

Candidature au Grand Prix de l'Académie Amorum 2002

Présentée par Catherine PEYROT DES GACHONS

**Recherches sur le potentiel aromatique des raisins
de *Vitis vinifera* L.cv Sauvignon blanc**

Thèse de Doctorat,
Faculté d'œnologie, Université Victor Ségalen Bordeaux

Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L.cv Sauvignon blanc

Catherine PEYROT DES GACHONS

Thèse de Doctorat, Faculté d'œnologie, Université Victor Ségalen Bordeaux

La recherche sur le potentiel aromatique des cépages blancs à saveur simple comme le Sauvignon blanc est innovante. Jusqu'ici, seul le potentiel aromatique des cépages muscatés, à travers l'étude des précurseurs d'arôme glycosylés, a fait l'objet de recherches approfondies. La récente identification de trois S-conjugués à la cystéine, précurseurs inodores des thiols volatils responsables de l'arôme du Sauvignon, a ouvert un nouveau champ de recherche.

L'exploitation de ces deux types de précurseurs d'arôme diffère radicalement. Les précurseurs glycosylés sont dégradés en arôme dans la baie ; ils sont relativement peu affectés par les mécanismes chimiques et enzymatiques naturels de la vinification et se retrouvent pratiquement intact dans les vins jeunes. A l'inverse, les précurseurs cystéinylés sont transformés en thiols volatils sous l'action de la levure. L'arôme variétal du Sauvignon blanc se développe donc entièrement pendant la fermentation alcoolique.

Ainsi, l'obtention d'un vin de Sauvignon typé dépend de la constitution du potentiel aromatique au cours de la maturation des raisins, de son extraction optimale pendant les opérations préfermentaires et de son exploitation par la fermentation alcoolique. Nos recherches se proposent de mettre en lumière plusieurs facteurs environnementaux, physiologiques et œnologiques influençant chacune de ces étapes. Elles portent également sur l'identification d'un S-conjugué au glutathion, composé essentiel dans la compréhension de la biosynthèse des précurseurs d'arôme cystéinylés chez *Vitis vinifera*.

Ce travail constitue la première étude approfondie sur le potentiel aromatique des raisins de Sauvignon blanc ; de plus, la présence des thiols volatils et de leur précurseur cystéinylé dans les vins et moûts de nombreux autres cépages blancs et rouges, lui confère une dimension plus large.

Introduction

De tous les grands cépages non muscatés, le Sauvignon blanc est aujourd'hui le seul dont l'arôme soit partiellement interprétable par l'analyse chimique. Les molécules responsables des nuances aromatiques caractéristiques des vins de ce cépage, ont été identifiées à des thiols volatils (Darriet *et al.*, 1995 ; Tominaga *et al.*, 1996, 1998c) et leurs précurseurs inodores aux S-conjugués à la cystéine correspondants (Tominaga *et al.*, 1998b). Il a été démontré par ailleurs que ces thiols volatils sont libérés au cours de la fermentation alcoolique, par clivage de la liaison soufre-carbone, sous l'action de la levure. Ainsi, il est maintenant établi que la 4mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP), à forte odeur de buis et d'eucalyptus, le 4-mercapto-4-méthylpentan-1-ol (4MMPOH), évoquant le zeste d'agrumes et le 3mercaptohexan-1-ol (3MH) aux nuances plus fruitées de pamplemousse et de fruit de la passion, sont libérés, respectivement, à partir de la S-4-(4-méthylpentan-2-one)-cystéine (P-4MMP), de la S-4-(4-méthylpentan-2-ol)-cystéine (P-4MMPOH) et de la S-3-(hexan-1-ol)-cystéine (P-3MH).

Si ces trois thiols volatils ne peuvent pas, à eux seuls, rendre compte de la complexité aromatique des grands vins de Sauvignon, ils n'en demeurent pas moins d'excellents marqueurs ; ils sont caractéristiques de l'arôme variétal et extrêmement odorants. Leurs seuils de perception dans l'eau sont compris entre 0,8 ng/L et 60 ng/L. Dans notre étude, nous avons donc considéré que les P-4MMP, P-4MMPOH et P-3MH représentaient le potentiel aromatique de ce cépage.

Le développement d'une méthode de dosage des précurseurs cystéinylés nous a permis d'étudier l'évolution du potentiel aromatique du Sauvignon blanc, au cours de la maturation des baies et de la vinification. Nous avons, plus particulièrement, étudié l'influence de l'alimentation hydrique de la vigne sur les teneurs en précurseurs dans le raisin, leur répartition dans la baie et leur extraction au cours de la macération pelliculaire, puis leur transformation au cours de la fermentation alcoolique. Par ailleurs, l'identification du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion, au cours de ces travaux de recherche, fournit des informations essentielles dans la compréhension de la biosynthèse des précurseurs d'arômes cystéinylés chez *Vitis vinifera*.

I Méthode de dosage des S-conjugués à la cystéine

L'idée originale de cette méthode réside dans la percolation de 20 mL de moût sur une colonne dont le ligand est une tryptophanase, enzyme capable de catalyser la dégradation des S-

conjugués à la cystéine en thiols volatils. L'extraction et le dosage des arômes ainsi libérés permettent de déterminer indirectement les teneurs en précurseurs.

Les premiers dosages, présentés par Tominaga (1998), ont été réalisés par extraction directe au dichlorométhane des thiols volatils libérés, avec addition en sortie de colonne tryptophanase d'un étalon externe ; l'extrait était ensuite analysés par CPG-FPD. Cependant, deux problèmes restaient à résoudre : détecter systématiquement les thiols volatils libérés, même lorsque les quantités de précurseurs initiales sont très faibles, et s'affranchir de l'influence de différents paramètres sur la révélation des arômes, notamment la baisse progressive d'activité de l'enzyme immobilisée au cours des percolations successives ou la présence éventuelle d'un inhibiteur.

Afin d'augmenter la fiabilité et la sensibilité du dosage des précurseurs cystéinylés, présents en quantités très variables selon le moût et surtout le précurseur considéré, il fut nécessaire d'effectuer l'analyse par couplage CPG-SM. Toutefois, l'extrait obtenu par extraction directe au dichlorométhane ne pouvait être analysé par CPG-SM car plusieurs acides gras parasitaient les spectres. L'addition d'une étape de purification des thiols volatils libérés, par combinaison à l'acide *p*-hydroxymercureux (*p*-HMB) adaptée de la méthode de dosage des arômes (Tominaga *et al.*, 1998), a donc été indispensable. Ensuite, afin de prendre en compte les pertes de thiols libérés, occasionnées par les étapes de purification mais aussi les problèmes inhérents à l'utilisation répétée d'une colonne d'enzyme immobilisée, l'étalon externe a été substitué par des étalons internes, additionnés dès la première étape du dosage. Ces étalons internes sont les analogues deutériés des précurseurs cystéinylés naturels.

L'efficacité de ces modifications fut vérifiée en simulant une « usure » de la colonne de tryptophanase. Dans ce but, nous avons fait varier le volume total du gel et ainsi modifié dans les mêmes proportions l'activité totale de la colonne. Un même moût est donc percolé successivement sur trois volumes différents d'un même gel initial. La figure 1 montre que si l'abondance du pic de 4MMP naturelle (Hs) diminue de façon linéaire, en revanche, le rapport des abondances du pic de 4MMP naturelle et du pic de son analogue deutérié (Hs/Hei) demeure identique. Il en est de même pour le 4MMPOH et le 3MH. Ainsi nous disposons maintenant d'une méthode de détermination des teneurs en précurseurs, par dilution d'isotopes stables, efficace dans le moût, mais également dans le vin et les tissus végétaux (Peyrot des Gachons *et al.*, 2000).

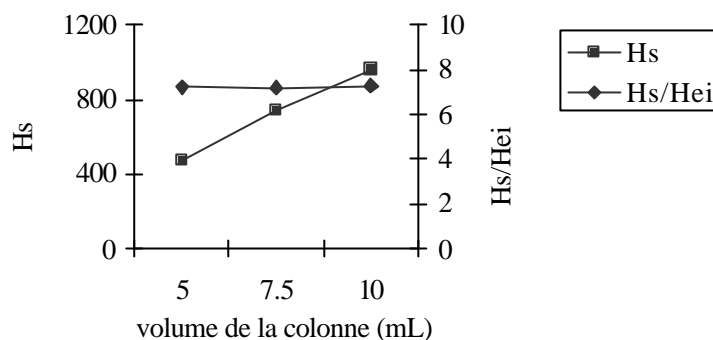


Figure 1 : Influence du volume de gel de tryptophanase immobilisée sur l'abondance de la 4MMP naturelle libérée (Hs) et sur le rapport des abondances de la 4MMP naturelle et de la 4MMP deutériée (Hs/Hei).

II Influence de l'alimentation hydrique de la vigne sur le potentiel aromatique des raisins de Sauvignon blanc

A travers l'étude pédologique et agronomique de quatre parcelles situées dans le vignoble des Graves, nous avons essayé d'apprécier l'influence de l'alimentation hydrique sur le potentiel aromatique du Sauvignon. Cette étude a été menée en collaboration avec le laboratoire d'Agronomie de l'INRA de Bordeaux et l'ENITA de Bordeaux.

II.1 Description des parcelles d'étude et caractérisation de l'alimentation hydrique des vignes au cours des millésimes 1998 et 1999

La première parcelle (SG), sablo-graveleuse, présente deux zones bien distinctes. Seul le premier horizon (0 à 50 cm), sableux, est colonisé par les racines ; au-delà, la compacité de la structure limite très fortement le développement racinaire. La deuxième parcelle (GS), gravelo-sableuse, est caractérisée par des graves profondes, donc drainante, et est dotée d'un enracinement moyen. La troisième parcelle (SA/CT), sablo-argileuse sur calcaire tendre, possède des horizons riches en argile peu perméable et un enracinement profond. La quatrième parcelle (SA/CD), présentant une texture sablo-argileuse sur les 60 premiers centimètres, repose sur une

dalle calcaire. La colonisation des racines est stoppée par la roche mais au cours de la période estivale, l'eau migre par capillarité à partir du calcaire poreux et réapprovisionne ainsi régulièrement le sol.

Dans cette étude, le niveau d'hydratation de la plante a été estimé par la mesure du potentiel foliaire de base (Scholander *et al.*, 1965). Cette mesure est effectuée avant le lever du soleil, lorsque la plante a reconstitué sa réserve en eau ; à cette période, son potentiel hydrique est proche de celui du sol dans les horizons exploités par les racines. Lorsque la valeur est inférieure à $-0,3$ Mpa, on estime que la vigne subit un stress hydrique (Smart et Coombe, 1983).

En 1998, les potentiels foliaires de base mesurés sur les quatre parcelles ont constamment diminué sur la période considérée (figure 2). Début juillet, le potentiel foliaire était faiblement négatif sur toutes les parcelles, mais dès la fin juillet deux types de comportement se sont différenciés : les vignes implantées sur les sols graveleux (SG et GS) subissaient un stress hydrique important, surtout sur la parcelle SG, alors que les vignes situées sur les sols argilo-calcaires (SA/CT et SA/CD) bénéficiaient d'une alimentation en eau peu limitante malgré les conditions de sécheresse relative du millésime. En 1999, comme pour l'été précédent, toutes les parcelles présentaient les mêmes potentiels foliaires en début de saison, puis deux groupes se sont distingués. Les valeurs mesurées sur les parcelles argilo-calcaires sont restées très faiblement négatives sur toute la durée du cycle végétatif, à aucun moment l'alimentation en eau n'est devenue limitante. Les potentiels foliaires des vignes implantées sur les sols graveleux étaient plus négatifs, cependant seule la parcelle SG a subi un stress hydrique au cours de ce millésime.

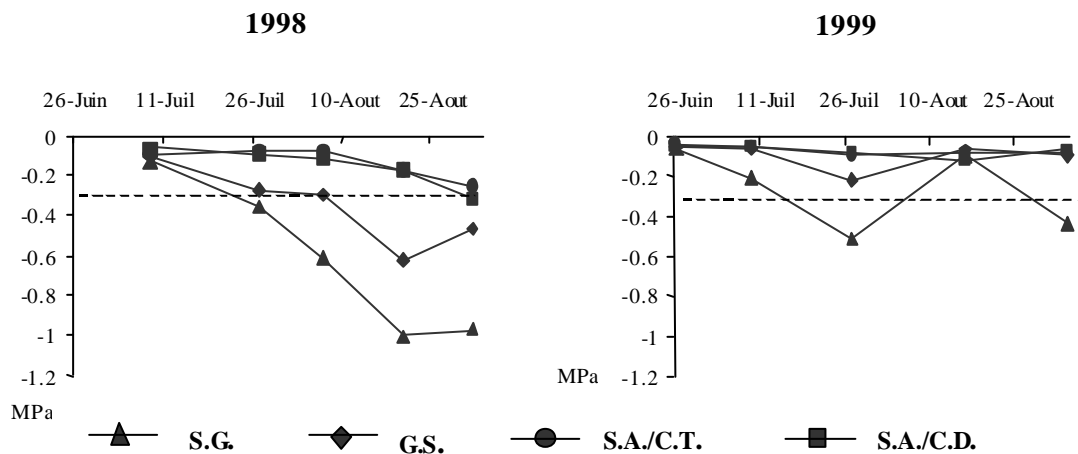


Figure 2 : Evolution des potentiels foliaires de base en 1998 et 1999.
Seuil de stress hydrique (---).

II.2 Teneurs en précurseurs cystéinylés dans les raisins, à la récolte

Si l'on détermine les teneurs en précurseur dans les raisins à maturité (figure 3), on constate que les précurseurs cystéinylés sont plus abondants dans les raisins des parcelles argilo-calcaires en 1998, alors qu'à l'inverse, en 1999, leur teneur est plus élevée dans ceux des parcelles graveleuses. Cette tendance est peu marquée pour le P-3MH, excepté sur la parcelle SA/CD en 1998, mais elle est bien visible pour le P-4MMP.

Si l'on compare ces valeurs, pour chaque année, aux potentiels foliaires de base, on observe qu'au cours d'une année sèche, comme 1998, le sol SG, à faible capacité de rétention en eau, ne peut fournir à la vigne l'alimentation hydrique nécessaire à l'obtention d'un potentiel aromatique élevé. En revanche, les sols argilo-calcaires, pourvus d'une plus grande réserve en eau, semblent mieux convenir. Cependant avec des régimes hydriques proches, le potentiel aromatique des raisins issus de ces deux parcelles sont différents. Le potentiel aromatique plus faible mesuré sur la parcelle SA/CT pourrait s'expliquer par la forte carence azotée observée sur ces vignes. Des expériences complémentaires menées par X. Choné (2001) semblent confirmer cette hypothèse. En année pluvieuse, comme 1999, les parcelles graveleuses fournissent des raisins plus riches en précurseurs cystéinylés. Dans ce cas, l'alimentation en eau continue et régulière des parcelles argilo-calcaires paraît moins propice à l'obtention de raisins à fort potentiel aromatique.

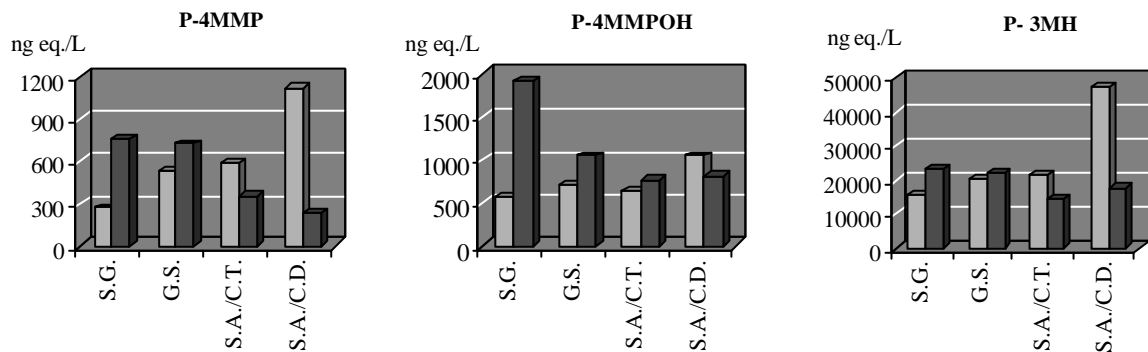


Figure 3 : Teneurs en précurseurs cystéinylés (ng eq de thiols/L) dans le moût, à la récolte, en 1998 (■) et 1999 (■).

En conclusion, une contrainte hydrique modérée semble favoriser un enrichissement des baies en précurseurs d'arôme, tandis qu'un stress hydrique important et prolongé semble préjudiciable à la qualité aromatique du raisin.

III Localisation des précurseurs cystéinylés dans les raisins de Sauvignon blanc. Effet de la macération pelliculaire sur le potentiel aromatique des moûts

Les monoterpènes et les norisoprénoïdes existent dans la baie sous forme libre et liée et sont localisés principalement dans la pellicule (Wilson *et al.*, 1986). Cependant, seules leurs formes libres sont responsables de l'arôme des vins de cépage type muscat, car en l'absence de traitements enzymatiques exogènes, la fraction liée n'est que peu hydrolysée au cours de la fermentation alcoolique (Gunata *et al.*, 1986). En revanche, les thiols volatils sont libérés pendant la fermentation alcoolique. Ainsi, l'arôme des vins de Sauvignon blanc dépend avant tout du pool de précurseurs présent dans le moût. Il est donc particulièrement intéressant de connaître la localisation de ces composés dans la baie, notamment pour interpréter les conséquences des opérations préfermentaires.

III.1 Localisation des précurseurs cystéinylés dans une baie de Sauvignon

Les concentrations en précurseurs d'arôme (en ng eq. de thiols/g de matière fraîche) ont été déterminées dans les différentes parties de la baie, à différents stades de son développement. Deux fractions seulement ont été considérées : la pellicule et le jus ; en effet, les teneurs en précurseurs trouvées dans les pépins étaient négligeables. En tenant compte des proportions respectives (g de matière fraîche) de jus et de pellicule, nous avons évalué la répartition des différents précurseurs dans la baie de raisin (figure 4).

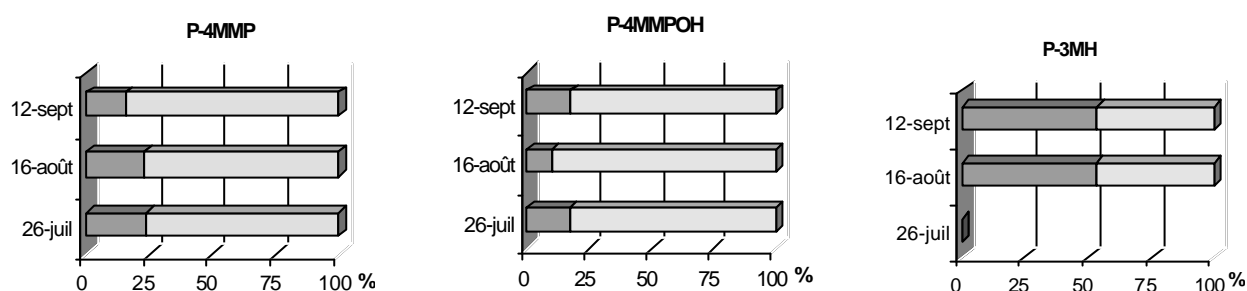


Figure 4. Répartition des précurseurs cystéinylés dans la baie de Sauvignon blanc au cours de son développement : début véraison (26/7), véraison + 10 jours (16/8), maturité (12/9) ; pellicule (■), jus (□).

On constate que le P-4MMP et le P-4MMPOH sont principalement localisés dans le jus (80% environ) alors que le P-3MH est réparti également entre les deux compartiments ; de plus, on observe que cette distribution ne dépend pas du stade de développement de la baie. La localisation dans la baie de Sauvignon des précurseurs cystéinylés diffère donc sensiblement selon le thiol volatil considéré.

III.3 Effet de la macération pelliculaire sur le potentiel aromatique du moût

Evolution des teneurs en précurseurs cystéinylés dans le jus au cours de la macération pelliculaire.

Les précurseurs cystéinylés ont été dosés dans des prélèvements de jus effectués au cours d'une macération pelliculaire à 18°C, réalisée dans une microcuve au laboratoire (figure 5). Dès le foulage, avant macération, les trois précurseurs sont déjà présents dans le jus. Au cours de la

macération, les teneurs en précurseurs augmentent mais dans des proportions différentes. Après 7h de macération, les concentrations en P-4MMP et P-4MMPOH restent stables. En revanche, la quantité de P-3MH dans le jus continue de s'accroître, ce qui signifie que les parties solides des raisins peuvent encore enrichir la fraction liquide en ce composé. En fin de macération (19h), on observe un accroissement de 20% pour le P-4MMPOH, 30% pour le P-4MMP et 50% pour le P-3MH. La macération pelliculaire du Sauvignon blanc permet donc une augmentation des teneurs en précurseurs d'arômes dans le jus ; cependant, elle favorise surtout l'enrichissement du moût en P-3MH.

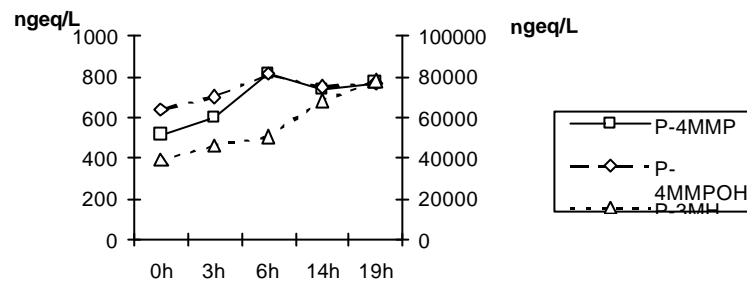


Figure 5. Evolution de la teneur en précurseurs cystéinylés dans le jus au cours d'une macération pelliculaire à 18°C.

Influence de la température de macération pelliculaire sur les teneurs en précurseurs cystéinylés dans le moût.

Les teneurs en précurseurs d'arômes ont également été déterminées dans des moûts obtenus par pressurage direct (témoin) ou après macération pelliculaire à 10°C ou à 18°C (figure 6). Par rapport à un pressurage immédiat, la macération pelliculaire modifie relativement peu les quantités de P-4MMP et P-4MMPOH dans le moût. Quelque soit la température de macération, elle ne permet que d'augmenter modestement ces composés par rapport au moût non macéré. Par contre, elle procure un enrichissement important du moût en P-3MH, dont l'arôme correspondant est responsable des nuances de pamplemousse et fruit de la passion des vins de Sauvignon. Une température de macération basse limite cet apport en P-3MH, vraisemblablement en diminuant l'extraction des constituants des parties solides. La différence de comportement entre les P-4MMP et P-4MMPOH d'une part et les P-3MH d'autre part s'explique par la différence de leur localisation dans la baie (Peyrot des Gachons *et al.*, 2002).

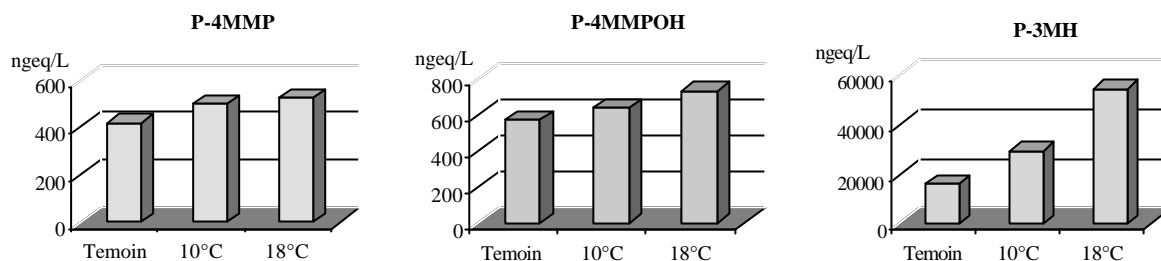


Figure 6. Teneurs en précurseurs cystéinylés dans des moûts obtenus par pressurage direct (témoin) ou après macération pelliculaire de 18h à 10°C ou à 18°C.

IV Transformation du potentiel aromatique en arômes variétaux

Dans un milieu modèle de fermentation, la libération de 3MH est proportionnelle à la concentration initiale en P-3MH (Tominaga, 1998a). Cependant, on peut se demander si cette proportionnalité est conservée dans un milieu plus complexe comme le moût où de nombreux constituants peuvent intervenir sur l'assimilation par la levure du composé cystéinylé, l'activation ou l'inhibition du système enzymatique impliqué dans la dégradation des précurseurs ou encore la stabilité chimique des thiols volatils libérés ?

IV.1 Pourcentage de transformation des précurseurs en arômes au cours de la fermentation alcoolique

La 4MMP, le 4MMPOH et le 3MH ont été dosés dans 15 vins, un mois après la fin de la fermentation alcoolique. Parallèlement, les teneurs initiales en précurseurs ont été déterminées dans les moûts correspondants. On constate que les teneurs en S-conjugués à la cystéine sont largement supérieures à celles en thiols volatils. Les pourcentages de transformation des précurseurs en arôme sont tous très faibles ; le pourcentage moyen est égal à 1,4 % pour le P-4MMP, 3,0 % pour le P-4MMPOH et 4,2 % pour le P-3MH.

Ainsi, la majeure partie des précurseurs cystéinylés ne se transforme pas en arôme. Cette constatation appelle plusieurs hypothèses : soit la quantité de précurseurs disparus (transformés

ou non en arôme) est très faible, soit l'arôme libéré est majoritairement métabolisé par la levure ou très instable dans le vin en fermentation.

IV.2 Disparition des précurseurs au cours de la fermentation alcoolique

Afin de déterminer la proportion de précurseurs disparus au cours de la fermentation alcoolique (transformés ou non en arôme) les S-conjugués à la cystéine ont été dosés dans des vins, avant et après fermentation alcoolique. La différence entre les teneurs initiales en précurseurs dans le moût et celles restantes dans le vin permet de calculer le pourcentage de disparition des S-conjugués à la cystéine. Si l'on compare ces pourcentages avec les pourcentages de transformation de ces composés en arôme dans ces mêmes vins, on constate que quasiment dans tous les cas, la majorité des précurseurs disparus n'est pas transformé en arôme (résultats non montrés). Toutefois, les teneurs en précurseurs disparus sont significativement corrélées à celles en thiols volatils libérés (figure 7).

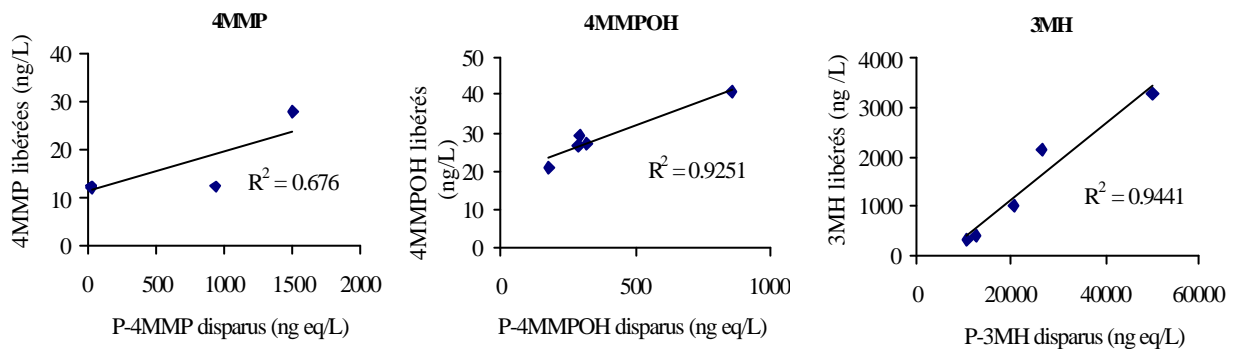


Figure 7 : Corrélation entre les précurseurs cystéinylés disparus (ng eq/L) et les thiols volatils libérés (ng/L) dans le vin (n=5).

Il est important de souligner que les pourcentages de disparition diffèrent à la fois selon le précurseur et le vin considéré. Ainsi, d'autres constituants dans le moût doivent influencer fortement l'assimilation et/ou la dégradation de chaque précurseur. Pour comprendre ces phénomènes, il serait nécessaire d'élucider la nature et les propriétés des enzymes de la levure assurant la transformation des précurseurs cystéinylés en arôme.

V Identification du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion dans le moût de Sauvignon. Hypothèse sur la voie de biosynthèse du P-3MH chez *Vitis vinifera*.

La voie de biosynthèse des S-conjugués à la cystéine dans la vigne est jusqu'ici totalement inconnue. Certains S-conjugués à la cystéine, présents dans les organes de plantes et d'animaux, sont des produits intermédiaires du système de détoxification des organismes vivants ; ils sont issus de la dégradation de S-conjugués au glutathion correspondants, selon les réactions enzymatiques présentées dans la figure 8. Dans le but de progresser dans la compréhension de la voie de biosynthèse de S-conjugués à la cystéine du Sauvignon blanc, nous avons examiné la présence éventuelle dans le moût de S-conjugués au glutathion correspondants.

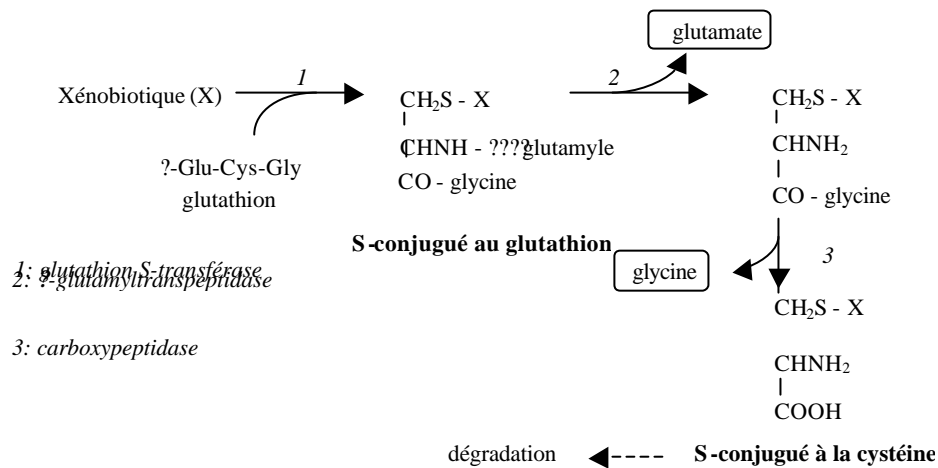


Figure 8: Voie d'élimination de xénobiotiques chez les plantes et les animaux.

V.1 Identification du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion

Les teneurs en S-conjugués à la cystéine ont été déterminés dans trois moûts de Sauvignon et un moût de Gros Manseng avant et après la percolation sur une colonne de γ -glutamyltranspeptidase, préparée selon le même protocole que la colonne de tryptophanase. La percolation sur cette colonne entraîne une augmentation de la teneur en P-3MH dans tous les moûts analysés ; le pourcentage d'augmentation en P-3MH est particulièrement élevé (637 %) dans le moût de Gros Manseng et varie de 49 à 71% dans les moûts de Sauvignon. En revanche, elle n'a aucun effet sur les teneurs en P-4MMP et P-4MMPOH. Ce phénomène laisse fortement envisager la présence dans le moût du 3MH sous forme d'un conjugué γ -glutamylcystéinyle.

Cependant, l'existence éventuelle d'un conjugué glutathionylé n'est pas à éliminer dans l'hypothèse d'une activité contaminante de carboxypeptidase dans la préparation commerciale de γ -glutamyltranspeptidase utilisée.

La technique que nous avons utilisée pour l'identification, est la LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry) ; cette technique permet de déterminer la masse moléculaire des composés présents dans l'échantillon. Ainsi, un extrait brut de précurseurs d'arôme de sauvignon (EBPAS) préparé à partir d'une grande quantité de moût de Sauvignon, a été purifié, puis analysé par LSIMS basse résolution (figure 9a). Sur le spectre de masse, on observe le pic 222 qui correspond au $[M + H]^+$ du P-3MH (PM=221), et le pic 408 qui pourrait correspondre au S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (PM=407). La spécificité de la γ -glutamyltranspeptidase vis à vis de son substrat permet de vérifier l'identité du composé correspondant au pic 408. L'analyse par LSIMS basse résolution de l'EBPAS incubé 1h avec 100 μ L du gel de γ -glutamyltranspeptidase précédemment utilisé, montre la diminution du pic 408 et l'apparition du pic 279 (figure 9b), ce qui témoigne de la transformation enzymatique du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion, par élimination de l'acide glutamique, en S-3-(hexan-1-ol)-cystéinyglycine (PM=278). L'existence du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion dans le moût est donc très vraisemblable. De plus, le fait que le pic 279 ne soit pas présent dans l'échantillon d'EBPAS, avant l'incubation avec la γ -glutamyltranspeptidase laisse supposer que la S-3-(hexan-1-ol)-cystéinyglycine n'existe pas naturellement dans le moût.

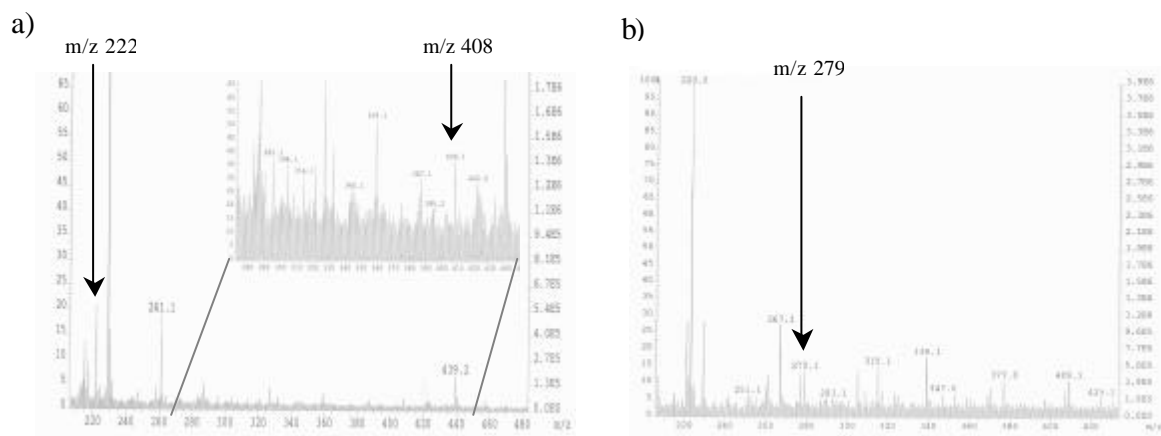


Figure 9: Spectres de masse obtenus par analyse LSIMS basse résolution de l'extrait brut de précurseurs d'arôme du Sauvignon (EBPAS) purifié non traité (a) et traité par la γ -glutamyltranspeptidase (b).

L'identification définitive du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion dans l'EBPAS de Sauvignon blanc a été réalisée par LSIMS haute résolution. Dans ce cas, la masse moléculaire du composé correspondant au pic 408 est mesurée très précisément dans l'échantillon d'EBPAS purifié, puis comparée à des masses moléculaires calculées à partir de différentes formules brutes. La masse mesurée du pic 408 (408,180239) est très proche de la masse calculée pour la formule brute $C_{16}H_{30}N_3O_7S_1$ (408,180448 ; + 0,5 ppm). Cette formule brute correspond au S-3-(hexan-1-ol)-glutathion (Peyrot des Gachons *et al.*, à paraître).

V.2 Discussion et conclusion

L'identification de ce composé, par LSIMS, n'a été réalisée que dans le moût de Sauvignon blanc. Cependant, la présence du S-conjugué au glutathion dans le moût de Gros Manseng est très vraisemblable, compte tenu de la forte augmentation de la teneur en S-conjugué à la cystéine dans le moût après percolation sur la colonne de γ -glutamyltranspeptidase. Par ailleurs, la présence du 3MH dans de nombreux vins blancs et rouges de *Vitis vinifera* (Tominaga *et al.*, 2000 ; Bouchilloux, 1998), ainsi que celle de son précurseur cystéinylé correspondant dans les moûts (Murat *et al.*, 2001) laisse envisager la coexistence dans ces raisins du S-conjugué au glutathion.

Dans le règne végétal, mais également animal, les S-conjugués à la cystéine coexistent souvent avec les S-conjugués au glutathion correspondants. Les S-conjugués au glutathion sont généralement impliqués dans le système de détoxification des organismes vivants. Le composé toxique à éliminer (endogène ou exogène) est conjugué au glutathion par la S-glutathion transférase, puis le produit formé est dégradé par la γ -glutamyltranspeptidase qui élimine l'acide glutamique et une carboxypeptidase qui élimine la glycine, formant ainsi un S-conjugué à la cystéine (Jakoby, 1984). Marrs *et al.* (1995) suggèrent que certaines anthocyanes sont reconnues, conjuguées au glutathion, puis transportées et métabolisées dans la vacuole, en réponse à la toxicité de la quercitine, un intermédiaire dans la voie de biosynthèse de ces pigments ; il en est de même pour de nombreux autres S-conjugués au glutathion (Wolf *et al.*, 1996). La localisation préférentielle du P-3MH dans les cellules de la pellicule des raisins de Sauvignon, dotées de larges vacuoles, et la coexistence dans le moût de la P-3MH et du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion

pourrait signifier que le P-3MH soit impliqué dans la voie catabolique des S-conjugués au glutathion, responsable de la détoxification cellulaire.

Conclusion générale et perspectives

Notre méthode de dosage des précurseurs cystéinylés, par dilution d'isotopes stables, est basée sur l'analyse des thiols volatils correspondants, libérés par percolation du moût sur une colonne de tryptophanase immobilisée. Cette méthode de détermination du potentiel aromatique des raisins de Sauvignon, nous a permis de mettre en évidence les phénomènes suivants.

Les teneurs en précurseurs dans le raisin dépendent du S-conjugué à la cystéine considéré, mais aussi des conditions climatiques. L'alimentation en eau joue un rôle essentiel sur le potentiel aromatique du Sauvignon. Une contrainte hydrique modérée favorise un enrichissement des baies en précurseurs cystéinylés, tandis qu'un stress hydrique important est préjudiciable. Par ailleurs, une carence en azote semble diminuer le potentiel aromatique.

La distribution dans la baie des trois précurseurs diffère selon le précurseur considéré : 80% des P-4MMP et P-4MMPOH sont localisés dans le jus et plus de 50 % du P-3MH se situent dans la pellicule. Par conséquent, la macération pelliculaire accroît le potentiel aromatique du moût, mais elle a une incidence essentiellement sur la teneur en P-3MH dans le moût.

Les thiols volatils, sont libérés à partir de leur précurseur sous l'action de la levure. La révélation du potentiel aromatique cystéinylé dépend donc entièrement de la fermentation alcoolique. Le taux de transformation des précurseurs en arôme pendant la fermentation alcoolique est très faible. La vinification n'exploite qu'une modeste partie du potentiel aromatique du raisin. De plus, le taux de dégradation des précurseurs varie fortement en fonction de la composition du moût.

Nos travaux ont également permis d'identifier pour la première fois le S-3-(hexan-1-ol)-glutathion dans le moût de Sauvignon. L'identification de ce composé fournit des informations importantes sur la voie de biosynthèse du P-3MH, car les S-conjugués au glutathion sont impliqués dans les voies de détoxification chez les organismes vivants.

Notre travail ouvre la voie à de nouvelles recherches dans l'enzymologie des levures et la biosynthèse des précurseurs d'arôme cystéinylés dans la vigne.

- Les constituants du moût influençant l'assimilation et la dégradation des S-conjugués à la cystéine par la levure doivent être déterminés.

- La nature et les propriétés de(s) enzyme(s) de la levure assurant la transformation des précurseurs cystéinylés en arôme restent à élucider.

- L'implication des S-3-(hexan-1-ol)-glutathion et S-3-(hexan-1-ol)-cystéine dans le système de détoxification de la vigne doit être étudiée. Dans ce but une méthode de dosage du S-3-(hexan-1-ol)-glutathion doit être mise au point.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AERNY J., 1996. Composés azotés des moûts et des vins. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **28**, 3, 161-165.

AGENBACH W. A., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. In *Processing of South African Society for Enology and Viticulture*, Cap Town, South Africa, Stellenbosh.

ARNOLD R. A., NOBLE A. C., 1979. Effect of pomace contact on the flavor of chardonnay wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 3, 179-181.

ARNOLD W. N., THOMPSON J. F., 1962. The formation of (+) S-methyl-L-cysteine sulfoxide from S-methyl-L-cysteine in crucifers. *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 604-606.

AUGUSTYN O. P., RAPP A., VAN WYCK C. J., 1982. Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* L. cv. sauvignon blanc. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **3**, 53-60.

AYRAN A. P., WILSON B., STRAUSS C. R., WILLIAMS P. J., 1987. The properties of glycosidases of *Vitis vinifera* and a comparison of their glycosidase activity with that of exogenous enzymes. An assesment of possible applications in enology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 182-188.

BAVARESCO L., 1995. Utilisation d'un compteur non destructif pour déterminer la concentration de chlorophylle dans les feuilles de vigne. *Bull. O.I.V.*, **771-772**, 406-414.

- BAYONOVE C., CORDONNIER R., DUBOIS P., 1975. Etude d'une fraction caractéristique de l'arôme du raisin de la variété Cabernet-sauvignon ; mise en évidence de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D.*, **281**, 75-78.
- BAYONOVE C., GUNATA Z., CORDONNIER R., 1984. Mise en évidence de l'intervention des enzymes dans le développement de l'arôme du jus de muscat avant fermentation : la production des terpénoles. *Bull. O.I.V.*, 741-758.
- BERHANE K., WIDERSTEN M., ENGSTROM A., KOZARICH J. W., MANNERVICK B., 1994. Detoxification of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 4, 1480-1484.
- BIRON C., CORDONNIER R., GLORY O., SAPIS J. C., 1988. Etude dans le raisin de l'activité glycosidase. *Conn. Vigne Vin*, **22**, 125-134.
- BOISSENOT E., 1997. Incidences du climat, des sols et du comportement de la vigne sur les caractères organoleptiques des vins rouges du Haut-Médoc. Relation avec la maturation du raisin. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- BOUCHILLOUX P., DARRIET P., HENRY R., LAVIGNE CRUEGE V., DUBOURDIEU D., 1998. Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3095-3099.
- BOURBOULOUX A., SHAHI P., CHAKLADAR A., DELROT S., BACHHAWAT A. K., 2000. Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 275, **18**, 13259-13265.
- BOYLAND E., CHASSEAUD L. F., 1967. Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem. J.*, **104**, 95-102.
- BRUNS C. M., HUBATSCH I., RIDDERSTROM M., MANNERVIK B., TAINER J. A., 1999. Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *J. Mol. Biol.*, **288**, 3, 427-439.
- CAMBELL R. J., MOBLEY K. N., MARINI R. P., PFEIFFER D. G., 1990. Growing conditions alter the relationship between S.P.A.D.-501 values and apple leaf chlorophyll. *Hort. Science*, **25**, 330-331.
- CARBONNEAU A., MOUEIX A., LECLAIR N., RENOUX J. L., 1991. Proposition d'une méthode de prélèvements de raisins à partir de l'analyse de l'hétérogénéité de maturation sur un cep. *Bull. O.I.V.*, **727-728**, 679-690.
- CHAMPAGNOL F., 1984. Eléments de physiologie de la vigne et de viticulture. Champagnol F. Ed., Saint Gély du Fesc.
- CHATONNET P., LAVIGNE V., DUBOURDIEU D., BOIDRON J. N., 1992. Identification et dosage de certains composés soufrés volatils lourds dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Sci. Aliments*, **12**, 513-532.

- CHONE X., 2001. Contribution à l'étude des terroirs de Bordeaux : Etude des déficits hydriques modérés, de l'alimentation en azote et de leurs effets sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L.cv. Sauvignon blanc. Thèse de doctorat de l'Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- CONKLIN P. L., LAST R. L., 1995. Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol.*, **109**, 203-212.
- CORDONNIER R., BAYONOVE C., 1974. Mise en évidence dans la baie de raisin, var. muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés, révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *C.R. Acad. Sci.* 278, série D, 3387-3390.
- CORDONNIER R., BAYONOVE C., 1981. Etude de la phase préfermentaire de la vinification : extraction et formation de certains composés de l'arôme ; cas des terpénols, des aldéhydes et des alcools en C6. *Conn. Vigne. Vin*, **15**, 4, 269-286.
- CORDONNIER R., GUNATA Z., BAUMES R., BAYONOVE C., 1989. Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolyse des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin. *Conn. Vigne Vin*, **23**, 7-23.
- CRAIG H., 1957. Isotope standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochem. Cosmochim. Acta*, **12**, 133.
- DARRIET P., LAVIGNE V., BOIDRON J. N., DUBOURDIEU D., 1991. Caractérisation de l'arôme variétal des vins de sauvignon par couplage chromatographie en phase gazeuse-odométrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **25**, 3, 167-174.
- DARRIET P., 1993. Recherche sur l'arôme et les précurseurs d'arôme du sauvignon. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- DARRIET P., TOMINAGA T., DEMOLE E., DUBOURDIEU D., 1993. Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* (var. sauvignon) d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. *C.R. Acad. Sci. Paris, Biologie et pathologie végétale*, **316**, 1332-1335.
- DARRIET P., TOMINAGA T., LAVIGNE V., BOIDRON J. N., DUBOURDIEU D., 1995. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines : 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. *Flavour and Fragr. J.*, **10**, 385-392.
- DELAS J., MOLOT C., SOYER J. P., 1991. Effects of nitrogen fertilization and grafting on the yield and quality of the crop of *Vitis vinifera* cv. Merlot. In *Proceedings of the Int. Symp. on Nitrogen in Grapes and Wines*. J. Rantz Ed., Am. Soc. Enol. Vitic., Davis. 242-248.
- DI STEFANO R., MAGGIOROTTO G., 1993. Différences entre la composition terpénique des cépages aromatiques. In *Actes du Symposium International « Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins »*, Montpellier, Rev. Fr. Œnologie Ed., 107-112.
- DUBOURDIEU D., OLLIVIER C., BOIDRON J. N., 1986. Incidence des opérations préfermentaires sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins blancs secs. *Conn. Vigne Vin*, **20**,1, 53-76.

- DUTEAU J., 1976. Le vignoble des Côtes de Bourg. Les sols et le climat. Influence sur la croissance des sarments et sur la maturation du raisin. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- ELLMAN G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- FARQUHAR G. D., HUBICK K. T., CONDON A. G., RICHARDS R.A., 1988. Carbon isotope fractionation and plant water use efficiency. In *Stable Isotopes in Ecological Research*, Rundel P. W., Ehleringer J. R., Nagy K. A. Eds., Springer Verlag New York. 21-40.
- FOWDEN L., 1963. The chemistry and metabolism of recently isolated amino acids. *Annu. Rev. Biochem.*, **33**, 173-204.
- FUKUDA A., NAKAMURA Y., OHIGASHI H., OSAWA T., UCHIDA K., 1997. Cellular response to the redox active lipid peroxidation products : induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 2, 505-509.
- FUKUI S., IKEDA S., FUJIMARA M., YAMADA H., KUMAGAI H., 1975. Comparative studies on the properties of tryptophanase and tyrosinase phenol-lyase immobilized directly on Sepharose or by use of Sepharose-bound pyridoxal 5'-phosphate. *Eur. J. Biochem.*, **51**, 155-164.
- GAUDILLERE J.P., VAN LEEUWEN C., OLLAT N., GOUTOULY J.P., CHAMPAGNOL F., 1999. ¹³C/¹²C discrimination measured in tartrate and sugars in mature grapevine berries. Proc. 1st ISHS Workshop on Water Relations of Grapevines. Rühl E. H., Schmid J Eds.. *Acta Hort.*, **493**, 63-67.
- GONZALO SEPULVEDA R., KLIWER W. M., 1983. Estimation of leaf area of two grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) using lamina linear measurements and fresh weight. *Am. J. Enol. Vitic.*, **34**, 4,221-226.
- GOORE M. Y., THOMPSON J. F., 1967. ?-glutamyl transpeptidase from kidney bean fruit. I. Purification and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta*, **132**, 15-26.
- GUDEWAR M. B., DAUTERMAN W. C., 1979. Purification and properties of a glutathione-S-transferase from corn which conjugates S-triazine herbicides. *Phytochemistry*, **18**, 735-740.
- GUILLOUX M., 1981. Evolution des composés phénoliques de la grappe pendant la maturation du raisin. Influence des facteurs naturels. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- GUNATA, Y. Z., 1984. Recherches sur la fraction liée de nature glycosidique de l'arôme du raisin : importance des terpénylglycosides, action des glycosidases. Thèse Docteur Ingénieur, Université Sciences et Technique du Languedoc.

- GUNATA, Y. Z., BAYONOVE C., BAUMES R., CORDONNIER R., 1985. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv. Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **36**, 857-862.
- GUNATA Y. Z., BAYONOVE C., BAUMES R., CORDONNIER R., 1986. Stability of free and bound fractions of some aroma components of grapes cv. muscat during the wine processing : preliminary results. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 2, 112-114.
- GUNATA Y. Z., BIRON C., SAPIS J. C., BAYONOVE C., 1989. Glycosidase activities in sound and rotten grapes in relation to hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides. *Vitis*, **28**, 191-197.
- GUNATA Y. Z., DUGELAY I., SAPIS J. C., BAUMES R., BAYONOVE C., 1990. Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification : libération de l'arôme à partir de précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **24**, 3, 133-144.
- GUNATA Y. Z., 1993. Progress in Flavour Precursor studies. Schreier P., Winterhalter P. Eds. ; Würzburg, Octobre 1992.
- HARBONE J. B., 1986. The natural distribution in angiosperms of anthocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids. *Phytochemistry*, **25**, 1887-1894.
- HASHIZUME K., SAMUTA T., 1997. Green odorants of grape cluster stem and their ability to cause a wine stemmy flavor., *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1333-1337.
- HIRATA E., TAKAHASHI H., 1981. Degradation of methyl mercury glutathione by the pancreatic enzymes in bile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **58**, 483-491.
- HOCH J. A., SIMPSON F.J., DEMOSS R.D., 1966. Purification and some properties of tryptophanase from *Bacillus alvei*. *Biochemistry*, **5**, 7, 2229-2237.
- HODGES D. M., FORNEY C. F., 2000. The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *J. Exp. Bot.*, **51**, 344, 645-655.
- JAKOBY W. B., KETTERER B., MANNERVICK B., 1984 a. Glutathione transferases : nomenclature. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2539-2540.
- JAKOBY W. B., STEVENS J., DUFFEL M. W., WEISIGER R. A., 1984 b. The terminal enzymes of mercapturate formation and the thiomethyl shunt. *Rev. Biochem. Toxicol.*, **6**, 97-115.
- KATAOKA H., TAKAGI K., MAKITA M., 1995. Determination of glutathione and related aminothiols by gas chromatography with flame photometric detection. *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 85-89.
- KEAN E. A., HARE E. R., 1980. γ -glutamyl transpeptidase of ackee plant. *Phytochemistry*, **19**, 199-203.
- KEPPLER D., 1999. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 985-991.

- KINZER G., SCHREIER P., 1980. Influence of different pressing systems on the composition of volatile constituents in unfermented grape musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **31**, 7-13.
- KRENGEL U., SCHROTER K. H., HOIER H., ARKEMA A., KALK K. H., ZIMNIAK P., DIJKSTRA B. W., 1998. Crystal structure of a murine alpha-class glutathione S-transferase involved in cellular defense against oxidative stress. *FEBS Lett.*, **422**, 3, 285-290.
- LACEY M. J., ALLEN M.S., HARRIS R. L., BROWN W. V., 1991. Methoxypyrazines in sauvignon blanc grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 103-108.
- LAMOUREUX G. L., RUSNESS D. G., 1981. Catabolism of glutathione conjugates of pesticides in higher plants. Dans *Sulfur in pesticide action and metabolism*, Rosen J. D., Magee P. S., Casida J. E., Eds, ACS Symposium series, **158**, 133-164.
- LAMOUREUX G. L., RUSNESS D. G., 1987. EPTC metabolism in corn, cotton and soybean: identification of a novel metabolite derived from the metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 1, 1-7.
- LARSEN G. L., 1985. Distribution of cysteine conjugate γ -lyase in gastrointestinal bacteria and in the environment. *Xenobiotica*, **15**, 3, 199-209.
- LARSEN G. L., STEVENS J. L., 1986. Cysteine conjugate γ -lyase in the gastrointestinal bacterium *Eubacterium limosum*. *Mol. Pharmacol.*, **29**, 97-103.
- LATEYRON C., 1983. Vinification et étude de la macération des moûts blancs dans une cave Californienne. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- LEAVITT J. R., PENNER D., 1979. In vitro conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 3, 533-536.
- LORENZINI F., 1996. Teneurs en azote et fermentescibilité des moûts de chasselas. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, **28**, 3, 169-174.
- MARAIS J., 1987. Terpene concentrations and wines quality of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer as affected by grape maturity and cellar practices. *Vitis*, **26**, 231-245.
- MARRS K. A., ALFENITO M. R., LLOYD A. M., WALBOT V., 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature*, **375**, 397-400.
- MARTINOIA E., GRILL E., TOMMASINI R., KREUZ K., AMRHEIN N., 1993. ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, **364**, 247-249.
- MASNEUF I., DUBOURDIEU D., 1994. Comparaison de deux techniques d'identification des souches de levures de vinification basées sur le polymorphisme de l'ADN génomique : réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse des caryotypes (électrophorèse en champ pulsé). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28**, 153-160.

- MASNEUF I., MURAT M. L., CHONE X., DUBOURDIEU D., 2000. Dosage systématique de l'azote assimilable : détecter les carences au chai. *Viti*, **249**, 19-22.
- MONJE O. A., BUGBEE B., 1992. Inherent limitations of non-destructive chlorophyll meters : A comparison of two types of meters. *Hort. Science*, **27**, 69-71.
- MOOZ E. D., WIGGLESWORTH L., 1976. Evidence for the γ -glutamyl cycle in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 1221-1228.
- MORINO Y., SNELL E., 1967a. A kinetic study of the reaction mechanism of tryptophanase-catalyzed reactions. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2793-2799.
- MORINO Y., SNELL E., 1967b. The relation of spectral changes and tritium exchange reactions to the mechanism of tryptophanase-catalyzed reactions. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2800-2809.
- MURAT M. L., MASNEUF I., DARRIET P., LAVIGNE V., TOMINAGA T., DUBOURDIEU D. Winemaking importance of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the varietal aroma liberation of sauvignon blanc. *Am. J. Enol. Vitic.* Accepted pour publication.
- MURAT M.L., TOMINAGA T., DUBOURDIEU D., 2001. Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rosé wines by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5412-5417.
- OLLIVIER C., 1987. Recherches sur la vinification des vins blancs secs. Diplôme d'Etudes et de Recherches de l'Université de Bordeaux 2.
- OUGH C. S., 1969. Substances extracted during skin-contact with white musts. I. General wine composition and quality changes with contact times. *Am. J. Enol. Vitic.*, **20**, 2, 93-100.
- OUGH C. S., BERG H. W., 1971. Simulated mechanical harvest and gondola transport. II. Effect of temperature, atmosphere and skin-contact on chemical and sensory qualities of white wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **22**, 3, 194-198.
- PEYNAUD E., 1980. Le Goût du Vin., Dunod Ed., Paris.
- PEYROT DES GACHONS C., TOMINAGA T., DUBOURDIEU D., 2000. Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grapes by assaying S-cysteine conjugate compounds, precursors of the volatile thiols responsible for the varietal aroma of wines. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3387-3391.
- PEYROT DES GACHONS C., 2000. Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- PEYROT DES GACHONS C., TOMINAGA T., DUBOURDIEU D., 2001. Localisation in the berry of S-cysteine conjugates, aroma precursors of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc grapes. The effect of skin contact on the aromatic potential of the musts. *Am. J. Enol. Vitic.* In press.
- PEYROT DES GACHONS C., TOMINAGA T., DUBOURDIEU D. A sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. Accepted by *J. Agric. Food Chem.*

- PUERTAS F. J., DIAZ-LLOPIS M., CHIPONT E., ROMA J., RAYA A, ROMERO F. J., 1993. Glutathione system of human retina : enzymatic conjugation lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 5, 549-51.
- RADFORD T., KAWASHIMA K., FRIEDEL P. K., POPE L. E., GIANTURCO M. A., 1974. Distribution of volatile compounds between the pulp and serum of some fruit juices. *J Agric. Food Chem.*, **22**, 1066-1070.
- RAMEY D., BERTRAND ., OUGH C. S., SINGLETON V. L., SANDERS E., 1986. Effects of skin contact temperature on chardonnay must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 2, 99-106.
- RAPP A., HASTRICH H., ENGEL L., 1976. Gas chromatographic investigations on the aroma constituents of grape berries. *Vitis*, **15**, 183-192.
- RAZUNGLES A., GUNATA Z., PINATEL S., BAUMES R., BAYONOVE C., 1993. Etude quantitative de composés terpéniques, norisprénoïdes et de leurs précurseurs dans diverses variétés de grappes. *Sci. Aliments*, **13**, 1, 59-72.
- REBBEOR J. F., CONNOLLY G. C., DUMONT M. E., BALLATORI N., 1998. ATP-dependent transport of reduced glutathione in yeast secretory vesicles. *Biochem. J.*, **334**, 723-729.
- RENNENBERG H., 1982. Reviews. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry*, **21**, 12, 2771-2781.
- RIBEREAU-GAYON P., BOIDRON J. N., TERRIER A., 1975. Aroma of Muscat grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 6, 1042-1047.
- RIOU C., SALMON J. M., VALLIER M. J., GUNATA Z., BARRE P., 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 10, 3607-3614.
- ROSEN H., 1957. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 102-115.
- RUBIN B., KIRINO O., CASIDA J. E., 1985. Chemistry and action of N-phenylmaleamic acids and their progenitors as selective herbicide antidotes. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 489-494.
- RUZSA S. M., MYLONA P., SCANDALIOS J. G., 1999. Differential response of antioxidant genes in maize leaves exposed ozone. *Redox Rep.*, **4**, 3, 95-103.
- SCHOLANDER P.F., HAMMEL H.J., BRADSTREET E.D., HEMMINGSEN E.A., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*, **148**, 339-346.
- SEGUIN G., 1970. Les sols de vignoble du Haut-Médoc. Influence sur l'alimentation en eau de la vigne et sur la maturation du raisin. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- SERGEANT D., 1996. Etude du comportement du sauvignon et du sémillon selon la diversité géologique et agro-pédologique de la région des Graves : incidences du climat et des sols

sur le comportement de la vigne, la maturation des raisins et les vins. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.

- SINGHA S., TOWNSEND E.C., 1989. Relationship between chromaticity values and chlorophyll concentration in apple, grape, and peach leaves. *Hort. Science*, **24**, 1034.
- SINGLETON V. L., SIEBERHAGEN H. A., de WET P., VAN WYCK C. J., 1975. Composition and sensory qualities of wines prepared for white grapes by fermentation with and without grape solids. *Am. J. Enol. Vitic.*, **26**, 2, 62-69.
- SKOUROUMOUNIS G. K., WINTERHALTER P., 1994. Glycosidically bound norisoprenoids from *Vitis vinifera* cv. Riesling leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1068-1072.
- SMART R., COOMBE B., 1983. Water relations of grapevines. Dans *KOZLOWSKI Water deficits and plant growth*, Academic Press, New York, vol. VII, 137-196.
- SOYER J. P., MOLOT C., GAUDILLERE J. P., 1999. Les indicateurs de nutrition azotée de la vigne. *Viti*, **249**, 6-8.
- SPAYD S., WAMPLE R., EVANS R., STEVENS R., SEYMOUR B., NAGEL C., 1994. Nitrogen fertilization of white Riesling grapes in Washington. Must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 1, 23-27.
- STAHL-BISKUP E., INTERT F., HOLTHUIJZEN J., STENGELE M., SCHULZ G., 1993. Glycosidically bound volatiles- A review 1986-1991. *Flavour and Fragr. J.*, **8**, 61-80.
- ST-PIERRE M. V., RUETZ S., EPSTEIN L. F., GROS P., ARIAS I. M., 1994. ATP-dependent transport of organic anions in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 20, 9476-9479.
- STRAUSS C.R., WILSON B., ANDERSON R., WILLIAMS P. J., 1987. Development of precursors of C₁₃ nor-isoprenoid flavorants in Riesling Grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 1, 34-41.
- STRAUSS C.R., WILSON B., WILLIAMS P. J., 1988. Novel monoterpene diols and diolglycosides in *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 569-573.
- TATE S. S., MEISTER A., 1985. γ -glutamyl transpeptidase from kidney. Dans *Methods in enzymology*, A. Meister Ed, Academic Press, London, **113**, 414.
- THOMPSON J. F., TURNER D. H., GERING R. K., 1964. γ -glutamyl transpeptidase in plants. *Phytochemistry*, **3**, 33-46.
- TJALKENS R. B., LUCKEY S. W., KROLL D. J., PETERSEN D. R., 1998. Alpha, beta-unsaturated aldehydes increase glutathione S-transferase mRNA and protein : correlation with activation of antioxidant response element. *Arch. Biochem. Biophys.*, **359**, 1, 42-50.
- TOMINAGA T., MASNEUF I., DUBOURDIEU D., 1995. Mise en évidence d'un S-conjugué à la cystéine, précurseurs d'arôme du sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **29**, 4, 227-232.

- TOMINAGA T., DARRIET P., 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**, 4, 207-210.
- TOMINAGA T., FURRER A., HENRY R., DUBOURDIEU D., 1997. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines. *Flavour and Fragr. J.*, **13**, 159-162.
- TOMINAGA T., 1998a. Recherche 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 Ségalen Bordeaux 2.
- TOMINAGA T., PEYROT DES GACHONS C., DUBOURDIEU D., 1998b. A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. sauvignon blanc : S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 12, 5215-5219.
- TOMINAGA T., MURAT M. L., DUBOURDIEU D., 1998c. Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1044-1048.
- TOMINAGA T., BALTENWECK-GUYOT R., PEYROT DES GACHONS C., DUBOURDIEU D., 2000. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**, 2, 178-181.
- USSEGLIO TOMASSET L., DI STEFANO R., 1979. Osservazioni sui costituenti terpenici delle uve e dei vini aromatici. *Vigne-vini*, **10**, 33-38.
- VAN LEEUWEN C., 1991. Le vignoble de Saint Emilion : Répartition des sols et fonctionnement hydrique ; incidences sur le comportement de la vigne et la maturation du raisin. Thèse de doctorat. Université Victor Ségalen Bordeaux 2.
- VAN LEEUWEN C., CHONE X., CHERY P., MOLOT C., SOYER J. P., 1999. Etude de quatre sols viticoles de l'AOC Saint-Julien (Haut-Médoc, Bordeaux) ; incidences du régime hydrique et de l'alimentation en azote de la vigne sur la maturation du raisin et la qualité du vin (*Vitis vinifera* var. Cabernet-Sauvignon, 1997). Dans *Œnologie 99, 6^{ème} Symposium International d'œnologie*. Tec & Doc. Ed., 92-97.
- VAN LEEUWEN C., FRIANT P., SOYER J. P., MOLOT C., CHONE X., DUBOURDIEU D., 2000. L'intérêt du dosage de l'azote assimilable dans le moût comme indicateur de la nutrition azotée de la vigne. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **34**, 2, 75-82.
- VIRTANEN A. I., 1965. A review. Studies on organic sulphur compounds and other labile substances in plants. *Phytochemistry*. **4**, 207-228.
- WILLIAMS P. J., STRAUSS C.R., WILSON B., MASSY-WESTROPP R.A., 1982a. Novel monoterpenes disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry*, **21**, 8, 2013-2020.
- WILLIAMS P. J., STRAUSS C.R., WILSON B., MASSY-WESTROPP R.A., 1982b. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene

- ?-D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1219-1223.
- WILSON B., STRAUSS C. R., WILLIAMS P. J., 1984. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 4, 919-924.
- WILSON B., STRAUSS C. R., WILLIAMS P. J., 1986. The distribution of free and glycosidically-bound monoterpenes among skin, juice, and pulpe fractions of some white grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 2, 107-111.
- WINTERHALTER P., SEFTON M. A., WILLIAMS P. J., 1990. Volatile C₁₃-norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 4, 277-283.
- WOLF A. E., DIETZ K. J., SCHRODER P., 1996. Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett.*, **384**, 31-34.
- YANAI T., SATO M., 1999. Isolation and properties of ?-glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**, 231-235
- YASUMOTO K., IWAMI K., YONEZAWA T., MITSUDA H., 1977. Anion activation of ?-glutamyltransferase from fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Phytochemistry*, **16**, 1351-1354.
- ZACHARIUS R. M., MORRIS C. J., THOMPSON J. F., 1959. The isolation and characterization of ?-L-glutamyl-S-methyl-L-cysteine from kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 199-209.
- ZADZINSKI R., MASZEWSKI J., BARTOSZ G., 1996. Transport of glutathione S-conjugates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biol. Int.*, **20**, 5, 325-330.