### GRAND PRIX 2017 SCIENCES & RECHERCHE

# Liming ZENG

Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle





### PRÉFACE

Le Groupe Amorim, né du liège en 1870 au Portugal, a fondé les bases de son développement sur cette extraordinaire matière première, à travers la production de cet humble mais inséparable compagnon du Vin : le bouchon de liège.

Notre volonté de servir la cause du vin s'est toujours exprimée dans la recherche technologique sur la filière liège, base de notre activité.

En 1992, nous avons souhaité aller plus loin et nous engager davantage aux côtés des chercheurs en œnologie en créant l'Académie Amorim, un lieu de rencontre et d'échange entre œnologues, ingénieurs, professeurs, sommeliers, auteurs, artistes... tous animés d'une même passion du Vin

Chaque année, notre Académie encourage et soutient la recherche en œnologie par la remise d'un Prix à un chercheur ou à une équipe de chercheurs ayant fait paraître des travaux significatifs qui concourent à la défense et à la promotion de la qualité du Vin. Que soient ici saluées les personnalités, membres de cette Académie, qui contribuent si généreusement à cette mission.

Je formule le vœux que cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix de l'Académie, devienne, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin.

#### Americo Ferreira de Amorim

Président du Groupe Amorim

#### Grand Prix 2014 - Olivier SERRA

Le législateur et le marché vinicole sous la Troisième République

#### Grand Prix 2013 – Dorothée BOYER-PAILLARD

Essai sur les notions d'origine et de provenance en droit du commerce, la reconnaissance juridique des « territoires des productions typiques »

#### Grand Prix 2012 - Guillaume ANTALICK

Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique – le rôle particulier des esters

#### Grand Prix 2011 - Axel MARCHAL

Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs

#### Grand Prix 2010 - Caroline LE GOFFIC

La protection des indications géographiques en France, dans la Communauté européenne et aux Etats-Unis

### Grand Prix 2009 - Katharina ZOTT

Les levures non-Saccharomyces : dynamique, caractérisation et interaction avec Saccharomyces durant les étapes pré-fermentaires et la fermentation alcoolique

#### Grand Prix 2008 - Elise SARRAZIN

Recherches sur l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble issus des cépages Sémillon et Sauvignon blanc

Caractérisation de composés cles et étude de leur genèse

#### Grand Prix 2007 - Alexandre PONS

Recherche sur l'arôme de vieillissement prématuré des vins blancs secs

#### Grand Prix 2006 - Paulo LOPEZ

Etude des phénomènes oxidatifs pendant le vieillissement des vins en bouteille. Rôle de l'obturateur

#### Grand Prix 2005 - Stéphane LA GUERCHE

Les défauts moisis terreux des vins : la géosmine identifiée comme principale responsable

Grand Prix 2004 - Michael JOURDES Réactivité, sythèse, couleur et activité biologique d'Ellagitannins C-Glycosidique et Flavano-Ellagi tannins

#### Grand Prix 2003 Dominique ROUJOU DE BOUBEE

Recherches sur la 2-méthoxy-3-isobuty/pyrazine dans les raisins et dans les vins

#### Grand Prix 2002 - Catherine PEYROT DES GACHONS

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

#### Grand Prix 2001 - René SIRET

Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (Vitis vinifera L.) à l'aide de marqueurs microsatellites : application à la caractérisation des cépages dans les vins

#### Grand Prix 2000 - Takatoshi TOMINAGA

Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin

#### Grand Prix 1999 - Isabelle CUTZACH-BILLARD

Etude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement. Son origine. Sa formation

#### Grand Prix 1998 - Virginie MOINE-LEDOUX

Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins

#### Grand Prix 1997 - Valérie LAVIGNE-CRUEGE

Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et l'élevage des vins blancs secs

#### Grand Prix 1996 - Sylvie BIAU

Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux

#### Grand Prix 1995 - Samuel LUBBERS

Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme

#### Grand Prix 1994 - Ziya GÜNATA

Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique

> Grand Prix 1993 - Pierre-Louis TEISSEDRE Le plomb, du raisin au vin

#### Grand Prix 1992 - Pascal CHATONNET

Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques

Le Grand Prix « Sciences & Recherche » de l'Académie Amorim illustre la volonté de cette Académie d'apporter son soutien aux jeunes étudiants qui, dans les Universités dédiées à la vigne et aux vins offrent, par leurs travaux de recherche, une contribution remarquable à la filière vitivinicole.

La célébration du 25éme anniversaire, en 2015, de la fondation de cette Académie a été marquée par la publication de « l'ADN du vin », ouvrage de témoignages présentés par les lauréats auxquels se sont associées de hautes personnalités, la famille Amorim ayant, à cette occasion, manifesté le maintien de son engagement à leurs côtés. La diversité des thèses distinguées par l'Académie au cours de ces 25 années met en lumière la richesse des travaux réalisés dans ces domaines et forme un corpus culturel important.

L'Institut de la vigne et du vin de Bordeaux (ISVV) offre dans la continuité, par la thèse de Liming Zeng, un approfondissement de la science œnologique. En étudiant la composition macromoléculaire du raisin et des vins, cette thèse présente des résultats originaux et novateurs, en particulier, par la découverte d'une nouvelle famille de tanins condensés dits : « les tanins couronnes ». On peut souligner que les perspectives ouvertes par l'évaluation des activités neuroprotectrices de ces tanins laissent espérer d'autres développements qui dépassent la recherche en œnologie et s'ouvrent vers d'autres disciplines. La lauréate est une brillante étudiante chinoise qui a obtenu, avec la mention très bien, son diplôme de « normalisation des produits agricoles » à l'Université d'Agriculture du Sud de la Chine. Ayant choisi la France et Bordeaux en particulier, elle a pris le temps d'apprendre le français à l'université Michel de Montaigne pour aborder ensuite son cursus de chercheur universitaire en chimie du vin et pour rédiger et soutenir sa thèse de doctorat.

Le choix du Jury en lui attribuant le Grand Prix « Sciences et Recherche » consacre à la fois l'attractivité internationale de Bordeaux pour les chercheurs en œnologie et la qualité des travaux qui y sont conduits.

Robert Tinlot
Président de l'Académie Amorim

# Étude de la composition macromoléculaire du raisin et des vins : impact sur la qualité sensorielle

#### Liming ZENG

THÈSE pour le doctorat en œnologie de l'Université de Bordeaux Soutenue publiquement le 10 décembre 2015.

#### DIRECTEUR DE THÈSE

Monsieur **Michaël JOURDES** *Maître de conférences de l'Université de Bordeaux* 

#### MEMBRES DU JURY

Monsieur **Pierre-Louis TEISSEDRE** (Président) Professeur Université de Bordeaux (Bordeaux, France)

Monsieur **Fernando ZAMORA** (Rapporteur) *Professeur Université Rovira i Virgili (Tarragone, Espagne)* 

Monsieur Victor De FREITAS (Rapporteur) Professeur Université de Porto (Porto, Portugal)

Monsieur **Olivier DANGLES** (Examinateur) Professeur Université d'Avignon (Avignon, France)

#### INTRODUCTION

De la naissance d'un grand vin rouge de garde jusqu'au moment optimal de sa consommation après un certain nombre d'années de vieillissement en bouteille, les phénomènes liés à l'amélioration de sa qualité organoleptique sont notés par les dégustateurs [1]. L'une des premières modifications notables est le changement de la teinte rouge-violette vers tuilé-orangé suivie de l'évolution et de l'augmentation de sa complexité aromatique pour former le «bouquet de vieillissement» [2] ainsi qu'un meilleur équilibre en bouche comprenant l'adoucissement de l'acidité, la diminution de la sensation d'astringence, l'amélioration de la qualité tannique du râpeux, rugueux et grossier vers soyeux et velouté. Parmi tous ces phénomènes, deux d'entre eux, l'évolution de la couleur et des propriétés gustatives des vins sont directement liés à la présence des composés phénoliques du vin rouge, et plus particulièrement à la présence des tanins condensés et des anthocyanes.

Actuellement, les unités de base, les dimères et trimères des tanins condensés sont bien connus. Néanmoins, la majeure partie des tanins du vin sont sous forme d'oligomères et de polymères [3-5] qui sont mal connus. De plus, il a été prouvé que ce sont les oligomères et les polymères qui participent principalement à l'astringence des vins alors que les monomères et les dimères sont eux plus amers qu'astringents [6, 7]. Durant le vieillissement, la complexité des tanins condensés issus du raisin augmentent notamment par la formation de nouvelles liaisons inter- et intra-moléculaires et ces tanins condensés sous formes évoluées sont également mal connus. Concernant la couleur des vins rouges et son évolution durant le vieillissement, ce sont les anthocyanes et leurs produits dérivés issus des interactions avec les autres composés du vin qui en sont responsables. Notre connaissance sur les anthocyanes et sur les nouvelles familles de pigments formés durant l'élevage et le vieillissement s'accroissent grâce à de nombreuses études [8]. Néanmoins, les pigments polymérisés qui participent à la couleur des vins vieux sont encore mal connus [9].

Le manque d'information structurelle et quantitative sur les tanins condensés à hauts poids moléculaires et les pigments polymérisés est dû à la difficulté de leur purification et caractérisation ainsi qu'au nombre très important de structures possibles. Les objectifs du travail sont de caractériser de nouvelles structures de tanins condensés et pigments polymérisés afin de mieux comprendre l'évolution de la composition macromoléculaire des tanins condensés et des pigments polymérisés du vin rouge durant le vieillissement. Ainsi, une nouvelle famille de tanins condensés : les tanins condensés couronnes jusqu'ici inconnus dans le règne végétal a été découverte dans le vin et une nouvelle méthode de quantification de chacune des familles de pigments polymérisés séparément a été développée.

## I. Découverte d'une nouvelle famille de tanins condensés : tanins couronnes

#### I.I La détection et l'identification par spectrométrie de masse haute résolution

L'analyse de plusieurs vins rouges par le système UPLC-UV-MS (Q-TOF) a montré en début de chromatogramme plusieurs ions en mode positif avec des m/z à 1153,2615, 1441,3200 et 1457,3175. Ces trois masses correspondent, respectivement, aux formules brutes de  $C_{60}H_{48}O_{24}$  ([M+H]+ = 1153,2608 ; diff : 0,61 ppm),  $C_{75}H_{60}O_{30}$  ([M+H]+ = 1441,3242 ; diff : -2,78 ppm) et  $C_{75}H_{60}O_{31}$  ([M+H]+ = 1457,3191 ; diff : -1,10 ppm). Les formules proposées pourraient correspondre à des tétramère et pentamères de tanins condensés auxquels il manquerait deux hydrogènes et présenteraient donc une liaison carbone-carbone ou carbone-oxygène supplémentaire. Cela nous a conduit à formuler l'hypothèse que ces tanins oligomères pourraient présenter soit une liaison inter-flavonoïde de type A et les autres liaisons seraient alors de type B ; soit aurait une liaison carbone-carbone intramoléculaire reliant deux cycles B entre eux dérivant d'un mécanisme oxydatif.

Des analyses en MS/MS par la HRMS Q-TOF ont confirmé leur identité de proanthocyanidine. La Figure I montre les deux spectres de fragmentation en mode positif du tétramère en utilisant les énergies de collision à 15 % et à 30 %. Les modes de fragmentation des proanthocyanidines sont clairement établis et permettent l'identification des unités monomériques et des liaisons inter-flavonoïdes (type B ou type A) [10]. Le spectre MS/MS obtenu pour le tétramère montre des fragments avec une perte de 152,0473 Da ( $-C_8H_8O_3$ , fragments à m/z = 1001,2118 et à m/z =713,1492) et une perte de 126,0304 Da (- $C_cH_cO_3$ , fragment à m/z = 451,1013), qui résultent de la fission Rétro-Diels-Alder (RDA) et de la fission de l'hétérocycle (HRF) respectivement. En outre, quatre ions avec une différence de 288 Da (m/z = 1153,2608, m/z = 865,1963, m/z = 577,1334 et m/z = 289,0697) ont été observés issus des fissions quinone méthine (QM) successives. Curieusement, les trois fragments issus de la fission QM ont une perte d'unité de 288 Da en commun, cela indique que les pertes observées sont des unités supérieures et aucune perte d'unité terminale (-290 Da) n'a été observée. Par ailleurs, aucun fragment spécifique lié à la liaison inter-flavonoïde de type A (m/z = 433,10) ni aux liaisons carbone-carbone entre cycle B n'a été observé. Les mêmes modes de fragmentations ont été également observés pour les pentamères.

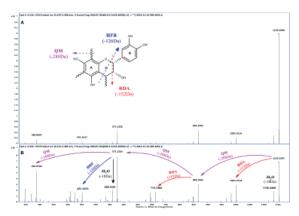


Figure 1. Les spectres de fragmentation du tétramère. A : Énergie de collision de 15 %; B : Énergie de collision de 30 %.

Ces tanins oligomères se distinguent des autres tanins condensés de type B par leurs polarités élevées. De plus, une résistance partielle à la dépolymérisation chimique dans les conditions de phloroglucinolyse a été observée. Afin de caractériser complètement les liaisons inter-flavanoïdes présentes dans ces molécules, de comprendre l'absence d'unité terminale observée en MS et de clarifier leurs configurations 3D qui pourraient être l'origine de leurs polarités élevées et leur résistance aux conditions de phloroglucinolyse, le tétramère et les pentamères ont été purifiés en vue de leur analyse en RMN.

#### 1.2 Développement d'une méthode de purification

Une méthode de purification en trois étapes a été établie, avec comme première étape un fractionnement en SPE sur un gel C18, suivie d'une deuxième étape de chromatographie sur le gel d'exclusion stérique TSK HW-40S généralement utilisé pour le fractionnement et la purification des tanins condensés [11], et pour finir une dernière étape d'HPLC semi-préparative sur une colonne C18.

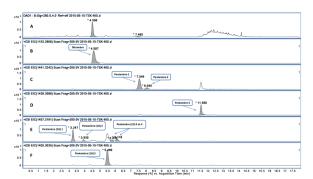


Figure 2. Les chromatogrammes de la fraction après la colonne TSK sur UPLC-UV-MS. A: Chromatogramme UV à 280nm; B: Chromatogramme de m/z = 1153,2608 (tétramère); C: Chromatogramme de m/z = 1441,3242 (pentamères); D: Chromatogramme de m/z = 1439,3086 (pentamères); E: Chromatogramme de m/z = 1457,3156 [pentamères (IG)]; F: Chromatogramme de m/z = 1455,3035 [pentamères (IG)].

La Figure 2 montre les chromatogrammes de la fraction après la colonne TSK sur UPLC-UV-MS. Les deux étapes de fractionnement sur le gel C18 et sur le gel d'exclusion stérique ont fortement concentré des composés d'intérêt et simplifié le milieu complexe d'un vin rouge. Après l'étape du fractionnement sur gel TSK, en total, neuf tetramère et pentamères ont été détectés. Le tétramère et les deux pentamères 1 et 2 ont été collectés séparément par HPLC semi-préparative. La pureté de ces fractions a été évaluée à 99 % en fonction de l'aire d'absorption à 280 nm sur le système de HPLC-semi-préparative ainsi que sur le système UPLC-UV-Q-TOF. Ces fractions issues de HPLC semi-préparative ont été évaporées et lyophilisées pour obtenir une poudre blanche prête à être utilisée pour l'analyse RMN.

#### 1.3 La caractérisation de la structure couronne par RMN et la modélisation moléculaire

Les analyses RMN ID (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) et 2D (HSQC, HMBC, ROESY) ont été effectuées avec 5,6 mg du tétramère pur dans du méthanol-d4. Les données <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et la corrélation HMBC du tétramère sont montrées dans le Tableau I.

Tableau I. Les données <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et la corrélation HMBC du tétramère.

Cycle	Num.	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub> m(J en Hz)	HMBC (H -> C)
Flavano	ol I			
С	2	78,5	5,17 brs	C-4C, C-8aA, C-1'B, C-2'B, C-6'B
	3	73,0	4,29 brd (5,2)	C-4C, C-4aA, C-8D, C-1'B
	4	37,7	4,21 brd (5,2)	C-8D, C-8aD, C-7D, C-4aA, C-8aA, C-2C, C-3C
A	4a	104,9	-	
	5	155,5	-	
	6	106,3	_	
	7	155,5	-	
	8	96, I	6,12 (s)	C-4aA, C-8aA
	8a	155,1	-	
В	1'	131,9	-	
	2'	115,4	6,99 d (1,8)	C-1'B, C-3'B, C-4'B, C-6'B, C-2C
	3'	145,4	-	
	4'	145,5	-	
	5'	115,5	6,71 d (8,1)	C-1'B, C-3'B, C-4'B, C-6'B
	6'	119,8	6,83 dd (1,8;8,1)	C-2'B, C-4'B, C-2C
II				
F	2	75,2	4,45 s	C-3F, C-4F, C-1'E, C-2'E, C-6'E
	3	67,9	4,48 d (2,1)	C-2F, C-4F, C-4aD, C-1'E
	4	37,8	4,56 d (2,5)	C-5A, C-6A, C-7A, C-4aD, C-8aD,
				C-2F, C-3F
D	<b>4</b> a	98,6	-	
	5	157,1	-	
	6	97,0	6,09 (s)	C-4aD, C-5D, C-7D, C-8D

	7 8	157,3 109,0	-	
	8a	157,2	-	
E	1'	131,3	-	
	2'	114,4	6,20 d (1,8)	C-1'E, C-3'E, C-4'E, C-6'E, C-2F
	3'	144,8	-	
	4'	144,6	-	
	5'	115,5	6,42 d (8,1)	C-1'E, C-3'E, C-4'E
	6'	119,7	5,75 d (1,8;8,1)	C-2F, C-2'E, C-4'E

Le spectre proton obtenu apparait relativement simple pour un tétramère d'unité flavan-3-ol alors qu'un très grand nombre de isomères sont attendus pour un tétramère d'unité flavan-3-ol. De plus, chaque signal de proton aromatique ou aliphatique intègre pour deux protons, ce qui indique une symétrie dans la structure. Une analyse plus fine du spectre proton montre l'absence de proton aliphatique de type CH<sub>2</sub> caractéristique du carbone C4 d'une unité flavan-3-ol terminale et dont le déplacement chimique est entre 2,3 et 3 ppm.

Par comparaison avec la littérature, les signaux des carbones des unités flavan-3-ols du tétramère dans la plage de déplacement chimique 5C 155-160 ppm ont été attribués aux signaux des carbones en position C5, C7, et C8a. Ces attributions ont également été réalisées grâce à des corrélations à longue-distance HMBC entre les carbones C8a et les protons H2 des noyaux hétérocycliques C et F, et entre le carbone C5A et le proton H4C pour les unités I et entre le carbone C5D et le proton H4F pour les unités II. Les liaisons inter-flavonoïdes (C4/C8 ou C4/C6) ont également été attribuées grâce aux corrélations HMBC. Les corrélations fortes entre les protons H4C et les carbones C7D, C8D et C8aD indiquent que la liaison inter-flavonoïde entre l'unité I et l'unité II (cycle C et D) est 4 -> 8. De plus, les corrélations HMBC entre le proton H4F et les carbones C5A, C6A et C7A prouve que la liaison inter-flavonoïde entre l'unité III (cycle F et A) est 4 -> 6. Les déplacements chimiques pour les protons et les carbones des unités flavan-3-ols I et III étant identiques, ces dernières corrélations HMBC prouvent également la présence d'une structure cyclique et symétrique.

La configuration des carbones 2, 3 et 4 du cycle C et du cycle F pour les 4 unités flavan-3-ol a été déterminée en utilisant le spectre ROESY. Une forte corrélation entre les protons H2C et H3C et entre les protons H2F et H3F prouve que ces protons sont orientés vers la même face de l'unité flavan-3-ol et donc que les 4 unités flavan-3-ol constitutives de ce tétramère sont des (–)-épicatéchines. De même, les corrélations fortes observées en ROESY entre les protons aromatiques des cycles B et E et les protons H4C et H4F respectivement suggèrent que ces protons H4C et H4F sont orientés vers l'arrière comme les cycles aromatiques B et E. Cette orientation vers l'arrière des protons H4C et H4F prouve que toutes les liaisons interflavonoïdes entre toutes les unités sont de type ß (vers l'avant).

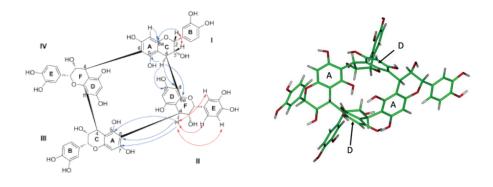


Figure 3. Le tétramère couronne et sa structure modélisée en 3D.

Toutes les interprétations des résultats RMN ci-dessus conduisent à la structure cyclique montrée à la Figure 3 (gauche). L'unité I est liée avec l'unité II par une liaison inter-flavonoïde de type  $4B \rightarrow 8$ , l'unité II est liée à l'unité III par une liaison  $4B \rightarrow 6$ , l'unité II est liée à l'unité IV par une liaison  $4B \rightarrow 8$ , et l'unité IV est liée à l'unité I par une liaison  $4B \rightarrow 6$ . Les unités I et II sont équivalentes aux unités III et IV du fait de la symétrie. Ce type de composé tétramérique cyclique n'avait jusqu'à présent jamais été reporté dans la littérature que ce soit dans le vin ou dans le règne végétal. Au vu de son squelette carboné très particulier, nous avons décidé de nommer cette famille de composés les tanins condensés couronnes.

Suite à ces analyses par RMN, une modélisation moléculaire sous contraintes RMN a été réalisée en utilisant le logiciel Accelrys [12] en tenant compte de toutes les corrélations NOE observées sur le spectre ROESY. La structure obtenue par cette modélisation moléculaire (Figure 3 droit) révèle une importante cavité au centre de la structure. Les cycles D des unités II et IV sont notamment parallèles et à une distance de 5,54 Å alors que les cycles A des unités I et III sont eux distants de 4,97 Å. De façon identique, les deux fonctions phénols portées par les carbones C5 des cycles A des unités I et III, apparaissent orientées vers l'intérieur de la cavité et sont distants de 2,59 Å.

Pour confirmer ces nouvelles structures cycliques observées par l'analyse RMN, et également mieux comprendre la résistance à la dépolymérisation chimique par phloroglucinolyse observée précédemment à partir du vin, les fractions pures du tétramère et des pentamères I et 2 ont été soumises à la phloroglucinolyse. Aucun flavan-3-ol monomère n'a été libéré, ce qui est en accord avec le fait que toutes les unités soient reliées entre elles par des liaisons inter-flavonoïdes confirmant la structure cyclique.

En conclusion, les résultats de RMN et phloroglucinolyse montrent que les structures de ces procyanidines oligomères sont cycliques. Pour le tétramère, toutes les unités de base sont de l'(-)-épicatéchine et pour les deux pentamères, les unités de base de la (+)-catéchine sont également présentes. La Figure 4 montre les trois structures semi-hypothétiques des deux pentamères cycliques : pour la structure A et B, le cycle est formé par cinq unités de base en ajoutant une liaison inter-flavonoïde de C4-C8/C6 et la structure C présente une configuration de structure cyclique de tétramère branchée par une cinquième unité flavanol.

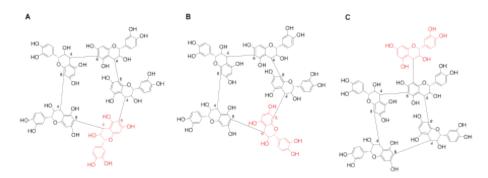


Figure 4. Trois structures semi-hypothétiques des deux pentamères couronnes.

#### I.4 Evaluation des activités neuroprotectrices du tétramère couronne

La maladie d'Alzheimer est la principale maladie neurodégénérative chez les personnes âgées et se manifeste principalement par la perte des fonctions cognitives et mentales résultant de la mort cellulaire et neuronale. L'agrégation du peptide \( \beta\)-amyloïde (\beta\)A) est considérée comme un évènement critique dans le développement de la maladie puisque son agrégation va conduire à la formation d'une plaque sénile et à la mort neuronale. En se basant sur ce mécanisme de développement de la maladie d'Alzheimer, un test rapide et fiable a été mis au point pour estimer l'activité neuroprotectrice des composés phénoliques [13]. Et il a été montré que de nombreux composés phénoliques du raisin et du vin tel que les anthocyanes et les stilbènes présentaient une forte inhibition de l'agrégation du peptide \( \beta\)-amyloïde (\( \beta\)A) [13]. Ce test est basé sur la

viabilité et la survie des cellules PC12 (établie à partir d'un phéochromocytome de rat) en présence du peptide β-amyloïde (βA).

Les tanins couronnes étant une nouvelle sous-famille des tanins condensés avec un squelette carboné inhabituel, leur activité neuroprotectrice vis-à-vis de l'agrégation du peptide  $\beta$ -amyloïde ( $\beta$ A) a été estimée. Dans un premier temps, l'effet du tétramère couronne sur la viabilité des cellules PC 12 a été mesurée (**Figure 5**). Il est apparu que pour une concentration supérieure à 50  $\mu$ M, le tétramère couronne diminuait la survie et la viabilité des cellules PC 12 ce qui représente une concentration relativement élevée. Par la suite, en utilisant cette valeur comme concentration plafond, la capacité du tétramère à inhiber la mort cellulaire induite par le peptide à une concentration de 4  $\mu$ M a été estimée. Il est apparu qu'une concentration de 10  $\mu$ M en tétramère couronne restaurait déjà la viabilité des cellules PC 12 en présence de 4  $\mu$ M de  $\beta$ A et que pour une concentration de 30  $\mu$ M en tétramère couronne, la viabilité des cellules PC 12 est augmentée de 36 %. A titre de comparaison, dans des conditions identiques, le resvératrol à 25  $\mu$ M induit une augmentation de viabilité de 30 % [14] alors qu'un gain de seulement 10 % a été rapporté pour une concentration de 50  $\mu$ M de cyanidine-3-*O*-glucoside [15].

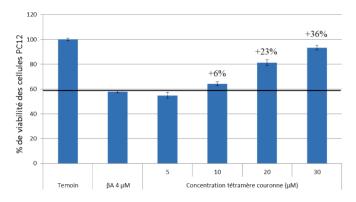


Figure 5. Pourcentage de cellules PC 12 vivantes après traitement.

#### 1.5 L'évolution des tanins condensés couronnes durant le vieillissement du vin

La quantification des tanins condensés tétramère et pentamères couronnes et de type B a été réalisée. Les concentrations en tétramère couronne dans les vins rouges issus du Languedoc Appellation Montpeyroux cépage syrah (Domaine de l'Aiguelière), varient de 15 à 45 mg/L (Figure 6). Afin de comparer l'évolution du tétramère couronne avec un tétramère de type B au cours du vieillissement, le tétramère de type B le plus abondant (R.T. = 4,968) a été quantifié avec la courbe de calibration du tétramère couronne. Les concentrations de ce tétramère de type B varient entre 5 et 47 mg/L dans les vins rouges de Languedoc Montpeyroux et diminuent fortement durant le vieillissement. En comparant avec l'évolution du tétramère de type B, une stabilité élevée de la concentration du tétramère couronne durant le vieillissement a été observée. De plus, les variations de concentration observées pour ce tétramère couronne s'avèrent être corrélées avec la richesse polyphénolique totale du vin (IPT). C'est-à-dire que la variation de la concentration du tétramère couronne est plutôt due à l'effet millésime qu'au vieillissement et que sa concentration est relativement stable avec le temps. Comme pour le tétramère, l'évolution des pentamères couronnes suit la même tendance que l'IPT des vins.

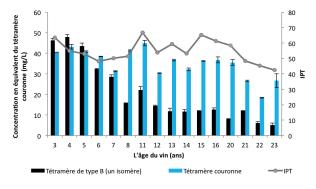
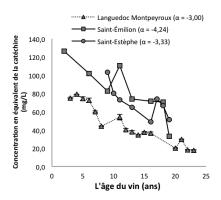


Figure 6. Comparaison des évolutions d'un tanin tétramère de type B et le tétramère couronne durant le vieillissement de vins rouges du Languedoc Montpeyroux, cépage syrah.

La stabilité de la concentration du tétramère couronne a également été observée pour les deux séries de vins de Bordeaux. En revanche, pour tous les millésimes, le niveau du tétramère couronne est légèrement plus élevé dans les vins de Languedoc Montpeyroux issus du cépage Syrah que dans les vins de Bordeaux issus des cépages Cabernet Sauvignon, Merlot et Cabernet Franc (Figure 7B). Cette observation est à l'inverse des niveaux obtenus pour les tanins condensés de type B qui sont plus abondants dans les vins de Bordeaux que dans les vins de Languedoc Montpeyroux (Figure 7A). Il y a donc proportionnellement plus de tanins couronnes dans les vins issus de Syrah quel que soit le millésime.



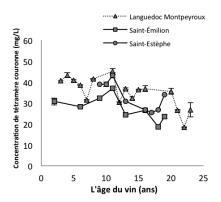


Figure 7. A : Evolution des tanins condensés de type B (des monomères aux pentamères) au cours du vieillissement dans les trois séries de vin rouge ( $\alpha$  : pente de régression linéaire) ; B : L'évolution du tétramère couronne durant le vieillissement dans les trois séries de vin rouge.

#### II. Etude des pigments polymérisés du vin rouge

#### II.1 Marqueurs de quantification des pigments polymérisés du vin

54 composés concernant les pigments polymérisés ainsi que leurs marqueurs de quantification après la phloroglucinolyse ont été identifiés. Des ambiguïtés de fragmentation entre des adduits  $F-A^+$  et des adduits  $A^+$ -F ont été clarifiées. De plus, les structures de type A-F(type A)-F(n) et de type F(n)-A-F(type A), les formes acétylés de l'anthocyane trimère et de l'anthocyane dimères liés par pont éthylidène ont été montrées pour la première fois.

Les mécanismes de dépolymérisation des différentes familles de pigments polymérisés ont été clarifiés grâce aux marqueurs identifiés en spectrométrie de masse haute résolution Q-TOF. Ces marqueurs de quantification ont été utilisés pour déterminer les teneurs spécifiques de chacune des familles de pigments polymérisés ainsi que leurs cinétiques d'évolution durant le vieillissement du vin rouge. Le Tableau 2 récapitule les neuf familles de pigments polymérisés avec leurs structures générales et leurs marqueurs de quantification respectifs.

Tableau 2. Structures générales de pigments polymérisés et leurs marqueurs de quantification.

Groupe	Structure générale	Marqueur de quantification
Groupe I: A(flavène)-T	OND CHI	OMe OH OH OHO
Groupe 2:	T(n) ON OH OH OH OH OH	HO OH OH OH
Groupe 3:	HO CH CH CH CH CH CH T(n)	Adduit phloroglucinol non détecté
Groupe 4: T-A-F(type A)	T(n) CMA CHI	HO NO NO
Groupe 5: A-F(type A) -T	HO OME ON	10 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 0
Groupe 6: A*-P. ET	(n)T Cs, Cs T(n)	000 000 000 000 000 000 000 000 000 00
Groupe 7: A*- P.EA	INC Me	OH OMO OH OMO OH OMO
Groupe 8: T-A <sup>+</sup> (oligomère)	T(n) HO OR	HO 000 000 000 000 000 000 000 000 000 0
Groupe 9: Flavano -Pyranoanthocyane	OMe OME OME OH OH OH	900 321 900 - 300 - 900 100 - 90 - 90 100 - 90 - 90 100 - 90 - 90 100 - 90 - 90 100 - 90 - 90

#### II.2 Évolution des pigments polymérisés au cours du vieillissement du vin

Grâce aux marqueurs de quantification des pigments polymérisés, l'évolution de la concentration

des différentes familles de pigments polymérisés a pu être évaluée pour la première fois avec la stratégie de phloroglucinolyse. La concentration de la plupart d'entre eux diminue durant le vieillissement en bouteille. Néanmoins, différentes tendances d'évolution ont été obtenues. Les concentrations des pigments polymérisés de type T-A+ et de type A+-pont éthylidène-T diminuent rapidement durant le vieillissement, alors que les concentrations plus stables ont été observées pour les structures polymériques avec des liaisons de type A. Cette stabilité relative a également été observée pour les flavano-pyranoanthocyanes. De plus, les structures oligo/polymériques sont généralement plus abondantes que les structures dimériques. Le Tableau 3 récapitule les pigments étudiés dans cette étude en fonction de l'évolution de leurs concentrations au cours du vieillissement

Tableau 3. Comparaison des stabilités des concentrations des pigments monomériques, des pigments polymérisés et des polymères incolores durant le vieillissement du vin rouge en bouteille.

#### Les structures dont les concentrations diminuent :

Dérivés vitisine A
Dérivés vitisine B
Mv<sup>+</sup>
T-Mv<sup>+</sup>
Mv-pont éthylidène-F
Mv-pont éthylidène-T
Mv-Mv<sup>+</sup>
Mv-Mv-Mv<sup>+</sup>

#### Les structures dont les concentrations sont plutôt stables :

Dérivés Mv-3-O-glc-4-vinylcatéchol Dérivés Mv-3-O-glc-4-vinylphénol Dérivés Mv-3-O-glc-4-vinylguaïacol Mv(flavène) —T Mv-F(type A) T-Mv-F(type A) Mv-F(type A)-T Mv-vinyl-F

#### III. Analyse sensorielle et analyse de couleur

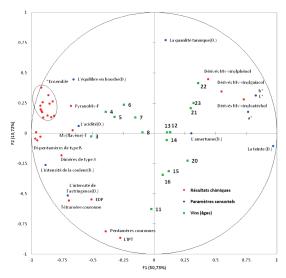
À part les analyses chimiques, l'analyse sensorielle et l'analyse de couleur ont été également effectuées avec la série de 16 vins rouges de Languedoc Montpeyroux.

Une dégustation verticale sur la série de 16 vins rouges de Languedoc Montpeyroux s'est déroulée avec 20 dégustateurs professionnels (12 femmes et 8 hommes). Il a été demandé aux dégustateurs de juger l'aspect visuel et l'aspect gustatif du vin. L'aspect visuel concerne la teinte et l'intensité de la couleur. L'aspect gustatif comprend l'intensité d'astringence, la qualité tannique, l'amertume, l'acidité et l'équilibre en bouche. Des échelles continues ont été proposées et les dégustateurs ont indiqué l'intensité du paramètre correspondant à l'aide d'une croix.

L'évolution de la couleur du vin durant le vieillissement a été évaluée par trois méthodologies différentes : la mesure de l'intensité colorante et de la teinte par spectrophotométrie, la

caractérisation de la couleur en utilisant l'espace de couleur CIELAB avec la mesure des variables L\*a\*b\* à l'aide d'un colorimètre, et l'évaluation sensorielle réalisée par les dégustateurs.

Afin de mieux comprendre les contributions des divers composés étudiés, une régression par moindres carrés partiels (PLS : Partial Least Squares regression) a été réalisée sur l'ensemble des données sensorielles et chimiques obtenues (Figure 8). Cet outil statistique réduit l'espace initial des (nombreuses) variables en un espace de faible dimensionnalité avec un petit nombre de variables, appelées « facteurs » ou « variables latentes », qui sont construites les unes après les autres de façon interactive. Dans notre contexte, des variables dépendantes (Y) comprennent toutes les données sensorielles (point bleu) et des variables explicatives (X) sont les concentrations des composés quantifiés (point rouge). Les observations sont les différents millésimes de vins étudiés (carré vert).



\*Ensemble : C et EC; Mv\*; F-Mv\*; T-Mv\*; Mv-F(type A); T-Mv-F(type A); Mv-F(type A)-T; Mv\*-pont éthylidène-F; Mv\*-pont éthylidène-F; Mv trimérique Dérivés Mv-acide pyruvique; Dérivés Mv-acide pyruvique; Dérivés Mv-acide pyruvique; Dérivés Mv-acide pyruvique;

Figure 8. Cercle de corrélation issu de la régression PLS obtenu à partir des résultats sensoriels et des résultats chimiques ('D.': Données de dégustation).

L'analyse statistique regroupée dans la **Figure 8** a permis d'obtenir un modèle formé par les deux premières composantes F1 et F2 qui représentent 64,45 % des variances totales. L'axe F1 représente à lui seul 50,73 % de la variance totale, ce qui signifie que les données sont significativement discriminées selon cet axe. Les paramètres sensoriels sont séparés par l'axe F1 avec l'équilibre en bouche, l'acidité, l'intensité de la couleur et l'intensité d'astringence opposés à la qualité tannique, l'amertume, les valeurs L\* a\* b\* et la teinte. Le tétramère couronne est très proche de l'intensité d'astringence, cela indique qu'il y a une très forte corrélation entre les deux. Concernant la couleur, l'intensité de la couleur est opposée aux valeurs L\*, a\*, b\* et à la teinte. L'intensité de la couleur est plutôt corrélée positivement avec la plupart des pigments, des pigments polymérisés et des structures polymériques incolores (**Figure 8**\*ensemble), alors que les valeurs L\*, a\*, b\* et la teinte sont positivement corrélées avec les dérivés Mv-vinylphénol, les dérivés Mv-vinylgaïacol et les dérivés Mv-vinylcatéchol. On constate finalement que les vins sont répartis selon leur âge suivant les axes.

#### CONCLUSION

L'objectif de ce travail a été d'approfondir les connaissances sur la composition macromoléculaire du vin ainsi que sur leurs évolutions durant le vieillissement en bouteille. Les études sur les tanins condensés et les pigments polymérisés ont été réalisées de façon simultanée en utilisant différentes techniques de fractionnement et de caractérisation ainsi que la stratégie de dépolymération chimique.

Tout d'abord, une nouvelle famille de tanins condensés: **(des tanins condensés couronnes)** a été découverte pour la première fois dans le vin et dans le règne végétal. Ces tanins condensés couronnes ont comme particularité structurale d'être cycliques et d'être composés uniquement des liaisons inter-flavonoïdes de type B. De plus, ils présentent au sein de leurs structures une cavité relativement grande et composée de quatre cycles aromatiques et de plusieurs fonctions phénols. Les tanins condensés couronnes montrent des propriétés spécifiques : ils sont plus polaires que les tanins condensés de type B; ils ont une stabilité plus élevée que les tanins condensés de type B durant le vieillissement et ils sont partiellement résistants aux conditions de phloroglucinolyse. Un premier test d'activité biologique du tétramère couronne montre une activité inhibitrice de l'agrégation du peptide β-amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer intéressante. Une évaluation plus approfondie de ces activités devra être envisagée. De plus, il a été montré que leurs concentrations étaient plus élevées dans les vins de Syrah que dans les vins de Cabernet Sauvignon et Merlot. Une forte corrélation entre la concentration des tanins couronnes et l'intensité d'astringence ressentie par les dégustateurs a également été mise en évidence.

Concernant les pigments polymérisés, leur large gamme de masse allant des oligomères jusqu'aux polymères rend leur quantification individuelle impossible. Une stratégie de dépolymérisation chimique en milieu acide par phloroglucinolyse a ainsi été utilisée afin de quantifier les pigments polymérisés selon les types de liaisons impliquées. Les mécanismes de dépolymérisation des différentes familles de pigments polymérisés ont été clarifiés grâce aux marqueurs identifiés en spectrométrie de masse haute résolution Q-TOF. Ces marqueurs de quantification ont été utilisés pour déterminer les teneurs spécifiques de chacune des familles de pigments polymérisés ainsi que leurs cinétiques d'évolution durant le vieillissement du vin rouge.

Une dégustation verticale a été réalisée afin d'évaluer les changements d'aspect visuel et d'aspect gustatif durant le vieillissement. Avec le temps, l'intensité de la couleur du vin diminue et la teinte évolue vers le tuilé-orangé. Une diminution de l'intensité d'astringence a été notée par les dégustateurs. Finalement, les résultats de l'étude sensorielle ont été corrélés avec les résultats chimiques afin de mieux comprendre les réactions impliquées durant le vieillissement du vin rouge conduisant au changement de couleur et à l'adoucissement de la sensation d'astringence. Presque tous les composés étudiés sont fortement corrélés avec l'âge du vin. La contribution importante des dérivés hydroxyphényl-pyranoanthocyanes pour les vins vieux a été démontrée et une forte corrélation entre la concentration des tanins couronnes et l'intensité d'astringence ressentie par les dégustateurs a été obtenue.

Les nouveautés apportées dans cette étude ouvrent de nombreuses perspectives de recherche. En particulier, la famille des tanins condensés couronnes, rapportée pour la première fois dans le vin et dans le règne végétal, devra être étudiée plus profondément. L'étude des cinétiques d'évolution des pigments polymérisés durant le vieillissement en bouteille a été réalisée durant cette thèse, et la détermination des cinétiques d'extraction et de formation de ces structures oligomériques et polymériques en fonction des conditions de vinification et d'élevage serait intéressante à réaliser pour aider le vinificateur dans ses choix de parcours œnologiques et garantir la qualité optimum des vins obtenus.

#### **ABREVIATION**

F Flavan-3-ol
T Tanins condensés

A<sup>+</sup> Anthocyane sous forme flavylium A(flavène) Anthocyane sous forme flavène

Mv Malvidine P.E. Pont éthylidène

UPLC Ultra Performance Liquid Chromatography / Chromatographie en phase

liquide à ultrahaute performance

C18 Carbonne 18 UV Ultraviolet

MS Mass spectrometry / Spectrométrie de masse

Q-tof Quadrupole-Time of flight / Quadripôle-Temps de vol

EIC Extracted Ion Chromatogram / Chromatogramme d'ion extrait

BFF Benzofuran Forming Fission
HFR Heterocyclic Ring Fission
RDA Retro-Diels-Alder Fission
QM Quinone Methide Fission

RMN Résonance magnétique nucléaire

H Hydrogène

<sup>13</sup>C RMN Spectre carbonne RMN
<sup>1</sup>H RMN Spectre proton RMN

COSY Correlation spectroscopy / Corrélation proton-proton de spectre RMN

HMBC Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence
NOESY Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

IPT Indice Polyphénols Totaux IC Intensité Colorante

#### **BIBLIOGRAPHIE**

- Peynaud, E. and Blouin J., eds. Le goût du vin: le grand livre de la dégustation. 5ème ed. 2013, DUNOD.
- 2. Picard, M., et al., A sensory study of the ageing bouquet of red Bordeaux wines: A three-step approach for exploring a complex olfactory concept. Food Qual. Prefer, 2015. 42: p. 110-122.
- 3. Carando, S., et al., Levels of flavan-3-ols in french wines. J. Agr. Food Chem., 1999. 47(10): p. 4161-4166.
- 4. Chira, K., et al., Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). J. Agr. Food Chem., 2009. 57(2): p. 545-553.
- Lorrain, B., Chira K. and Teissedre P.L., Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. Food Chem., 2011. 126(4): p. 1991-1999.
- 6. Fontoin, H., et al., Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. Food Qual. Prefer, 2008. 19(3): p. 286-291.
- 7. Chira, K., Jourdes M., and Teissedre P.-L., Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. Eur. Food Res. Technol., 2011. 234(2): p. 253-261.
- 8. He, F, et al., Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. Molecules, 2012. 17(2): p. 1483.
- 9. Somers, T.C., The polymeric nature of wine pigments. Phytochem., 1971. 10(9): p. 2175-2186.
- 10. Li, H.-J. and Deinzer M.L., Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. Anal. Chem., 2007. 79(4): p. 1739-1748.
- De Freitas, V., Recherches sur les tanins condenses: application à l'étude des structures et proprietes des procyanidines oligomeres du raisin et du vin. 1995.
- 12. Tarascou, I., et al., A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling. Magn. Reson. Chem., 2006. 44(9): p. 868-880.
- 13. Papastamoulis, Y., et al., Viniphenol A, a complex resveratrol hexamer from Vitis vinifera stalks: structural elucidation and protective effects against amyloid-β-induced toxicity in PC12 cells. J. Nat. Prod., 2014. 77(2): p. 213-217.
- Jang, J.-H. and Surh Y.-J., Protective effect of resveratrol on β-amyloid-induced oxidative
   PC12 cell death. Free Radical Bio. Med., 2003. 34(8): p. 1100-1110.
- 15. Tarozzi, A., et al., Neuroprotective effects of cyanidin 3-*O*-glucopyranoside on amyloid beta (25–35) oligomer-induced toxicity. Neurosci. Lett., 2010. 473(2): p. 72-76.



Secrétariat de l'Académie Amorim Emilie Loubié : +33 (0) 6 62 20 91 97 Email : contact@academie-amorim.com www.academie-amorim.com