



# Approches sensorielle et analytique de l'arôme fruité des vins rouges : influence relative des levures et des bactéries lactiques

Marine Gammacurta

## ► To cite this version:

Marine Gammacurta. Approches sensorielle et analytique de l'arôme fruité des vins rouges : influence relative des levures et des bactéries lactiques. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2014. Français. <NNT : 2014BORD0353>. <tel-01281324>

**HAL Id: tel-01281324**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01281324>**

Submitted on 2 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Œnologie

Présentée et soutenue publiquement le 18 décembre 2014

Par Marine GAMMACURTA

### **APPROCHES SENSORIELLE ET ANALYTIQUE DE L'ARÔME FRUITÉ DES VINS ROUGES**

#### **INFLUENCE RELATIVE DES LEVURES ET DES BACTERIES LACTIQUES**

Sous la direction du Pr. Gilles de REVEL

#### **Membres du Jury**

M. A. RAZUNGLES, Professeur, Montpellier SUPAGRO ..... Rapporteur  
M. A.C. DA SILVA FERREIRA, Assistant Professor, UCP-ESB, Porto ..... Rapporteur  
Mme. I. MASNEUF-POMAREDE, Professeur, ISVV, Bordeaux Sciences Agro ..... Président  
Mme. S. MARCHAND, Maître de Conférences, ISVV, Université de Bordeaux ..... Membre invité  
Mme. V. MOINE, Directrice scientifique, Société Biolaflfort, Bordeaux ..... Membre invité  
M. G. de REVEL, Professeur, ISVV, Université de Bordeaux ..... Directeur de thèse

## **Approches sensorielle et analytique de l'arôme fruité des vins rouges**

### **Influence relative des levures et des bactéries lactiques**

Les fermentations alcoolique (FA) et malolactique (FML) sont deux étapes importantes de la vinification en rouge dans l'établissement de l'arôme fruité des vins. Afin d'étudier l'importance relative des microorganismes fermentaires, nous étudions l'influence de six couples levures/bactéries lactiques (BL) - trois souches de levures, deux de BL - sur la modulation des notes fruitées de différents vins rouges de Bordeaux.

Une première approche analytique montre l'influence prédominante de la souche de levures sur la concentration de plus de 70 marqueurs potentiels de la note fruitée. L'étude particulière des esters montre que l'effet levures observé dès la fin de la FA persiste au cours du temps malgré la FML et les modifications engendrées par le vieillissement du vin.

L'étude sensorielle conforte l'influence majeure des levures sur la modulation de l'arôme fruité des vins rouges à différents temps d'élevage. Néanmoins, les résultats obtenus suggèrent l'implication d'autres composés aromatiques dans la modulation de la note fruitée des vins, non quantifiés dans la première partie de cette étude.

Un travail de fractionnement d'extraits de vin par HPLC permet par la suite l'identification d'une fraction d'intérêt impliquée dans des variations aromatiques liées à la souche de levures. L'analyse de cette fraction par chromatographie en phase gazeuse n'a pas permis d'identifier le ou les composés impliqués. Nous avons néanmoins mis en évidence une thiophénone qui pourrait agir en tant que masque de l'arôme fruité, ainsi qu'un ester hydroxylé qui pourrait s'avérer être un marqueur intéressant de l'activité bactérienne et dont l'effet exhausteur de notes fruitées est également envisagé comme perspectives.

Mots clés : vin, arôme fruité, levures, esters, fraction, reconstitutions aromatiques.

## **Analytical and sensorial approaches of red wines fruity aroma**

### **Influence of yeasts and lactic acid bacteria**

Alcoholic (AF) and malolactic (MLF) fermentations are important steps in red winemaking for the revelation of wine fruity aroma. To investigate the relative importance of fermentative microorganisms, we studied the influence of six yeasts/lactic acid bacteria (LAB) combination - three yeast strains, two LAB - on Bordeaux red wines fruity notes modulation.

A first analytical approach showed the predominant influence of yeast strain on the concentration of more than 70 potential fruity note markers. Special study of esters showed a yeast strain effect since the end of FA that persists over time, despite MLF and changes caused by wine aging.

Sensory studies also highlighted the major influence of yeasts on red wines fruity aroma modulations at different aging steps. Nevertheless, results suggested the role of other aromatic compounds in fruity note modulation, not quantified in the first part of this study.

The study of fractions made by HPLC with wine organic extracts enables the identification of an interested fraction involved in aromatic variations related to the yeast strain. Analysis of this fraction by gas chromatography has not allowed identifying compounds involved in these organoleptic variations. However, we highlighted a thiophenone that could act as a mask of fruity aroma and a hydroxylated ester that could be an interesting marker of bacterial activity. Its role as enhancer of fruity esters aroma is also considered.

Key words: wine, fruity aroma, yeast, esters, fraction, aromatic reconstitutions.

## Remerciements

Monsieur Gilles de Revel, Professeur à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, m'a confié ce sujet de recherche passionnant. Il m'a permis de découvrir le monde du vin et de la recherche en me laissant une grande liberté dans mon travail, tout en me guidant dans les moments importants et décisifs. Qu'il soit assuré de mon entière reconnaissance.

Madame Isabelle Masneuf-Pomarède, Professeur à Bordeaux Sciences Agro, m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je lui exprime ma plus grande gratitude.

Messieurs Alain Razungles, Professeur à Montpellier SUPAGRO, et António César Da Silva Ferreira, Assistant Professor à l'UCP-ESB de Porto, ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. J'en suis très honorée et les remercie vivement.

Je remercie la société Laffort qui a permis le financement de cette thèse et exprime toute ma gratitude à Luc Laffort pour sa confiance.

Je remercie très chaleureusement Virginie Moine, directrice scientifique de la société Laffort, pour son soutien, sa disponibilité et ses nombreux conseils. Je suis par ailleurs très heureuse qu'elle ait accepté de juger cette thèse.

Monsieur le professeur Denis Dubourdieu, directeur de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, a permis que je réalise ce travail au sein de cet institut. Je lui exprime ma gratitude. Monsieur le professeur Philippe Darriet m'a accueilli au sein de l'unité de recherche Œnologie ; je le remercie vivement.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements aux différents membres du laboratoire de chimie analytique ; à Madame Stéphanie Marchand-Marion, Maître de conférences à l'ISVV, pour ses précieux conseils de chimiste ; à Monsieur Jean-Christophe Barbe, Maître de conférences à Bordeaux Sciences Agro, et à Georgia Lytra qui m'ont apporté leur connaissance sur le fractionnement d'extrait de vin par HPLC ; à Sophie Tempère pour son aide précieuse sur les différentes techniques d'analyse sensorielle. Son amitié et nos nombreux échanges ont rendu cette thèse particulièrement agréable.

Je tiens également à exprimer ma plus profonde reconnaissance à Madame Marie-Claire Perelló et à Monsieur Laurent Riquier, techniciens de recherche au laboratoire de chimie analytique, qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse.

Enfin, pour leur aide et les moments de convivialités passés ensemble, je remercie toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire de chimie analytique : Eléonore, Marie-Hélène, Céline, Magali, Margaux, Maxime.

Je remercie également Claire Jousset, Felix Pouyanne et Nicolas Le Menn qui ont suivi au cours de leur stage les différentes expérimentations réalisées sur le terrain, indispensables à cette thèse et à Claire Guilbaud qui a consacré six mois de ses études à l'étude de l'influence des bactéries lactiques sur l'arôme du vin.

Je tiens à remercier le personnel des sociétés Laffort et Lamothe-Abiet, en particulier Joana Coulon et Nerea Iturmendi pour leur aide et leur soutien, ainsi que Rémi Winterholer pour son aide

dans la réalisation des micro-vinifications au WEC et sa bonne humeur. Je remercie également tout le personnel du laboratoire Sarco pour les nombreuses analyses réalisées.

Merci également à toute l'équipe de Microflora® pour les contrôles d'implantation bactérienne. Je remercie aussi Monsieur le professeur Patrick Lucas qui m'a permis de travailler au sein de l'unité Microbiologie ainsi que Marion Favier pour son aide et sa disponibilité. Merci également Warren Albertin pour son aide dans le traitement statistique des nombreuses données recueillies au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie également les propriétés qui m'ont accueillie au cours des deux premières années de cette thèse et m'ont permis de réaliser mes expérimentations dans les meilleures conditions. Je pense notamment au château Léoville-Poyferré, au château des Graviers, à l'Union des Producteurs de Saint-Emilion, au château Soutard, au château Chantegrive et au château Latour-Martillac, ainsi qu'aux nombreuses personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer et avec qui j'ai eu la chance de travailler.

Je n'oublie pas les dégustateurs, indispensables à la réalisation des études sensorielles, et les remercie pour le temps qu'ils m'ont accordé.

Je suis très reconnaissante envers Axel Marchal, Maître de conférences à l'ISVV. Ces trois années de thèse n'auraient définitivement pas été les mêmes sans son amitié, son soutien et son réconfort. Ses nombreuses connaissances œnologiques et scientifiques m'ont été d'une aide précieuse dans la réalisation de ces travaux. Il m'a fait partager sa passion pour le vin, et nos discussions à ce sujet ont été des plus enrichissantes. Je le remercie très sincèrement.

Je remercie bien sûr également Adrien Zimmer pour son amitié, son soutien et tous les bons moments partagés ensemble, sans oublier ses délicieux repas du midi.

Mariette El Khoury et Fety Jaomanjaka ont été mes deux "compagnons d'infortune" durant ces trois années. Je les remercie chaleureusement pour les nombreuses parties de rigolades et soirées films passés ensemble.

Je pense aussi à Philippe Renault, Guillaume Antalick, Elodie Guittard, Julien Michel, Isabelle Ky. Merci à eux pour leur amitié et les nombreux jeudis soirs passés en leur compagnie.

Une pensée amicale pour toutes les personnes que j'ai côtoyées à l'ISVV. S'ils sont trop nombreux pour être tous cités, je leur exprime ma reconnaissance et ma sympathie.

Enfin, je remercie ma famille, mes amis (charentais, toulousains, expatriés en Martinique ou à Londres) pour leur soutien sans faille.

# Sommaire

Liste des abréviations.....	i
Liste des tableaux .....	iv
Liste des figures .....	vii
Introduction générale.....	1
<b>PREMIERE PARTIE</b> : Etude analytique et sensorielle de l'influence organoleptique de souches commerciales de levures et de bactéries lactiques sur l'arôme fruité des vins rouges de Bordeaux .....	4
<b>CHAPITRE 1</b> : ETUDE DE L'EFFET COUPLE LEVURES/BACTERIES LACTIQUES .....	5
<b>I. Les fermentations alcoolique et malolactique : des étapes clés pour l'élaboration des vins rouges</b> .....	5
I.A. Aspects microbiologiques et biochimiques des fermentations .....	6
I.A.1. <i>La fermentation alcoolique et les levures</i> .....	6
I.A.1.a. Processus de la fermentation alcoolique .....	6
I.A.1.b. Diversité des souches de levures .....	8
I.A.2. <i>La fermentation malolactique et les bactéries</i> .....	9
I.A.2.a. Nature de la transformation malolactique .....	10
I.A.2.b. Diversité des souches de bactéries lactiques.....	11
I.A.3. <i>Interactions levures/bactéries lactiques : état de l'art</i> .....	11
I.A.3.a. Les interactions microbiennes au cours de la vinification.....	12
I.A.3.b. Influence des interactions levures/bactéries sur la composition chimique et le profil aromatique des vins .....	13
I.B. Connaissances sur les composés aromatiques impliqués dans l'expression de l'arôme fruité des vins rouges.....	14
I.B.1. <i>Les composés d'origine variétale</i> .....	15
I.B.1.a. Les norisoprénoides à 13 atomes de carbone .....	15
I.B.1.b. Les lactones .....	17
I.B.1.c. Les thiols.....	18
I.B.2. <i>Les alcools supérieurs</i> .....	19
I.B.3. <i>Les acides volatils</i> .....	21
I.B.4. <i>Les esters</i> .....	23
I.B.4.a. Les esters variétaux .....	25
I.B.4.b. Les esters d'acides fixes .....	25
I.B.4.c. Les esters éthyliques d'acides gras.....	26
I.B.4.d. Les acétates d'alcools supérieurs .....	26
I.B.4.e. Les esters éthyliques d'acides branchés .....	27
I.B.4.f. Les esters hydroxylés .....	27
I.B.4.g. Les esters mineurs.....	28
I.B.5. <i>Les composés soufrés volatils</i> .....	28
I.B.6. <i>Le diacétyle et autres composés <math>\alpha</math>-dicarbonylés</i> .....	30
<b>II. Etude de l'influence de six couples levures/bactéries lactiques sur la composition chimique d'un vin rouge</b> .....	32
II.A. Méthodes d'analyses des principales molécules volatiles .....	32
II.A.1. <i>Analyses par injection directe et par espace de tête</i> .....	32
II.A.2. <i>Analyses des molécules volatiles par extraction liquide/liquide</i> .....	35

II.A.3. Analyses par microextraction sur phase solide .....	39
II.B. Description du plan expérimental .....	43
II.B.1. Caractéristiques des souches de levures et de bactéries utilisées.....	43
II.B.2. Méthodes d'analyses classiques et contrôles d'implantation .....	44
II.B.3. Protocole de vinification.....	44
II.B.4. Cinétiques des fermentations et bilans œnologiques.....	46
II.C. Résultats préliminaires : influence du couple levures/bactéries sur la concentration de soixante-quatorze marqueurs potentiels de l'arôme des vins rouges .....	49
II.D. Discussion.....	58

**CHAPITRE 2 : PREDOMINANCE DE LA SOUCHE DE LEVURES SUR LA CONCENTRATION DES ESTERS AU COURS DE LA VINIFICATION ET DE L'ÉLEVAGE .....** 60

**I. Evolution de la concentration en esters au cours de la vinification et de l'élevage : état de l'art.....** 60

I.A. Synthèse des esters au cours de la fermentation alcoolique.....	60
I.A.1. Les esters éthyliques d'acides gras .....	61
I.A.2. Les acétates d'alcools supérieurs .....	62
I.A.3. Les esters éthyliques branchés .....	64
I.A.4. Les esters hydroxylés et esters mineurs.....	65
I.B. Modulation de la teneur en esters par les bactéries lactiques au cours de la fermentation malolactique et leur impact potentiel au cours de l'élevage.....	65
I.B.1. Synthèse et hydrolyse des esters par les bactéries lactiques au cours de la fermentation malolactique .....	66
I.B.2. Influence indirecte de la souche de bactéries lactiques sur la concentration en esters au cours de l'élevage.....	68
I.C. Hydrolyse et synthèse chimique des esters au cours de l'élevage.....	69

**II. Influence de la souche de levures sur la synthèse des esters dans les vins rouges lors de la fermentation alcoolique et au cours de l'élevage .....** 70

II.A. Conditions expérimentales de l'étude et méthodes d'analyse .....	70
II.A.1. Vinifications.....	72
II.A.1.a. Protocole de vinifications .....	72
II.A.1.b. Cinétiques des fermentations et analyses œnologiques classiques .....	73
II.A.2. Suivi de 32 esters odorants au cours de la vinification et de l'élevage .....	78
II.B. Résultats : mise en évidence d'un effet levure en fin de fermentation alcoolique qui perdure pendant l'élevage des vins .....	79
II.B.1. Les esters éthyliques d'acides gras.....	79
II.B.2. Les acétates d'alcools supérieurs .....	83
II.B.3. Les esters éthyliques d'acides branchés .....	85
II.B.4. Les esters mineurs.....	87
II.C. Discussion.....	88

**III. Influence limitée de la fermentation malolactique et de la souche de bactéries lactiques sur les teneurs en esters .....** 92

III.A. Observation d'un effet de la souche de bactéries lactiques sur la teneur en certains esters pendant l'élevage de vins de Cabernet Sauvignon.....	93
III.A.1. Résultats .....	93
III.A.2. Discussion .....	95
III.B. Etude de l'influence de la souche de bactéries lactiques sur l'évolution de la concentration en esters au cours de l'élevage. Modélisation au laboratoire .....	96
III.B.1. Protocole de la micro-vinification.....	97

III.B.1.a. Acclimatation des bactéries et dénombrement de la population bactérienne par épifluorescence .....	98
III.B.1.b. Inoculation des bactéries et suivi de la fermentation malolactique .....	99
III.B.1.c. Conservation des vins et dosage des esters.....	100
III.B.2. Résultats et discussion.....	100
III.B.2.a. Cinétiques des fermentations et analyses œnologiques classiques .....	100
III.B.2.b. Concentration des esters au cours du temps et effet de la souche bactérienne .....	101
III.C. Discussion.....	104

## **CHAPITRE 3 : ETUDE SENSORIELLE DE LA MODULATION DE L'AROME FRUITE PAR LES**

<b>MICROORGANISMES .....</b>	<b>106</b>
------------------------------	------------

### **I. L'arôme fruité des vins rouges, connaissances actuelles..... 106**

I.A. Modification de l'arôme fruité des vins rouges par les microorganismes fermentaires.....	106
I.A.1. Révélation de l'arôme du vin par les levures au cours de la fermentation alcoolique .....	106
I.A.2. Modulation de l'arôme fruité par les bactéries lactiques .....	107
I.B. L'analyse sensorielle .....	109
I.B.1. L'épreuve de classement .....	110
I.B.2. L'analyse descriptive quantitative .....	110
I.B.3. Le Napping®.....	111

### **II. Etude de l'effet des microorganismes sur la modulation de l'arôme fruité :**

#### **perception par les dégustateurs ..... 113**

II.A. Caractérisation globale analysée par la méthode du Napping® .....	113
II.A.1. Méthodologie de l'épreuve .....	114
II.A.2. Caractérisation globale à différents temps d'élevage.....	117
II.A.3. Discussion.....	122
II.B. Confirmation du rôle essentiel de la souche de levures par un test de classement .....	123
II.B.1. Méthodologie de l'épreuve .....	123
II.B.2. Résultats obtenus .....	125
II.B.3. Discussion.....	126
II.C. Caractérisation de l'effet souche de levures par un profil sensoriel .....	128
II.C.1. Méthodologie de l'épreuve .....	128
II.C.2. Résultats obtenus .....	128
II.C.3. Discussion.....	132

## **Conclusion de la première partie ..... 134**

## **DEUXIÈME PARTIE : Mise en évidence d'interactions perceptives ..... 137**

### **CHAPITRE 4 : ELABORATION D'UNE STRATEGIE GUIDEE PAR L'ANALYSE SENSORIELLE**

<b>DANS LE BUT D'ISOLER UNE FRACTION ODORANTE D'INTERET .....</b>	<b>138</b>
---	------------

#### **I. Intérêt du fractionnement des vins par HPLC ..... 138**

I.A. Principe et contraintes de la stratégie de fractionnement par HPLC.....	139
I.B. Quelques exemples d'interactions perceptives mises en évidence grâce au fractionnement par HPLC d'extraits de vin .....	141

#### **II. Analyses préliminaires..... 142**

II.A. Méthodologie.....	142
II.A.1. Extraction liquide-liquide suivie du fractionnement par HPLC .....	142
II.A.2. Reconstitutions aromatiques.....	143
II.B. Validation de la méthode de fractionnement et sélection des vins .....	144
II.B.1. Validation de la méthode .....	144

II.B.1.a. Méthodologie de l'analyse sensorielle .....	144
II.B.1.b. Résultats et discussion : évaluation de la méthode de fractionnement.....	146
II.B.2. <i>Sélection des vins</i> .....	147
II.B.2.a. Méthodologie de l'analyse sensorielle .....	147
II.B.2.b. Résultats et discussion .....	147
<b>III. Description olfactive des fractions obtenues par HPLC issues d'un vin de Cabernet Sauvignon fermenté par deux souches de levures différentes à plusieurs étapes de vinification et d'élevage.....</b>	<b>149</b>
III.A. Conditions de l'analyse sensorielle .....	149
III.B. Description des fractions par les dégustateurs.....	150
III.B.1. <i>Distinction des fractions deux à deux</i> .....	150
III.B.2. <i>Comparaison de l'intensité aromatique</i> .....	150
III.B.3. <i>Description qualitative des fractions</i> .....	151
III.C. Discussion.....	154
<b>IV. Mise en évidence d'une fraction d'intérêt grâce à des tests d'omission .....</b>	<b>156</b>
IV.A. Recherche des fractions d'intérêt .....	156
IV.A.1. <i>Méthodologie de l'analyse sensorielle</i> .....	156
IV.A.2. <i>Résultats et discussion</i> .....	157
IV.B. Confirmation de l'importance de la fraction 12 dans la perception de l'arôme fruité.....	159
IV.B.1. <i>Méthodologie de l'analyse sensorielle</i> .....	159
IV.B.2. <i>Résultats et discussion</i> .....	160
IV.B.2.a. Expérience 1 : sélection de la fraction 12.....	160
IV.B.2.b. Expérience 2 : confirmation de l'effet de la fraction 12 .....	161
IV.C. Discussion .....	163

## CHAPITRE 5 : IDENTIFICATION DES MOLECULES PRESENTES DANS LA FRACTION

D'INTERET .....	164
<b>I. Matériel et méthodes .....</b>	<b>164</b>
I.A. Analyse de la fraction 12 par GC-MS.....	164
I.A.1. <i>Composés de référence commerciaux</i> .....	165
I.A.2. <i>Synthèse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle</i> .....	165
I.B. Quantification des composés dans le vin .....	166
<b>II. Tentative d'identification et quantification des composés majeurs de la fraction 12 .....</b>	<b>167</b>
II.A. Tentative d'identification des pics A, B et C.....	168
II.B. Quantification dans le vin des quatre alcools identifiés.....	172
II.C. Discussion.....	173
<b>III. Tentative d'identification et quantification de composés minoritaires de la fraction 12 .....</b>	<b>175</b>
III.A. Tentative d'identification des pics D, E et F .....	175
III.B. Quantification dans le vin des trois molécules identifiées.....	178
III.C. Discussion.....	180

## CHAPITRE 6 : QUANTIFICATION DE LA 2-METHYLTETRAHYDROTHIOPHEN-3-ONE ET DU 2-HYDROXY-3-METHYLBUTANOATE D'ETHYLE DANS LES VINS EXPERIMENTAUX DU MILLESIME 2012.....

<b>I. Matériel et méthodes .....</b>	<b>183</b>
<b>II. Quantification et semi-quantification dans le vin .....</b>	<b>186</b>

II.A. Quantification de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one .....	186
II.B. Etude du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ; comparaison avec le leucate d'éthyle.....	187
<i>II.B.1. Caractéristiques chimiques</i> .....	187
<i>II.B.2. Semi-quantification dans le vin</i> .....	189
II.C. Discussion.....	193
<b>Conclusion de la deuxième partie .....</b>	<b>195</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>197</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>201</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>218</b>
ANNEXE 1 : Méthodes expérimentales .....	219
ANNEXE 2 : Concentrations en esters dosées dans les vins WEC11, WEC12, PL et SE à différents stades de leur élaboration.....	246
ANNEXE 3 : Fiche de dégustation pour un test de classement et un test triangulaire .....	255
ANNEXE 4 : Fiche de dégustation pour un test de profil comparé .....	256
ANNEXE 5 : Fiche de dégustation pour la comparaison directe de fractions deux à deux.....	258

## Liste des abréviations

### Abréviations générales

°C	Degré Celsius
µg, mg, g, kg	Microgramme, milligramme, gramme, kilogramme
µL, mL, L, hL	Microlitre, millilitre, litre, hectolitre
µm, mm, m	Micromètre, millimètre, mètre
ACP	Analyse en composante principale
AFM	Analyse factorielle multiple
ANOVA	Analyse de variance
BL	Bactéries lactiques
FA	Fermentation alcoolique
FML	Fermentation malolactique
LSA	Levures sèches actives
NA	Non applicable
n.d.	Non déterminé
NQ	Non quantifiable
NS	Non significatif
PL	Pessac-Léognan
PPDS	Plus petite différence significative
s, min, h	Seconde, minute, heure
SE	Saint-Emilion
TAV	Titre alcoométrique volumique
tr/min	Tours par minute
UFC	Unité formant une colonie
WEC	<i>Wine experimental center</i> ; centre expérimental de la société Laffort

### Abréviations des molécules

2mC <sub>4</sub>	Acide 2-méthylbutyrique
2mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	2-méthylbutyrate d'éthyle
2OH3C <sub>1</sub> C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle
2OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	2-hydroxyhexanoate d'éthyle
3OHC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	3-hydroxybutyrate d'éthyle
3SH	3-sulfanylhexanol
4MMP	4-mercapto-4-méthylpentan-2-one
6OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	6-hydroxyhexanoate d'éthyle
α-i	α-ionone
β-dam	β-damascone
β-done	β-damascénone
β-i	β-ionone
δ-C10	δ-décalactone
γ-C10	γ-décalactone
γ-C11	γ-undécalactone
γ-C12	γ-dodécalactone
γ-C8	γ-octalactone
γ-C9	γ-nonolactone
AAS	Acétate d'alcools supérieurs
C <sub>10</sub>	Acide décanoïque
C <sub>12</sub>	Acide dodécanoïque
C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	Acétate de propyle
C <sub>2</sub> C <sub>8</sub>	Acétate d'octyle
C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub>	Acétate d'isobutyle
C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	Propionate d'éthyle
C <sub>4</sub>	Acide butyrique

C <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	Butyrate de méthyle
C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	Butyrate d'éthyle
C <sub>4</sub> iC <sub>5</sub>	Butyrate d'isoamyle
C <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	Valérate d'éthyle
C <sub>6</sub>	Acide hexanoïque
C <sub>6</sub> C <sub>1</sub>	Hexanoate de méthyle
C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	Hexanoate d'éthyle
C <sub>6</sub> iC <sub>4</sub>	Hexanoate d'isobutyle
C <sub>6</sub> iC <sub>5</sub>	Hexanoate d'isoamyle
C <sub>7</sub> C <sub>2</sub>	Heptanoate d'éthyle
C <sub>8</sub>	Acide octanoïque
C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	Octanoate de méthyle
C <sub>8</sub> C <sub>2</sub>	Octanoate d'éthyle
C <sub>8</sub> iC <sub>5</sub>	Octanoate d'isoamyle
C <sub>9</sub> C <sub>2</sub>	Nonanoate d'éthyle
C <sub>10</sub> C <sub>1</sub>	Décanoate de méthyle
C <sub>10</sub> C <sub>2</sub>	Décanoate d'éthyle
C <sub>12</sub> C <sub>2</sub>	Dodécanoate d'éthyle
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CinC <sub>2</sub>	Cinnamate d'éthyle
dhCinC <sub>2</sub>	Dihydrocinnamate d'éthyle
DMS	Sulfure de diméthyle
EEAB	Esters éthyliques d'acides branchés
EEAG	Esters éthyliques d'acides gras
Framb	Frambinone
gerC <sub>1</sub>	<i>Trans</i> -geranate de méthyle
H <sub>2</sub> S	Sulfure d'hydrogène
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide sulfurique
HexC <sub>2</sub>	<i>Trans</i> -2-hexénoate d'éthyle
iC <sub>4</sub>	Acide isobutyrique
iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	Isobutyrate d'éthyle
iC <sub>5</sub>	Acide isovalérique
iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	Isovalérate d'éthyle
LacC <sub>2</sub>	Lactate d'éthyle
LeuC <sub>2</sub>	Leucate d'éthyle
N	Azote
NaCl	Chlorure de sodium
PhC <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	Phénylacétate d'éthyle
SDE	Succinate de diéthyle
SME	Succinate de monoéthyle
SO <sub>2</sub>	Dioxyde de soufre

### Abréviations relatives aux techniques analytiques utilisées

BP21	Colonne capillaire de phase polaire
C18	Silice à polarité de phase inversée (greffée C18)
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GC-O	Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie
CIS	<i>Cooled injection system</i>
CPWAX57 CB	Colonne capillaire de phase très polaire
eV	Electron-volt
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FPD	Détecteur à photométrie de flamme
HP5	Colonne capillaire non polaire
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HS	<i>Head space</i> (espace de tête)
NIST	<i>US National Institute of Standards and Technology</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane

RA	Reconstitution aromatique
SBSE	<i>Stir bar sorbtive extraction</i>
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SPME	<i>Solid phase microextraction</i>
TDS	<i>Thermal desorption system</i>
m/Z	Rapport masse/charge

## Liste des tableaux

- Tableau 1.** Principaux composés d'origine variétale à caractère fruité identifiés dans les vins rouges.
- Tableau 2.** Principaux alcools supérieurs synthétisés par la levure au cours de la fermentation alcoolique.
- Tableau 3.** Principaux acides volatils synthétisés par la levure au cours de la fermentation alcoolique.
- Tableau 4.** Principaux esters à caractère fruité identifiés dans les vins rouges.
- Tableau 5.** Principaux composés soufrés volatils identifiés dans les vins rouges.
- Tableau 6.** Principaux composés dicarboxylés et leurs produits de réduction identifiés dans les vins rouges.
- Tableau 7.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des alcools supérieurs.
- Tableau 8.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des composés acétoïniques.
- Tableau 9.** Conditions expérimentales de la HS-GC-FPD pour le dosage des composés soufrés.
- Tableau 10.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des acides volatils.
- Tableau 11.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour le dosage des composés dicarboxylés.
- Tableau 12.** Ions spécifiques utilisés pour la détection des composés dicarboxylés.
- Tableau 13.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour le dosage des composés polaires.
- Tableau 14.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des composés polaires.
- Tableau 15.** Conditions expérimentales de la SBSE-GC-MS pour le dosage des C<sub>13</sub>-norisoprénoides et lactones.
- Tableau 16.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des C<sub>13</sub>-norisoprénoides et lactones.
- Tableau 17.** Conditions expérimentales de la HS-SPME-GC-MS pour le dosage des esters apolaires.
- Tableau 18.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des esters apolaires.
- Tableau 19.** Principaux paramètres œnologiques du moût et des vins après les fermentations alcoolique et malolactique. Les données représentent la moyenne des triplicats pour chaque couple  $\pm$  l'écart type.
- Tableau 20.** Concentrations moyennes  $\pm$  écart type (exprimées en mg/L) des composés volatils fermentaires dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage pour chaque couple levures/BL vinifié en triplicat. Les données ont été traitées par analyse de variance à un facteur (couple).
- Tableau 21.** Concentrations moyennes  $\pm$  écart type (exprimées en  $\mu$ g/L) des esters dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage pour chaque couple levures/BL vinifié en triplicat. Les données ont été traitées par analyse de variance à un facteur (couple).
- Tableau 22.** Niveau de significativité de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) pour les composés volatils dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage.
- Tableau 23.** Niveau de significativité de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) pour les esters dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage.
- Tableau 24.** Principaux paramètres œnologiques du moût et des vins WEC 12, PL et SE après les fermentations alcooliques et malolactiques. Pour les vins WEC 11, les données sont présentées Tableau 19. Les données représentent la moyenne des triplicats pour chaque couple  $\pm$  l'écart type.

- Tableau 25.** Conditions expérimentales de la HS-SPME-GC-MS pour le dosage des esters apolaires.
- Tableau 26.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des étalons internes.
- Tableau 27.** Niveaux de significativité de l'ANOVA à un facteur (levures) pour les esters dosés dans les vins WEC 11 et WEC 12 à 5 étapes de leur élaboration.
- Tableau 28.** Influence de la souche de levures sur la concentration en esters éthyliques d'acides gras et en propionate d'éthyle dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'ester (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).
- Tableau 29.** Influence de la souche de levures sur la concentration en acétates d'alcools supérieurs dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'esters (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).
- Tableau 30.** Influence de la souche de levures sur la concentration en esters éthyliques d'acides branchés dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'ester (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).
- Tableau 31.** Influence de la souche de levures sur la concentration en esters méthyliques, esters éthyliques à nombre impair de carbone, esters isoamyliques, cinnamates et esters mineurs dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'ester (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).
- Tableau 32.** Niveaux de significativité de l'ANOVA à un facteur (bactéries) pour les esters éthyliques d'acides gras et les acétates dosés dans les vins WEC 11, WEC 12 et PL à 5 étapes de leur élaboration.
- Tableau 33.** Principaux paramètres œnologiques des vins après FA et FML. Les données représentent la moyenne des réplicats pour chaque modalité  $\pm$  l'écart type.
- Tableau 34.** Concentrations moyennes en EEAG et AAS  $\pm$  écart type des triplicats (exprimés en  $\mu\text{g/L}$ ) déterminées dans les vins inoculés par les BL B28 ou 450, après FML et après 2, 4, 6 et 8 semaines de conservation. Les données ont été traitées par ANOVA à un facteur (bactéries).
- Tableau 35.** Résultats du test de classement par rangs pour les séances 3 (WEC 2012, 3 mois) et 6 (WEC 2012, 12 mois).
- Tableau 36.** Résultats du test de classement par rangs pour les séances 4 (PL, 3 mois) et 5 (SE, 3 mois) et 7 (PL, 12 mois).
- Tableau 37.** Description des fractions obtenues par fractionnement HPLC en phase normale et en phase inverse par un jury constitué de 11 à 20 juges considérés comme experts.
- Tableau 38.** Conditions expérimentales de l'HPLC pour le fractionnement d'un extrait brut.
- Tableau 39.** Echantillons utilisés lors des différents tests triangulaires.
- Tableau 40.** Résultats du test triangulaire pour les séances 1, 2, 3 et 4.
- Tableau 41.** Résultats du test de classement par rang des RA pour les séances 5 (PL, 3 mois), 6 (WEC 2012, 3 mois).
- Tableau 42.** Description des fractions obtenues par fractionnement HPLC des vins PL fermentés par le couple 522D/B28 par un panel constitué de 3 à 6 juges considérés comme spécialistes, à différents temps de prélèvement (fin FA, fin FML, 3 et 6 mois d'élevage).
- Tableau 43.** Regroupement des fractions en fonction des descripteurs générés par le panel (3 à 6 juges) et des différences d'intensité de l'arôme perçues par au moins 50 % des juges entre les différentes modalités évaluées.

**Tableau 44.** Composition des reconstitutions aromatiques présentées lors des différents tests. Le premier test de chaque expérience est un test d'omission d'un groupe de fractions. Pour le second, les groupes de fractions testés ont été échangés et mélangés à la RA issue de l'autre levure. Les modalités comparées sont FX10/B28 vs 522D/B28 issues des vins PL après FML.

**Tableau 45.** Composition des reconstitutions aromatiques présentées lors des différents tests de profil. Les RA utilisées pour l'expérience 1 sont issues d'un cru classé Pessac-Léognan 2003. Les modalités comparées au cours de l'expérience 2 sont FX10/B28 vs 522D/B28, issues des vins PL après 3 mois d'élevage.

**Tableau 46.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour l'analyse de la fraction 12.

**Tableau 47.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) utilisés pour la détection des composés présents dans la fraction 12 et données de la courbe de calibration réalisée pour quatre composés.

**Tableau 48.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour l'analyse des énantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle.

**Tableau 49.** Conditions expérimentales de la GC-O pour l'étude olfactive des énantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle.

**Tableau 50.** Niveau de significativité de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) pour les deux esters quantifiés dans les vins WEC12, PL et SE à différentes étapes de leur élaboration.

## Liste des figures

**Figure 1.** Voie de la glycolyse et de la fermentation alcoolique.

**Figure 2.** Représentation schématique de la formation de composés aromatiques par la levure.

**Figure 3.** Evolution des populations de levures *S. cerevisiae* et de bactéries lactiques *O. oeni* au cours de la vinification.

**Figure 4.** Plan expérimental des micro-vinifications réalisées en 2011 au WEC.

**Figure 5.** Cinétiques des fermentations alcooliques (a) par la mesure de la densité et malolactiques (b) par le dosage de l'acide malique (exprimé en g/L) pour une cuve de chaque modalité des vins WEC 2011 inoculés avec différentes souches de levures et de BL.

**Figure 6.** Représentation des vins WEC 2011 en triplicat après 3 mois d'élevage (a et c) et des composés volatils (b et d) par analyse en composante principale (a et b : axes F1-F2 ; c et d : axes F1-F3).

**Figure 7.** Voie de biosynthèse des esters éthyliques d'acides gras chez *S. cerevisiae*.

**Figure 8.** Voie de biosynthèse des acétates d'alcools supérieurs chez *S. cerevisiae*.

**Figure 9.** Voie de biosynthèse des esters éthyliques d'acides branchés chez *S. cerevisiae*.

**Figure 10.** Différentes voies de biosynthèse des esters.

**Figure 11.** Plan expérimental des vinifications réalisées en 2011 et 2012 au WEC, à Pessac-Léognan (PL) et à Saint-Emilion (SE).

**Figure 12.** Cinétiques des fermentations alcooliques par la mesure de la densité pour une cuve de chaque modalité des vins WEC 2012 (a), PL (b) et SE (c) inoculés avec différentes souches de levures.

**Figure 13.** Cinétiques des fermentations malolactiques par le dosage de l'acide malique (exprimé en g/L) pour une cuve de chaque modalité des vins WEC 2012 (a), PL (b) et SE (c) inoculés avec différentes souches de bactéries lactiques.

**Figure 14.** Teneurs moyennes en esters éthyliques d'acides gras (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon la souche de levures utilisée pour réaliser la FA.

**Figure 15.** Teneurs moyennes en acétates d'alcools supérieurs (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon la souche de levures utilisée pour réaliser la FA.

**Figure 16.** Teneurs moyennes en esters éthyliques d'acides branchés (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observés dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon la souche de levures utilisée pour réaliser la FA.

**Figure 17.** Teneurs moyennes en esters totaux (trente-deux) (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observés dans les différents vins après FA et à la fin de chaque expérimentation en fonction de la souche de levures utilisée.

**Figure 18.** Teneurs moyennes en décanoate et dodécanoate d'éthyle ( $\text{C}_{10}\text{C}_2$  et  $\text{C}_{12}\text{C}_2$ ) et en acétate d'hexyle et d'octyle ( $\text{C}_2\text{C}_6$  et  $\text{C}_2\text{C}_8$ ) (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observés dans les vins WEC 11 après FML et au cours de l'élevage.

**Figure 19.** Plan expérimental des micro-vinifications réalisées en laboratoire.

**Figure 20.** Suivi cinétique des FML par le dosage de l'acide malique (exprimé en g/L) pour une fermentation de chaque modalité.

**Figure 21.** Teneurs moyennes (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliqués en esters éthyliques d'acides gras (a) et acétates d'alcools supérieurs (b) observés dans les différentes modalités au cours de leur élaboration et selon la souche de BL utilisée pour réaliser la FML.

**Figure 22.** Descripteurs générés par le panel lors des séances 1 et 2. Les mots représentés par la même couleur ont été regroupés sous le même terme. Les mots en gris n'ont pas été utilisés dans l'AFM (cités une seule fois ou plusieurs fois par le même juge).

**Figure 23.** Organisation des données recueillies suite au test du Napping® couplé au Profil Ultra-Flash. Les coordonnées x et y de chaque vin pour chaque juge constituent les données actives. Les descripteurs générés par le panel ainsi que leur fréquence de citation relevés pour chaque vin constituent les données illustratives.

**Figure 24.** Représentations des descripteurs issus du Profil Ultra-Flash et introduits en tant que variables illustratives dans l'AFM (a) et des individus (b) issus de l'AFM réalisée sur la séance 1 de Napping® (vin 2011 après 3 mois d'élevage) (axes F1-F2).

**Figure 25.** Représentations des descripteurs issus du Profil Ultra-Flash et introduits en tant que variables illustratives dans l'AFM (a, c, e) et des individus (b, d, f) issus de l'AFM réalisée sur la séance 2 de Napping® (vin 2011 après 12 mois d'élevage) (a et b : F1-F2 ; c et d : F1-F3 ; e et f : F2-F3).

**Figure 26.** Profils comparés réalisés sur les vins WEC 2012 (a), PL (b) et SE (c), après 3 mois d'élevage, vinifiés avec 6 ou 4 couples levures/bactéries différents et résultats (p-value) de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries).

**Figure 27.** Profils comparés réalisés sur les vins WEC 2012 (a) et PL (b), après 12 mois d'élevage, vinifiés avec 6 ou 4 couples levures/bactéries différents et résultats (p-value) de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries).

**Figure 28.** Profils sensoriels des différentes reconstitutions aromatiques (RA) réalisées à partir d'un cru classé Pessac-Léognan 2003 (moyenne  $\pm$  écart type). (a) comparaison entre la RA totale (1 à 25) et la RA avec omission des fractions 12 à 13 ; (b) comparaison entre la RA totale (1 à 25) et la RA avec omission de la fraction 12 ; (c) comparaison entre la RA totale (1 à 25) et la RA avec omission de la fraction 13.

**Figure 29.** Profils sensoriels des différentes reconstitutions aromatiques (RA) réalisées à partir des vins PL après 3 mois d'élevage pour les modalités **FX10/B28** vs **522D/B28** (moyenne  $\pm$  écart type). (a) RA totales (1 à 25) ; (b) omission de la fraction 12 ; (c) échange de la fraction 12.

**Figure 30.** Chromatogramme en mode SCAN de la fraction 12 issue de la modalité FX10/B28 du vin PL après 3 mois d'élevage.

**Figure 31.** (a) Spectre de masse du pic A. (b) Spectre de masse du 2-phényléthanol selon NIST 2008 (NIST register number : 118543 ; CAS number : 60-12-8). (c) Spectre de masse du 2-phényléthanol en solution pure.

**Figure 32.** (a) Spectre de masse du pic B. (b) Spectre de masse du 3-méthylbutan-1-ol selon NIST 2008 (NIST register number : 19490 ; CAS number : 123-51-3). (c) Spectre de masse du 3-méthylbutan-1-ol en solution pure ; (d) Spectre de masse du 2-méthylbutan-1-ol en solution pure.

**Figure 33.** (a) Spectre de masse du pic C. (b) Spectre de masse de l'alcool benzylique selon NIST 2008 (NIST register number : 151560 ; CAS number : 100-51-6). (c) Spectre de masse de l'alcool benzylique en solution pure.

**Figure 34.** Teneurs moyennes en 2-phényléthanol (a), 2-méthylbutan-1-ol et 3-méthylbutan-1-ol (b) (exprimées en mg/L), et alcool benzylique (c) (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliqués observées dans les vins PL après 3 mois d'élevage.

**Figure 35.** Agrandissement du chromatogramme en mode SCAN entre 18 et 42,5 minutes de la fraction 12 issue de la modalité FX10/B28 du vin PL après 3 mois d'élevage.

**Figure 36.** (a) Spectre de masse du pic D. (b) Spectre de masse du malate de diéthyle selon NIST 2008 (NIST register number : n.c. ; CAS number : 7554-12-3). (c) Spectre de masse du malate de diéthyle en solution pure.

**Figure 37.** (a) Spectre de masse du pic E. (b) Spectre de masse de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one selon NIST 2008 (NIST register number : 249131 ; CAS number : 13679-85-1). (c) Spectre de masse de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one en solution pure.

**Figure 38.** (a) Spectre de masse du pic D. (b) Spectre de masse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle selon NIST 2008 (NIST register number : 164508 ; CAS number : 2441-06-7). (c) Spectre de masse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle de synthèse en solution pure.

**Figure 39.** Teneurs moyennes en malate de diéthyle (a) et 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one (b) ainsi que les teneurs théoriques moyennes en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (c) (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins PL après 3 mois d'élevage.

**Figure 40.** Enantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle. (a) S-2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (CAS number : 63674-18-0) ; (b) R-2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (CAS number : 129025-85-0).

**Figure 41.** Teneurs moyennes en 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon le couple utilisé.

**Figure 42.** Chromatogrammes obtenus suite à l'analyse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle sur colonne chirale ( $\gamma$ -cyclodextrine) (a) du mélange racémique synthétisé au laboratoire, (b) de la forme S, (c) de la forme R et (d) d'un extrait de vin rouge.

**Figure 43.** Teneurs théoriques moyennes en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % pour les répliquats biologiques observées dans les vins WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon le couple levures/BL utilisé.

**Figure 44.** Teneurs moyennes en leucate d'éthyle (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon le couple levure/BL utilisé.

**Figure 45.** Teneurs moyennes en leucate d'éthyle (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins issus des micro-vinifications réalisées en laboratoire, au cours de leur élaboration, selon la souche de bactéries utilisée pour réaliser la FML et dans un vin témoin n'ayant pas étéensemencé en BL.

## Introduction générale

La typicité se définit, selon Casabianca *et al.* (2005), comme la propriété d'appartenance à un type distingué et identifié par un groupe humain de référence. Ainsi, il est depuis longtemps observé de façon empirique l'existence d'une expression fruitée des vins rouges, et, de façon plus spécifique aux vins de Bordeaux, de notes évoquant les fruits rouges et noirs comme la framboise, la cerise ou encore le cassis. Récemment, Pineau (2007) a démontré l'existence d'un espace sensoriel propre à ces vins. Ces notes fruitées, non détectées dans le moût, sont révélées au cours des différentes étapes de vinification et d'élaboration des vins. Les fermentations alcoolique et malolactique constituent des étapes clés dans la libération des arômes du vin. Plusieurs travaux ont tenté de déterminer l'influence des souches de levures ou de bactéries lactiques (BL) sur la modulation organoleptique du vin sans qu'aucun consensus ne puisse être établi (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012 ; McDaniel *et al.*, 1987 ; Henick-Kling *et al.*, 1994 ; Antalick *et al.*, 2012).

L'interprétation moléculaire de cette spécificité des vins rouges de Bordeaux est rendue difficile par le manque de connaissances sur les composés aromatiques responsables de ces nuances. Depuis plusieurs décennies, de nombreux travaux se sont attachés à la caractérisation moléculaire des composés volatils du vin. Les premières études réalisées sur des vins blancs ont permis de faire l'association entre certains arômes caractéristiques et une ou plusieurs molécules d'intérêt (Marais, 1983 ; Tominaga *et al.*, 1998). De nombreux auteurs ont abordé l'étude de l'arôme fruité des vins rouges en tentant d'identifier les composés aromatiques clés responsables de ces odeurs (Moio et Etievant, 1995 ; Kotseridis et Baumes, 2000 ; Campo *et al.*, 2007 ; Siebert *et al.*, 2008). S'il n'a pas encore été possible d'identifier des molécules spécifiques, expliquant à elles seules la typicité de l'arôme fruité, l'existence de tels composés ne peut pour autant être définitivement exclue. Néanmoins, plusieurs travaux récents ont démontré l'importance des interactions perceptives entre plusieurs familles d'odorants (Ferreira *et al.*, 1999 ; Pineau, 2007 ; Lytra, 2012). Par ailleurs, plusieurs études ont visé à déterminer l'impact de microorganismes fermentaires sur la modulation des teneurs en divers marqueurs potentiels de l'arôme fruité. Là encore, aucun consensus n'a pu réellement être mis en évidence. La variation de la note fruitée des vins rouges semble impliquer des phénomènes plus complexes qu'un simple effet souche, et pourrait résulter

d'effets liés aux propriétés de la matrice, combinés à l'influence de la souche de levures et/ou de la souche de BL.

Au vu de ces dernières acquisitions, nous avons choisi, dans le cadre de ce travail, d'étudier l'impact organoleptique de couples levures/BL sur les nuances de l'arôme fruité de plusieurs vins rouges bordelais.

Une approche par l'analyse chimique et sensorielle de vins produits dans des conditions de fermentation classique ou de micro-vinification sera effectuée pour trois sites en bordelais sur deux millésimes. Ceci est rendu possible par l'utilisation au laboratoire de différentes méthodes d'analyses quantitatives validées. Il a été choisi de travailler sur deux cépages très répandus dans la région de Bordeaux : le Cabernet Sauvignon et le Merlot. Plusieurs couples levures/BL seront sélectionnés (trois souches de *Saccharomyces cerevisiae* ; deux souches d'*Oenococcus oeni*) et implantés dans des cuves de quelques hectolitres à plusieurs dizaines d'hectolitres suivant un plan expérimental le plus complet possible.

Nous déterminerons d'abord la concentration de divers composés aromatiques potentiellement impliqués dans la modulation de l'arôme fruité afin d'avoir un aperçu global de l'impact des couples levures/BL sur la composition chimique des vins.

Nous étudierons ensuite plus en détail les variations des teneurs en esters, composés reconnus comme jouant un rôle central dans la modulation de l'arôme fruité. Plus précisément, la quantification de leur concentration, par une méthode développée au laboratoire (Antalick *et al.*, 2010), permettra d'apprécier l'influence des souches de levures et BL sur ces composés à différentes étapes de l'élaboration des vins et sur plusieurs matrices.

Parallèlement, l'étude sensorielle originale et normative des vins sera entreprise afin d'évaluer l'impact du couple levures/BL sur l'arôme fruité. Notre approche consistera à associer l'analyse descriptive quantitative, les tests de différence et de classement avec des techniques d'approche plus globales afin de caractériser au mieux l'influence des microorganismes sur l'arôme du vin. Nous tenterons par la suite d'établir un lien entre les résultats sensoriels obtenus et les teneurs en esters de ces vins.

Bien qu'exerçant une influence déterminante, ces nombreux composés, dont nous maîtrisons la quantification, ne sont pas responsables, à eux seuls, de l'arôme fruité des vins rouges. Nous avons donc choisi dans un second temps, d'étudier l'influence des couples

levures/BL sur ce type de notes par la mise en œuvre de reconstitutions aromatiques élaborées à partir de fractions issues du vin (Pineau, 2007 ; Lytra, 2012).

Dans une première approche, l'étude par flairage de chaque fraction odorante nous permettra de cibler celles dont l'intensité de l'arôme est influencée par la souche de levures. Elles feront alors l'objet de reconstitutions aromatiques afin d'évaluer leur impact réel sur la modulation de l'arôme fruité. Après avoir mis en évidence le rôle particulier d'une ou de plusieurs fractions d'intérêt sur l'intensité aromatique, nous tenterons d'identifier les molécules constitutives. Enfin, l'influence des souches de levures et de BL sur la concentration des certains composés mis en évidence sera déterminée et discutée.

Afin d'explicitier le cheminement de nos expérimentations et le raisonnement que nous avons suivi au cours de ces travaux, nous avons choisi de ne pas regrouper l'étude bibliographique ainsi que la liste du matériel et des méthodes employées dans des chapitres dédiés. Ces points seront en effet intégrés aux différents chapitres présentant les résultats qui les concernent tandis que l'ensemble des données expérimentales sera repris en annexe.

**PREMIERE PARTIE** : Etude analytique et sensorielle de l'influence organoleptique de souches commerciales de levures et de bactéries lactiques sur l'arôme fruité des vins rouges de Bordeaux

## Chapitre 1 : Etude de l'effet couple levures/bactéries lactiques

Le terme "arôme" désigne « le principe odorant des fleurs et en général des substances végétales qui ont une odeur agréable » (Dictionnaire de l'Académie Française). En œnologie, l'arôme désigne l'ensemble des nuances odorantes des vins jeunes, tandis que l'odeur acquise au cours du vieillissement est plutôt qualifiée de bouquet. Au sein de cette classification, on distingue alors deux types d'arômes. L'arôme primaire, provenant du cépage, contribue à la typicité des vins. Souvent présent sous forme de précurseurs inodores dans les baies et le moût, il est libéré au cours des différentes étapes de la vinification. L'arôme secondaire, quant à lui, permet d'étoffer l'odeur finale du vin. Il résulte du métabolisme des levures et BL, réalisant respectivement les fermentations alcoolique et malolactique. Ces phénomènes microbiologiques, largement impliqués dans la libération des arômes du vin ont déjà fait l'objet de plusieurs travaux. L'influence des souches de levures ou de BL sur la concentration de nombreux marqueurs potentiels a également été étudiée sans qu'aucun consensus ne puisse être établi. L'étude conjointe de l'impact de ces deux microorganismes a pour but une meilleure compréhension de la modulation de l'arôme du vin.

Après avoir rappelé les acquisitions relatives aux processus biologiques intervenant lors de la vinification en rouge, nous présenterons l'état actuel des connaissances concernant les principaux composés aromatiques connus et impliqués dans la modulation de l'arôme fruité des vins rouges. Puis, nous présenterons nos premiers résultats concernant l'impact du couple levures/bactéries sur la concentration d'une partie de ces composés aromatiques.

### **I. Les fermentations alcoolique et malolactique : des étapes clés pour l'élaboration des vins rouges**

La vinification est l'ensemble des opérations mises en œuvre pour transformer le raisin en vin. A l'exception des cépages blancs dits "aromatiques", l'arôme d'un vin est beaucoup plus complexe que celui du moût dont il est issu. Les différentes étapes de l'élaboration du vin sont donc à l'origine de ces changements aromatiques. La vinification en rouge comporte schématiquement trois grands phénomènes : la fermentation alcoolique, la fermentation malolactique, précédées ou poursuivies par la macération des matières solides. La maîtrise de

la vinification implique donc un bon développement des levures et des BL, car comme le disait Emile Peynaud dans son ouvrage *Connaissance et travail du vin* (1981), "les microorganismes qui participent à la vinification agissent plus ou moins profondément sur la composition du vin et, de ce fait, sont en grande partie responsables de son goût et de ses arômes." Il semble donc essentiel de rappeler les acquisitions sur les différents mécanismes mis en jeu au cours de ces deux fermentations, à l'origine de la genèse ou de la modification de l'arôme du vin.

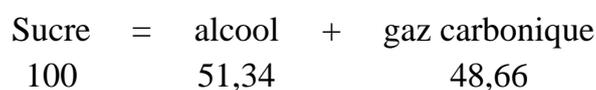
## **I.A. Aspects microbiologiques et biochimiques des fermentations**

### ***I.A.1. La fermentation alcoolique et les levures***

Les levures, responsables de la fermentation alcoolique (FA), ont été observées pour la première fois à partir d'un moût de bière en 1680 par Antonie van Leeuwenhoek, sans qu'aucun lien avec la réalisation de la FA ne soit pour autant établi. Il faudra attendre le XVIII<sup>e</sup> siècle pour voir apparaître les premières explications scientifiques. Lavoisier montrera que le sucre du moût est transformé en alcool et en gaz carbonique qui se dégage, établissant ainsi l'un des principes premiers de la chimie : « rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme ». C'est finalement Pasteur qui établira définitivement le lien entre les levures et la FA dans ses deux ouvrages *Etudes sur le vin* (1866) et *Etudes sur la bière* (1876). Ces travaux ont permis d'établir les bases de l'œnologie, permettant un suivi et une reproduction plus facile des processus fermentaires. Depuis, les levures et la FA ont donné lieu à un grand nombre de travaux, intégrant les progrès croissants de la microbiologie, de la biochimie, de la génétique et de la biologie moléculaire.

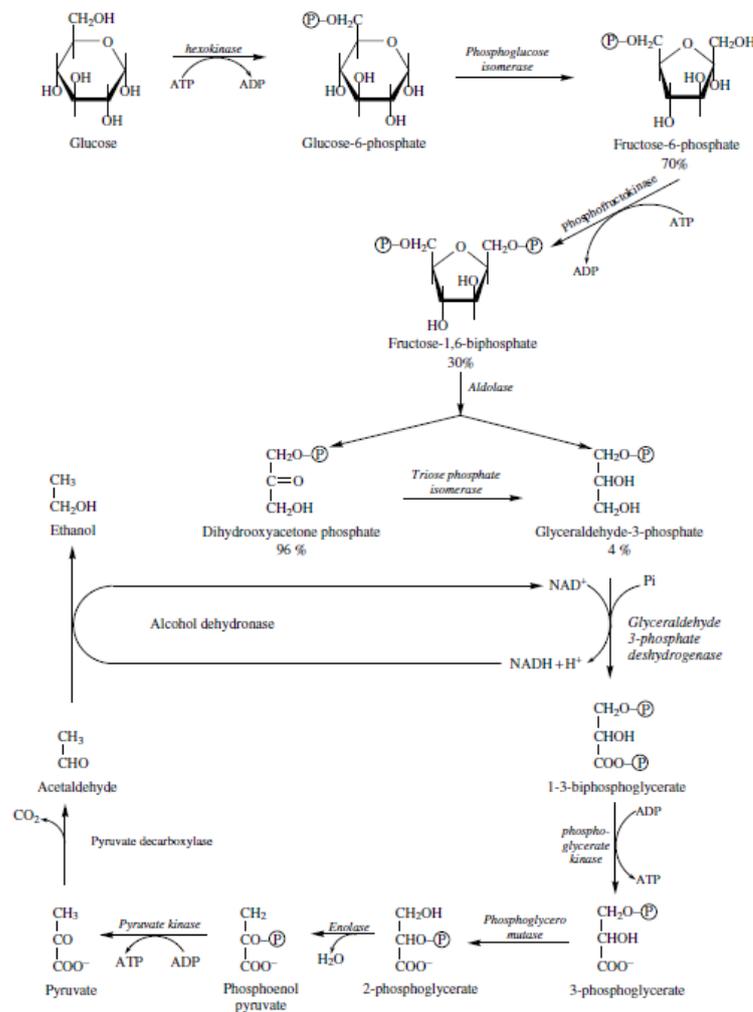
#### ***I.A.1.a. Processus de la fermentation alcoolique***

A la suite des travaux de Lavoisier, Gay-Lussac donna une première formule chimique de la réaction de transformation des sucres :



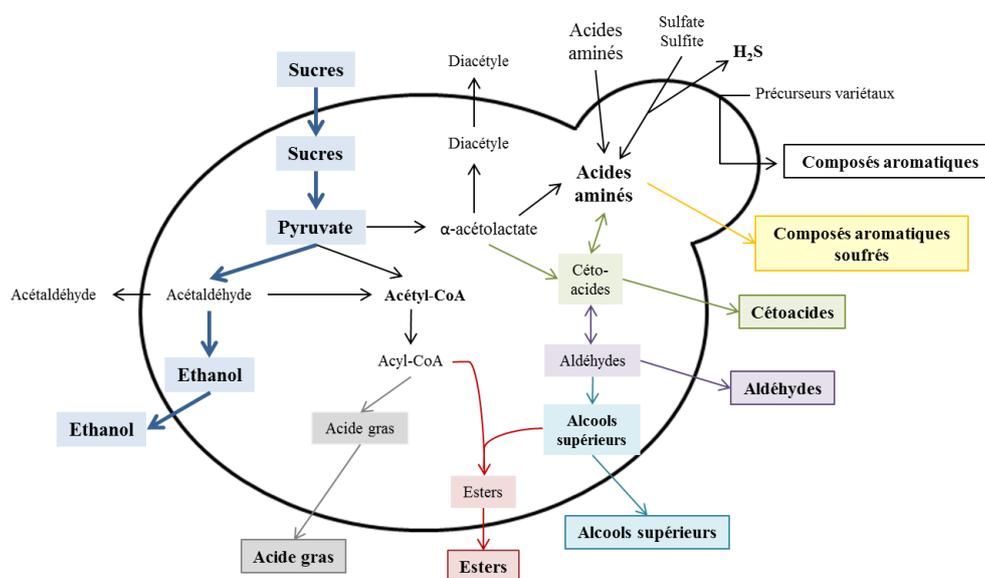
Cette équation n'est en fait valable que pour 95 % du sucre transformé ; le reste est converti en d'autres substances, dites secondaires, dont certaines jouent un rôle aromatique (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a).

En condition d'anaérobie, la fermentation fait suite à une autre voie : la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhoff qui transforme le glucose ou le fructose en pyruvate avec libération d'énergie sous la forme de deux molécules d'adénosine triphosphate (ATP) (**Figure 1**). La fermentation permet la régénération du nicotiamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) grâce à la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde, lui-même réduit pour former l'éthanol.



**Figure 1.** Voie de la glycolyse et de la fermentation alcoolique (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a).

Une partie du pyruvate est utilisée dans d'autres voies métaboliques, dites secondaires, pour former de nombreux composés volatils tels que des alcools supérieurs, des esters, des acides gras. Les acides aminés sont également des précurseurs essentiels dans la synthèse ou la libération d'autres molécules aromatiques comme les composés soufrés, les composés acétoïniques ou cétoniques (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). Certains jouent un rôle dans l'expression fruitée des vins rouges (**Figure 2**).



**Figure 2.** Représentation schématique de la formation de composés aromatiques par la levure (adaptée de Henschke et Jiranek 1993).

### 1.A.1.b. Diversité des souches de levures

Les espèces de levures présentes sur le raisin appartiennent principalement au genre *Rhodotorula*, et dans une moindre mesure *Metchnikowia*, *Candida*, *Pichia* ou *Hansenula* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a). Dans les premières heures de la vinification, la microflore du moût est très similaire à celle de la baie de raisin. Après une vingtaine d'heures, les levures majoritaires appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, sélectionnées par leur meilleure adaptation au milieu (Zott *et al.*, 2010). Cette levure, particulièrement résistante aux conditions du moût (anaérobiose, richesse en sucre, augmentation croissante d'éthanol, sulfitage des vendanges) joue un rôle essentiel dans le déroulement de la FA. Dans la pratique, la fermentation spontanée du moût n'est pas une fermentation pure, c'est-à-dire

réalisée par une seule souche de levures. Dans la majorité des situations, la FA est réalisée par quelques souches majoritaires que l'on retrouve du début jusqu'à la fin du processus fermentaire. Cependant, il arrive qu'aucune souche (ou nombre restreint) ne parvienne à s'imposer. La fermentation est alors réalisée par une population de *S. cerevisiae* présentant une grande diversité clonale. Cette situation est peu souhaitable, car elle est souvent associée à une fermentation languissante, voire à un arrêt de fermentation avant épuisement total des sucres (Frezier, 1992). La fermentation par les levures indigènes peut donc comporter deux risques : d'une part, celui d'une fermentation lente et/ou incomplète, et d'autre part celui du développement de souches défectueuses (productrices d'acétate d'éthyle, d'hydrogène sulfuré, d'anhydride sulfureux) voire indésirables (type *Brettanomyces*). Le levurage des moûts par des souches sélectionnées a constitué un progrès dans la maîtrise des fermentations et dans la recherche de qualité. « Sélectionner une levure, c'est la choisir parmi un grand nombre d'autres, après une étude détaillée portant sur des caractères physiologiques : rendement en alcool, pouvoir alcoogène, résistance à une température élevée, forte formation de glycérol ou faible d'acide acétique, production d'arôme particulier [...] » disait Peynaud (1981). Plusieurs techniques ont été développées (sélection clonale, mutagenèse, croisement et évolution dirigée) dans le but de sélectionner les souches d'intérêt et d'en améliorer les qualités fermentaires. Un des premiers critères de sélection était basé sur des paramètres cinétiques (rapidité de départ en fermentation, capacité à finir une fermentation). D'autres critères ont par la suite également été pris en compte (résistance au stress, production de composés aromatiques), dans le but d'améliorer la qualité générale des vins (Zimmer, 2013). De nos jours, il existe des dizaines de souches de levures commerciales, sélectionnées pour leur capacité à réaliser la fermentation alcoolique, tout permettant d'optimiser la révélation des caractères distinctifs au vin. Leur utilisation pour la vinification en blanc a notamment été rationalisée grâce aux nombreuses études, sur lesquelles nous reviendrons, montrant l'influence de la souche de levures sur l'arôme du vin. Si elles sont également très utilisées dans la vinification en rouge, leur intérêt organoleptique n'a pour le moment pas été mis en évidence.

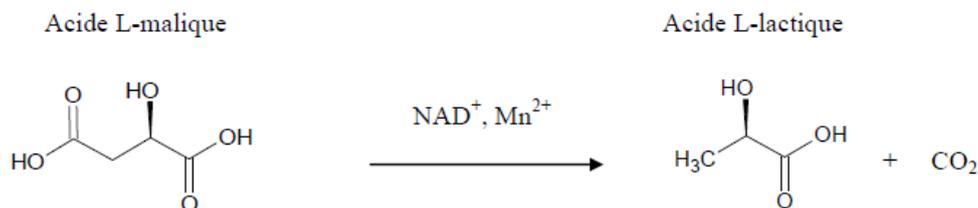
### ***1.A.2. La fermentation malolactique et les bactéries***

Le vin n'est pas le fruit de la seule fermentation des sucres par les levures, comme on a pu le croire après Pasteur. Celle-ci est souvent suivie d'une deuxième fermentation dite

malolactique, réalisée par les BL naturellement présentes dans le vin. Elle est quasi systématiquement recherchée dans les vins rouges. Les travaux de Ribéreau-Gayon et Peynaud ont en effet montré entre 1937 et 1964 tout l'intérêt de cette deuxième fermentation, d'abord considérée comme une maladie par Pasteur. Elle garantit le plus souvent la stabilité des vins ainsi qu'une amélioration gustative et olfactive. Pour ces raisons, le déroulement de cette transformation a été rendu obligatoire par les décrets (cahiers des charges) de la plupart des AOC des vins rouges.

### 1.A.2.a. Nature de la transformation malolactique

La fermentation malolactique (FML) est définie comme la décarboxylation de l'acide L-malique en acide L-lactique se manifestant sous la forme d'un dégagement de dioxyde de carbone. Cette réaction biochimique est réalisée par l'enzyme malolactique isolée pour la première fois par Lonvaud (1975). Elle nécessite les cofacteurs  $\text{NAD}^+$  et un ion manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) (Lonvaud-Funel et Strasser de Saad, 1982 ; Spettoli *et al.*, 1984 ; Naouri *et al.*, 1990).



Cette décarboxylation est à l'origine d'une diminution naturelle de l'acidité totale, et d'une légère augmentation du pH, due au remplacement d'un diacide (l'acide malique) par un monoacide (l'acide lactique). D'un point de vue organoleptique, la FML apporte de la rondeur et de la souplesse au vin, l'acide lactique étant beaucoup plus doux en bouche que l'acide malique. Sans cette fermentation, l'acidité renforcerait la sensation d'astringence provoquée par les tanins présents dans les vins rouges.

La FML permet également une certaine stabilisation microbiologique des vins par épuisement de substrats autres que l'acide malique tels que l'acide citrique et certains pentoses ou hexoses. Ces métabolismes bactériens secondaires sont également à l'origine de modifications chimiques affectant la perception olfactive et gustative du vin (Henick-Kling, 1993 ; Bartowsky *et al.*, 2002 ; Matthews *et al.*, 2004).

### *I.A.2.b. Diversité des souches de bactéries lactiques*

Pendant les premiers jours de la vinification et dès le remplissage des cuves, la population bactérienne du moût est comprise entre  $10^2$  et  $10^4$  UFC/mL. Les espèces identifiées appartiennent généralement aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Oenococcus*. Ces BL à Gram positif sont chimiotrophes, c'est-à-dire qu'elles tirent l'énergie nécessaire à l'ensemble de leur métabolisme de l'oxydation de composés chimiques. La plupart des BL tolèrent la présence d'oxygène, mais ne l'utilisent pas dans les mécanismes énergétiques. Selon les espèces, leur métabolisme peut être homofermentaire, caractérisé par la production majoritaire d'acide lactique ou hétérofermentaire, entraînant la libération de quantités significatives de CO<sub>2</sub>, d'éthanol ou d'autres acides en plus de l'acide lactique (L et/ou D).

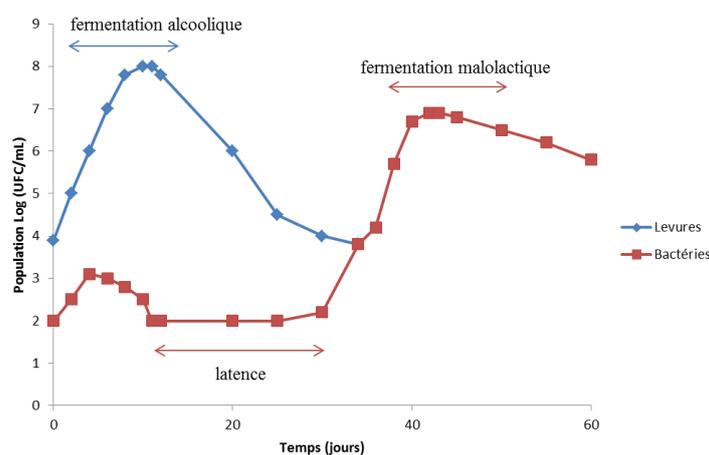
Au début de la FA, la concentration bactérienne diminue et une sélection naturelle des souches résistantes à un environnement de plus en plus stressant (augmentation du niveau d'éthanol, présence de SO<sub>2</sub>, pH faible) s'opère, souvent au profit de l'espèce *Oenococcus oeni*. C'est l'espèce de BL préférentielle de la FML car elle résiste au pH bas, décompose l'acide malique en priorité, secondairement les sucres, et forme peu d'acidité volatile. Le développement d'autres bactéries, telles *Lactobacillus*, peut entraîner l'altération du vin (Peynaud, 1981). Pour prévenir ce risque, on peut envisager l'ensemencement de BL sélectionnées pour leur bonne résistance au vin, leur faible temps de latence et leur capacité à réaliser rapidement la fermentation.

### *I.A.3. Interactions levures/bactéries lactiques : état de l'art*

Levures et bactéries interagissent dès les premières heures de la vinification jusqu'au début de la fermentation malolactique. L'évolution des différentes populations au cours de la vinification est en partie due à l'antagonisme entre les levures et les bactéries. Plusieurs études montrent que le type et le degré d'interactions dépendent de plusieurs facteurs, dont le couple levures/bactéries impliqué. Ces interactions entre microorganismes sont variables suivant les souches présentes et pourraient être à l'origine de changements métaboliques chez les levures ou les BL, influençant la composition chimique du vin et donc ses arômes (Beelman *et al.*, 1982 ; Lonvaud-Funel *et al.*, 1988a ; Henschke and Jiranek, 1993).

## I.A.3.a. Les interactions microbiennes au cours de la vinification

Les interactions observées entre levures et bactéries sont complexes et évoluent au cours de la vinification (**Figure 3**).



**Figure 3.** Evolution des populations de levures *S. cerevisiae* et de bactéries lactiques *O. oeni* au cours de la vinification (adaptée de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012a).

On observe dès les premières heures de la vinification une inhibition des BL par les levures. L'inoculation expérimentale d'un moût par *S. cerevisiae* et *O. oeni*, même lorsque cette dernière atteint des concentrations cent fois supérieures, mène toujours à une croissance rapide des levures au détriment des BL. Non seulement celles-ci ne se multiplient pas, mais elles sont de surcroît partiellement éliminées (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988b). Le premier paramètre envisagé pour expliquer cette observation est l'appauvrissement du milieu en nutriment par les levures, notamment en acides aminés (Fornachon, 1968). L'éthanol, synthétisé au cours de la FA, est également un inhibiteur de la croissance bactérienne, bien que son impact soit négligeable les premiers jours (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1964). Il a également été suggéré que certains métabolites libérés par les levures aient un effet toxique sur les BL comme le dioxyde de soufre (Fornachon, 1968; Henick-Kling *et al.*, 1994) ou les acides gras de taille moyenne (entre 6 et 12 atomes de carbone) (Lafon Lafourcade *et al.*, 1983; Lonvaud-Funel *et al.*, 1988b). L'effet de ces différents composés combiné à l'augmentation de la teneur en éthanol et au pH acide du milieu renforce l'inhibition des BL par les levures (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988b).

Lorsque le milieu s'appauvrit et que la population de levures entre en phase stationnaire, les effets négatifs liés au métabolisme de la levure finissent par être compensés par leurs effets positifs. La période de latence entre la fin de la FA et le début de la FML est liée à l'adaptation des BL ayant résisté pendant la FA au vin (**Figure 3**). Ce délai pourrait dépendre de la libération de certains métabolites levuriens. En effet, la lyse des levures entraîne le relargage de nutriments stimulant la croissance bactérienne : vitamines, bases azotées, acides aminées, peptides, glucanes ou encore mannoprotéines (Llaubères *et al.*, 1987 ; Charpentier et Feuillat, 1993 ; Alexandre *et al.*, 2001). A cet effet stimulant peut être ajouté un phénomène d'inhibition des levures par les BL, qui va accélérer la phase de déclin des levures. Des études ont en effet mis en évidence l'activité de glucosidases et de protéases bactériennes probablement responsables de la lyse des parois levuriennes pendant cette période de latence (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988b).

De nombreuses études ont montré que la nature des interactions entre levures et BL est liée aux souches présentes dans le milieu et qu'elles sont même très spécifiques du couple utilisé pour réaliser les fermentations alcoolique et malolactique (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988a ; Comitini *et al.*, 2005 ; Arnink et Henick-Kling, 2005). Ces interactions entre microorganismes n'influencent pas seulement leur croissance au cours de la vinification mais aussi probablement leur métabolisme et de ce fait la composition en molécules aromatiques du vin.

#### *I.A.3.b. Influence des interactions levures/bactéries sur la composition chimique et le profil aromatique des vins*

L'impact du couple levures/BL sur la concentration des composés impliqués dans la perception de l'arôme fruité des vins a été peu étudié. La plupart des travaux se sont en effet principalement intéressés à l'effet de la FML ou de la souche de BL sur la modulation de l'arôme fruité et de ses composés. Il en résulte une grande hétérogénéité dans les résultats présentés. Certaines études montrent en effet une augmentation de l'arôme fruité après FML quand d'autres parlent au contraire de diminution ou de masquage (McDaniel *et al.*, 1987 ; Henick-Kling *et al.*, 1994 ; Sauvageot et Vivier, 1997 ; Antalick *et al.*, 2012). De même, l'impact de la souche de BL sur des composés volatils donnés varie en fonction des études, qui peuvent montrer un effet significatif, traduit par une augmentation ou une diminution de leur concentration, ou au contraire un effet non significatif (Malherbe *et al.*, 2011 ; Vestner *et*

*al.*, 2011 ; Antalick *et al.*, 2012 ; Ruiz *et al.*, 2012). La grande variabilité de l'influence de la FML sur l'arôme fruité ne peut être attribuée à un simple effet souche et semble impliquer des phénomènes bien plus complexes. Ces variations seraient le reflet d'interactions entre la matrice, les levures et les BL, où chaque composante a son importance.

La composition chimique du vin après FA est un élément essentiel pour expliquer les changements aromatiques engendrés par les BL au cours de la FML. Or, ce paramètre dépend directement des métabolites libérés par les levures au cours de la FA ou suite à leur autolyse. Ce phénomène est lui-même dépendant de certains paramètres œnologiques tels que la température de fermentation ou la composition du moût initial. Delaquis *et al.* (2000) ont en effet montré que la composition aromatique des vins est influencée par la souche de levures et de bactéries mais également par les conditions de fermentation. Antalick *et al.* (2013) mettent également en évidence un effet couple sur la modulation de l'arôme fruité et de certains composés aromatiques. Ils montrent aussi que le moment de l'inoculation des BL (co-inoculation *versus* inoculation séquentielle) est un paramètre important dans la modulation de l'arôme du vin. Les résultats sont cependant très variables et dépendent fortement de la souche et de la matrice utilisées.

Enfin, Sun *et al.* (2013) ont évalué l'influence de différents couples levures/BL sur la composition aromatique de "vins" de cerise. L'étude met en évidence le caractère unique de chaque produit tant du point de vue de sa composition chimique que de sa perception sensorielle ; néanmoins, il semblerait que l'effet de la souche de levures sur l'arôme fruité et sur les composés présents soit prédominant face aux légères modifications apportées par les BL au cours de la FML.

## **I.B. Connaissances sur les composés aromatiques impliqués dans l'expression de l'arôme fruité des vins rouges**

Le vin est une matrice complexe composée de centaines de molécules responsables de son goût et de ses arômes. Contrairement aux cépages blancs dits "aromatiques", aucune expression variétale fruitée corrélée à la présence de molécules aromatiques clés n'a pu être mise en évidence dans les vins rouges. L'existence même d'une expression fruitée spécifique aux vins issus de cépages rouges a jusque dans les années 2000 été l'objet d'une vive controverse (Piombino *et al.*, 2003). Grâce à l'utilisation de verres noirs, permettant d'écarter

toute influence de la couleur des vins, Pineau (2007) a montré l'existence d'un arôme fruité spécifique aux vins rouges de Bordeaux. Ses travaux ont également permis de définir un espace sensoriel olfactif propre aux vins rouges marqués par des notes de "fruits noirs" et de "fruits confiturés". Si l'existence de molécules aromatiques clés responsables de la typicité des vins rouges n'est pas à exclure, de nombreuses études ont démontré qu'une composante de cet arôme est souvent le reflet d'interactions perceptives entre plusieurs familles de composés aromatiques issus du raisin, des fermentations et de réactions chimiques lors du vieillissement (Ferreira *et al.*, 2002 ; Segurel *et al.*, 2004 ; Escudero *et al.*, 2007 ; Pineau *et al.*, 2009).

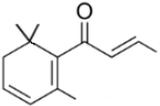
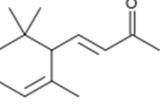
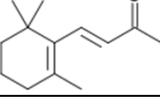
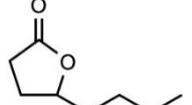
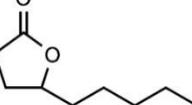
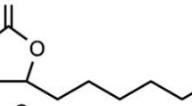
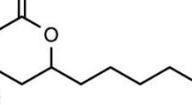
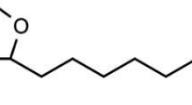
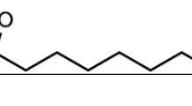
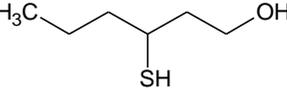
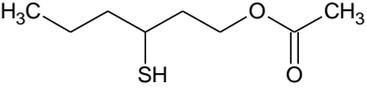
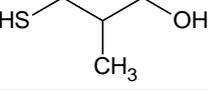
### ***1.B.1. Les composés d'origine variétale***

De nombreux composés aromatiques sont présents dans la baie de raisin sous forme de précurseurs non volatils inodores. Ces arômes sont libérés dans le vin par activité enzymatique ou hydrolyse acide au cours de la vinification. Parmi ces nombreux composés, trois familles de molécules impliquées dans l'arôme fruité des vins peuvent être particulièrement distinguées : les norisoprénoïdes à 13 atomes de carbone, les lactones et les thiols (**Tableau 1**).

#### ***1.B.1.a. Les norisoprénoïdes à 13 atomes de carbone***

La  $\beta$ -damascénone, isolée à partir d'huile de rose bulgare par Demole *et al.* (1970), a été identifiée quelques années plus tard dans le vin par Schreier et Drawert (1974). Elle présente une odeur à la fois florale, fruitée et épicée avec des notes particulières de pomme cuite, de miel et de tabac (Pineau *et al.*, 2007). Son seuil de perception dépend très fortement de la matrice, allant de plusieurs nanogrammes par litre en solution hydroalcoolique à quelques microgrammes par litre dans le vin (Guth, 1997 ; Pineau *et al.*, 2007) (**Tableau 1**).

**Tableau 1.** Principaux composés d'origine variétale à caractère fruité identifiés dans les vins rouges.

Composé	Formule chimique	Seuil de perception (µg/L)	Descripteurs
<b>Norisoprénoïdes à 13 atomes de carbone</b>			
β-damascénone		0,05 <sup>[1]</sup> ; 7 <sup>[2]</sup>	floral, fruité et épicé, pomme cuite, miel, tabac
α-ionone		0,4 <sup>[3]</sup> ; 2,6 <sup>[4]</sup>	floral, framboise fraîche
β-ionone		0,03 <sup>[3]</sup> ; 0,09 <sup>[5]</sup>	floral, violette
<b>Lactones</b>			
γ-octalactone		35 <sup>[6]</sup>	noix de coco
γ-nonolactone		70 <sup>[6]</sup>	noix de coco, pêche
γ-décalactone		88 <sup>[4]</sup>	noix de coco, pêche
δ-décalactone		386 <sup>[5]</sup>	pêche, noix de coco
γ-undécalactone		nd	pêche, melon
γ-dodécalactone		nd	cireux, fruité, lourd
<b>Thiols</b>			
3-sulfanylhexanol		0,012 - 0,015 <sup>[7]</sup>	pamplemousse, fruits de la passion
acétate de 3-sulfanylhexanol		0,002 - 0,003 <sup>[7]</sup>	buis, fruits de la passion
3-sulfanyl-2-méthylpropanol		3 <sup>[8]</sup>	sueur, grillé

<sup>[1]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol) (Guth, 1997) ; <sup>[2]</sup> vin rouge (Pineau *et al.*, 2007) ; <sup>[3]</sup> eau (Buttery *et al.*, 1997) ; <sup>[4]</sup> vin (Etievant, 1991) ; <sup>[5]</sup> vin synthétique (11 % v/v éthanol, 7 g/L glycérine, 5 g/L acide tartrique, pH 3,4) (Ferreira *et al.*, 2000) ; <sup>[6]</sup> vin synthétique (18 % v/v éthanol, 100 g/L sucre, pH 5) (Cutzach *et al.*, 1998), <sup>[7]</sup> eau (Tominaga *et al.*, 1998), <sup>[8]</sup> eau (Bouchilloux *et al.*, 1998)

Sa faible teneur dans les vins la rend difficilement perceptible de façon directe, mais il est fort probable qu'elle joue un rôle dans l'expression du caractère fruité des vins *via* des interactions perceptives (Pineau *et al.*, 2007).

L' $\alpha$ - et la  $\beta$ -ionone ont des odeurs plus florales que la  $\beta$ -damascénone avec des nuances de framboise fraîche et de violette respectivement. Leur seuil de perception dépend également de la matrice et oscille entre plusieurs dizaines voire centaines de nanogrammes par litre (Etievant et Bayonove, 1983 ; Buttery *et al.*, 1997 ; Ferreira *et al.*, 2000) (**Tableau 1**). Il semble cependant que les ionones et en particulier la  $\beta$ -ionone aient des seuils de perceptions dans les vins rouges proches des concentrations habituellement retrouvées (Kotseridis, 1999), ce qui suggère une possible contribution aromatique. Cependant, de récents travaux ont mis en évidence qu'une partie importante de la population (environ 50 %) est peu sensible à la  $\beta$ -ionone (Plotto *et al.*, 2006 ; Tempere *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont clairement démontré l'importance des métabolismes levurien (Segurel *et al.*, 2009 ; Loscos *et al.*, 2010) et bactérien (Boido *et al.*, 2002 ; D'Incecco *et al.*, 2004) dans la libération de ces norisoprénoïdes. Ils peuvent également être synthétisés au cours du vieillissement à la suite de l'hydrolyse de certains précurseurs et de réarrangements chimiques en milieu acide (Strauss *et al.*, 1987 ; Schneider *et al.*, 2001).

#### *1.B.1.b. Les lactones*

Les lactones sont des composés largement présents dans les aliments y compris dans les vins. La  $\gamma$ -butyrolactone est la plus représentée dans les vins (plusieurs dizaines de milligrammes par litre). Elle est caractérisée par une faible odeur crémeuse légèrement fruitée et ne participe probablement pas à l'arôme fruité. Les lactones les plus intéressantes du point de vue de l'arôme fruité sont les  $\gamma$ - et les  $\delta$ -lactones avec 8 à 12 atomes de carbone. Elles possèdent une odeur de noix de coco et de pêche, de plus en plus marquée en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée (**Tableau 1**). Leur concentration dans les vins est inférieure à leur seuil de perception, mais cet écart peut être relativement faible pour certaines d'entre elles (Ferreira *et al.*, 2004). La  $\gamma$ -nonalactone pourrait ainsi jouer un rôle important dans la note fruitée des vins rouges au cours du vieillissement (Ferreira *et al.*, 2004). Néanmoins, de récentes études ont montré que ce composé pouvait également contribuer à l'arôme de vieillissement prématuré des vins rouges (Pons *et al.*, 2008), apportant des notes de pruneau indésirables. La contribution des lactones à la note fruitée des vins n'a jamais été clairement

étudiée et établie. Néanmoins, l'omission de lactones dans des reconstitutions aromatiques a montré des différences significatives et laisse envisager un effet de ces composés sur la modulation de la note fruitée des vins rouges (Loscos *et al.*, 2007).

La voie de formation des lactones a été beaucoup moins étudiée que celle des norisoprénoïdes. Les résultats de plusieurs études laissent envisager une origine variétale sous forme de précurseurs glycosylés ou hydroxylés, libérés par les levures ou les BL au cours des différentes fermentations (Ferreira *et al.*, 2000 ; Wanikawa *et al.*, 2000 ; Loscos *et al.*, 2007 ; Segurel *et al.*, 2009).

### *I.B.1.c. Les thiols*

Ces puissants composés aromatiques ont d'abord été mis en évidence dans les vins blancs. La contribution de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) à l'arôme de goyave de vins de Sauvignon Blanc sud-africains a d'abord été évoquée par Du Plessis et Augustyn (1981). Par la suite, la 4MMP ainsi que d'autres thiols variétaux ont été identifiés comme étant des composés clés de l'arôme typique du Sauvignon Blanc (Darriet *et al.*, 1995 ; Tominaga *et al.*, 1998). Certains d'entre eux comme le 3-sulfanylhéxanol (3SH), l'acétate de 3-sulfanylhéxanol ou le 3-sulfanyl-2-méthylpropanol ont également été trouvés dans d'autres cépages blancs tels que le Muscadet ou le Bacchus (Schneider *et al.*, 2003) et des vins rouges de Cabernet Sauvignon, de Merlot (Bouchilloux *et al.*, 1998 ; Lavigne *et al.*, 1998) ou de Grenache (Ferreira *et al.*, 2002) à des concentrations avoisinant leurs seuils de perceptions (Tominaga *et al.*, 1998) (**Tableau 1**). Le 3SH semble être le plus impliqué dans l'arôme fruité des vins rouges. Ce composé est présent sous forme de deux énantiomères évoquant le zeste de pamplemousse et le fruit de la passion pour les formes R et S respectivement. Dans les vins rouges, il renforcerait le caractère "fruits rouges" (Ferreira *et al.*, 2002 ; Rigou *et al.*, 2014).

Ces composés, présents dans le moût sous forme de précurseurs inodores non volatils car S-conjugués à la cystéine et au glutathion, sont libérés pendant la FA sous l'effet du métabolisme levurien (Tominaga *et al.*, 1998 ; Peyrot des Gachons *et al.*, 2002). Un précurseur du 3SH, le S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine, identifié dans le moût par Bouchilloux *et al.* (1998), est ainsi séparé de sa partie aminée grâce à une  $\beta$ -lyase levurienne (Thibon *et al.*, 2008). Une autre voie de synthèse à partir du (E)-2-hexèn-1-al a également été suggérée par Schneider *et al.* (2006). Enfin, la souche de levures impliquée tient une place essentielle dans la libération de ces composés. Leur capacité à hydrolyser les précurseurs de ces composés est

en effet très variable en fonction de l'espèce et même de la souche de levures utilisée pendant la fermentation (Dubourdiou *et al.*, 2006).

### ***1.B.2. Les alcools supérieurs***

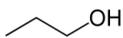
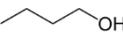
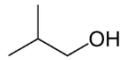
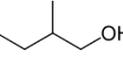
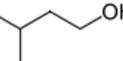
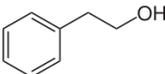
La famille des alcools supérieurs inclut tous les alcools ayant plus de 2 atomes de carbone avec un poids moléculaire et une température d'ébullition supérieurs à l'éthanol. Dans le vin, ils représentent quantitativement le groupe le plus important des composés aromatiques issus de la FA.

Les alcools supérieurs sont divisés en deux groupes : aliphatique et aromatique (**Tableau 2**). Les principaux alcools aliphatiques sont le propan-1-ol, le butan-1-ol, l'isobutanol (ou 2-méthylpropan-1-ol), le 2-méthylbutan-1-ol et le 3-méthylbutan-1-ol. Ce dernier, aussi appelé alcool isoamylique, est le principal alcool supérieur synthétisé par les levures au cours de la FA et représente entre 40 et 70 % de la concentration totale en alcools supérieurs dans le vin (Ribéreau-Gayon et Bertrand, 1971). Le principal alcool aromatique est le 2-phényléthanol. Selon leur concentration, ces composés peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'arôme du vin. Plusieurs études ont ainsi démontré qu'en dessous de 300 mg/L, les alcools supérieurs ont un impact positif et contribuent à la complexité aromatique du vin. Au-dessus de 400 mg/L, ils apportent des notes âcres, caustiques, qui diminuent la qualité du vin (Rapp et Mandery, 1986 ; Rapp et Versini, 1991). De récents travaux réalisés dans notre laboratoire mettent en évidence l'effet masquage de certains alcools vis-à-vis de la note fruitée dans une solution modèle principalement composée d'esters (communication personnelle).

Les alcools sont principalement formés par la levure à partir des acides aminés du raisin par la réaction d'Ehrlich qui consiste en la désamination des acides aminés, suivi d'une décarboxylation en aldéhydes qui peuvent être réduits en alcools. Une deuxième voie métabolique est possible : ces alcools peuvent être formés à partir des acides  $\alpha$ -cétoniques issus du métabolisme des sucres qui rejoindront la voie d'Ehrlich. L'utilisation de marqueurs radioactifs a montré que 65 % des alcools supérieurs provenaient des acides aminés, les 35 % restant étant issus des sucres (Zoecklein *et al.*, 1990). Plusieurs facteurs influencent la production d'alcools supérieurs au cours de la fermentation. La concentration en précurseurs dans le moût, notamment en acides aminés, joue évidemment un rôle essentiel (Schulthess et

Ettlinger, 1978). D'autres paramètres tels que la teneur en éthanol, le pH, la température de fermentation, le cépage, le degré de maturité influencent grandement la synthèse de ces composés (Fleet and Heard, 1993). Toutefois, la principale source de variation est la souche de levures. Mateo *et al.* (1991) ont mis en évidence l'impact significatif de différents genres de levures (*Brettanomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Dekkera*, *Saccharomyces* spp) sur la production d'alcools supérieurs. Au sein même du genre *Saccharomyces*, la synthèse de ces composés varie de manière significative d'une espèce à l'autre (Rankine, 1967). Les travaux de Giudici *et al.* (1990) montrent finalement que la synthèse d'alcools supérieurs est un caractère intra spécifique de la souche de levures *S. cerevisiae* et distinguent deux catégories, les souches productrices et peu productrices. Ils en concluent que la capacité à produire plus ou moins d'alcools supérieurs pourrait servir de critère dans la sélection des souches industrielles. En effet, ce caractère est aujourd'hui de plus en plus pris en compte.

**Tableau 2.** Principaux alcools supérieurs synthétisés par la levure au cours de la fermentation alcoolique (d'après Lambrechts et Pretorius, 2000).

Composé	Formule chimique	Concentration dans le vin (mg/L)	Seuil de perception (mg/L)	Descripteurs
propan-1-ol		9 - 68	306 <sup>[1]</sup> 500 <sup>[2]</sup>	fruits mûrs, solvant, huile de fusel
butan-1-ol		0,5 - 8,5	150 <sup>[1]</sup>	solvant, médicamenteux
isobutanol		9 - 174	40 <sup>[3]</sup> 500 <sup>[2]</sup>	malté
2-méthylbutan-1-ol		15 - 150	40 <sup>[4]</sup>	solvant, malté, amylique
3-méthylbutan-1-ol		60 - 490	30 <sup>[3]</sup> 300 <sup>[2]</sup>	malté, amylique, punaise
2-phényléthanol		4 - 197	14 <sup>[5]</sup>	floral, rose

<sup>[1]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol à pH 3,5 + acide tartrique) (Peinado *et al.*, 2004) ; <sup>[2]</sup> vin (Lambrechts et Pretorius, 2000) ; <sup>[3]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol) (Guth, 1997) ; <sup>[4]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol) (Villanova et Martinez, 2007) ; <sup>[5]</sup> vin synthétique (11 % v/v éthanol, 7 g/L glycérine, 5 g/L acide tartrique, pH 3,4) (Ferreira *et al.*, 2000).

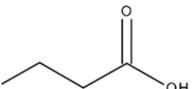
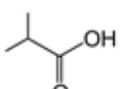
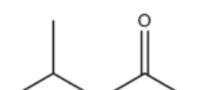
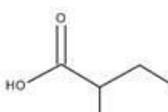
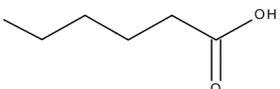
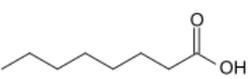
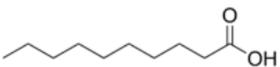
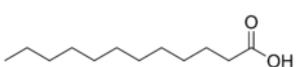
### ***I.B.3. Les acides volatils***

Le vin contient de nombreux acides saturés et insaturés issus du métabolisme levurien. La concentration en acides volatils est généralement de l'ordre de 500 à 1000 mg/L soit environ 10-15 % de la concentration totale en acides. L'acide acétique représente à lui seul environ 90 % des acides volatils (Fowles, 1992 ; Henschke et Jiranek, 1993 ; Radler, 1993). Les 10 % restant sont principalement des acides à courte (acides butyrique, isobutyrique, isovalérique, 2-méthylbutyrique, hexanoïque) et moyenne (acides octanoïque, décanoïque, dodécanoïque) chaîne de carbone (**Tableau 3**).

L'acide acétique joue un rôle important dans la modulation de l'arôme des vins. Il est le constituant essentiel de l'acidité volatile et sa teneur dans les vins est limitée par la législation. Habituellement, on admet des concentrations en acide acétique de l'ordre de 0,2 à 0,6 g/L suivant le style de vin ; au-delà, il apporte une odeur de vinaigre et un caractère piqué altérant la qualité du vin (Corison *et al.*, 1979 ; Dubois, 1994). L'acide acétique est principalement synthétisé par les bactéries acétiques, mais de nombreux travaux ont également mis en évidence un effet levure. Le genre *Saccharomyces* produit généralement moins d'acide acétique que les autres levures dites non-*Saccharomyces* (Fleet et Heard, 1993). Au sein de l'espèce *S. cerevisiae*, un important effet souche est également observé (Delfini et Cervetti, 1991). D'autre part, la piqûre lactique est également une source d'une augmentation de l'acidité volatile des vins lors du développement des BL et de la dégradation de quantités importantes d'hexoses résiduels.

Les autres acides, plus ou moins volatils, à courte et moyenne chaîne de carbone, sont issus du métabolisme des acides gras et sont plutôt considérés comme des produits intermédiaires que comme des produits finaux du catabolisme des acides. Leur impact direct sur l'arôme fruité des vins est relativement faible. Cependant, ce sont les précurseurs d'une des familles de composés aromatiques les plus importantes dans le vin : les esters.

**Tableau 3.** Principaux acides volatils synthétisés par la levure au cours de la fermentation alcoolique (d'après Lambrechts et Pretorius, 2000).

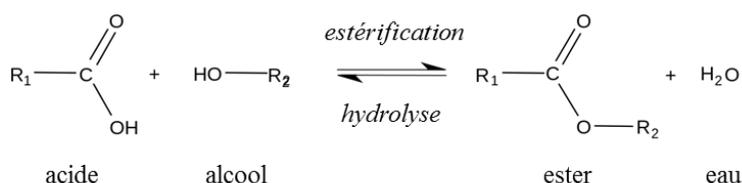
Composé	Formule chimique	Concentration dans le vin (mg/L)	Seuil de perception (mg/L)	Descripteurs
acide acétique		69 - 313	1 <sup>[1]</sup>	vinaigre
acide butyrique		0,5 - 4,7	0,173 <sup>[2]</sup>	beurré, fromage, âcre
acide isobutyrique		0,3 - 1,1	2,3 <sup>[2]</sup>	âcre, caustique
acide isovalérique		25,7 - 86,9	0,03 <sup>[2]</sup>	fromage, pieds
acide 2-méthylbutyrique		nd	3 <sup>[3]</sup>	fromage, pieds
acide hexanoïque		0,9 - 3,8	0,42 <sup>[2]</sup>	fromage, fruit
acide octanoïque		0,6 - 4,7	0,5 <sup>[2]</sup>	rance
acide décanoïque		0,06 - 0,8	1 <sup>[2]</sup>	rance, gras
acide dodécanoïque		traces	nd	nd

<sup>[1]</sup> vin synthétique (11 % v/v éthanol, 4 g/L acide tartrique, pH 3,5) (Kotseridis et Baumes, 2000) ; <sup>[2]</sup> vin synthétique (11 % v/v éthanol, 7 g/L glycérine, 5 g/L acide tartrique, pH 3,4) (Ferreira *et al.*, 2000) ; <sup>[3]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol) (Guth, 1997) ; nd : non déterminé.

### I.B.4. Les esters

Les esters sont, avec les alcools supérieurs, les principaux composés volatils du vin. Ces deux familles représentent la quasi-totalité de l'arôme fermentaire ou secondaire des vins. Les esters constituent la première source de molécules modulant l'arôme fruité. D'un point de vue qualitatif, tous les vins présentent une composition en esters à peu près similaire. En revanche, leur proportion peut fortement varier d'un vin à l'autre (Antalick *et al.*, 2014). Généralement, ces molécules se trouvent à des concentrations bien inférieures à leur seuil de perception et ne peuvent donc pas moduler de façon directe l'arôme des vins. Cependant, ces composés sont au cœur de phénomènes de synergie modulant l'expression fruitée des vins rouges (Pineau, 2007). Pour ces raisons, de faibles variations dans la concentration d'un ou plusieurs esters peuvent avoir un effet significatif sur la perception de l'arôme fruité.

Les esters sont formés à partir d'un acide et d'un alcool, soit par des réactions enzymatiques au cours des fermentations alcoolique ou malolactique, soit par estérification chimique pendant l'élevage. Cette réaction est réversible puisque l'ester produit peut être hydrolysé pour donner à nouveau l'alcool et l'acide mis en jeu. Lorsque le système est en équilibre, il existe une relation constante entre les concentrations des composés chimiques présents, régie par la loi d'action de masse. Le grand nombre d'alcools et d'acides présents dans le vin mène à un grand nombre de combinaisons possibles. Cependant, compte tenu de l'importance de l'éthanol et de la forte réactivité des alcools primaires, les esters éthyliques sont pour des raisons cinétiques les plus abondants.



Les principaux esters (esters éthyliques d'acide gras, esters éthyliques branchés et acétates d'alcools supérieurs) sont essentiellement formés par les levures pendant la FA (**Tableau 4**). Leur synthèse est d'ailleurs très dépendante du genre, de l'espèce ou de la souche de levures utilisée (Saerens *et al.*, 2006 ; Saerens *et al.*, 2008). Plusieurs études ont également mis en évidence une variation du niveau des esters après la FML (Malherbe *et al.*, 2011 ; Antalick *et al.*, 2012 ; Ruiz *et al.*, 2012) qui pourrait être due à des activités estérases bactériennes récemment découvertes (Sumbly *et al.*, 2009 ; Sumbly *et al.*, 2013a ; 2013b).

**Tableau 4.** Principaux esters à caractère fruité identifiés dans les vins rouges (d'après Antalick, 2010 et Lytra, 2012).

Composé	Abréviation	Seuil ( $\mu\text{g/L}$ )	Descripteurs
<b>Esters d'origine variétale</b>			
cinnamate d'éthyle	CinC <sub>2</sub>	1,6 <sup>[2]</sup>	cerise, figue, fruité, floral
dihydrocinnamate d'éthyle	dhCinC <sub>2</sub>	1,1 <sup>[2]</sup>	fruité, ananas, amande
anthranilate de méthyle	AnC <sub>1</sub>	nd	fraise des bois, mandarine, camphré
anthranilate d'éthyle	AnC <sub>2</sub>	nd	fruité, mandarine, camphré
<b>Esters majeurs d'acides fixes</b>			
succinate de diéthyle	SDE	200 000 <sup>[3]</sup>	fruité
lactate d'éthyle	lacC <sub>2</sub>	154 000 <sup>[3]</sup>	fruité, lacté
malate de diéthyle	MDE	10 000 <sup>[11]</sup>	cerise, pomme
<b>Esters éthyliques d'acides gras</b>			
propionate d'éthyle	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	2 100 <sup>[1]</sup>	solvant, fraise mûre
butyrate d'éthyle	C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	20 <sup>[2]</sup> , 600 <sup>[1]</sup>	kiwi mûr, fraise mûre, fromage
hexanoate d'éthyle	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	14 <sup>[2]</sup> , 440 <sup>[1]</sup>	ananas, fruit, pomme
octanoate d'éthyle	C <sub>8</sub> C <sub>2</sub>	580 <sup>[3]</sup> , 960 <sup>[1]</sup>	cireux, peau de pomme, fruité
décanoate d'éthyle	C <sub>10</sub> C <sub>2</sub>	200 <sup>[2]</sup>	cireux, savon, fruité
dodécanoate d'éthyle	C <sub>12</sub> C <sub>2</sub>	3 500 <sup>[4]</sup>	cireux, savon
<b>Acétates d'alcools supérieurs</b>			
acétate d'éthyle	C <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	7 500 <sup>[5]</sup> , 12 000 <sup>[6]</sup>	vernis, solvant
acétate de propyle	C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	65 000 <sup>[7]</sup>	solvant, fruité
acétate d'isobutyle	C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub>	1 600 <sup>[8]</sup> , 2100 <sup>[1]</sup>	solvant, fruité
acétate de butyle	C <sub>2</sub> C <sub>4</sub>	1 800 <sup>[3]</sup> , 1830 <sup>[1]</sup>	solvant, fruité
acétate d'isoamyle	C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub>	30 <sup>[2]</sup> , 860 <sup>[1]</sup>	banane
acétate d'hexyle	C <sub>2</sub> C <sub>6</sub>	670 <sup>[1]</sup>	fruité, poire, ananas
acétate d'octyle	C <sub>2</sub> C <sub>8</sub>	800 <sup>[1]</sup>	cireux, fruité
acétate de 2-phényléthyle	C <sub>2</sub> 2-PhC <sub>2</sub>	250 <sup>[5]</sup> , 6 500 <sup>[1]</sup>	floral, rose, vineux
<b>Esters éthyliques d'acides branchés</b>			
isobutyrate d'éthyle	iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	15 <sup>[2]</sup>	fraise, kiwi, fruité, solvant
2-méthylbutyrate d'éthyle	2mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	18 <sup>[2]</sup> , 1 890 <sup>[1]</sup>	fruité, kiwi
isovalérate d'éthyle	iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	3 <sup>[2]</sup>	fromage, fruité
phénylacétate d'éthyle	PhC <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	73 <sup>[9]</sup>	floral, mimosa, fruité, olive
<b>Esters éthyliques hydroxylés</b>			
3-hydroxybutyrate d'éthyle	3OHC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	1 800 <sup>[1]</sup>	fruité, fraise
2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle	LeuC <sub>2</sub>	300 <sup>[10]</sup>	mûre
2-hydroxyhexanoate d'éthyle	2OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	2 400 <sup>[1]</sup>	mûre
6-hydroxyhexanoate d'éthyle	6OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	1 200 <sup>[1]</sup>	fruité

<sup>[1]</sup> vin rouge désaromatisé (Pineau, 2007) ; <sup>[2]</sup> solution hydroalcoolique (11 % v/v éthanol, 7 g/L glycérol et 5 g/L acide tartrique, pH 3,4 ajusté avec NaOH 1M) (Ferreira *et al.*, 2000) ; <sup>[3]</sup> vin (Etievant, 1991) ; <sup>[4]</sup> bière (Meilgaard, 1975) ; <sup>[5]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol) (Guth, 1997) ; <sup>[6]</sup> vin (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b) ; <sup>[7]</sup> solution hydroalcoolique (14 % v/v éthanol) (Moreno *et al.*, 2005) ; <sup>[8]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol, 5 g/L acide tartrique, pH 3,2) (Aznar *et al.*, 2003) ; <sup>[9]</sup> vin (Tat *et al.*, 2007) ; <sup>[10]</sup> solution hydroalcoolique (12 % v/v éthanol, pH 3,5 ajusté avec de l'acide tartrique) (Falcao *et al.*, 2012) ; <sup>[11]</sup> vin de Xérès (Zea *et al.*, 2001) ; nd : non déterminé.

#### I.B.4.a. Les esters variétaux

Le cinnamate d'éthyle, le dihydrocinnamate d'éthyle, l'anthranilate de méthyle et l'anthranilate d'éthyle font partie des rares esters d'origine variétale identifiés (Loscos *et al.*, 2007). Les cinnamates sont caractérisés par des odeurs fruitées du type "cerise", "figue", "fraise", "fruits rouges" alors que les anthranilates présentent des notes plus pharmaceutiques avec des nuances de "fraise des bois". Ces derniers sont par ailleurs responsables du caractère particulièrement floral de cépages hybrides issus par exemple de *Vitis labrusca* (Nelson *et al.*, 1977 ; Acree *et al.*, 1993 ; Christoph *et al.*, 1999). De faibles teneurs en cinnamate d'éthyle et dihydrocinnamate d'éthyle (quelques centaines de ng/L à quelques µg/L) ont été détectées dans plusieurs vins de Pinot noir (Moio et Etievant, 1995), des vins de Sauvignon Blanc (Šuklje *et al.*, 2014) ainsi que dans des moûts de Chardonnay and Gewürztraminer (Serratosa *et al.*, 2014). Sa concentration dans les vins pourrait être augmentée lors de la vinification, notamment grâce à la macération carbonique (Ducruet *et al.*, 1983 ; Antalick *et al.*, 2014). Il reste cependant peu probable que ces esters jouent un rôle direct dans l'expression de l'arôme fruité. Ils pourraient en revanche participer de façon synergique à la note fruitée grâce à des interactions avec des composés comme la  $\beta$ -damascénone (Pineau *et al.*, 2007). Versini *et al.* (1984) avaient, par ailleurs, déjà émis l'hypothèse que le cinnamate d'éthyle pouvait être lié à la note "fraise / framboise" perçue dans les vins de macération carbonique.

#### I.B.4.b. Les esters d'acides fixes

Ces esters d'acides fixes tels que le lactate d'éthyle, le malate de diéthyle, le citrate de triéthyle, le succinate de monoéthyle ou le succinate de diéthyle sont principalement formés au cours du vieillissement par estérification des acides organiques du raisin (acides malique, citrique ou succinique). Les succinates peuvent éventuellement et dans une moindre mesure, être synthétisés par les levures et les BL au cours des deux fermentations. En revanche, le lactate d'éthyle peut avoir trois origines : en plus de l'estérification chimique, il est également synthétisé par les levures, mais surtout par les BL au cours de la FML (Boido *et al.*, 1999). Leurs teneurs retrouvées dans les vins, de l'ordre de la centaine de milligrammes par litre, est nettement supérieure à la plupart des autres esters. Ils n'ont cependant qu'un rôle très limité dans les qualités organoleptiques des vins et la bonification liée au vieillissement ne leur est pas imputable (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b).

#### I.B.4.c. Les esters éthyliques d'acides gras

Les esters éthyliques d'acide gras (EEAG) sont synthétisés à partir de l'éthanol et de l'acide "gras" correspondant, et sont principalement représentés par le butanoate d'éthyle, l'hexanoate d'éthyle, l'octanoate d'éthyle, le décanoate d'éthyle et dans une moindre mesure le dodécanoate d'éthyle. Les esters éthyliques à chaîne carbonée plus longue n'interviennent probablement pas dans la modulation de l'arôme fruité en raison de leur masse molaire élevée et leur très faible polarité. Le propionate d'éthyle peut être inclus dans cette liste, même s'il ne provient pas à proprement parler d'un acide gras. Les esters éthyliques présentent des arômes jugés agréables, peu typés, principalement fruités (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1964 ; Bertrand, 1983 ; Etievant, 1991). Leurs notes se rapprochent des odeurs savonneuses dites "stéariques" lorsque le nombre de carbone augmente (Jackson, 1994). Leurs teneurs dans les vins sont bien souvent inférieures à leur seuil de perception, mais de nombreuses études ont mis en évidence leur rôle majeur dans la modulation de l'arôme fruité par le biais d'interactions perceptives. Pineau *et al.* (2009) ont par exemple démontré que le butyrate, l'hexanoate et l'octanoate d'éthyle participent aux notes "fruits rouges" / "fruits frais" et que le propionate d'éthyle contribue aux notes "fruits noirs" / "fruits confiturés" des vins rouges.

#### I.B.4.d. Les acétates d'alcools supérieurs

Les acétates d'alcools supérieurs sont les esters formés par l'acide acétique et l'alcool supérieur correspondant. Il s'agit principalement de l'acétate de propyle, l'acétate d'isobutyle, l'acétate de butyle, l'acétate d'isoamyle, l'acétate de 2-méthylbutyle, l'acétate d'hexyle, l'acétate d'octyle et de l'acétate de 2-phényléthyle. Ils possèdent des odeurs plus lourdes que les EEAG et peuvent masquer l'arôme variétal du vin lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). Pris individuellement, ils ont des odeurs "fruité", "solvant" assez variées, allant de la banane type bonbon pour l'acétate d'isoamyle, à la poire pour l'acétate d'hexyle en passant par un caractère plus vineux et floral pour l'acétate de 2-phényléthyle. Les acétates sont moins impliqués que les esters éthyliques dans la perception de l'arôme fruité des vins rouges. Néanmoins, ils participent grandement à l'arôme "fermentaire" des vins jeunes et bien sûr à celui des vins nouveaux subissant la macération carbonique ou la thermovinification (Antalick *et al.*, 2014). L'acétate d'éthyle fait figure

d'exception parmi les esters car son odeur de vernis ou de solvant dénature le bouquet d'un vin en lui conférant une note d'acescence désagréable (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b).

#### *I.B.4.e. Les esters éthyliques d'acides branchés*

Les esters éthyliques d'acides branchés sont formés à partir de l'éthanol et de l'acide branché correspondant, dont les principaux sont l'isobutyrate d'éthyle, le 2-méthylbutyrate d'éthyle, l'isovalérate d'éthyle et le phénylacétate d'éthyle. Les trois premiers ont des odeurs fruitées, de fraise et de kiwi notamment avec des nuances de fromage et de solvant, alors que le phénylacétate d'éthyle est plutôt caractérisé par des notes plus florales. L'impact de ces esters dans le vin a longtemps été considéré comme négligeable, du fait de leurs faibles concentrations et seuils de perception dans le vin. Ces esters se sont pourtant révélés comme étant des composés à fort pouvoir odorant (Guth, 1997 ; Ferreira *et al.*, 1998). S'ils ne participent probablement pas de manière directe dans la modulation de l'arôme fruité, il semblerait qu'ils jouent tout de même un rôle *via* des effets de synergie. Pineau *et al.* (2007) ont par exemple démontré que l'isobutyrate d'éthyle et le 2-méthylbutyrate d'éthyle contribuent aux notes "fruits noirs" et "fruits confiturés" des vins rouges.

#### *I.B.4.f. Les esters hydroxylés*

Un certain nombre d'esters hydroxylés sont également présents dans le vin à des concentrations très variables. Parmi eux, on trouve le 3-hydroxybutyrate d'éthyle, le 4-hydroxybutyrate d'éthyle, le 2-hydroxyhexanoate d'éthyle et le 6-hydroxyhexanoate d'éthyle. Ces composés sont caractérisés par des odeurs de fraise, de mûre ou de pomme. Leurs teneurs dans le vin, de l'ordre de quelques microgrammes par litre, restent loin de leur seuil de perception, ce qui rend peu probable une participation directe de ces composés à l'arôme du vin. Comme les autres esters, il semblerait qu'ils participent à la note fruitée *via* des interactions perceptives (Pineau *et al.*, 2007). L'absence de ces composés dans les moûts et les vins blancs laisse présumer d'une origine fermentaire impliquant probablement des précurseurs pelliculaires uniquement présents dans les raisins rouges (Pineau, 2007). De manière générale, l'origine, les teneurs et l'impact de ces composés n'ont été que très peu étudiés.

Le 2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle (ou leucate d'éthyle), identifié pour la première fois dans des vieux Madère et certains Xérès (Campo *et al.*, 2006), a récemment été mis en évidence dans des vins rouges de Bordeaux (Falcao *et al.*, 2012). Cet ester hydroxylé et ramifié aux notes marquées de mûre a été identifié dans les vins rouges à une concentration moyenne d'environ 400 µg/L, assez proche de son seuil de perception (300 µg/L en solution hydroalcoolique) (Falcao *et al.*, 2012). Plus intéressant, Lytra *et al.* (2012a) ont récemment mis en évidence le rôle d'exhausteur de ce composé sur le caractère fruité des vins rouges.

#### *I.B.4.g. Les esters mineurs*

Le nombre important d'alcools et d'acides présents dans le vin offre la possibilité à de nombreuses autres combinaisons dans la formation des esters. Certains ont déjà été identifiés tels que les esters méthyliques, les esters isoamyliques ou encore les esters éthyliques d'acides à nombre impair de carbone. Ils n'ont cependant été que très peu étudiés et leur concentration dans les vins ne semble pas dépasser les quelques microgrammes par litre (Antalick *et al.*, 2014). Si leur impact direct sur l'arôme fruité est peu probable, ils représentent une base potentielle pour des interactions perceptives. La liste d'esters présentée dans cette étude bibliographique n'est donc pas exhaustive et il est fort probable qu'un certain nombre de ces composés n'aient pas encore été identifiés.

#### *I.B.5. Les composés soufrés volatils*

Les composés soufrés volatils peuvent contribuer de façon significative à l'arôme du vin en raison de leur faible seuil de perception et d'une volatilité importante. Ils ne sont cependant pas tous souhaitables et peuvent, en excès, entraîner des odeurs désagréables de réduction et diminuer la qualité du vin (**Tableau 5**).

Le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) est caractérisé par une odeur désagréable d'œuf et un faible seuil de perception variant de la dizaine de microgrammes par litre à quelques nanogrammes par litre en fonction de la matrice (Lambrechts et Pretorius, 2000). Si certaines études ont montré un effet plutôt positif de ce composé à faible concentration sur l'arôme "fermentaire" (Dittrich et Staudenmayer, 1970), l'H<sub>2</sub>S est principalement considéré comme un défaut du vin. Il peut cependant être facilement éliminé par dégazage, légère aération ou à

l'aide d'ajout de sels de sulfate ou de citrate de cuivre. Ce composé soufré volatil peut être synthétisé par les levures au cours de la FA à partir de composés soufrés organiques ou inorganiques, de sulfates ou de sulfites, ou de précurseurs comme la cystéine ou le glutathion (Rankine, 1963 ; Eschenbruch *et al.*, 1974 ; Rauhut, 1993 ; Spiropoulos *et al.*, 2000) à différents niveaux suivant la souche de levures impliquée (Rauhut *et al.*, 1996). Il peut également être formé par réduction du SO<sub>2</sub> si le sulfitage est réalisé trop précocement après l'achèvement de la FA, en raison de la rémanence de l'activité sulfite-réductase des levures (Lavigne-Cruège, 1996).

**Tableau 5.** Principaux composés soufrés volatils identifiés dans les vins rouges (d'après Lambrechts et Pretorius, 2000).

Composé	Formule chimique	Concentration dans le vin (µg/L)	Seuil de perception (µg/L)	Descripteurs
sulfure d'hydrogène	$\text{H}-\text{S}-\text{H}$	Traces - 80	0,8 <sup>[1]</sup>	œuf pourri
sulfure de diméthyle	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_3$	Traces - 910	27 <sup>[2]</sup>	truffe, foin, olive verte
diméthylsulfure	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_3$	Traces - 1,6	2,5 <sup>[1]</sup> , 30 <sup>[3]</sup>	chou cuit, oignon
méthanethiol	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{H}$		0,3 <sup>[4]</sup>	œuf pourri, chou
éthanethiol	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{H}$		0,1 <sup>[1]</sup>	oignon, caoutchouc

<sup>[1]</sup> vin solution modèle (Lavigne *et al.*, 1993) ; <sup>[2]</sup> vin rouge (Anocibar Beloqui *et al.*, 1996) ; <sup>[3]</sup> vin rouge (Chatonnet *et al.*, 1992) ; <sup>[4]</sup> vin solution modèle (Lavigne et Dubourdiou, 1997).

Le sulfure de diméthyle (DMS) est un composé présent dans un grand nombre de produits alimentaires dont le vin. Pris à part, il présente des odeurs de truffe, de sous-bois, d'olive verte voire de choux, suivant les concentrations (Anocibar Beloqui *et al.*, 1996 ; Segurel *et al.*, 2004). Son seuil de perception dans le vin rouge a été établi à 27 µg/L (Anocibar Beloqui *et al.*, 1996). Sa teneur dans les vins dépasse fréquemment son seuil de perception, ce qui confèrerait des notes de cassis et de framboise (Anocibar Beloqui *et al.*, 1996 ; Segurel *et al.*, 2004). Escudero *et al.* (2007) avaient évoqué un rôle d'exhausteur d'arôme fruité par le DMS, confirmé récemment par Lytra *et al.* (2014a) en solution modèle. Ce composé a été retrouvé dans des vins issus de nombreux cépages (Xynomavro, Grenache,

Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon) ; néanmoins son origine n'a pas été totalement élucidée. Une méthode de dosage du potentiel en DMS (PDMS), par la dégradation de ses précurseurs en DMS, permet d'estimer la concentration en ce composé susceptible d'être libérée dans le vin au cours du vieillissement (Segurel *et al.*, 2005). Les conditions physiologiques de la vigne et notamment l'alimentation hydrique semblent être un paramètre important pouvant moduler les teneurs finales en DMS (De Royer Dupré *et al.*, 2014). D'après plusieurs études, les levures sont capables d'en synthétiser au cours de la FA à partir d'acides aminés ou de leurs dérivés (De Mora *et al.*, 1986) ou à partir de sulfoxyde de diméthyle (Anocibar Beloqui *et al.*, 1996). D'autres auteurs ont également montré la capacité des BL à synthétiser ce composé grâce au métabolisme de la méthionine (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004). La plus grande partie du DMS est cependant formée par voie chimique au cours de l'élevage et dépend des conditions de conservation (De Mora *et al.*, 1986 ; Anocibar Beloqui *et al.*, 1996 ; Segurel *et al.*, 2004).

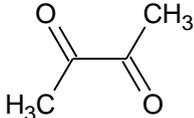
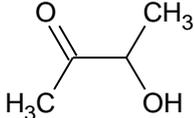
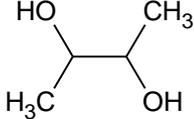
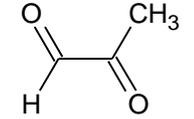
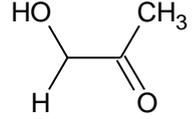
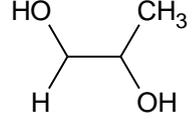
D'autres composés soufrés volatils comme par exemple le méthanethiol, l'éthanethiol ou le diméthylsulfure ont également été identifiés et corrélés aux odeurs désagréables de réduction trouvées dans les vins (Rauhut et Kurbel, 1996).

### ***1.B.6. Le diacétyle et autres composés $\alpha$ -dicarbonylés***

La butan-2,3-dione, plus communément appelée diacétyle, est le principal composé aromatique issu du métabolisme de l'acide citrique (**Tableau 6**). Il dégage une odeur beurrée influençant plus ou moins négativement l'arôme du vin en fonction de sa concentration (Bertrand *et al.*, 1984). Pourtant, Peynaud (1980) considère que le diacétyle formé pendant la FML est un élément intervenant dans l'affinement de l'arôme. Des études ont en effet montré qu'à faibles teneurs (< 4 mg/L), il peut augmenter la complexité et améliorer la qualité du vin (Rankine *et al.*, 1969). Récemment, Lytra *et al.* (2012b) confirment l'effet masque du diacétyle, diminuant la perception de notes fruitées dans les vins rouges. Certaines levures sont capables de synthétiser le diacétyle au cours de la FA par décarboxylation non enzymatique de l' $\alpha$ -acétolactate ou par association du pyruvate et de l'acétyl-CoA (de Revel, 1992). L'impact de cette synthèse levurienne est cependant relativement faible, la plupart du diacétyle formé étant par la suite réduit en composés moins odorants comme l'acétoïne ou le butan-2,3-diol (Postel et Meier, 1983 ; de Revel *et al.*, 1989). La majorité du diacétyle est formée au cours de la FML par les BL suite à la dégradation de l'acide citrique (Bertrand *et*

*al.*, 1984 ; Davis *et al.*, 1985 ; de Revel, 1992 ; Bartowsky et Henschke, 2004). La souche de BL, sa croissance ainsi que les caractéristiques œnologiques des vins (concentration en sucres, en acides malique et citrique) influencent grandement la synthèse du diacétyl (Shimazu *et al.*, 1985) et sa concentration finale.

**Tableau 6.** Principaux composés dicarbonylés et leurs produits de réduction identifiés dans les vins rouges.

Composé	Formule chimique	Seuil de perception (mg/L)	Descripteurs
diacétyl		0,1 <sup>[1]</sup>	beurre, fromage
acétoïne		150 <sup>[2]</sup>	beurre, lactique
butan-2,3-diol		4 500 <sup>[3]</sup>	peu aromatique
méthylglyoxal		5 <sup>[4]</sup>	lactique, crème fraîche
acétol		nd	peu aromatique, fruité
propan-1,2-diol		nd	peu aromatique

<sup>[1]</sup> solution hydroalcoolique (10 % v/v éthanol) (Guth, 1997) ; <sup>[2]</sup> vin (Etievant, 1991) ; <sup>[3]</sup> bière (Meilgaard, 1975) ; <sup>[4]</sup> bière (Palamand *et al.*, 1970) ; nd : non déterminé.

D'autres molécules  $\alpha$ -dicarbonylées comme le méthylglyoxal et ses produits de réduction, l'acétol et le propan-1,2-diol, sont également susceptibles de nuancer l'arôme du vin en apportant des notes beurrées plus fraîches et plus douces (de Revel et Bertrand, 1993). Ils peuvent également, de façon indirecte, jouer un rôle dans le bouquet de vieillissement des vins en réagissant avec de nombreux substrats pour former des thiazoles et des hétérocycles aux odeurs de noisette et de café (Marchand *et al.*, 2000 ; Pripis-Nicolau *et al.*, 2000).

## II. Etude de l'influence de six couples levures/bactéries lactiques sur la composition chimique d'un vin rouge

### II.A. Méthodes d'analyses des principales molécules volatiles

#### II.A.1. Analyses par injection directe et par espace de tête

Les analyses GC par injection directe ou par espace de tête sont des techniques rapides qui ne nécessitent que d'un faible volume d'échantillon. Elles sont utilisées pour quantifier les composés présents en grande quantité (injection directe) ou très volatils (technique de l'espace de tête).

#### **- Les alcools supérieurs par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme.**

La méthode officielle J.O. des Communautés Européennes (29 décembre 2000) permet le dosage des principaux alcools supérieurs : propan-1-ol, 2-méthylpropan-1-ol, butan-1-ol et les alcools isoamyliques mais également la détection du méthanol, de l'acétate d'éthyle et de l'éthanal.

50  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne (4-méthylpentan-2-ol à 14 g/L en solution hydroalcoolique à 50 % v/v) sont ajoutés à 5 mL de vin et l'ensemble est homogénéisé avant injection directe.

Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 7**.

#### **- Les composés acétoïniques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme.**

Cette méthode développée et validée au laboratoire (de Revel, 1992) permet le dosage de l'acétoïne, de l'acétol et des butan-2,3-diol D(-) et méso.

50  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne (butan-1,4-diol à 1 g/L en solution hydroalcoolique, 40 % v/v) sont ajoutés à 1 mL de vin. Le tout est dilué avec 2 mL de méthanol. Les conditions expérimentales sont présentées le **Tableau 8**.

**Tableau 7.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des alcools supérieurs.

Principe :	Injection directe
Appareil :	HP 5890
Colonne :	CPWAX 57 CB 50 m x 0,25 mm Epaisseur de film 0,2 µm
Injecteur :	Mode : <i>split</i> rapport de division 1/60 Volume injecté : 0,4 µL Température : 200 °C
Gaz vecteur :	Hydrogène 5.5 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	40 °C pendant 5 min 4 °C/min jusqu'à 200 °C
Détecteur :	Ionisation de flamme (FID) Température : 240 °C

**Tableau 8.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des composés acétoïniques.

Principe :	Injection directe
Appareil :	Agilent 6890N
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Epaisseur de film 0,25 µm
Injecteur :	Mode : <i>split</i> rapport de division 1/60 Volume injecté : 0,5 µL Température : 200 °C
Gaz vecteur :	Hydrogène 5.5 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	80 °C pendant 5 min 3 °C/min jusqu'à 200 °C maintenu 15 min
Détecteur :	Ionisation de flamme (FID) Température : 240 °C

**- Les composés soufrés légers par chromatographie en phase gazeuse couplée à la photométrie de flamme.**

Les composés soufrés dits « légers » ont un point d'ébullition inférieur à 90 °C. La méthode de dosage développée et validée par Anocibar Beloqui (1998) permet la quantification du sulfure d'hydrogène, du méthane-thiol, de l'éthane-thiol, du diméthyl-disulfure, du diméthyl-sulfure, du disulfure de carbone. Parmi tous les composés soufrés, deux molécules ont été quantifiées dans le cadre de cette étude : H<sub>2</sub>S et DMS.

Dans un flacon d'une capacité de 125 mL, 100 mL de vin sont additionnés de 10 µL de solution d'étalon interne (thiophène à 300 mg/L en solution alcoolique). Le flacon est fermé hermétiquement par un bouchon perforable et serti avec une capsule métallique. Après stabilisation pendant 24 heures à une température de 22 °C, il est injecté 1 mL du volume gazeux. Les conditions expérimentales sont résumées ci-dessous.

**Tableau 9.** Conditions expérimentales de la HS-GC-FPD pour le dosage des composés soufrés.

Principe :	Injection par espace de tête
Appareil :	HP5890
Colonne :	HP5 30 m x 0,25 mm Epaisseur de film 0,25 µm
Injecteur :	Volume injecté : 1 mL Température : 70 °C
Gaz vecteur :	Hydrogène 5.5 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	32 °C pendant 1 min 10 °C/min jusqu'à 80 °C 20 °C/min jusqu'à 180 °C
Détecteur :	Photométrie de flamme (FPD) Température : 200 °C

### **II.A.2. Analyses des molécules volatiles par extraction liquide/liquide**

L'extraction liquide-liquide est une opération qui permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux phases liquides non-miscibles. Elle est utilisée pour des composés présents en concentration plus faible et dont la volatilité est moins importante que ceux décrits précédemment.

#### **- Les acides volatils par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme.**

Ce dosage permet, entre autre, la détection des acides isobutyrique, butyrique, isovalérique, hexanoïque, octanoïque, décanoïque, et dodécanoïque (Bertrand, 1975).

200 µL d'une solution d'étalon interne (octan-3-ol à 400 mg/L en solution hydroalcoolique, 40 % v/v) sont ajoutés à 50 mL de vin avec 0,3 mL d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dilué au 1/3 pour libérer les acides de leurs sels. L'échantillon est successivement extrait par 4, 2 et 2 mL d'un mélange éther-isohexane (1 : 1, v/v) pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases organiques et aqueuses sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les phases organiques sont recueillies dans un pilulier de 20 mL et l'émulsion est cassée à l'aide d'un barreau magnétique. Les quelques gouttes de solution aqueuse encore présentes sont enlevées avec soin. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 10**.

#### **- Les composés dicarbonylés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.**

La méthode utilisée permettant le dosage du diacétyl, du glyoxal, du méthylglyoxal et de la pentan-2,3-dione a été développée et validée par de Revel *et al.* (2000).

100 µL d'une solution d'étalon interne (hexan-2,3-dione à 3,80 g/L en solution hydroalcoolique, 50 % v/v) sont ajoutés à 50 mL de vin et 5 mL de solution aqueuse de 1,2-diaminobenzène à 6,5 g/L (agent de dérivatisation). Le pH est ajusté à 8 avec de la soude (10M). Après 3 heures à 60 °C, le mélange est acidifié à pH 2 avec une solution d'acide sulfurique 2M, puis extrait 2 fois avec 5 mL de dichlorométhane pendant 5 min. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 11**.

**Tableau 10.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des acides volatils.

Principe :	Extraction liquide-liquide
Appareil :	HP 5890
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Epaisseur de film 0,25 µm
Injecteur :	Mode : <i>splitless/split</i> Division : 30 mL/min Temps sans division : 0,5 min Température : 200 °C Volume injecté : 1 µL
Gaz vecteur :	Hydrogène N50 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	40 °C pendant 5 min 3 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu 30 min
Détecteur :	Ionisation de flamme (FID) Température : 250 °C

**Tableau 11.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour le dosage des composés dicarbonylés.

Principe :	Extraction liquide-liquide après dérivatisation
Appareil :	Agilent 6890N
Colonne :	HP5 30 m x 0,25 mm Epaisseur de film 0,25 µm
Injecteur :	Mode : <i>splitless</i> (30 s) Volume injecté : 2 µL Température : 250 °C
Gaz vecteur :	Hélium N55 Débit : 1,4 mL/min
Programmation de température :	60 °C pendant 1 min 2 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu pendant 20 min
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : Agilent 5973 <i>inert</i> Energie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> ) Quantification avec les ions totaux sélectionnés

Le **Tableau 12** présente les ions utilisés pour la détection des différents composés dicarboxylés nous intéressant.

**Tableau 12.** Ions spécifiques utilisés pour la détection des composés dicarboxylés.

Composés	Ions (m/Z)
Glyoxal	130, 103, 76
Méthylglyoxal	144, 117, 76, 103
Diacétyl	158, 117, 76
Pentan-2,4-dione	171, 130
Hexan-2,3-dione (EI)	158, 171, 117, 143

#### - Les esters hydroxylés et autres composés polaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Cette méthode a été adaptée et validée par Antalick (2010). Les composés aromatiques du vin dits "polaires" correspondent à des composés dont le coefficient de partage octanol/eau est faible (c'est à dire log p inférieur à 1) ou négatif. Il s'agit du linalol, de la frambinone, de certains acides gras branchés (acide isobutyrique, acide 2-méthylbutyrique et acide isovalérique) ; et d'esters polaires (lactate d'éthyle, succinate de diéthyle, succinate de monoéthyle, 3-hydroxybutyrate d'éthyle, 2-hydroxyhexanoate d'éthyle, 6-hydroxyhexanoate d'éthyle et leucate d'éthyle).

10 µL d'une solution d'étalon interne (2-hydroxyisobutyrate d'éthyle à 0,96 g/L, en solution alcoolique) sont ajoutés à 50 mL de vin. Le mélange est extrait successivement avec 4, 2 et 2 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases, organiques et aqueuses, sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les trois phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 20 mL et l'émulsion est cassée à l'aide d'un barreau magnétique tournant lentement. Les traces d'eau de la phase organique sont éliminées à l'aide de sulfate de sodium anhydre. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 13**. Le **Tableau 14** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés aromatiques nous intéressant.

**Tableau 13.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour le dosage des composés polaires.

Principe :	Extraction liquide-liquide
Appareil :	HP 5890
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Epaisseur de film 0,25 µm
Injecteur :	Mode : <i>splitless</i> (45 s) Volume injecté : 1 µL Température : 250 °C
Gaz vecteur :	Hélium N55 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	60 °C pendant 5 min 3 °C/min jusqu'à 200 °C maintenu pendant 50 min
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : HP 5972 Energie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

**Tableau 14.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des composés polaires.

Composés	Abréviations	Ions (m/Z)
Acide isobutyrique	iC <sub>4</sub>	<b>73</b> , 43,88
Acide 2-méthylbutyrique	2mC <sub>4</sub>	<b>60</b> , 87
Acide isovalérique	iC <sub>5</sub>	<b>74</b> , 87
Lactate d'éthyle	LacC <sub>2</sub>	<b>45</b> , 75
Succinate de diéthyle	SDE	<b>101</b> , 128
Succinate de monoéthyle	SME	<b>101</b> , 129
3-hydroxybutyrate d'éthyle	3OHC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>87</b> , 71, 88
2-hydroxyhexanoate d'éthyle	2OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	<b>87</b>
6-hydroxyhexanoate d'éthyle	6OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	<b>88</b> , 97, 101, 115
Leucate d'éthyle	LeuC <sub>2</sub>	<b>87</b>
Frambinone	Framb	<b>107</b>
2-hydroxyisobutyrate d'éthyle	EI	<b>59</b>

### **II.A.3. Analyses par microextraction sur phase solide**

L'extraction liquide-liquide est une technique qui demande du temps, un volume d'échantillon important et surtout de grandes quantités de solvant de haute pureté. La microextraction en phase solide est une méthode d'extraction de molécules organiques sans solvant, plus facile à automatiser. Les composés sont extraits par adsorption sur une fibre ou un barreau de silice fondue revêtue d'un polymère qui sera soit introduite directement dans l'échantillon, soit exposée à l'espace de tête.

#### **- Les C<sub>13</sub>-norisoprénoides et lactones par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.**

Cette méthode, développée et validée par Antalick (2010) permet le dosage de six lactones :  $\gamma$ -octalactone,  $\gamma$ -nonalactone,  $\gamma$ -décylactone,  $\delta$ -décylactone,  $\gamma$ -undécylactone,  $\gamma$ -dodécylactone et de quatre norisoprénoides :  $\beta$ -damascone,  $\beta$ -damascénone,  $\alpha$ -ionone et  $\beta$ -ionone.

25  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne (cinnamate d'éthyle-*d*<sub>5</sub> à 1,74 g/L en solution alcoolique) sont ajoutés à 25 mL de vin. Après homogénéisation, un volume de 20 mL d'échantillon est prélevé et transféré dans un pilulier de 20 mL. Le barreau magnétique Twister® de 126  $\mu$ L de volume de phase stationnaire est placé dans le pilulier pour agitation à 900 tr/min pendant 60 minutes. Le barreau est ensuite rincé à l'eau milliQ, séché sur papier absorbant et placé dans le tube de désorption. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 15**. Le **Tableau 16** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés aromatiques nous intéressant.

**Tableau 15.** Conditions expérimentales de la SBSE-GC-MS pour le dosage des C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes et lactones.

Principe :	Microextraction sur phase solide, SBSE
Appareil :	HP 6890
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Epaisseur de film 0,25 µm
Injecteur (Gerstel) :	TDS : Température : 50 °C puis 60 °C/min jusqu'à 280 °C maintenu 10 min Cryolocalisation des composés dans le CIS à -100 °C Ligne de transfert TDS/CIS à 300 °C Mode : <i>splitless</i>
CIS :	Température : 12 °C/min jusqu'à 290 °C maintenu 5 min
GC :	Mode <i>solvent vent</i> (45 s)
Gaz vecteur :	Hélium N55 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	60 °C maintenu 6 min 6 °C/min jusqu'à 164 °C 1 °C/min jusqu'à 190 °C 4 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu 20 min
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : HP 5972 Energie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

**Tableau 16.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes et lactones.

Composés	Abréviations	Ions (m/Z)
γ-octalactone	γ-C8	<b>85</b> , 100
γ-nonolactone	γ-C9	<b>85</b> , 99
γ-décalactone	γ-C10	<b>85</b> , 128
δ-décalactone	δ-C10	<b>99</b> , 70, 114
γ-undécalactone	γ-C11	<b>85</b> , 128
γ-dodécalactone	γ-C12	<b>85</b> , 100, 128
β-damascone	β-dam	<b>192</b> , 123, 177
β-damascénone	β-done	<b>190</b> , 121, 69
α-ionone	α-i	<b>136</b> , 121, 93
β-ionone	β-i	<b>177</b> , 192
cinnamate d'éthyle- <i>d</i> <sub>5</sub>	EI	<b>181</b> , 131

### - Les esters apolaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

La méthode (Antalick *et al.*, 2010) permet la quantification de 32 esters, listés dans le **Tableau 18**.

Pour ce dosage, quatre étalons internes en solution alcoolique sont utilisés : butyrate d'éthyle- $d_5$  (187 mg/L), hexanoate d'éthyle- $d_5$  (271 mg/L), octanoate d'éthyle- $d_5$  (262 mg/L), cinnamate d'éthyle- $d_5$  (174 mg/L). 20  $\mu$ L de la solution d'étalons internes sont ajoutés à 25 mL de vin. Le mélange est homogénéisé puis un prélèvement de 10 mL est placé dans un vial SPME préalablement rempli de 3,5 g de NaCl. Le vial est serti avec une capsule métallique recouverte d'un septum en silicone puis agité quelques secondes pour homogénéiser son contenu. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 17**.

**Tableau 17.** Conditions expérimentales de la HS-SPME-GC-MS pour le dosage des esters apolaires.

Principe :	Microextraction sur phase solide, HS-SPME
Appareil :	HP 5890
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Epaisseur de film 0,25 $\mu$ m
Injecteur :	Paramètres d'adsorption : Fibre en PDMS (polydiméthylsiloxane) Epaisseur de film : 100 $\mu$ m Température d'adsorption : 40 °C pendant 30 min Vitesse d'agitation : 500 tr/min Paramètres de désorption : Température injecteur : 250 °C Désorption pendant 15 min Mode <i>splitless</i> (45 s)
Gaz vecteur :	Hélium N55 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	40 °C maintenu 5 min 5 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu 30 min
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : HP 5972 Energie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

Le **Tableau 18** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés aromatiques nous intéressant.

**Tableau 18.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des esters apolaires.

Composés	Abréviations	Ions (m/Z)
Propionate d'éthyle	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	<b>102/57/75</b>
Isobutyrate d'éthyle	iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>116/88/71</b>
Acétate de propyle	C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	<b>61/43</b>
Butyrate de méthyle	C <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87/71</b>
Acétate d'isobutyle	C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub>	<b>56/43</b>
Butyrate d'éthyle	C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/71/60</b>
2-méthylbutyrate d'éthyle	2mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>102/57/85</b>
Isovalérate d'éthyle	iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/85/57</b>
Acétate de butyle	C <sub>2</sub> C <sub>4</sub>	<b>56/43</b>
Acétate d'isoamyle	C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub>	<b>70/55/43</b>
Valérate d'éthyle	C <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	<b>85/88/101</b>
Hexanoate de méthyle	C <sub>6</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87/99</b>
Hexanoate d'éthyle	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/99/60</b>
Butyrate d'isoamyle	C <sub>4</sub> iC <sub>5</sub>	<b>71/70/55</b>
Acétate d'hexyle	C <sub>2</sub> C <sub>6</sub>	<b>56/43</b>
Heptanoate d'éthyle	C <sub>7</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
<i>Trans</i> -2-hexénoate d'éthyle	HexC <sub>2</sub>	<b>99/97/55</b>
Hexanoate d'isobutyle	C <sub>6</sub> iC <sub>4</sub>	<b>99/56/71</b>
Octanoate de méthyle	C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87/127</b>
Octanoate d'éthyle	C <sub>8</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101/127</b>
Hexanoate d'isoamyle	C <sub>6</sub> iC <sub>5</sub>	<b>99/70</b>
Acétate d'octyle	C <sub>2</sub> C <sub>8</sub>	<b>56/43</b>
Nonanoate d'éthyle	C <sub>9</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
Décanoate de méthyle	C <sub>10</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87</b>
Décanoate d'éthyle	C <sub>10</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
Octanoate d'isoamyle	C <sub>8</sub> iC <sub>5</sub>	<b>127/70</b>
<i>Trans</i> -géranoate de méthyle	gerC <sub>1</sub>	<b>114/69</b>
Phénylacétate d'éthyle	PhC <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	<b>91/105</b>
Acétate de 2-phényléthyle	C <sub>2</sub> PhC <sub>2</sub>	<b>104/91/43</b>
Dodécanoate d'éthyle	C <sub>12</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
Dihydrocinnamate d'éthyle	dhCinC <sub>2</sub>	<b>104/91/178</b>
Cinnamate d'éthyle	CinC <sub>2</sub>	<b>176/131</b>
Butyrate d'éthyle- <i>d</i> <sub>5</sub>	EI	<b>93/106</b>
Hexanoate d'éthyle- <i>d</i> <sub>5</sub>	EI	<b>106/93</b>
Octanoate d'éthyle- <i>d</i> <sub>5</sub>	EI	<b>106/93</b>
Cinnamate d'éthyle- <i>d</i> <sub>5</sub>	EI	<b>181/131</b>

## II.B. Description du plan expérimental

Pour étudier l'impact du couple levures/BL sur la modulation de l'arôme fruité, trois souches industrielles de levures *S. cerevisiae* et deux souches industrielles de BL *O. oeni* ont été utilisées au cours des différentes vinifications.

### II.B.1. Caractéristiques des souches de levures et de bactéries utilisées

#### - Les souches de levures sèches actives

La levure Actiflore *cerevisiae*® ou **522D** (Laffort, Floirac, France) est la première souche industrialisée sous forme de levure sèche active (LSA) et est utilisée dans une grande partie du vignoble bordelais. Elle est décrite comme étant une souche technique assurant des fermentations complètes et rapides, qui ne modifie pas les caractéristiques organoleptiques du vin ("neutralité" aromatique), ce qui en fait une souche témoin idéale.

La levure Zymaflore **FX10**® (Laffort, Floirac, France) a été obtenue par croisement. Cette technique de sélection consiste à croiser deux souches, sans avoir recours aux technologies OGM, puis à isoler dans leur descendance une souche fille hybride conjuguant les caractéristiques parentales recherchées. La souche **FX10** a été obtenue à partir de la souche F10 dans le but d'améliorer sa résistance aux températures élevées (Marullo *et al.*, 2009). Ses principales caractéristiques organoleptiques et aromatiques revendiquées sont une forte production de polysaccharides et une faible production d'arômes fermentaires.

Enfin, la levure Excellence **XR** (Lamothe-Abiet, Canéjan, France) obtenue par croisement a été sélectionnée pour ses capacités fermentaires et sa bonne production de polysaccharides et de glycérol. Elle est réputée pour donner des vins puissants et structurés.

#### - Les souches de bactéries lactiques

La bactérie Lactoenos **450** PreAc® (Laffort, Floirac, France) a été sélectionnée pour son activité malolactique élevée. Elle est caractérisée par une faible production d'acidité volatile, de diacétyl et de lactate d'éthyle et ne produit pas d'amines biogènes.

La souche Lactoenos **B28** PreAc® (Laffort, Floirac, France) est considérée comme particulièrement bien adaptée aux vins cumulant des conditions stressantes pour les bactéries (teneurs moyennes en acides gras C8 et C10, faibles concentrations en acide malique, fortes

teneurs en acide tartrique, IPT élevés, pH bas, TAV important) et permet un déclenchement rapide de l'activité malolactique dans des conditions difficiles.

### ***II.B.2. Méthodes d'analyses classiques et contrôles d'implantation***

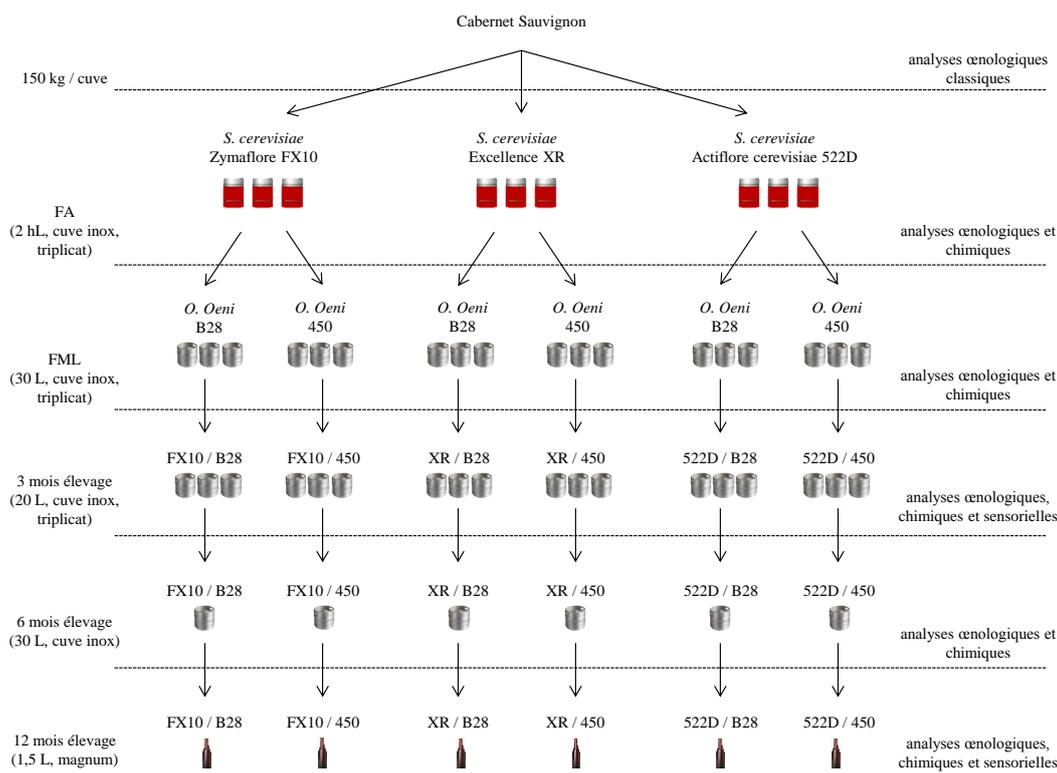
Les analyses œnologiques "classiques" du moût et du vin (détermination des sucres réducteurs, de l'azote assimilable, du SO<sub>2</sub> libre et total, de l'acide L-malique, de l'acidité totale, mesure du titre alcoométrique volumique (TAV) et du pH) ont été réalisées par le laboratoire Sarco (Laffort Œnologie, Floirac, France) selon les méthodes officielles ou celles recommandées (OIV).

Les contrôles d'implantation des levures ont été réalisés par PCR par le laboratoire Sarco. Les contrôles d'implantation des bactéries ont été effectués par le laboratoire Microflora® (ISVV, Univ. Bordeaux, France) grâce à la méthode développée par Claisse et Lonvaud-Funel (2012).

### ***II.B.3. Protocole de vinification***

Au cours du millésime 2011, un plan expérimental complet en micro-vinifications a été mis en place dans le chai d'application de la société Laffort (WEC) dans les Graves de Vayres. Toutes les combinaisons de couples levures/BL ont pu être testées en triplicat (**Figure 4**).

Des raisins de Cabernet Sauvignon ont été récoltés à la main, égrappés, foulés et répartis de façon homogène dans neuf cuves en acier inoxydable de 2 hL (150 kg de raisins dans chaque cuve). Un échantillon de chaque lot a été prélevé avant FA afin de déterminer la concentration en sucre, la teneur en azote, l'acidité totale et le pH. Pour s'approcher des effets d'une macération pré-fermentaire, une préparation enzymatique contenant des pectinases (6 700 PGNU/g) a été ajoutée aux moûts à 3g/100kg (Lafase® fruit, Laffort, Floirac, France). Après analyse, la concentration en azote assimilable des moûts a été corrigée à environ 210 mg/L.



**Figure 4.** Plan expérimental des micro-vinifications réalisées en 2011 au WEC.

La fermentation alcoolique a été réalisée à une température régulée entre 19-22 °C et initiée par inoculation de levures industrielles. Les LSA ont été réhydratées selon les recommandations du fabricant (ajout de nutriments Superstart/Dynastart®, Laffort, Floirac, France) et inoculées à 20 g/hL. Trois souches de levures ont été utilisées pour réaliser la FA : **FX10**, **522D** et **XR** et les expérimentations ont été conduites en triplicat. Des contrôles d'implantation ont été réalisés à mi-fermentation (densité  $\approx 1,04$ ) pour chaque cuve. A la fin de la FA (concentration en sucres réducteurs < 2 g/L) des analyses œnologiques classiques du vin ont été réalisées (détermination des sucres réducteurs, dosage de l'acide malique et du SO<sub>2</sub> libre et total, acidité totale, TAV, pH). Des prélèvements de chaque cuve ont été effectués dans des bouteilles de 0,75 L pour analyser les composés volatils. Les bouteilles ont été sulfitées à 5 g/hL et conservées une semaine à 10 °C. Après décantation, le vin a été aliquoté dans des flacons et conservé à -18 °C jusqu'à l'analyse.

Le vin de chaque cuve a ensuite été réparti dans deux fûts en acier inoxydable de 30 L et inoculé avec des BL préalablement réhydratées (ajout de nutriment Energizer®, Laffort, Floirac, France) selon les recommandations du fabricant. La FML a été réalisée en triplicat avec deux souches de BL : **B28** et **450**. Des prélèvements hebdomadaires ont été effectués

afin de suivre l'évolution de la FML par un dosage de l'acide L-malique. Des contrôles d'implantation ont été réalisés à mi-fermentation (diminution de 50 % de la concentration en acide malique) pour chaque fût. A la fin de la FML (concentration en acide L-malique < 0,1 g/L), des échantillons de vin ont été prélevés pour analyses œnologiques et chimiques (bouteilles de 0,75 L) et le vin de chaque fût a été sulfité par ajout de SO<sub>2</sub> à raison de 5 g/hL. Les échantillons prélevés ont été traités de la même façon que ceux réalisés après FA (sulfités à 5 g/hL, décantés à 10 °C, aliquotés et stockés à -18 °C).

Le vin a ensuite été transféré dans des fûts en acier inoxydable de volume plus faible (20 L) pour éviter qu'il soit en vidange et s'oxyde prématurément. Après 3 mois d'élevage en fûts, des prélèvements ont été effectués pour analyses œnologiques et chimiques comme décrit précédemment. Les vins ont ensuite été dégustés afin de vérifier l'absence de défaut puis assemblés par triplicat dans un fût unique en acier inoxydable de 30 L. Un prélèvement de chaque assemblage a été effectué (bouteille de 0,75 L) et des tests d'analyse sensorielle ont été réalisés dans les 2 jours.

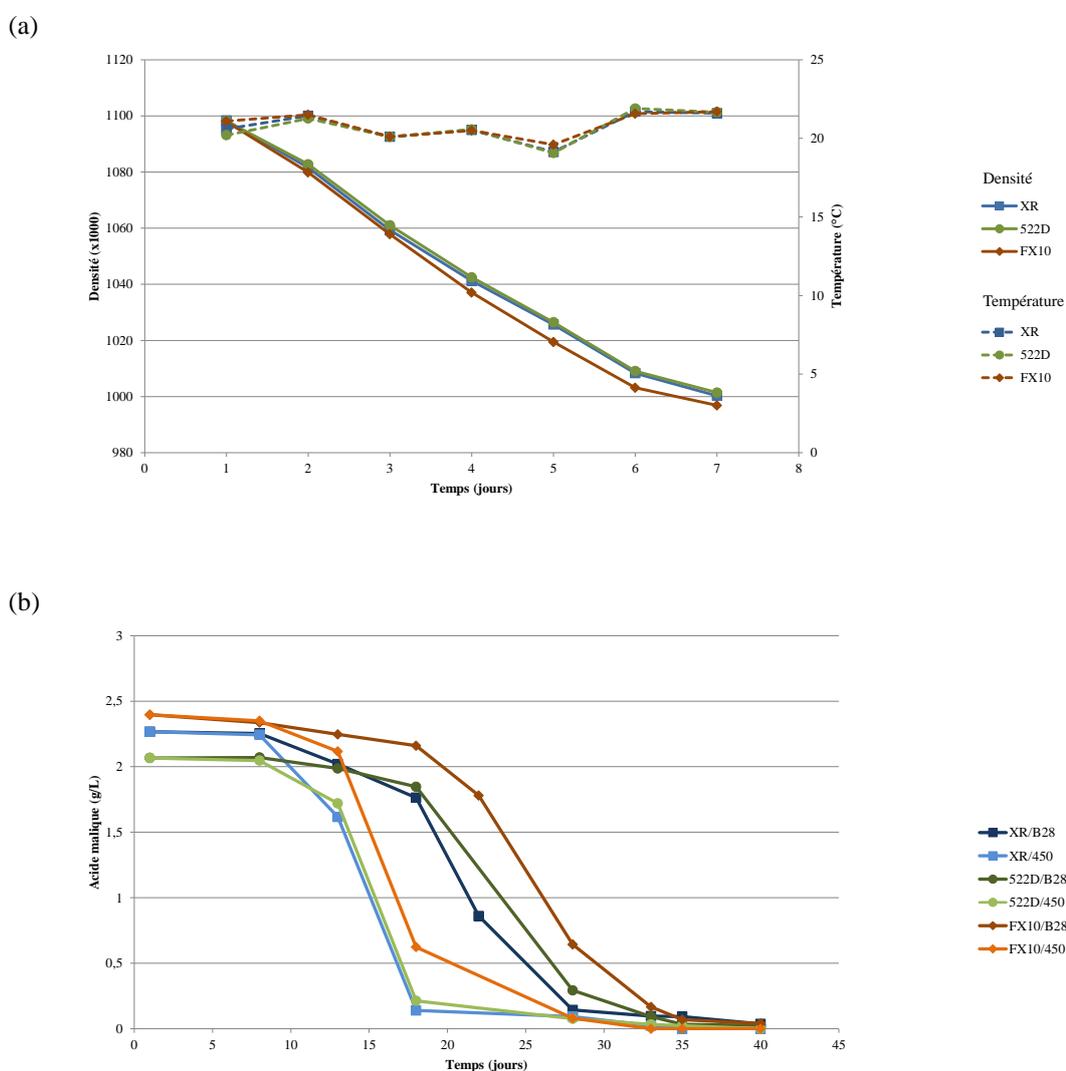
Après 3 mois d'élevage supplémentaires, soit 6 mois d'élevage au total, une partie du vin a été prélevée pour des analyses œnologiques et chimiques. Le reste a été conservé en magnum de 1,5 L à 10 °C pour 6 mois supplémentaires. La concentration en SO<sub>2</sub> libre a été ajustée si nécessaire à 30 mg/L. A la fin de ces 12 mois d'élevage, une partie du vin a été utilisée pour des analyses œnologiques et chimiques, l'autre pour des tests d'analyse sensorielle.

#### ***II.B.4. Cinétiques des fermentations et bilans œnologiques***

Les cinétiques des fermentations alcooliques et malolactiques sont présentées dans la **Figure 5** pour les six couples levures/BL utilisés. Etant donné qu'aucune différence de n'a été observée entre les triplicats de chaque modalité, nous avons choisi de ne présenter qu'une cinétique fermentaire par modalité. Toutes les levures ont achevé la FA en 170 heures et aucune différence significative n'a pu être observée entre les cuves au niveau des principaux paramètres œnologiques (**Tableau 19**). Les vins fermentés avec la souche **FX10** présentent néanmoins des acidités totales et volatiles légèrement plus élevées que dans les autres vins.

Au cours de la FML, l'acide malique a été entièrement dégradé (concentration < 0,1 g/L) par les deux souches de BL utilisées. On note cependant une différence significative de la cinétique fermentaire en fonction de la bactérie. La souche *O. oeni* **450** a terminé la FML

en 26 jours, quelle que soit la souche de levures ayant réalisée la FA. Au contraire, la souche *O. oeni* **B28** a eu besoin de plus de temps pour achever la FML : 31 jours pour **XR/B28** et **522D/B28** et 33 jours pour **FX10/B28**. Il est intéressant de noter que les différences de cinétique observées ne sont pas dues à des différences dans la vitesse de dégradation de l'acide L-malique mais plutôt à un temps de latence plus long chez la souche **B28** (environ 5 jours). Les vins fermentés avec la souche **B28** présentent une acidité volatile légèrement plus élevée que ceux fermentés avec la souche **450** (**Tableau 19**) ; ces écarts sont cependant faibles et ne devraient pas être à l'origine des différences significatives observées entre les vins.



**Figure 5.** Cinétiques des fermentations alcooliques (a) par la mesure de la densité et malolactiques (b) par le dosage de l'acide malique (exprimé en g/L) pour une cuve de chaque modalité des vins WEC 2011 inoculés avec différentes souches de levures et de BL.

**Tableau 19.** Principaux paramètres œnologiques du moût et des vins après les fermentations alcoolique et malolactique. Les données représentent la moyenne des triplicats pour chaque couple  $\pm$  l'écart type.

Souche levure	Souche BL	Sucres réducteurs (g/L)	Azote assimilable (mg N/L)	Degré alcoolique (% v/v)	pH	Acidité totale (g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Acidité volatile (g/L acide acétique)	SO <sub>2</sub> total (mg/L)	SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	Acide malique (g/L)
<b>Moût</b>										
XR	NA	222 $\pm$ 6	99,5 $\pm$ 0,7	NQ	3,50 $\pm$ 0,03	3,3 $\pm$ 0,2	NQ	55 $\pm$ 1	NQ	2,4 $\pm$ 0,0
522D	NA	218 $\pm$ 3	104,7 $\pm$ 6,7	NQ	3,48 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,0	NQ	52 $\pm$ 5	NQ	2,4 $\pm$ 0,1
FX10	NA	223 $\pm$ 4	94,3 $\pm$ 5,0	NQ	3,50 $\pm$ 0,09	3,4 $\pm$ 0,2	NQ	58 $\pm$ 3	NQ	2,2 $\pm$ 0,2
<b>Après fermentation alcoolique</b>										
XR	NA	1,1 $\pm$ 0,1	NQ	12,9 $\pm$ 0,3	3,53 $\pm$ 0,03	4,8 $\pm$ 0,0 b	0,07 $\pm$ 0,00 b	27 $\pm$ 2 b	4 $\pm$ 1	2,3 $\pm$ 0,1 ab
522D	NA	1,0 $\pm$ 0,2	NQ	12,8 $\pm$ 0,2	3,53 $\pm$ 0,01	4,8 $\pm$ 0,0 b	0,07 $\pm$ 0,00 b	29 $\pm$ 1 ab	4 $\pm$ 1	2,1 $\pm$ 0,1 b
FX10	NA	1,1 $\pm$ 0,1	NQ	13,1 $\pm$ 0,2	3,48 $\pm$ 0,01	5,0 $\pm$ 0,1 a	0,11 $\pm$ 0,01 a	31 $\pm$ 1 a	5 $\pm$ 1	2,4 $\pm$ 0,2 a
<b>Après fermentation malolactique</b>										
XR	B28	1,0 $\pm$ 0,1	NQ	13,2 $\pm$ 0,2	3,68 $\pm$ 0,03	3,4 $\pm$ 0,0 d	0,29 $\pm$ 0,02 a	41 $\pm$ 2	30 $\pm$ 4 a	0,01 $\pm$ 0,00
522D	B28	1,0 $\pm$ 0,2	NQ	13,2 $\pm$ 0,3	3,67 $\pm$ 0,01	3,4 $\pm$ 0,1 cd	0,23 $\pm$ 0,03 b	43 $\pm$ 6	28 $\pm$ 2 a	0,01 $\pm$ 0,00
FX10	B28	0,9 $\pm$ 0,1	NQ	13,2 $\pm$ 0,2	3,60 $\pm$ 0,02	3,6 $\pm$ 0,0 b	0,30 $\pm$ 0,02 a	42 $\pm$ 4	30 $\pm$ 2 a	0,01 $\pm$ 0,00
XR	450	1,1 $\pm$ 0,1	NQ	13,2 $\pm$ 0,1	3,64 $\pm$ 0,03	3,5 $\pm$ 0,1 bc	0,13 $\pm$ 0,02 c	33 $\pm$ 9	20 $\pm$ 5 b	0,01 $\pm$ 0,00
522D	450	1,0 $\pm$ 0,2	NQ	13,2 $\pm$ 0,2	3,64 $\pm$ 0,01	3,5 $\pm$ 0,0 c	0,09 $\pm$ 0,01 d	39 $\pm$ 13	25 $\pm$ 7 ab	0,01 $\pm$ 0,00
FX10	450	1,0 $\pm$ 0,1	NQ	13,1 $\pm$ 0,2	3,59 $\pm$ 0,02	3,7 $\pm$ 0,0 a	0,16 $\pm$ 0,01 c	29 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1 b	0,01 $\pm$ 0,00

NA : non applicable ; NQ : non quantifiable

Les valeurs avec différentes lettres (a-d) dans la même colonne sont significativement différentes selon le test *post hoc* de Duncan ( $P < 0,05$ )

## II.C. Résultats préliminaires : influence du couple levures/bactéries sur la concentration de soixante-quatorze marqueurs potentiels de l'arôme des vins rouges

Cette étude porte sur l'effet du couple levures/BL sur la concentration en composés volatils susceptibles d'avoir un impact sur l'arôme du vin. Afin d'établir un premier bilan analytique, 74 molécules ont été quantifiées sur des vins fermentés par les 6 couples levures/BL testés et ayant subi un élevage de 3 mois en fûts inox.

Les molécules quantifiées dans les différentes modalités décrites dans ce chapitre sont présentées dans les **Tableaux 20 et 21**. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne des concentrations mesurées pour chaque couple. Dans un premier temps, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été réalisée afin d'étudier le paramètre "couple". Les résultats obtenus montrent un effet significatif du couple sur la concentration de 62 composés volatils, principalement des alcools, des acides et des esters. Les composés d'origine variétale et les composés  $\alpha$ -dicarbonylés semblent moins affectés. Les concentrations en aldéhydes (glyoxal, méthylglyoxal) ainsi qu'en composés soufrés volatils (DMS, H<sub>2</sub>S) ne semblent pas être affectées par le couple de microorganismes.

Les alcools supérieurs constituent quantitativement le groupe le plus important des composés volatils. De manière générale, leur concentration est modulée par le couple levures/BL utilisé au cours des différentes vinifications (**Tableau 20**). La concentration totale en alcools supérieurs est fortement liée à celle du 3-méthylbutan-1-ol. Ce composé représente en effet plus de 60 % de la concentration totale en alcools supérieurs pour chaque modalité. Cependant, c'est le seul à ne pas être affecté de manière significative par le couple levures/BL. Les autres alcools, propan-1-ol, 2-méthylpropan-1-ol et 2-méthylbutan-1-ol présentent des concentrations significativement différentes (aux seuils de 0,1 %, 5 % et 0,1 % respectivement) en fonction du couple utilisé.

Parmi les onze composés d'origine variétale dosés, dont des C<sub>13</sub>-norisoprénoides, des lactones et un terpène, seuls quatre d'entre eux semblent affectés par le couple levures/BL (**Tableau 20**). Pour les C<sub>13</sub>-norisoprénoides, aucune différence significative entre les différentes modalités n'a pu être établie à l'exception de l' $\alpha$ -ionone (au seuil de 1 %). Les variations de concentration en  $\alpha$ -ionone d'une modalité à l'autre (de 0,22  $\mu$ g/L pour **XR/B28**

à 0,11 µg/L pour **FX10/450**) sont cependant très faibles. Les lactones sont principalement représentées par l' $\gamma$ -octalactone dont la concentration varie significativement (au seuil de 5 %) en fonction du couple levures/BL. La concentration des autres lactones semblent être peu affectée par les microorganismes.

**Tableau 20.** Concentrations moyennes  $\pm$  écart type (exprimées en mg/L) des composés volatils fermentaires dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage pour chaque couple levures/BL vinifié en triplicat. Les données ont été traitées par analyse de variance à un facteur (couple).

Composés	XR/B28	XR/450	522D/B28	552D/450	FX10/B28	FX10/450	Significativité
<b>Alcools</b>							
propan-1-ol	35 $\pm$ 5	37 $\pm$ 3	55 $\pm$ 5	55 $\pm$ 5	38 $\pm$ 2	40 $\pm$ 2	***
2-méthylpropan-1-ol	54 $\pm$ 2	56 $\pm$ 2	61 $\pm$ 3	62 $\pm$ 3	57 $\pm$ 1	58,4 $\pm$ 0,4	*
2-méthylbutan-1-ol	88 $\pm$ 5	90 $\pm$ 4	115 $\pm$ 4	114 $\pm$ 8	79 $\pm$ 1	80 $\pm$ 3	***
3-méthylbutan-1-ol	319 $\pm$ 17	330 $\pm$ 10	346 $\pm$ 13	341 $\pm$ 21	326 $\pm$ 8	334 $\pm$ 7	NS
<i>Somme des alcools sup.</i>	496	514	577	570	499	513	
butan-2,3-diol (D-)	127 $\pm$ 31	99 $\pm$ 16	140 $\pm$ 17	98 $\pm$ 16	189 $\pm$ 66	116 $\pm$ 9	*
butan-2,3-diol (Méso)	49 $\pm$ 17	56 $\pm$ 9	54 $\pm$ 8	52 $\pm$ 11	66 $\pm$ 21	52 $\pm$ 4	NS
<b>Aldéhydes et cétones</b>							
glyoxal	0,14 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,05	0,19 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03	NS
méthylglyoxal	0,40 $\pm$ 0,06	0,42 $\pm$ 0,07	0,46 $\pm$ 0,06	0,45 $\pm$ 0,06	0,55 $\pm$ 0,08	0,43 $\pm$ 0,03	NS
acétoine	19 $\pm$ 4	24 $\pm$ 3	24 $\pm$ 5	19 $\pm$ 2	30 $\pm$ 10	21 $\pm$ 2	NS
diacétyl	11 $\pm$ 1	7,4 $\pm$ 0,6	10 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	5,6 $\pm$ 0,5	***
pentan-2,3-dione	1,52 $\pm$ 0,1	1,68 $\pm$ 0,09	1,47 $\pm$ 0,01	1,9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,2	***
frambinone	15 $\pm$ 5	14 $\pm$ 3	14 $\pm$ 3	13 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	11,1 $\pm$ 0,7	NS
<b>Composés soufrés légers</b>							
sulfure d'hydrogène	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 0,2	NS
sulfure de diméthyle	3,7 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,5	3,6 $\pm$ 0,7	4,1 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,4	NS
<b>Acides</b>							
acide butyrique	7,5 $\pm$ 1,0	5,5 $\pm$ 0,5	6,7 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,2	***
acide isobutyrique	1,22 $\pm$ 0,09	1,2 $\pm$ 0,1	1,22 $\pm$ 0,03	1,22 $\pm$ 0,03	1,01 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,02	***
acide isovalérique	1,11 $\pm$ 0,07	1,10 $\pm$ 0,07	1,11 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,02	***
acide 2-méthylbutyrique	0,82 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,05	0,94 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,03	0,51 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,01	***
acide hexanoïque	7,8 $\pm$ 0,4	8,0 $\pm$ 0,4	8,7 $\pm$ 0,4	9,4 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 0,5	***
acide octanoïque	2,6 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,2	3,62 $\pm$ 0,05	***
acide décanoïque	0,70 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,09	0,72 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,07	*
acide dodécanoïque *	9 $\pm$ 3	6 $\pm$ 1	6,7 $\pm$ 0,8	11 $\pm$ 1	6,8 $\pm$ 0,7	12,1 $\pm$ 0,8	***
<b>C<sub>13</sub>-norisoprénoides, lactones &amp; terpène</b>							
$\beta$ -damascone *	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,01	NS
$\beta$ -damascénone *	6,6 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 0,9	6,1 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,5	NS
$\alpha$ -ionone *	0,22 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,02	**
$\beta$ -ionone *	0,09 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01	NS
$\gamma$ -octalactone *	16 $\pm$ 3	17 $\pm$ 3	23 $\pm$ 2	21 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3	18 $\pm$ 2	*
$\gamma$ -nonalactone *	7,7 $\pm$ 0,4	7,1 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 1,0	8 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	7,1 $\pm$ 0,5	NS
$\gamma$ -décalactone *	0,91 $\pm$ 0,01	0,8 $\pm$ 0,2	0,63 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,06	0,8 $\pm$ 0,3	0,70 $\pm$ 0,01	NS
$\delta$ -décalactone *	1,06 $\pm$ 0,04	1,3 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,5	1,57 $\pm$ 0,09	*
$\gamma$ -undécalactone *	0,07 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	NS
$\gamma$ -dodécalactone *	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	NS
linalol *	12 $\pm$ 2	9,7 $\pm$ 0,7	13 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2	7,98 $\pm$ 0,36	**

\* concentration exprimée en µg/L

Significativité : NS : Non Significatif ; \* P < 0,05 ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001

**Tableau 21.** Concentrations moyennes  $\pm$  écart type (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ ) des esters dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage pour chaque couple levures/BL vinifié en triplicat. Les données ont été traitées par analyse de variance à un facteur (couple).

Composés	XR/B28	XR/450	522D/B28	552D/450	FX10/B28	FX10/450	Significativité
<b>Esters d'acides fixes</b>							
lactate d'éthyle *	56 $\pm$ 5	31 $\pm$ 1	55 $\pm$ 2	31 $\pm$ 2	55 $\pm$ 1	38 $\pm$ 4	***
succinate de monoéthyle *	22 $\pm$ 1	20 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	20 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1	NS
succinate de diéthyle	683 $\pm$ 29	586 $\pm$ 38	793 $\pm$ 105	697 $\pm$ 115	621 $\pm$ 81	588 $\pm$ 50	*
<b>Esters polaires</b>							
leucate d'éthyle	70 $\pm$ 5	58,2 $\pm$ 0,3	94 $\pm$ 6	96 $\pm$ 13	85 $\pm$ 13	80 $\pm$ 16	**
3-hydroxybutyrate d'éthyle	333 $\pm$ 10	323 $\pm$ 12	384 $\pm$ 29	387 $\pm$ 18	454 $\pm$ 26	454 $\pm$ 21	***
2-hydroxyhexanoate d'éthyle	0,9 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,6	1,27 $\pm$ 0,04	1,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1	NS
6-hydroxyhexanoate d'éthyle	3,12 $\pm$ 0,06	3,4 $\pm$ 0,8	3,1 $\pm$ 0,7	4 $\pm$ 1	3,9 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,7	NS
<b>Esters éthyliques d'acides gras</b>							
propionate d'éthyle	306 $\pm$ 12	292 $\pm$ 8	425 $\pm$ 25	384 $\pm$ 58	281 $\pm$ 22	258 $\pm$ 16	***
butyrate d'éthyle	185 $\pm$ 17	179 $\pm$ 8	218 $\pm$ 22	218 $\pm$ 28	198 $\pm$ 9	194 $\pm$ 17	*
hexanoate d'éthyle	286 $\pm$ 11	294 $\pm$ 5	319 $\pm$ 13	320 $\pm$ 23	313 $\pm$ 18	324 $\pm$ 29	NS
octanoate d'éthyle	289 $\pm$ 20	282 $\pm$ 25	307 $\pm$ 27	302 $\pm$ 34	330 $\pm$ 21	334 $\pm$ 15	NS
décanoate d'éthyle	71 $\pm$ 6	94 $\pm$ 3	91 $\pm$ 10	103 $\pm$ 8	87 $\pm$ 6	115 $\pm$ 7	***
dodécanoate d'éthyle	4,81 $\pm$ 0,39	6,8 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,6	9,9 $\pm$ 0,9	8 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	***
<b>Esters éthyliques d'acides branchés</b>							
isobutyrate d'éthyle	62 $\pm$ 6	58 $\pm$ 6	63,5 $\pm$ 0,9	49 $\pm$ 15	61 $\pm$ 4	59 $\pm$ 6	NS
2-méthylbutyrate d'éthyle	11,7 $\pm$ 0,7	12 $\pm$ 1	13,7 $\pm$ 0,3	13,8 $\pm$ 0,8	7,4 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,3	***
isovalérate d'éthyle	18,4 $\pm$ 0,4	17 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	11,6 $\pm$ 0,4	11,7 $\pm$ 0,6	***
phénylacétate d'éthyle	3,22 $\pm$ 0,02	3,2 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,6	5,5 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,1	***
<b>Acétates d'alcools supérieurs</b>							
acétate d'éthyle *	90 $\pm$ 2	78 $\pm$ 3	72 $\pm$ 1	71 $\pm$ 4	88 $\pm$ 4	80 $\pm$ 3	***
acétate de propyle	17,1 $\pm$ 0,5	15,5 $\pm$ 0,5	23 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2	19,3 $\pm$ 0,3	***
acétate d'isobutyle	41 $\pm$ 1	37 $\pm$ 2	53 $\pm$ 4	51 $\pm$ 5	50 $\pm$ 2	51 $\pm$ 1	***
acétate de butyle	0,8 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2	1,26 $\pm$ 0,07	0,8 $\pm$ 0,2	**
acétate d'isoamyle	1105 $\pm$ 61	1064 $\pm$ 37	1484 $\pm$ 181	1339 $\pm$ 196	1367 $\pm$ 143	1317 $\pm$ 73	**
acétate d'hexyle	6 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1	9 $\pm$ 2	8,1 $\pm$ 0,9	8,7 $\pm$ 0,3	NS
acétate d'octyle	0,08 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,03	0,18 $\pm$ 0,01	***
acétate de 2-phényléthyle	87 $\pm$ 8	89 $\pm$ 3	144 $\pm$ 24	145 $\pm$ 17	117 $\pm$ 10	120 $\pm$ 9	***
<b>Esters méthyliques</b>							
butyrate de méthyle	0,86 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,02	1,22 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,08	1,0 $\pm$ 0,1	0,84 $\pm$ 0,04	***
hexanoate de méthyle	1,9 $\pm$ 0,1	1,71 $\pm$ 0,06	2,2 $\pm$ 0,2	2,16 $\pm$ 0,09	1,9 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,1	**
octanoate de méthyle	1,26 $\pm$ 0,02	1,34 $\pm$ 0,05	1,4 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,44 $\pm$ 0,09	1,5 $\pm$ 0,1	**
décanoate de méthyle	0,33 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01	***
<b>Esters éthyliques à nombre impair de carbone</b>							
valérate d'éthyle	0,67 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,04	1,0 $\pm$ 0,1	0,87 $\pm$ 0,03	0,84 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,2	***
heptanoate d'éthyle	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,92 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,03	***
nonanoate d'éthyle	0,61 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,08	1,07 $\pm$ 0,09	***
<b>Esters isoamyliques</b>							
butyrate d'isoamyle	0,66 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,02	0,8 $\pm$ 0,1	0,71 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,03	***
hexanoate d'isoamyle	1,9 $\pm$ 0,1	1,88 $\pm$ 0,06	2,0 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,1	2,18 $\pm$ 0,07	*
octanoate d'isoamyle	2,8 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,1	3,48 $\pm$ 0,07	**
<b>Cinnamates</b>							
cinnamate d'éthyle	2,55 $\pm$ 0,02	2,57 $\pm$ 0,05	2,4 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	2,56 $\pm$ 0,07	2,71 $\pm$ 0,06	**
dihydrocinnamate d'éthyle	1,7 $\pm$ 0,1	1,69 $\pm$ 0,05	1,5 $\pm$ 0,1	1,52 $\pm$ 0,06	1,51 $\pm$ 0,07	1,57 $\pm$ 0,05	**
<b>Esters mineurs</b>							
<i>trans</i> -2-hexénoate d'éthyle	1,8 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	1,41 $\pm$ 0,07	1,51 $\pm$ 0,09	1,30 $\pm$ 0,10	1,68 $\pm$ 0,09	***
hexanoate d'isobutyle	0,16 $\pm$ 0,00	0,17 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	***
<i>trans</i> -géranoate de méthyle	0,15 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,00	0,24 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,02	***

\* concentration exprimée en mg/L

Significativité : NS : Non significatif ; \* P &lt; 0,05 ; \*\* P &lt; 0,01 ; \*\*\* P &lt; 0,001

Huit acides volatils connus pour leur contribution dans l'équilibre de l'arôme fruité ont été dosés. La concentration des acides branchés (isobutyrique, isovalérique et 2-méthylbutyrique) est significativement modulée par le couple levures/BL ayant réalisé les fermentations (au seuil de 0,1 %). De même, celles des acides linéaires (butanoïque, hexanoïque, décanoïque et dodécanoïque) varient toutes en fonction du couple (au seuil de 0,1 % sauf pour l'acide décanoïque, significatif au seuil de 5 %).

Enfin, les esters sont considérés comme l'une des plus importantes familles de composés aromatiques capables de moduler l'arôme fruité des vins rouges (Ebeler, 2001). Sur les 40 esters dosés, seulement 8 ne semblent pas être affectés par le couple levures/BL. Plus de la moitié (22 esters) présentent des concentrations significativement différentes (au seuil de 0,1 %) en fonction du couple (**Tableau 21**).

L'effet "couple" étudié ici peut être en réalité le résultat de trois paramètres. Les différences de concentration observées entre les modalités peuvent effectivement être dues à un effet du couple, résultant de l'interaction spécifique entre une souche de levures et une souche de BL. Mais il se pourrait également que l'effet observé soit principalement dû à l'influence de la souche de levures, ou de la souche de bactéries.

Afin d'affiner nos observations, une analyse en composante principale (ACP) des données a été réalisée à partir des concentrations des 62 molécules mises en évidence par l'ANOVA, pour chaque triplicat (**Figure 6**). Les projections des triplicats de chaque couple sont représentées proches les uns des autres sur les plans F1 x F2 mais également F1 x F3, indiquant une bonne répétabilité de l'expérimentation. L'ACP montre bien que c'est la souche de levures qui semble avoir le plus d'importance dans la modulation des concentrations en ces composés volatils et non pas le couple à proprement parler. En effet, la projection des différentes modalités sur le plan F1 x F2, montrant 65,8 % de la variance totale, sépare les vins en fonction de la souche de levures (**Figures 6 a et b**). Un impact de la souche de bactéries sur la concentration en certains composés, principalement le lactate d'éthyle, le diacétyle, la pentan-2,3-dione, et le butan-2,3-diol est également observé sur le plan F1 x F3 (représentant 46,5 % de la variance totale) (**Figures 6 c et d**). En revanche, aucun effet couple n'a pu être mis en évidence.





Ces observations se confirment grâce à une ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / interaction levures x bactéries) (**Tableaux 22 et 23**). Sur les soixante-quatorze molécules quantifiées, seules neuf semblent être réellement affectées par le couple levures/BL alors qu'un effet "levures" est observé pour cinquante-quatre de ces composés aromatiques.

La concentration en alcools supérieurs ne semble être modulée que par la souche de levures (**Tableau 22**). Les vins fermentés par la souche **522D** contiennent significativement plus de 2-méthylpropan-1-ol, propan-1-ol et de 2-méthylbutan-1-ol que ceux vinifiés avec les levures **FX10** ou **XR** (aux seuils de 1 % et 0,1 % respectivement).

Les levures influencent également la concentration en composés d'origine variétale de manière très spécifique (**Tableau 22**). Ainsi, les vins inoculés avec la souche **522D** présentent des teneurs en  $\gamma$ -octalactone plus élevées que ceux inoculés avec **FX10** ou **XR** (au seuil de 1 %). Les levures **XR** ont synthétisé significativement plus de  $\gamma$ -déalactone (au seuil de 5 %) tandis que les levures **FX10** ont produit plus de  $\delta$ -déalactone (significatif au seuil de 1 %). Seule la concentration de l' $\alpha$ -ionone semble être modulée par le couple. En effet, le vin fermenté avec la modalité **XR/B28** en contient significativement plus que les autres vins (au seuil de 5 %).

Le diacétyle et son produit de réduction le butan-2,3-diol sont, comme on pouvait s'y attendre, affectés par la souche de BL réalisant la FML (**Tableau 22**). Ces deux composés sont majoritairement retrouvés dans les vins inoculés avec la souche de BL **B28** (aux seuils de 0,1 % et 1 % respectivement).

La concentration en acides volatils est également modulée par les microorganismes fermentaires (**Tableau 22**). La souche de levures influence significativement (au seuil de 0,1 %) la concentration en acides branchés dosés dans les vins. Tous présentent des valeurs plus élevées en acides isobutyrique, isovalérique et 2-méthylbutyrique lorsqu'ils ont été fermentés par les souches **522D** ou **XR**. Les esters linéaires, également influencés par la souche de levures (significatif au seuil de 0,1 %), sont présents majoritairement dans les vins inoculés avec **522D** ou **FX10**, à l'exception de l'acide butyrique. La souche de bactéries module également la concentration de ces acides, et les vins fermentés par la souche **450** présentent des valeurs en acides hexanoïque, octanoïque, décanoïque et dodécanoïque significativement plus élevées (au seuil de 1 %).

**Tableau 22.** Niveau de significativité de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) pour les composés volatils dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage.

Composés	Significativité		
	levures	bactéries	levures x bactéries
<i>Alcools</i>			
propan-1-ol	***	NS	NS
2-méthylpropan-1-ol	**	NS	NS
2-méthylbutan-1-ol	***	NS	NS
3-méthylbutan-1-ol	NS	NS	NS
butan-2,3-diol (D)	NS	**	NS
butan-2,3-diol (M)	NS	NS	NS
<i>Aldéhydes et cétones</i>			
glyoxal	*	NS	NS
méthylglyoxal	NS	NS	NS
acétoine	NS	NS	NS
diacétyle	NS	***	NS
pentan-2,3-dione	***	***	NS
frambinone	NS	NS	NS
<i>Composés soufrés légers</i>			
sulfure d'hydrogène	NS	NS	NS
sulfure de diméthyle	NS	NS	NS
<i>Acides</i>			
acide butyrique	***	***	NS
acide isobutyrique	***	NS	NS
acide isovalérique	***	NS	NS
acide 2-méthylbutyrique	***	NS	NS
acide hexanoïque	***	**	NS
acide octanoïque	***	***	NS
acide décanoïque	*	**	NS
acide dodécanoïque	*	**	***
<i>C<sub>13</sub>-norisoprénoides, lactones &amp; terpène</i>			
β-damascone	NS	NS	NS
β-damascénone	NS	NS	NS
α-ionone	*	***	*
β-ionone	NS	NS	NS
γ-octalactone	**	NS	NS
γ-nonalactone	NS	NS	NS
γ-décylactone	*	NS	NS
δ-décylactone	**	NS	NS
γ-undécylactone	NS	NS	NS
γ-dodécylactone	NS	NS	NS
linalol	**	NS	NS

Significativité : NS : Non Significatif ; \* P &lt; 0,05 ; \*\* P &lt; 0,01 ; \*\*\* P &lt; 0,001

**Tableau 23.** Niveau de significativité de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) pour les esters dosés dans les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage.

Composés	Significativité		
	levures	bactéries	levures x bactéries
<b><i>Esters d'acides fixes</i></b>			
lactate d'éthyle	NS	***	NS
succinate de monoéthyle	NS	NS	NS
succinate de diéthyle	*	NS	NS
<b><i>Esters polaires</i></b>			
leucate d'éthyle	**	NS	NS
3-hydroxybutyrate d'éthyle	***	NS	NS
2-hydroxyhexanoate d'éthyle	NS	NS	NS
6-hydroxyhexanoate d'éthyle	NS	NS	NS
<b><i>Esters éthyliques d'acides gras</i></b>			
propionate d'éthyle	***	*	NS
butyrate d'éthyle	**	NS	NS
hexanoate d'éthyle	*	NS	NS
octanoate d'éthyle	**	NS	NS
décanoate d'éthyle	**	***	NS
dodécanoate d'éthyle	***	***	*
<b><i>Esters éthyliques d'acides branchés</i></b>			
isobutyrate d'éthyle	NS	NS	NS
2-méthylbutyrate d'éthyle	***	NS	NS
isovalérate d'éthyle	***	NS	NS
phénylacétate d'éthyle	***	NS	NS
<b><i>Acétates d'alcools supérieurs</i></b>			
acétate d'éthyle	***	***	**
acétate de propyle	***	**	NS
acétate d'isobutyle	***	NS	NS
acétate de butyle	*	NS	**
acétate d'isoamyle	**	NS	NS
acétate d'hexyle	NS	*	NS
acétate d'octyle	***	**	NS
acétate de 2-phényléthyle	***	NS	NS
<b><i>Esters méthyliques</i></b>			
butyrate de méthyle	***	**	NS
hexanoate de méthyle	***	NS	NS
octanoate de méthyle	**	*	NS
décanoate de méthyle	***	***	NS
<b><i>Esters éthyliques à nombre impair de carbone</i></b>			
valérate d'éthyle	***	NS	NS
heptanoate d'éthyle	***	NS	NS
nonanoate d'éthyle	***	**	*
<b><i>Esters isoamyliques</i></b>			
butyrate d'isoamyle	***	NS	**
hexanoate d'isoamyle	**	NS	NS
octanoate d'isoamyle	**	NS	NS
<b><i>Cinnamates</i></b>			
cinnamate d'éthyle	**	NS	NS
dihydrocinnamate d'éthyle	***	NS	NS
<b><i>Esters mineurs</i></b>			
trans-2-hexénoate d'éthyle	**	*	**
hexanoate d'isobutyle	***	NS	NS
trans-géranate de méthyle	***	***	NS

Significativité : NS : Non significatif ; \* P &lt; 0,05 ; \*\* P &lt; 0,01 ; \*\*\* P &lt; 0,001

Enfin, les teneurs en esters sont, elles aussi, largement influencées par la souche de levures ayant réalisé la FA. Trente-quatre d'entre eux présentent des concentrations significativement différentes (au seuil de 5 % minimum) en fonction de la souche de levures, alors qu'un effet "bactéries" n'est observé que pour quatorze esters. L'effet d'interaction "levures x bactéries" ne concerne que six de ces esters (**Tableau 23**).

La concentration en lactate d'éthyle, principalement synthétisé au cours de la FML, est fortement modulée par la souche de BL : les vins inoculés avec la souche **B28** présentent des concentrations plus élevées (significatif au seuil de 0,1 %). Les autres esters dont la concentration semble être influencée par la souche de bactéries sont principalement des esters à longue chaîne de carbone : *trans*-2-hexénoate, nonanoate, décanoate et dodécanoate d'éthyle, *trans*-géranate, octanoate et décanoate de méthyle et acétates d'hexyle et d'octyle. Tous présentent des teneurs significativement plus élevées dans les vins fermentés par la bactérie **450**. En revanche, les modalités inoculées avec la souche **B28** ont des concentrations en esters à courte chaîne de carbone (propionate d'éthyle, acétate de propyle et butyrate de méthyle) significativement plus élevées.

L'impact de la souche de levures sur la concentration en esters est variable d'un composé à l'autre. Cependant, il semble être homogène au sein d'une famille d'esters donnée. Par exemple, les vins fermentés par les souches **522D** et **FX10** contiennent des niveaux plus élevés en esters éthyliques et méthyliques et en acétates que ceux fermentés par la levure **XR**. Les esters éthyliques branchés semblent avoir été synthétisés en plus grande quantité par la levure **522D** (significatif au seuil de 0,1 %) tandis que les esters isoamyliques, les cinnamates et les esters mineurs sont présents en plus grande quantité dans les vins fermentés par la levure **FX10** ou **XR**.

## II.D. Discussion

Cette première expérimentation a permis d'étudier l'effet de plusieurs souches de *S. cerevisiae* et *O. oeni* sur la production de divers composés aromatiques pouvant avoir un impact sur l'arôme fruité des vins rouges. Les résultats obtenus montrent que chaque modalité présente un profil en composés volatils unique, susceptible de conférer au vin des propriétés organoleptiques différentes selon le couple levures/BL utilisé. Cependant, la souche de levures semble être le paramètre dominant du couple, en affectant de façon plus marquée la concentration de la quasi-totalité des molécules dosées.

En effet, la concentration en alcools supérieurs, lactones, acides volatils et esters est fortement influencée par la souche de levures ayant réalisé la FA. Ces résultats ne sont guère surprenant et en accord avec les nombreuses études réalisées sur le sujet (Rankine, 1967 ; Mateo *et al.*, 1991 ; Segurel *et al.*, 2009 ; Delfini et Cervetti, 1991 ; Saerens *et al.*, 2006). Evidemment, il s'agit là d'une liste non exhaustive de molécules. D'autres composés aromatiques tels que les thiols, dont l'impact organoleptique sur l'arôme du vin a déjà été plusieurs fois démontré (Darriet *et al.*, 1995 ; Rigou *et al.*, 2014) pourront compléter cette liste.

Outre le diacétyl, que les BL synthétisent plus fortement au cours de la FML, ces dernières semblent également capables de moduler la concentration en esters et acides correspondant. La longueur de la chaîne carbonée semble jouer un rôle important dans la modulation de la synthèse de ces composés par les microorganismes. En effet, les esters et acides les plus affectés par la souche de BL sont ceux ayant une chaîne carbonée plus longue (C6, C8, C10, C12). Ces résultats sont en contradiction avec certaines données de la littérature. Matthews *et al.* (2007) ont en effet montré que l'activité hydrolytique des estérases de souches appartenant à différentes espèces ou genres (*O. oeni*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*) avait une plus grande spécificité pour les substrats à courte chaîne carbonée (C2, C4). Ils ont notamment mis en évidence que l'activité estérase d'*O. oeni* était plus importante pour les substrats en C4. En revanche, d'autres études ont montré la capacité des BL à synthétiser des esters éthyliques et des acétates à longue chaîne de carbone (C8, C10, C12) (Antalick *et al.*, 2012). L'impact de la FML sur les esters éthyliques d'acides gras à chaîne carbonée plus courte paraît quant à lui moins marqué. Cependant, l'influence de la souche de BL sur les teneurs en esters semble également très dépendante de la matrice. Des études ont en effet observé que, suivant le vin, la concentration en ester pouvait augmenter ou diminuer après FML (Antalick, 2010). Ces résultats devront donc être confirmés par le dosage de ces composés dans plusieurs matrices. De plus, le dosage de ces différents esters après 3 mois d'élevage ne permet pas de préciser le rôle des bactéries dans la modulation de leur teneur.

Afin d'approfondir ces aspects et, plus généralement, de préciser l'effet des microorganismes sur la synthèse ou l'hydrolyse des esters, leur dosage a été réalisé à différentes étapes de l'élaboration des vins dans quatre matrices différentes.

## Chapitre 2 : Prédominance de la souche de levures sur la concentration des esters au cours de la vinification et de l'élevage

Les esters représentent la première source de molécules aromatiques modulant l'arôme fruité du vin. Leur concentration est notamment influencée par les souches de levures et de BL.

Dans un premier temps, une étude bibliographique décrira l'évolution de la concentration en esters au cours de l'élaboration des vins, de la FA à la mise en bouteille. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus dans le cadre d'une étude que nous avons réalisée grâce à quatre expérimentations mises en place dans différentes régions du bordelais. Cette étude vise à évaluer l'effet des levures et des BL sur la concentration en esters dans plusieurs matrices et à différents stades de l'élaboration des vins. En outre, la réalisation de micro-vinifications permettra de préciser au laboratoire l'influence réelle des BL sur leur concentration.

### **I. Evolution de la concentration en esters au cours de la vinification et de l'élevage : état de l'art**

#### **I.A. Synthèse des esters au cours de la fermentation alcoolique**

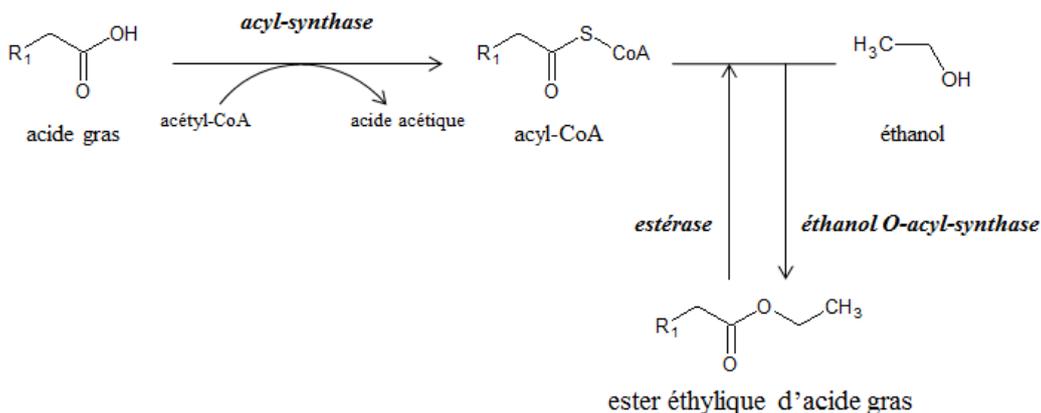
Depuis la découverte de leur synthèse chez la levure par Nordström en 1962, les esters ont donné lieu à de nombreuses études. Les différentes voies biochimiques impliquées dans leur synthèse, les gènes permettant de réguler cette synthèse, et les facteurs influençant leur niveau de régulation ont ainsi été mis en évidence.

Au cours de la FA, les esters sont synthétisés par des enzymes intracellulaires de la levure. Leurs propriétés liposolubles leur permettent ensuite de traverser la membrane plasmique pour rejoindre le milieu extracellulaire. La vitesse de diffusion des esters dépend de leur composition. Ainsi, les acétates d'alcools supérieurs diffusent au travers de la membrane beaucoup plus rapidement que les esters éthyliques d'acides gras, dont le transfert dépend de la longueur de la chaîne carbonée (Saerens *et al.*, 2010). A ce jour, cinq enzymes

ont été isolées chez l'espèce *S. cerevisiae* et caractérisées comme ayant une activité synthase et/ou hydrolase.

### ***I.A.1. Les esters éthyliques d'acides gras***

Ces esters sont synthétisés à partir d'acides "gras" présents dans le moût (extraits des pellicules de raisin) ou issus du métabolisme levurien (Saerens *et al.*, 2008) (**Figure 7**). Ces derniers sont toxiques pour la levure et leur utilisation dans la synthèse d'esters correspondants pourrait permettre la détoxification du milieu. Leur estérification pourrait également permettre de régénérer du coenzyme-A (CoA) nécessaire au métabolisme de la levure (Mason et Dufour, 2000 ; Saerens *et al.*, 2010).



**Figure 7.** Voie de biosynthèse des esters éthyliques d'acides gras chez *S. cerevisiae*.

A ce jour, deux gènes ont été identifiés comme étant responsables de la synthèse d'esters éthyliques. Mason et Dufour (2000) avaient suggéré l'action d'Eht1, une éthanol hexanol transférase, sur la synthèse d'esters ; son implication, ainsi que celle d'Eeb1, une éthanol acyltransférase, a par la suite été confirmée (Saerens *et al.*, 2006).

La délétion du gène *EEB1* chez une levure *Saccharomyces* entraîne une diminution de plus de 50 % de la synthèse de butanoate, octanoate et décanoate d'éthyle tandis qu'une délétion du gène *EHT1* ne provoque qu'une diminution de l'ordre de 20 à 30 % de la synthèse d'hexanoate et octanoate d'éthyle. Les souches de levures dont les gènes *EHT1* et *EEB1* ont

été supprimés restent néanmoins capables de synthétiser les principaux esters éthyliques à hauteur de 50 % par rapport à la souche sauvage (Saerens *et al.*, 2006). Ces résultats montrent que le gène *EHT1* joue un rôle mineur dans la synthèse des esters et que d'autres gènes sont probablement impliqués. Le rôle d'un troisième gène, *YMR210w*, a été évoqué mais sa fonction précise dans la synthèse des esters éthyliques d'acides gras n'a pour le moment pas été déterminée (Saerens *et al.*, 2010).

La surexpression des gènes *EHT1* et *EEB1* chez la levure n'entraîne pas d'augmentation significative de la synthèse d'esters. Le niveau d'expression de ces gènes ne semble donc pas être un facteur limitant dans la formation de ces composés (Saerens *et al.*, 2006). Ces résultats pourraient cependant être biaisés par la double fonction synthase / hydrolase de l'enzyme Eeb1 et ne pas réellement refléter l'impact du niveau d'expression des gènes sur la synthèse d'esters (Sumbly *et al.*, 2010).

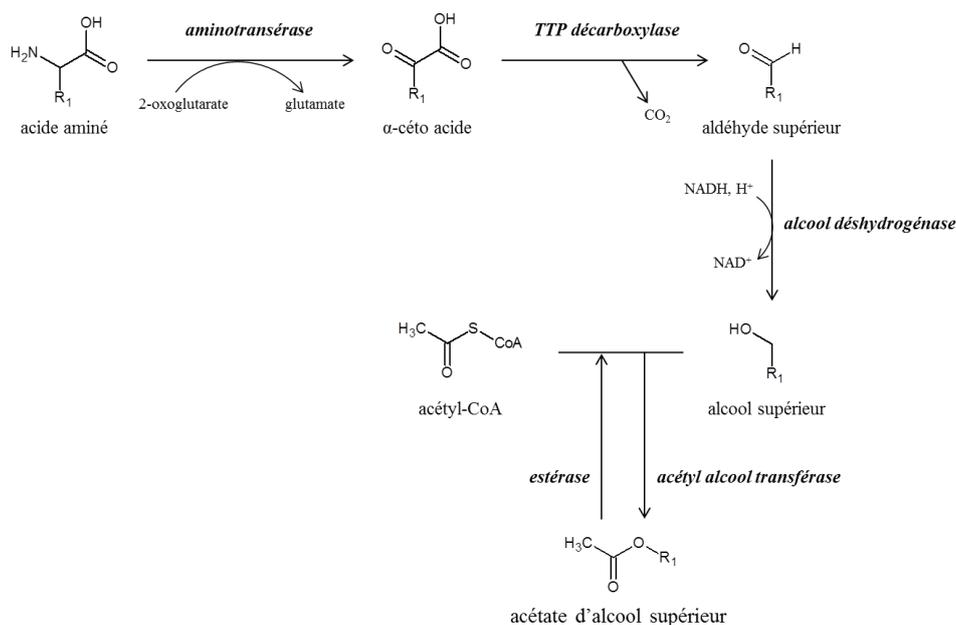
La formation d'EEAG pendant la FA semble principalement régulée par la disponibilité en précurseurs. Plusieurs études ont en effet montré que l'ajout d'acides gras entraînait l'augmentation de la synthèse en esters correspondant (Saerens *et al.*, 2006 ; Lilly *et al.*, 2006). D'autres paramètres tels que la température de fermentation, la composition nutritive du milieu (éléments azotés, particules solides du moût) ou le niveau d'oxygène peuvent également influencer sur la synthèse levurienne des esters (Sumbly *et al.*, 2010).

### ***I.A.2. Les acétates d'alcools supérieurs***

Ces esters sont synthétisés à partir de l'acide acétique et de l'alcool supérieur correspondant (**Figure 8**). Les alcools sont eux-mêmes formés à partir d'aldéhydes supérieurs issus du moût ou du métabolisme des acides aminés. La synthèse des acétates pourrait permettre une détoxification du milieu par les levures, notamment en stérols (Tiwari *et al.*, 2007) ainsi que la régénération de coenzyme-A (Saerens *et al.*, 2010). Mason et Dufour (2000) ont également suggéré que certains esters hydroxylés à longue chaîne de carbone pourraient être utilisés par la levure à la place d'acides gras insaturés pour maintenir la fluidité membranaire.

La synthèse de ces esters est régulée par les gènes *AFT1* et *AFT2* codant pour des alcool-acétyltransférases I et II (Malcorps et Dufour, 1992 ; Fujii *et al.*, 1994 ; Nagasawa *et al.*, 1998 ; Yoshimoto *et al.*, 1998). Des essais ont montré que des vins fermentés avec une

levure dont les gènes *ATF1* et *ATF2* avaient été surexprimés contiennent plus d'acétates que ceux fermentés avec une levure sauvage. Ils sont également décrits comme étant "fruité", "floral" avec des notes "solvant/chimique". Les vins présentant les odeurs "fermentaires" les plus marquées ont été obtenus à partir de levures dont seul le gène *ATF1* a été surexprimé (Lilly *et al.*, 2000; Lilly *et al.*, 2006). Ces résultats montrent que l'enzyme *Atf2* n'a qu'un rôle partiel dans la synthèse des acétates.



**Figure 8.** Voie de biosynthèse des acétates d'alcools supérieurs chez *S. cerevisiae*.

La double délétion des gènes *AFT1* et *AFT2* chez *Saccharomyces* entraîne une absence complète de synthèse d'acétate d'isoamyle et une diminution d'environ 50 % dans la synthèse des autres acétates, indiquant l'existence d'autres enzymes. Au contraire, la surexpression de ces gènes entraîne une production de chaque ester différente en fonction de la souche. Les différences de profils aromatiques observées dans des vins fermentés par plusieurs souches pourraient en partie être dues à des mutations spécifiques des gènes *AFT* (Lilly *et al.*, 2000 ; Verstrepen *et al.*, 2003).

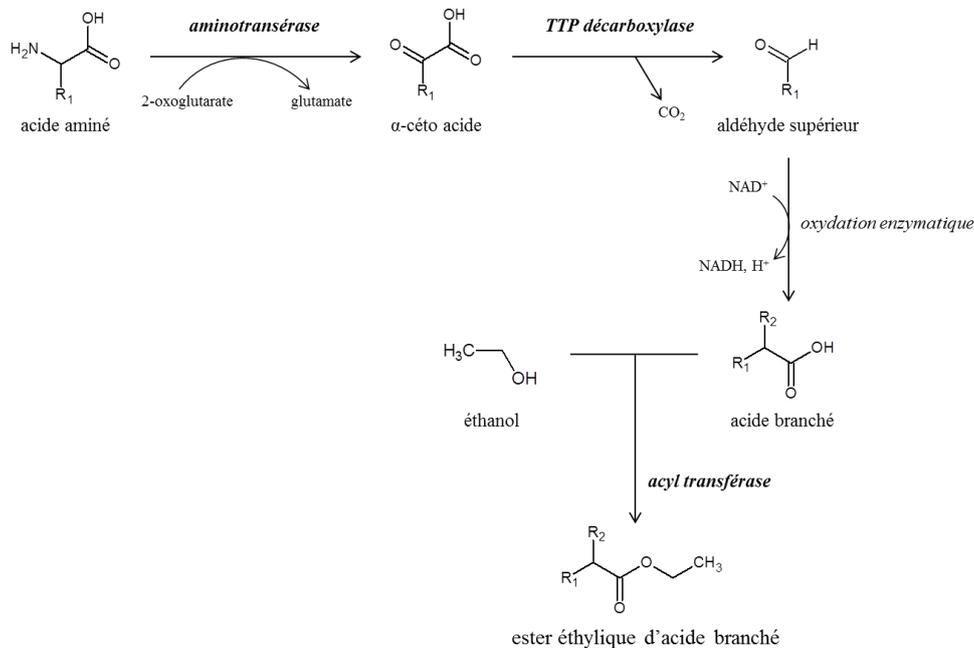
Comme pour les EEAG, la synthèse des acétates est régulée par les paramètres œnologiques : composition nutritive du milieu (Yoshimoto *et al.*, 2002 ; Verstrepen *et al.*, 2003), température de fermentation (Lilly *et al.*, 2000) et disponibilité en substrats (acide

acétique et alcools) bien que ce dernier facteur soit moins important que pour les EEAG. Des études ont par exemple démontré qu'*ATF1* était inhibé par l'oxygène ou la présence d'acides gras insaturés (Fujii *et al.*, 1997 ; Fujiwara *et al.*, 1998 ; Fujiwara *et al.*, 1999). Le niveau d'expression des gènes *ATF* est cependant la principale source de régulation de la synthèse des acétates (Fujii *et al.*, 1994 ; Fujii *et al.*, 1996 ; Nagasawa *et al.*, 1998 ; Verstrepen *et al.*, 2003). Le facteur limitant est donc ici génétique et la formation de ces esters est intimement liée à la souche de levures réalisant la FA (Lilly *et al.*, 2000).

### I.A.3. Les esters éthyliques branchés

Les esters branchés sont synthétisés à partir d'éthanol et de l'acide gras branché correspondant. Le phénylacétate d'éthyle, ester de l'acide phénylacétique, n'est pas à proprement parler un ester d'acide gras branché, mais son origine dans le vin est la même.

La synthèse d'acides gras branchés et de l'acide phénylacétique par les levures au cours de la FA a été très peu étudiée. Néanmoins, ils semblent suivre la même voie de formation que les alcools supérieurs (voie d'Ehrlich) (**Figure 9**).



**Figure 9.** Voie de biosynthèse des esters éthyliques d'acides branchés chez *S. cerevisiae*.

Les gènes impliqués ainsi que les niveaux de régulation n'ont à ce jour pas été étudiés. Comme les autres esters, la synthèse des EEAB pourrait dépendre des conditions œnologiques (composition nutritive du milieu, température de fermentation...) ou du cépage (Ferreira *et al.*, 2000).

#### ***I.A.4. Les esters hydroxylés et esters mineurs***

Les voies de synthèse des esters hydroxylés et des esters mineurs chez la levure n'ont pratiquement pas été étudiées. De même, peu d'information sont disponibles sur la libération d'esters variétaux au cours de la FA.

Les cinnamates, dont l'origine variétale a été confirmée par Loscos *et al.* (2007), pourraient dériver de l'acide shikimique *via* des acides aminés comme la phénylalanine ou la tyrosine (Tesnières *et al.*, 1991). Ugliano et Moio (2008) proposent la formation de ces composés à partir des réactions acides catalysées au cours de la FA. Des techniques de vinification comme la macération carbonique pourraient également permettre d'augmenter leur synthèse grâce à la libération de précurseurs (Flanzy *et al.*, 1981).

Les esters hydroxylés pourraient quant à eux suivre la même voie que les esters branchés (voie d'Ehrlich). Le 4-hydroxybutyrate d'éthyle semble par exemple provenir de l'estérification de l'acide  $\gamma$ -hydroxybutyrique issu du catabolisme de l'acide glutamique (Ugliano et Moio, 2005).

Peu d'informations sont disponibles sur l'origine des esters dit mineurs tels que les esters méthyliques, esters isoamyliques, esters d'acides à nombre impair de carbone. Pour la plupart de ces composés, leur impact sur l'arôme fruité n'a pas encore été étudié.

### **I.B. Modulation de la teneur en esters par les bactéries lactiques au cours de la fermentation malolactique et leur impact potentiel au cours de l'élevage**

La synthèse ou l'hydrolyse des esters par les BL au cours de la FML ont été peu étudiées, sinon par le biais de comparaisons des teneurs rencontrées dans le vin. Les voies métaboliques impliquées sont peu connues ; en revanche les activités enzymatiques liées aux

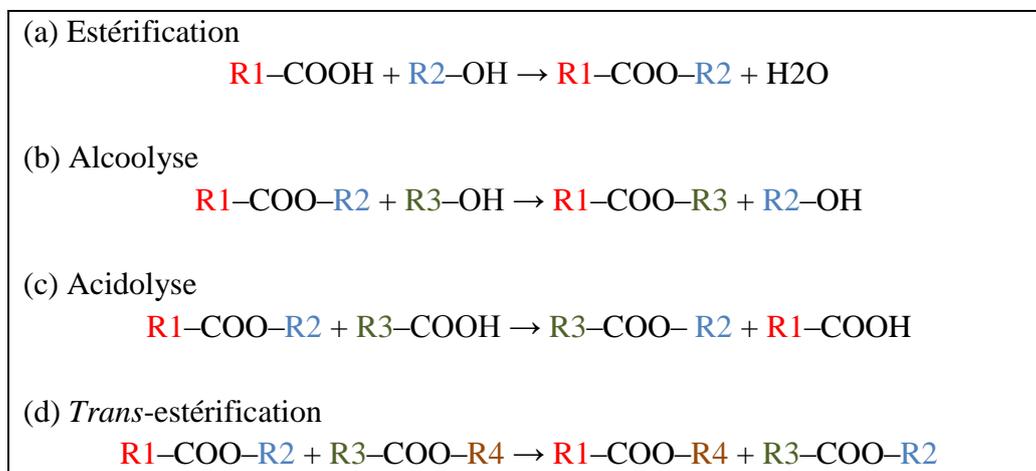
esters sont particulièrement bien documentées chez les BL utilisées dans l'industrie fromagère.

### ***1.B.1. Synthèse et hydrolyse des esters par les bactéries lactiques au cours de la fermentation malolactique***

Dès la fin des années 60, des études ont mis en évidence la capacité de souches de BL (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) à augmenter la teneur en certains esters dans le vin au cours de la FML (Pilone *et al.*, 1966 ; Meunier et Bott, 1979). Le criblage de l'activité enzymatique de plusieurs souches de BL du vin révèle que certaines d'entre elles sont également capables d'hydrolyser les esters (Davis *et al.*, 1988). De nombreuses études sur la modulation de l'arôme du vin ont depuis montré que la teneur en esters pouvait augmenter ou diminuer après la FML (Zeeman *et al.*, 1980 ; de Revel *et al.*, 1999 ; Delaquis *et al.*, 2000 ; Ugliano et Moio, 2005 ; Antalick *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que les estérases des BL du vin, comme celles des BL de l'industrie fromagère, sont capables de synthétiser et/ou d'hydrolyser ces composés. Cette hypothèse a récemment été validée par Sumbly *et al.* (2013a) qui ont mis en évidence le rôle de synthèse et d'hydrolyse de deux enzymes EstA2 et EstB28 liées au métabolisme des esters chez *O. oeni*.

Deux voies de synthèse des esters par les BL sont actuellement envisagées : par estérification d'un acide avec un alcool ou par réaction d'un ester avec un alcool (alcoolyse). Les deux autres voies connues, l'acidolyse et la *trans*-estérification sont peu probables car elles n'ont à ce jour jamais été observées chez les BL (Abeijón Mukdsi *et al.*, 2009) (**Figure 10**). La synthèse d'esters en milieu aqueux par les bactéries des produits laitiers semble principalement due à des réactions de transférases (alcoolyse) dans lesquelles le groupement acyl gras d'un glycéride est directement transféré vers un alcool sans utilisation d'un cofacteur (Inoue *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2003). Cette synthèse fait surtout intervenir des monoglycérides et des diglycérides et ne semble pas être possible à partir de triglycérides (Gobbetti *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2004). Il a toutefois été observé chez des souches isolées de lait de chèvre et de brebis, une préférence dans la synthèse d'esters éthyliques d'acides gras de 2 à 10 carbones pour l'estérification plutôt que pour l'alcoolyse (Abeijón Mukdsi *et al.*, 2009). Le vin étant un milieu hydroalcoolique avec une grande disponibilité en éthanol, la

voie de l'alcoolyse apparait comme la voie principale de synthèse des esters par les BL au cours de la FML (Holland *et al.*, 2005).



**Figure 10.** Différentes voies de biosynthèse des esters (d'après Sumby *et al.*, 2010).

Outre la nature de la souche, un des principaux paramètres qui influence la synthèse ou l'hydrolyse des esters au cours de la FML est la disponibilité en substrats comme les acides gras ou les alcools (Sumby *et al.*, 2010). Les lipides du vin ont principalement deux origines. Ils peuvent dériver de la baie de raisin (pellicule, pépins, pulpe) ; leur concentration dépend donc ici du cépage. Les glycérides et acides gras peuvent également être libérés par les levures au moment de leur autolyse et leur teneur dépend alors de la souche de levures ayant réalisé la FA (Pueyo *et al.*, 1999). Enfin, il semble que l'activité de l'eau, représentant la quantité d'eau disponible pour des réactions biochimiques, influence également l'activité synthèse/hydrolyse des enzymes : plus l'activité de l'eau est grande, plus l'hydrolyse est favorisée et inversement (Liu *et al.*, 2004).

Si les teneurs en esters au cours de la FML varient de façons différentes en fonction de la souche de BL ou de la matrice, toutes les études s'accordent pour dire que la concentration du lactate d'éthyle est fortement affectée par la FML (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). Dans le vin, 70 à 80 % du lactate d'éthyle est sous la forme (S). L'ester issu du métabolisme levurien est formé à partir de l'acide D-lactique dérivé du métabolisme des sucres et est principalement retrouvé sous la forme (R). Le (S)-lactate d'éthyle majoritairement présent est donc issu du métabolisme des BL qui le synthétisent à partir de l'acide L-lactique (Lloret *et al.*, 2002).

### ***1.B.2. Influence indirecte de la souche de bactéries lactiques sur la concentration en esters au cours de l'élevage***

Après la FML, la souche de BL pourrait également avoir un impact indirect sur la teneur en esters, notamment sur l'évolution de leur concentration pendant l'élevage, par la libération d'enzymes ou de précurseurs au moment de leur autolyse.

La composition lipidique de la membrane plasmique des BL dépend bien sûr de la souche, mais également de l'environnement dans lequel elles se sont développées (Garbay *et al.*, 1995). En outre, des phénomènes physicochimiques de rétention de certains esters, comme l'hexanoate d'éthyle, sur la paroi cellulaire de BL alimentaires ont récemment été mis en évidence (Ly *et al.*, 2008). L'autolyse de ces microorganismes en fin de fermentation pourrait par ailleurs modifier significativement la concentration en précurseurs d'esters et modifier l'équilibre acide/ester en favorisant une hydrolyse ou une synthèse chimique de ces derniers pendant l'élevage.

Par ailleurs, des travaux suggèrent que la dégradation des esters dans le temps serait due à la fois à leur hydrolyse mais aussi à leur oxydation. L'ajout d'antioxydants tels que certains composés phénoliques (Roussis *et al.*, 2005 ; Lambropoulos et Roussis, 2007) ou le glutathion (Papadopoulou et Roussis, 2008) pourrait limiter la diminution de la teneur des esters au cours du vieillissement. Ces composés ne joueraient pas sur l'hydrolyse, mais sur la dégradation par oxydation. Des études ont montré que les BL du vin possédaient des tannases pouvant légèrement modifier le profil en composés phénoliques. Ces enzymes étant souche dépendantes, leur activité pendant la FML pourrait influencer la cinétique d'oxydation des esters au cours de l'élevage des vins et expliquer en partie les différences de concentration de ces composés observées d'un vin à un autre. Enfin, il a également été observé que le niveau de glutathion total (forme oxydée plus forme réduite) pouvait diminuer après la FML (Marchand et de Revel, 2010). Ces résultats montrent que les BL du vin ont la capacité de consommer ou retenir le glutathion sans phénomène d'oxydation. Ce phénomène pourrait également avoir une incidence sur la vitesse de dégradation des esters au cours du vieillissement des vins.

## I.C. Hydrolyse et synthèse chimique des esters au cours de l'élevage

Le comportement des esters au cours de l'élevage et du vieillissement en bouteille varie selon la famille à laquelle ils appartiennent et le nombre de carbones qui composent leur chaîne carbonée. Il est également influencé par l'équilibre des concentrations entre l'acide et l'ester correspondant. Après les fermentations, cet équilibre est généralement déplacé en faveur de l'ester, ce qui entraînera donc son hydrolyse au cours du temps. La température, le pH et le temps d'élevage ont également un impact sur l'évolution de la concentration en esters (Marais, 1978 ; Marais et Pool, 1980).

Les esters éthyliques d'acides gras ainsi que les acétates sont hydrolysés au cours du vieillissement (Marais et Pool, 1980 ; Ramey et Ough, 1980), ce qui a longtemps fait penser qu'ils étaient surtout des marqueurs de l'arôme fruité des vins jeunes. Ce phénomène est d'autant plus rapide que la chaîne carbonée est longue, car l'effet inductif sur la fonction carbonyle est plus marqué, favorisant ainsi l'hydrolyse de l'ester. La concentration des composés à 8, 10 et 12 atomes de carbone diminue fortement après quelques années quand celle d'esters à 4 et 6 atomes de carbone peut, dans certains cas, rester stable (Antalick *et al.*, 2014). Le propionate d'éthyle fait figure d'exception ; certaines études rapportent des teneurs plus importantes de ce composé dans des vins âgés par rapport à des vins jeunes, ce qui impliquerait une synthèse de cet ester au cours du vieillissement (Antalick *et al.*, 2014).

La concentration en esters éthyliques d'acides branchés reste stable voire augmente au cours du vieillissement (Ferreira *et al.*, 2001 ; Díaz-Maroto *et al.*, 2005 ; Antalick *et al.*, 2014). Si une partie est synthétisée par les levures pendant la FA, la majorité est formée par estérification des acides correspondant avec l'éthanol au cours du vieillissement du vin. Le leucate d'éthyle, ester hydroxylé et branché, peut être ajouté à cette catégorie puisque des études récentes ont montré une augmentation de sa concentration au cours du vieillissement dans les vins rouges (Lytra, 2012).

Les esters éthyliques d'acides à nombre impair de carbone, probablement synthétisés à partir du propanoyl-CoA (dérivé de l'acide propionique) (Nykänen, 1986), semblent se comporter de la même façon que le propionate d'éthyle. Des teneurs en pentanoate et heptanoate d'éthyle plus importantes ont en effet été trouvées dans des vins d'une dizaine d'années par rapport à des vins n'ayant subi que quelques années de vieillissement. Le nonanoate d'éthyle en revanche semble être plus affecté par l'hydrolyse, probablement à cause de sa chaîne carbonée plus longue (Antalick *et al.*, 2014). D'après les mêmes auteurs,

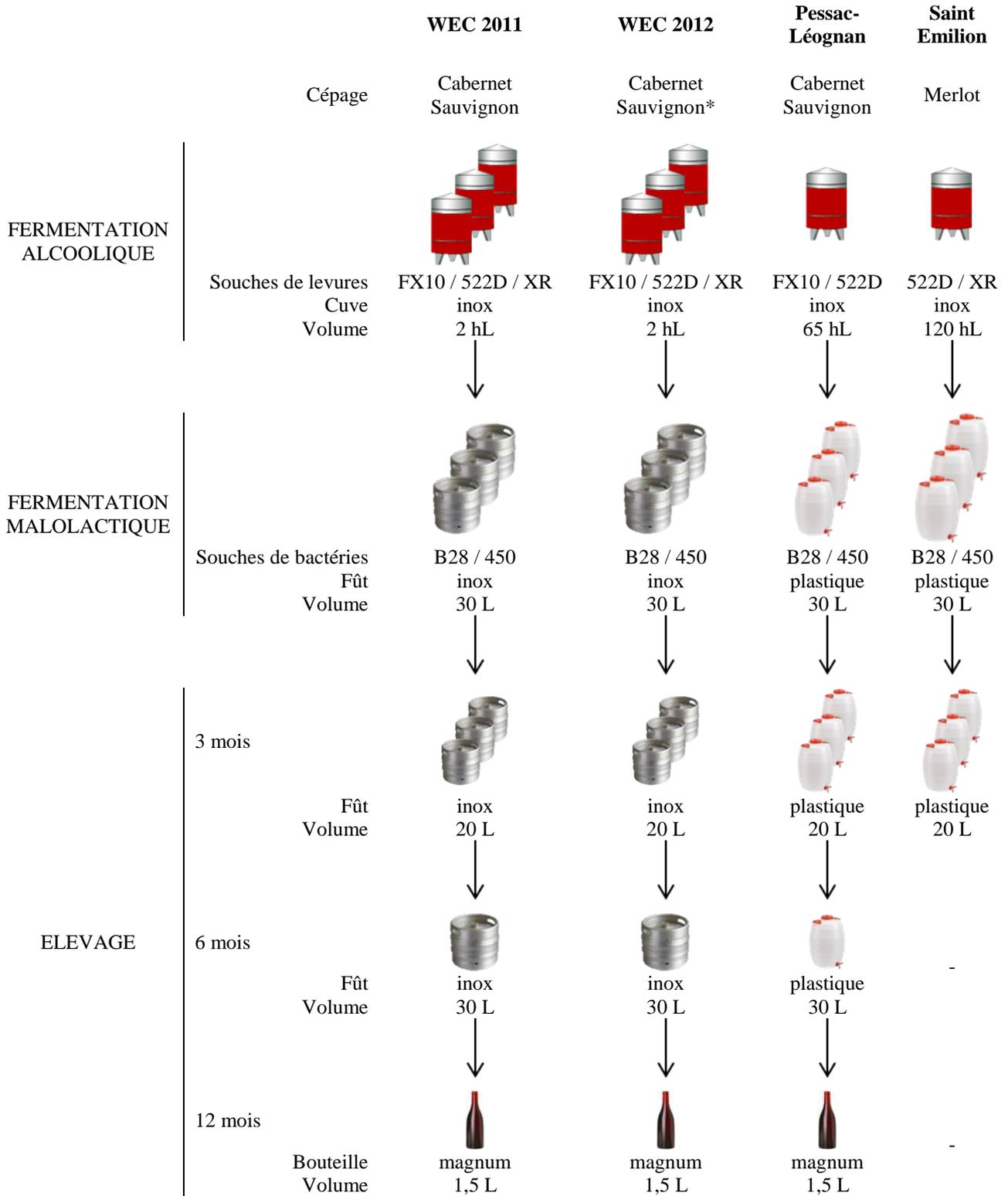
les autres esters d'acides gras (méthyliques, isoamyliques ou isobutyriques), semblent s'hydrolyser au cours du vieillissement.

## **II. Influence de la souche de levures sur la synthèse des esters dans les vins rouges lors de la fermentation alcoolique et au cours de l'élevage**

L'expérimentation WEC 11 nous a permis de comparer l'influence de 6 couples levures/BL sur la concentration de plusieurs familles de composés aromatiques. Sur la base de ces résultats, l'inoculation séquentielle de levures et de BL a conduit à des vins dont le profil chimique est spécifique au couple utilisé. Cependant, la souche de levures semble être la composante majoritaire du couple, affectant fortement les teneurs de ces composés aromatiques, dont la plupart des esters recherchés. L'objectif de cette seconde partie est d'étudier plus précisément l'influence de la souche de levures sur la concentration en esters après la FA et sur leur évolution au cours des différentes étapes de l'élaboration de quatre vins rouges.

### **II.A. Conditions expérimentales de l'étude et méthodes d'analyse**

En complément du millésime 2011, trois nouvelles expérimentations ont été mises en place avec les cépages Cabernet Sauvignon et Merlot. L'essai de micro-vinification au WEC a été répété sur le millésime 2012 (WEC 2012). Des essais à taille réelle, dans deux châteaux situés sur les appellations Pessac-Léognan (PL) et Saint-Emilion (SE) ont également été réalisés afin de s'assurer que les résultats observés en volume réduit sont reproductibles au chai. Un bilan analytique a été établi pour 32 esters en mesurant leur concentration dans les 4 vins (WEC 11, WEC 12, PL et SE) et à 5 étapes de leur élaboration : après FA, après FML et au bout de 3, 6 et 12 mois d'élevage (**Figure 11**).



\*moût de thermovinification

**Figure 11.** Plan expérimental des vinifications réalisées en 2011 et 2012 au WEC, à Pessac-Léognan (PL) et à Saint-Emilion (SE).

### ***II.A.1. Vinifications***

Les souches de levures (**FX10**, **XR** et **522D**) et de BL (**B28** et **450**) ainsi que les techniques d'analyses œnologiques classiques et de contrôle d'implantation sont les mêmes que celles utilisées et décrites précédemment (Chapitre 1.II.B.1. p.43).

#### *II.A.1.a. Protocole de vinifications*

##### **- Micro-vinification de moût de Cabernet Sauvignon thermovinifié au WEC**

Au cours du millésime 2012, un deuxième plan expérimental complet en micro-vinifications a été mis en place dans le chai d'application de la société Laffort (WEC) dans les Graves de Vayres. Toutes les combinaisons de couples levures/BL ont de nouveau été testées en triplicat (**Figure 11**). Les raisins ont préalablement été traités par thermovinification (chauffage à 70 °C pendant 30 minutes) avant vinification. Neuf cuves en acier inoxydable de 2 hL ont été remplies de 1,5 hL de moût et un échantillon de chaque lot a été prélevé avant FA afin de déterminer la concentration en sucre, la teneur en azote, l'acidité totale et le pH. La concentration en azote assimilable des moûts a été corrigée à environ 210 mg/L par ajout de sulfate d'ammonium. Les fermentations alcooliques et malolactiques se sont déroulées suivant le protocole décrit précédemment (Chapitre 1.II.B.3 p.44). Des contrôles d'implantation ont également été réalisés à mi-fermentation (densité  $\approx$  1,04 pour la FA ; diminution de 50 % de la concentration en acide malique pour la FML) pour chaque cuve. L'élevage des vins a été réalisé dans des fûts en acier inoxydable comme décrit dans le chapitre 1. Le SO<sub>2</sub> libre a été ajusté à 30 mg/L si nécessaire à chaque étape du vieillissement. Des prélèvements après FA, FML, 3, 6 et 12 mois d'élevage pour analyses œnologiques classiques, analyses chimiques et analyses sensorielles (à 3 et 12 mois seulement) ont été effectués.

##### **- Vinification de Cabernet Sauvignon au chai**

Un premier essai au chai a été réalisé avec des raisins de Cabernet Sauvignon de l'appellation Pessac-Léognan (PL) répartis de façon homogène dans deux cuves en acier inoxydable de 65 hL. La fermentation alcoolique a été initiée par les souches de levures **FX10** ou **522D**. La concentration en azote assimilable a été corrigée à 210 mg/L au préalable. A mi-fermentation (densité  $\approx$  1,04), des contrôles d'implantation des levures ont été réalisés. Après la FA, le vin de chaque cuve a été réparti de façon homogène dans six bidons en plastique

alimentaire de 30 L adaptés à la vinification afin de réaliser la FML en triplicat. Les souches de BL utilisées sont les mêmes que pour les autres essais (**B28** et **450**). A la fin de la FML, les vins ont été sulfités à 5 g/hL de SO<sub>2</sub> et transvasés dans des fûts en plastique alimentaire de 20 L pour 3 mois d'élevage. A la fin de cette période, les triplicats ont été assemblés en un seul bidon de 30 L pour 3 mois d'élevage supplémentaire. Après 6 mois d'élevage, une partie du vin a été conservée en magnum à 10 °C pendant 6 mois (**Figure 11**). Le SO<sub>2</sub> libre a été ajusté à 30 mg/L au préalable. Des prélèvements aux mêmes étapes de l'élaboration des vins et suivant le protocole décrit au chapitre 1 ont été effectués pour les analyses œnologiques classiques, le dosage des esters et les tests d'analyse sensorielle (vins de 3 et 12 mois d'élevage seulement).

### - Vinification de Merlot au chai

Un second essai au chai a été réalisé avec des raisins de Merlot de l'appellation Saint-Emilion (SE) répartis de façon homogène dans deux cuves en acier inoxydable de 120 hL. Le moût a été analysé et sa concentration en azote a été ajustée à 210 mg/L. La cuvaïson comporte trois phases : une macération pré fermentaire à froid, la fermentation, réalisée par les souches de levures **XR** ou **522D**, et une macération post fermentaire. Comme pour les vins PL, le vin de chaque cuve a été réparti de façon homogène dans six bidons en plastique alimentaire de 30 L afin de réaliser la FML en triplicat (souches **B28** et **450**).

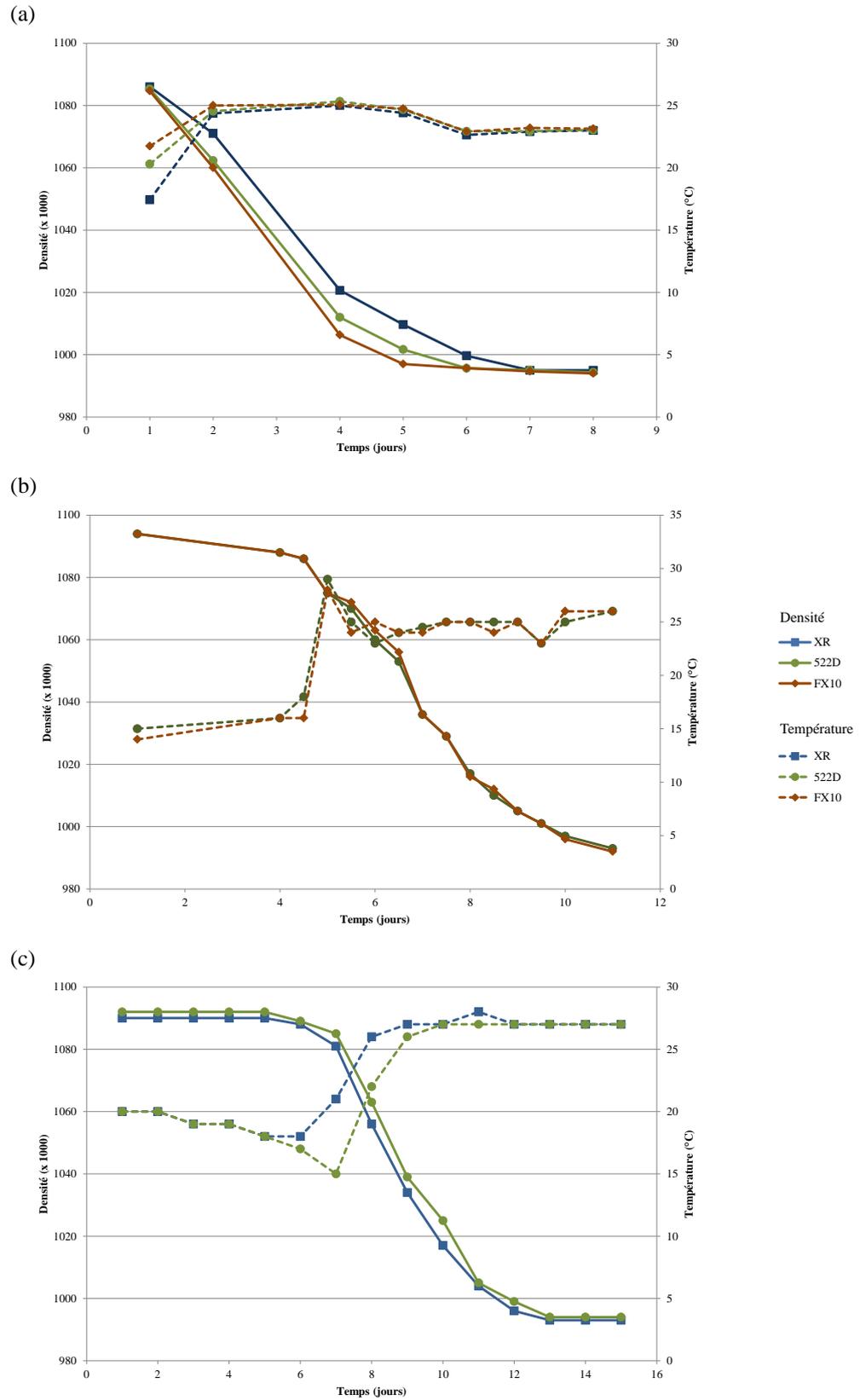
A la fin de la FML, les vins ont été sulfités à 5 g/hL de SO<sub>2</sub> et transvasés dans des fûts en plastique alimentaire de 20 L pour 3 mois d'élevage (**Figure 11**). Chaque triplicat a été assemblé en fût de 30 L pour 3 mois d'élevage supplémentaires. L'expérimentation a été arrêtée après 6 mois d'élevage à cause de contaminations microbiologiques de certaines modalités ayant engendré des déviations aromatiques de type phénol. Les analyses chimiques et sensorielles n'ont donc été réalisées que sur les vins après FA, FML et 3 mois d'élevage, exempts de tout problème.

#### *II.A.1.b. Cinétiques des fermentations et analyses œnologiques classiques*

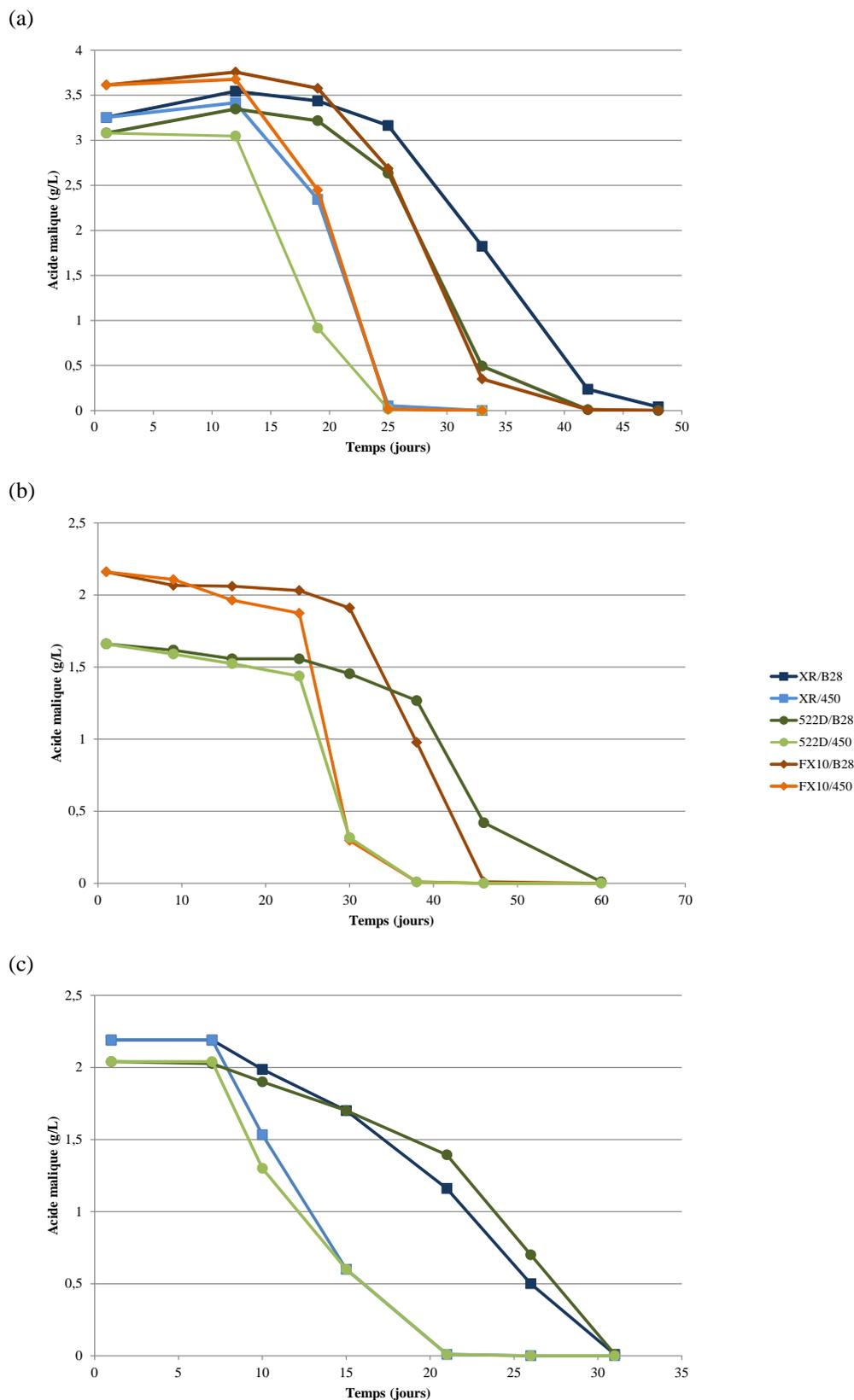
Les cinétiques des fermentations alcooliques et malolactiques sont présentées dans les **Figures 12 et 13** respectivement pour tous les couples levures/BL utilisés. Etant donné qu'aucune différence de n'a été observée entre les triplicats de chaque modalité, nous avons choisi de ne présenter qu'une cinétique fermentaire par modalité.

Pour chaque expérimentation, aucune différence entre les cinétiques des FA n'a été observée. Toutes les levures ont achevé leur fermentation en 192 heures au WEC 12 (**Figure 12a**), en 264 heures pour les vins PL (**Figure 12b**) et en 216 heures pour les vins SE (**Figure 12c**). Aucune différence significative n'a pu être observée entre les cuves au niveau des principaux paramètres œnologiques (**Tableau 24**). Néanmoins, les vins WEC 12 et PL fermentés avec la souche **FX10** présentent des acidités totales et volatiles légèrement plus élevées que dans les autres vins. La teneur en acide malique apparaît également moins élevée dans toutes les modalités inoculées avec la levure **522D**, ce qui suggère que cette souche serait capable de métaboliser cet acide.

Au cours de la FML, l'acide malique a été entièrement dégradé (concentration < 0,1 g/L) par les deux souches de BL utilisées dans chaque expérimentation (**Figure 13**). Comme pour les vins WEC 11 (Chapitre 1.II.B.4. p.46), on note une différence significative de la cinétique fermentaire en fonction de la bactérie. La souche *O. oeni* **450** a terminé plus rapidement la FML que la souche **B28** quelle que soit la levure ayant réalisée la FA, pour tous les essais mis en place. Là encore, les différences de cinétique observées ne sont pas dues à des différences dans la vitesse de dégradation de l'acide L-malique mais plutôt à un temps de latence plus long chez la souche **B28** (environ 5 jours). De manière générale, les vins fermentés avec la souche **B28** présentent une acidité volatile légèrement plus élevée que ceux fermentés avec la souche **450** (**Tableau 24**) ; ces écarts sont cependant faibles et ne devraient pas être à l'origine de différences significatives observées entre les vins.



**Figure 12.** Cinétiques des fermentations alcooliques par la mesure de la densité pour une cuve de chaque modalité des vins WEC 2012 (a), PL (b) et SE (c) inoculés avec différentes souches de levures.



**Figure 13.** Cinétiques des fermentations malolactiques par le dosage de l'acide malique (exprimé en g/L) pour une cuve de chaque modalité des vins WEC 2012 (a), PL (b) et SE (c) inoculés avec différentes souches de bactéries lactiques.

**Tableau 24.** Principaux paramètres œnologiques du moût et des vins WEC 12, PL et SE après les fermentations alcooliques et malolactiques. Pour les vins WEC 11, les données sont présentées **Tableau 19** dans le chapitre 1.II.B.4. p48. Les données représentent la moyenne des triplicats pour chaque couple  $\pm$  l'écart type.

Vin	Souche levure	Souche BL	Sucres réducteurs (g/L)	Azote assimilable (mg N/L)	Degré alcoolique (% v/v)	pH	Acidité totale (g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Acidité volatile (g/L acide acétique)	SO <sub>2</sub> total (mg/L)	SO <sub>2</sub> libre (mg/L)	Acide malique (g/L)
<b>Moût</b>											
WEC 12	NA	NA	207	129	NQ	3,6	4,3	NQ	42	NQ	nd
PL	NA	NA	217	93,5	NQ	3,6	2,9	NQ	56	NQ	nd
SE	NA	NA	187	96,5	NQ	3,5	3,7	NQ	58	NQ	nd
<b>Après fermentation alcoolique</b>											
WEC 12	XR	NA	0,01 $\pm$ 0,00	NQ	11,89 $\pm$ 0,03	3,64 $\pm$ 0,01	4,9 $\pm$ 0,1	0,19 $\pm$ 0,01 <b>c</b>	23 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	3,25 $\pm$ 0,14 <b>b</b>
	522D	NA	0,01 $\pm$ 0,00	NQ	11,95 $\pm$ 0,02	3,65 $\pm$ 0,02	4,8 $\pm$ 0,0	0,23 $\pm$ 0,01 <b>b</b>	22 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1	3,08 $\pm$ 0,07 <b>b</b>
	FX10	NA	0,01 $\pm$ 0,00	NQ	11,94 $\pm$ 0,02	3,66 $\pm$ 0,02	5,0 $\pm$ 0,1	0,29 $\pm$ 0,02 <b>a</b>	23 $\pm$ 2	4 $\pm$ 0	3,41 $\pm$ 0,03 <b>a</b>
PL	522D	NA	0,09	NQ	13,12	3,59	4,5	0,15	8	NQ	1,66
	FX10	NA	0,12	NQ	13,04	3,60	4,8	0,22	7	NQ	2,16
SE	XR	NA	0,06	NQ	12,97	3,64	4,3	0,20	6	NQ	2,19
	522D	NA	0,07	NQ	13,07	3,57	4,3	0,16	3	NQ	2,04
<b>Après fermentation malolactique</b>											
WEC 12	XR	B28	NQ	NQ	12,12 $\pm$ 0,04	3,81 $\pm$ 0,00	2,8 $\pm$ 0,0	0,37 $\pm$ 0,02 <b>cd</b>	52 $\pm$ 1 <b>c</b>	31 $\pm$ 2 <b>bc</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	522D	B28	NQ	NQ	12,13 $\pm$ 0,02	3,82 $\pm$ 0,01	2,8 $\pm$ 0,0	0,44 $\pm$ 0,01 <b>b</b>	46 $\pm$ 1 <b>d</b>	29 $\pm$ 1 <b>c</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	FX10	B28	NQ	NQ	12,16 $\pm$ 0,02	3,81 $\pm$ 0,01	2,9 $\pm$ 0,0	0,50 $\pm$ 0,00 <b>a</b>	45 $\pm$ 1 <b>d</b>	29 $\pm$ 1 <b>c</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	XR	450	NQ	NQ	12,10 $\pm$ 0,04	3,79 $\pm$ 0,01	2,9 $\pm$ 0,0	0,28 $\pm$ 0,01 <b>e</b>	69 $\pm$ 2 <b>a</b>	37 $\pm$ 0 <b>a</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	522D	450	NQ	NQ	12,13 $\pm$ 0,01	3,81 $\pm$ 0,02	2,8 $\pm$ 0,0	0,35 $\pm$ 0,03 <b>d</b>	61 $\pm$ 1 <b>b</b>	34 $\pm$ 1 <b>b</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	FX10	450	NQ	NQ	12,14 $\pm$ 0,01	3,79 $\pm$ 0,01	2,9 $\pm$ 0,1	0,39 $\pm$ 0,01 <b>c</b>	60 $\pm$ 1 <b>b</b>	35 $\pm$ 2 <b>ab</b>	0,01 $\pm$ 0,00
PL	522D	B28	NQ	NQ	13,17 $\pm$ 0,01	3,70 $\pm$ 0,01	3,4 $\pm$ 0,2	0,23 $\pm$ 0,01 <b>c</b>	32 $\pm$ 2	18 $\pm$ 0	0,01 $\pm$ 0,00
	FX10	B28	NQ	NQ	13,12 $\pm$ 0,01	3,71 $\pm$ 0,01	3,5 $\pm$ 0,1	0,35 $\pm$ 0,02 <b>a</b>	32 $\pm$ 3	17 $\pm$ 2	0,01 $\pm$ 0,00
	522D	450	NQ	NQ	13,17 $\pm$ 0,00	3,70 $\pm$ 0,01	3,6 $\pm$ 0,0	0,20 $\pm$ 0,02 <b>d</b>	31 $\pm$ 4	18 $\pm$ 2	0,01 $\pm$ 0,00
	FX10	450	NQ	NQ	13,08 $\pm$ 0,04	3,71 $\pm$ 0,01	3,6 $\pm$ 0,1	0,28 $\pm$ 0,01 <b>b</b>	29 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2	0,01 $\pm$ 0,00
SE	XR	B28	NQ	NQ	13,02 $\pm$ 0,02	3,69 $\pm$ 0,00	3,2 $\pm$ 0,0	0,31 $\pm$ 0,02 <b>a</b>	60 $\pm$ 15 <b>a</b>	33 $\pm$ 8 <b>a</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	522D	B28	NQ	NQ	13,14 $\pm$ 0,02	3,68 $\pm$ 0,01	3,2 $\pm$ 0,0	0,30 $\pm$ 0,02 <b>a</b>	70 $\pm$ 9 <b>a</b>	36 $\pm$ 5 <b>a</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	XR	450	NQ	NQ	13,00 $\pm$ 0,01	3,67 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,0	0,23 $\pm$ 0,00 <b>b</b>	39 $\pm$ 1 <b>b</b>	20 $\pm$ 1 <b>b</b>	0,01 $\pm$ 0,00
	522D	450	NQ	NQ	13,14 $\pm$ 0,01	3,67 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,1	0,21 $\pm$ 0,01 <b>b</b>	34 $\pm$ 5 <b>b</b>	17 $\pm$ 4 <b>b</b>	0,01 $\pm$ 0,00

NA : non applicable ; NQ : non quantifiable ; nd : non déterminé  
 Les valeurs avec différentes lettres (a-d) dans la même colonne sont significativement différentes selon le test *post hoc* de Duncan (P < 0,05)

### II.A.2. Suivi de 32 esters odorants au cours de la vinification et de l'élevage

La méthode utilisée est décrite Chapitre 1.II.A.3. p.41 (Antalick *et al.*, 2010). Suite à l'évolution de la méthode au cours du doctorat, quatre nouveaux étalons internes commerciaux en solution alcoolique sont utilisés : butyrate d'éthyle-4,4,4- $d_3$  (200 mg/L), hexanoate d'éthyle- $d_{11}$  (204 mg/L), octanoate d'éthyle- $d_{15}$  (276 mg/L), *trans*-cinnamate d'éthyle- $d_5$  (phenyl- $d_5$ ) (192 mg/L) (Cluzeau, Sainte Foy la Grande, France). Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales différentes de la méthode décrite p.41 sont résumées dans le **Tableau 25**.

**Tableau 25.** Conditions expérimentales de la HS-SPME-GC-MS pour le dosage des esters apolaires.

Principe :	Microextraction sur phase solide, HS-SPME
Appareil :	Agilent 7890A
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique
	Appareil : Agilent 5975C
	Energie d'ionisation : 70 eV
	Température : 280 °C
	Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

Les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés aromatiques nous intéressant sont déjà décrits dans le **Tableau 18** (chapitre 1.II.A. p.42). Les ions utilisés pour détecter les quatre nouveaux étalons internes commerciaux sont présentés dans le **Tableau 26**.

**Tableau 26.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des étalons internes.

Composés	Ions (m/Z)
Butyrate d'éthyle-4,4,4- $d_3$	<b>74/89</b>
Hexanoate d'éthyle- $d_{11}$	<b>91/110</b>
Octanoate d'éthyle- $d_{15}$	<b>91/142</b>
<i>Trans</i> -cinnamate d'éthyle- $d_5$ (phenyl- $d_5$ )	<b>136/181</b>

## **II.B. Résultats : mise en évidence d'un effet levure en fin de fermentation alcoolique qui perdure pendant l'élevage des vins**

Les données ont été traitées par une ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries). Cependant, dans un souci de clarté, les résultats seront présentés dans deux parties distinctes. Les résultats de l'ANOVA du facteur "levures" des données collectées pour 4 vins, à 5 étapes de leur élaboration, sont présentés dans le **Tableau 27**. Néanmoins, et pour une meilleure visibilité dans les résultats, il est nécessaire de considérer séparément chaque famille d'esters comme un groupe homogène. Les trois principales familles connues pour jouer un rôle dans la modulation de l'arôme fruité (esters éthyliques d'acides gras, acétates d'alcools supérieurs et esters éthyliques d'acides branchés) sont présentées indépendamment des autres familles dont le rôle est considéré comme mineur. Les teneurs en esters de chaque vin aux différents temps de prélèvement étudiés sont disponibles en annexe 2.

### ***II.B.1. Les esters éthyliques d'acides gras***

De manière générale, la concentration moyenne en EEAG diminue au cours du temps pour les 4 vins étudiés (**Figure 14**). Un effet de la souche de levures sur les teneurs en esters est également observé dès la fin de la FA et semble se maintenir pour chaque étape de l'élaboration des vins (**Tableau 27**). Néanmoins, cet impact n'est pas le même selon le millésime et le cépage.

Après la FA, les vins WEC 11 vinifiés avec la souche **522D**, et dans une moindre mesure **FX10**, présentent des teneurs en EEAG significativement plus élevées que ceux fermentés par la souche **XR** (au seuil de 1 %). Ces différences perdurent au cours de l'élevage car à la fin de l'expérimentation, après 12 mois de vieillissement, les mêmes tendances sont observées (au seuil de 1 % également). Les vins WEC 12 ont des concentrations nettement supérieures en EEAG, ce qui n'empêche pas d'observer un effet "levures" dès la fin de la FA qui se maintient au cours du temps. Pour cette expérimentation en revanche, c'est la levure **FX10** qui a synthétisé le plus d'esters (au seuil de 0,1 %).

**Tableau 27.** Niveaux de significativité de l'ANOVA à un facteur (levures) pour les esters dosés dans les vins WEC 11 et WEC 12 à 5 étapes de leur élaboration.

	WEC 2011					WEC 2012				
	après FA	après FML	après 3 mois	après 6 mois	après 12 mois	après FA	après FML	après 3 mois	après 6 mois	après 12 mois
<i>Esters éthyliques d'acides gras (EEAG)</i>										
C3C2	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**
C4C2	NS	***	**	***	NS	*	***	***	***	NS
C6C2	**	*	*	NS	NS	***	***	***	***	***
C8C2	NS	***	**	*	*	***	***	***	***	***
C10C2	NS	NS	**	**	**	***	NS	***	***	**
C12C2	***	NS	***	**	***	***	*	***	**	*
<b>Somme</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>*</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>
<i>Esters éthyliques d'acides branchés (EEAB)</i>										
iC4C2	**	***	NS	NS	NS	***	***	***	***	**
2-mC4C2	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
iC5C2	***	**	***	***	*	***	***	***	***	***
PhC2C2	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<b>Somme</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>*</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>
<i>Acétates d'alcools supérieurs (AAS)</i>										
C2C3	**	***	***	***	***	***	***	***	***	**
C2iC4	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***
C2C4	***	***	*	**	NS	***	***	***	***	NS
C2iC5	**	***	**	**	***	***	***	***	***	***
C2C6	***	NS	NS	*	*	**	***	***	***	***
C2C8	*	**	***	**	NS	***	***	***	***	NS
C2PhC2	***	***	***	**	***	***	***	***	***	***
<b>Somme</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>**</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>	<b>***</b>
<i>Esters méthyliques</i>										
C4C1	***	***	***	***	***	NS	NS	NS	***	NS
C6C1	***	***	***	*	**	***	***	***	***	***
C8C1	*	***	**	**	**	***	***	***	***	***
C10C1	NS	**	***	***	***	***	*	***	*	***
<i>Esters éthyliques à nombre impair de carbone</i>										
C5C2	***	*	***	***	**	NS	***	***	**	**
C7C2	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***
C9C2	***	NS	***	*	**	***	***	***	*	NS
<i>Esters isoamyliques</i>										
C4iC5	NS	***	***	**	**	***	***	***	***	**
C6iC5	NS	*	**	*	***	*	***	***	***	***
C8iC5	NS	NS	**	**	**	**	***	*	NS	*
<i>Cinnamates et esters mineurs</i>										
hexC2	NS	NS	**	**	*	***	***	***	***	***
C6iC4	**	**	***	**	NS	NS	NS	***	***	**
gerC1	***	*	***	NS	***	***	***	***	***	***
dhCinnC2	*	NS	**	NS	*	***	***	***	***	***
CinC2	*	NS	***	**	**	***	NS	*	***	***

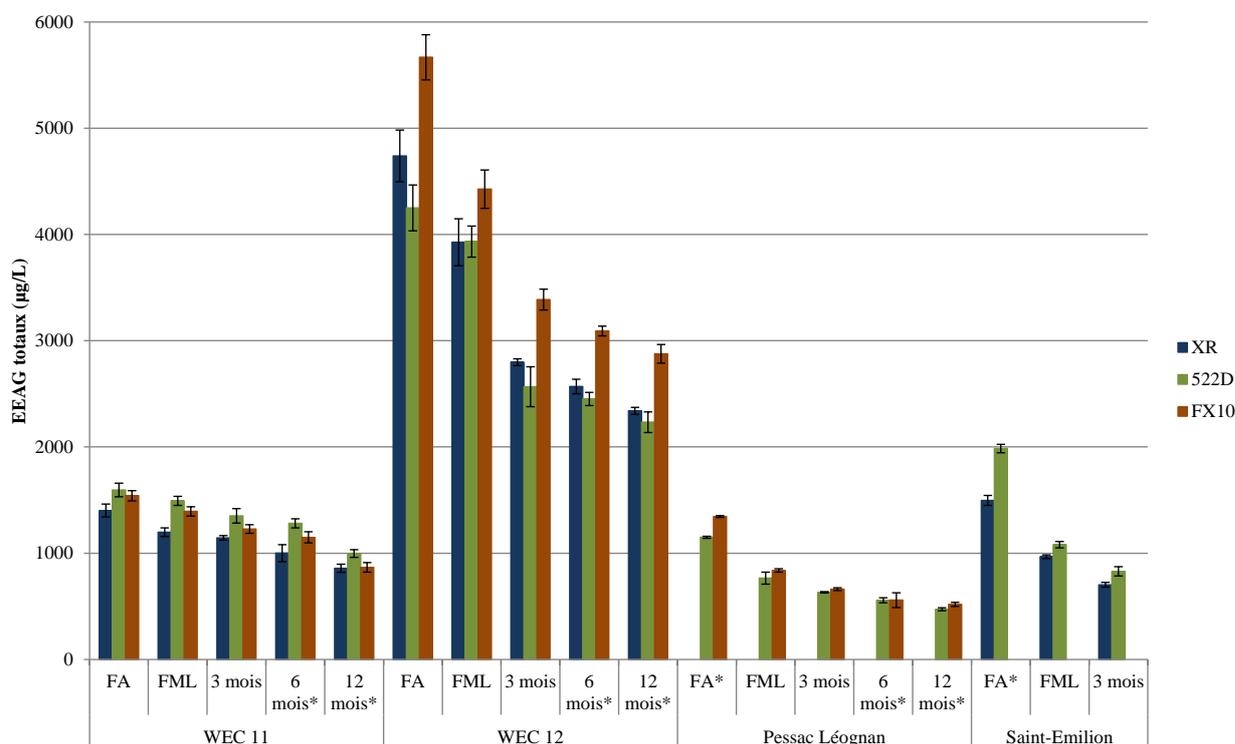
\*, \*\*, \*\*\* indiquent un effet significatif à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  respectivement ; NS : non significatif.

**Tableau 27 (suite).** Niveaux de significativité de l'ANOVA à un facteur (levures) pour les esters dosés dans les vins PL et SE à différentes étapes de leur élaboration.

	Pessac Léognan					Saint-Emilion		
	après FA	après FML	après 3 mois	après 6 mois	après 12 mois	après FA	après FML	après 3 mois
<i>Esters éthyliques d'acides gras (EEAG)</i>								
C3C2	***	***	***	***	***	**	***	***
C4C2	**	**	***	*	*	NS	***	***
C6C2	***	***	***	***	***	***	***	***
C8C2	***	***	***	***	***	***	***	***
C10C2	**	***	***	***	***	***	***	***
C12C2	***	NS	NS	***	***	***	***	**
<b>Somme</b>	***	*	*	*	*	**	***	***
<i>Esters éthyliques d'acides branchés (EEAB)</i>								
iC4C2	**	***	***	***	***	*	**	NS
2-mC4C2	***	***	***	***	***	**	***	***
iC5C2	***	***	***	***	NS	*	NS	NS
PhC2C2	**	***	***	***	***	***	***	***
<b>Somme</b>	***	***	***	***	***	NS	**	*
<i>Acétates d'alcools supérieurs (AAS)</i>								
C2C3	NS	**	***	NS	***	***	***	***
C2iC4	NS	*	***	NS	***	***	***	**
C2C4	NS	**	***	NS	NS	***	***	***
C2iC5	NS	NS	*	*	NS	***	***	***
C2C6	**	***	***	***	***	***	***	***
C2C8	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	*
C2PhC2	***	***	***	***	***	***	***	***
<b>Somme</b>	NS	NS	NS	NS	NS	**	***	***
<i>Esters méthyliques</i>								
C4C1	NS	NS	*	*	NS	***	*	***
C6C1	NS	NS	*	*	NS	***	***	***
C8C1	**	***	***	NS	***	***	***	***
C10C1	**	***	***	NS	***	***	***	*
<i>Esters éthyliques à nombre impair de carbone</i>								
C5C2	**	***	***	*	***	***	*	***
C7C2	**	***	***	***	***	***	***	***
C9C2	***	**	***	*	***	***	***	***
<i>Esters isoamyliques</i>								
C4iC5	*	NS	**	NS	*	***	***	***
C6iC5	NS	NS	NS	***	***	***	***	***
C8iC5	**	***	***	***	***	***	***	***
<i>Cinnamates et esters mineurs</i>								
hexC2	NS	NS	NS	NS	NS	***	***	***
C6iC4	NS	***	***	**	***	*	NS	NS
gerC1	NS	NS	**	**	***	*	**	NS
dhCinnC2	*	***	***	***	***	***	***	***
CinC2	NS	***	***	**	***	***	***	***

\*, \*\*, \*\*\* indiquent un effet significatif à p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001 respectivement ; NS : non significatif.

Ces effets, observés pour des vins issus de micro-vinifications, s'avèrent également présents dans des vins vinifiés à une échelle plus classique. Les modalités **FX10** des échantillons PL sont significativement plus concentrées en EEAG dès la fin de la FA (**Figure 14**) et ce jusqu'à 12 mois de vieillissement (aux seuils de 0,1 % et 5 % respectivement). Les vins SE, pour lesquels seules les souches **XR** et **522D** avaient été utilisées, sont également significativement différents en fonction de la souche de levures : les modalités inoculées avec **522D** contiennent plus d'EEAG que celles fermentées par la souche **XR** (significatif au seuil de 1 %).



\*réplicats analytiques

**Figure 14.** Teneurs moyennes en esters éthyliques d'acides gras (exprimées en µg/L) ± intervalle de confiance à 5 % entre les réplicats observées dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon la souche de levures utilisée pour réaliser la FA.

Toutefois, il existe une certaine variabilité dans l'impact de la souche de levures sur les teneurs en EEAG et leur évolution au cours du temps dépend de l'ester considéré (**Tableau 28**). Le propionate d'éthyle ( $C_3C_2$ ), qui n'est pas à proprement parlé un ester d'acide gras, se distingue des autres esters. Pour les 4 vins étudiés, il est majoritairement synthétisé par la souche **522D** et l'effet de la souche de levures se maintient au cours du

temps. Les autres esters en revanche, sont principalement synthétisés par la souche **FX10** quand elle est présente. Cependant, et ce quels que soient l'ester ou l'expérimentation considérés, leurs concentrations sont largement inférieures aux seuils de perception (**Tableau 4**, chapitre 1.I.B.4. p. 24) et ne peuvent avoir un impact direct sur la modulation de l'arôme fruité.

**Tableau 28.** Influence de la souche de levures sur la concentration en esters éthyliques d'acides gras et en propionate d'éthyle dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'ester (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).

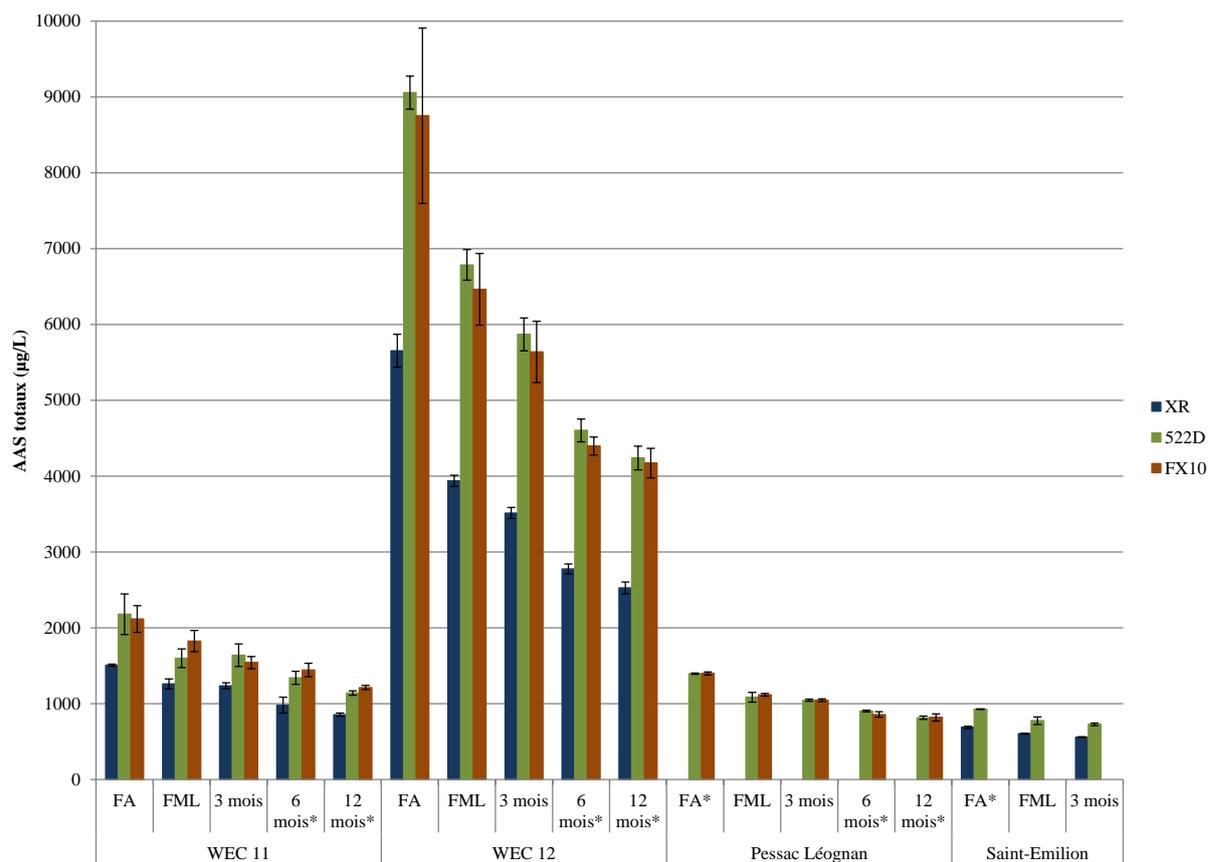
	WEC 2011			WEC 2012			Pessac Léognan			Saint-Emilion		
	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 3 mois
C3C2	522D	522D	522D	522D / XR	522D / XR	522D / XR	522D	522D	522D	522D	522D	522D
C4C2	NS	522D / FX10	NS	FX10	FX10	NS	FX10	FX10	FX10	NS	522D	522D
C6C2	FX10	NS	NS	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	522D	522D	522D
C8C2	NS	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	522D	522D	522D
C10C2	NS	NS	FX10	FX10	NS	FX10	FX10	FX10	FX10	522D	522D	522D
C12C2	FX10	NS	FX10	FX10	522D / XR	FX10 / XR	FX10	NS	FX10	522D	522D	522D
<b>Somme</b>	<b>522D / FX10</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>FX10</b>	<b>FX10</b>	<b>FX10</b>	<b>FX10</b>	<b>FX10</b>	<b>FX10</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>

NS : non significatif

### II.B.2. Les acétates d'alcools supérieurs

Comme pour les EEAG, la concentration moyenne en AAS diminue au cours du temps pour les 4 vins étudiés (**Figure 15**). Un effet de la souche de levures sur les teneurs en acétates est également observé dès la fin de la FA et se maintient aux différentes étapes de l'élaboration des vins étudiés (**Tableau 27**). Contrairement aux EEAG, une tendance générale semble se dégager, quelle que soit la matrice.

Après la FA, les vins WEC 11 et WEC 12 vinifiés avec les souches **522D** et **FX10** présentent des teneurs en AAS significativement plus élevées que ceux fermentés par la souche **XR** (tous deux au seuil de 1 %). Ces différences perdurent après la FML (au seuil de 0,1 % pour les deux expérimentations) ainsi qu'au cours de l'élevage. A la fin de l'expérimentation, après 12 mois de vieillissement, les mêmes tendances sont observées (au seuil de 0,1 % également). Les teneurs en AAS dans les vins WEC 12 sont également nettement supérieures à celles mesurées dans les autres vins, ce qui n'empêche pas d'observer le même effet "levures" sur ces composés.



\*réplicats analytiques

**Figure 15.** Teneurs moyennes en acétates d'alcools supérieurs (exprimées en µg/L) ± intervalle de confiance à 5 % entre les réplicats observés dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon la souche de levures utilisée pour réaliser la FA.

Dans des vins vinifiés au chai à une échelle plus classique, le même impact de la souche de levures a pu être observé. Les vins PL, fermentés par les souches **522D** ou **FX10** présentent peu de différences dans la teneur en acétates après FA, confirmant la capacité des deux levures à synthétiser ces composés dans les mêmes proportions. A la fin de l'expérimentation, les vins élaborés à partir des souches **522D** et **FX10** ne sont pas différenciables sur la base de leur teneur en AAS.

Enfin, les modalités "**522D**" des vins SE présentent des concentrations en acétates significativement plus élevées que les modalités "**XR**" dès la fin de la FA et ce jusqu'à 12 mois de vieillissement (aux seuils de 1 % et 0,1 % respectivement).

Les résultats obtenus dans le cadre des expérimentations au chai sont cohérents avec ceux des micro-vinifications : les modalités "**522D**" et "**FX10**" ne sont pas différenciées, au contraire des modalités "**XR**" et "**522D**" ou "**XR**" et "**FX10**".

**Tableau 29.** Influence de la souche de levures sur la concentration en acétates d'alcools supérieurs dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'esters (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).

	WEC 2011			WEC 2012			Pessac Léognan			Saint-Emilion		
	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 3 mois
C2C3	522D / FX10	522D / FX10	522D	522D / FX10	522D / FX10	522D / FX10	NS	FX10	FX10	522D	522D	522D
C2iC4	522D / FX10	522D / FX10	522D / FX10	522D	522D	522D	NS	FX10	FX10	522D	522D	522D
C2C4	522D / FX10	522D / FX10	NS	522D / FX10	FX10	NS	NS	522D	NS	522D	522D	522D
C2iC5	522D / FX10	FX10	FX10	522D / FX10	522D / FX10	522D / FX10	NS	NS	NS	522D	522D	522D
C2C6	522D / FX10	NS	522D / FX10	522D / FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	522D	522D	522D
C2C8	NS	522D / FX10	NS	522D	522D	NS	FX10	FX10	NS	NS	NS	522D
C2PhC2	522D	FX10	522D / FX10	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D
<b>Somme</b>	<b>522D / FX10</b>	<b>FX10</b>	<b>FX10</b>	<b>522D / FX10</b>	<b>522D / FX10</b>	<b>522D / FX10</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>NS</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>

NS : non significatif

Le **Tableau 29** montre l'impact de la souche de levures sur la concentration de chaque acétate après FA. Il confirme les tendances générales : les souches **522D** et **FX10** ont synthétisé plus d'AAS que la souche **XR**. Ni la FML ni l'étape de vieillissement ne semblent entrainer de modification assez importante dans la teneur de ces composés pour masquer ou pour moduler significativement l'effet de la souche de levures.

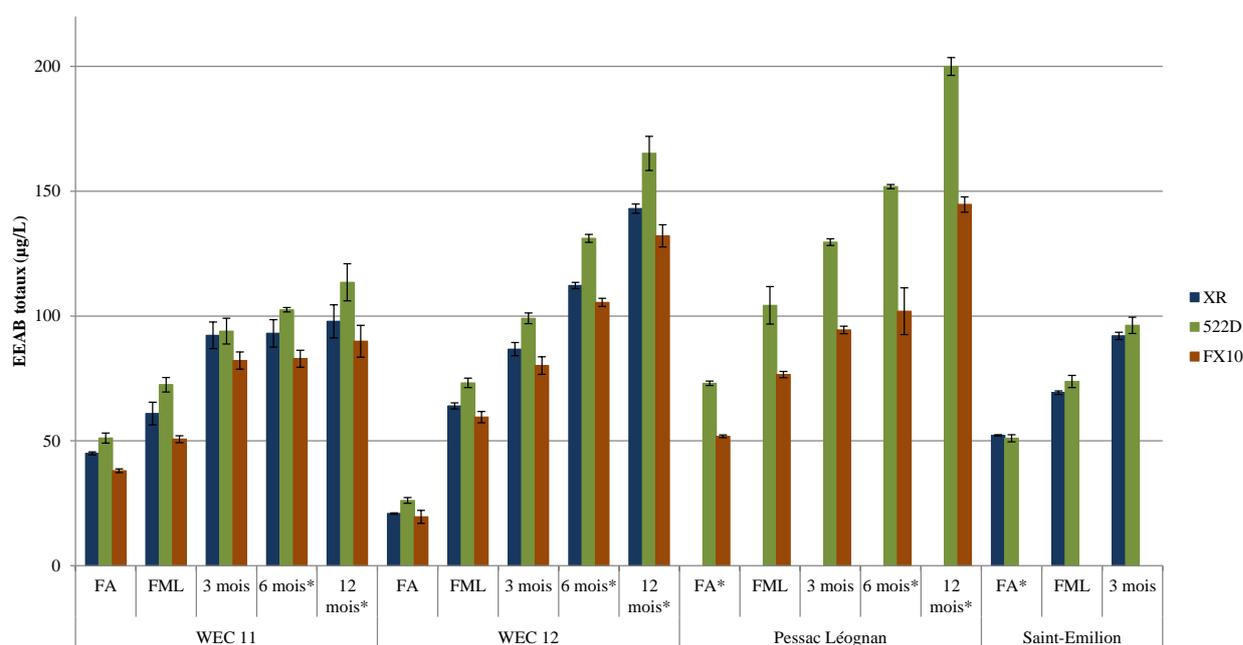
L'effet souche sur la teneur en ces composés peut être important et avoir potentiellement un impact aromatique. L'acétate d'isoamyle, par exemple, principal ester odorant de cette famille, est trouvé dans des quantités très variables en fin d'expérimentation, selon la souche de levures inoculée. Dans tous les cas, sa concentration dans les vins est proche voire supérieure au seuil de perception déterminé par Pineau (2007). Pour les quatre essais, l'écart entre les modalités "**522D**" et "**FX10**" ne varie que de quelques dizaines de microgrammes par litre. En revanche, les différences de concentration entre les vins "**522D**" ou "**FX10**" et "**XR**" sont plus importantes. Elles vont de quelques centaines de microgrammes par litre (+ 150 µg/L pour les vins SE, + 300 µg/L pour les vins WEC 11) à plusieurs centaines (+ 1460 µg/L pour le vins WEC 12). Le seuil de ce composé ayant été établi à 860 µg/L dans un vin désaromatisé (Pineau, 2007), il est fort probable que ces variations aient un impact sur le profil aromatique des vins et puissent être perçues par un panel.

### **II.B.3. Les esters éthyliques d'acides branchés**

Les EEAB sont les seuls esters parmi tous ceux dosés dans cette étude dont la concentration augmente au cours du temps, pour les quatre vins étudiés (**Figure 16**). L'impact

de la souche de levures sur leur concentration est également observable dès la fin de la FA et se maintient au cours du temps (**Tableau 27**).

Après la FA, les vins WEC 11 et WEC 12 vinifiés avec la souche **522D**, et dans une moindre mesure par la souche **XR**, présentent des teneurs en EEAB significativement plus élevées que ceux fermentés par la souche **FX10** (aux seuils de 0,1 % et 1 % respectivement). Ni la FML ni le vieillissement ne semblent entraîner de changement assez important pour masquer l'influence de la souche de levures sur la concentration en esters. En effet, après 12 mois de vieillissement, les modalités "**522D**" apparaissent plus concentrées en esters branchés que les modalités "**XR**" et "**FX10**" (aux seuils de 1 % et 0,1 % respectivement).



\*réplicats analytiques

**Figure 16.** Teneurs moyennes en esters éthyliques d'acides branchés (exprimées en µg/L) ± intervalle de confiance à 5 % entre les réplicats observées dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon la souche de levures utilisée pour réaliser la FA.

Ces tendances sont également observées dans les vins PL où les différences entre les modalités "**522D**" et "**FX10**" sont particulièrement marquées (significatives au seuil de 0,1 % pour toutes les étapes de l'expérimentation). Les écarts de concentration moyenne entre les vins fermentés par les levures **522D** et **XR** pour l'expérimentation SE sont moins nets (non significatif après la FA ; au seuil de 5 % après 3 mois d'élevage).

**Tableau 30.** Influence de la souche de levures sur la concentration en esters éthyliques d'acides branchés dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'ester (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).

	WEC 2011			WEC 2012			Pessac Léognan			Saint-Emilion		
	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 3 mois
iC4C2	522D	522D	NS	522D	522D	522D	522D	522D	522D	XR	522D	NS
2-mC4C2	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D
iC5C2	522D	522D / FX10	522D	522D	522D	522D	522D	522D	NS	XR	NS	NS
PhC2C2	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D
<b>Somme</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>	<b>NS</b>	<b>522D</b>	<b>522D</b>

NS : non significatif

Le **Tableau 30** montre que les quatre esters branchés dosés dans cette étude sont principalement synthétisés par la souche **522D**, confirmant les tendances générales dégagées plus haut. A la fin de chaque expérimentation, tous les vins fermentés par cette levure présentent des concentrations significativement plus élevées en esters branchés qui pourraient avoir un impact sur la perception globale de l'arôme fruité. De plus, mis à part le phénylacétate d'éthyle, la concentration des trois autres esters dans les vins après 12 mois d'élevage est largement supérieure à leur seuil de perception respectif.

En fin d'expérimentation, les modalités "**522D**" et "**FX10**" présentent en moyenne des écarts de concentration en isobutyrate d'éthyle (iC<sub>4</sub>C<sub>2</sub>) du même ordre de grandeur que son seuil de perception (15 µg/L, Ferreira *et al.*, 2000) : + 5 µg/L pour WEC 11 ; + 21 µg/L pour WEC 12 ; + 25 µg/L pour PL. Les différences de concentration en isovalérate d'éthyle (iC<sub>5</sub>C<sub>2</sub>) pour ces deux modalités sont également proche du seuil de perception (3 µg/L, Ferreira *et al.*, 2000) : + 4 µg/L dans les vins WEC 11 ; + 3 µg/L pour les vins WEC 12 ; + 14 µg/L pour les vins PL. Ces écarts sont également observés pour le 2-méthylbutanoate d'éthyle et le phénylacétate d'éthyle dans une moindre mesure. L'effet de la levure sur la concentration de ces composés peut donc être important d'une souche à l'autre et pourrait avoir une influence sur la perception globale de l'arôme de ces vins.

#### **II.B.4. Les esters mineurs**

L'influence de la souche de levures sur la concentration en esters dits mineurs est présentée dans le **Tableau 31**. Elle est très variable selon la matrice, la famille voire l'ester considéré. Toutefois, de façon générale, les modalités présentant des teneurs en esters plus

importantes en fin d'élevage sont les mêmes que celles ayant les concentrations les plus élevées en fin de FA. La souche de levures est donc, là encore, le principal paramètre qui va définir le profil en esters des vins.

**Tableau 31.** Influence de la souche de levures sur la concentration en esters méthyliques, esters éthyliques à nombre impair de carbone, esters isoamyliques, cinnamates et esters mineurs dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration. La souche indiquée représente la modalité contenant significativement le plus d'ester (ANOVA suivi d'un test *post hoc* de Duncan).

	WEC 2011			WEC 2012			Pessac-Léognan			Saint-Emilion		
	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 12 mois	après FA	après FML	après 3 mois
<i>Esters méthyliques</i>												
C4C1	522D	522D	522D	NS	NS	NS	NS	NS	NS	522D	NS	522D
C6C1	522D	522D	522D	FX10	FX10	FX10	NS	NS	NS	522D	522D	522D
C8C1	FX10	522D / FX10	522D / FX10	FX10	FX10	FX10	NS	FX10	FX10	522D	522D	522D
C10C1	NS	522D / FX10	522D / FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	FX10	522D	522D	522D
<i>Esters éthyliques à nombre impair de carbone</i>												
C5C2	522D	NS	FX10	NS	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D
C7C2	522D / XR	522D	522D	XR	522D / XR	522D / XR	522D	522D	522D	522D	522D	522D
C9C2	522D / XR	NS	522D	XR	522D / XR	NS	522D	522D	522D	522D	522D	522D
<i>Esters isoamyliques</i>												
C4iC5	NS	522D	522D	522D	522D	522D	522D	NS	522D	522D	522D	522D
C6iC5	NS	FX10	FX10	XR	522D	FX10	NS	NS	FX10	522D	522D	522D
C8iC5	NS	NS	FX10	XR / FX10	522D	FX10	FX10	FX10	FX10	522D	522D	522D
<i>Cinnamates et esters mineurs</i>												
hexC2	NS	NS	XR / FX10	FX10	FX10	FX10	NS	NS	NS	522D	522D	522D
C6iC4	FX10	522D / FX10	NS	NS	FX10	FX10	NS	FX10	FX10	522D	NS	NS
gerC1	FX10	522D	FX10	XR	XR	XR	NS	NS	FX10	522D	XR	NS
dhCinnC2	522D	NS	XR / FX10	522D / XR	522D / XR	522D	522D	522D	522D	522D	522D	522D
CinC2	FX10	NS	FX10	XR	NS	XR / FX10	NS	FX10	FX10	XR	XR	XR

NS : non significatif

## II.C. Discussion

Le dosage de 32 esters dans 19 échantillons de vins, fermentés par 3 souches de levures différentes, à plusieurs étapes de leur élaboration a permis de mettre en évidence l'influence majeure de la souche de levures sur la concentration des composés de cette famille chimique. S'il était déjà établi depuis plusieurs années que les esters étaient principalement synthétisés par les levures au cours de la FA, ce bilan global montre ici que l'impact de la souche perdure au cours du temps et que les autres étapes de la vinification n'ont que peu d'influence sur leurs concentrations.

L'effet de la matrice a également pu être étudié grâce à ces quatre expérimentations réalisées sur trois sites bordelais différents à travers deux millésimes. De façon générale, le même

impact de la souche de levures a été observé, quelle que soit la matrice utilisée. En revanche, les concentrations absolues en esters, principalement EEAG et AAS, varient selon les expérimentations. Les modalités vinifiées au WEC 12 présentent des concentrations en esters 3 à 7 fois supérieures par rapport aux autres expérimentations. Ces différences pourraient être dues à la thermovinification, technique qui consiste à chauffer la vendange à 70-75 °C pendant un laps de temps très court (30 à 40 minutes), à la pressurer, à la refroidir et à la vinifier en phase liquide après clarification. Selon plusieurs études, cette technique donne des vins plus fruités et plus riches en esters, probablement grâce à la libération importante de précurseurs (Fischer *et al.*, 2000 ; de Andrade Neves *et al.*, 2014). Néanmoins, les concentrations en esters branchés ne semblent pas être affectées par la technique de thermovinification. La disponibilité en substrat ne semble donc pas être un facteur limitant de la synthèse de cette famille d'esters par les levures au cours de la FA.

Dans leur ensemble, les esters éthyliques d'acides gras sont davantage synthétisés par les levures **522D** et **FX10**. De façon plus détaillée, il existe certaines différences au niveau de leur métabolisme, en fonction de l'ester considéré. Le propionate d'éthyle est synthétisé en plus grande quantité par la levure **522D**, quelle que soit la matrice tandis que les autres esters semblent davantage synthétisés par la levure **FX10**. Ces résultats suggèrent que le propionate d'éthyle emprunte une voie de synthèse différente des EEAG. Les autres esters à nombre impair de carbone sont par ailleurs eux aussi synthétisés en plus grande quantité par la levure **522D**. En outre, la concentration en propionate d'éthyle augmente au cours du temps pour certains vins (WEC 12 et PL) alors que la tendance est plutôt à une diminution pour les esters d'acides gras. Des résultats similaires ont également été observés par Antalick *et al.* (2014). Ils suggèrent que le propionate d'éthyle emprunte la même voie que les acides branchés, dérivant du métabolisme des acides aminés. Dans tous les cas, et quel que soit le temps de prélèvement, les concentrations en EEAG sont inférieures aux seuils de perception de chaque ester considéré. Les écarts observés entre deux modalités significativement différentes pour un ester donné semblent assez faibles (200 µg/L maximum) et il semble peu probable que cet écart puisse être perçu sensoriellement. Il serait toutefois plus juste de parler ici du seuil différentiel qui définit la limite en dessous de laquelle un individu ne parvient plus à différencier deux stimulations. A notre connaissance, ces seuils n'ont cependant jamais été déterminés. Il reste néanmoins peu probable que ces esters jouent individuellement un rôle direct sur les écarts de perception de l'arôme fruité de deux modalités différentes. Ces

différences semblent également trop faibles pour induire seules des modulations de la note fruitée, au regard des études sur les interactions perceptives (Pineau *et al.*, 2009).

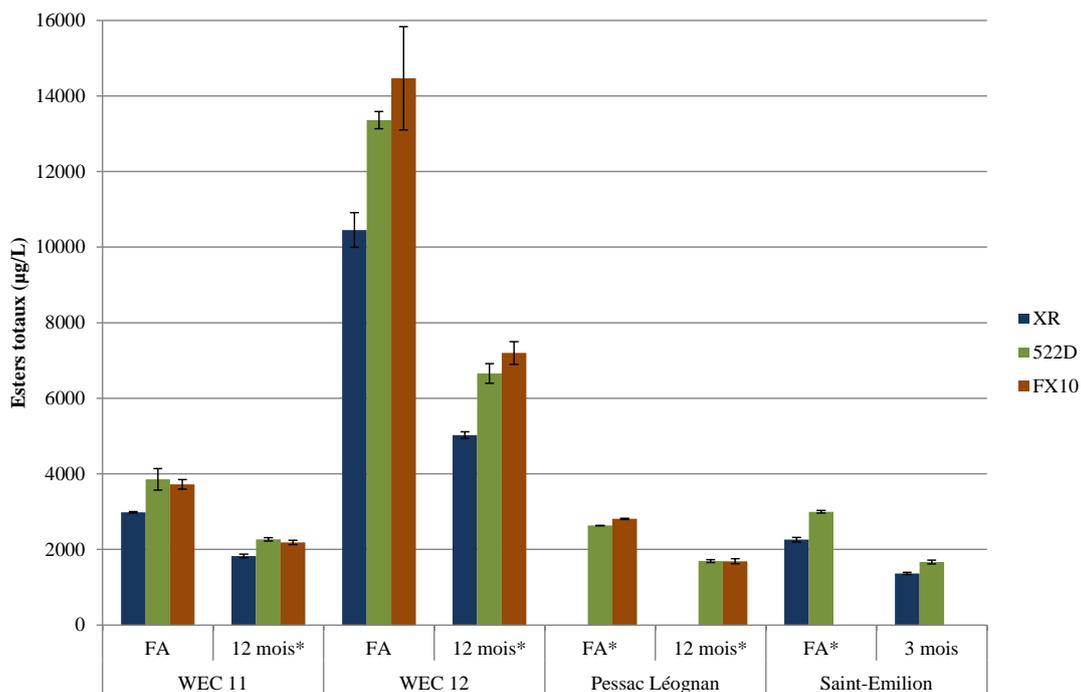
Les acétates d'alcools supérieurs, aux notes plus lourdes que les EEAG, participent grandement à l'arôme fermentaire des vins. S'ils sont eux aussi principalement synthétisés au cours de la FA par les levures, leur hydrolyse rapide au cours du vieillissement en fait surtout des marqueurs de l'arôme fruité des vins jeunes. Le facteur limitant de leur synthèse est génétique (Sumbly *et al.*, 2010) et la souche de levures apparaît en ce sens comme un paramètre important. En effet, pour toutes les expérimentations mises en place, les levures **522D** et **FX10** ont synthétisé significativement plus d'acétates que la souche **XR**. Ces écarts de concentration en esters perdurent au cours du temps puisqu'après 12 mois de vieillissement, les vins fermentés par ces dernières ont des teneurs en acétates plus élevées que les vins fermentés par la souche **XR**. L'acétate d'isoamyle est le seul ester présent en quantité nettement supérieure à son seuil de perception (de 20 à 1000 fois plus) et pouvant de fait avoir un impact directement perceptible sur l'arôme de ces vins. Les différences de concentration entre les modalités "**FX10**" et "**522D**", contenant le plus d'acétate d'isoamyle, et les modalités "**XR**" sont elles aussi nettement supérieures à son seuil de perception et devraient donc être perceptibles. Parmi les autres acétates, seuls l'acétate d'hexyle et l'acétate de 2-phényléthyle présentent des concentrations assez élevées pour prétendre jouer un rôle dans la modulation de l'arôme fruité, sans doute *via* des phénomènes de synergie avec d'autres molécules aromatiques (Pineau, 2007).

Les esters branchés sont en partie synthétisés par les levures pendant la FA mais également au cours du vieillissement à partir des acides branchés correspondant. Dans toutes les modalités testées, la levure **522D** a synthétisé significativement plus d'esters branchés que les levures **FX10** ou **XR**. Leurs concentrations se retrouvent par ailleurs supérieures dans les vins fermentés par la souche **522D** après plusieurs mois d'élevage. D'après Pineau (2007), ces composés seraient particulièrement impliqués dans les interactions perceptives à l'origine de la modulation de l'arôme fruité des vins. De faibles variations dans leurs concentrations, de l'ordre de quelques microgrammes par litre, suffisent à moduler l'arôme fruité des vins, même si elles se trouvent bien au-dessous du seuil de perception de ces esters. Par exemple, une addition de 2-méthylbutanoate d'éthyle à de faibles niveaux (3 µg/L soit une teneur passant de 2 à 5 µg/L) dans un vin rouge reconstitué est perceptible par un panel (Pineau, 2007). Les variations observées entre les différentes modalités à la fin de chaque expérimentation sont de l'ordre du microgramme voire de la dizaine de microgrammes par litre, dépassant parfois le seuil de perception de l'ester étudié. C'est notamment le cas pour l'isobutanoate et

l'isovalérate d'éthyle et le 2-méthylbutanoate d'éthyle qui participent aux notes "fruits noirs" / "fruits confiturés" des vins rouges (Pineau *et al.*, 2009 ; Lytra *et al.*, 2014b). Des différences sensorielles devraient alors être perceptibles entre un vin fermenté par la souche **522D** et la souche **FX10** ayant synthétisé le moins d'esters branchés.

Les autres esters, méthyliques, éthyliques à nombre impair de carbone, isoamyliques et cinnamates, ne sont présents qu'en faible quantité dans les vins dosés (de l'ordre du microgramme, voire nanogramme par litre) et semblent s'hydrolyser au cours du temps. De récents travaux montrent des résultats similaires et suggèrent que ces esters pourraient suivre le même schéma que les EEAG (Antalick *et al.*, 2014). Une influence de la souche de levures sur leur concentration est en effet observée dès la fin de la FA. Elle n'est toutefois pas nécessairement la même que pour les EEAG et dépend beaucoup de la matrice et de l'ester considéré. Des études plus approfondies sur le métabolisme de ces esters mineurs permettraient de mieux comprendre l'influence de ces différents paramètres sur leur synthèse. Cependant, les différences observées d'une modalité à l'autre sont très faibles (de l'ordre du nanogramme ou microgramme par litre maximum) et il est raisonnable de penser qu'ils ne puissent pas être impliqués de façon directe dans la modulation de la note fruitée. De plus, leurs implications dans des phénomènes de synergie n'ont jamais été mentionnées.

De façon plus générale, ces travaux ont permis de mettre en évidence l'influence importante de la souche de levures sur la concentration en esters. Même après plusieurs mois de vieillissement, et malgré plusieurs phénomènes pouvant moduler leur concentration (intervention des BL, hydrolyse chimique), la teneur en esters totaux (trente-deux) reste marquée par la souche de levures ayant réalisé la FA (**Figure 17**). Ces résultats analytiques devront être confrontés à des données sensorielles afin de vérifier si les différences organoleptiques suggérées par les écarts de concentration en esters sont effectivement perçus par un panel d'experts. A titre d'exemple, les modalités **FX10** et **522D** devraient notamment être perçues comme plus fruitées que les modalités **XR**. Cette étude sensorielle sera présentée au chapitre 3.



\*réplicats analytiques

**Figure 17.** Teneurs moyennes en esters totaux (trente-deux) (exprimées en µg/L) ± intervalle de confiance à 5 % entre les réplicats observées dans les différents vins après FA et à la fin de chaque expérimentation en fonction de la souche de levures utilisée.

### III. Influence limitée de la fermentation malolactique et de la souche de bactéries lactiques sur les teneurs en esters

L'influence de la souche de BL sur la concentration de certains composés avait déjà été évoquée dans le chapitre 1 dans un vin ayant déjà réalisé quelques mois d'élevage. Le dosage de plusieurs esters à différentes étapes de l'élaboration des vins confirme ces premières constatations. Les vins SE n'ayant pratiquement pas subi la période de vieillissement, nous n'exposerons dans cette partie que les résultats obtenus à partir des vins WEC 11, WEC 12 et PL.

### III.A. Observation d'un effet de la souche de bactéries lactiques sur la teneur en certains esters pendant l'élevage de vins de Cabernet Sauvignon

#### III.A.1. Résultats

Les résultats de l'ANOVA pour le facteur "bactéries" des données collectées pour les EEAG et les AAS dans les vins WEC 11, WEC 12 et PL, après FML et pendant le vieillissement, sont présentés dans le **Tableau 32**. Des résultats similaires ont également été observés pour les esters méthyliques et esters éthyliques à nombre impair de carbone. Cependant, leur influence sur la modulation de la note fruitée étant probablement faible, ils ne seront pas évoqués dans cette partie.

Toutes les FML étudiées ne conduisent qu'à de faibles variations de la teneur en esters. A l'exception du propionate d'éthyle dont la concentration augmente légèrement, celle des autres esters diminue de façon proportionnelle à la taille de leur chaîne carbonée (annexe 2). Peu de différences significatives entre les modalités fermentées par les souches **B28** ou **450** ont pu être mises en évidence à la fin de la FML.

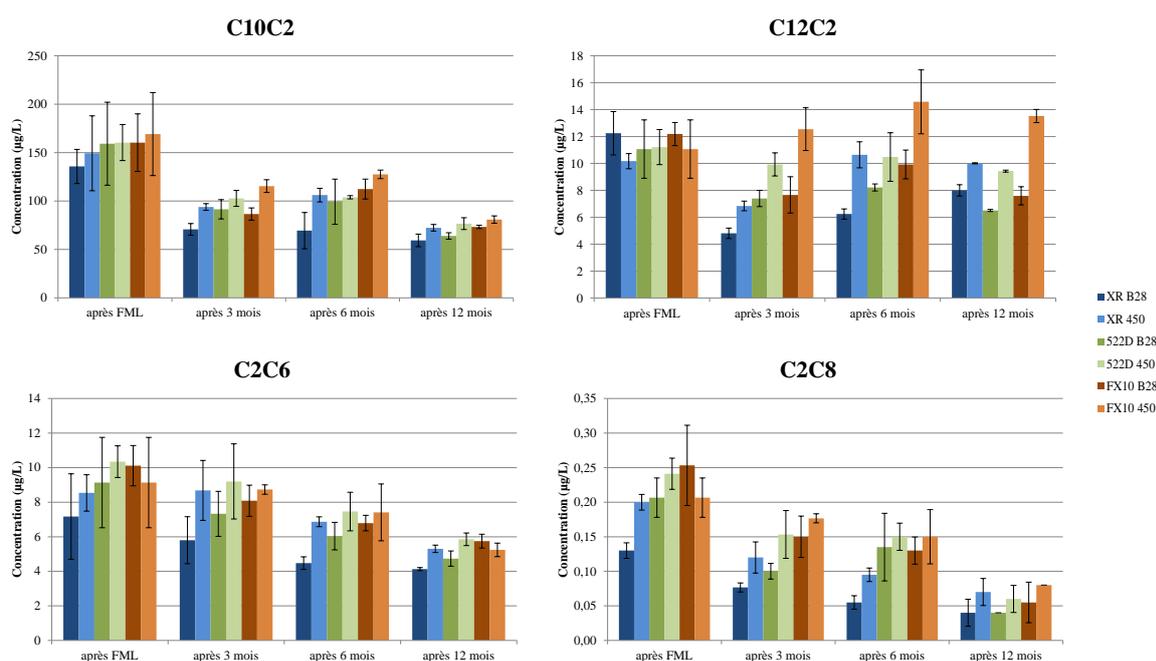
**Tableau 32.** Niveaux de significativité de l'ANOVA à un facteur (bactéries) pour les esters éthyliques d'acides gras et les acétates dosés dans les vins WEC 11, WEC 12 et PL à 5 étapes de leur élaboration.

	WEC 2011				WEC 2012				Pessac Léognan			
	après FML	après 3 mois	après 6 mois	après 12 mois	après FML	après 3 mois	après 6 mois	après 12 mois	après FML	après 3 mois	après 6 mois	après 12 mois
<i>Esters éthyliques d'acides gras (EEAG)</i>												
C3C2	NS	*	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C4C2	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C6C2	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***	NS
C8C2	**	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	***	NS
C10C2	NS	***	*	**	NS	NS	NS	NS	*	NS	***	***
C12C2	NS	***	**	***	NS	NS	NS	NS	NS	**	***	***
<i>Acétates d'alcools supérieurs (AAS)</i>												
C2C3	**	**	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C2iC4	***	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
C2C4	NS	NS	**	NS	**	*	*	NS	**	NS	NS	NS
C2iC5	NS	NS	NS	*	NS	*	***	NS	NS	***	NS	**
C2C6	NS	*	**	**	NS	**	***	***	NS	**	NS	***
C2C8	NS	**	NS	*	**	***	***	NS	NS	NS	*	NS
C2PhC2	*	NS	NS	NS	NS	**	***	***	*	*	**	*

\*, \*\*, \*\*\* indiquent un effet significatif à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  respectivement ; NS : non significatif.

A l'inverse, la souche de BL ayant réalisé la FML semble être un facteur influençant la dégradation de ces composés au cours de l'élevage puisque des différences significatives ont été observées entre les modalités "B28" et "450" à partir de 3 mois de vieillissement (**Tableau 32**). En outre, l'influence de la longueur de leur chaîne carbonée sur la vitesse de dégradation est confirmée.

Pour les vins WEC 11, la diminution de la teneur en esters éthyliques et en acétates est moins importante pour les vins fermentés par la souche 450 que par la souche B28 (**Figure 18**). L'écart est davantage marqué pour les esters à longue chaîne de carbone, probablement en raison de leur dégradation plus rapide. Ainsi, après 3 mois d'élevage, les vins inoculés avec la souche 450 ont des concentrations en décanoate et dodécanoate d'éthyle et en acétates d'hexyle et d'octyle significativement supérieures aux vins fermentés par la souche B28 (aux seuils de 0,01 %, 0,01 %, 5 % et 1 % respectivement), quelle que soit la souche de levures. Malgré une hydrolyse de ces composés au cours du temps, ces écarts restent perceptibles.



**Figure 18.** Teneurs moyennes en décanoate et dodécanoate d'éthyle ( $C_{10}C_2$  et  $C_{12}C_2$ ) et en acétate d'hexyle et d'octyle ( $C_2C_6$  et  $C_2C_8$ ) (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins WEC 11 après FML et au cours de l'élevage.

Le même effet "bactéries" est observé dans les vins du WEC 12. Il est cependant moins net pour les esters éthyliques mais particulièrement présent pour les acétates (**Tableau 32**). Après

3 mois d'élevage, leur hydrolyse semble, là encore, moins rapide pour les vins fermentés avec la souche **450** qui contiennent significativement plus de  $C_2C_4$ ,  $C_2iC_5$ ,  $C_2C_6$ ,  $C_2C_8$  et  $C_2PhC_2$  (aux seuils de 5 %, 5 %, 1 %, 0,1 % et 1 % respectivement). Ces différences de concentrations, dues à une vitesse de dégradation moins rapide pour les modalités "**450**", sont également observables dans les vins après 6 mois et 12 mois d'élevage.

Enfin, des teneurs différentes en esters éthyliques et acétates ont également été mises en évidence dans les vins PL en fonction de la souche de bactéries après 3, 6 et 12 mois d'élevage. Les concentrations en décanoate et dodécanoate d'éthyle et en acétates d'hexyle et d'octyle sont notamment plus élevées dans les modalités "**450**", ce qui confirme les résultats précédents.

### **III.A.2. Discussion**

Le dosage de ces 32 esters dans différents vins à plusieurs étapes de leur élaboration a également permis de mettre en évidence une influence relative de la souche de BL sur l'évolution de leur concentration au cours du temps. La teneur en esters semble peu influencée par la FML ou la souche de bactéries comme cela a pu être démontré dans plusieurs études (Matthews *et al.*, 2007 ; Antalick *et al.*, 2012). En revanche, la souche de BL pourrait être un paramètre influençant la dégradation de certains esters, notamment ceux à longue chaîne de carbone, durant le vieillissement. Cet effet étant observé dans 3 vins (et donc 3 matrices) différents, les conditions de vinification (température de FML ou d'élevage, contenant, écoulage...) qui diffèrent d'un essai à l'autre ne participent probablement pas à cet effet. Dans ce cas, les facteurs qui peuvent avoir un impact sur la vitesse de dégradation sont essentiellement le pH, la composition en substrat ou la présence d'une activité enzymatique bactérienne résiduelle.

La réaction d'hydrolyse des esters dans le vin est une hydrolyse acide et peut être influencée par le pH (Marais, 1978). Cependant, les variations de pH entre les vins étudiés dans les différents essais sont trop faibles pour influencer une telle réaction (de l'ordre de 0,1 unité pH), quel que soit le temps de prélèvement.

La composition en lipide de la membrane plasmique des BL dépend de la souche bactérienne (Garbay *et al.*, 1995). La libération de précurseurs lipidiques au moment de leur autolyse, en fin de FML pourrait modifier l'équilibre ester/acide et influencer la vitesse d'hydrolyse des esters pendant l'élevage d'une façon dépendante de la souche. La lyse des cellules

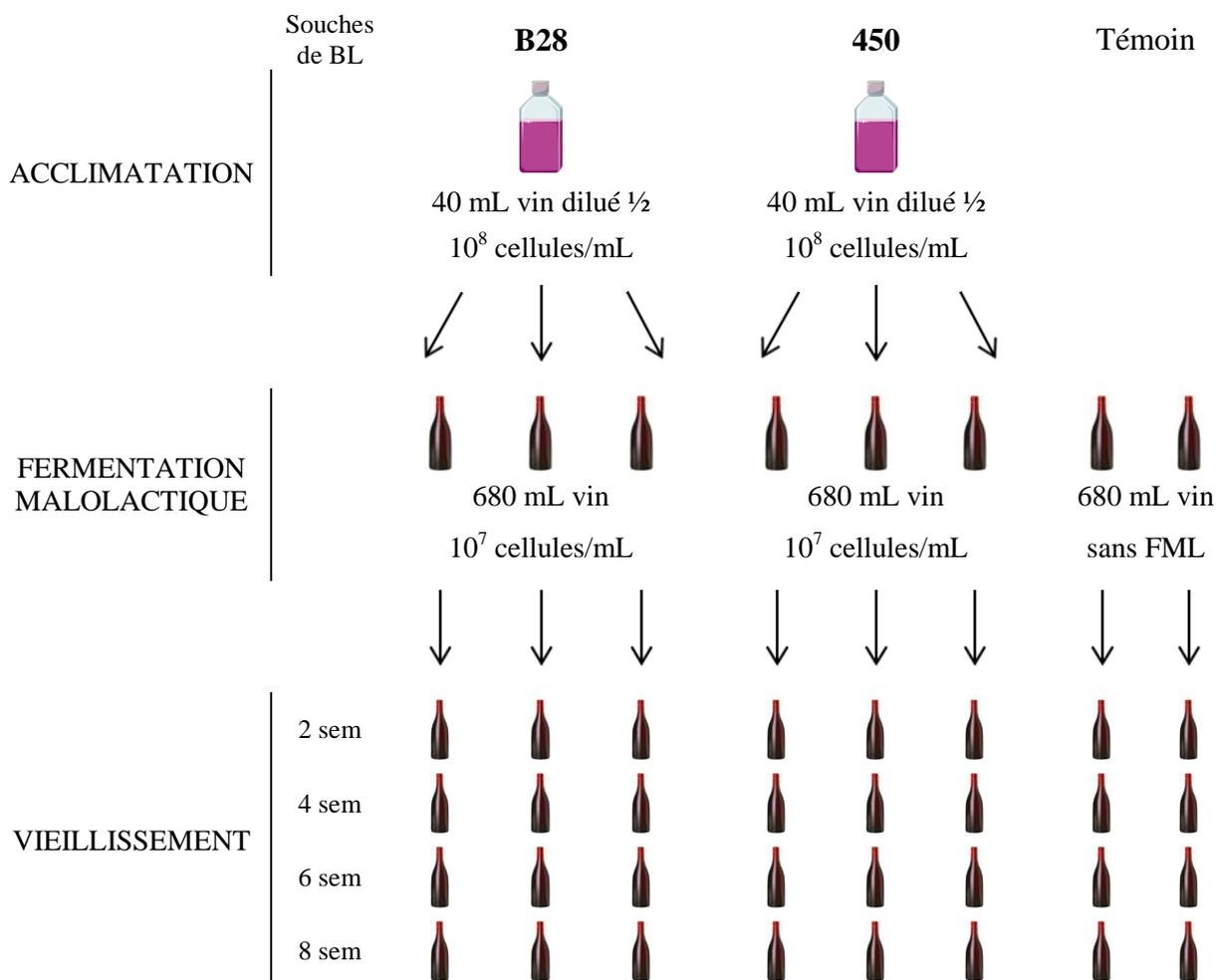
bactériennes pourrait également entraîner la libération d'enzymes, et principalement d'estérases intracellulaires, dans le milieu extracellulaire. Cette activité enzymatique résiduelle, et donc dépendante de la souche, pourrait également influencer la cinétique d'hydrolyse des esters au cours de l'élevage, à condition que ces enzymes soient actives dans les conditions du vin. Peu d'études sont disponibles quant à l'influence plus ou moins importante des lies bactériennes sur la concentration en esters au cours de l'élevage et ce point devrait être approfondi.

Cet impact *a posteriori* des BL sur la teneur en esters semble paradoxalement lié à leur métabolisme pendant la FML pour les raisons évoquées précédemment. Or, les cinétiques fermentaires des deux bactéries testées sont différentes, la souche **B28** ayant un temps de latence plus important que la souche **450**. Une étude récente a montré que le rendement de production de la souche **B28** était très inférieur à celui de la souche **450** (moins de 5 g/L et 75 g/L respectivement) (Favier, 2012). Ce rendement correspond à la masse de lyophilisat ramenée à la concentration usuelle de  $10^{11}$  cellules/g produites par litre de production. L'étape de congélation-lyophilisation serait l'étape critique de la production de souche lyophilisée. L'inoculation dans le vin est la seconde étape critique qui peut affecter la survie cellulaire et le bon déroulement de la FML. Après réhydratation et ensemencement à  $10^7$  cellules/mL dans un vin modèle, la souche **B28** montre un taux de survie de 100 %, contre 35 % pour la souche **450** (Favier, 2012). Lors de nos différents essais, l'ensemencement réel n'a peut-être pas été réalisé à la même concentration entre les deux modalités. Ce paramètre pourrait expliquer le temps de latence plus important observé pour la souche **B28** ainsi que les différences de concentration en esters mises en évidence au cours de l'élevage.

### **III.B. Etude de l'influence de la souche de bactéries lactiques sur l'évolution de la concentration en esters au cours de l'élevage. Modélisation au laboratoire**

L'objectif de cette partie est donc d'étudier si l'effet "bactéries" observé dans plusieurs vins au cours de l'élevage est dû à des métabolismes microbiens distincts pendant la FML pouvant avoir un impact au moment de l'élevage, ou à des cinétiques fermentaires différentes liées à la population bactérienne à l'inoculation. Des FML ont été réalisées au laboratoire avec les souches de BL utilisées dans les expérimentations précédentes. Les vins obtenus ont subi

une période de "vieillessement", et l'ensemble des modalités a été conduit en triplicat. Le plan expérimental complet est présenté **Figure 19**.



**Figure 19.** Plan expérimental des micro-vinifications réalisées en laboratoire.

### III.B.1. Protocole de la micro-vinification

Le vin utilisé pour cet essai est issu du même moût thermovinifié que les vins WEC 2012 précédemment décrits. Après fermentation alcoolique, le vin a été stabilisé par filtration sur plaques de 0,60 µm (LAFFORT L15) puis conservé à 4 °C. Deux filtrations stérilisantes ont été réalisées : une première sur des plaques de 2 µm (LAFFORT L5) puis une deuxième sur plaques de 0,35 µm (LAFFORT L60) afin d'éliminer les bactéries indigènes. Les souches de BL utilisées pour réaliser la FML sont **B28** et **450**.

### *III.B.1.a. Acclimatation des bactéries et dénombrement de la population bactérienne par épifluorescence*

La phase d'acclimatation permet de réduire le choc subit par les BL consécutivement au changement de milieu et améliore la viabilité cellulaire. Elle consiste à placer les souches bactériennes dans du vin dilué au demi par de l'eau osmosée, pendant 24h à 20 °C.

Une population bactérienne équivalente à  $10^6$  cellules/mL est nécessaire pour enclencher le départ de la FML et par mesure de précaution, le taux d'inoculation des vins a été fixé à  $10^7$  cellules/mL. Lors de la phase d'acclimatation des bactéries, le risque de mortalité a été pris en compte et la population à acclimater a été surestimée aux alentours de  $10^9$  cellules/mL. Pour chaque souche, un flacon stérile de 50 mL contenant 20 mL d'eau osmosée stérile, 20 mL de vin filtré et 5 g d'Energizer® (Laffort, Floirac) est inoculé avec 1 g de bactéries lyophilisées et placé dans une étuve à 20 °C pendant 24h. La population théorique est ainsi de  $2,5 \cdot 10^9$  cellules/mL.

Après 24h, un comptage bactérien par épifluorescence à double coloration est réalisé afin de déterminer la biomasse réelle. Cette méthode permet l'estimation immédiate de la population bactérienne totale d'un échantillon et la différenciation des cellules viables ou non (Favier, 2012). Le principe de la technique repose sur la dégradation d'un substrat, l'acétate de fluorescéine en un fluorochrome, la fluorescéine, par une estérase intracellulaire. Les cellules viables sont caractérisées par une activité estérasique et une intégrité membranaire. Elles émettent donc une lumière de fluorescence verte et peuvent être facilement dénombrées à l'aide d'un microscope. Pour les cellules non viables, la détection est basée sur l'utilisation d'une substance lipophile, l'iodure de propidium, qui pénètre dans la cellule à travers la membrane ayant perdu son intégrité. Il se fixe aux acides nucléiques de la cellule, et émet alors une fluorescence rouge détectable au microscope.

La limite de détection de la méthode étant de  $10^3$  cellules/mL, l'échantillon de vin est dilué au 1/1000 avant d'être filtré sur une membrane de porosité de  $0,4 \mu\text{m}$  (Chemunex, Marcy l'Etoile, France). Cette membrane est ensuite déposée sur un support imbibé d'une solution de marquage composée de 500  $\mu\text{L}$  de solution tampon Chemsol B16, de 2,5  $\mu\text{L}$  d'acétate de fluorescéine ChemChrome V6 (Chemunex), et de 5  $\mu\text{L}$  d'iodure de propidium en solution à 1 mg/L (Sigma-Aldrich). Le tout est incubé pendant 25 minutes à 30 °C dans l'obscurité totale. La membrane est ensuite déposée entre lame et lamelle et observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus BX51) équipé du filtre approprié (Olympus 467803) au grossissement x1000. Les cellules sont comptées dans 10 ou 20 champs puis la valeur

moyenne est multipliée par le nombre de champs composant la membrane, donnant ainsi le nombre de cellules viables et non viables contenues dans l'échantillon filtré.

La population bactérienne dénombrée en fin de phase d'acclimatation pour chaque modalité est de :

- souche **B28** :  $5,86 \cdot 10^8$  cellules/mL
- souche **450** :  $6,9 \cdot 10^8$  cellules/mL

### *III.B.1.b. Inoculation des bactéries et suivi de la fermentation malolactique*

Pour cette expérimentation, les FML sont réalisées en triplicat dans des bouteilles en verre stériles de 750 mL bouchées avec du coton cardé. Un volume de 680 mL de vin total est inoculé en BL à hauteur de  $10^7$  cellules/mL soit pour chaque modalité un volume de vin acclimaté de :

- souche **B28** : 11,6 mL
- souche **450** : 9,86 mL

Deux bouteilles supplémentaires n'ont pas étéensemencées afin d'être utilisées comme témoin n'ayant pas réalisé la FML.

Toutes les bouteilles sont ensuite inertées au CO<sub>2</sub> (0,5 bar, 30 secondes) puis placées dans une étuve à 20 °C, sans agitation, pour la durée de la FML.

Pour suivre l'évolution de la FML, la teneur en acide L-malique est mesurée quotidiennement (laboratoire Sarco). Un dénombrement bactérien par microscopie à épifluorescence est effectué deux jours après le lancement des FML afin de contrôler l'évolution de la population. Le contrôle d'implantation est réalisé à 50 % de la FML comme décrit pour les expérimentations en chai. Chaque bouteille est systématiquement inertée au CO<sub>2</sub> (0,5 bar, 30 secondes) à la suite d'un prélèvement afin d'éviter le développement de microorganismes aérobies indésirables. La fermentation est considérée comme achevée lorsque la concentration en acide L-malique est inférieure à 0,01 g/L.

### *III.B.1.c. Conservation des vins et dosage des esters*

A la fin de la FML, les vins sont stabilisés par ajout de SO<sub>2</sub> à 5 g/hL et chaque modalité est aliquotée dans des flacons en verre brun stériles de 60 mL. Afin de simuler le vieillissement des vins et d'accélérer l'hydrolyse des esters au cours du temps, les flacons sont placés dans une étuve à 31 °C (Marais et Pool, 1980). Un flacon est prélevé toutes les deux semaines afin de doser la concentration en esters éthyliques d'acides gras et acétates d'alcools supérieurs dans les différentes modalités.

La méthode de dosage des esters par SPME est décrite dans le paragraphe II. 2 de ce chapitre.

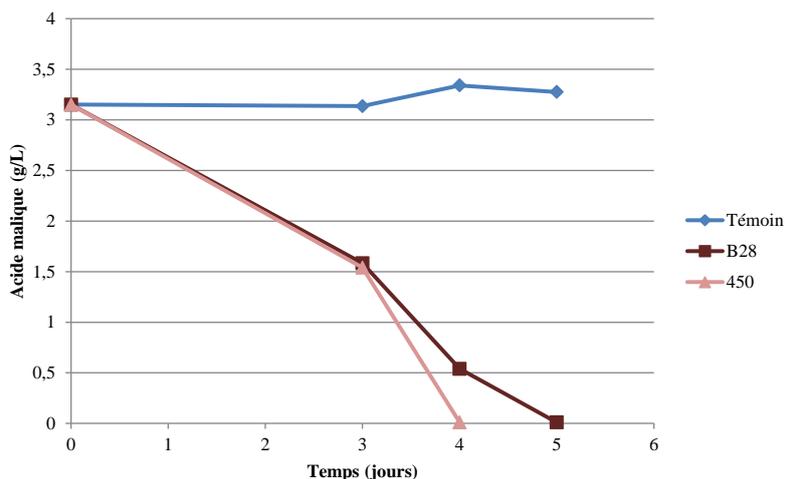
### *III.B.2. Résultats et discussion*

#### *III.B.2.a. Cinétiques des fermentations et analyses œnologiques classiques*

Les cinétiques des fermentations malolactiques ainsi que les principaux paramètres œnologiques mesurés dans les vins après FA et après FML sont présentés respectivement à la **Figure 20** et au **Tableau 33**. Etant donné qu'aucune différence de n'a été observée entre les triplicats de chaque modalité, nous avons choisi de ne présenter qu'une cinétique fermentaire par modalité.

Au cours de la FML, l'acide malique a été entièrement dégradé (concentration < 0,1 g/L) dans les modalités inoculés avec les deux souches de BL. Un dénombrement de la population bactérienne 48h après ensemencement ne révèle pas de différence significative entre les deux modalités inoculées (souche **B28** : 8,5.10<sup>6</sup> cellules/mL ; souche **450** : 7,2.10<sup>6</sup> cellules/mL). Aucune BL n'a pu être identifiée et comptabilisée dans la modalité témoin. Les cinétiques de fermentation des deux bactéries ne présentent pas de différences. Néanmoins, la souche **450** a achevé la FML en 4 jours, contre 5 pour la souche **B28**.

Comme on peut s'y attendre, la modalité témoin, n'ayant pas subi la FML présente une acidité totale plus élevée et un pH plus bas (**Tableau 33**). Aucune différence significative n'est observée entre les modalités ayant réalisé la FML pour ces deux paramètres. Le vin témoin présente également une acidité volatile moins élevée que le vin fermenté avec la souche **450**, lui-même moins élevé que celui inoculé avec la bactérie **B28**.



**Figure 20.** Suivi cinétique des FML par le dosage de l'acide malique (exprimé en g/L) pour une fermentation de chaque modalité.

**Tableau 33.** Principaux paramètres œnologiques des vins après FA et FML. Les données représentent la moyenne des réplicats pour chaque modalité ± l'écart type.

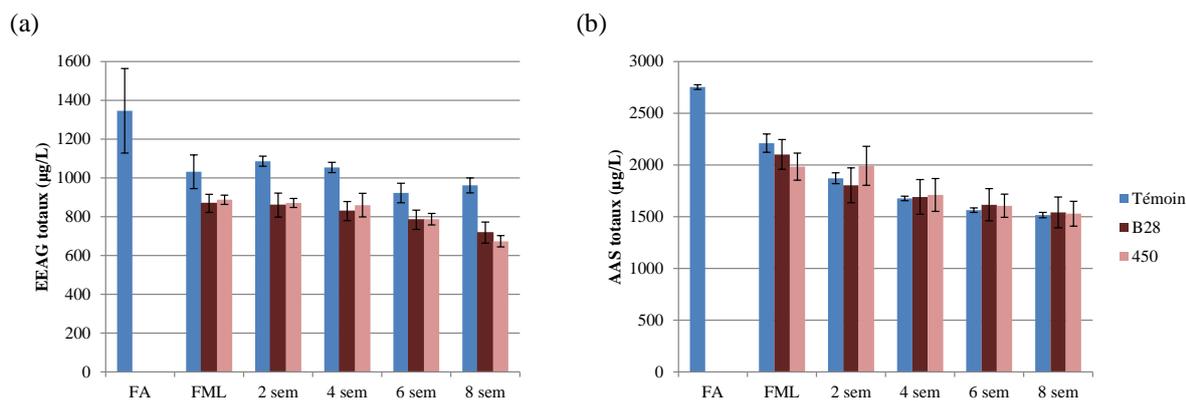
Modalité	Degré alcoolique (% v/v)	Acidité totale (g/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Acidité volatile (g/L ac. acétique)	pH	SO <sub>2</sub> total (mg/L)	SO <sub>2</sub> libre (mg/L)
après FA	12,06	nd	nd	3,63	38	nd
après FML						
450	11,92 ± 0,05	2,7 ± 0,1 <b>b</b>	0,42 ± 0,02 <b>b</b>	3,73 ± 0,01 <b>a</b>	4 ± 1 <b>b</b>	2 ± 0 <b>b</b>
B28	12,09 ± 0,01	2,8 ± 0,0 <b>b</b>	0,67 ± 0,02 <b>a</b>	3,75 ± 0,01 <b>a</b>	7 ± 1 <b>a</b>	5 ± 1 <b>a</b>
Témoin	12,09 ± 0,01	3,8 ± 0,0 <b>a</b>	0,29 ± 0,01 <b>c</b>	3,54 ± 0,01 <b>b</b>	5 ± 1 <b>b</b>	2 ± 0 <b>b</b>

nd : non déterminé

Les valeurs avec différentes lettres (a-c) dans la même colonne sont significativement différentes selon le test *post hoc* de Duncan (P <0,05)

### III.B.2.b. Concentration des esters au cours du temps et effet de la souche bactérienne

Les teneurs moyennes en esters éthyliques d'acides gras et en acétates d'alcools supérieurs totaux dosées dans les différentes modalités après FML et 2, 4, 6 et 8 semaines de vieillissement dans une étuve à 31 °C sont présentées **Figure 21**. La concentration de chaque ester dans les vins ayant réalisés la FML et leur évolution au cours du temps sont disponibles dans le **Tableau 34**.



**Figure 21.** Teneurs moyennes (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les réplicats en esters éthyliques d'acides gras (a) et acétates d'alcools supérieurs (b) observées dans les différentes modalités au cours de leur élaboration et selon la souche de BL utilisée pour réaliser la FML.

Pour les deux modalités testées, la concentration en EEAG et AAS diminue après la FML. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les modalités "B28" et "450" en fin de fermentation, et ce pour l'ensemble des esters dosés. La concentration en esters dans la modalité témoin n'ayant pas réalisé la FML diminue également. Néanmoins, on observe une diminution de la teneur globale en EEAG plus importante dans les vins ayant réalisé la FML par rapport au vin témoin. Plus précisément, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les trois modalités (témoin, B28 et 450) pour les concentrations en butanoate et hexanoate d'éthyle, quel que soit le temps de prélèvement. En revanche, des écarts ont été observés pour l'octanoate, le décanoate et le dodécanoate d'éthyle. Après FML, l'échantillon témoin contient des concentrations significativement supérieures en ces trois esters par rapport aux modalités "B28" et "450" (aux seuils de 1 %, 1 % et 0,1 % respectivement). Ces écarts entre échantillons témoin et fermentés sont également observables pendant la période de conservation (au seuil minimum de 1 %). Ces résultats suggèrent une dégradation plus importante de ces composés due au métabolisme bactérien au cours de la FML.

Sans surprise, l'hydrolyse des esters au cours du temps apparaît plus rapide pour les acétates que pour les esters éthyliques. En revanche, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les vins fermentés par la souche B28 ou 450, quel que soit l'ester considéré.

**Tableau 34.** Concentrations moyennes en EEAG et AAS ± écart type des triplicats (exprimées en µg/L) déterminées dans les vins inoculés par les BL **B28** ou **450**, après FML et après 2, 4, 6 et 8 semaines de conservation. Les données ont été traitées par ANOVA à un facteur (bactéries).

	Fin FML		2 semaines		4 semaines		6 semaines		8 semaines						
	B28	450	B28	450	B28	450	B28	450	B28	450					
C4C2	115 ± 9	113 ± 7	NS	114 ± 10	112 ± 6	NS	111 ± 9	110 ± 9	NS	111 ± 10	113 ± 9	NS	121 ± 6	113 ± 7	NS
C6C2	252 ± 17	255 ± 9	NS	259 ± 20	251 ± 8	NS	231 ± 18	240 ± 20	NS	219 ± 13	230 ± 16	NS	204 ± 16	188 ± 15	NS
C8C2	363 ± 18	383 ± 6	NS	358 ± 30	375 ± 7	NS	357 ± 21	380 ± 24	NS	333 ± 26	335 ± 4	NS	290 ± 30	270 ± 5	NS
C10C2	49 ± 2	51 ± 2	NS	39 ± 2	42 ± 1	NS	52 ± 1	56 ± 8	NS	52,3 ± 0,8	41 ± 1	NS	45 ± 3	49 ± 2	NS
C12C2	1,42 ± 0,03	1,32 ± 0,05	NS	0,98 ± 0,07	0,98 ± 0,03	NS	1,39 ± 0,03	1,3 ± 0,1	NS	1,21 ± 0,04	0,67 ± 0,01	NS	0,96 ± 0,05	0,98 ± 0,09	NS
C2C3	17,6 ± 0,3	16 ± 1	NS	15,4 ± 0,5	16,4 ± 0,1	NS	15,0 ± 0,8	15,1 ± 0,6	NS	15,4 ± 0,6	14,4 ± 0,5	NS	14,2 ± 0,9	14 ± 1	NS
C2C4	64 ± 4	60 ± 4	NS	56 ± 5	58 ± 5	NS	54 ± 5	54 ± 4	NS	54 ± 5	52 ± 4	NS	52 ± 5	49 ± 4	NS
C2C4	2,07 ± 0,04	2,0 ± 0,2	NS	1,9 ± 0,2	1,65 ± 0,06	NS	1,7 ± 0,1	1,72 ± 0,03	NS	1,88 ± 0,06	1,77 ± 0,04	NS	1,4 ± 0,1	2,6 ± 0,6	NS
C2C5	1745 ± 129	1635 ± 98	NS	1459 ± 154	1514 ± 151	NS	1359 ± 152	1374 ± 132	NS	1307 ± 144	1301 ± 96	NS	1246 ± 130	1248 ± 105	NS
C2C6	24 ± 2	23 ± 2	NS	20 ± 2	21 ± 2	NS	18 ± 2	19 ± 2	NS	17 ± 2	17 ± 2	NS	15 ± 2	14 ± 1	NS
C2C8	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	NS	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	NS	0 ± 0	0 ± 0	NS	0 ± 0	0 ± 0	NS	0 ± 0	0 ± 0	NS
C2PhC2	248 ± 10	248 ± 26	NS	251 ± 8	381 ± 30	NS	242 ± 8	246 ± 20	NS	221 ± 4	219 ± 10	NS	213 ± 10	200 ± 9	NS

NS : non significatif

La réalisation de FML au laboratoire a permis de contrôler de façon plus rigoureuse la mise en place et le bon déroulement de ces fermentations. Les paramètres pouvant influencer la dégradation des esters tels que la population bactérienne ou le pH ont été mesurés à différentes étapes de l'expérimentation. En régulant de façon similaire l'implantation des BL, aucune différence significative entre les deux modalités inoculées n'a été mise en évidence, écartant de fait leur impact potentiel.

Après FML, aucune différence significative dans la teneur en acétates n'a été observée entre les trois modalités. En revanche, la concentration en esters éthyliques, et plus particulièrement en octanoate, décanoate et dodécanoate d'éthyle est significativement plus élevée dans la modalité témoin n'ayant pas subi la FML. Ces résultats suggèrent une activité hydrolytique des estérases des BL. Des résultats similaires avaient déjà été mis en évidence par Antalick (2010) pour les esters à longue chaîne carbonée. De plus, Sumbly *et al.* (2013a) ont récemment montré le rôle de synthèse mais aussi d'hydrolyse de deux enzymes liées au métabolisme d'*O. oeni*.

Une diminution de la teneur en esters éthyliques et acétates a été observée au cours de la conservation des échantillons. La concentration moyenne en EEAG a diminué d'environ 20 % pour les deux modalités ayant réalisé la FML, et d'environ 25 % pour les acétates. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude qui, dans des conditions similaires (pH = 3,7, température de vieillissement : 30 °C), a montré, 8 semaines après la FML, une diminution de la teneur en esters éthyliques et en acétates de 15 % et 30 % respectivement (Marais et Pool, 1980).

Dans les conditions de cette étude, aucun effet de la souche de bactéries sur la concentration en esters n'a pu être mis en évidence après FML ou au cours de la conservation.

### III.C. Discussion

L'influence de la souche de BL sur la vitesse de dégradation de certains esters au cours du vieillissement a été étudiée dans plusieurs vins issus de vinifications classiques en chai ou de micro-vinifications réalisées en laboratoire.

Dans les vins WEC 11, WEC 12 et PL, les modalités fermentées par la souche **B28** contenaient significativement moins d'esters à longue chaîne de carbone que les modalités inoculées avec la souche **450** dans les différents prélèvements effectués au cours du vieillissement. Le principal biais potentiel mis en évidence dans ces expérimentations pouvant

être à l'origine des différences observées concernait la vitesse de fermentation. En effet, un temps de latence plus important (environ 5 jours) a été observé chez la bactérie **B28**, probablement dû à une différence de population lors de l'inoculation. La réalisation de FML en laboratoire a permis de contrôler ce paramètre et les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives entre les modalités. Il est cependant possible d'imaginer que cette absence d'effet "bactéries" soit due à une durée de l'expérimentation (et donc un temps d'élevage) trop court pour observer une quelconque différence. L'essai en laboratoire se termine en effet après 8 semaines de conservation, et après une diminution de la teneur en EEAG et acétates de 20 % et 25 % respectivement. La concentration en esters éthyliques des vins WEC 11, WEC 12 et PL a quant à elle diminué de 20 à 50 % en fonction de l'ester considéré entre la fin de la FML et 3 mois d'élevage. Les acétates d'alcools supérieurs ont, eux, diminués en moyenne de 20 à 30 % pour cette même période. Si l'essai en laboratoire aurait probablement mérité une durée d'élevage plus longue, des différences de concentrations en certains esters entre les modalités inoculées avec les bactéries **B28** ou **450** auraient néanmoins dû être observées après 8 semaines de vieillissement. L'effet "bactéries" mis en évidence dans les vins WEC 11, WEC 12, et PL semble donc principalement dû à une concentration bactérienne à l'inoculation différente.

La comparaison entre ces deux types d'expérimentation est cependant à manier avec précaution. Plusieurs paramètres pouvant influencer la vitesse d'hydrolyse des esters varient d'une étude à l'autre, comme notamment le volume de vin, le contenant ou la température d'élevage. Il serait intéressant de pouvoir confirmer ces résultats avec des FML réalisées en chai, en contrôlant mieux la population bactérienne avant inoculation.

Dans tous les cas, les différences de concentration observées entre les modalités fermentées avec la souche **B28** ou **450** sont bien loin des seuils de perception des esters concernés (de l'ordre de quelques microgrammes par litre). Ces écarts semblent également trop faibles pour induire des modulations de la note fruitée *via* des phénomènes de synergie, au regard des études sur les interactions perceptives (Pineau *et al.*, 2009). Contrairement à la souche de levures qui, comme nous l'avons démontré, pourrait être à l'origine de différences organoleptiques perceptibles entre les modalités, la souche de bactéries ne semble pas en mesure d'entraîner de telles modulations de l'arôme fruité.

## Chapitre 3 : Etude sensorielle de la modulation de l'arôme fruité par les microorganismes

L'odorat est un sens majeur de la dégustation. Il permet, dès les premiers instants, de juger de la qualité d'un vin, de l'absence ou non de défauts, de sa valeur hédonique et de sa typicité. Il paraît donc essentiel d'étudier, de façon sensorielle, l'influence de nos divers couples levures/BL sur l'arôme du vin.

Après avoir décrit succinctement l'état des connaissances concernant l'impact des microorganismes sur la modulation de l'arôme fruité des vins rouges ainsi que les différents tests d'analyse sensorielle utilisés, nous exposerons les principaux résultats sensoriels obtenus.

### I. L'arôme fruité des vins rouges, connaissances actuelles

#### I.A. Modification de l'arôme fruité des vins rouges par les microorganismes fermentaires

##### *I.A.1. Révélation de l'arôme du vin par les levures au cours de la fermentation alcoolique*

Malgré de nombreuses études mettant en évidence un effet significatif de la souche de levures sur les teneurs en divers composés aromatiques retrouvés dans les vins, leur influence sur la perception de l'arôme fruité n'a cependant été que partiellement étudiée.

L'influence de la souche de levures sur le goût et l'arôme des vins blancs a été plus largement étudiée que sur celui des vins rouges (Egli *et al.*, 1998 ; Henick-Kling *et al.*, 1998 ; Dubourdiou *et al.*, 2006 ; Marchal, 2010). Pourtant, le rôle des levures sur l'arôme variétal des vins blancs est un sujet encore mal connu, sans doute par l'ignorance des marqueurs clés de beaucoup de cépages blancs, exception faite des arômes terpéniques des cépages muscatés et de l'arôme de Sauvignon Blanc. Cependant, la levure ne libère que de faibles quantités de terpénols libres à partir des précurseurs présents dans le moût de muscat. La souche de levures utilisée pour réaliser la FA n'a donc pas beaucoup d'influence sur la composition en terpénols du vin et donc sur son arôme (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). En revanche, de nombreux

vinificateurs ont observé de façon empirique la capacité de certaines souches de *Saccharomyces* à moduler l'arôme variétal des vins de certains cépages (Sauvignon Blanc, Gewürztraminer, Riesling). Dubourdiou *et al.* (2006) ont mis en évidence que l'arôme caractéristique du Sauvignon Blanc était révélé par les levures, grâce à la libération de composés variétaux soufrés au cours de la FA (Darriet, 1993 ; Darriet *et al.*, 1995 ; Bouchilloux *et al.*, 1998). La libération de ces thiols volatils évoqués au chapitre 1 est très dépendante de la souche de levures ; il en est donc de même pour l'arôme de ces vins. L'influence de la souche de levures sur la modulation de l'arôme de vins issus de cépages non aromatiques tel que le Chardonnay a également été mise en évidence. Bien qu'on ne connaisse pas encore tous les marqueurs clés de ces vins, il pourrait s'agir d'arômes variétaux vraisemblablement libérés au cours de la FA. Henick-Kling *et al.* (1998) et Egli *et al.* (1998) ont par exemple montré que l'utilisation de levures indigènes ou de levains sélectionnés pour réaliser la FA avait un impact sur les caractéristiques sensorielles des vins de Chardonnay et de Riesling. La FA réalisée par différentes souches de levures sur des vins de Godello ou d'Alvarinho donnent également des vins différents tant par leur composition que par leurs propriétés organoleptiques (Vilanova *et al.*, 2005 ; Blanco *et al.*, 2013).

Il semblerait cependant que la souche de levures n'influe pas seulement sur les composés d'origine variétale. Molina *et al.* (2009) ont montré que des vins synthétiques fermentés par diverses souches de *Saccharomyces* étaient significativement différents d'un point de vue sensoriel. L'utilisation d'un milieu "jus de raisin", de composition chimique connue, permet d'écarter l'intervention de composés variétaux. Ces travaux montrent que l'influence des levures sur la modulation de l'arôme des vins peut aussi impliquer des composés aromatiques d'origine fermentaire. Quelques rares études relatent l'effet de la souche de levures sur la modulation de l'arôme fruité de vins de Syrah (Ugliano *et al.*, 2010) Pinot Noir (Takush et Osborne, 2012) ou de Prieto Picudo (Álvarez-Pérez *et al.*, 2012), mais de manière générale, peu d'informations sont disponibles sur l'effet "levure" en vinification en rouge.

### ***1.A.2. Modulation de l'arôme fruité par les bactéries lactiques***

L'effet de la FML, *via* la désacidification malolactique, sur le goût du vin est bien établi. Il est également reconnu qu'elle améliore la structure du vin en augmentant sa longueur en bouche et en apportant plus de rondeur (Henick-Kling *et al.*, 1994 ; Keim *et al.*, 2002).

L'influence de la FML sur l'expression aromatique est plus controversée. Les premières études sur le sujet ne montrent pas d'effet significatif de la FML sur l'arôme du vin (Rankine, 1972 ; Kunkee, 1974 ; Davis *et al.*, 1985). Des progrès dans les méthodes d'analyses sensorielles avec notamment l'utilisation de panels de dégustateurs entraînés ainsi que l'utilisation de méthodes d'analyses physico-chimiques plus performantes telles que la chromatographie en phase gazeux couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ou à l'olfactométrie (GC-O) ont permis des avancées majeures quant à l'impact sensoriel de la FML sur l'arôme des vins (McDaniel *et al.*, 1987 ; Henick-Kling, 1993 ; Henick-Kling *et al.*, 1994 ; Sauvageot et Vivier, 1997 ; Delaquis *et al.*, 2000).

Depuis les années 80, il est établi que la FML influence la composition en molécules volatiles du vin (Zeeman *et al.*, 1980). Les différentes études s'accordent sur le fait que la FML complexifie l'arôme du vin ; en revanche, il n'existe pas de consensus dans la détermination de ces modifications aromatiques. Grace à l'utilisation de la GC-O, Acree (1976) et Acree *et al.* (1984) ont montré que des zones odorantes d'un olfactogramme décrites comme "fruité" pouvaient s'intensifier après FML. De même, Keim *et al.*, (2002) ont observé une intensification de certaines zones odorantes décrites comme "framboise", "cerise" ou "pomme" ainsi qu'une augmentation globale de la note "fruits rouges" après fermentation malolactique sur des vins de Merlot. McDaniel *et al.* (1987) ont montré que certaines souches de BL peuvent entraîner une augmentation de la note fruitée des vins de Pinot Noir ; Henick-Kling *et al.* (1994) ont obtenu des résultats similaires à partir de vins de Cabernet Sauvignon. Enfin, l'augmentation de l'intensité de la note fruitée après FML a également été observée dans les vins blancs ayant subi cette deuxième fermentation comme le Chardonnay (Laurent *et al.*, 1994). D'autres études en revanche montrent que cette note fruitée peut diminuer ou ne pas être affectée par l'activité des BL. C'est le cas par exemple de Sauvageot et Vivier (1997) qui indiquent des diminutions de l'intensité des notes "fruits rouges" et "fruits noirs" après FML dans des vins de Pinot Noir ainsi qu'une baisse d'intensité des notes de pomme et d'agrumes pour des vins de Chardonnay. Des résultats similaires ont également été rapportés pour des vins de Tannat avec une diminution de l'intensité de notes fruitées telles que "cassis" et "abricot" (Gambaro *et al.*, 2001) ou encore "framboise", "mûre", "cerise", "figue sèche" et "prune" (Boido *et al.*, 2009). L'apparition de notes "fumé", "grillé" au cours de la FML entraînant un effet de masque pourrait en partie expliquer l'impression d'une diminution de la note fruitée (Keim *et al.*, 2002 ; Antalick *et al.*, 2010). Enfin, il a été montré que la FML n'entraînait pas nécessairement de modification de l'arôme fruité (McDaniel *et al.*, 1987 ; Laurent *et al.*, 1994; Henick-Kling *et al.*, 1994). Les résultats de toutes ces études mettent

finalement en évidence que l'impact de la FML sur la modulation de l'arôme fruité des vins est très dépendant de la souche de BL qui réalise la fermentation mais également de la matrice, comme par exemple l'origine du cépage.

### **I.B. L'analyse sensorielle**

La norme NF EN ISO 5492 : 2009 définit l'analyse sensorielle comme « l'examen des propriétés organoleptiques d'un produit par les organes des sens ». Il s'agit donc d'utiliser en quelque sorte l'être humain comme instrument de mesure en mettant à profit ses capacités olfactives, gustatives, visuelles et tactiles pour caractériser et évaluer des produits, notamment dans les domaines où les sens apportent une valeur ajoutée par rapport aux mesures physico-chimiques usuelles. En œnologie, la dégustation des vins par des professionnels reste indispensable tout au long des processus de vinification et d'élaboration malgré le développement de techniques analytiques toujours plus performantes. L'évaluation sensorielle complète la dégustation des vins par une normalisation de la méthodologie et permet l'obtention de résultats plus objectifs. La mise en œuvre des techniques d'analyse sensorielle repose sur l'organisation de séances de mesure, pendant lesquelles des participants sont confrontés à des produits qu'ils doivent évaluer et décrire sur un ensemble précis de critères sensoriels. Selon les objectifs poursuivis et la méthode utilisée, les testeurs ou juges peuvent être des experts, entraînés à l'évaluation des produits concernés ou des sujets novices.

Les épreuves sensorielles peuvent être divisées en trois sous familles permettant de résoudre des problèmes spécifiques et requérant des méthodologies différentes (Martin et de Revel, 1999). Les épreuves hédoniques ciblent les consommateurs afin de définir leurs préférences vis-à-vis de plusieurs produits. Les épreuves discriminatives, sur lesquelles nous reviendrons, sont utilisées pour tenter de détecter de faibles différences sensorielles entre les produits. Le panel utilisé doit être constitué d'une vingtaine de sujets qui ne requièrent pas d'entraînement particulier. Enfin, les épreuves descriptives permettent la qualification et la quantification de ces différences sensorielles. Les dégustateurs doivent avoir bénéficié au préalable d'un entraînement concernant les critères sensoriels étudiés. Trois tests descriptifs ont été utilisés dans le cadre de cette étude : le test de classement, le profil sensoriel et le Napping®.

### ***1.B.1. L'épreuve de classement***

Cette épreuve descriptive simple consiste à classer différents échantillons suivant l'intensité d'un critère sensoriel. Elle ne nécessite donc qu'un entraînement limité des juges sur le critère sensoriel considéré. Ces épreuves sont faciles à réaliser par le dégustateur : une épreuve de classement sera généralement perçue comme plus intuitive qu'une notation. Du point de vue statistique, leur interprétation est rapide et indiscutable. Le test de comparaison par paire (ISO 5495 : 2005) est l'épreuve de classement la plus simple : deux échantillons codés sont classés suivant l'intensité d'un critère sensoriel et les résultats s'interprètent en utilisant la loi Binomiale. Lorsque le nombre d'échantillons est supérieur à deux, le traitement statistique fait appel aux tests de Friedman ou de Page basés sur une analyse des rangs (NF ISO 8587 : 2006). Le test de Page est utilisé lorsqu'il existe un ordre prédéterminé des échantillons (par exemple, par l'ajout d'une concentration croissante d'un composé dans le vin). Dans le cas contraire, les résultats sont traités avec le test de Friedman.

Le test de classement permet de classer des produits les uns par rapport aux autres, en fonction de l'intensité d'un descripteur donné. On ne cherche pas ici à déterminer l'amplitude des différences mais plutôt à hiérarchiser les produits les uns par rapport aux autres.

### ***1.B.2. L'analyse descriptive quantitative***

La méthode du profil conventionnel (ISO 13299 : 2003) est une généralisation de la méthode *Quantitative Descriptive Analysis* (QDA®) développée par Stone *et al.* (1974) et Stone et Sidel (1998). Elle permet une description plus complète de la nature et de l'intensité des différentes perceptions relatives aux produits. En revanche, la mise en place d'un profil sensoriel est contraignante et nécessite un panel compétant et entraîné. Ce test est basé sur la recherche de descripteurs permettant de donner un maximum d'informations sur les propriétés sensorielles des produits étudiés puis sur la quantification de ces descripteurs (Barthélémy, 1998).

Le panel doit, dans un premier temps, générer du vocabulaire pour décrire le produit étudié ainsi que les différences entre les produits. Les termes spécifiés sont ensuite mis en commun et triés de façon à écarter les descripteurs à connotation hédonique, les synonymes et les antonymes, ainsi que les termes non pertinents afin d'obtenir un vocabulaire caractéristique pour l'ensemble du panel. Différentes méthodes statistiques peuvent être

utilisées pour réduire cette liste de descripteurs (Barthélémy, 1998 ; Lawless et Heymann, 1998). Le profil sensoriel vise à décrire avec un maximum d'efficacité une gamme de produits donnés ; le nombre de descripteurs dans la liste finale ne doit donc pas être trop important (15 à 20 en moyenne). Le panel s'accorde ensuite sur la définition de chaque descripteur et des séances d'entraînement des juges à l'utilisation des différents termes sont organisées dans le but de mettre les panélistes d'accord sur la sensation associée à chaque descripteur. La dernière étape consiste à l'évaluation par les juges des différents échantillons sur la base de la fiche commune.

De par leur structure, les données peuvent être analysées à la fois par des techniques statistiques univariées telles que des analyses de variance, des tests non paramétriques ou par des techniques multivariées comme des analyses en composante principale (ACP) ou des classifications hiérarchiques. Cependant, même si la méthode repose sur l'établissement d'un consensus et sur l'interprétation des moyennes du panel, il arrive que des désaccords demeurent entre les juges. De nombreux auteurs considèrent que les panélistes utilisent des parties différentes de l'échelle pour noter les différences entre les produits et ceux malgré la longue phase d'entraînement censée apporter un consensus entre les juges (Barthélémy, 1998 ; Barcenas *et al.*, 2004 ; Delarue et Sieffermann, 2004). Le fait d'utiliser l'échelle de façon différente ne veut cependant pas dire que les juges ne sont pas d'accords, mais les résultats obtenus peuvent s'en trouver moins nets. Pour Lawless et Heymann (1998), les données obtenues grâce au profil sont relatives et ne doivent pas être utilisées comme des données absolues.

### ***I.B.3. Le Napping®***

Le Napping® ou *Projective Mapping* a été développé afin d'obtenir une mesure de la perception globale (Risvik *et al.*, 1994 ; Risvik *et al.*, 1997). Cette méthode a déjà été utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour décrire du chocolat (Risvik *et al.*, 1994), des échantillons de soupes déshydratées (Risvik *et al.*, 1997), des barres énergétiques (King *et al.*, 1998), du fromage de brebis (Barcenas *et al.*, 2004), du jus de citron (Nestrud et Lawless, 2008) ou d'orange (Ares *et al.*, 2011) et plus récemment du vin (Perrin et Pagès, 2009).

Il s'agit pour les juges de réaliser une carte en deux dimensions en fonction des ressemblances et dissemblances entre les produits. Dans la pratique, l'ensemble des produits est présenté simultanément aux panélistes qui doivent les disposer sur une feuille de papier

(nappe) de sorte que deux échantillons perçus comme semblables sensoriellement, selon leurs propres critères, seront proches l'un de l'autre spatialement. Au contraire, deux produits perçus comme différents seront éloignés sur la feuille. Les coordonnées x et y des produits sur la feuille constituent les données.

A l'origine, les résultats étaient traités par ACP (Risvik *et al.*, 1994 ; Risvik *et al.*, 1997). Rapidement, King *et al.* (1998) puis Barcenas *et al.* (2004) suggèrent d'adapter le traitement statistique des données afin de prendre en compte les différences inter-individuelles. Pagès (2003 et 2005) propose alors de traiter les données par Analyse Factorielle Multiple (AFM) non normée afin de prendre en compte les différences entre les juges mais aussi la dimensionnalité de leur jugement, ainsi que l'importance relative de leurs critères de positionnement. Pagès (2003) suggère également d'associer le Napping® à la méthode dite du Profil Ultra-Flash afin d'obtenir des informations sur les critères de positionnement des produits : après avoir positionné les échantillons, il est alors demandé aux juges d'ajouter des descripteurs caractéristiques du produit ou groupe de produits. Il est également possible d'utiliser des données extérieures telles que des données de profil sensoriel ou d'analyses chimiques afin de compléter le Napping® (Pagès, 2005).

Plusieurs études comparatives opposant la méthode de profil conventionnel et le Napping® ont montré de bonnes corrélations entre les résultats des deux méthodes (Perrin *et al.*, 2008 ; Moussaoui et Varela, 2010 ; Albert *et al.*, 2011 ; Ares *et al.*, 2011). Cependant, il serait erroné de penser que le Napping® puisse remplacer le profil conventionnel. En fait, ces deux méthodes ne répondent pas exactement aux mêmes objectifs. Le profil conventionnel semble plus adéquat si l'on veut caractériser le produit de façon précise. Le Napping® permet d'obtenir des informations sur les perceptions globales. Des différences significatives peuvent être observées pour certains critères avec des méthodes classiques comme le profil mais ne pas être mises en évidence avec le Napping® car l'importance de ces critères dans la perception globale est limitée (Perrin, 2008). Les informations obtenues par le Napping® peuvent donc permettre de pondérer les résultats obtenus par des méthodes sensorielles plus ciblées. Il permet également de mettre en évidence des différences entre les produits qui peuvent être difficilement verbalisables par le panel en raison du caractère plus libre et intuitif de cette méthode. Par ailleurs, il ne nécessite pas forcément un panel averti et entraîné contrairement au profil.

## **II. Etude de l'effet des microorganismes sur la modulation de l'arôme fruité : perception par les dégustateurs**

Les différentes analyses sensorielles ont été réalisées à partir des vins de micro-vinification du WEC sur les millésimes 2011 et 2012 (WEC 11, WEC 12) ainsi qu'à partir des vins vinifiés aux chais durant le millésime 2012 (PL et SE), après 3 et 12 mois d'élevage (excepté SE). Elles ont toutes porté sur les perceptions orthonasale et gustative.

Plusieurs facteurs peuvent affecter la réponse sensorielle : les variations interindividuelles (sexe, âge, sensibilité) mais également l'environnement de la séance de dégustation, le verre utilisé, la température de la pièce ou de l'échantillon (Martin et de Revel, 1999). Afin d'écarter toute perturbation pouvant affecter les résultats de la dégustation, la norme NF EN ISO 8589 : 2010 définit les conditions normalisées de l'analyse sensorielle : une température de confort à  $\pm 20$  °C, un éclairage uniforme, une isolation acoustique et un isolement des sujets entre eux pour garantir l'indépendance du jugement. Toutes les séances d'analyse sensorielle ont été effectuées dans la salle de dégustation du laboratoire de recherche de l'ISVV qui répond à cette norme. Les verres utilisés sont des verres incolores correspondant à la norme ISO 3591 : 1977, codés par un nombre aléatoire à trois chiffres et recouverts par une boîte de Pétri. Les vins ont été sortis de la chambre froide à 10 °C quelques heures avant la séance de dégustation et servis à température ambiante. Ils ont été présentés simultanément, disposés dans un ordre aléatoire et équilibré entre tous les sujets. Enfin, tous les juges, membres des différentes unités de recherche de l'ISVV ou de la société Laffort ont été choisis pour leur expérience dans l'analyse sensorielle et peuvent donc être considérés comme expérimentés.

### **II.A. Caractérisation globale analysée par la méthode du Napping®**

La méthode du Napping® couplée au Profil Ultra-Flash (Perrin, 2008) a été utilisée pour caractériser de façon globale les vins réalisés en micro-vinification au WEC pendant le millésime 2011 avec six couples levures/BL différents.

### **II.A.1. Méthodologie de l'épreuve**

Les juges ont évalué les vins de façon globale (vue, odorat et goût) et étaient libres de les goûter autant de fois qu'ils souhaitaient, sans limite de temps. Ils disposaient d'une feuille de papier blanc, de dimension 40 x 60 cm, et ont reçu la consigne suivante :

Principe :

*Il vous est demandé d'évaluer les ressemblances (ou dissemblances) entre plusieurs vins, et ce, selon vos propres critères, ceux qui sont importants pour vous. Il n'y a pas de bonnes et de mauvaises réponses.*

Mode opératoire :

*Placez les vins sur une feuille de papier blanc ; deux vins sont d'autant plus proches qu'ils vous paraissent semblables. Deux vins sont éloignés s'ils vous paraissent différents. Et encore une fois, ceci selon vos propres critères. N'hésitez pas à marquer les différences, c'est-à-dire à utiliser toute la feuille disponible. Quand l'opération est terminée, indiquez par des croix les emplacements occupés par les verres et reportez les numéros des vins.*

Il a ensuite été demandé aux juges d'écrire, à côté des vins, des termes qui leur semblaient caractériser le vin (ou groupe de vins). La consigne était la suivante :

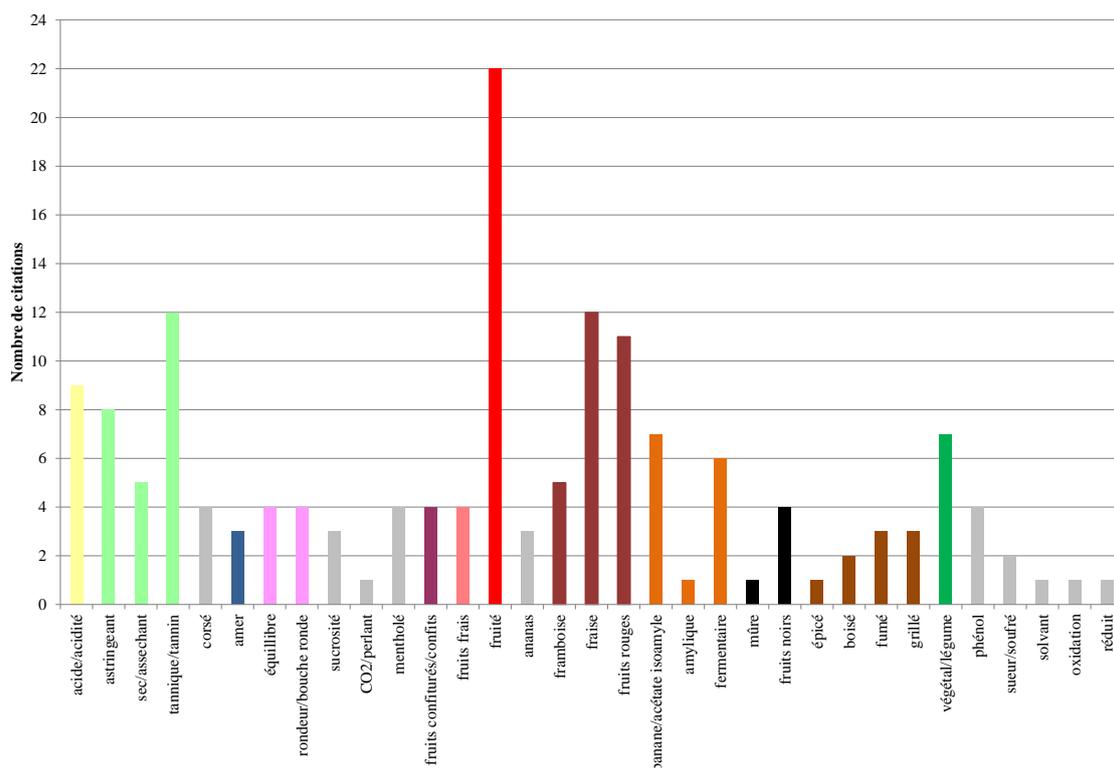
Mode opératoire :

*Indiquez, à côté de l'emplacement de chaque produit, ou chaque groupe de produits, les mots qui vous viennent à l'esprit pour le caractériser. UTILISEZ DES MOTS QUANTIFIABLES et non des phrases. Ces mots doivent permettre une description OBJECTIVE des vins. Evitez les adverbes (plus, moins...) et les termes hédoniques.*

Deux séances ont été réalisées :

- **Séance 1 :** vin WEC 2011 (6 couples levures/BL) après **3 mois d'élevage** en mars 2012 avec 15 dégustateurs (5 hommes, 10 femmes) âgés de  $36,6 \pm 8,5$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 2 :** vin WEC 2011 (6 couples levures/BL) après **12 mois d'élevage** en février 2013 avec 22 dégustateurs (10 hommes, 12 femmes) âgés de  $34 \pm 7,5$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)

Les résultats ont été traités par AFM comme décrit par Pagès (2005). Les données correspondent aux coordonnées de l'emplacement des produits sur la feuille, pour chaque juge. On obtient donc des valeurs de X (abscisse) comprises entre 0 et 60 et des valeurs de Y (ordonnée) comprises entre 0 et 40, pour chaque vin et pour chaque juge. Les mots associés à chaque vin sur chaque nappe ont été recueillis de façon collective (**Figure 22**). Les descripteurs cités par l'ensemble des juges sont sommés de façon à obtenir un tableau de contingence, qui est simplifié par la suite : les termes utilisés par un seul juge ainsi que les mots à caractère hédonique ont par exemple été écartés. Les descripteurs évoquant la même idée ont été assemblés : par exemple, les mots "fraise", "framboise" et "fruits rouges" ont été regroupés sous le terme "fruits rouges" (**Figure 22**). Le nombre de citations de chaque descripteur retenu pour chaque échantillon est ensuite relevé. On obtient alors une table structurée en  $n$  sous-tableaux, correspondant aux  $n$  juges, de 6 lignes, correspondant aux 6 vins testés (**Figure 23**).



**Figure 22.** Descripteurs générés par le panel lors de la séance 1. Les mots représentés par la même couleur ont été regroupés sous le même terme. Les mots en gris n'ont pas été utilisés dans l'AFM (cités une seule fois ou plusieurs fois par le même juge).

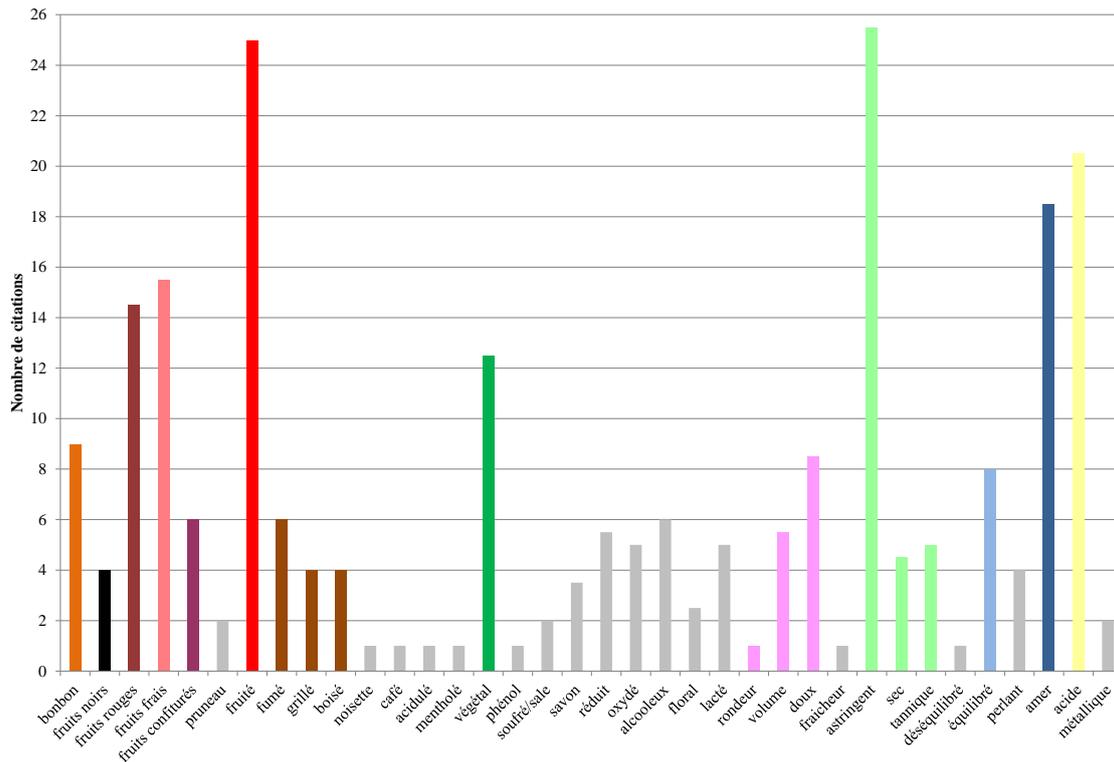


Figure 22 (suite). Descripteurs générés par le panel lors de la séance 2.

		Juge 1		...		Juge n		Descripteurs			
		x	y	x	y	x	y	D1	...	...	Dn
E C H A N T I L L O N S	Vin 1							0			6
	Vin 2							5			3
	Vin 3							4			0
	Vin 4							7			2
	Vin 5							1			1
	Vin 6							3			1

données actives
données illustratives

Figure 23. Organisation des données recueillies suite au test du Napping® couplé au Profil Ultra-Flash. Les coordonnées x et y de chaque vin pour chaque juge constituent les données actives. Les descripteurs générés par le panel ainsi que leur nombre de citations relevés pour chaque vin constituent les données illustratives.

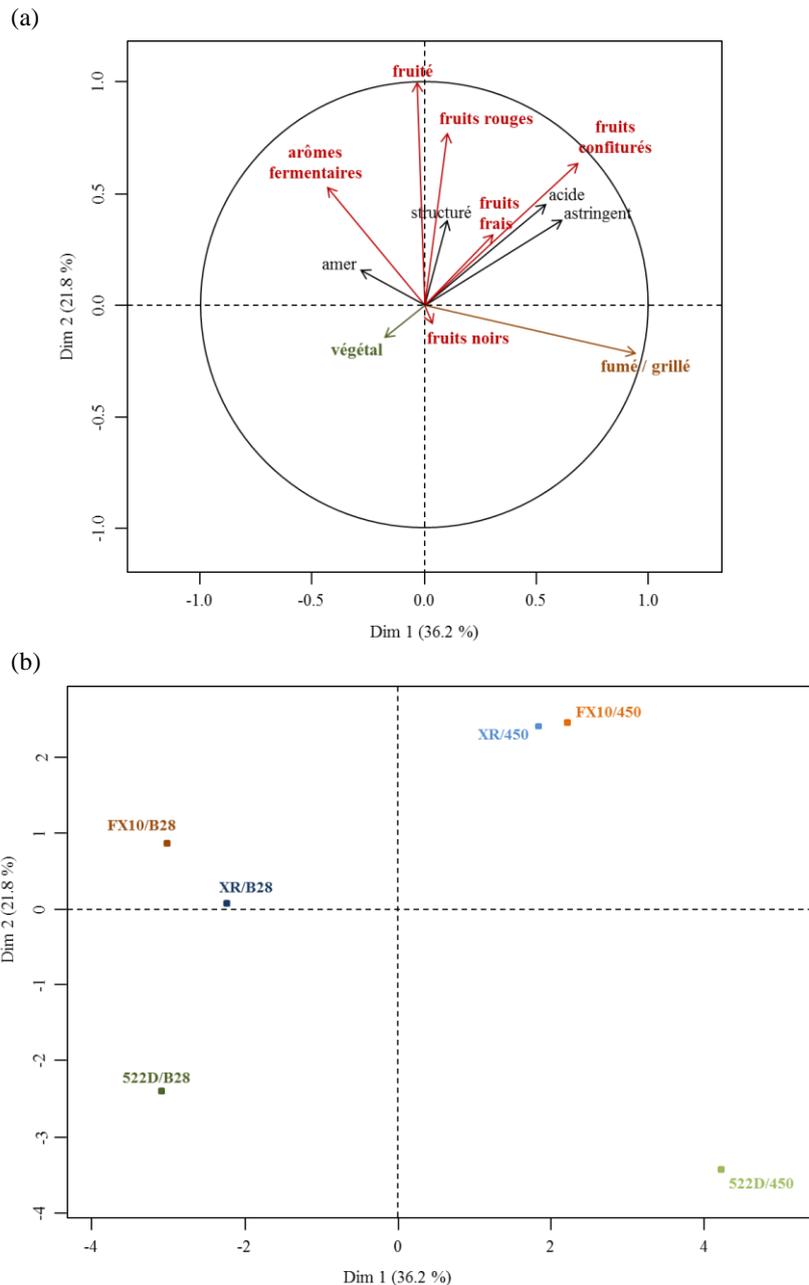
### ***II.A.2. Caractérisation globale à différents temps d'élevage***

Le test du Napping® permet une caractérisation globale des vins et permet aux juges de construire leur propre représentation graphique basée sur les dimensions sensorielles qui leur semblent importantes. Il s'agit probablement du test sensoriel qui se rapproche le plus d'une dégustation classique du vin. Les représentations des descripteurs générés grâce au Profil Ultra-Flash ainsi que la dégustation des vins WEC11 après 3 ou 12 mois d'élevage sont présentées **Figures 24** et **25**. Au cours des deux séances, les descripteurs les plus utilisés pour définir l'arôme des vins appartiennent au champ lexical du fruit : "fruité", "fruits frais", "fruits confiturés", "fruits rouges", "fruits noirs", "arômes fermentaires", comme on pouvait s'y attendre pour de jeunes vins rouges de Bordeaux n'ayant pas subi d'élevage sous bois de chêne. Les autres descripteurs sensoriels utilisés pour qualifier l'arôme de ces vins sont "fumé/grillé" et "végétal".

La **Figure 24** représente la projection des vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage (**Figure 24 b**) ainsi que la projection des descripteurs sensoriels générés par le panel (**Figure 24 a**) sur le plan F1-F2 (58 % de la variance totale).

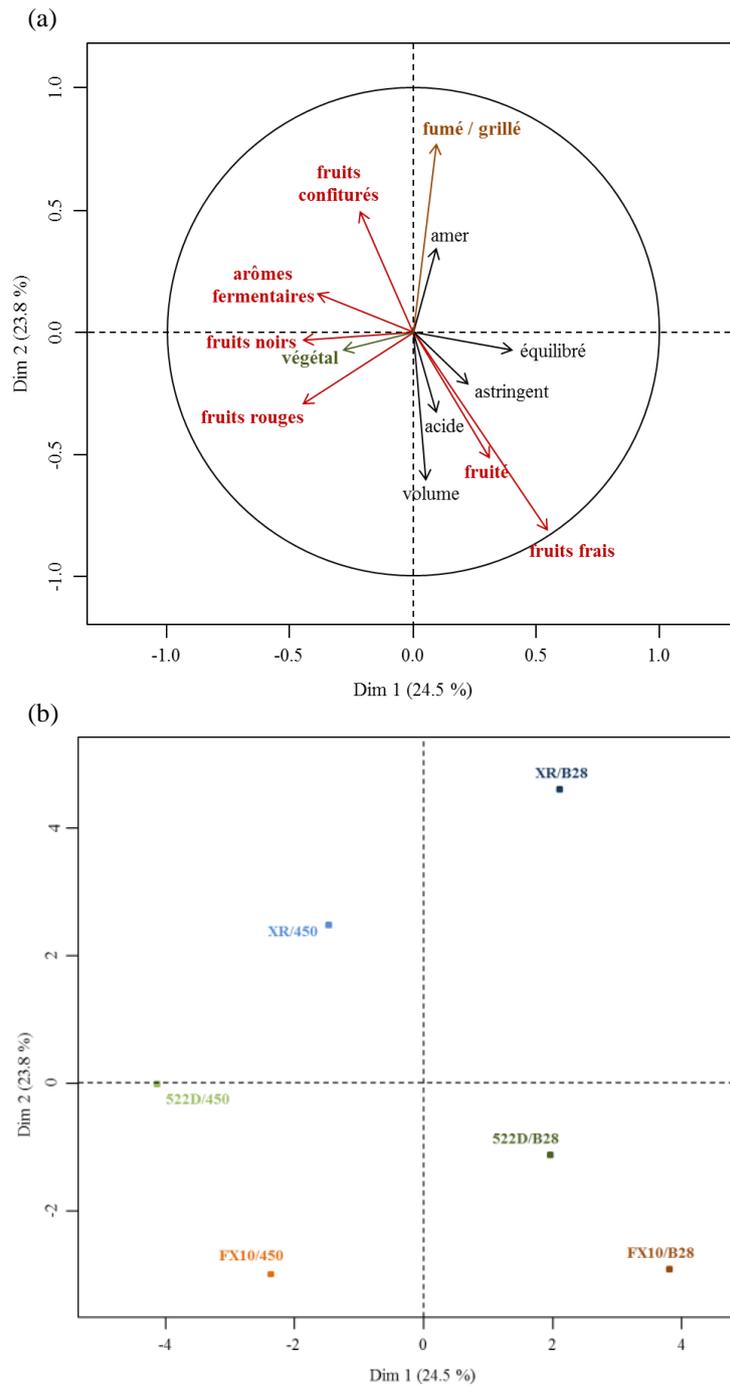
L'axe 1 (36 % de la variance) est principalement caractérisé par le descripteur "fumé/grillé" et permet une séparation des vins en fonction de la souche de bactéries. Il semblerait en effet que les vins inoculés avec la souche **450** apparaissent plus fumés et grillés à la dégustation que ceux vinifiés avec la bactérie **B28**.

L'axe 2 (22 % de la variance) quant à lui est plutôt défini par des descripteurs liés au fruité : "fruité", "fruits confiturés", "fruits rouges", "arômes fermentaires". Il permet une séparation des modalités en fonction de la souche de levures. Les vins fermentés avec les souches **FX10** et **XR** et plus particulièrement par les couples **FX10/450** et **XR/450** semblent être les plus fruités.

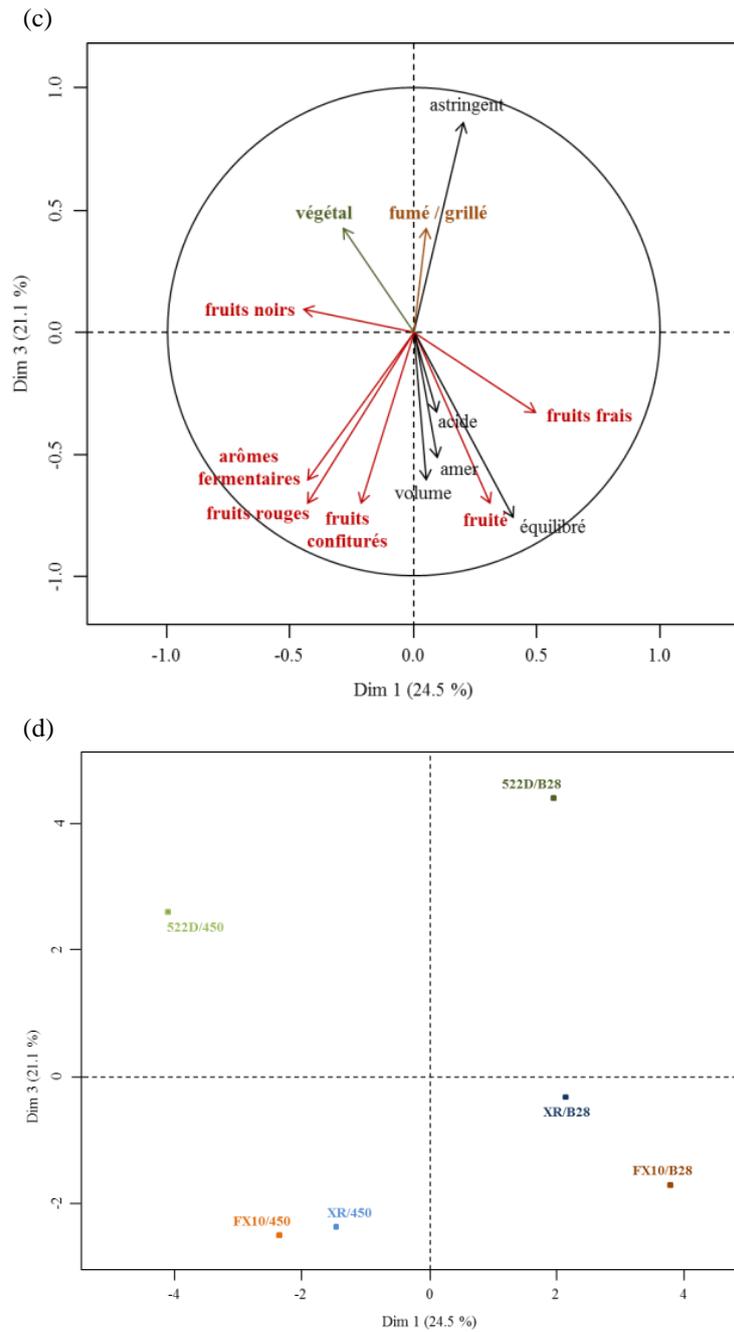


**Figure 24.** Représentations des descripteurs issus du Profil Ultra-Flash et introduits en tant que variables illustratives dans l'AFM (a) et des individus (b) issus de l'AFM réalisée sur la séance 1 de Napping® (vin 2011 après 3 mois d'élevage) (axes F1-F2).

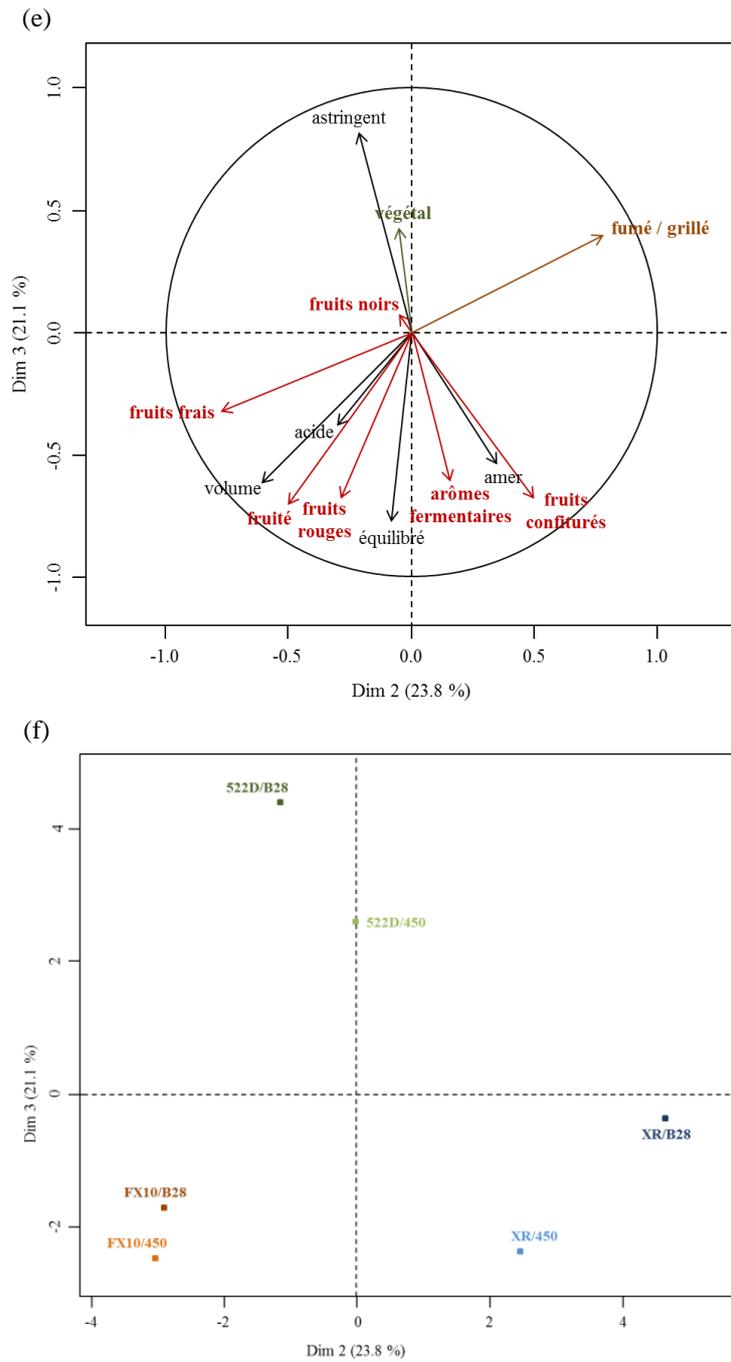
Ces premiers résultats se confirment par l'analyse sensorielle des mêmes vins après 12 mois d'élevage. La **Figure 25** représente la projection des vins WEC 2011 après 12 mois d'élevage ainsi que la projection des descripteurs sensoriels générés par le panel sur les plans F1-F2 (a et b ; 48 % de la variance totale), F1-F3 (c et d ; 46 % de la variance totale) et F2-F3 (e et f ; 45 % de la variance totale).



**Figure 25.** Représentations des descripteurs issus du Profil Ultra-Flash et introduits en tant que variables illustratives dans l'AFM (a) et des individus (b) issus de l'AFM réalisée sur la séance 2 de Napping® (vin 2011 après 12 mois d'élevage) (a et b : F1-F2)



**Figure 25 (suite).** Représentations des descripteurs issus du Profil Ultra-Flash et introduits en tant que variables illustratives dans l'AFM (c) et des individus (d) issus de l'AFM réalisée sur la séance 2 de Napping® (vin 2011 après 12 mois d'élevage) (c et d : F1-F3).



**Figure 25 (suite).** Représentations des descripteurs issus du Profil Ultra-Flash et introduits en tant que variables illustratives dans l'AFM (e) et des individus (f) issus de l'AFM réalisée sur la séance 2 de Napping® (vin 2011 après 12 mois d'élevage) (e et f : F2-F3).

L'axe 1 permet une séparation des vins en fonction de la souche de bactéries, confirmant leur effet potentiel sur la modulation de l'arôme du vin (**Figures 25 b et d**). Cependant, aucune corrélation avec les descripteurs générés par le panel n'a pu être établie. L'influence de la souche de levures sur la perception globale de l'arôme des différents vins est représentée grâce aux axes 2 et 3 (**Figures 25 b, d et f**).

L'axe 2 (24 % de la variance) oppose les descripteurs "fumé/grillé", corrélés aux modalités **XR/B28** et **XR/450** à "fruits frais", lié aux vins inoculés avec **FX10/450** et **FX10/B28** (**Figures 25 a, b, e et f**).

Enfin, l'axe 3 (21 % de la variance) est défini par des descripteurs liés au fruité : "fruité", "fruits confiturés", "fruits rouges", "arômes fermentaires" (**Figures 25 c et e**). Il oppose cette fois les modalités fermentées avec la souche **FX10**, encore une fois corrélées aux descripteurs fruités, de celles fermentées avec la levure **522D** (**Figures 25 d et f**).

L'effet "levures" observé sur les vins WEC 2011 après 3 mois d'élevage se confirme sur ceux dégustés après 12 mois d'élevage : le panel semble trouver les vins fermentés par la levure **FX10** plus fruités que ceux obtenus avec **XR** ou **522D**.

### *II.A.3. Discussion*

A partir des vins étudiés, il est possible de relier les souches de levures ou de bactéries à certaines caractéristiques sensorielles.

Même si l'on ne peut pas généraliser ces observations à chacun des vins, il semble possible de dégager une tendance pour les vins fermentés avec des levures différentes. En effet, les modalités "**FX10**" et dans une moindre mesure "**XR**" semblent associées aux descripteurs fruités très utilisés par le panel ("fruité", "fruits confiturés", "fruits rouges", "arômes fermentaires"). Au contraire, les deux modalités "**522D**" seraient plutôt liées à des notes connues pour masquer l'arôme fruité telle que "végétal". Néanmoins, ce descripteur semble associé à la sensation d'astringence et il est possible que les juges fassent un amalgame entre ces deux notions.

L'influence de la souche de BL sur les caractéristiques sensorielles a elle aussi été montrée. Elle semble surtout liée au descripteur "fumé/grillé" dans les vins après 3 mois d'élevage. Cependant, la perception d'un effet "bactéries" par les dégustateurs semble moins net et plus difficile à caractériser après plusieurs mois de vieillissement.

D'une façon générale, il serait imprudent de généraliser ces résultats dans la mesure où l'étude n'a porté que sur un seul millésime. Le test de Napping® permet de dégager des tendances globales en laissant le plus de liberté possible au panel. Il a permis de mettre en évidence un possible effet de la souche de levures sur la modulation de l'arôme fruité, au même titre que sur la concentration en esters tel que démontré précédemment. Ces observations doivent être confirmées et précisées par des tests sensoriels plus ciblés.

## **II.B. Confirmation du rôle essentiel de la souche de levures par un test de classement**

L'objectif ici est de confirmer les tendances globales dégagées grâce au Napping® par un test quantitatif. Nous avons donc choisi dans un premier temps d'évaluer les vins vinifiés au cours du millésime 2012 au WEC, ainsi que dans les régions de Pessac-Léognan et Saint-Emilion, en fonction de leur note fruitée grâce à un test de classement.

### ***II.B.1. Méthodologie de l'épreuve***

Les juges ont classé les différents vins par ordre croissant d'intensité de la note fruitée (pas d'*ex aequo* possible). Cinq séances ont été réalisées :

- **Séance 3** : vin WEC 2012 (6 couples levures/BL) après **3 mois d'élevage** en avril 2013 avec 22 dégustateurs (8 hommes, 14 femmes) âgés de  $34,5 \pm 8,8$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 4** : vin PL 2012 (4 couples levures/BL) après **3 mois d'élevage** en avril 2013 avec 24 dégustateurs (9 hommes, 15 femmes) âgés de  $35 \pm 8,7$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 5** : vin SE 2012 (4 couples levures/BL) après **3 mois d'élevage** en mars 2013 avec 21 dégustateurs (9 hommes, 12 femmes) âgés de  $33,4 \pm 7,7$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 6** : vin WEC 2012 (6 couples levures/BL) après **12 mois d'élevage** en janvier 2014 avec 18 dégustateurs (7 hommes, 11 femmes) âgés de  $37,1 \pm 8,7$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)

- **Séance 7 :** vin PL 2012 (4 couples levures/BL) après **12 mois d'élevage** en janvier 2014 avec 18 dégustateurs (6 hommes, 12 femmes) âgés de  $37,2 \pm 8,5$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)

La modalité vin SE 2012 après 12 mois d'élevage n'a pas pu être testée à cause de contaminations microbiologiques de certains échantillons durant l'élevage.

La fiche de dégustation présentée au panel est fournie en annexe 3.

Le but de ces tests est d'étudier l'influence du couple levures/BL sur l'intensité de l'arôme fruité des vins. Il n'existe donc pas de hiérarchie supposée entre les différents échantillons. Selon la norme NF ISO 8587 : 2006, le test statistique à appliquer est le test de Friedman.

Les  $p$  modalités sont classées par ordre croissant par les  $n$  sujets et les sommes des rangs  $R_1, R_2, R_3, \dots, R_p$  sont déterminées. On calcule la valeur  $F$  :

$$F = \frac{12 \cdot \sum_{i=1}^p R_i^2}{n \cdot p \cdot (p + 1)} - 3 \cdot n \cdot (p + 1)$$

On compare ensuite  $F$  aux valeurs critiques de la loi du  $\chi^2$  à  $(p - 1)$  degré de liberté :

- Si  $F > \chi^2$  (5 %), les produits sont considérés comme étant significativement différents.
- Si  $F \leq \chi^2$  (5 %), les produits sont considérés comme n'étant pas différenciables.

Dans le cas où une différence globale entre les échantillons est statistiquement prouvée, un test supplémentaire de comparaison multiple des sommes des rangs peut permettre de déterminer la différence éventuelle des échantillons deux à deux. On calcule la plus petite différence significative (PPDS) que l'on compare à la valeur absolue de la différence entre les sommes de rangs de deux produits :

$$PPDS = 1,96 \sqrt{n \cdot p \cdot (p + 1) / 6}$$

- Si  $|R_i - R_j| > PPDS$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme différentes au risque de 5 %
- Si  $|R_i - R_j| < PPDS$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme non différenciables

### II.B.2. Résultats obtenus

Les résultats et le traitement statistique des données obtenues suite aux séances d'analyse sensorielle 3 et 6 sont présentés dans le **Tableau 35**.

**Tableau 35.** Résultats du test de classement par rangs pour les séances 3 (WEC 2012, 3 mois) et 6 (WEC 2012, 12 mois).

	Somme des rangs						<i>F</i>	$\chi^2$ à 1 %	$\chi^2$ à 0,1 %	Résultat
	XR/B28	XR/450	FX10/B28	FX10/450	522D/B28	522D/450				
Séance 3	72	53	95	94	76	72	16,10	15,09	20,52	Significatif à 1 %
Séance 6	56	67	73	84	33	65	23,97	15,09	20,52	Significatif à 0,1 %

Les résultats obtenus montrent que les tests sont significatifs aux seuils de 1 % et 0,1 % respectivement. Les dégustateurs ont été capables de distinguer les différentes modalités et de les classer selon l'intensité de la note fruitée. Pour les deux séances, les sommes des rangs les plus importantes ont été attribuées aux modalités fermentées avec la souche de levures **FX10**.

De plus, on calcule le PPDS = 24,32 pour la séance 3 et PPDS = 22 pour la séance 6, au risque de 5 %.

On en déduit pour la séance 3 que :

- les vins fermentés avec les couples **FX10/450** et **FX10/B28** sont plus fruités que ceux fermentés avec **XR/450** et dans une moindre mesure **XR/B28** et **522D/B28**

Et pour la séance 6 que :

- le vin fermenté avec le couple **FX10/450** est plus fruité que celui fermenté avec **XR/B28**
- le vin fermenté avec le couple **522D/B28** est moins fruité que ceux fermentés avec **FX10/450**, **FX10/B28**, **XR/450**, **XR/B28** et **522D/450**

De manière générale, et quel que soit le temps de prélèvement, les vins inoculés avec la souche de levures **FX10** apparaissent plus fruités que ceux fermentés avec les souches **XR** ou **522D**. Il existe donc un effet de la souche de levures sur l'intensité du caractère fruité, et cet effet perdure au cours de l'élevage. En outre, un effet "bactéries" est observable pour certaines modalités mais ne semble pas se maintenir dans le temps.

Les résultats obtenus à partir des vins PL (séances 4 et 7) montrent que les tests sont significatifs aux seuils de 0,1 % et 5 % respectivement (**Tableau 36**). Là encore, les dégustateurs ont été capables de distinguer les différentes modalités et de les classer selon l'intensité de la note fruitée. Pour les deux séances, les sommes des rangs les plus importantes ont également été attribuées aux modalités fermentées avec la souche de levures **FX10**. En outre, on calcule les PPDS = 17,53 et 15,18 respectivement pour les séances 4 et 7. Pour les deux séances, les vins fermentés avec la levure **FX10** apparaissent significativement plus fruités que les vins inoculés avec la levure **522D**.

**Tableau 36.** Résultats du test de classement par rangs pour les séances 4 (PL, 3 mois), 5 (SE, 3 mois) et 7 (PL, 12 mois).

	Somme des rangs						<i>F</i>	$\chi^2$ à 5 %	$\chi^2$ à 1 %	$\chi^2$ à 0,1 %	Résultat
	XR/B28	XR/450	FX10/B28	FX10/450	522D/B28	522D/450					
Séance 4	-	-	75	72	39	54	21,15	7,81	11,34	16,27	Significatif à 0,1 %
Séance 7	-	-	52	56	34	38	11,33	7,81	11,34	16,27	Significatif à 5 %
Séance 5	59	44	-	-	42	35	10,2	7,81	11,34	16,27	Significatif à 5 %

Concernant les vins SE, le test est également significatif au seuil de 5 %, montrant que les juges ont été capables de distinguer les échantillons selon l'intensité de leur note fruitée (**Tableau 36**). La somme des rangs la plus importante a été attribuée à la modalité "**XR/B28**". Grâce au calcul du PPDS = 15,18 on peut par ailleurs dire que ce vin est significativement plus fruité que ceux inoculés avec la levure **522D**, quelle que soit la souche de bactéries utilisée pour réaliser la FML.

### **II.B.3. Discussion**

Pour les trois expérimentations, les échantillons ont été distingués et classés de façon statistiquement significative par les dégustateurs. Les résultats obtenus mettent en évidence une influence des microorganismes fermentaires sur la perception de la note fruitée des vins rouges à différents stades de leur vieillissement.

Après 3 mois d'élevage, les vins du WEC 12, PL et SE atteignent respectivement les seuils de significativité de 1 %, 0,1 % et 5 %. Après 12 mois de vieillissement, les seuils de

0,1 % et 5 % sont atteints respectivement par les vins WEC 12 et PL. Ces différences de significativité entre les séries peuvent être dues au nombre d'échantillons dégustés au cours des séances. En effet, 6 verres étaient présentés au panel dans le cas des vins du WEC 12 contre 4 verres pour les vins PL et SE, ce qui influence probablement la facilité de classement des échantillons. Cette différence peut également être liée à un effet matrice, les trois vins ayant été réalisés à partir de moûts bien différents (Cabernet Sauvignon thermovinifié, Cabernet Sauvignon et Merlot). Toutefois, l'intérêt de ces dégustations réside essentiellement dans la comparaison des échantillons au sein d'une même expérimentation, et il apparaît bien que quelle que soit la matrice, les microorganismes fermentaires influencent l'arôme fruité des vins rouges.

Pour les vins WEC 12, les modalités fermentées par la souche de levures **FX10** sont perçues comme significativement plus fruitées que tous les autres, après 3 et 12 mois d'élevage. Après 12 mois d'élevage, les modalités "**XR/450**" et "**522D/450**" ne sont plus différenciées de la modalité "**FX10/B28**" bien qu'étant toutes moins fruitées que la modalité "**FX10/450**". Il faut noter toutefois que le test de classement par rangs n'a pas pour finalité première la différenciation des échantillons deux à deux. En effet, le nombre des modalités tend à compliquer la dégustation et ainsi à diminuer le contraste entre ces dernières. Le test triangulaire aurait été mieux adapté si l'objectif de l'étude avait été d'évaluer la différence éventuelle entre deux échantillons.

De la même façon pour les vins PL, les modalités fermentées par la levure **FX10** ont été perçues comme plus fruitées que les modalités fermentées par la levure **522D** après 3 mois comme après 12 mois d'élevage. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence en fonction de la souche de BL ayant réalisée la FML.

Enfin, pour les vins SE, la modalité "**XR/B28**" a été décrite comme plus fruitée que les modalités "**522D/450**" et "**522D/B28**" au seuil de 5 %. La modalité "**XR/450**" n'a pas pu être différenciée des autres par les dégustateurs. Il faut noter que dans les autres séances, le panel n'a pas été capable de distinguer les vins fermentés par la levure **522D** de ceux fermentés par la levure **XR**. L'écart entre les profils de ces différentes modalités est probablement plus faible qu'entre la souche **FX10** et l'une ou l'autre d'entre elles. Cela rend plus difficile la perception d'une différence sensorielle.

De façon générale, ces résultats confirment les observations dégagées grâce au Napping® et montrent que la souche de levures, davantage que la souche de bactéries, influence l'arôme fruité des vins rouges.

## II.C. Caractérisation de l'effet souche de levures par un profil sensoriel

Après avoir confirmé l'influence de la souche de levures sur l'arôme fruité, nous avons voulu caractériser plus finement cet effet grâce à l'utilisation du profil sensoriel.

### II.C.1. Méthodologie de l'épreuve

Selon la norme ISO 13299 : 2003, une liste de descripteurs a été préétablie à l'aide des mots générés par les dégustateurs aux cours des séances de Napping®. Nous avons retenu 5 descripteurs olfactifs : "fruits frais", "fruits confiturés", "arôme fermentaire", caractéristiques des vins rouges de Bordeaux selon Pineau *et al.* (2010) ainsi que "fumé/grillé" et "végétal" pouvant moduler la note fruitée (Keim *et al.*, 2002 ; Antalick, 2010). Chaque descripteur a été évalué et positionné en fonction de son intensité sur une échelle de notation structurée de 0 à 7 (où 0 indique qu'aucune odeur n'est perçue et 7 indique une intensité très élevée) (Martin et de Revel, 1999). Tous les profils ont été réalisés au cours des séances 3 à 7, à la suite du test de classement. La fiche de dégustation présentée au panel est fournie en annexe 4. Il s'agit d'une fiche imposée, présentée sous forme d'un profil comparé.

Afin d'évaluer statistiquement l'impact du couple et des souches de levures et de bactéries sur la modulation de la note fruitée, des ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) ont été réalisées pour chaque descripteur suivi d'un test *post hoc* par paire de Duncan pour confirmer les différences entre échantillons. Les tests statistiques ont été réalisés à partir de données centrées-réduites afin de limiter l'effet juge.

### II.C.2. Résultats obtenus

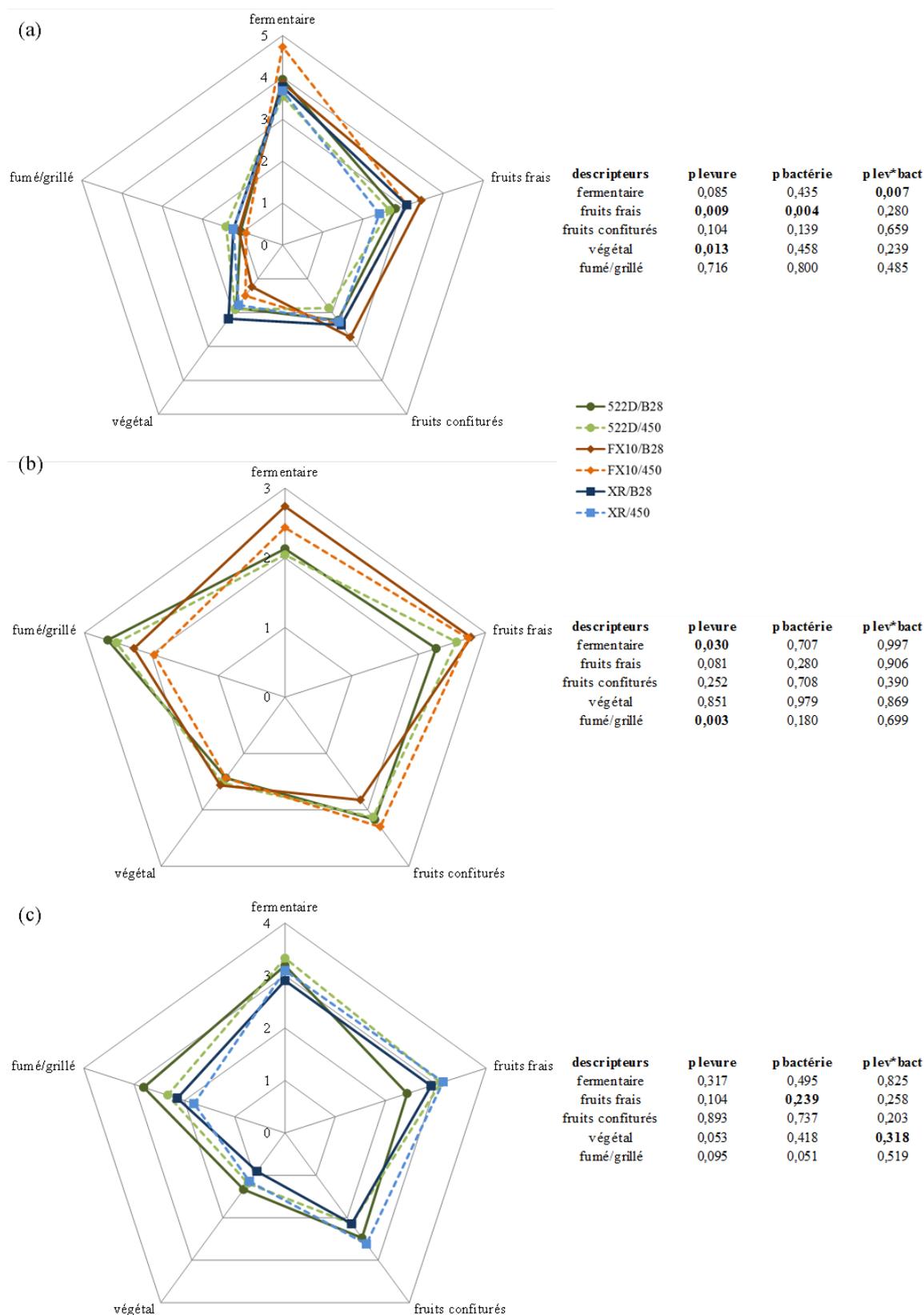
Les analyses statistiques confirment que les juges différencient les vins inoculés avec la souche de levures **FX10** des autres modalités, aussi bien pour les vins après 3 mois que 12 mois d'élevage.

En effet, pour les vins du WEC à 3 mois de vieillissement en fût inox (**Figure 26 a**), la modalité fermentée par le couple **FX10/450** semble différente des autres avec des notes "arôme fermentaire" plus marquées (au seuil de 1 %). Les deux modalités inoculées avec la souche de levures **FX10** sont également décrites avec des notes de "fruits frais" et "arôme

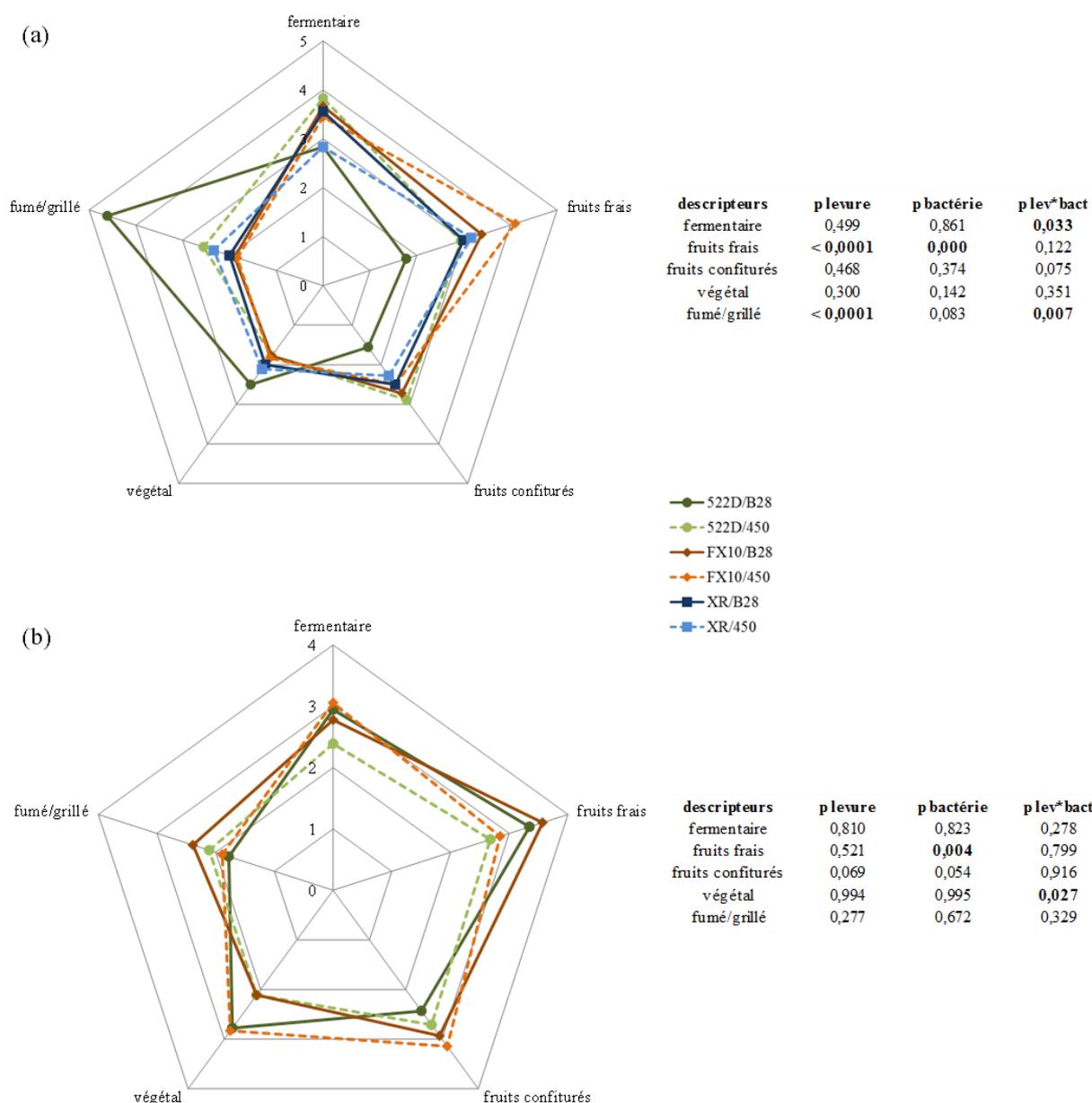
fermentaire" (effet de la levure significatif aux seuils de 1 % et 10 % respectivement). D'autre part, les modalités fermentées avec les levures **XR** ou **522D** sont perçues par les juges comme moins fruitées et plus "végétal" (effet de la levure significatif au seuil de 5 %). Cet effet "levures" est également observé sur les mêmes vins, après 12 mois de vieillissement (**Figure 27 a**). Les juges perçoivent là encore une différence significative entre les vins fermentés avec la souche **FX10**, décrits comme plus fruités ("fruits frais" significatif au seuil de 0,1 %). La modalité **522D/B28** se démarque particulièrement des autres : elle apparaît moins fruitée, et principalement caractérisée par des notes "fumé/grillé" (significatif au seuil de 1 %).

Des résultats similaires ont été observés pour les vins réalisés en vinification classique. Les juges ont décrit les vins PL fermentés par les couples **FX10/450** et **FX10/B28** comme plus fruités que les vins "**522D/450**" et "**522D/B28**", confirmant les résultats du test de classement (**Figure 26 b**). La souche de levures semble moduler les notes "arôme fermentaire" (significatif au seuil de 5 %) et "fruits frais" (au seuil de 10 %) mais également la note "fumé/grillé" (significatif au seuil de 1 %) caractérisant les vins fermentés par la souche **522D**. Néanmoins, ces différences semblent avoir été moins bien perçues par le panel sur les vins vieillis pendant 12 mois (**Figure 27 b**). Les différences de notes "arôme fermentaire" et "fruits frais" perçues à 3 mois ne sont plus significatives à 12 mois d'élevage. Les modalités fermentées par la levure **FX10** restent néanmoins perçues comme plus fruitées et caractérisées par des notes de "fruits confiturés" (significatif au seuil de 10 %).

Enfin, les résultats obtenus avec les vins SE après 3 mois d'élevage (**Figure 26 c**) sont moins clairs, indiquant peut-être une différence moins importante entre les vins fermentés par les levures **XR** et **522D**. Aucune différence significative sur la perception des descripteurs fruités n'a pu être mise en évidence. Cependant, une tendance se dégage des vins fermentés par la levure **522D** qui semblent être perçus comme plus "végétal" (significatif au seuil de 10 %) et "fumé/grillé" (significatif au seuil de 10 %). Ces résultats restent néanmoins cohérents avec les observations réalisées à partir des tests de classement qui mettent principalement en évidence des différences perçues entre les vins inoculés avec les levures **FX10** et **XR** ou **FX10** et **522D**, mais où peu de différences ont été observées entre les vins inoculés avec les souches **XR** et **522D**.



**Figure 26.** Profils comparés réalisés sur les vins WEC 2012 (a), PL (b) et SE (c), après 3 mois d'élevage, vinifiés avec 6 ou 4 couples levures/BL différents et résultats (p-value) de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries).



**Figure 27.** Profils comparés réalisés sur les vins WEC 2012 (a) et PL (b), après 12 mois d'élevage, vinifiés avec 6 ou 4 couples levures/BL différents et résultats (p-value) de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries).

Un effet "bactéries" est également observé pour le descripteur "fruits frais", aussi bien pour les vins de 3 mois que de 12 mois d'élevage (**Figures 26 a, 27 a et 27 b**). L'impact de la souche de bactéries sur la modulation de la note fruitée est cependant moins clair. Après 3 mois d'élevage, les vins du WEC fermentés avec la souche **B28** sont perçus par les juges comme plus fruités ("fruits frais" significatif au seuil de 1 %) (**Figure 26 a**). En revanche,

après 12 mois d'élevage, la tendance s'inverse et les modalités inoculées avec la bactérie **450** sont à leur tour perçues comme plus fruitées ("fruits frais" significatif au seuil de 0,1 %) (**Figure 27 a**). De plus, aucune différence significative n'a été observée pour les vins PL après 3 mois d'élevage (**Figure 26 b**), alors que les vins fermentés par la souche **B28** sont perçus comme significativement plus fruités après 12 mois d'élevage ("fruits frais" significatif au seuil de 1 %).

### ***II.C.3. Discussion***

L'inoculation séquentielle de levures et de BL a conduit à des vins dont le profil aromatique est spécifique au couple levures/BL utilisé. Si nous avons démontré que la souche de levures, plus que la souche de bactéries, influence l'arôme fruité des vins rouges, la réalisation d'un profil sensoriel permet d'apporter quelques nuances.

Dans l'ensemble, les descripteurs proposés pour décrire l'arôme fruité des vins ont bien été utilisés par les juges pour différencier les modalités. Pour les expérimentations WEC 12 et PL, les vins fermentés par la levure **FX10** sont principalement caractérisés par les notes "fermentaire" et "fruits frais". Sur les trois descripteurs liés à la note fruitée, "fruits confiturés" n'a pratiquement pas été utilisé par les juges pour différencier les vins. Or les vins jeunes sont principalement caractérisés par des arômes fermentaires qui vont s'estomper au cours du temps pour laisser place, le plus souvent, à des notes de "fruits confiturés", "épicé", plus complexes.

Des effets de masque de l'arôme fruité ont également été mis en évidence par l'utilisation des descripteurs "végétal" et "fumé/grillé". La note végétale est souvent en opposition avec la note fruitée. Les vins issus du WEC 12, fermentés par la levure **FX10**, sont en effet décrits comme plus fruités et moins "végétal" que les modalités "**522D**" ou "**XR**". De même pour les vins SE, les modalités inoculées par la levure **522D** apparaissent plus "végétal" que celles inoculées avec la souche **XR**, même si ces dernières n'ont pas pour autant été décrites comme plus fruitées. Le principal marqueur de la note végétale, la 3-isobutyl-2-méthoxypyrazine ou IBMP, n'a pas été dosée ici. Cependant, cette pyrazine est un composé d'origine variétale liée à la maturité du raisin, et il semble peu probable que la souche de levures puisse avoir un impact significativement perceptible.

Les vins fermentés avec la levure **522D** ont également été décrits comme possédant des notes "fumé/grillé", susceptibles de masquer l'arôme fruité. Pour la modalité **522D/B28** du WEC 12

après 12 mois d'élevage, l'effet de ce masque participe vraisemblablement à une perte importante de la perception de la note fruitée. Cependant, le caractère "fumé/grillé" ne semble pas uniquement corrélé à la souche de levures. Il a en effet également été utilisé pour différencier les vins en fonction de la souche de bactéries, et semble corrélé avec la souche **B28**. L'apparition d'un masque de l'arôme fruité après la FML par des notes de ce type a déjà été décrite dans des vins de Merlot et de Cabernet Sauvignon (Keim *et al.*, 2002 ; Antalick *et al.*, 2012). Les composés responsables de cette odeur sont peu connus. Au cours des épreuves d'analyse sensorielle, les juges ont pu associer l'odeur "fumé/grillé" avec des notes qui s'en approchent comme certaines notes de réduction. Des études ont mis en évidence des phénomènes de réduction liés à des composés soufrés volatils libérés au cours de la FML (Pripis-Nicolau *et al.*, 2004 ; Vallet, 2007). Deux d'entre eux, le DMS et l'H<sub>2</sub>S, ont été dosés dans les vins du millésime 2011. Aucun effet "levures" ou "bactéries" n'a pu être mis en évidence pour ces composés, ce qui exclut sans doute leur participation à cette note aromatique. En outre, les mêmes conclusions avaient été observées par Antalick (2010). Il est par ailleurs peu probable que ces notes "fumé/grillé" correspondent à l'apparition de composés tels que les thiazoles. Ces réactions sont en effet lentes et observables dans des vins ayant subi plusieurs années de vieillissement (Marchand *et al.*, 2000 ; Marchand *et al.*, 2002). Enfin, cette note aromatique ne peut également pas être corrélée aux molécules issues de l'élevage sous bois de chêne étant donné qu'aucune barrique n'a été utilisée dans ces expérimentations.

Ces travaux montrent pour la première fois l'importance de la souche de levures dans la modulation de l'arôme fruité des vins rouges de Bordeaux. L'utilisation de barrique au cours de l'élevage a volontairement été écartée de l'étude, au vu des nombreux travaux ayant montré l'impact du bois sur les propriétés organoleptiques du vin (Chatonnet, 1995 ; Tominaga *et al.*, 2000 ; Marchal *et al.*, 2013). Il serait cependant intéressant de compléter ces travaux avec des vins ayant subi un élevage en barriques, afin de voir si l'influence de la souche de levures sur l'arôme fruité reste perceptible malgré l'utilisation de bois.

## Conclusion de la première partie

Cette première partie avait pour objectif d'étudier l'importance du couple levures/BL dans la modulation de l'arôme fruité des vins rouges. Quatre expérimentations ont été mises en place dans trois régions du bordelais et deux millésimes (WEC 11, WEC 12, PL et SE) afin de tester l'impact de trois souches de levures (**FX10**, **XR** et **522D**) et de deux souches de BL (**B28** et **450**) sur la modulation de l'arôme fruité. Cinq prélèvements ont été réalisés, en fonction des différentes étapes de vinification et d'élaboration des vins : après les fermentations alcoolique et malolactique ainsi que pendant l'élevage, après 3, 6 et 12 mois. Le dosage de plus de 70 composés aromatiques et la réalisation de plusieurs tests d'analyse sensorielle ont permis d'étudier les profils analytiques et aromatiques de chaque couple testé.

Un premier profil analytique a été établi pour les vins du millésime 2011 par le dosage de nombreuses molécules potentiellement impliquées dans l'arôme fruité : six alcools supérieurs, trois aldéhydes et trois cétones, deux composés soufrés, huit acides, quatre dérivés des norisoprénoïdes à 13 carbones, six lactones, un terpène et quarante esters. La concentration de la quasi-totalité de ces molécules est significativement affectée par la souche de levures, tandis que peu d'entre elles sont modulées par la souche de bactéries. Au-delà du diacétyl, et de quelques produits dérivés, connus pour être principalement synthétisés par les BL au cours de la FML, la concentration en certains esters semble également modifiée.

Par la suite, la quantification de trente-deux esters dans toutes les modalités issues des quatre expérimentations a en effet permis de confirmer l'effet des souches de levures et de bactéries sur la modulation de leur concentration. Cependant, la réalisation de micro-vinifications en laboratoire a montré que l'effet "bactéries" observé au cours de l'élevage sur certains esters était vraisemblablement dû à une différence de population bactérienne lors de l'inoculation avant FML.

A la fin de la FA, des écarts de concentration significatifs ont donc pu être mis en évidence entre les modalités fermentées par différentes levures. Malgré une deuxième fermentation et plusieurs mois d'élevage, le même effet "levures" a pu être observé à la fin de l'expérimentation, quel que soit l'ester considéré. Ces résultats démontrent la pertinence et la permanence de l'effet "levures" sur cette famille chimique.

Ainsi, dans les vins WEC 11, WEC 12 et PL, les modalités fermentées par la souche **FX10** contiennent significativement plus d'esters éthyliques d'acides gras (du C<sub>4</sub>C<sub>2</sub> au C<sub>12</sub>C<sub>2</sub>) que les autres modalités. Leurs concentrations diminuent au cours du temps et sont toutes inférieures au seuil de perception considéré, quel que soit le temps de prélèvement. Les EEAG ne peuvent donc pas avoir d'influence directe sur la modulation de la note fruitée des vins. Les écarts mesurés entre les différentes modalités semblent également trop faibles pour être perçus olfactivement, au regard des études préalablement menées sur les interactions perceptives (Pineau *et al.*, 2009).

Les acétates d'alcools supérieurs sont quant à eux principalement synthétisés par les levures **522D** et **FX10**. L'acétate d'isoamyle, principal composé de cette famille, est présent dans les vins à des concentrations supérieures à son seuil de perception et peut donc avoir un impact direct sur l'arôme. Au vu de leurs concentrations, d'autres acétates comme l'acétate d'hexyle et l'acétate de 2-phényléthyle pourraient également jouer un rôle dans la modulation des notes fruitées *via* des phénomènes de synergie (Pineau, 2007).

Enfin, les esters branchés constituent la troisième sous famille d'esters pouvant avoir un rôle central. Dans les quatre expérimentations, ils sont retrouvés en plus grande quantité dans les vins fermentés par la levure **522D**, à des concentrations proches voire supérieures à leur seuil de perception. De plus, les écarts de concentrations observés, de l'ordre de quelques microgrammes par litre, entre les différentes modalités, et notamment entre "**522D**" et "**FX10**", devraient être suffisants pour modifier l'arôme fruité du vin et être perçus par les dégustateurs (Pineau, 2007).

En complément des analyses chimiques, trois tests d'analyse sensorielle ont été utilisés.

Le Napping®, utilisé pour étudier les vins du millésime 2011 a permis d'observer de façon globale l'effet des différents couples sur l'arôme du vin. Il a ainsi été montré que le caractère fruité est l'attribut le plus influencé par la souche de levures. Les vins fermentés par les souches **FX10** et **XR** ont été différenciés de ceux inoculés avec la levure **522D** sur la base de leurs notes fruitées. Les tests de classement et de profil conventionnel ont permis de confirmer ces observations sur les trois vins du millésime 2012. Pour toutes les expérimentations, les vins fermentés par la souche **FX10** ont été perçus comme plus fruités que les vins inoculés avec la levure **XR** ou **522D**. A SE où **FX10** n'a pas été testée, les modalités "**XR**" ont été décrites comme plus fruitées que les modalités "**522D**".

Lors des différents tests d'analyse sensorielle, les vins ont également été caractérisés par des notes "fumé/grillé", souvent en opposition avec les notes liées au fruité. L'apparition d'un masque de l'arôme fruité a déjà été décrite mais les composés responsables de cette odeur n'ont pas été identifiés. Il pourrait s'agir de notes de réduction, dues à la libération de certains composés volatils soufrés. Des travaux complémentaires, plus approfondis, sont nécessaires pour déterminer l'origine de ces notes "fumé/grillé".

L'effet "levures" mis en évidence dans ce travail a été observé sensoriellement, y compris après 3 et 12 mois d'élevage. Comme pour les esters, l'impact de la levure sur l'arôme fruité persiste au cours du temps. Cependant, ces résultats ne concordent pas parfaitement avec ceux de l'analyse chimique. Les trente-deux esters dosés ne permettent pas à eux seuls d'expliquer les différences sensorielles perçues par le panel entre deux modalités. Ces résultats suggèrent l'existence dans les vins d'autres composés volatils capables d'augmenter l'arôme fruité. La détermination de ces molécules constitue le principal enjeu de la deuxième partie de cette thèse.

Le vin est une matrice complexe, composée de centaines de molécules volatiles et non volatiles potentiellement impliquées dans la modulation de l'arôme fruité. Le dosage d'une grande partie de ces composés serait possible, néanmoins, il semble peu vraisemblable qu'une méthode de criblage aussi large puisse permettre l'identification de molécules clés. Pour permettre cette recherche efficacement, nous avons donc choisi de simplifier la matrice grâce au fractionnement par chromatographie en phase liquide d'extraits de vin, méthode déjà employée dans le laboratoire, et d'étudier les fractions d'intérêt conjointement par GC-MS et par flairage.

## **DEUXIÈME PARTIE : Mise en évidence d'interactions perceptives**

## Chapitre 4 : Elaboration d'une stratégie guidée par l'analyse sensorielle dans le but d'isoler une fraction odorante d'intérêt

Dans le but de cibler les molécules responsables des différences sensorielles observées dans le chapitre précédent, des extraits de vin ont été fractionnés par chromatographie en phase liquide à haute pression. L'étape préliminaire consiste à sélectionner les fractions d'intérêt par simple flairage, puis à tester leur impact sur l'arôme fruité de diverses reconstitutions aromatiques à l'aide de plusieurs tests d'omission.

### **I. Intérêt du fractionnement des vins par HPLC**

Le vin est une matrice complexe, composée de plus de 800 molécules aromatiques potentiellement impliquées dans la modulation de l'arôme fruité des vins rouges (Maarse et Visscher, 1989). L'extraction liquide/solide ou liquide/liquide de vins permet de simplifier cette matrice tout en conservant la complexité aromatique et le caractère fruité du vin (Kotseridis et Baumes, 2000 ; Aznar *et al.*, 2001 ; Escudero *et al.*, 2007). L'étude de ces extraits de vin par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (GC-O) et des zones odorantes obtenues, ont permis de mettre en évidence de nombreux composés aromatiques participant à l'arôme du vin (Bouchilloux *et al.*, 1998 ; Kotseridis et Baumes, 2000 ; Ferreira *et al.*, 2001 ; Escudero *et al.*, 2007). L'analyse par GC-O connaît toutefois quelques limites. En effet, l'extrait de vin est généralement caractérisé par un très grand nombre de zones odorantes, dont beaucoup ont des durées longues (plusieurs secondes) et présentent un arôme qui varie entre le début et la fin de la perception en raison de co-élutions (Pineau, 2007). Il est donc difficile d'obtenir à partir d'extraits aromatiques aussi complexes des zones odorantes brèves et dont l'arôme soit net. La mise au point de méthodes d'isolement des différentes nuances constituant l'arôme final du vin a permis une simplification du milieu par rapport aux extraits bruts de vins rendant plus facile l'étude de zones odorantes spécifiques (Ferreira *et al.*, 1999 ; Barbe *et al.*, 2008).

## I.A. Principe et contraintes de la stratégie de fractionnement par HPLC

La méthode d'isolement des différents arômes par fractionnement des extraits bruts de vin par HPLC a été développée par Ferreira *et al.*, (1999) et optimisée dans notre unité par Pineau (2007). Le protocole de fractionnement d'extraits de vin présente deux étapes : une première phase d'extraction, dont l'objectif est de récupérer au maximum l'ensemble des arômes du vin, et une deuxième phase de fractionnement.

L'étape d'extraction peut être réalisée par extraction liquide/liquide, grâce à un solvant organique tel que le dichlorométhane ou un mélange pentane/éther (1 : 1, v : v) ou par extraction liquide/solide sur différentes résines. Ces dernières ont cependant l'inconvénient de libérer des résidus d'arômes type plastique, retrouvés dans des fractions proches de fractions fruitées d'intérêt et ont donc été écartées du protocole d'extraction (Pineau, 2007).

Le fractionnement de l'extrait de vin peut être réalisé par HPLC sur colonne à polarité de phase normale ou inverse. Cette dernière permet d'obtenir davantage de fractions aromatiques que la séparation en phase normale (**Tableau 37**). Les deux modes de fractionnement présentent cependant toutes deux une bonne discrimination des nuances aromatiques au sein des arômes fruités. Les notes de fruits rouges et de fruits frais sont par exemple isolées dans des fractions différentes (**Tableau 37**). Le fractionnement en phase normale permet d'obtenir des fractions dans un solvant organique, particulièrement adapté pour une analyse directe (injection de la fraction en GC par exemple). Cependant, cette méthode ne permet pas l'analyse olfactive par flairage directe des fractions, du fait de la présence de solvant. Il est donc nécessaire de passer par une olfaction sur mouillette. L'analyse sensorielle est alors très éloignée de celle d'un vin et les résultats peuvent s'en trouver biaisés. Au contraire, le fractionnement en phase inverse permet d'obtenir des fractions en solution hydro-alcoolique que l'on peut utiliser directement pour l'analyse sensorielle des différentes fractions ou mélange de fractions. Ce type de fractionnement nécessite cependant une nouvelle étape d'extraction dans un solvant organique pour l'analyse en GC des fractions sélectionnées (Pineau, 2007).

Le fractionnement HPLC sur colonne C18 à polarité de phase inverse d'un extrait de vin rouge au dichlorométhane présente l'avantage de conserver une forme d'intégrité de l'arôme du vin. Si l'ensemble de la méthode d'extraction, puis de fractionnement de l'extrait ne permet pas de conserver la totalité de l'arôme initial du vin, Pineau (2007) a cependant montré que les notes dominantes caractérisant un vin sont retrouvées au sein des différentes fractions. De plus, l'ajout de plusieurs fractions fruitées dans une matrice peu aromatique telle

qu'un vin "désaromatisé" suffit à lui conférer des notes aromatiques proches de celles retrouvées dans le vin d'origine (Pineau, 2007 ; Lytra, 2012).

**Tableau 37.** Description des fractions obtenues par fractionnement HPLC en phase normale et en phase inverse par un jury constitué de 11 à 20 juges considérés comme experts (d'après Pineau, 2007).

Fraction	HPLC phase normale sur colonne -NH <sub>2</sub>	HPLC phase inverse sur colonne C18
1	-	-
2	-	-
3	-	beurré - très intense
4	-	crème, lacté
5	-	crème, lacté
6	-	crème, caramel - très intense
7	floral	fromage, butyrique
8	floral, lourd (chocolat, caramel)	floral, résine de pin
9	floral, fromage	solvant, végétal
10	floral, lourd (biscuits, beurre)	fruité type alcool benzylique
11	floral, légèrement épicé, agrumes	phénolique, lourd
12	-	solvant (vernis)
13	-	solvant, floral
14	-	floral, agrumes
15	fruité (fruits rouges frais) - léger	floral, noisettes grillées
16	floral, fruité chimique (bonbon anglais)	floral, agrumes (citron)
17	fruité (confiture de fraises, de framboises)	mentholé, épicé, fruité (fruits rouges frais)
18	grillé, caoutchouc brûlé	fruité chimique (fraise, banane, fermentaire) - intense
19	-	fruité (framboise fraîche très net, citron)
20	-	fruité (confiture de fraises, de framboises)
21	-	fruité (fruits rouges) - léger caoutchouc brûlé
22	-	grillé, brûlé
23	-	éthanol
24	-	éthanol
25	-	éthanol

Cependant, l'arôme du vin diffère significativement de celui de la reconstitution aromatique (RA) totale des 25 fractions issues de ce même vin (Lytra, 2012). Cette observation peut s'expliquer, d'une part par une différence de composition en molécules aromatiques entre le vin et la reconstitution et, d'autre part, par une différence de composition de la partie non volatile de la matrice par rapport à celle du vin. De nombreuses études ont mis en évidence

des phénomènes d'interactions entre des composés volatils et non volatils du vin comme les composés phénoliques (Dufour et Bayonove, 1999a ; Dufour et Sauvaitre, 2000 ; Rocha *et al.*, 2001 ; Aronson et Ebeler, 2004 ; Lorrain *et al.*, 2013), les polysaccharides (Dufour et Bayonove, 1999b), le dioxyde de soufre ou encore les catéchols (Ferreira *et al.*, 2003) pouvant moduler la perception de l'arôme fruité des vins.

### **I.B. Quelques exemples d'interactions perceptives mises en évidence grâce au fractionnement par HPLC d'extraits de vin**

Cette méthode d'extraction et de fractionnement visant à simplifier la matrice a déjà permis l'identification de plusieurs molécules volatiles ayant un impact sur l'arôme des vins. La manipulation des différentes fractions et l'utilisation de reconstitutions aromatiques plus ou moins complètes, c'est-à-dire avec l'ensemble ou une partie des fractions, a également permis de mettre en évidence des effets d'interactions perceptives (effet exhausteur, masquage) entre différents composés aromatiques.

La comparaison des RA (fractions 17 à 22) et RA (fractions 18 à 22) issues de vins rouges a par exemple montré que l'intensité des notes "fruits frais" et "fruits noirs" était plus élevée dans le cas de la RA (17 à 22). La fraction 17, pourtant elle-même de faible caractère fruité, contribue donc à ces notes de fruits noirs et fruits frais, suggérant un effet exhausteur d'un ou plusieurs composés présents dans cette fraction (Lytra, 2012). L'analyse de la composition de cette fraction par GC-O et GC-MS a permis de mettre en évidence la présence du 2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle ou leucate d'éthyle (Falcao *et al.*, 2012). Cet ester avait déjà été quantifié dans de vieux Madère et certains Xérès (Campo *et al.*, 2006), mais son impact sur l'arôme fruité des vins rouges en temps qu'exhausteur n'avait jusqu'à présent pas été démontré.

Lytra *et al.* (2012b) ont également utilisé cette méthode de fractionnement pour mettre en évidence un effet masquage du caractère fruité par les fractions 3 à 5. En effet, l'ajout de ces trois fractions à la RA totale suffit à diminuer la perception de la note fruitée des vins rouges. Ces résultats indiquent donc que ces fractions, aux notes beurrées et lactées et les molécules qui les composent (diacétyle, acétoïne, acide acétique et  $\gamma$ -butyrolactone) peuvent avoir un effet sur l'arôme fruité des vins. Si les propriétés organoleptiques directes de ces composés avaient déjà été décrites, cette étude récente a permis de mettre en évidence, à l'aide de

différentes RA, l'effet masquant de ces molécules sur les notes de fruits frais ainsi que leur effet intensifiant sur les notes de fruits confiturés.

Par ailleurs, les vins blancs de "pourriture noble" de Bordeaux sont caractérisés par des notes évoquant les agrumes et les fruits secs dans les vins jeunes, le zeste d'orange dans les vins plus âgés, et des nuances de miel ou de cire dans les vins soumis à un vieillissement oxydatif (Peynaud, 1980). Plusieurs composés volatils de familles chimiques différentes ont été identifiés par GC-O et GC-MS et corrélés avec la typicité de ces vins botrytisés (Sarrazin *et al.*, 2007a ; Sarrazin *et al.*, 2007b ; Sarrazin *et al.*, 2010). L'utilisation de la technique du fractionnement par HPLC d'extrait de vin a, là aussi, permis d'isoler une fraction contenant l'arôme "oranges confites", considéré comme une des nuances "clés" de l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble (Stamatopoulos *et al.*, 2014). Plusieurs tests d'omission ont été réalisés à partir des RA et ont mis en évidence l'impact de cette fraction sur l'arôme des vins. En effet, son omission, au niveau de l'aromagramme, entraîne la perte du caractère "fruits confits" dans les extraits. L'étude de cette fraction par GC-MS a permis d'identifier une nouvelle lactone spécifique des vins liquoreux, le 2-nonèn-4-olide (Stamatopoulos *et al.*, 2014).

## II. Analyses préliminaires

Avant d'utiliser les fractions obtenues par HPLC pour élaborer et comparer des reconstitutions aromatiques de nos différentes modalités, nous avons tenté d'évaluer la fiabilité et la reproductibilité de la méthode.

### II.A. Méthodologie

#### *II.A.1. Extraction liquide-liquide suivie du fractionnement par HPLC*

100 mL de vin sont extraits successivement avec 8, 4 et 4 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases, organiques et aqueuses, sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les trois phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 50 mL et l'émulsion est cassée à l'aide d'un barreau

magnétique tournant lentement. Les traces d'eau de la phase organique sont éliminées à l'aide de sulfate de sodium anhydre. L'extrait est ensuite concentré sous flux de diazote jusqu'à un volume final de 250  $\mu$ L puis fractionné par HPLC. Les conditions chromatographiques, optimisées par Pineau (2007), sont présentées dans le **Tableau 38**. Les fractions sont recueillies toutes les 2 minutes, afin d'obtenir 25 fractions de 1 mL en phase aqueuse plus ou moins riches en éthanol.

**Tableau 38.** Conditions expérimentales de l'HPLC pour le fractionnement d'un extrait brut.

Appareil :			
Pompe : L-6200 A (Merck-Hitachi, Germany)			
Carousel : Model 2110 Fraction Collector (Bio-Rad, USA)			
Colonne :			
Nova-Pak C18 (phase inverse)			
30 m x 3,9 mm			
Diamètre des pores 4 $\mu$ m			
Injection :			
200 $\mu$ L, à l'aide d'un injecteur manuel			
Phase mobile :			
Solvant A : eau distillée			
Solvant B : éthanol (pureté > 99,9 %)			
Débit : 0,5 mL/min			
Gradient linéaire :			
Temps (min)	0	2	50
% de B	0	0	100
Remise à zéro :			
Solvant : 100 % A			
Temps : 15 min			

### ***II.A.2. Reconstitutions aromatiques***

Les fractions aromatiques utilisées pour les reconstitutions provenaient de différents vins :

- vin de Cabernet Sauvignon de Pays d'Oc, disponible au laboratoire
- vin de Cabernet Sauvignon de la région de Bordeaux, également disponible
- vin WEC 2011, 3 mois d'élevage
- vin WEC 2012, 3 mois d'élevage
- vin PL 2012, 3 mois d'élevage

Les reconstitutions aromatiques élaborées à partir des 25 fractions obtenues par HPLC ont été préparées en assemblant toutes les fractions et en les mettant en solution de telle sorte que le volume final obtenu corresponde au volume de vin à l'origine de ces fractions (soit 100 mL). La matrice obtenue était une matrice hydro-alcoolique constituée d'eau distillée et d'éthanol absolu (VWR, pureté > 99,9 %) avec un TAV de 12 % v/v.

## **II.B. Validation de la méthode de fractionnement et sélection des vins**

Plusieurs dégustations ont été organisées dans les conditions décrites Chapitre 3.II. p.113 (Martin et de Revel, 1999). Les verres utilisés sont des verres noirs correspondant à la norme ISO 3591 : 1977. Toutes les analyses sensorielles ont porté exclusivement sur la perception orthonasale.

### ***II.B.1. Validation de la méthode***

#### *II.B.1.a. Méthodologie de l'analyse sensorielle*

Avant d'utiliser les fractions obtenues par HPLC pour élaborer diverses reconstitutions aromatiques, le premier objectif a été d'évaluer la validité et la répétabilité de la méthode d'extraction et de fractionnement. S'il a déjà été montré dans l'étude bibliographique que l'arôme du vin était différent de celui de la RA totale, nous voulions nous assurer que les différences observées entre deux vins étaient également observables entre les RA de ces mêmes vins (séances 1 et 2, **Tableau 39**). La répétabilité de la méthode a été évaluée en comparant les RA totales de deux échantillons (a et b) d'un même vin (séances 3 et 4, **Tableau 39**).

**Tableau 39.** Echantillons utilisés lors des différents tests triangulaires.

	Matrice	Echantillons comparés	
Séance 1	vin	Pays d'Oc	Bordeaux
Séance 2	RA (1 à 25)	Pays d'Oc	Bordeaux
Séance 3	RA (1 à 25)	Pays d'Oc (a)	Pays d'Oc (b)
Séance 4	RA (1 à 25)	Bordeaux (a)	Bordeaux (b)

RA : Reconstitution aromatique

Les différents échantillons ont été évalués par un test triangulaire (NF EN ISO 4120 : 2007). Le but de cette épreuve discriminative est de comparer deux vins dont on cherche à évaluer s'ils présentent ou non des différences sensorielles (Martin et de Revel, 1999). Pour ce faire, trois échantillons, dont deux sont identiques, sont présentés simultanément aux juges qui doivent désigner l'échantillon différent. Six présentations sont possibles suivant la nature du produit répété (A ou B) et la position de l'échantillon unique : AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB. L'ordre de présentation des verres est équilibré sur l'ensemble des individus. Le traitement statistique de ce test est basé sur la loi binomiale : l'hypothèse initiale est l'identité entre les deux produits (hypothèse nulle  $H_0$ , probabilité de réponse correcte  $p = 1/3$ ). La probabilité que l'hypothèse initiale, notée  $P$ , soit vraie est calculée comme suit :

$$P = \sum_{i=r}^n C \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

Avec  $r$  : nombre de réponses correctes

$n$  : nombre de sujets

$q$  :  $1 - p = 2/3$

Plus  $P$  est faible, c'est-à-dire proche de 0, moins l'hypothèse d'identité des modalités est vraisemblable. Les valeurs limites de significativité généralement adoptées sont 0,05 ; 0,01 et 0,001. Ainsi, lorsque  $P$  est inférieure à ces valeurs, les échantillons sont considérés comme différents au risque de 5 %, 1 % et 0,1 % respectivement. Afin de faciliter l'analyse des réponses, des tables, dites tables de la loi binomiale sont disponibles dans la littérature (NF EN ISO 4120 : 2007 ; Martin et de Revel, 1999).

Le panel utilisé pour les quatre séances est constitué de 15 dégustateurs (6 hommes, 9 femmes) âgés de  $33 \pm 6,8$  ans (moyenne  $\pm$  écart type).

La fiche de dégustation présentée au panel est fournie en annexe 3.

### *II.B.1.b. Résultats et discussion : évaluation de la méthode de fractionnement*

L'objectif de ces premiers tests étaient de s'assurer du respect de "l'intégrité" de l'arôme du vin suite à l'extraction liquide/liquide et au fractionnement HPLC. Les résultats des tests triangulaires pour les séances 1, 2, 3 et 4 sont présentés dans le **Tableau 40**.

Au cours de la séance 1, les deux vins ont été jugés significativement différents par le panel, au risque de 0,1 %. Les RA totales des extraits des deux vins sont également perçues comme significativement différentes par le panel, au seuil de 1 % (séance 2).

Ce résultat suggère que les étapes d'extraction et de fractionnement n'ont pas affecté l'arôme des deux vins.

Les résultats des tests triangulaires n'ont pas montré de différence significative entre les RA (a) et (b) pour les deux vins testés. On peut donc en conclure que la méthode est reproductible.

**Tableau 40.** Résultats du test triangulaire pour les séances 1, 2, 3 et 4.

	Matrice	Echantillons comparés		Significativité
Séance 1	vin	Pays d'Oc	Bordeaux	***
Séance 2	RA (1 à 25)	Pays d'Oc	Bordeaux	**
Séance 3	RA (1 à 25)	Pays d'Oc (a)	Pays d'Oc (b)	NS
Séance 4	RA (1 à 25)	Bordeaux (a)	Bordeaux (b)	NS

RA : Reconstitution Aromatique ; \*\* P < 0,01 ; \*\*\* P < 0,001 ; NS : Non significatif

## ***II.B.2. Sélection des vins***

L'objectif ici est de s'assurer que les différences mises en évidence entre les couples levures/BL grâce aux tests de classement décrits au chapitre 3.II.B. entre les différentes modalités des vins WEC12 et PL existent également avec les RA de ces mêmes vins. L'expérimentation SE n'a pas été testée dans cette partie, les différences sensorielles entre les modalités ayant été perçues comme moins nettes par les juges au cours des différents tests d'analyse sensorielle. La méthode d'extraction et de fractionnement étant assez lourde à réaliser, seuls les vins après 3 mois d'élevage ont été testés. Ce test doit donc nous permettre de sélectionner les vins pouvant servir à l'étude de l'impact de la souche de levures sur la modulation de la note fruitée.

### *II.B.2.a. Méthodologie de l'analyse sensorielle*

Les juges ont classé les reconstitutions aromatiques issues des différents vins par ordre croissant d'intensité de la note fruitée (pas d'ex aequo possible). La méthodologie du test de classement est identique à celle décrite au chapitre 3.II.B.1. p123. Deux séances ont été réalisées :

- **Séance 5** : Reconstitutions aromatiques (1 à 25) des vins PL (4 couples levures/BL) après **3 mois d'élevage** avec 19 dégustateurs (6 hommes, 13 femmes) âgés de  $35 \pm 7,1$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 6** : Reconstitutions aromatiques (1 à 25) des vins WEC 2012 (6 couples levures/BL) après **3 mois d'élevage** avec 21 dégustateurs (9 hommes, 12 femmes) âgés de  $34 \pm 8,3$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)

### *II.B.2.b. Résultats et discussion*

Les résultats et le traitement statistique des données obtenues suite aux séances d'analyse sensorielle 5 et 6 sont présentée dans le **Tableau 41**.

**Tableau 41.** Résultats du test de classement par rangs des RA pour les séances 5 (PL, 3 mois), 6 (WEC 2012, 3 mois).

	Somme des rangs						F	$\chi^2$ à 5 %	$\chi^2$ à 1 %	$\chi^2$ à 0,1 %	Résultat
	XR/B28	XR/450	FX10/B28	FX10/450	522D/B28	522D/450					
Séance 5	-	-	57	60	36	37	15,44	7,81	11,34	16,27	Significatif à 1 %
Séance 6	74	54	73	96	75	69	12,37	11,07	15,09	20,52	Significatif à 5 %

Les résultats obtenus à partir des reconstitutions aromatiques issues des vins PL (séance 5) montrent que le test est significatif au seuil de 1 %. Les dégustateurs ont distingué les RA des différentes modalités et les ont classées selon l'intensité de la note fruitée. Les sommes des rangs les plus importantes ont été attribuées aux modalités fermentées avec la souche de levures **FX10**.

En outre, on calcule le PPDS = 15,60. On en déduit que les RA des vins fermentés avec la levure **FX10** apparaissent significativement plus fruités que les RA des vins inoculés avec la levure **522D**.

Lors du test de classement de ces vins, le panel avait également jugé plus fruités les vins fermentés par la levure **FX10**, avec un seuil de significativité de 0,1 %. Le même résultat a donc été obtenu, avec le vin et avec la RA en solution hydro-alcoolique, ce qui confirme l'intérêt de l'utilisation de cette méthode pour étudier l'impact de la souche de levures sur l'arôme fruité de ces vins.

Concernant les RA issues des vins WEC12 (séance 6), le traitement statistique des résultats obtenus montrent que le panel a classé les différentes modalités en fonction de leur note fruitée, au risque de 5 %. De plus, le calcul du PPDS = 23,76 permet d'en déduire que :

- la RA issue du vin fermenté avec le couple **FX10/450** est plus fruitée que celles issues des vins fermentés par les autres couples levures/BL
- les RA issues des vins fermentés avec les couples **522D/450** et **XR/450** sont perçues comme moins fruitées que les autres RA

Le classement des vins avait montré que les deux modalités fermentées par la levure **FX10** avaient été perçues comme plus fruitées, au seuil de 1 %. Si les résultats semblent concorder entre vin et RA, ils sont cependant moins nets que pour les vins PL. La matrice, mais également le nombre de modalités plus important (6 pour WEC12 contre 4 pour PL) augmentent certainement la difficulté du classement des RA. De plus, les principales différences sensorielles mises en évidence dans les vins concernent les modalités fermentées

avec les levures **FX10** et **522D**. Pour le reste de cette étude, nous nous sommes donc seulement intéressés aux vins de l'expérimentation PL.

### **III. Description olfactive des fractions obtenues par HPLC issues d'un vin de Cabernet Sauvignon fermenté par deux souches de levures différentes à plusieurs étapes de vinification et d'élevage**

Les analyses chimiques, et notamment le dosage de la concentration en esters, n'ont pas permis d'expliquer totalement les différences observées dans la perception de l'arôme fruité des vins fermentés par les souches de levures **522D** et **FX10**. Le fractionnement par HPLC, suivi de la comparaison des fractions par flairage vise à cibler celles impliquées dans la modulation de l'arôme fruité afin d'en déterminer des composés clés.

#### **III.A. Conditions de l'analyse sensorielle**

Les vins de l'expérimentation PL après FA, FML, 3 et 6 mois d'élevage ont été extraits et fractionnés selon le protocole décrit dans ce chapitre, paragraphe II p.142.

Un panel de 3 à 6 juges, considérés comme spécialistes de l'arôme des vins (2 hommes, 4 femmes âgés de  $41 \pm 5,1$  ans), a été utilisé pour réaliser les analyses descriptives des fractions ainsi que de divers essais préliminaires concernant les RA. La sélection des fractions a été réalisée par olfaction directe de celles-ci. Pour chaque étape de prélèvement, les fractions ont été comparées deux à deux. L'objectif de cette partie est de mettre en évidence la ou les fractions responsables des différences olfactives observées au chapitre 3 entre les modalités fermentées par différentes souches de levures, donc, toutes les combinaisons n'ont pas été testées.

Ainsi, nous avons demandé au panel de comparer deux à deux les fractions des modalités :

- fin FA : **522D** vs **FX10**
- fin FML, 3 mois et 6 mois : **522D/B28** vs **FX10/B28**  
**522D/450** vs **FX10/450**

Trois questions ont été posées au panel :

*(1) Ces deux fractions sont-elles différentes ?*

(2) Si oui, laquelle des deux vous semble la plus intense ?

(3) Quel(s) descripteur(s) caractérise(nt) le mieux, selon vous, ces fractions (vocabulaire libre) ?

La fiche de dégustation est disponible en annexe 5.

Les fractions ont été présentées aux juges dans un ordre aléatoire, codées par un nombre à deux chiffres compris entre 26 et 99 (1 à 25 pouvant influencer les juges).

### **III.B. Description des fractions par les dégustateurs**

#### ***III.B.1. Distinction des fractions deux à deux***

Le panel devait tout d'abord indiquer si les fractions présentées semblaient différentes deux à deux. Quelles que soient les modalités comparées, aucun des juges n'a identifié de différence pour les fractions 1, 2, 22, 23, 24 et 25 pour les quatre temps de prélèvement (fin FA, fin FML, 3 et 6 mois d'élevage).

Concernant les autres fractions, elles ont été jugées différentes par au moins la moitié du panel pour les modalités :

- fin FA, **522D** vs **FX10** : 19 fractions différentes
- fin FML, **522D/B28** vs **FX10/B28** : 17 fractions différentes
- fin FML, **522D/450** vs **FX10/450** : 18 fractions différentes
- 3 mois, **522D/B28** vs **FX10/B28** : 16 fractions différentes
- 3 mois, **522D/450** vs **FX10/450** : 17 fractions différentes
- 6 mois, **522D/B28** vs **FX10/B28** : 12 fractions différentes
- 6 mois, **522D/450** vs **FX10/450** : 11 fractions différentes

#### ***III.B.2. Comparaison de l'intensité aromatique***

Les juges ont ensuite dû déterminer quelle(s) fraction(s) leur paraissai(en)t plus intense(s) pour chaque paire proposée.

Les fractions 3 à 5 ont une odeur plus intense lorsqu'il s'agit des modalités fermentées avec la souche de levures **522D**, quelle que soit la souche de bactéries. Au moins la moitié des juges ont noté cette différence pour les modalités après FML, 3 mois et 6 mois d'élevage. Ils n'ont en revanche pas réussi à se mettre d'accord pour les modalités prélevées après FA.

L'arôme des fractions 6 à 8 issues des vins fermentés par la levure **FX10** a été perçu comme plus intense par au moins la moitié des juges, notamment pour les modalités après FML et 6 mois d'élevage. Cependant, plusieurs juges ont noté une différence plus qualitative que quantitative entre ces fractions. Etant donné que certaines d'entre elles semblaient présenter des arômes différents, il a été difficile pour les juges de statuer sur leur intensité.

Le panel n'a pas réussi à s'accorder sur l'intensité des fractions 9 à 11 et aucun effet souche n'a pu être mis en évidence, tandis que les fractions 12 et 13 sont apparues légèrement plus intenses pour les modalités "**FX10**".

Les fractions 14 et 15 ont été perçues comme plus intenses pour les modalités "**522D**" alors que l'intensité de la fraction 16 semble plutôt liée à la levure **FX10**, et ce à tous les temps de prélèvement.

Enfin, les fractions 17 et 18 ont été jugées plus intenses pour les vins fermentés par la souche **522D** alors que 19, 20 et 21 sont apparues plus intenses pour les modalités "**FX10**". Les différences observées par le panel pour ces cinq dernières fractions concernent principalement les modalités "après FA" et "après FML" et semblent moins nettes pour celles prélevées pendant l'élevage.

### ***III.B.3. Description qualitative des fractions***

Enfin, il était demandé aux juges de proposer quelques descripteurs pour caractériser chaque fraction. L'ensemble du vocabulaire généré par le panel pour les modalités **522D/B28** et **FX10/B28** après FA, FML, 3 et 6 mois d'élevage est présenté dans le **Tableau 42**. Bien qu'appliqués à des vins perçus comme différents à la dégustation, les descripteurs utilisés pour caractériser une fraction donnée sont assez similaires, quelle que soit la souche de levures ou de bactéries de la modalité.

Ainsi, les fractions 2, 3, 4 et 5 sont principalement caractérisées par des odeurs "beurré", "lacté", "frais" évoluant vers des notes "caramel" retrouvées également dans les fractions 6, 7 et 8. Ces dernières sont également décrites avec des arômes plus "rance", "butyrique", "grillé" et "réduit". Les fractions 9, 10 et 11 évoluent vers des notes plus lourdes, type "solvant" alors que les fractions 12 et 13, également caractérisées par des odeurs de solvant apparaissent plus "floral". Enfin, les fractions 14 à 21 sont principalement marquées par des notes de fruits : "agrume", "zeste d'agrumes" et "sueur" pour les fractions 14 à 16, "bonbon", "fermentaire" et "vomi" pour les fractions 17 à 19 et "figue" et "pomme cuite" pour les fractions 20 et 21.

**Tableau 42.** Description des fractions obtenues par fractionnement HPLC des vins PL fermentés par le couple **522D/B28** par un panel constitué de 3 à 6 juges considérés comme spécialistes, à différents temps de prélèvement (fin FA, fin FML, 3 et 6 mois d'élevage).

	FA	FML	3 mois	6 mois
1	-	-	-	-
2	beurré	-	beurré	-
3	beurré, rance	beurré	yaourt, lacté, beurré	frais
4	beurré	beurré, biscuit au beurre	lacté, caramel	lacté, beurré
5	vineux	beurré, lacté, caramel	beurre, fruité, caramel, rance, butyrique	caramel
6	caramel	lacté	beurre léger, lacté, caramel, rance	diacétyle, lacté
7	gâteau au fromage, rance, sec, cuit, réduit, pomme de terre	beurre, caramel, grillé, réduit, poussiéreux, rance	lacté, fromage, patate, solvant, chocolat	beurre, fromage, potage, caramel
8	groseille, réduit, oignon	beurre, réduit, patate, dissolvant	fruité, solvant, réduit	solvant, butyrique, rance, chocolat
9	âcre, lourd, butyrique, irritant	caramel, chocolat, fruits mûrs, solvant, réduit, grillé - très intense	fruité, chocolat, solvant	fromage, fleuri
10	âcre, lourd	floral, fruité	pieds sales, solvant	solvant, irritant
11	floral	floral, alcool sup	solvant	solvant
12	rose, floral	solvant, chocolat	floral	solvant
13	thiols	fleuri, ananas, lourd	fruité, floral	solvant, fleuri
14	élégant	solvant	grillé, miel	grillé, noisette, réduit, sablé chaud, brioche, alcool à brûler
15	fruits, épice, phénolé, thiols	agrumes, thiols	agrumes, fruité, chimique, miel, grillé, caoutchouc	fruité, agrumes surmûris
16	fruits, zestes d'agrumes	framboise, pivoine, lourd, phénolé, agrumes	oranges surmûries, lourd, miel	lourd, thiols, sueur, agrumes
17	épice, vomé, végétal, tabac, fruité, amylique	fruité, vomé, rance - intense	fruité	fruité, un peu vomé
18	fruité, fermentaire, amylique	fruité, lourd - intense	amylique	fruité, amylique
19	amylique	fruité	fruité	amylique
20	floral, rose, pivoine, litchi	fruité, fruits mûrs, confits	$\beta$ -damascénone, floral, figue	$\beta$ -damascénone, pomme cuite
21	agrumes, fruits de la passion	fruits frais, cassis, figue, fleur - très intense	solvant, frais, fruité	$\beta$ -damascénone
22	fumé, tabac	alcool	alcool	alcool
23	alcool	alcool	alcool	alcool
24	alcool	alcool	alcool	alcool
25	alcool	alcool	alcool	alcool

FRACTIONS

**Tableau 42 (suite).** Description des fractions obtenues par fractionnement HPLC des vins PL fermentés par le couple **FX10/B28** par un panel constitué de 3 à 6 juges considérés comme spécialistes, à différents temps de prélèvement (fin FA, fin FML, 3 et 6 mois d'élevage).

	FA	FML	3 mois	6 mois
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	beurré	lacté, épicé	lacté, beurre	lactique
4	âcre	beurré, caramel, grillé, fruité	lacté, beurre, vert	lacté, un peu végétal
5	lactique	beurré, lacté, caramel	beurre	lacté, caramel
6	complexe	beurré, lacté	beurre, yaourt, un peu fruité	crème, caramel, beurré
7	gâteau au fromage, rance, caramel	lacté, butyrique, caramel, grillé, noix, réduit	rance, grillé	café, grillé, rance
8	solvant	solvant, beurré, grillé	rance, butyrique	solvant, butyrique, rance, chocolat
9	agréable	chocolat, solvant, beurre	chocolat, lacté, solvant	grillé, fromage, réduit, irritant, chocolat, solvant
10	âcre, lourd, fruité, floral	solvant, lourd, acides gras	solvant	solvant, irritant
11	lourd, réduit	fleuri, caramel, chocolat, solvant	solvant, fruité, chocolat	fleuri, lilas
12	lourd, réduit	floral, solvant	floral, fané, solvant	fleur fanée
13		fleuri, rose	floral	floral, lourd
14	curry, noix, épicé, phénolé, agrumes, fruits blancs	phényléthanol, lourd, fruité	fruité	frais
15	métallique, champignon, sotolon	dissolvant, bonbon	grillé, orange, thiols, fruité	sueur, agressif, agrumes, phénols, fleuri, capiteux, miel, solvant
16	sueur, fruité	lourd, solvant, agrumes, thiols	zestes d'agrumes, frais	fleuri, thiols
17	épicé, vomé	fromage	fruité, vomé	fruité
18	jus de viande	frais, fruité	fruité, bonbon, frais	fruité, menthé, frais
19	amylique	fruité, frais, pêche, thiols	fruité, bonbon, frais, pêche, solvant	C2/C5, solvant, chimique, fruité, pomme cuite
20	fruité	figue	fruité, complexe	fleuri, bonbon anglais, fruits rouges
21	fruité	floral, figue, mûre	fleuri	vert, poivron, frais
22	alcool	champagne	alcool	alcool
23	alcool	alcool	alcool	alcool
24	alcool	alcool	alcool	alcool
25	alcool	alcool	alcool	alcool

FRACTIONS

### III.C. Discussion

Les résultats obtenus montrent que les juges ont été capables de distinguer les fractions deux à deux issues de deux modalités différentes. A l'exception des fractions 1, 2, 22, 23, 24 et 25, le panel a été en mesure de comparer chaque paire et d'identifier la fraction dont l'arôme semblait le plus intense. Les descripteurs utilisés pour caractériser chaque fraction sont assez similaires d'une modalité à l'autre et concordent avec ceux décrits dans la littérature (Pineau, 2007 ; Lytra, 2012). Le nombre de juges étant faible (3 à 6), aucun test statistique n'a été réalisé pour traiter ces résultats. En outre, l'objectif de ce travail préliminaire n'est pas d'établir un profil sensoriel pour chaque fraction. Il s'agit plutôt d'en faire une première description afin de simplifier l'étude ultérieure de leur implication respective dans l'arôme fruité des RA.

L'identification de fractions différentes au sein de chaque paire présentée semble plus facile pour les modalités issues des vins après FA, après FML et après 3 mois d'élevage. Si l'on écarte les premières et dernières fractions, les 19 fractions restantes issues des vins après FA ont été perçues comme différentes deux à deux. En revanche, concernant les modalités après 6 mois d'élevage, les juges n'ont identifié que 11 et 12 paires de fractions dont l'intensité de l'arôme est différente. Il semble notamment plus difficile pour le panel de percevoir un écart d'intensité pour les fractions (17 à 21) issues de modalités différentes. Ces fractions, caractérisées par des odeurs principalement fruitées telles que "bonbon", "fruits rouges", "cassis", "fermentaire" ou "figue" sont principalement composées d'esters (Pineau, 2007 ; Lytra, 2012). La diminution de leur concentration par hydrolyse évaluée pour certains d'entre eux dans le chapitre 2.II. pourrait expliquer la difficulté des juges à identifier des différences entre les fractions issues de vins ayant subi plusieurs mois d'élevage.

Afin de simplifier l'étude de ces différentes fractions, nous avons cherché à les regrouper par "famille", présentée dans le **Tableau 43**, grâce aux descripteurs générés par le panel. Nous les avons également regroupées par modalité, en fonction de leur intensité décrite par les juges (**Tableau 43**). Les fractions 2 à 5, par exemple, caractérisées par des odeurs "beurré", "lacté", "frais", semblent avoir une odeur plus intense dans les RA issues des vins fermentés par la souche de levures **522D**. Il faut cependant noter que ce classement ne prend en compte que l'effet direct des composés sur l'olfaction. Certaines molécules, dont l'odeur peut être faible lorsqu'elles sont mises à part, peuvent avoir un effet exhausteur ou masquant sur l'arôme total. Il ne s'agit donc ici que d'un moyen de grouper les fractions afin de diminuer le nombre de combinaisons à étudier. Afin de prendre en compte les effets d'interactions entre

composés, l'impact de ces groupes de fractions, issus de différentes modalités, sur la modulation de l'arôme fruité doit être évalué grâce à des RA totales et différents tests d'omissions.

**Tableau 43.** Regroupement des fractions en fonction des descripteurs générés par le panel (3 à 6 juges) et des différences d'intensité de l'arôme perçues par au moins 50 % des juges entre les différentes modalités évaluées.

<b>Descripteurs</b>			
<b>FRACTIONS</b>	1	-	-
	2		
	3	beurré, lacté, frais	<b>522D</b> plus intense
	4		
	5		
	6	caramel, grillé, beurre rance	<b>FX10</b> plus intense
	7		
	8		
	9	âcre, lourd, irritant, solvant, chocolat	pas d'effet levure évident
	10		
	11		
	12	rose, floral, solvant	<b>FX10</b> légèrement plus intense
	13		
	14	thiols, agrumes, sueur	<b>522D</b> plus intense
	15		
	16		
	17	fruité, fermentaire, amylique, pomme cuite, figue, vomé	<b>522D</b> plus intense
	18		
	19		
	20		
	21		
	22		
	23	alcool	-
	24		
	25		

## IV. Mise en évidence d'une fraction d'intérêt grâce à des tests d'omission

L'objectif de cette partie est d'étudier l'impact d'un groupe de fractions sur la modulation de l'arôme fruité de RA totales grâce à des tests d'omission ou d'échange de fractions. L'étude préalablement décrite nous a permis de réduire le nombre de fractions à six groupes : (2 à 5), (6 à 8), (9 à 11), (12 à 13), (14 à 16) et (17 à 21) et de simplifier notre approche expérimentale.

### IV.A. Recherche des fractions d'intérêt

#### *IV.A.1. Méthodologie de l'analyse sensorielle*

Les vins de l'expérimentation PL après FML, 3 et 6 mois d'élevage ont été extraits et fractionnés selon le même protocole décrit dans ce chapitre, paragraphe II p.142. Une solution hydro-alcoolique de 12 % v/v a également été injectée afin d'obtenir 25 fractions hydro-alcoolique exemptes de composés volatils. Lors des tests d'omission, les fractions qui n'ont pas été ajoutées à la RA ont été remplacées par les fractions non odorantes correspondantes. Pour chaque RA, 40 µL de chaque fraction ont été prélevés pour un volume final de 1 mL, dans lequel 3 mL d'eau distillée ont été ajoutés pour obtenir un TAV de 12 % v/v. Ainsi, toutes les combinaisons testées, présentées dans le **Tableau 44**, étaient issues des mêmes échantillons fractionnés. Le nombre d'échantillons testés étant important (13 au total), l'ensemble des combinaisons n'a été testé qu'une seule fois, entre les modalités **FX10/B28** et **522D/B28**.

Les RA étaient présentées dans des flacons de 20 mL à deux juges (un homme et une femme âgés de  $28,5 \pm 2,5$  ans) entraînés à la dégustation. Pour chaque test, il leur a été demandé d'indiquer l'échantillon le plus fruité. Afin d'évaluer l'impact d'un groupe de fractions donné sur la modulation de la note fruitée, deux tests ont été réalisés :

- l'omission de ce groupe de fractions.
- l'échange de fractions : par exemple dans l'expérience 1, les fractions (2 à 5) de la modalité **FX10/B28** ont été ajoutées aux fractions (1 et (6 à 25)) de la modalité **522D/B28** et inversement.

**Tableau 44.** Composition des reconstitutions aromatiques présentées lors des différents tests. Le premier test de chaque expérience est un test d'omission d'un groupe de fractions. Pour le second, les groupes de fractions testés ont été échangés et mélangés à la RA issue de l'autre levure. Les modalités comparées sont **FX10/B28** vs **522D/B28** issues des vins PL après FML.

<b>Echantillons comparés</b>		
Témoin	RA (1 à 25)	RA (1 à 25)
Expérience 1	RA (1 à 25) - (2 à 5)	RA (1 à 25) - (2 à 5)
	RA (1 à 25) + (2 à 5)	RA (1 à 25) + (2 à 5)
Expérience 2	RA (1 à 25) - (6 à 8)	RA (1 à 25) - (6 à 8)
	RA (1 à 25) + (6 à 8)	RA (1 à 25) + (6 à 8)
Expérience 3	RA (1 à 25) - (9 à 11)	RA (1 à 25) - (9 à 11)
	RA (1 à 25) + (9 à 11)	RA (1 à 25) + (9 à 11)
Expérience 4	RA (1 à 25) - (12 à 13)	RA (1 à 25) - (12 à 13)
	RA (1 à 25) + (12 à 13)	RA (1 à 25) + (12 à 13)
Expérience 5	RA (1 à 25) - (14 à 16)	RA (1 à 25) - (14 à 16)
	RA (1 à 25) + (14 à 16)	RA (1 à 25) + (14 à 16)
Expérience 6	RA (1 à 25) - (17 à 21)	RA (1 à 25) - (17 à 21)
	RA (1 à 25) + (17 à 21)	RA (1 à 25) + (17 à 21)

RA : Reconstitution Aromatique

#### **IV.A.2. Résultats et discussion**

Comme attendu, la RA (1 à 25) de la modalité **FX10/B28** a été perçue par les deux juges comme plus fruitée que celle de la modalité **522D/B28**.

Les expériences 1, 2, 3, 5 et 6 n'ont pas permis d'identifier de fractions intéressantes, quel que soit le test. Après l'omission des fractions (2 à 5), (6 à 8), (9 à 11), (14 à 16) et (17 à 21) respectivement, la modalité **FX10/B28** a été identifiée comme plus fruitée. Après l'échange de fractions (6 à 8) et (9 à 11) dans les RA, la modalité **FX10** a été encore une fois perçue comme plus fruitée. En revanche, l'échange des fractions (2 à 5), (14 à 16) et (17 à 21) a entraîné une perte de différence nette dans l'intensité de la note fruitée entre **FX10** et **522D**.

Après l'omission des fractions (12 à 13), une diminution de l'intensité de l'arôme fruité a été observée par les juges. La modalité **FX10/B28** est restée néanmoins perçue comme plus fruitée que la modalité **522D/B28**. Après l'échange de fractions, la modalité **522D/B28** a été identifiée comme plus fruitée que la modalité **FX10/B28**.

L'omission de fractions n'a jamais entraîné la perte totale de l'arôme fruité. Bien évidemment, celui-ci s'en est trouvé modifié, notamment après l'omission des fractions (14 à 16) et surtout (17 à 21) principalement caractérisées par des notes "fruits rouges", "fruits noirs" et "fermentaire". Après l'échange d'un groupe de fractions donné dans les RA, trois résultats ont pu être observés : (1) pas de modification de l'intensité de l'arôme fruité : la modalité **FX10** reste plus fruitée, (2) perte de différence entre les échantillons : l'intensité aromatique des modalités **FX10** et **522D** n'est plus perçue comme différente, (3) changement dans la perception de l'intensité de la note fruitée : la modalité **522D** est décrite comme plus fruitée que la modalité **FX10**. Ces deux derniers résultats indiquent la présence de composés capables de modifier ou de moduler l'arôme fruité. Néanmoins, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement aux fractions (12 à 13), seul groupe identifié par les deux juges comme étant capable de modifier et d'inverser de façon nette l'intensité de l'arôme fruité.

L'expérience 4 a donc été renouvelée avec les vins :

- fin FML, **FX10/450** vs **522D/450**
- 3 mois, **FX10/B28** vs **522D/B28**
- 3 mois, **FX10/450** vs **522D/450**

Dans tous les cas :

- la RA (1 à 25) de la modalité **FX10** a été perçue plus fruitée que celle de la modalité **522D**.
- après omission des fractions (12 à 13) la modalité **FX10** est toujours perçue comme plus fruitée que la modalité **522D**.
- après échange des fractions (12 à 13) la modalité **522D** devient plus fruitée que la modalité **FX10**.

Ces derniers tests semblent confirmer la présence dans les fractions (12 à 13) d'un ou plusieurs composés capables de moduler l'intensité de l'arôme fruité. Ils n'ont cependant été réalisés que sur un panel très réduit (deux juges). Ces différentes RA ont donc été présentées à un panel plus large, afin de valider statistiquement l'effet observé.

## IV.B. Confirmation de l'importance de la fraction 12 dans la perception de l'arôme fruité

### IV.B.1. Méthodologie de l'analyse sensorielle

Des séances d'analyse sensorielle avec un panel de dégustateurs entraînés ont été réalisées dans le but de (1) identifier quelle fraction, 12 ou 13, a un impact sur l'intensité de l'arôme fruité, et de confirmer l'effet de cette fraction (2) sur un vin commercial et (3) entre les modalités **522D** et **FX10**.

Pour chaque RA, 40 µL de chaque fraction ont été prélevés pour un volume final de 1 mL, dans lequel 3 mL d'eau distillée ont été ajoutés pour obtenir un TAV de 12 % v/v. Les échantillons ont été présentés dans des verres noirs dans les conditions de dégustation décrites dans le chapitre 3. Il a été demandé aux juges de comparer olfactivement les échantillons présentés dans le **Tableau 45** et de noter l'intensité de la note fruitée pour chaque échantillon, sur une échelle discontinue allant de 0 à 7.

**Tableau 45.** Composition des reconstitutions aromatiques présentées lors des différents tests de profil. Les RA utilisées pour l'expérience 1 sont issues d'un cru classé Pessac-Léognan 2003. Les modalités comparées au cours de l'expérience 2 sont **FX10/B28** vs **522D/B28**, issues des vins PL après 3 mois d'élevage.

Echantillons comparés	
Expérience 1	RA (1 à 25) / RA (1 à 25) - (12 à 13)
	RA (1 à 25) / RA (1 à 25) - (12)
	RA (1 à 25) / RA (1 à 25) - (13)
Expérience 2	RA (1 à 25) / RA (1 à 25)
	RA (1 à 25) - (12) / RA (1 à 25) - (12)
	RA (1 à 25) + (12) / RA (1 à 25) + (12)

RA : Reconstitution Aromatique

#### • Expérience 1

Les fractions aromatiques obtenues selon le même protocole décrit dans ce chapitre, paragraphe II p.140, provenaient d'un cru classé Pessac-Léognan du millésime 2003. Ce vin particulièrement fruité est issu d'un assemblage de cépages bordelais (56 % de Cabernet

Sauvignon, 38 % de Merlot et 6 % de Cabernet Franc) est caractérisé par des notes de groseille, de cassis et de cerise (Parker, 2009). Le panel était constitué de 19 dégustateurs (9 hommes, 10 femmes) âgés de  $30,9 \pm 4,3$  ans (moyenne  $\pm$  écart type).

#### • Expérience 2

Les fractions aromatiques provenaient des vins PL après 3 mois d'élevage. Seules les modalités **FX10/B28** et **522D/B28** ont été comparées. Le panel était constitué de 16 dégustateurs (8 hommes, 8 femmes) âgés de  $32 \pm 6,4$  ans (moyenne  $\pm$  écart type). Il a été demandé aux juges de comparer les RA totales (1 à 25), les RA ne contenant pas la fraction 12 puis les RA contenant la fraction 12 de l'autre modalité.

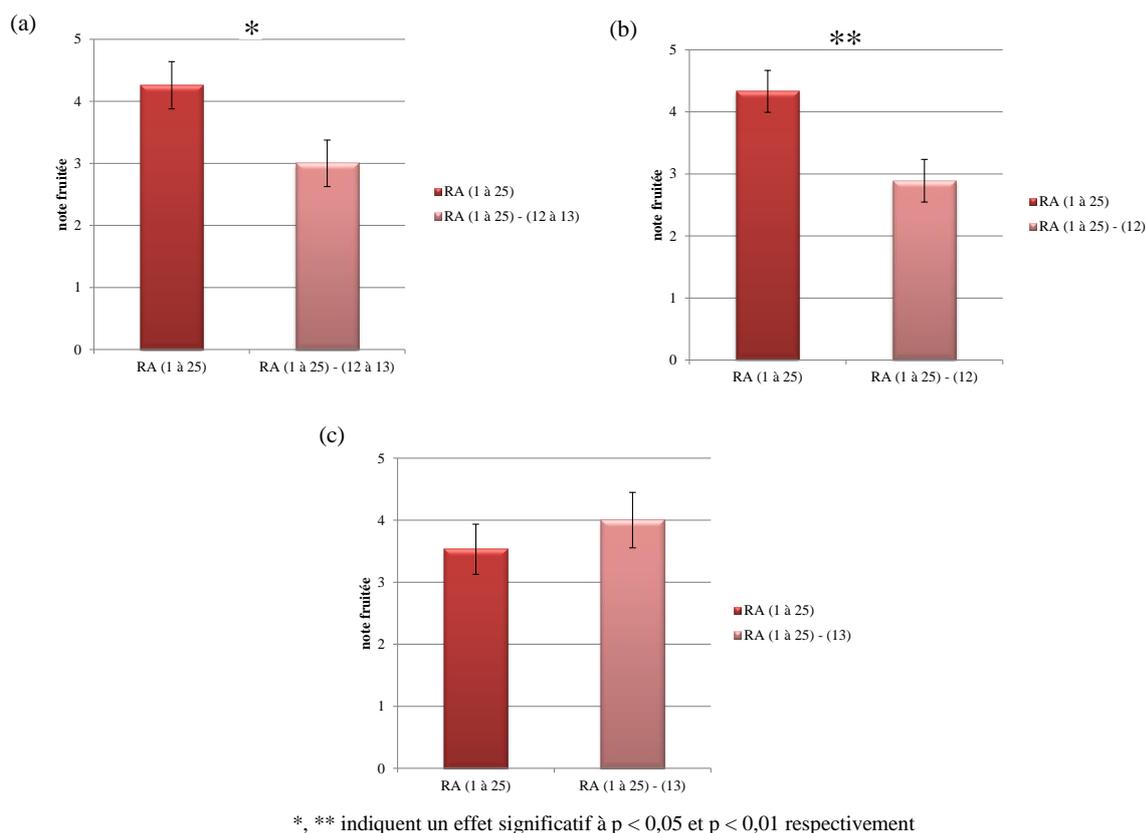
### ***IV.B.2. Résultats et discussion***

#### *IV.B.2.a. Expérience 1 : sélection de la fraction 12*

Les résultats obtenus lors de l'expérience 1 sont présentés **Figure 28**.

L'omission des fractions (12 à 13) entraîne bien une diminution significative de l'intensité de la note fruitée, au risque de 5 %. Ce premier test confirme l'impact de ces fractions et montre que cet effet est également observable sur un vin commercial, vinifié de façon classique.

L'omission de la fraction 12 entraîne également une diminution significative de l'intensité de l'arôme fruité, au seuil de 1 %. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre la RA totale et la RA privée de la fraction 13. Ces résultats mettent en évidence l'impact d'une seule fraction sur la modulation de l'intensité de la note fruitée : la fraction 12.



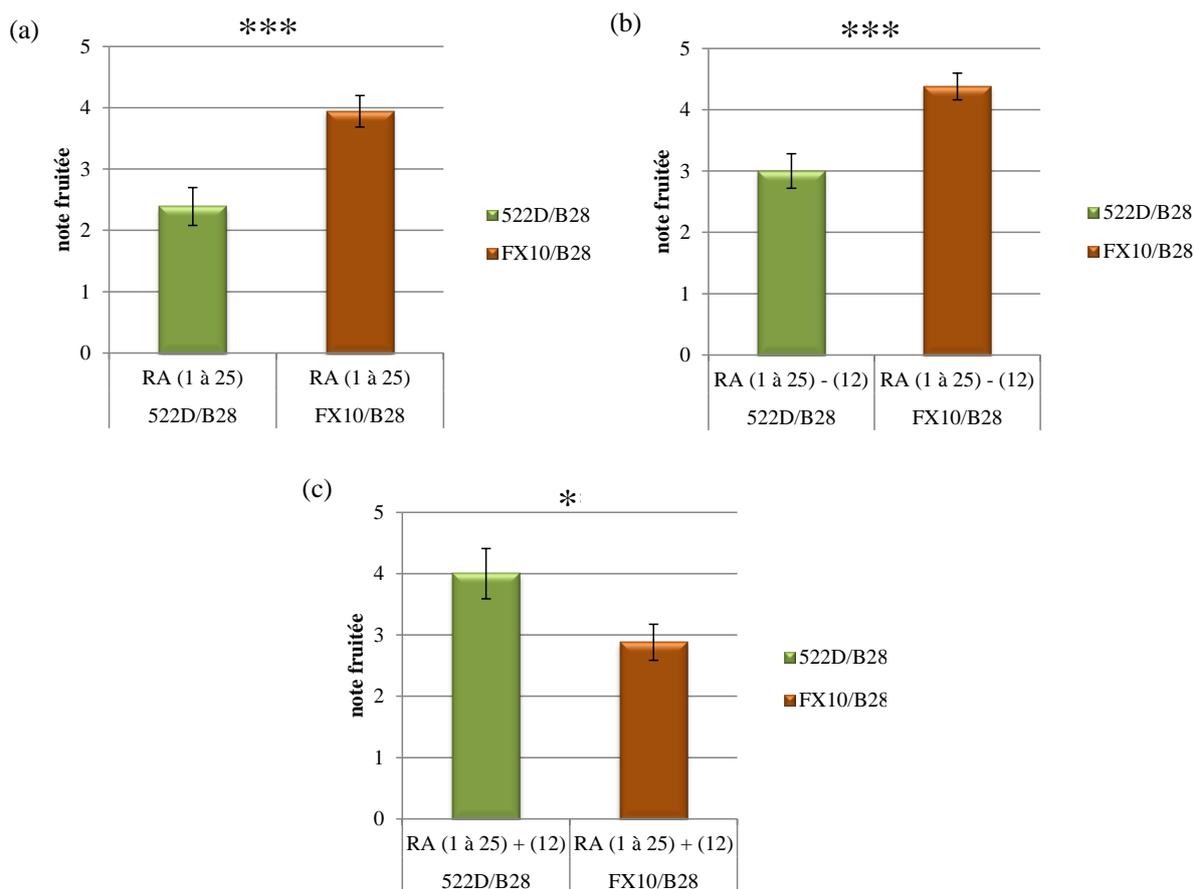
**Figure 28.** Profils sensoriels des différentes reconstitutions aromatiques (RA) réalisées à partir d'un cru classé Pessac-Léognan 2003 (moyenne  $\pm$  écart type). (a) comparaison entre la RA totale (1 à 25) et la RA avec omission des fractions 12 à 13 ; (b) comparaison entre la RA totale (1 à 25) et la RA avec omission de la fraction 12 ; (c) comparaison entre la RA totale (1 à 25) et la RA avec omission de la fraction 13.

#### IV.B.2.b. Expérience 2 : confirmation de l'effet de la fraction 12

Les résultats obtenus lors de l'expérience 2 sont présentés **Figure 29**.

Comme on pouvait s'y attendre, la RA totale (1 à 25) issue de la modalité "**FX10/B28**" (vin PL après 3 mois d'élevage) a été notée significativement plus fruitée que celle issue de la modalité "**522D/B28**", au seuil de 0,1 %.

L'omission de la fraction 12 n'a pas entraîné de changement dans la perception de l'intensité de l'arôme, la modalité "**FX10/B28**" étant encore notée plus fruitée que la modalité "**522D/B28**", au risque de 0,1 %.



\*, \*\*\* indiquent un effet significatif à  $p < 0,05$  et  $p < 0,001$  respectivement

**Figure 29.** Profils sensoriels des différentes reconstitutions aromatiques (RA) réalisées à partir des vins PL après 3 mois d'élevage pour les modalités **FX10/B28** vs **522D/B28** (moyenne  $\pm$  écart type). (a) RA totales (1 à 25) ; (b) omission de la fraction 12 ; (c) échange de la fraction 12.

En revanche, l'échange de la fraction 12 entre les deux modalités a conduit les juges à noter la modalité "**522D/B28**" comme étant significativement plus fruitée que la modalité "**FX10/B28**", au seuil de 5 %.

Ces résultats confirment l'impact important de la fraction 12 et des molécules qui la composent, sur la modulation de l'arôme fruité. Il est toutefois intéressant de noter que son omission n'entraîne pas la perte de l'odeur fruitée dans la RA. De plus, la modalité "**FX10**" est toujours perçue par le panel comme plus fruitée que la modalité "**522D**". Il existe donc d'autres fractions, et par extension d'autres molécules, qui influencent l'intensité de l'arôme fruité. Néanmoins, cette fraction nous a semblé donner les résultats les plus pertinents et sera utilisée pour la suite de l'étude.

#### **IV.C. Discussion**

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté la mise en place d'un protocole de fractionnement par HPLC de vins fermentés par deux souches de levures. Le but était d'identifier la ou les fractions responsables des différences olfactives mises en évidence dans le chapitre 3.

Dans un premier temps, l'olfaction et la comparaison directe de fractions issues de vins fermentés par la souche de levures **FX10** ou **522D** a permis de regrouper les fractions par famille en fonction de leur odeur et d'en réduire le nombre afin de simplifier leur étude ultérieure. Cette approche nous a également permis d'apprécier l'impact de la souche de levures sur l'intensité aromatique des différentes fractions.

La deuxième étape a consisté à évaluer l'impact de groupes de fractions sur l'arôme fruité de reconstitutions aromatiques grâce à des tests d'omission. L'échange de ces groupes dans les RA des modalités "**FX10**" et "**522D**" a permis de mettre en évidence l'effet exhausteur de la fraction 12 sur l'arôme fruité. L'identification du ou des composé(s) présent(s) dans cette fraction responsable(s) de la modulation de l'arôme fruité constitue la prochaine étape de cette étude.

## Chapitre 5 : Identification des molécules présentes dans la fraction d'intérêt

Le fractionnement d'extraits de vin par HPLC et la sélection de fractions guidée par flairage nous a permis d'isoler la fraction 12, impliquée dans la modulation de l'arôme fruité des reconstitutions aromatiques. L'analyse de cette fraction par GC-MS vise à tenter d'identifier les composés présents et pouvant contribuer à l'intérêt de cette fraction.

### **I. Matériel et méthodes**

#### **I.A. Analyse de la fraction 12 par GC-MS**

Les fractions 12 issues des vins PL après 3 mois d'élevage ont été analysées par GC-MS. 3 mL d'eau milliQ sont ajoutés à 1 mL de la fraction afin d'obtenir un TAV de 12 % v/v. Le mélange est extrait deux fois successives par 2 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). A l'issue de chaque extraction, les phases organiques et aqueuses sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les deux phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 20 mL et les traces d'eau sont éliminées à l'aide de sulfate de sodium anhydre. L'extrait est ensuite concentré sous flux de diazote pour atteindre un volume final de 250 µL. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 46**.

L'acquisition des résultats est effectuée en utilisant le logiciel MPS2-GCMS Data Analysis pourvu de la bibliothèque NIST 2008 MS (US National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). La tentative d'identification des composés présents dans la fraction 12 est faite par la comparaison de leur spectre de masse et leur temps de rétention avec ceux des composés de références analysés dans les mêmes conditions.

**Tableau 46.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour l'analyse de la fraction 12.

Principe :	Extraction liquide-liquide
Appareil :	Agilent 7890A
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Epaisseur de film 0,25 µm
Injecteur :	Mode : <i>splitless</i> (45 s) Volume injecté : 1 µL Température : 250 °C
Gaz vecteur :	Hélium N55 Débit : 2 mL/min
Programmation de température :	Température initiale : 40 °C 3 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu pendant 20 min
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : Agilent 5975C Energie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SCAN ( $m/z$ 40 à 350)

### ***I.A.1. Composés de référence commerciaux***

Lorsqu'il a été possible, nous avons utilisé des produits commerciaux. L'alcool benzylique (99,8 % pureté), le phényléthanol (99 %), le 3-méthylbutan-1-ol (99 %), le 2-méthylbutan-1-ol (99 %) et le malate de diéthyle (99 %) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). La 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one (97 %) a été obtenu auprès de Lancaster (USA).

### ***I.A.2. Synthèse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle***

Le composé n'étant pas disponible au laboratoire et le délai de livraison du fabricant s'élevant à plusieurs mois, nous avons choisi, dans un premier temps, de le synthétiser à partir de l'acide correspondant. Sa synthèse a permis son identification dans la fraction 12 ainsi qu'une estimation de sa concentration dans les vins (semi-quantification).

Pour cela, 1 g d'acide 2-hydroxy-3-méthylbutanoïque (99 %, Sigma-Aldrich), 50 mL d'éthanol (99,9 %, Merck, Allemagne), 5/6 gouttes d'acide sulfurique à 2M et quelques grains de pierre ponce sont introduits dans un ballon. Le tout est chauffé à reflux pendant trois heures. Le composé est ensuite purifié sur colonne de silice et élué avec un solvant éther/isoheptane (50/50 v/v). La partie solvant a ensuite été évaporée au Rotavapor®. Une poudre blanchâtre a été obtenue, pesée à 0,813 g et dissoute dans 25 mL d'éthanol pour obtenir une concentration théorique en ester de 32,52 g/L, en supposant que la réaction d'estérification soit totale. Cette hypothèse est étayée par la concentration largement excessive en l'un des réactifs (l'éthanol). L'analyse GC-MS du tout réactionnel montre un seul pic chromatographique, dont le spectre de masse est cohérent avec celui de l'ester concerné. Son aire représente 96 % de l'air totale des ions. Ces observations tendent à confirmer l'hypothèse d'une réaction totale.

### **I.B. Quantification des composés dans le vin**

Les différents composés ont été dosés dans les vins PL après 3 mois d'élevage (triplicats biologiques).

Le phényléthanol, le 3-méthylbutan-1-ol et le 2-méthylbutan-1-ol ont été quantifiés par la méthode de dosage GC-FID des alcools supérieurs décrite au chapitre 1.II.A.1 p.32. La température du four ainsi que la programmation ont été modifiées afin de pouvoir doser dans la même méthode le phényléthanol (40 °C pendant 5 min puis 4 °C/min jusqu'à 100 °C et enfin 2 °C/min jusqu'à 160 °C, température maintenue 5 min).

L'alcool benzylique, le malate de diéthyle, la 2-méthyltétrahydrothiophène-3-one et le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ont été quantifiés par GC-MS après une extraction liquide/liquide au dichlorométhane. Au préalable, 20 µL d'une solution d'étalon interne (octan-3-ol à 1,04 g/L, en solution alcoolique) sont ajoutés à 100 mL de vin. Le mélange est extrait successivement avec 8, 4 et 4 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases organiques et aqueuses sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les trois phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 20 mL et l'émulsion restante est cassée à l'aide d'un barreau magnétique tournant lentement. L'extrait organique obtenu est séché sur sulfate de sodium anhydre et concentré au Rotavapor® (température du bain maintenue constante à 20 °C) jusqu'à obtenir un volume d'environ 1 mL, puis sous flux de diazote jusqu'à un volume final de 250 µL. Les

caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 46**. Le **Tableau 47** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés.

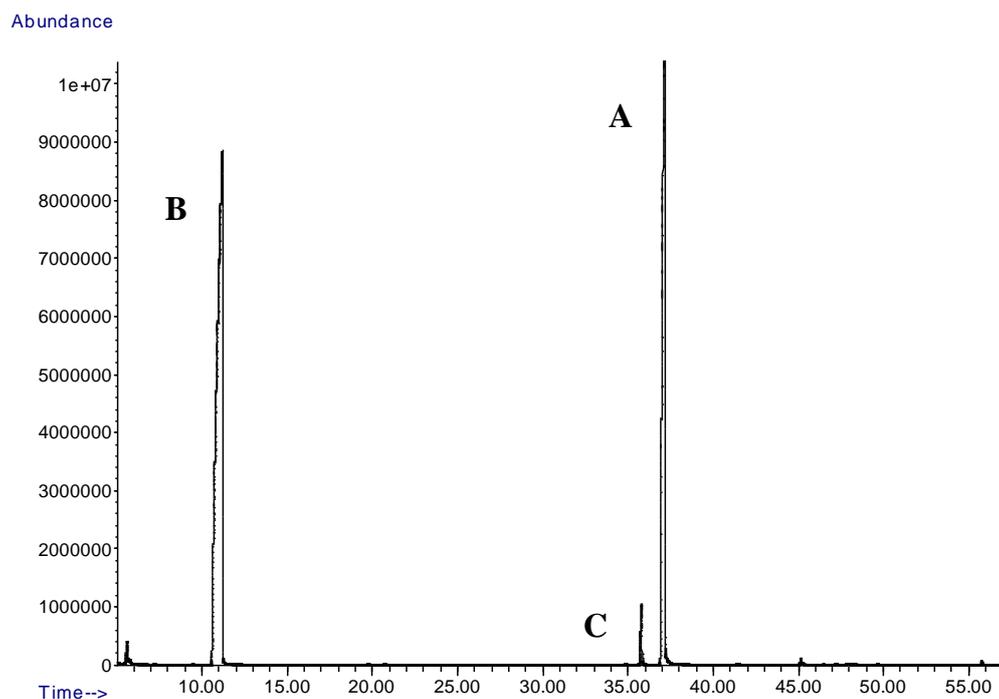
**Tableau 47.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) utilisés pour la détection des composés présents dans la fraction 12 et données de la courbe de calibration réalisée pour quatre composés.

Composés	Ions (m/Z)	Gamme de concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	R <sup>2</sup>
Alcool benzylique	<b>108</b> , 107, 79	330 à 720	0,9967
Malate de diéthyle	<b>117</b> , 71, 89	330 à 720	0,9973
2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one	<b>60</b> , 116, 88	5 à 85	0,9999
2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle	<b>73</b> , 55, 76	5 à 85	0,9998
Octan-3-ol (EI)	<b>83</b> , 101, 43		

Une courbe de calibration est réalisée en duplicat à partir des composés de référence (commerciaux et synthétisés). Un vin est supplémenté avec 5 concentrations croissantes des composés à doser (**Tableau 47**). Les rapports entre les surfaces des pics de l'ion quantificateur du composé et de l'étalon interne ainsi que l'équation de la droite de régression sont déterminés à l'aide du logiciel Enhanced ChemStation, MSD ChemStation, Agilent Technologie Inc. Les coefficients de corrélation trouvés pour chaque composé sont indiqués dans le **Tableau 47**.

## II. Tentative d'identification et quantification des composés majeurs de la fraction 12

L'analyse de la composition de la fraction 12 par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence dans un premier temps la présence de 3 pics majoritaires **A**, **B** et **C** (**Figure 30**).

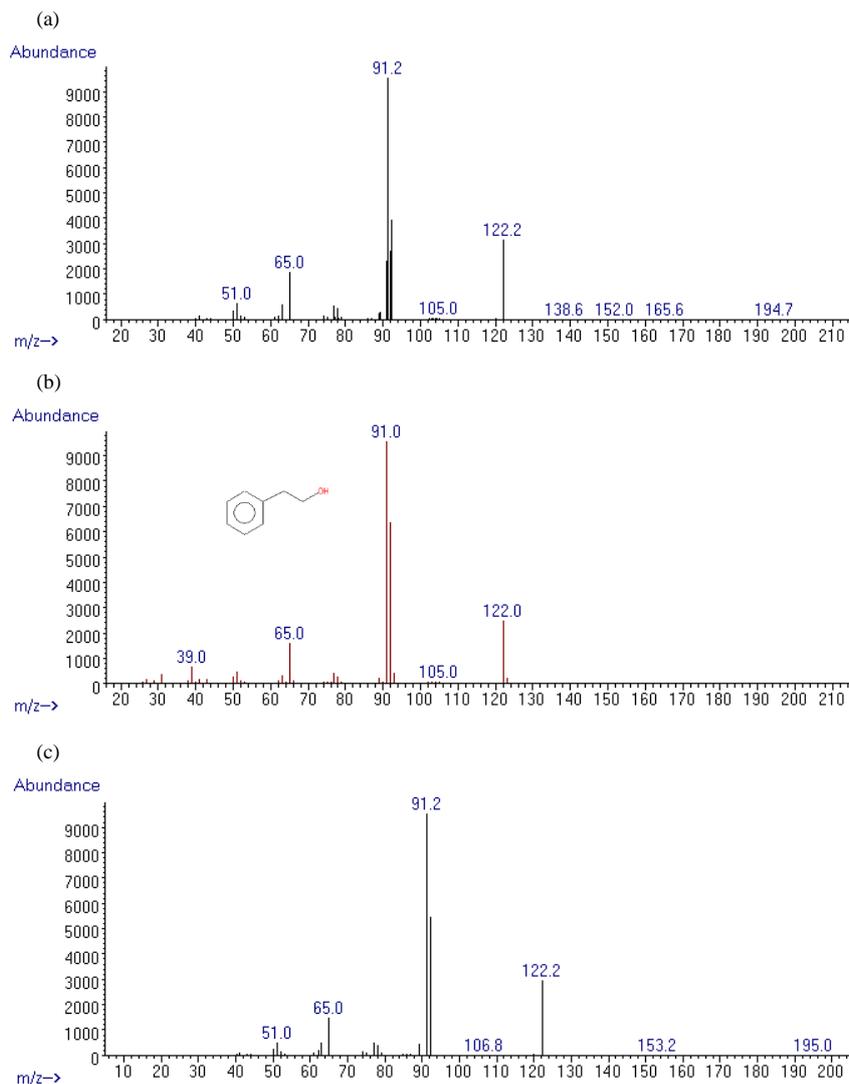


**Figure 30.** Chromatogramme en mode SCAN de la fraction 12 issue de la modalité **FX10/B28** du vin PL après 3 mois d'élevage.

## II.A. Tentative d'identification des pics A, B et C

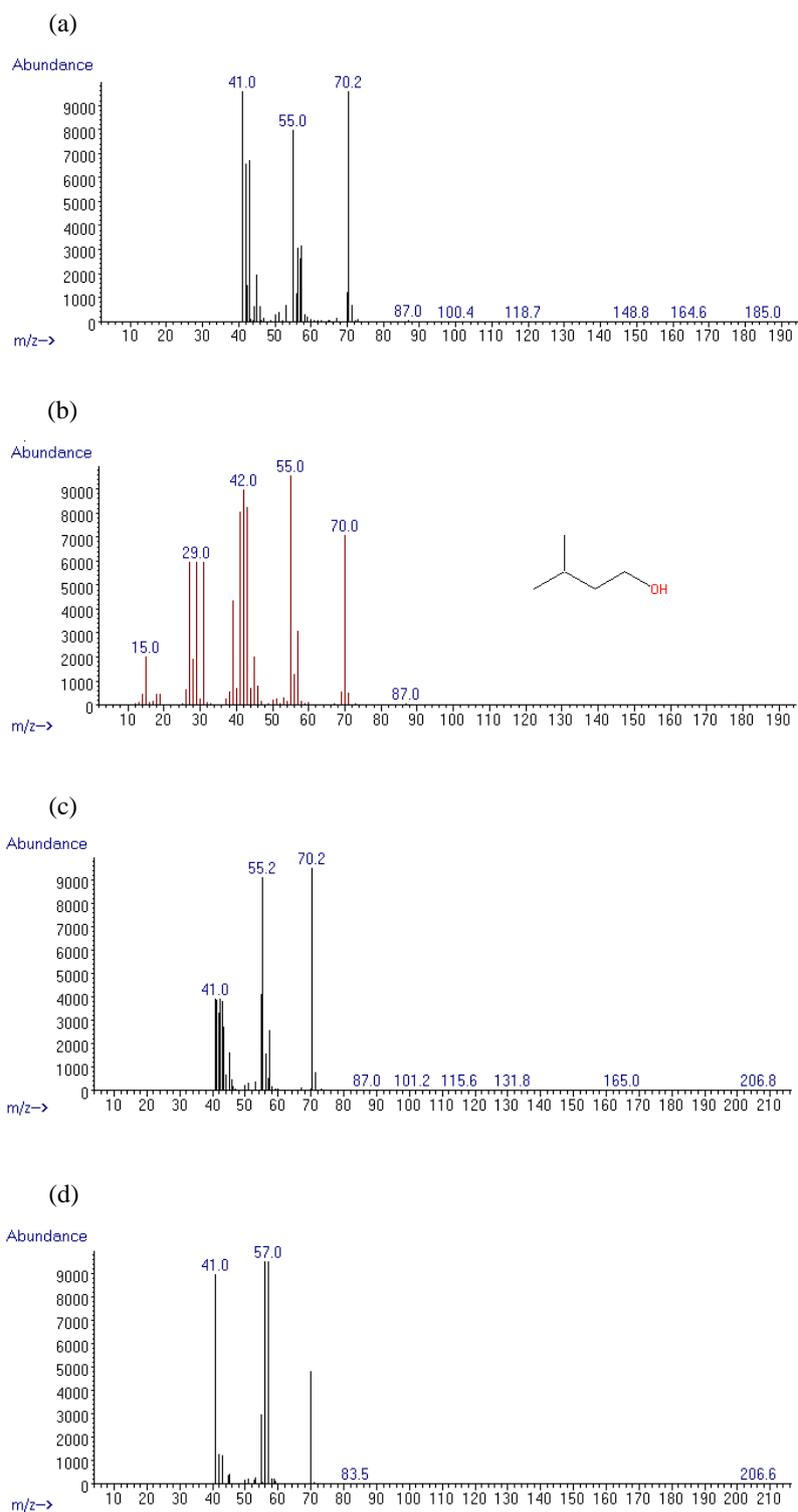
Les spectres de masse associés au pics A, B et C obtenus grâce à la GC-MS sont présentés respectivement dans les **Figures 31, 32 et 33**.

Selon la bibliothèque NIST, le pic A correspond avec une similitude de 91 % à celui du 2-phényléthanol. Ces résultats ont été confirmés en comparant le temps de rétention (37'05 sur colonne BP21) et le spectre de masse du composé détecté dans la fraction à ceux du 2-phényléthanol de référence (37'04 sur colonne BP21) (**Figure 31**).



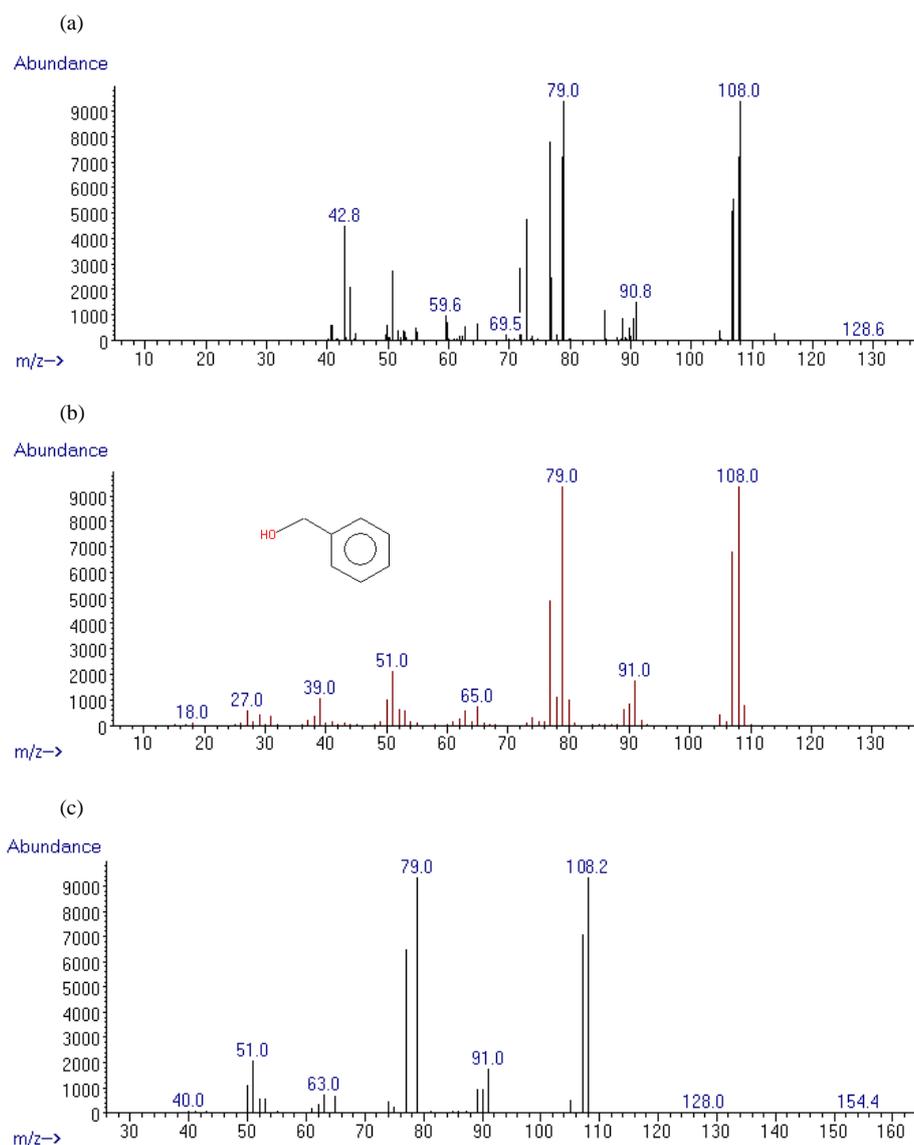
**Figure 31.** (a) Spectre de masse du pic A. (b) Spectre de masse du 2-phényléthanol selon NIST 2008 (NIST register number : 118543 ; CAS number : 60-12-8). (c) Spectre de masse du 2-phényléthanol en solution pure.

Le spectre de masse associé au pic B correspond quant à lui, avec une similitude de 72 %, à celui du 3-méthylbutan-1-ol. Ces résultats ont été confirmés en comparant le temps de rétention (11'19 sur colonne BP21) et le spectre de masse du composé détecté dans la fraction à ceux du 3-méthylbutan-1-ol de référence (11'10 sur colonne BP21). Cependant, l'injection sur colonne CPWAX 57 CB dans les conditions de la GC-FID décrites dans le chapitre 1.II.A. montre qu'il s'agit de deux alcools co-élus : le 3-méthylbutan-1-ol (isoamylique) et le 2-méthylbutan-1-ol (amylique actif) (**Figure 32**).



**Figure 32.** (a) Spectre de masse du pic B. (b) Spectre de masse du 3-méthylbutan-1-ol selon NIST 2008 (NIST register number : 19490 ; CAS number : 123-51-3). (c) Spectre de masse du 3-méthylbutan-1-ol en solution pure ; (d) Spectre de masse du 2-méthylbutan-1-ol en solution pure.

Enfin, le spectre de masse associé au pic C correspond avec une similitude de 87 % à celui de l'alcool benzylique. Ces résultats ont également été confirmés en comparant le temps de rétention (35'89 sur colonne BP21) et le spectre de masse du composé détecté dans la fraction à ceux de l'alcool benzylique de référence (36' sur colonne BP21) (**Figure 33**).

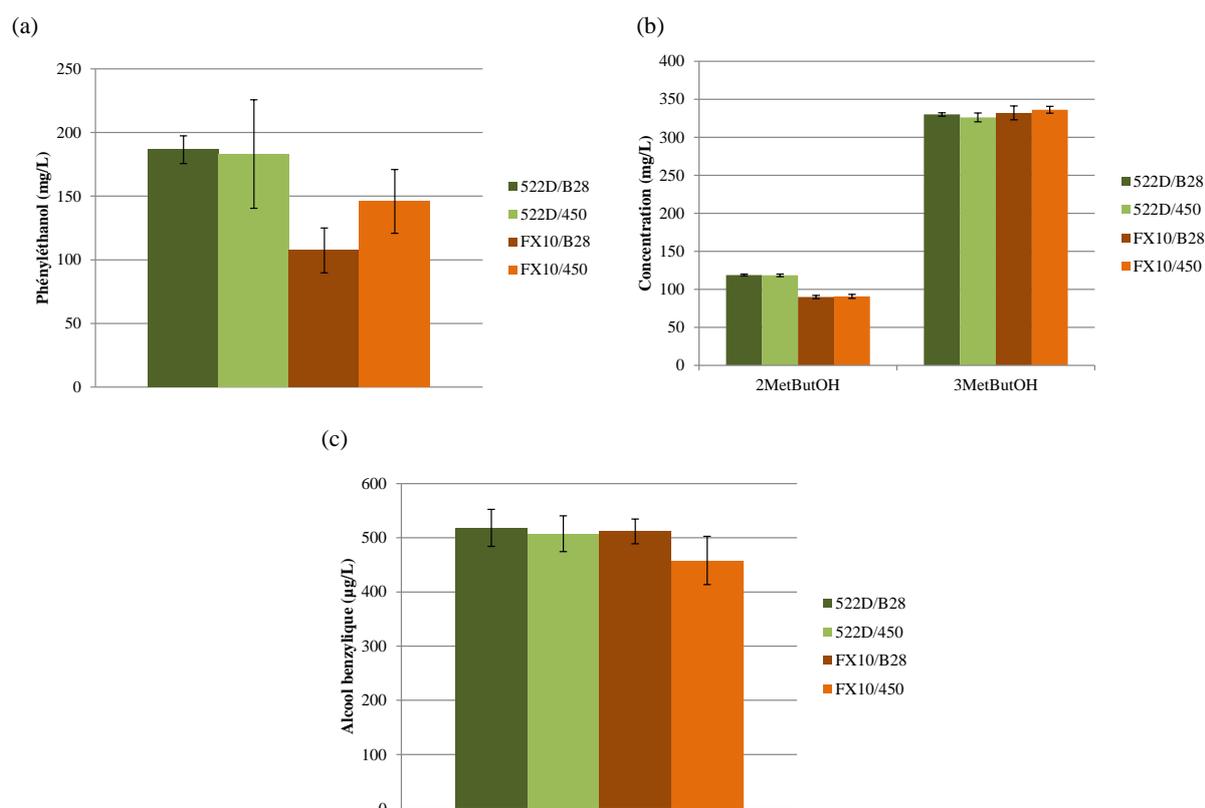


**Figure 33.** (a) Spectre de masse du pic C. (b) Spectre de masse de l'alcool benzylique selon NIST 2008 (NIST register number : 151560 ; CAS number : 100-51-6). (c) Spectre de masse de l'alcool benzylique en solution pure.

## II.B. Quantification dans le vin des quatre alcools identifiés

Les concentrations moyennes en 2-phényléthanol, 2-méthylbutan-1-ol, 3-méthylbutan-1-ol et alcool benzylique ont été mesurées pour chaque couple levures/BL dans les vins PL après 3 mois d'élevage (**Figure 34**). Les données ont été traitées par une ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries).

Concernant le 2-phényléthanol (**Figure 34a**), les résultats indiquent qu'il existe un effet significatif de la souche de levures (au seuil de 1 %). En effet, les vins inoculés avec la levure **522D** contiennent en moyenne plus de phényléthanol que les modalités "**FX10**" ( $186,51 \pm 10,92$  mg/L et  $183,08 \pm 42,58$  mg/L pour **522D/B28** et **522D/450** respectivement contre  $107,37 \pm 17,59$  mg/L et  $145,85 \pm 25,10$  mg/L pour **FX10/B28** et **FX10/450** respectivement). En revanche, aucun effet "bactéries" ou d'interaction "levures x bactéries" n'a pu être mis en évidence.



**Figure 34.** Teneurs moyennes en 2-phényléthanol (a), 2-méthylbutan-1-ol et 3-méthylbutan-1-ol (b) (exprimées en mg/L), et alcool benzylique (c) (exprimées en µg/L) ± intervalle de confiance à 5 % entre les réplicats observés dans les vins PL après 3 mois d'élevage.

Les teneurs en 2-méthylbutan-1-ol et 3-méthylbutan-1-ol ont été déterminées par la méthode chromatographique classique permettant de séparer correctement les deux alcools (**Figure 34b**). Concernant le 3-méthylbutan-1-ol, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les quatre modalités testées. En revanche, il existe un effet significatif de la souche de levures sur la concentration en 2-méthylbutan-1-ol (au seuil de 0,1 %). Les teneurs en alcool apparaissent en effet légèrement plus élevées dans les vins fermentés par la souche **522D** (118 mg/L en moyenne) que dans les modalités "**FX10**" (90 mg/L en moyenne). Aucun effet "bactéries" ou d'interaction "levures x bactéries" n'a pu être mis en évidence.

Enfin, les valeurs observées en alcool benzylique sont très faibles comparées à celles des autres alcools (**Figure 34c**). De plus, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les quatre modalités testées.

## II.C. Discussion

L'analyse de la composition de la fraction 12 par GC-MS montre que les quatre composés majoritaires identifiés font partie de la famille des alcools supérieurs : le 2-phényléthanol, le 3-méthylbutan-1-ol, le 2-méthylbutan-1-ol et l'alcool benzylique. Un effet significatif de la souche de levures a pu être mis en évidence pour deux d'entre eux : le 2-phényléthanol et le 2-méthylbutan-1-ol, tous deux présents en plus grande quantité dans les vins fermentés par la souche **522D**. Aucun effet "bactéries" ou d'interaction "levures x bactéries" n'a été observé.

Le 2-phényléthanol est un alcool aromatique à l'odeur florale. Son seuil de perception dans un vin synthétique (11 % v/v éthanol, 7 g/L glycérol, 5 g/L acide tartrique, pH 3,4) a été déterminé à 14 mg/L (Ferreira et al, 2000). Les concentrations en 2-phényléthanol trouvées dans les vins PL se situent dans la moyenne haute selon la littérature (de 107,37 à 186,51 mg/L). Ces résultats sont nettement supérieurs au seuil de perception déterminé par Ferreira *et al.* (2000). Cependant, Rankine et Pocock (1969) avaient démontré que ce seuil pouvait être très variable selon les juges, allant de 30 à 200 mg/L dans un vin blanc sec. De plus, peu d'études sont disponibles sur l'effet potentiel du 2-phényléthanol sur l'arôme fruité des vins mais il paraît peu probable, au regard de ses propriétés aromatiques, qu'il puisse avoir un impact direct sur celui-ci. Il possède en effet une odeur vineuse, rappelant la rose et la jacinthe.

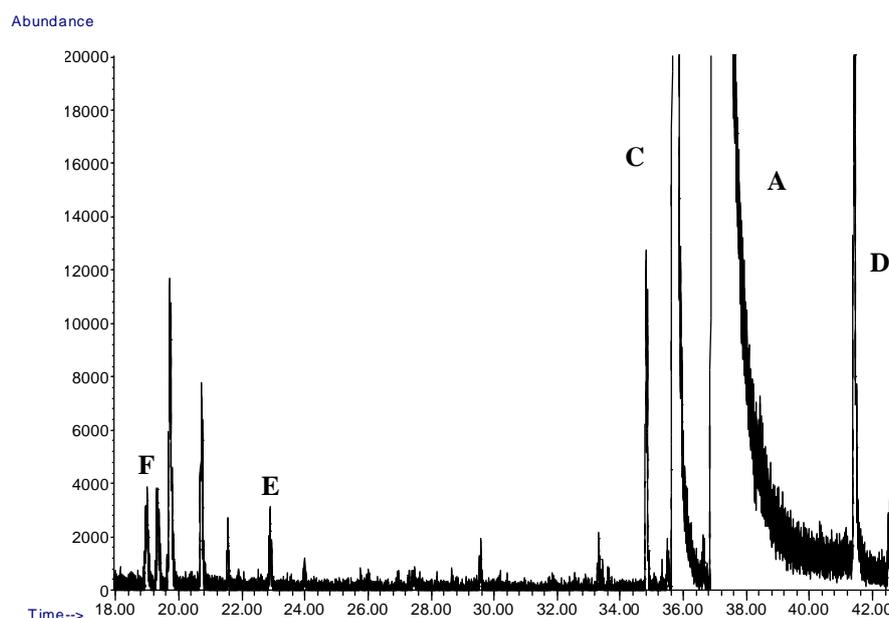
Le 2-méthylbutan-1-ol et le 3-méthylbutan-1-ol ont été dosés à des concentrations de l'ordre de 100 mg/L et 320 mg/L respectivement. Ce dernier est à des niveaux proches de son seuil de perception déterminé dans le vin blanc à 300 mg/L (Rankine, 1967). A notre connaissance, le seuil du 2-méthylbutan-1-ol n'a pas été établi dans le vin. Pour comparaison, il a été estimé dans la bière entre 60 et 100 mg/L contre 70 à 75 mg/L pour le 3-méthylbutan-1-ol (Meiglaard, 1975). Une récente étude dans notre laboratoire a confirmé l'effet masque de plusieurs alcools supérieurs sur l'arôme fruité de diverses reconstitutions aromatiques à base d'esters, et notamment de celui du 3-méthylbutan-1-ol (communication personnelle). Cependant, aucune différence significative dans la concentration de cet alcool n'a pu être mise en évidence entre nos différentes modalités. Des écarts significatifs de concentration ont bien été observés entre les souches de levures pour le 2-méthylbutan-1-ol. Cependant, ce composé ne semble pas pouvoir, à lui seul, entraîner de diminution de la note fruitée en solution modèle (communication personnelle). Il semble donc très peu probable que ces deux alcools soient impliqués dans les modulations aromatiques observées.

L'alcool benzylique est un alcool aromatique peu odorant, décrit par des notes "floral" et "amande". Son seuil de perception a été calculé à 900 mg/L dans la bière (Meilgaard, 1975) et à 200 mg/L dans une solution modèle à 10 % d'alcool (v/v) contenant 5 g/L d'acide tartrique à pH 3,2 (Gómez-Míguez *et al.*, 2007). Les concentrations retrouvées dans les vins PL, autour de 500 µg/L, sont très inférieures aux seuils de perception décrits dans la littérature. Même si ces derniers n'ont pas été déterminés dans le vin, il semble toutefois peu probable que ce composé puisse avoir un impact direct sur l'arôme du vin. Il est par ailleurs considéré comme un alcool mineur du vin, au contraire des trois autres (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2012b). De plus, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différentes modalités. Ce composé n'est donc vraisemblablement pas impliqué dans la modulation de l'arôme fruité et ne permet pas d'expliquer les différences sensorielles observées entre les vins fermentés par les levures **FX10** ou **522D**.

L'implication de ces quatre alcools dans la modulation de l'intensité de l'arôme fruité semble donc peu probable, y compris en mélange. Afin de nous en assurer, le dosage de ces composés dans la fraction 12 a été réalisé. Les alcools ont ensuite été ajoutés dans la RA (1 à 25 - 12) aux concentrations préalablement déterminées. Malgré leur ajout, la RA totale composée des 25 fractions est encore parue plus fruitée que la RA (1 à 25 - 12) dopée aux alcools supérieurs. Nous nous sommes donc concentrés sur l'identification des composés minoritaires présents dans la fraction 12.

### III. Tentative d'identification et quantification de composés minoritaires de la fraction 12

Parmi les 25 autres pics chromatographiques pouvant être associés aux composés dits minoritaires dans la fraction 12, trois (D, E et F) ont été l'objet d'une tentative d'identification (par comparaison des spectres de masse et temps de rétention) (**Figure 35**).

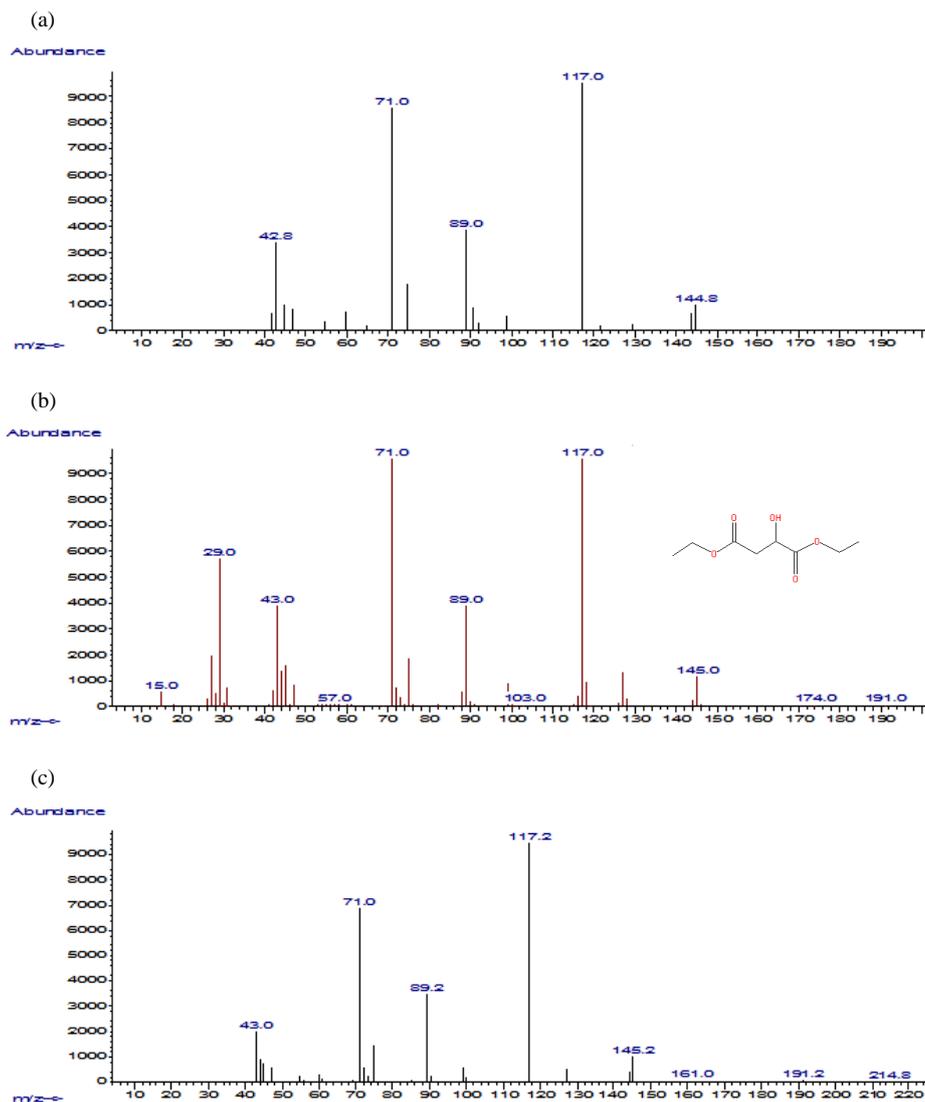


**Figure 35.** Agrandissement du chromatogramme en mode SCAN entre 18 et 42,5 minutes de la fraction 12 issue de la modalité **FX10/B28** du vin PL après 3 mois d'élevage.

#### III.A. Tentative d'identification des pics D, E et F

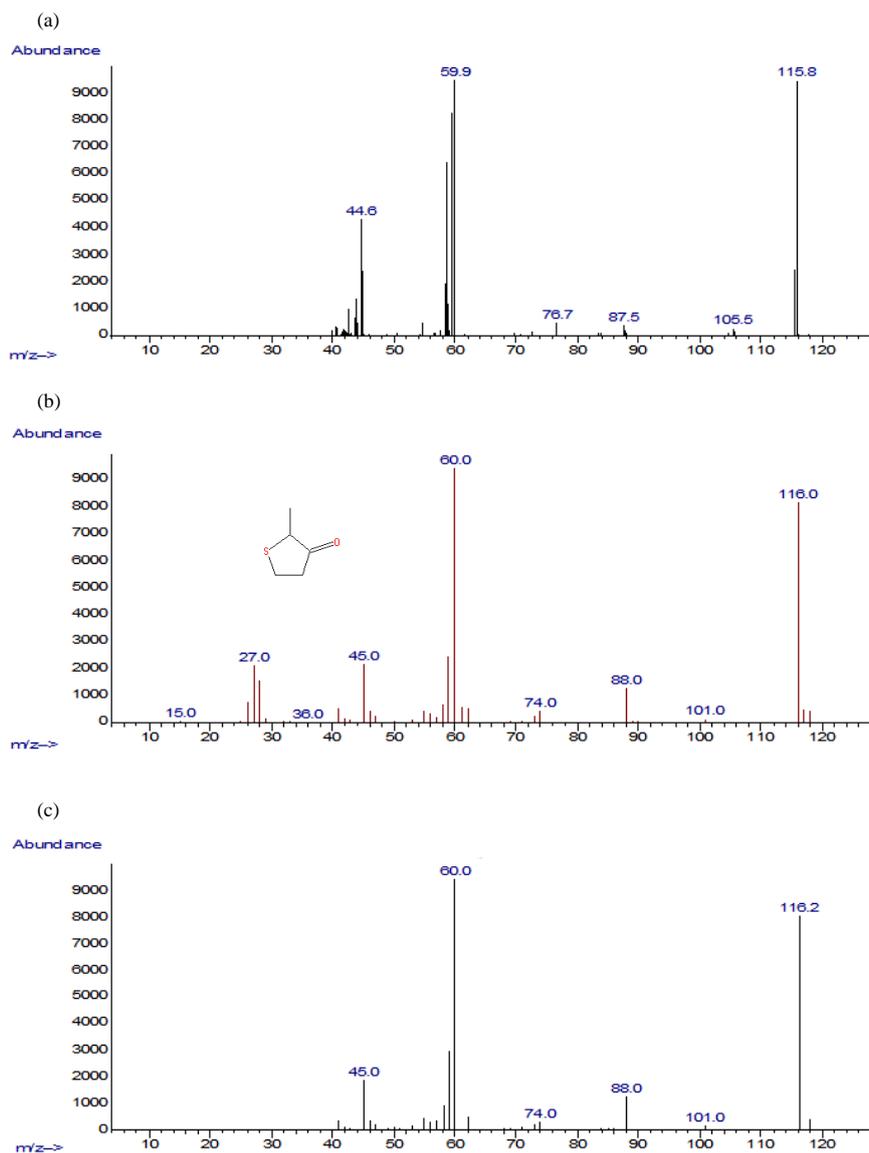
Les spectres de masse associés aux pics D, E et F obtenus grâce à la GC-MS sont présentés respectivement dans les **Figures 36, 37** et **38**.

Selon la bibliothèque NIST, celui du pic D correspond avec une similitude de 56 % au 2-hydroxybutanedioate de diéthyle ou malate de diéthyle. La comparaison des spectres de masse ainsi que des temps de rétention du pic D (41'52 sur colonne BP21) à ceux du malate de diéthyle de référence (41'38 sur colonne BP21) confirme cette hypothèse (**Figure 36**).



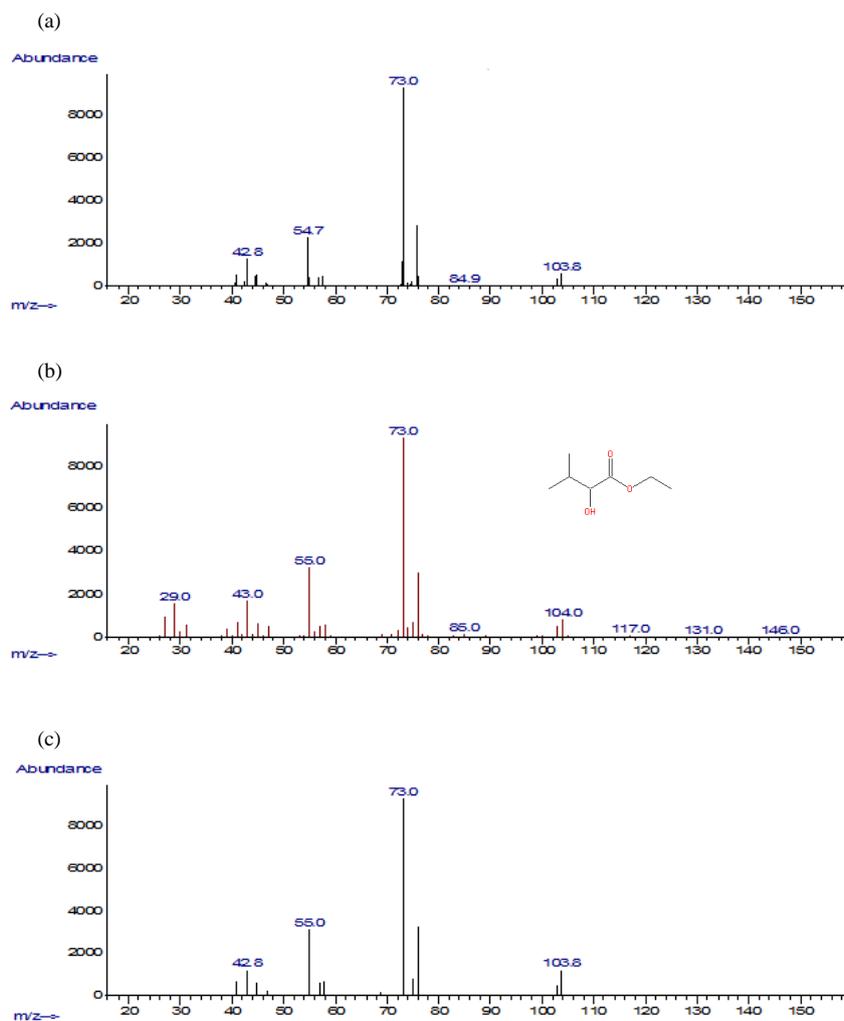
**Figure 36.** (a) Spectre de masse du pic D. (b) Spectre de masse du malate de diéthyle selon NIST 2008 (NIST register number : n.c. ; CAS number : 7554-12-3). (c) Spectre de masse du malate de diéthyle en solution pure.

Le spectre de masse associé au pic E correspond avec une similitude de 72 % à celui de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one. Ces résultats ont été confirmés en comparant le temps de rétention (22'78 sur colonne BP21) et le spectre de masse du composé détecté dans la fraction à ceux de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one de référence (22'94 sur colonne BP21) (**Figure 37**).



**Figure 37.** (a) Spectre de masse du pic E. (b) Spectre de masse de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one selon NIST 2008 (NIST register number : 249131 ; CAS number : 13679-85-1). (c) Spectre de masse de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one en solution pure.

Enfin, le spectre de masse associé au pic F correspond avec une similitude de 45 % à celui du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle. Ces résultats ont également été confirmés en comparant le temps de rétention (18'96 sur colonne BP21) et le spectre de masse du composé détecté dans la fraction à ceux du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle synthétisé (19'01 sur colonne BP21) (**Figure 38**).

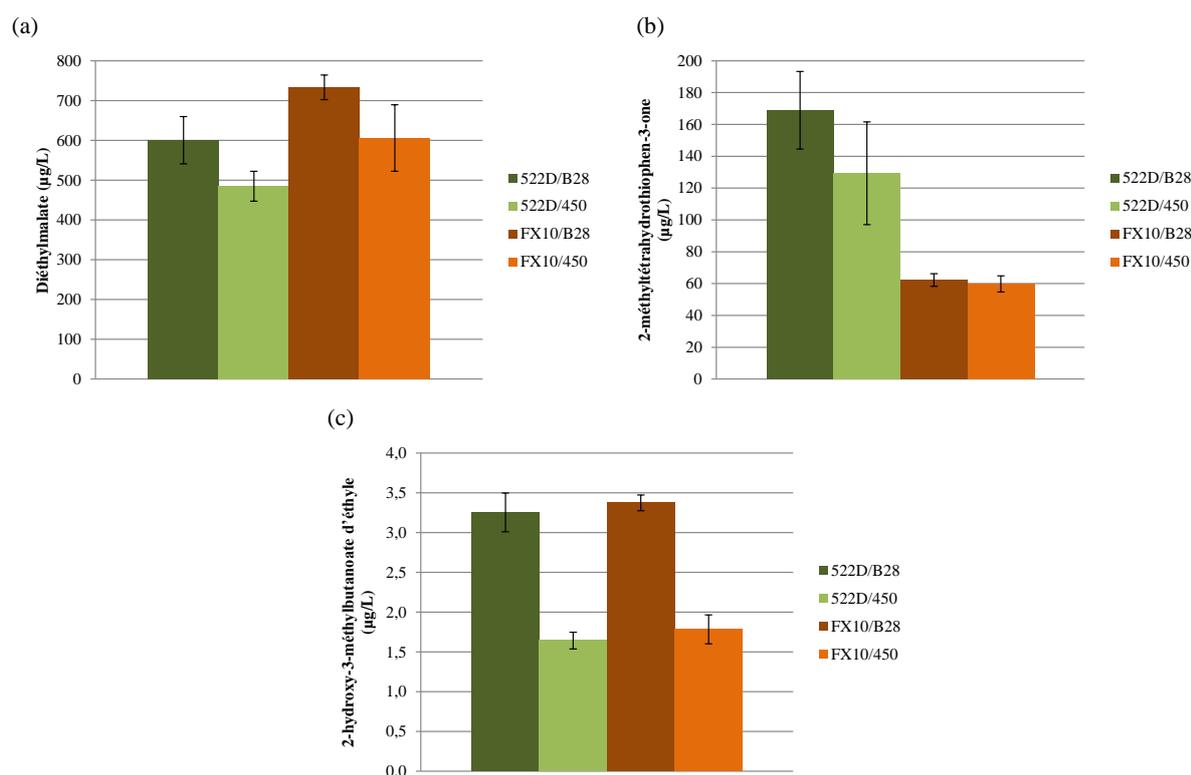


**Figure 38.** (a) Spectre de masse du pic F. (b) Spectre de masse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle selon NIST 2008 (NIST register number : 164508 ; CAS number : 2441-06-7). (c) Spectre de masse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle de synthèse en solution pure.

### III.B. Quantification dans le vin des trois molécules identifiées

Les concentrations moyennes en malate de diéthyle et en 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one ainsi que les teneurs théoriques en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ont également été quantifiées dans des vins PL après 3 mois d'élevage, pour chaque couple levures/BL (**Figure 39**). Les données ont été traitées statistiquement par une ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries).

Les résultats obtenus montrent que la concentration en malate de diéthyle est modulée par la souche de levures mais également par la souche de bactéries (aux seuils de 1 % et 1 %). En effet, les teneurs en diester apparaissent plus élevées dans les vins fermentés par la souche **FX10** que dans les modalités "**522D**". De même, les vins inoculés avec la bactérie **B28** présentent des concentrations supérieures à celles mesurées dans les vins inoculés avec la souche **450**. En revanche, aucun effet d'interaction "levures x bactéries" n'a pu être mis en évidence (**Figure 39a**).



**Figure 39.** Teneurs moyennes en malate de diéthyle (a) et 2-méthyltétrahydrothiophen-3-one (b) ainsi que les teneurs théoriques moyennes en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (c) (exprimées en µg/L)  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliqués observées dans les vins PL après 3 mois d'élevage.

Les teneurs moyennes en 2-méthyltétrahydrothiophen-3-one trouvées dans les vins PL après 3 mois d'élevage sont présentées dans la **Figure 39b**. Un effet significatif de la souche de levures sur la concentration de ce composé a été observé (au seuil de 0,1 %). Les vins fermentés par la souche **522D** possèdent des concentrations deux à trois fois supérieures à ceux des modalités "**FX10**". En revanche, aucun effet "bactéries" ou d'interaction "levures x bactéries" n'a pu être mis en évidence.

Enfin, les concentrations moyennes théoriques en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle mesurées pour chaque couple levures/BL dans les vins PL sont présentées dans la **Figure 39c**. Le traitement statistique des données indique qu'il existe un effet significatif de la souche de bactéries sur la concentration de cet ester (au seuil de 0,1 %). En effet, les vins inoculés avec la bactérie **B28** contiennent en moyenne deux fois plus d'ester que les modalités "**450**". Aucun effet "levures" ou d'interaction "levures x bactéries" n'a été observé pour ce composé.

### III.C. Discussion

Trois autres molécules ont été mises en évidence dans la fraction 12 et appréciées dans cette partie : deux esters, le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle et le malate de diéthyle et une molécule soufrée, la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one.

Le malate de diéthyle a été identifié pour la première fois dans le vin par Webb et Kepner (1962). Il est formé par la di-estérification de l'acide malique. Plusieurs études ont montré une augmentation de sa concentration pendant le vieillissement (Shinohara *et al.*, 1979 ; da Silva Ferreira, 1998). Comme les autres esters issus des principaux acides organiques du raisin, son implication dans les qualités organoleptiques du vin est limitée. En effet, il présente une odeur peu intense de cerise et de pomme. Un seuil de perception dans le vin de Xérès a été calculé à 10 mg/L (Zea *et al.*, 2001).

Le malate de diéthyle a été quantifié dans les vins PL entre 500 et 700 µg/L. Un effet "levures" ainsi qu'un effet "bactéries" ont été mis en évidence : les modalités "**FX10**" et "**B28**" contiennent respectivement plus de malate de diéthyle que les modalités "**522D**" et "**450**". Cependant, les concentrations retrouvées dans ces vins sont très loin du seuil de perception de ce composé. Il est donc peu probable qu'il puisse jouer un rôle dans la modulation de l'arôme fruité de ces vins.

A notre connaissance, la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one a été mise en évidence pour la première fois par Walradt *et al.* (1971) dans des cacahuètes grillées. Van Den Ouweland et Peer (1975) l'ont identifiée comme un produit de réaction entre le 4-hydroxy-5-méthyl-3(2H)-thiophénone (composé participant à l'arôme de viande grillée) et le sulfure d'hydrogène. Elle a également été mise en évidence dans d'autres produits alimentaires comme le café (Akiyama *et al.*, 2008) ou le yaourt dans lequel elle a été identifiée comme un produit issu de la fermentation par les BL (Ott *et al.*, 1997). Dans le vin, elle a été identifiée

pour la première fois par Schreier et Drawert (1974). Elle semble principalement synthétisée par les levures au cours de la FA (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Anocibar Beloqui, 1998). Cette thiophénone a été quantifiée dans le Chardonnay (Simpson et Miller, 1984) ainsi que dans plusieurs vins rouges dont le Grenache, la Syrah ou le Cabernet Sauvignon à des concentrations comprises entre 90 et 200 µg/L (Baumes *et al.*, 1986). Ce composé a également été dosé dans plusieurs Cognac (Ferrari *et al.*, 2004) ainsi que dans des vins de Rioja, Somontano, Duero, Priorato et Moravia Agria (Aznar *et al.*, 2001 ; Ferreira *et al.*, 2001 ; Gómez García-Carpintero *et al.*, 2012). Des études ont montré son implication dans la typicité de l'arôme du Chardonnay (Lorrain *et al.*, 2006 ; Cejudo-Bastante *et al.*, 2013) mais peu d'informations sont disponibles quant à son impact potentiel dans la modulation de l'arôme des vins rouges. La 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one est caractérisée par des odeurs de "grillé", "brulé", "café", "gaz" (Comstock, 1983). Son seuil de perception a été déterminé à 90 µg/L en solution modèle, à 250 µg/L dans le vin rouge et à 150 µg/L dans le vin blanc (Lavigne, 1996).

La 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one est retrouvée à des concentrations deux à trois fois plus élevées dans les vins fermentés par la levure **522D**. Aucun effet de la souche de bactéries ou d'interaction "levures x bactéries" n'a pu être mis en évidence. Les écarts en thiophénone observés dans les vins ne permettent pas d'établir de lien direct avec les résultats des analyses sensorielles. De plus, les concentrations trouvées sont inférieures, voire nettement inférieures pour les modalités **FX10**, au seuil de perception calculé par Lavigne (1996) dans les vins rouges. Cependant, ce dernier peut varier d'un vin à l'autre. Il est donc possible que les teneurs trouvées dans les modalités **522D** puissent être perçues par un panel. Des études ont également montré qu'elle pourrait contribuer aux défauts olfactifs de réduction des vins blancs secs (Lavigne, 1996). D'après l'auteur, l'arôme de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one ne constitue pas une véritable déviation mais interviendrait plutôt comme un masque olfactif. Ce composé devra donc faire l'objet d'une étude plus approfondie, afin de déterminer son effet sur l'arôme fruité des vins rouges.

Le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle est un composé présent dans de nombreux aliments ainsi que dans le vin. Cet ester a déjà été identifié dans plusieurs eaux-de-vie, Cognac et Calvados (Schreier *et al.*, 1978 ; Schreier *et al.*, 1979 ; Ledauphin *et al.*, 2003) ainsi que dans différents fruits comme la myrtille (Hirvi et Honkanen, 1983), l'ananas (Umano *et al.*, 1992) ou la banane (Jordán *et al.*, 2001 ; Pino et Febles, 2013). Il a également été dosé dans plusieurs vins rouges : Bobal (Atienza *et al.*, 1998), vieux Xérès et Madère (Campo *et al.*, 2006), Tempranillo (Alañón *et al.*, 2013) ; et quelques vins blancs : plusieurs cépages

slovaques (Pet'ka *et al.*, 2001), Chardonnay (Cejudo-Bastante *et al.*, 2013) ainsi que des vins de Fiano (Genovese *et al.*, 2007). Ces différentes études concordent sur la concentration de cet ester dans le vin, de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes par litre. Le dosage de cet ester dans des vins de Nebbiolo à différents temps d'élevage montre que sa concentration augmente avec le vieillissement (Bordiga *et al.*, 2014). Il est par ailleurs caractérisé par des odeur de "fraise" (Campo *et al.*, 2006) et de "myrtille" (Hirvi et Honkanen, 1983), mais aucun seuil de perception n'est, pour le moment, disponible.

Les concentrations en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle mesurées dans cette étude ne sont que des concentrations approximatives. Néanmoins, les écarts observés entre les différentes modalités peuvent être discutés. Aucun effet de la souche de levures n'a pu être mis en évidence. Il est donc peu probable que cette molécule ait l'impact olfactif recherché. Cependant, cet ester méthylé et hydroxylé appartient à la même famille chimique que le 2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle (leucate d'éthyle). De récentes études ont mis en évidence le rôle particulièrement intéressant de cet ester comme exhausteur de l'arôme fruité dans des solutions modèles (Lytra *et al.*, 2012a). En raison de la proximité de leur structure chimique, les mêmes effets pourraient être observés avec le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ; ils devront faire l'objet d'une étude plus poussée. De plus, la concentration de cet ester semble modulée par les BL et pourrait constituer un marqueur intéressant de la FML.

Ces travaux ne sont qu'une première étape dans l'identification de composés pouvant constituer la fraction d'intérêt et ayant un impact sur l'arôme fruité. De plus, il s'agit là d'une liste non exhaustive de molécules qui devra être complétée par l'étude des autres pics présents dans ces chromatogrammes. Une étape d'analyse sensorielle est également nécessaire pour valider l'effet de ces composés sur la modulation de l'arôme fruité. Leur concentration dans la fraction 12 devra être déterminée et l'ajout de ces composés, en substitution de la fraction 12, dans des RA permettra d'apprécier leur effet sur l'intensité de l'arôme fruité.

## Chapitre 6 : Quantification de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one et du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle dans les vins expérimentaux du millésime 2012

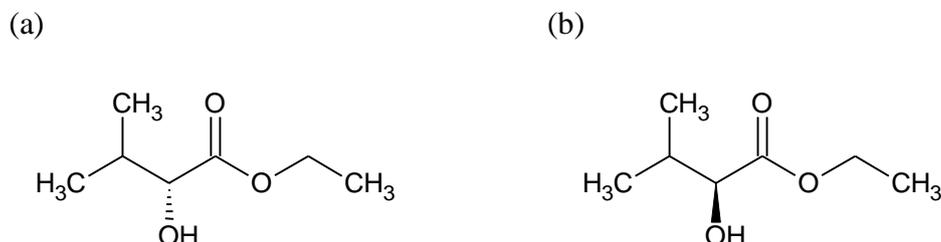
Le fractionnement d'extrait de vin par HPLC a permis d'isoler une fraction impliquée dans la modulation de l'arôme fruité des reconstitutions aromatiques. Son étude par GC-MS a mené à l'identification de sept composés aromatiques parmi lesquels un ester hydroxylé et une thiophénone. S'ils ne semblent pas, à première vue, impliqués dans les modulations aromatiques observées en lien avec l'effet "levures", le comportement de ces deux molécules dans les vins rouges n'a cependant pas ou peu été étudié jusqu'à présent. Il nous a semblé intéressant d'étudier plus en détail l'évolution de leurs teneurs dans les vins des expérimentations du millésime 2012.

### I. Matériel et méthodes

La 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one et le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ( $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$ ) ont été quantifié ou semi-quantifié dans toutes les modalités issues des vins WEC 12, PL et SE. Les vins de l'expérimentation WEC11 n'ont pas pu être analysés par manque de volume. Les échantillons ont été préparés selon le même protocole et dans les mêmes conditions chromatographiques décrits dans le chapitre 5.I.B. Aucun réplicat analytique n'a pu être réalisé.

Le  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  présente une structure chimique proche du leucate d'éthyle (2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle), composé intéressant pour son rôle d'exhausteur de l'arôme fruité récemment mis en évidence au laboratoire (Lytra *et al.*, 2012a). Le comportement dans le vin de ces deux esters ainsi que l'influence du couple levures/BL sur leurs concentrations seront comparés et discutés. La teneur en leucate d'éthyle des vins WEC12, PL et SE ainsi que des vins réalisés en micro-vinification au laboratoire a donc également été déterminée par la méthode de dosage des esters par HS-SPME-GC-MS décrite au chapitre 2.II.A.2. L'étalon interne utilisé pour sa quantification est l'hexanoate d'éthyle- $d_{11}$ . Les ions sélectionnés pour le dosage du leucate d'éthyle ont pour rapport  $m/z = 69$  pour l'ion quantificateur et  $m/z = 87$  et  $m/z = 104$  pour les ions identificateurs.

Le  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  est une molécule qui possède un carbone asymétrique (**Figure 40**) ; la présence des deux énantiomères, R et S, doit donc être recherchée dans le vin et leur importance organoleptique précisée.



**Figure 40.** Enantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle. (a) S-2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (CAS number : 63674-18-0) ; (b) R-2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (CAS number : 129025-85-0).

Afin de vérifier la présence d'énantiomères du  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  et leur distribution, tous les échantillons ont également été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne chirale ( $\gamma$ -cyclodextrine). Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 48**. Les ions utilisés pour la détection sont les mêmes que ceux indiqués précédemment (chapitre 5.I.B.).

Enfin, l'étude olfactive des énantiomères R et S du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle synthétisés à notre demande par la société Hangzhou Imaginechem Co., Ltd (98 %, Hangzhou, Chine) a été réalisée par GC-O. Un panel constitué de 6 juges entraînés (3 hommes, 3 femmes âgés de  $34 \pm 9$  ans) a été utilisé lors de l'analyse descriptive. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont présentées dans le **Tableau 49**.

**Tableau 48.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour l'analyse des énantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle.

Principe :	Extraction liquide-liquide
Appareil :	Agilent 6890N
Colonne :	Astec® CHIRALDEX G-TA 50 m x 0,25 mm Épaisseur de film 0,12 µm
Injecteur :	Mode : <i>split</i> (ratio 10 :1) Débit de purge : 15 mL/min Volume injecté : 1 µL Température : 200 °C
Gaz vecteur :	Hélium N55 Débit : 1,5 mL/min
Programmation de température :	40 °C maintenu 1 min 1 °C/min jusqu'à 100 °C 3 °C/min jusqu'à 180 °C maintenu pendant 5 min
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : Agilent 5973 <i>inert</i> Énergie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM ( $m/z = 73, 55, 76$ )

**Tableau 49.** Conditions expérimentales de la GC-O pour l'étude olfactive des énantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle.

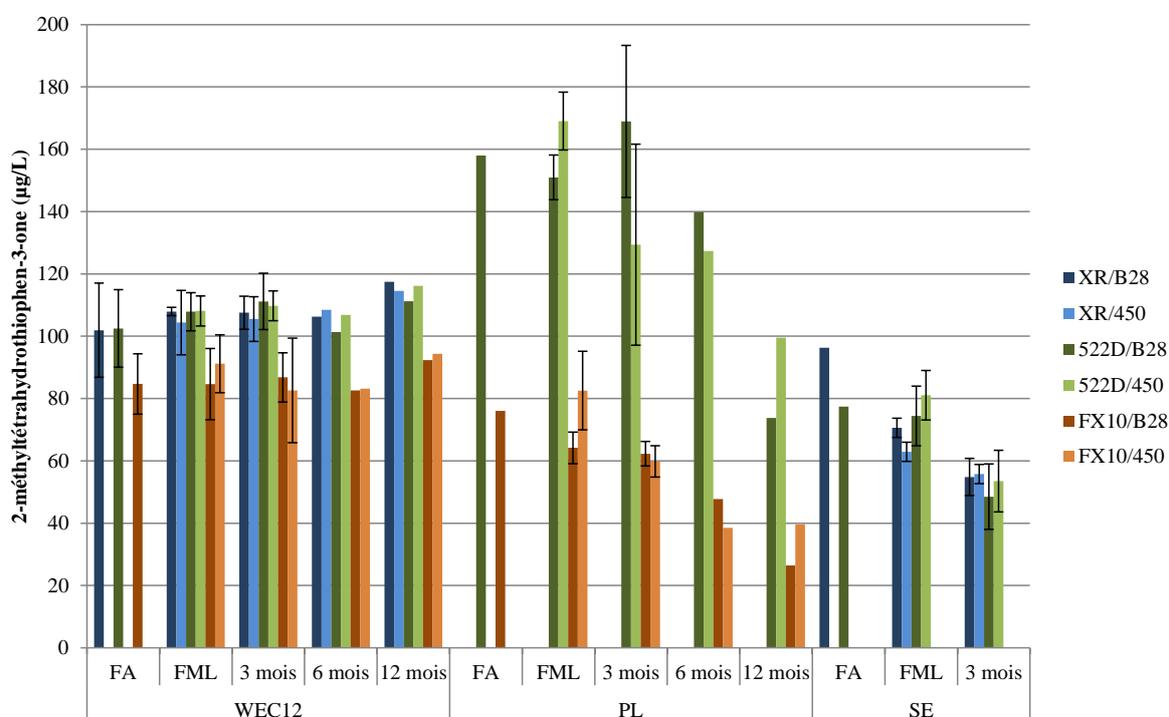
Appareil :	HP 4890A
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Épaisseur de film 0,25 µm
Injecteur :	Volume injecté : 1 µL Température : 250 °C
Gaz vecteur :	Hydrogène 5.5 Débit : 1,5 mL/min
Programmation de température :	35 °C maintenu 1 min 4 °C/min jusqu'à 100 °C 200 °C maintenu pendant 10 min
Détecteur :	Olfactory detector SGE

## II. Quantification et semi-quantification dans le vin

### II.A. Quantification de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one

Les concentrations mesurées dans les vins WEC12, PL et SE sont comprises entre 25 et 200  $\mu\text{g/L}$  (**Figure 41**). Etant donné qu'aucun réplicat analytique n'a pu être effectué, le traitement des résultats par ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) concerne uniquement les échantillons à réplicat biologique.

Concernant les vins WEC12, la teneur en 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one semble stable dans le temps. Un effet "levures" est observé dans les vins après FA, FML et 3 mois d'élevage. Dans tous les cas, les vins fermentés par les souches **522D** et **XR** contiennent significativement plus de 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one que les vins inoculés avec la levure **FX10**, au risque de 5 %, 1 % et 0,1 % respectivement. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les modalités "**522D**" et "**XR**". De plus, aucun effet "bactéries" ou d'interaction "levures x bactéries" n'a été observé.



**Figure 41.** Teneurs moyennes en 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les réplicats observées dans les vins WEC 11, WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon le couple utilisé.

Contrairement aux vins du WEC, les concentrations dosées dans les vins PL et SE semblent diminuer au cours du temps. Un effet de la souche de levures est également observé pour les vins PL, les modalités "522D" contenant plus de 2-méthyltétrahydrothiophène-3-one que les modalités "FX10" après FML et 3 mois d'élevage (aux seuils de 0,1 % et 0,1 % respectivement). En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les vins SE, fermentés par les levures 522D ou XR. Ces deux résultats confirment ceux obtenus avec les vins WEC12. Par ailleurs, aucun effet de la souche de bactéries ni d'interaction n'a été observé pour ces deux expérimentations.

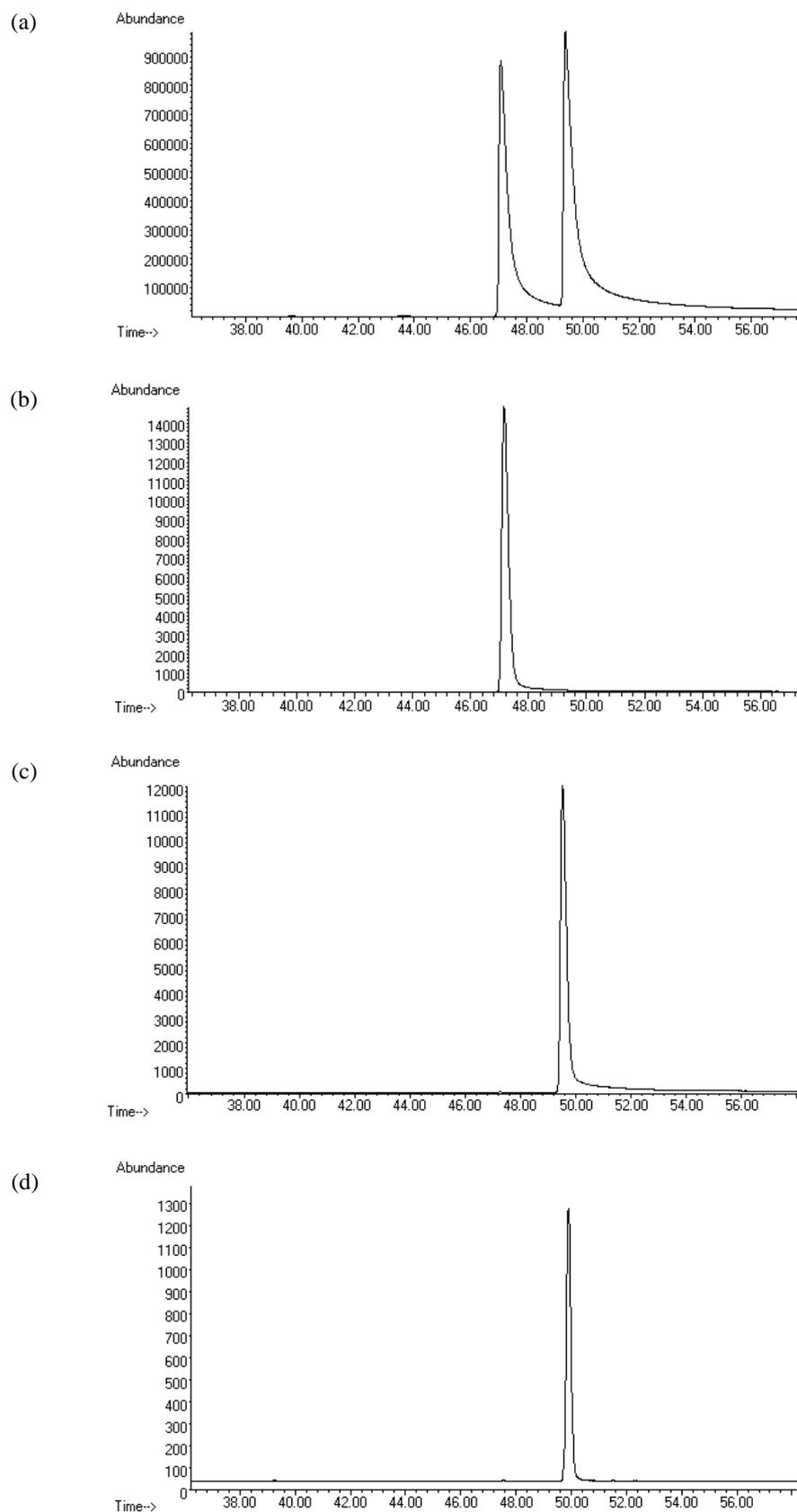
## II.B. Etude du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ; comparaison avec le leucate d'éthyle

### II.B.1. Caractéristiques chimiques

Grâce à la chromatographie en phase gazeuse sur colonne chirale ( $\gamma$ -cyclodextrine), nous avons pu séparer les deux isomères optiques dans la solution de référence synthétisée au laboratoire (**Figure 42**). Les analyses des énantiomères commerciaux ont permis de montrer que la forme S était éluée avant la forme R. Toutes les modalités des vins WEC12, PL et SE ont également été analysées ; seule la forme R est présente, tandis que la forme S n'a jamais pu être mise en évidence dans ces vins (**Figure 42**). Par comparaison, nous avons également identifié le R-leucate d'éthyle dans ces mêmes vins. La forme S ne semble pas présente dans ces échantillons.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Lytra *et al.* (2012a). Les auteurs ont en effet mis en évidence que la concentration de la forme R est largement supérieure à celle de la forme S dans tous les vins analysés. Plus précisément, le ratio R/S observé dans des vins jeunes est de 100:0. Ce ratio est légèrement modifié avec l'âge, il est de 91:9 pour des vins compris entre 20 et 30 ans.

Par analogie, il est possible que le ratio R/S du  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  soit également modifié avec le vieillissement. La quantification des énantiomères du  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  dans des vins de différents millésimes devra donc être réalisée pour confirmer cette hypothèse.



**Figure 42.** Chromatogrammes obtenus suite à l'analyse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle sur colonne chirale ( $\gamma$ -cyclodextrine) (a) du mélange racémique synthétisé au laboratoire, (b) de la forme S, (c) de la forme R et (d) d'un extrait de vin rouge.

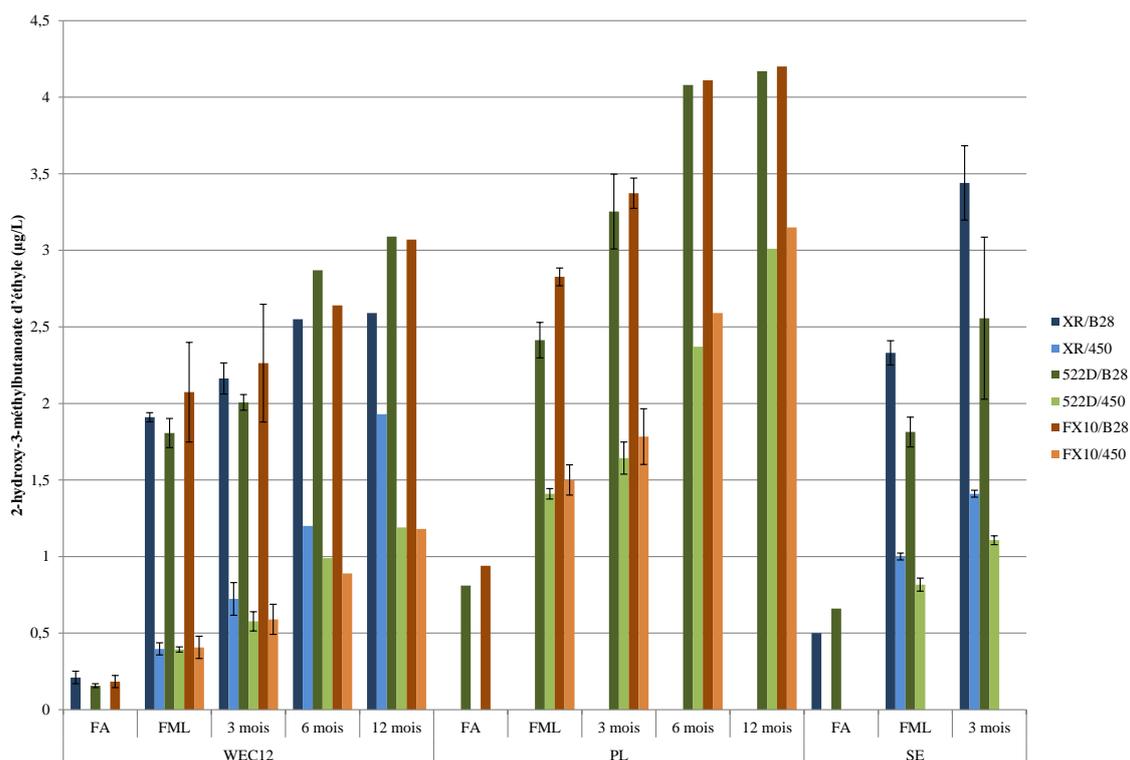
Les analyses olfactométriques nous ont permis d'estimer le caractère aromatique du 2OH3C<sub>1</sub>C<sub>4</sub>C<sub>2</sub>. Selon le panel, constitué de 6 juges, l'odeur du mélange racémique évoque globalement celle du fruit artificiel type bonbon, avec des notes de fraise, d'ananas, de kiwi et de pomme cuite. Le R-2OH3C<sub>1</sub>C<sub>4</sub>C<sub>2</sub> est caractérisé par des notes fruitées plus lourdes, légèrement "cireux", "végétal" et "empyreumatique". La forme S, apparaît plus fruitée ; elle est décrite par des arômes artificiels de fruits rouges, pomme verte et ananas. La différence d'intensité relative de ces deux formes ne semble pas très importante mais une étude spécifique des seuils devra être effectuée.

### **II.B.2. Semi-quantification dans le vin**

La concentration moyenne théorique en 2OH3C<sub>1</sub>C<sub>4</sub>C<sub>2</sub> trouvée dans les vins WEC12, PL et SE est présentée dans la **Figure 43**. Pour toutes les modalités, la teneur en cet ester augmente au cours du temps (de x 4 à x 12 selon les vins observés). En effet, pour les trois expérimentations, la concentration en fin de FA ne dépasse par 1 µg/L, alors qu'elle augmente significativement après FML. Les teneurs en 2OH3C<sub>1</sub>C<sub>4</sub>C<sub>2</sub> restent néanmoins faibles et sont inférieures à 5 µg/L après 12 mois d'élevage. Peu de différences de concentration ont été observées dans les vins des expérimentations. Contrairement aux esters éthyliques et aux acétates, la thermovinification ne semble pas influencer de manière significative les teneurs en esters hydroxylés. Ce résultat avait également été observé pour les esters branchés dans le chapitre 2.

Etant donné qu'aucun réplicat analytique n'a pu être effectué, le traitement des résultats par ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) concerne uniquement les échantillons à réplicat biologique (**Tableau 50**).

Aucun effet de la souche de levures n'a pu être mis en évidence pour les vins WEC11. Un effet "levures" significatif est observé pour les vins PL après FML. La modalité "**FX10/B28**" contient en effet plus de 2OH3C<sub>1</sub>C<sub>4</sub>C<sub>2</sub> que la modalité "**522D/B28**". Néanmoins aucune différence significative n'est observée après 3 mois d'élevage. Enfin, les vins SE fermentés avec la levure **XR** contiennent significativement plus d'ester que les vins "**522D**" après FML et 3 mois d'élevage (aux seuils de 0,1 % et 1 % respectivement).



**Figure 43.** Teneurs théoriques moyennes en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (exprimées en µg/L) ± intervalle de confiance à 5 % pour les réplicats biologiques observées dans les vins WEC12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon le couple levures/BL utilisé.

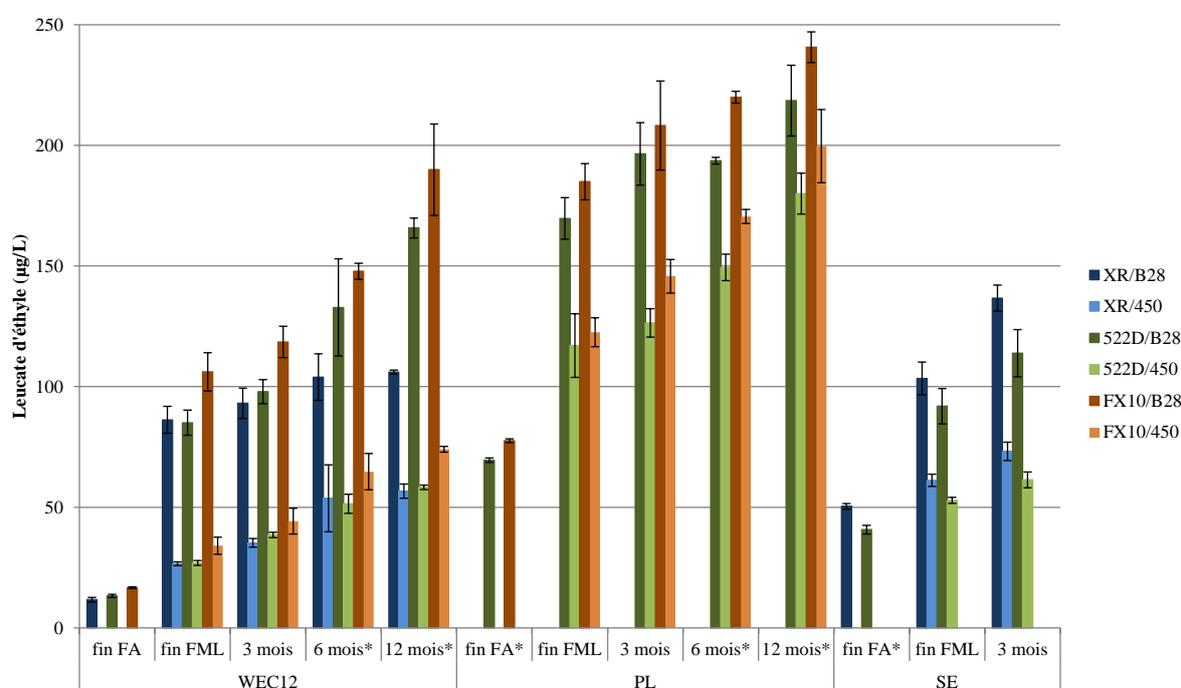
**Tableau 50.** Niveau de significativité de l'analyse de variance à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) pour les deux esters quantifiés dans les vins WEC12, PL et SE à différentes étapes de leur élaboration.

		2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle			Leucate d'éthyle		
		levures	bactéries	lev x bact	levures	bactéries	lev x bact
WEC12	FA	NS	-	-	**	-	-
	FML	NS	***	NS	*	***	NS
	3 mois	NS	***	NS	**	***	NS
	6 mois	n.d	n.d	n.d	**	***	*
	12 mois	n.d	n.d	n.d	***	***	***
PL	FA	n.d	-	-	**	-	-
	FML	***	***	**	*	***	NS
	3 mois	NS	***	NS	*	***	NS
	6 mois	n.d	n.d	n.d	***	*	NS
	12 mois	n.d	n.d	n.d	**	***	NS
SE	FA	n.d	-	-	***	-	-
	FML	***	***	**	**	***	NS
	3 mois	**	***	NS	***	***	NS

\*, \*\*, \*\*\* indiquent respectivement  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  ; NS : Non Significatif ; n.d : non déterminé ; - : non applicable

Un effet significatif de la souche de bactéries a été mis en évidence pour les trois expérimentations étudiées. En effet, tous les vins inoculés avec la souche **B28** contiennent plus de  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  que les modalités "**450**" (au seuil de 0,1 % pour tous les vins).

Nous avons également quantifié le leucate d'éthyle dans les vins WEC12, PL et SE (**Figure 44**). Les teneurs sont plus élevées (entre 10 et 250  $\mu\text{g/L}$ ) pour cet ester. Son comportement dans le vin est néanmoins similaire à celui du  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$ . Sa concentration augmente elle aussi au cours du temps, elle est multipliée par un coefficient compris entre 3 et 8 suivant la modalité étudiée.



\*réplicats analytiques

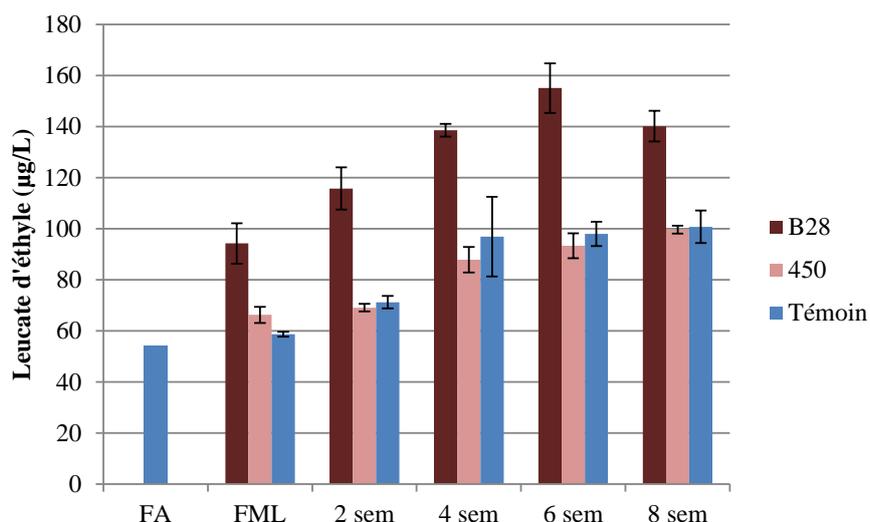
**Figure 44.** Teneurs moyennes en leucate d'éthyle (exprimées en  $\mu\text{g/L}$ )  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % entre les répliqués observés dans les vins WEC 12, PL et SE au cours de leur élaboration et selon le couple levure/BL utilisé.

Cependant, un effet significatif de la souche de levures est observé pour toutes les expérimentations (**Tableau 50**). Concernant les vins WEC12, les modalités fermentées avec la souche **FX10** contiennent significativement plus de leucate d'éthyle que "**522D**" (x 1,3 en moyenne) et "**XR**" (x 1,5 en moyenne). Le même effet est observé dans les vins PL où les

modalités "FX10" présentent des concentrations plus élevées en ester que "522D" (x 1,1 en moyenne). Enfin, les vins SE fermentés par la souche XR sont également significativement plus concentrés que les vins "522D" (x 1,2 en moyenne).

Un effet de la souche de bactéries est également mis en évidence dans tous les vins testés (Tableau 50). Comme pour le 2OH3C<sub>1</sub>C<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, les vins inoculés avec la souche B28 contiennent significativement plus de leucate d'éthyle que les vins fermentés par la souche 450. Quels que soient les vins ou la souche de levures, les modalités "B28" contiennent entre 2 et 3 fois plus de leucate d'éthyle que les modalités "450".

Afin de confirmer le rôle de la souche de BL sur la synthèse du leucate d'éthyle, sa concentration a également été recherchée dans les vins réalisés en micro-vinification au laboratoire (Figure 45).



**Figure 45.** Teneurs moyennes en leucate d'éthyle (exprimées en µg/L) ± intervalle de confiance à 5 % entre les répliquats observées dans les vins issus des micro-vinifications réalisées en laboratoire, au cours de leur élaboration, selon la souche de bactéries utilisée lors de la FML et dans un vin témoin n'ayant pas étéensemencé en BL.

Comme pour les vins issus des expérimentations, le niveau de leucate d'éthyle augmente au cours du temps. Le traitement des données par une ANOVA à un facteur (bactéries) montre une différence significative entre les modalités "B28", "450" et le témoin sans FML au seuil de 0,1 % pour tous les temps de prélèvement. Dans tous les cas, les vins inoculés avec la

souche **B28** sont plus concentrés en leucate d'éthyle que les vins inoculés avec la bactérie **450** ou ceux n'ayant pas réalisé la FML. La présence d'une modalité témoin confirme que la bactérie **B28** a bien synthétisé plus d'ester que la bactérie **450** (x 1,4 environ).

L'analyse du 2OH3C<sub>1</sub>C<sub>4</sub>C<sub>2</sub> devra également être réalisée dans ces vins afin de confirmer ces derniers résultats. En toute logique, la même cinétique devrait être observée et pourra montrer que la bactérie **B28** est plus productrice de ces esters hydroxylés potentiellement intéressants pour l'arôme fruité.

## II.C. Discussion

La concentration de ces deux molécules, identifiées précédemment dans la fraction 12, ont été déterminées dans toutes les modalités des vins du millésime 2012.

Les teneurs mesurées en 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one, comprises entre 25 et 200 µg/L se rapprochent de celles trouvées dans la littérature (Baumes *et al.*, 1986). Sa concentration semble principalement influencée par la souche de levures utilisée. Ces résultats concordent avec les données issues de plusieurs études (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Anocibar Beloqui, 1998). Excepté pour les vins du WEC12, la concentration de cette molécule soufrée diminue au cours du temps. Ce phénomène de dégradation avait également déjà été observé par Chatonnet *et al.* (1992). Les premiers résultats obtenus pour l'expérimentation WEC11, non présentés ici car partiels, semblent également indiquer des teneurs en thiophénone stables dans le temps. Les différences de comportement observées entre les vins du WEC et les vins PL et SE ne sont donc pas imputables à la thermovinification. Deux différences majeures existent entre les protocoles de ces vinifications. La première concerne le volume des cuves utilisées pour réaliser la FA. Cependant, il ne semble pas avoir influencé de manière significative les concentrations mesurées après FA (entre 80 et 100 µg/L pour les vins WEC12 et SE et entre 80 et 160 pour les vins PL). La deuxième différence concerne la nature du contenant ayant servi pour la réalisation de la FML et de l'élevage. Ces étapes ont, en effet, été réalisées dans des fûts inox dans le cas des vins du WEC, et dans des fûts en plastique alimentaire pour les vins PL et SE. Il est possible que les contenants en inox aient favorisé un milieu plus réducteur, protégeant la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one de la dégradation. Dans tous les cas, aucune différence significative n'a pu être observée entre les modalités "**522D**" et "**XR**". En revanche, la concentration en 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one dans ces deux modalités est significativement plus élevée que dans les vins fermentés par la souche **FX10**. Le rôle de

masque de l'arôme évoqué par Lavigne (1996) pourrait expliquer en partie les différences sensorielles liées à un effet "levures" observées entre ces vins. La concentration de ce composé dans la fraction 12 des différentes modalités devra être déterminée afin de valider une hypothèse de masquage. Cela ne remet toutefois pas en question la recherche de molécules spécifiques d'intérêt dans cette fraction.

Les teneurs approchées en 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ont été déterminées à partir du composé synthétisé en laboratoire dans tous les vins du millésime 2012. Sa concentration réelle, mesurée à partir du produit commercial, devra être déterminée avec plus de précisions dans les semaines à venir. Néanmoins, les différences de concentrations mises en évidence dans les vins peuvent être discutées. Cet ester semble principalement influencé par la souche de BL. Comme pour le leucate d'éthyle, les vins fermentés par la souche **B28** contiennent plus d'esters que les vins inoculés avec la BL **450**. Les micro-vinifications réalisées en laboratoire confirment cet effet "bactéries" sur la concentration en leucate d'éthyle. De plus, les BL semblent uniquement capables de synthétiser la forme R de ces deux esters ; la forme S du leucate d'éthyle n'apparaissant qu'au cours du vieillissement. Il s'agira de rechercher si le phénomène est similaire pour le  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$ . Les estérases identifiées chez *O. oeni* ne semblent impliquées que dans la synthèse ou l'hydrolyse des esters éthyliques à courte chaîne carbonée (Sumbly *et al.*, 2013a). D'autres études ont montré que plusieurs bactéries du genre *Bacillus*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonospora* ou *Pseudonocardia* possédaient des enzymes capables de réduire le  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  en alcool correspondant de façon stéréosélective. Plus précisément, il semble que la formation de la forme R de l'alcool soit privilégiée (Ishihara *et al.*, 1996 ; Ishihara *et al.*, 1997). A notre connaissance, ce genre d'enzyme stéréosélective n'a pas été mise en évidence chez *O. oeni* ni pour la synthèse, ni pour l'hydrolyse d'esters. L'étude de cette sous-famille d'esters, qui constituent un marqueur aromatique intéressant de la FML, devra être approfondie. Bien qu'appartenant à la même famille chimique que le leucate d'éthyle, son rôle potentiel d'exhausteur de l'arôme fruité des esters n'est pas pour autant facilement envisagé. Les concentrations mesurées en  $2\text{OH}3\text{C}_1\text{C}_4\text{C}_2$  sont en effet nettement inférieures à celles du leucate d'éthyle (5 µg/L contre 150 à 250 µg/L respectivement).

## Conclusion de la deuxième partie

L'objectif de cette deuxième partie était de cibler, par une approche inductive, les composés aromatiques responsables des différences sensorielles observées dans le chapitre 3. Dans cette optique, nous avons au préalable simplifié la matrice vin. Des extraits de vin ont été fractionnés par chromatographie en phase liquide, selon une méthode déjà développée au laboratoire (Pineau, 2007). Les fractions paraissant les plus intéressantes ont été utilisées dans diverses reconstitutions aromatiques.

L'utilisation de ces fractions a nécessité au préalable de s'assurer d'une part, de la reproductibilité de la méthode, et d'autre part, qu'aucune étape n'entraîne de changement significatif de l'arôme. Un travail a ensuite permis d'établir, par olfaction directe, un profil des 25 fractions en générant des descripteurs caractéristiques pour chacune d'elles. Cette étape de flairage a permis de réduire le nombre de fractions à six groupes, simplifiant ainsi leur étude ultérieure.

La recherche de fractions d'intérêt a été réalisée suivant deux stratégies : (1) l'omission de groupes de fractions de la RA totale a permis de mettre en évidence ceux ayant un impact sur l'intensité de l'arôme, (2) l'échange de fractions issues de modalités différentes dans les RA a permis de cibler celles dont l'effet aromatique est lié à la souche de levures. Nous avons ainsi pu mettre en évidence quelques interactions perceptives particulièrement intéressantes. Lorsque la fraction 12 est présente dans la RA totale, l'intensité de la note fruitée est significativement plus élevée. Ces résultats indiquent que cette fraction, perçue comme non fruitée, participe néanmoins à la modulation de l'arôme fruité. Cependant, son omission n'entraîne pas la perte totale de l'odeur de fruit dans la RA. Elle n'est donc pas la seule à être impliquée dans la modulation de ces notes et l'étude plus approfondie des autres fractions est nécessaire à l'interprétation exhaustive de l'arôme fruité. Ces résultats contribuent à confirmer l'hypothèse d'interactions perceptives impliquant plusieurs familles chimiques de molécules aromatiques plutôt que la présence de quelques composés clés responsables à eux seuls de l'arôme fruité des vins rouges.

L'analyse par GC-MS de la fraction 12 a permis la tentative d'identification de sept composés, par comparaison des spectres de masse et des temps de rétention avec des molécules commerciales ou synthétisées au laboratoire.

La présence de quatre alcools supérieurs, le 2-phényléthanol, le 2-méthylbutan-1-ol, le 3-méthylbutan-1-ol et l'alcool benzylique, a été mise en évidence. L'étude de leur concentration dans le vin et de leurs caractéristiques organoleptiques, ainsi que de leur ajout dans des RA, à la place de la fraction 12, a permis d'écarter l'hypothèse de l'implication de ces alcools dans la modulation recherchée de l'arôme fruité.

Parmi les vingt-cinq autres pics mineurs composant le chromatogramme de la fraction 12, trois d'entre eux ont pu être identifiés : le malate de diéthyle, la 2-méthyltétrahydrothiophène-3-one et le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle.

Le premier, possédant une odeur peu intense et présent dans les vins étudiés à des concentrations bien inférieures à son seuil de perception, semble peu impliqué dans les variations aromatiques observées.

La concentration de la thiophénone est bien significativement influencée par la souche de levures. Cependant, au vu des résultats obtenus, elle ne semble pas jouer de rôle direct sur l'arôme fruité des vins étudiés mais pourrait néanmoins agir comme un masque olfactif. L'étude plus approfondie de son impact organoleptique permettra de vérifier cette hypothèse. Enfin, le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle, dont la concentration augmente au cours du temps, semble particulièrement influencé par la souche de bactéries. Les mêmes observations ont été faites avec le leucate d'éthyle. Ces esters constituent donc un marqueur intéressant de la FML et n'avaient jamais été identifiés comme tel. Ces résultats devront néanmoins être approfondis. Comme le leucate d'éthyle, seule la forme R semble présente dans les vins jeunes. La forme S, qui est formée après plusieurs années de vieillissement pour le leucate d'éthyle, devra également être recherchée et quantifiée dans des vins plus âgés ; d'autant que les deux énantiomères présentent une nuance fruitée différente. De par la proximité de sa structure chimique avec le leucate d'éthyle, cette molécule pourrait s'avérer être un exhausteur de l'arôme fruité intéressant. Son seuil de perception dans différentes matrices ainsi que son effet synergique potentiel devront alors être précisés.

## Conclusion générale

L'élaboration d'un vin rouge implique différents procédés ainsi que de nombreux mécanismes chimiques et microbiologiques visant à optimiser l'expression de sa typicité. Ainsi, il est depuis longtemps observé de façon empirique l'existence d'une expression fruitée des vins rouges et, de façon plus spécifique aux vins de Bordeaux, de notes fruitées évoquant les fruits rouges et noirs. L'obtention et la préservation de ces arômes constituent un enjeu majeur pour la filière viticole, car ils sont associés à la qualité des vins et valorisés par les consommateurs.

Notre travail s'est ainsi intéressé à l'influence de différentes souches de levures et de BL sur la modulation de l'arôme fruité et à la recherche de l'importance du couple levures/BL en vinification en rouge. L'effet de trois souches de levures (**FX10**, **522D** et **XR**) et de deux souches de BL (**B28** et **450**) sur le profil chimique et sensoriel des vins a été évalué après FA et FML ainsi qu'au cours du vieillissement, après 3, 6 et 12 mois d'élevage sur deux millésimes.

La quantification de plus de soixante-dix composés aromatiques a permis d'établir un premier profil analytique. Bien que chaque vin présente un profil qui lui est propre, en fonction du couple levures/BL utilisé, l'impact de la souche de levures sur la concentration de la quasi-totalité des molécules dosées est prédominant. Peu de composés semblent modulés par l'interaction des deux microorganismes. Quant à la souche de BL elle affecte, outre les concentrations du diacétyle et de ses produits dérivés, celles en certains esters, principalement à longue chaîne carbonée. Au vu de ces premiers résultats, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à l'influence des levures et des BL sur la concentration en esters à court et moyen terme.

L'étude de trente-deux esters, dont des esters éthyliques, des acétates et des esters branchés, dans l'ensemble des modalités issues des expérimentations WEC11, WEC12, PL et SE a permis de confirmer les effets "levures" et "bactéries" observés. L'influence de la souche de levures sur la concentration en esters est cependant plus importante que celle des BL. Pour tous les esters, l'effet "levures" observé après FA reste inchangé jusqu'à 12 mois d'élevage, quel que soit le temps de prélèvement considéré. Ces résultats montrent que ni la FML, ni les phénomènes de dégradation ou de synthèse chimique intervenant au cours de l'élevage

n'entraînent de modifications assez importantes pour moduler significativement l'impact initial de la souche de levures sur la concentration des esters.

En parallèle de cette approche analytique, un effet "levures" est également mis en évidence sensoriellement, de manière significative et pour la première fois dans les vins rouges de Bordeaux, quel que soit le test considéré. Comme pour la concentration en esters, cet effet, observable après 3 mois d'élevage, persiste au cours du temps et reste perceptible après 12 mois. L'influence de la souche de BL sur la modulation de la note fruitée semble très limitée par rapport à celle de la levure. Quant à l'effet du couple, il n'a finalement jamais été confirmé dans cette étude.

Cependant, l'analyse quantitative des esters ne permet pas d'expliquer les différences sensorielles observées entre les souches de levures. Les vins fermentés avec les levures **522D** et **FX10** présentent en effet un profil analytique proche, alors qu'ils ont été clairement identifiés comme différents d'un point de vue sensoriel. Nous nous sommes donc intéressés, dans un deuxième temps, à la mise en évidence des composés responsables de ces modulations, par une méthode plus inductive.

Dans cette optique, nous avons tout d'abord mis en place un protocole de sélection de fractions obtenues par HPLC à partir d'extraits organiques de vin. Cette méthode, bien en place au laboratoire, a permis l'isolation d'une fraction, la fraction 12, à l'odeur florale peu intense et dont l'arôme semblait peu affecté par la souche de levures. Elle s'est néanmoins avérée jouer un rôle majeur, influençant l'intensité de la note fruitée de la reconstitution aromatique totale. L'importance de cette fraction est parfaitement corrélée avec l'effet "levures" observé dans nos diverses expérimentations. Son étude ne s'est cependant portée que sur un des vins de notre expérimentation. Le même travail sensoriel devra être réalisé avec les vins des autres essais afin de confirmer son implication organoleptique en lien avec la souche de levures.

Nous nous sommes par la suite focalisés sur la tentative de caractérisation des composés présents dans cette fraction d'intérêt. L'étude par chromatographie en phase gazeuse révèle la présence de quatre alcools supérieurs : le 2-phényléthanol, le 2-méthylbutan-1-ol co-élué avec le 3-méthylbutan-1-ol et l'alcool benzylique dont l'implication dans l'effet sensoriel observé semble peu probable.

La recherche d'autres composés présents dans la fraction 12 a mené à l'identification de trois autres molécules : deux esters et une thiophénone.

Parmi ces dernières, le diéthyle malate est caractérisé par une odeur peu intense. Il est présent dans les vins à des concentrations bien inférieures à son seuil de perception et ne peut pas être un bon candidat pour nos recherches.

La concentration en 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one est principalement influencée par la souche de levures. Son effet masquant, déjà évoqué dans les vins blancs, en fait un candidat potentiel pour tenter d'expliquer les variations aromatiques observées et liées à la souche de levures. Ce phénomène d'interaction devra être étudié plus en détail dans le futur. Cependant, cette molécule ne correspond pas à l'effet synergique recherché.

La troisième molécule, un ester hydroxylé branché, a semblé être le candidat idéal. En effet, sa structure chimique étant proche de celle d'un autre ester hydroxylé d'intérêt, le leucate d'éthyle, le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle pourrait également se révéler être un exhausteur intéressant des notes fruitées apportées par les esters. S'il ne répond finalement pas à l'effet "levures" recherché, ses propriétés organoleptiques méritent néanmoins d'être étudiées de façon plus détaillée. Le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle semble être un marqueur de l'activité bactérienne. Ce comportement a été rapproché de celui du leucate d'éthyle. L'étude de leurs énantiomères respectifs montre que seule la forme R est retrouvée dans les vins après FML. L'hypothèse de l'existence d'enzymes stéréosélectives chez les BL capables de synthétiser ou hydrolyser ces esters hydroxylés est proposée. Il nous semble intéressant d'étudier plus en détail les précurseurs de ces composés, les enzymes impliquées et les systèmes de régulation qui en découlent. Cette perspective plus fondamentale constitue un aspect attrayant du point de vue scientifique.

De façon plus générale, ce travail constitue une première approche visant à l'identification de composés aromatiques ayant un rôle majeur dans la modulation de l'arôme fruité des vins rouges, en lien avec l'activité des microorganismes fermentaires. En effet, la recherche de composés volatils entrant dans la composition de la fraction d'intérêt et pouvant expliquer la permanence de l'effet "levures" n'a pu être menée totalement à son terme. L'identification de ou des molécules impliquées dans cette fraction constitue un enjeu majeur pour la suite de ces travaux de thèse.

Par ailleurs, il reste à étudier de nombreux phénomènes d'interactions perceptives. Nous nous sommes en effet particulièrement intéressés à l'influence d'une seule fraction. Si son omission dans les reconstitutions aromatiques diminue l'intensité de l'arôme fruité, elle n'entraîne pas pour autant une perte totale de l'odeur fruitée. Les différences entre souches de levures sont, d'autre part, toujours perceptibles. Ceci implique l'existence d'autres fractions,

et par extension, d'autres molécules impliquées dans la modulation de cet arôme et liées au métabolisme levurien. Leur identification constitue un défi passionnant tant du point de vue de la chimie analytique que de l'œnologie.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse devront être confirmés et étendus à d'autres souches. Néanmoins, au delà de ces précautions de rigueur, la démonstration de l'impact durable de la souche de levures sur la concentration en certains composés volatils et, plus encore, sur l'arôme fruité des vins rouges, est une acquisition majeure de ce travail. Il faudra tenter de généraliser le phénomène aux autres cépages et dans des régions viticoles différentes. Il sera également intéressant d'étudier si l'élevage sous bois, indissociable de l'élaboration des grands vins rouges de Bordeaux, a une incidence sur la perception de ces phénomènes liés aux activités fermentaires. La modulation de l'arôme fruité constitue depuis de nombreuses années un critère de premier ordre dans la sélection des souches de levures utilisées pour la vinification en blanc. La pertinence de ces travaux pourrait permettre de poser les premières pierres d'une approche similaire appliquée aux vins rouges.

## Références bibliographiques

### A

- Abeijón Mukdsi, M.C., R.B. Medina, M.d.F. Alvarez, and S.N. González. 2009.** Ester Synthesis by Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat's and Ewe's Milk and Cheeses. *Food Chemistry* 117 (2): 241–47.
- Acree, T.E. 1976.** Sniffer to Determine the Odor of Gas Chromatographic Effluents. *Analytical Chemistry* 48 (12): 1821–22.
- Acree, T.E., J. Barnard, and D.G. Cunningham. 1984.** A Procedure for the Sensory Analysis of Gas Chromatographic Effluents. *Food Chemistry* 14 (4): 273–86.
- Acree, T. E., E.H. Lavine, and K. Shure. 1993.** The Aroma of Non *vinifera* Grappes. In *Connaissance aromatique des cépages et qualité des vins: actes*, 51–57. Montpellier, France: Revue française d'œnologie.
- Akiyama, M., K. Murakami, Y. Hirano, M. Ikeda, K. Iwatsuki, A. Wada, K. Tokuno, M. Onishi, and H. Iwabuchi. 2008.** Characterization of Headspace Aroma Compounds of Freshly Brewed Arabica Coffees and Studies on a Characteristic Aroma Compound of Ethiopian Coffee. *Journal of Food Science* 73 (5): C335–46.
- Alañón, M.E., R. Schumacher, L. Castro-Vázquez, I.J. Díaz-Maroto, M.C. Díaz-Maroto, and M.S. Pérez-Coello. 2013.** Enological Potential of Chestnut Wood for Aging Tempranillo Wines Part I: Volatile Compounds and Sensorial Properties. *Food Research International* 51 (1): 325–34.
- Albert, A., P. Varela, A. Salvador, G. Hough, and S. Fiszman. 2011.** Overcoming the Issues in the Sensory Description of Hot Served Food with a Complex Texture. Application of QDA®, Flash Profiling and Projective Mapping Using Panels with Different Degrees of Training. *Food Quality and Preference* 22 (5): 463–73.
- Alexandre, H., D. Heintz, D. Chassagne, M. Guilloux-Benatier, C. Charpentier, and M. Feuillat. 2001.** Protease A Activity and Nitrogen Fractions Released during Alcoholic Fermentation and Autolysis in Enological Conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26 (4): 235–40.
- Álvarez-Pérez, J.M., E. Campo, F. San-Juan, J.J.R. Coque, V. Ferreira, and P. Hernández-Orte. 2012.** Sensory and Chemical Characterisation of the Aroma of Prieto Picudo Rosé Wines: The Differential Role of Autochthonous Yeast Strains on Aroma Profiles. *Food Chemistry* 133 (2): 284–92.
- Anocibar Beloqui, A. 1998.** Contribution à l'Etude des Composés Soufrés Volatiles des Vins Rouges. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Anocibar Beloqui, A., Y. Kotseridis, and A. Bertrand. 1996.** Determination of the Content of Dimethyl Sulphide in Some Red Wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 30 (3): 167–70.
- Antalick, G. 2010.** Bilan Biochimique et Sensoriel des Modifications de la Note Fruitée des Vins Rouges lors de la Fermentation Malolactique : Rôle Particulier des Esters. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Antalick, G., M.C. Abeijón Mukdsi, and G. de Revel. 2010.** Development, Validation and Application of a Specific Method for the Quantitative Determination of Wine Esters by Headspace-Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography–mass Spectrometry. *Food Chemistry* 121 (4): 1236–45.
- Antalick, G., M.C. Perello, and G. de Revel. 2012.** Characterization of Fruity Aroma Modifications in Red Wines during Malolactic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (50): 12371–83.
- Antalick, G., M.C. Perello, and G. de Revel. 2013.** Co-Inoculation with Yeast and LAB under Winery Conditions: Modification of the Aromatic Profile of Merlot Wines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 34 (2): 223–32.
- Antalick, G., M.C. Perello, and G. de Revel. 2014.** Esters in Wines: New Insight through the Establishment of a Database of French Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 65 (3): 293–304.
- Ares, G., P. Varela, G. Rado, and A. Giménez. 2011.** Identifying Ideal Products Using Three Different Consumer Profiling Methodologies. Comparison with External Preference Mapping. *Food Quality and Preference* 22 (6): 581–91.

- Arnink, K., and T. Henick-Kling. 2005.** Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* Strains on Successful Malolactic Conversion in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56 (3): 228–37.
- Aronson, J., and S.E. Ebeler. 2004.** Effect of Polyphenol Compounds on the Headspace Volatility of Flavors. *American Journal of Enology and Viticulture* 55 (1): 13–21.
- Atienza, J., M.D. Climent, and P. Aragón. 1998.** Gas Chromatographic and Mass-Spectrometric Study of Fermentation Products from Varietal Grape Must (Red Bobal), with and without Selected Killer Yeast. *American Journal of Enology and Viticulture* 49 (1): 105–6.
- Aznar, M., R. López, J. Cacho, and V. Ferreira. 2003.** Prediction of Aged Red Wine Aroma Properties from Aroma Chemical Composition. Partial Least Squares Regression Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (9): 2700–2707.
- Aznar, M., R. López, J.F. Cacho, and V. Ferreira. 2001.** Identification and Quantification of Impact Odorants of Aged Red Wines from Rioja, GC-Olfactometry, Quantitative GC-MS, and Odor Evaluation of HPLC Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (6): 2924–29.

## B

- Barbe, J.C., B. Pineau, and A.C. da Silva Ferreira. 2008.** Instrumental and Sensory Approaches for the Characterization of Compounds Responsible for Wine Aroma. *Chemistry and Biodiversity* 5 (6): 1170–83.
- Barcenas, P., F.J. Pérez Elortondo, and M. Albisu. 2004.** Projective Mapping in Sensory Analysis of Ewes Milk Cheeses: A Study on Consumers and Trained Panel Performance. *Food Research International* 37 (7): 723–29.
- Barthélémy, J. 1998.** Evaluation d'une Grandeur Sensorielle Complexe : Description Quantifiée. In *Evaluation Sensorielle ; Manuel Méthodologique*, SSHA, 162–69. Tec & Doc. Paris, France.
- Bartowsky, E.J., I.L. Francis, J.R. Bellon, and P.A. Henschke. 2002.** Is Buttery Aroma Perception in Wines Predictable from the Diacetyl Concentration? *Australian Journal of Grape and Wine Research* 8 (3): 180–85.
- Bartowsky, E.J., and P.A. Henschke. 2004.** The 'Buttery' Attribute of Wine - Diacetyl - Desirability, Spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 96 (3): 235–52.
- Baumes, R., R. Cordonnier, S. Nitz, and F. Drawert. 1986.** Identification and Determination of Volatile Constituents in Wines from Different Vine Cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37 (9): 927–43.
- Beelman, R., R. Keen, M. Banner, and S. King. 1982.** Interactions between Wine Yeast and Malolactic Bacteria under Wine Conditions. *Dev Ind Microbiol* 23: 107–21.
- Bertrand, A. 1975.** Recherches sur l'Analyse des Vins par Chromatographie en Phase Gazeuse. Thèse d'Etat pour l'Université de Bordeaux 2.
- Bertrand, A. 1983.** *Volatiles from Grape Must Fermentation. Flavour of Distilled Beverages. Origin and Development*. E. Horwood. Chichester: Pigott, J.R.
- Bertrand, A., C. Zmirou-Bonnamour, and A. Lonvaud-Funel. 1984.** Aroma Compounds Formed by Malolactic Bacteria. In *Proceedings of the Alko Symposium on Flavour Research of Alcoholic Beverages*, 39–49. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. Helsinki.
- Blanco, P., J.M. Mirás-Avalos, E. Pereira, and I. Orriols. 2013.** Fermentative Aroma Compounds and Sensory Profiles of Godello and Albariño Wines as Influenced by *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (11): 2849–57.
- Boido, E., F. Carrau, E. Dellacassa, A. Lloret, K. Medina, and G. Versini. 1999.** Modificaciones Producidas por la Fermentacion Malolactica en la Composicion Aromatica de les Fracciones Libre y Ligada para la Variedad Tannat. In *VII Congreso Latino-americano de Viticultura y Enologica*. Mendoza, Argentina.
- Boido, E., A. Lloret, K. Medina, F. Carrau, and E. Dellacassa. 2002.** Effect of  $\beta$ -Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on the Glycosylated Flavor Precursors of Tannat Wine during Malolactic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (8): 2344–49.

- Boido, E., K. Medina, L. Fariña, F. Carrau, G. Versini, and E. Dellacassa. 2009.** The Effect of Bacterial Strain and Aging on the Secondary Volatile Metabolites Produced during Malolactic Fermentation of Tannat Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (14): 6271–78.
- Bordiga, M., G. Piana, J.D. Coisson, F. Travaglia, and M. Arlorio. 2014.** Headspace Solid-Phase Micro Extraction Coupled to Comprehensive Two-Dimensional with Time-of-Flight Mass Spectrometry Applied to the Evaluation of Nebbiolo-Based Wine Volatile Aroma during Ageing. *International Journal of Food Science and Technology* 49 (3): 787–96.
- Bouchilloux, P., P. Darriet, R. Henry, V. Lavigne-Cruège, and D. Dubourdieu. 1998.** Identification of Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (8): 3095–99.
- Buttery, R.G., L.C. Ling, and D.J. Stern. 1997.** Studies on Popcorn Aroma and Flavor Volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3): 837–43.

## C

- Campo, E., J. Cacho, and V. Ferreira. 2006.** Multidimensional Chromatographic Approach Applied to the Identification of Novel Aroma Compounds in Wine. Identification of Ethyl Cyclohexanoate, Ethyl 2-Hydroxy-3-Methylbutyrate and Ethyl 2-Hydroxy-4-Methylpentanoate. *Journal of Chromatography A* 1137 (2): 223–30.
- Campo, E., J. Cacho, and V. Ferreira. 2007.** Solid Phase Extraction, Multidimensional Gas Chromatography Mass Spectrometry Determination of Four Novel Aroma Powerful Ethyl Esters. Assessment of Their Occurrence and Importance in Wine and Other Alcoholic Beverages. *Journal of Chromatography A* 1140 (1-2): 180–88.
- Casabianca, F., B. Sylvander, Y. Noel, C. Beranger, J.B. Coulon, and F. Roncin. 2005.** Terroir et Typicité : Deux Concepts Clés des Appellations d'Origine Contrôlée, Essai de Définitions Scientifiques et Opérationnelles. In *Colloque International de restitution des travaux de recherches sur les indications et appellations d'origine géographiques*, 199–213. Paris, France: I- INAO.
- Cejudo-Bastante, M.J., I. Hermosín-Gutiérrez, and M.S. Pérez-Coello. 2013.** Accelerated Aging against Conventional Storage: Effects on the Volatile Composition of Chardonnay White Wines. *Journal of Food Science* 78 (4): C507–13.
- Charpentier, C., and M. Feuillat. 1993.** Yeast Autolysis. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, 289–326. Chur, Switzerland: Fleet, G.H.
- Chatonnet, P. 1995.** Influence des Procédés de Tonnellerie et des Conditions d'Élevage sur la Composition et la Qualité des Vins Élevés en Fûts de Chêne. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Chatonnet P., Lavigne V., Boidron J.N., and Dubourdieu D. 1992.** Identification et Dosage de Sulfures Volatils Lourds dans les Vins par Chromatographie en Phase Gazeuse et Photométrie de Flamme. *Sciences des aliments* 12 (3): 513–32.
- Christoph, N., M. Geßner, T.J. Simat, and K. Hoenicke. 1999.** Off-Flavor Compounds in Wine and Other Food Products Formed By Enzymatical, Physical, and Chemical Degradation of Tryptophan and Its Metabolites. In *Tryptophan, Serotonin, and Melatonin*, 467:659–69. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US.
- Claisse, O., and A. Lonvaud-Funel. 2012.** Development of a Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Typing Method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology* 30 (2): 340–47.
- Comitini, F., R. Ferretti, F. Clementi, I. Mannazzu, and M. Ciani. 2005.** Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and Malolactic Bacteria: Preliminary Characterization of a Yeast Proteinaceous Compound(s) Active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 99 (1): 105–11.
- Comstock M.J. 1983.** The Maillard Reaction in Foods and Nutrition. In *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*, edited by Comstock M. J. ACS Symposium Series 215. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
- Corison, C.A., C.S. Ough, H.W. Berg, and K.E. Nelson. 1979.** Must Acetic Acid and Ethyl Acetate as Mold and Rot Indicators in Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 30 (2): 130–34.

**Cutzach, I., P. Chatonnet, R. Henry, M. Pons, and D. Dubourdiou. 1998.** Study in Aroma of Sweet Natural Non Muscat Wines 2<sup>nd</sup> part : Quantitative Analysis of Volatil Compounds Taking Part in Aroma of Sweet Natural Wines during Ageing. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 32 (4): 211–21.

## D

- Darriet, P. 1993.** Recherches sur l'Arôme et les Précurseurs d'Arôme du Sauvignon : Applications Technologiques. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Darriet, P., T. Tominaga, V. Lavigne, J.N. Boidron, and D. Dubourdiou. 1995.** Identification of a Powerful Aromatic Component of *Vitis vinifera* L. Var Sauvignon Wines: 4-Mercapto-4-Methylpentan-2-One. *Flavour and Fragrance Journal* 10 (6): 385–92.
- Da Silva Ferreira, A.C. 1998.** Caractérisation du Vieillissement du Vin de Porto : Approche Chimique et Statistique, Rôle Aromatique du Sotolon. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Davis, C.R., D. Wibowo, R. Eschenbruch, T.H. Lee, and G.H. Fleet. 1985.** Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36 (4): 290–301.
- Davis, C.R., D. Wibowo, G.H. Fleet, and T.H. Lee. 1988.** Properties of Wine Lactic Acid Bacteria: Their Potential Enological Significance. *American Journal of Enology and Viticulture* 39 (2): 137–42.
- De Andrade Neves, N., L. de Araújo Pantoja, and A.S. dos Santos. 2014.** Thermovinification of Grapes from the Cabernet Sauvignon and Pinot Noir Varieties Using Immobilized Yeasts. *European Food Research and Technology* 238 (1): 79–84.
- Delaquis, P., M. Cliff, M. King, B. Girard, J. Hall, and A. Reynolds. 2000.** Effect of Two Commercial Malolactic Cultures on the Chemical and Sensory Properties of Chancellor Wines Vinified with Different Yeasts and Fermentation Temperatures. *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (1): 42–48.
- Delarue, J., and J.M. Sieffermann. 2004.** Sensory Mapping Using Flash Profile. Comparison with a Conventional Descriptive Method for the Evaluation of the Flavour of Fruit Dairy Products. *Food Quality and Preference* 15 (4): 383–92.
- Delfini, C., and F. Cervetti. 1991.** Metabolic and Technological Factors Affecting Acetic Acid Production by Yeast during Alcoholic Fermentation. *Vitic. Enol. Sci.* 46: 142–50.
- Demole, E., P. Enggist, U. Säuberli, M. Stoll, and E. Sz. Kováts. 1970.** Structure et Synthèse de la Damascénone (triméthyl-2,6,6-Trans-Crotonoyl-1-Cyclohexadiène-1,3), Constituant Odorant de l'Essence de Rose Bulgare (*Rosa damascena* Mill). *Helvetica Chimica Acta* 53 (3): 541–51.
- De Mora, S.J., R. Eschenbruch, S.J. Knowles, and D.J. Spedding. 1986.** The Formation of Dimethyl Sulphide during Fermentation Using the Wine Yeast. *Food Microbiology* 3 (1): 27–32.
- De Revel, G. 1992.** Le Diacétyle, les Composés Dicarboxyles et leurs Produits de Réduction dans le Vin. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- De Revel, G., and A. Bertrand. 1993.** A Method for the Detection of Carbonyl 4 Compounds in Wine: Glyoxal and Methylglyoxal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61 (2): 267–72.
- De Revel, G., A. Bertrand, and A. Lonvaud-Funel. 1989.** Synthèse des Substances Acétoïniques par *Leuconostoc oenos*. *Connaissance de La Vigne et Vin* 23 (1): 39–45.
- De Revel, G., N. Martin, L. Pripis-Nicolau, A. Lonvaud-Funel, and A. Bertrand. 1999.** Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10): 4003–8.
- De Revel, G., L. Pripis-Nicolau, J.C. Barbe, and A. Bertrand. 2000.** The Detection of  $\alpha$ -Dicarbonyl Compounds in Wine by Formation of Quinoxaline Derivatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (1): 102–8.
- De Royer Dupré, N., R. Schneider, J.C. Payan, E. Salançon, and A. Razungles. 2014.** Effects of Vine Water Status on Dimethyl Sulfur Potential, Ammonium, and Amino Acid Contents in Grenache Noir Grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (13): 2760–66.

- Díaz-Maroto, M.C., R. Schneider, and R. Baumes. 2005.** Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (9): 3503–9.
- D’Incecco, N., E. Bartowsky, S. Kassara, A. Lante, P. Spettoli, and P. Henschke. 2004.** Release of Glycosidically Bound Flavour Compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during Malolactic Fermentation. *Food Microbiology* 21 (3): 257–65.
- Dittrich, H.H., and T. Staudenmayer. 1970.** Relations Between Sulfite Formation and Hydrogen Sulfide Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite naturwissenschaftliche Abt.: Allgemeine, landwirtschaftliche und technische Mikrobiologie* 124 (2): 113–18.
- Dubois, P. 1994.** Les Arômes des Vins et leurs Défauts. *Rev. Fr. Enol.* 146: 39–50.
- Dubourdieu, D., T. Tominaga, I. Masneuf, C.P. des Gachons, and M.L. Murat. 2006.** The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon Blanc. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 (1): 81–88.
- Ducruet, V., C. Flanzy, M. Bourzeix, and Y. Chambroy. 1983.** Les Constituants Volatils des Vins Jeunes de Macération Carbonique. *Sciences Des Aliments* 3: 413–26.
- Dufour, C., and C.L. Bayonove. 1999a.** Interactions between Wine Polyphenols and Aroma Substances. An Insight at the Molecular Level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2): 678–84.
- Dufour, C., and C.L. Bayonove. 1999b.** Influence of Wine Structurally Different Polysaccharides on the Volatility of Aroma Substances in a Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2): 671–77.
- Dufour, C., and I. Sauvaitre. 2000.** Interactions between Anthocyanins and Aroma Substances in a Model System. Effect on the Flavor of Grape-Derived Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5): 1784–88.
- Du Plessis, C.S., and O.P.H. Augustyn. 1981.** Initial Study on the Guava Aroma of Chenin Blanc and Colombar Wines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 2: 101–3.

## E

- Ebeler, S.E. 2001.** Analytical Chemistry: Unlocking the Secrets of Wine Flavor. *Food Reviews International* 17 (1): 45–64.
- Egli, C.M., W.D. Edinger, C.M. Mittrakul, and T. Henick-Kling. 1998.** Dynamics of Indigenous and Inoculated Yeast Populations and Their Effect on the Sensory Character of Riesling and Chardonnay Wines. *Journal of Applied Microbiology* 85 (5): 779–89.
- Eschenbruch, R., P. Bonish, and B.M. Fisher. 1974.** The Production of H<sub>2</sub>S by Pure Culture Wine Yeasts. *Vitis* 17: 67–74.
- Escudero, A., E. Campo, L. Fariña, J. Cacho, and V. Ferreira. 2007.** Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (11): 4501–10.
- Etievant, P.X. 1991.** Wine. In *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, 483–586. Food Science and Technology. New-York: Maarse, H.
- Etievant, P.X., and C.L. Bayonove. 1983.** Aroma Components of Pomaces and Wine from the Variety Muscat de Frontignan. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34 (4): 393–403.

## F

- Falcao, L.D., G. Lytra, P. Darriet, and J.C. Barbe. 2012.** Identification of Ethyl 2-Hydroxy-4-Methylpentanoate in Red Wines, a Compound Involved in Blackberry Aroma. *Food Chemistry* 132 (1): 230–36.
- Favier, M. 2012.** Etude des Plasmides et Génomes d’*Oenococcus oeni* pour l’Identification des Gènes d’Intérêt Technologique. Thèse pour le doctorat de l’Université de Bordeaux 2.

- Ferrari, G., O. Lablanquie, R. Cantagrel, J. Ledauphin, T. Payot, N. Fournier, and E. Guichard. 2004.** Determination of Key Odorant Compounds in Freshly Distilled Cognac Using GC-O, GC-MS, and Sensory Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (18): 5670–76.
- Ferreira, V., M. Aznar, R. López, and J. Cacho. 2001.** Quantitative Gas Chromatography–Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract. Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10): 4818–24.
- Ferreira, V., P. Hernández-Orte, A. Escudero, R. López, and J. Cacho. 1999.** Semipreparative Reversed-Phase Liquid Chromatographic Fractionation of Aroma Extracts from Wine and Other Alcoholic Beverages. *Journal of Chromatography A* 864 (1): 77–88.
- Ferreira, V., I. Jarauta, R. López, and J. Cacho. 2003.** Quantitative Determination of Sotolon, Maltol and Free Furaneol in Wine by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Ion-Trap Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1010 (1): 95–103.
- Ferreira, V., I. Jarauta, L. Ortega, and J. Cacho. 2004.** Simple Strategy for Optimization of Solid-Phase Extraction Procedures Through the Use of Solid-Liquid Distribution Coefficients: Application to the Determination of Aliphatic Lactones In Wines. In *ExTech 2005: 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*, 1025 (2):349–54.
- Ferreira, V., R. López, and J.F. Cacho. 2000.** Quantitative Determination of the Odorants of Young Red Wines from Different Grape Varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (11): 1659–67.
- Ferreira, V., R. López, A. Escudero, and J.F. Cacho. 1998.** The Aroma of Grenache Red Wine: Hierarchy and Nature of Its Main Odorants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77 (2): 259–67.
- Ferreira, V., N. Ortín, A. Escudero, R. López, and J. Cacho. 2002.** Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (14): 4048–54.
- Fischer, U., M. Strasser, and K. Gutzler. 2000.** Impact of Fermentation Technology on the Phenolic and Volatile Composition of German Red Wines. *International Journal of Food Science & Technology* 35 (1): 81–94.
- Flanzy, C., M. Buret, and Y. Chambroy. 1981.** L'Acide Shikimique au Cours du Métabolisme Anaérobie de la Baie de Raisin. *Sciences Des Aliments* 1: 283–92.
- Fleet, G.H., and G.M. Heard. 1993.** Yeasts: Growth during Fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, 27–54. Chur, Switzerland: Fleet, G.H.
- Fornachon, J.C.M. 1968.** Influence of Different Yeasts on the Growth of Lactic Acid Bacteria in Wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 19 (7): 374–78.
- Fowles, G.W.A. 1992.** Acids in Grapes and Wines: A Review. *Journal of Wine Research* 3 (1): 25–41.
- Frezier, V. 1992.** Recherche sur l'Ecologie des Souches de *Saccharomyces cerevisiae* au Cours des Vinifications Bordelaises. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Fujii, T., O. Kobayashi, H. Yoshimoto, S. Furukawa, and Y. Tamai. 1997.** Effect of Aeration and Unsaturated Fatty Acids on Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Alcohol Acetyltransferase Gene. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (3): 910–15.
- Fujii, T., N. Nagasawa, A. Iwamatsu, T. Bogaki, Y. Tamai, and M. Hamachi. 1994.** Molecular Cloning, Sequence Analysis, and Expression of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Gene. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (8): 2786–92.
- Fujii, T., H. Yoshimoto, and Y. Tamai. 1996.** Acetate Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* Lacking the ATF1 Gene Encoding the Alcohol Acetyltransferase. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81 (6): 538–42.
- Fujiwara, D., O. Kobayashi, H. Yoshimoto, S. Harashima, and Y. Tamai. 1999.** Molecular Mechanism of the Multiple Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 Gene Encoding Alcohol Acetyltransferase. *Yeast* 15 (12): 1183–97.
- Fujiwara, D., H. Yoshimoto, H. Sone, S. Harashima, and Y. Tamai. 1998.** Transcriptional Co-Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Alcohol Acetyltransferase Gene, ATF1 and  $\Delta$ -9 Fatty Acid Desaturase Gene, OLE1 by Unsaturated Fatty Acids. *Yeast* 14 (8): 711–21.

## G

- Gambaro, A., E. Boido, A. Zlotejablko, K. Medina, A. Lloret, E. Dellacassa, and F. Carrau. 2001.** Effect of Malolactic Fermentation on the Aroma Properties of Tannat Wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7 (1): 27–32.
- Garbay, S., N. Rozes, and A. Lonvaud-Funel. 1995.** Fatty Acid Composition of *Leuconostoc oenos*, Incidence of Growth Conditions and Relationship with Malolactic Efficiency. *Food Microbiology* 12: 387–95.
- Genovese, A., A. Gambuti, P. Piombino, and L. Moio. 2007.** Sensory Properties and Aroma Compounds of Sweet Fiano Wine. *Food Chemistry* 103 (4): 1228–36.
- Giudici, P., P. Romano, and C. Zambonelli. 1990.** A Biometric Study of Higher Alcohol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology* 36 (1): 61–64.
- Gobbetti, M., P.F. Fox, and L. Stepaniak. 1997.** Isolation and Characterization of a Tributyrin Esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Journal of Dairy Science* 80 (12): 3099–3106.
- Gómez García-Carpintero, E., M.A. Gómez Gallego, E. Sánchez-Palomo, and M.A. González Viñas. 2012.** Impact of Alternative Technique to Ageing Using Oak Chips in Alcoholic or in Malolactic Fermentation on Volatile and Sensory Composition of Red Wines. *Food Chemistry* 134 (2): 851–63.
- Gómez-Míguez, M.J., J.F. Cacho, V. Ferreira, I.M. Vicario, and F.J. Heredia. 2007.** Volatile Components of Zalema White Wines. *Food Chemistry* 100 (4): 1464–73.
- Guth, H. 1997.** Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (8): 3027–32.

## H

- Henick-Kling, T. 1993.** Malolactic Fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, 289–326. Chur, Switzerland: Fleet, G.H.
- Henick-Kling, T., T.E. Acree, L.A. Krieger, M.H. Laurent, and W.D. Edinger. 1994.** Modification of Wine Flavor by Malolactic Fermentation. *Wine East* 4: 8–15.
- Henick-Kling, T., W. Edinger, P. Daniel, and P. Monk. 1998.** Selective Effects of Sulfur Dioxide and Yeast Starter Culture Addition on Indigenous Yeast Populations and Sensory Characteristics of Wine. *Journal of Applied Microbiology* 84 (5): 865–76.
- Henschke, P.A., and V. Jiranek. 1993.** Yeast: Growth during Fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, 27–54. Chur, Switzerland: Fleet, G.H.
- Hirvi, T., and E. Honkanen. 1983.** The Aroma of Blueberries. *J. Sci. Food Agric.*, 34: 992–96.
- Holland, R., S.Q. Liu, V.L. Crow, M.L. Delabre, M. Lubbers, M. Bennett, and G. Norris. 2005.** Esterases of Lactic Acid Bacteria and Cheese Flavour: Milk Fat Hydrolysis, Alcoholysis and Esterification. *International Dairy Journal* 15 (6-9): 711–18.

## I

- Inoue, Y., S. Trevanichi, K. Fukuda, S. Izawa, Y. Wakai, and A. Kimura. 1997.** Roles of Esterase and Alcohol Acetyltransferase on Production of Isoamyl Acetate in *Hansenula mrakii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3): 644–49.
- Ishihara, K., K. Iwai, H. Yamaguchi, N. Nakajima, K. Nakamura, and T. Ohshima. 1996.** Stereoselective Reduction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Keto Esters with Aerobic *Thermophiles*, *Bacillus* Strains. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60 (11): 1896–98.
- Ishihara, K., M. Nishitani, H. Yamaguchi, N. Nakajima, T. Ohshima, and K. Nakamura. 1997.** Preparation of Optically Active  $\alpha$ -Hydroxy Esters: Stereoselective Reduction of  $\alpha$ -Keto Esters Using Thermophilic Actinomycetes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84 (3): 268–70.
- ISO 3591. 1977.** Analyse Sensorielle – Appareillage – Verre à Dégustation pour l'Analyse Sensorielle des Vins. In *Analyse Sensorielle: Recueil, Normes, Agroalimentaire*. AFNOR.
- ISO 5495. 2005.** Analyse Sensorielle - Méthodologie - Essai de Comparaison par Paires. In *Analyse Sensorielle: Recueil, Normes, Agroalimentaire*. AFNOR.

**ISO 13299. 2003.** Analyse Sensorielle - Méthodologie - Directives Générales pour l'Établissement d'un Profil Sensoriel. In *Analyse Sensorielle: Recueil, Normes, Agroalimentaire*. AFNOR.

## J

**Jackson, R.S. 1994.** *Wine Science: Principles and Applications*. Academic Press Inc. San Diego.

**Jordán, M.J., K. Tandon, P.E. Shaw, and K.L. Goodner. 2001.** Aromatic Profile of Aqueous Banana Essence and Banana Fruit by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10): 4813–17.

## K

**Keim, H., G. de Revel, and A. Bertrand. 2002.** Instrumental and Sensory Evaluation of Malolactic Fermentation Wine. In *10th Weurman*. Beaune, France.

**King, M.C., M.A. Cliff, and J.W. Hall. 1998.** Comparison of Projective Mapping and Sorting Data Collection and Multivariate Methodologies for Identification of Similarity-of-Use of Snack Bars. *Journal of Sensory Studies* 13 (3): 347–58.

**Kotseridis, Y. 1999.** Etude de l'Arôme des Vins de Merlot et de Cabernet Sauvignon de la Région Bordelaise. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.

**Kotseridis, Y., and R. Baumes. 2000.** Identification of Impact Odorants in Bordeaux Red Grape Juice, in the Commercial Yeast Used for its Fermentation, and in the Produced Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2): 400–406.

**Kunkee, R.E. 1974.** Malo-Lactic Fermentation. Chemistry of Winemaking. Edited by A.D. Webb. American Chemical Society.

## L

**Lafon Lafourcade, S., E. Carre, and P. Ribereau Gayon. 1983.** Occurrence of Lactic Acid Bacteria during the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (4): 874–80.

**Lambrechts, M.G., and I.S. Pretorius. 2000.** Yeast and Its Importance to Wine Aroma - a Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21 (Special Issue): 97–129.

**Lambropoulos, I., and I.G. Roussis. 2007.** Inhibition of the Decrease of Volatile Esters and Terpenes during Storage of a White Wine and a Model Wine Medium by Caffeic Acid and Gallic Acid. *Food Research International* 40 (1): 176–81.

**Laurent, A., T. Henick-Kling, and T.E. Acree. 1994.** Changes in the Aroma and Odour of Chardonnay Wine due to Malolactic Fermentation. *Viticulture an Enology Sciences* 49: 3–10.

**Lavigne-Cruège, V. 1996.** Recherches sur les Composés Soufrés Volatils Formés par la Levure au Cours de la Vinification et de l'Élevage des Vins Blancs Secs. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.

**Lavigne, V., J.N. Boidron, and D. Dubourdiu. 1993.** Dosage des Composés Soufrés Volatils Légers dans les Vins par Chromatographie en Phase Gazeuse et Photométrie de Flamme. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* 27: 1–12.

**Lavigne, V., and D. Dubourdiu. 1997.** Recherche sur les Composés Soufrés Formés par la Levure au Cours de la Vinification et de l'Élevage des Vins Blancs Secs. *Revue Des Œnologues* 85: 23–30.

**Lavigne, V., R. Henry, and D. Dubourdiu. 1998.** Identification and Determination of Sulfur Compounds Responsible for 'Grilled' Aroma in Wines. *Sciences des Aliments* 18 (2): 175–91.

**Lawless, H.T., and H. Heymann. 1998.** *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices*. Chapman & Hall Food Science Book. Springer.

- Ledauphin, J., H. Guichard, J.F. Saint-Clair, B. Picoche, and D. Barillier. 2003.** Chemical and Sensorial Aroma Characterization of Freshly Distilled Calvados. 2. Identification of Volatile Compounds and Key Odorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2): 433–42.
- Lilly, M., F.F. Bauer, M.G. Lambrechts, J.H. Swiegers, D. Cozzolino, and I.S. Pretorius. 2006.** The Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase and Esterase Activity on the Flavour Profiles of Wine and Distillates. *Yeast* 23 (9): 641–59.
- Lilly, M., M.G. Lambrechts, and I.S. Pretorius. 2000.** Effect of Increased Yeast Alcohol Acetyltransferase Activity on Flavor Profiles of Wine and Distillates. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2): 744–53.
- Liu, S.Q., R. Holland, and V.L. Crow. 2003.** Ester Synthesis in an Aqueous Environment by *Streptococcus thermophilus* and Other Dairy Lactic Acid Bacteria.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (1): 81–88.
- Liu, S.Q., R. Holland, and V.L. Crow. 2004.** Esters and Their Biosynthesis in Fermented Dairy Products: A Review. *International Dairy Journal* 14 (11): 923–45.
- Llaubères, R.M., D. Dubourdieu, and J.C. Viletta. 1987.** Exocellular Polysaccharides from *Saccharomyces* in Wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 41 (3): 277–86.
- Lloret, A., E. Boido, D. Lorenzo, K. Medina, F. Carrau, E. Dellacassa, and G. Versini. 2002.** Aroma Variation in Tannat Wines: Effect of Malolactic Fermentation on Ethyl Lactate Level and Its Enantiomeric Distribution. *Italian Journal of Food Science* 14 (2): 175–80.
- Lonvaud-Funel, A., A. Joyeux, and C. Desens. 1988b.** Inhibition of Malolactic Fermentation of Wines by Products of Yeast Metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 44 (2): 183–91.
- Lonvaud-Funel, A., J.P. Masclef, A. Joyeux, and Y. Paraskevopoulos. 1988a.** Etude des Interactions entre Levures et Bactéries Lactiques dans le Mout de Raisin. *Connaissance de La Vigne et Vin* 22: 11–24.
- Lonvaud-Funel, A., and A.M. Strasser de Saad. 1982.** Purification and Properties of a Malolactic Enzyme from a Strain of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Grapes. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (2): 357–61.
- Lonvaud, M. 1975.** Recherches sur l’Enzyme des Bactéries Lactiques du Vin Assurant la Transformation du Malate en Lactate. Thèse pour le doctorat de l’Université de Bordeaux 2.
- Lorrain, B., J. Ballester, T. Thomas-Danguin, J. Blanquet, J.M. Meunier, and Y. Le Fur. 2006.** Selection of Potential Impact Odorants and Sensory Validation of Their Importance in Typical Chardonnay Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (11): 3973–81.
- Lorrain, B., S. Tempere, N. Iturmendi, V. Moine, G. De Revel, and P.L. Teissedre. 2013.** Influence of Phenolic Compounds on the Sensorial Perception and Volatility of Red Wine Esters in Model Solution: An Insight at the Molecular Level. *Food Chemistry* 140 (1-2): 76–82.
- Loscos, N., P. Hernandez-Orte, J. Cacho, and V. Ferreira. 2007.** Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (16): 6674–84.
- Loscos, N., P. Hernández-Orte, J. Cacho, and V. Ferreira. 2010.** Evolution of the Aroma Composition of Wines Supplemented with Grape Flavour Precursors from Different Varietals during Accelerated Wine Ageing. *Food Chemistry* 120 (1): 205–16.
- Ly, M.H., M. Covarrubias-Cervantes, C. Dury-Brun, S. Bordet, A. Voilley, T.M. Le, J.M. Belin, and Y. Waché. 2008.** Retention of Aroma Compounds by Lactic Acid Bacteria in Model Food Media. *Food Hydrocolloids* 22 (2): 211–17.
- Lytra, G. 2012.** Importance des Interactions Perceptives dans l’Expression de l’Arôme Fruité Typique des Vins Rouges. Thèse pour le doctorat de l’Université de Bordeaux 2.
- Lytra, G., S. Tempere, G. de Revel, and J.C. Barbe. 2012a.** Distribution and Organoleptic Impact of Ethyl 2-Hydroxy-4-Methylpentanoate Enantiomers in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (6): 1503–9.
- Lytra, G., S. Tempere, G. de Revel, and J.C. Barbe. 2012b.** Impact of Perceptive Interactions on Red Wine Fruity Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (50): 12260–69.
- Lytra, G., S. Tempere, G. de Revel, and J.C. Barbe. 2014b.** Distribution and Organoleptic Impact of Ethyl 2-Methylbutanoate Enantiomers in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (22): 5005–10.

**Lytra, G., S. Tempere, S. Zhang, S. Marchand, G. De Revel, and J.C. Barbe. 2014a.** Olfactory Impact of Dimethyl Sulfide on Red Wine Fruity Esters Aroma Expression in Model Solution. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* 48 (1): 75–85.

## M

**Maarse, H., and C.A. Visscher. 1989.** *Volatile Compounds in Food: Qualitative and Quantitative Data*. TNO-CIVO Food Analysis Institute.

**Malcorps, P., and J.P. Dufour. 1992.** Short-Chain and Medium-Chain Aliphatic-Ester Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 210 (3): 1015–22.

**Malherbe, S., A.G.J. Tredoux, H.H. Nieuwoudt, and M. Toit. 2011.** Comparative Metabolic Profiling to Investigate the Contribution of *O. oeni* MLF Starter Cultures to Red Wine Composition. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39 (3): 477–94.

**Marais, J. 1978.** The Effect of pH on Esters and Quality of Colombar Wine during Maturation. *Vitis* 17: 396–403.

**Marais, J. 1983.** Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 42: 49–60.

**Marais, J., and H.J. Pool. 1980.** Effect of Storage Time and Temperature on the Volatile Composition and Quality of Dry White Table Wines. *Vitis*, 19: 151–54.

**Marchal, A. 2010.** Recherches sur les Bases Moléculaires de la Saveur Sucrée des Vins Secs: Approches Analytique et Sensorielle. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.

**Marchal, A., A. Pons, V. Lavigne, and D. Dubourdieu. 2013.** Contribution of Oak Wood Ageing to the Sweet Perception of Dry Wines: Effect of Oak Ageing on Wine Sweetness. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19 (1): 11–19.

**Marchand, S., and G. de Revel. 2010.** A HPLC Fluorescence-Based Method for Glutathione Derivatives Quantification in Must and Wine. *Analytica Chimica Acta* 660 (1-2): 158–63.

**Marchand, S., G. de Revel, and A. Bertrand. 2000.** Approaches to Wine Aroma: Release of Aroma Compounds from Reactions between Cysteine and Carbonyl Compounds in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (10): 4890–95.

**Marchand, S., G. de Revel, J. Vercauteren, and A. Bertrand. 2002.** Possible Mechanism for Involvement of Cysteine in Aroma Production in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21): 6160–64.

**Martin, N., and G. de Revel. 1999.** Sensory Evaluation: Scientific Bases and Oenological Applications. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* 33 (SPEC ISS.): 81–93.

**Marullo, P., C. Mansour, M. Dufour, W. Albertin, D. Sicard, M. Bely, and D. Dubourdieu. 2009.** Genetic Improvement of Thermo-Tolerance in Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strains by a Backcross Approach. *FEMS Yeast Research* 9 (8): 1148–60.

**Mason, A.B., and J.P. Dufour. 2000.** Alcohol Acetyltransferases and the Significance of Ester Synthesis in Yeast. *Yeast* 16 (14): 1287–98.

**Mateo, J.J., M. Jiminez, T. Huerta, and A. Pastor. 1991.** Contribution of Different Yeasts Isolated from Musts of Monastrell Grapes to the Aroma of Wine. *International Journal of Food Microbiology* 14 (2): 153–60.

**Matthews, A., P.R. Grbin, and V. Jiranek. 2007.** Biochemical Characterisation of the Esterase Activities of Wine Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (2): 329–37.

**Matthews, A., A. Grimaldi, M. Walker, E. Bartowsky, P. Grbin, and V. Jiranek. 2004.** Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 5715–31.

**McDaniel, M., L.A. Henderson, B.T. Watson, and D. Heatherbell. 1987.** Sensory Panel Training and Screening for Descriptive Analysis of the Aroma of Pinot Noir Wine Fermented by Several Strains of Malolactic Bacteria. *Journal of Sensory Studies* 2 (3): 149–67.

**Meilgaard, M.C. 1975.** Flavor Chemistry of Beer: Part II: Flavor and Threshold of 239 Aroma Volatiles. In *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.*, 12:151–68.

- Meunier, J.M., and E.W. Bott. 1979.** The Behavior of Different Aromas in Burgundy Wines in the Running of the Biological Acid Degradation. [Das Verhalten Verschiedener Aromastoffe in Burgunderweinen Im Verlauf Des Biologischen Saureabbaues]. *Food Chem. Microbiol. Technol* 6: 92.
- Moio, L., and P.X. Etievant. 1995.** Ethyl Anthranilate, Ethyl Cinnamate, 2,3-Dihydrocinnamate, and Methyl Anthranilate: Four Important Odorants Identified in Pinot Noir Wines of Burgundy. *American Journal of Enology and Viticulture* 46 (3): 392–98.
- Molina, A.M., V. Guadalupe, C. Varela, J.H. Swiegers, I.S. Pretorius, and E. Agosin. 2009.** Differential Synthesis of Fermentative Aroma Compounds of Two Related Commercial Wine Yeast Strains. *Food Chemistry* 117 (2): 189–95.
- Moreno, J.A., L. Zea, L. Moyano, and M. Medina. 2005.** Aroma Compounds as Markers of the Changes in Sherry Wines Subjected to Biological Ageing. *Food Control* 16 (4): 333–38.
- Moussaoui, K.A., and P. Varela. 2010.** Exploring Consumer Product Profiling Techniques and Their Linkage to a Quantitative Descriptive Analysis. *Food Quality and Preference* 21 (8): 1088–99.

## N

- Nagasawa, N., T. Bogaki, A. Iwamatsu, M. Hamachi, and C. Kumagai. 1998.** Cloning and Nucleotide Sequence of the Alcohol Acetyltransferase II Gene (ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62 (10): 1852–57.
- Naouri, P., P. Chagnaud, A. Arnaud, and P. Galzy. 1990.** Purification and Properties of a Malolactic Enzyme from *Leuconostoc oenos* ATCC 23278. *Journal of Basic Microbiology* 30 (8): 577–85.
- Nelson, R.R., T.E. Acree, C.Y. Lee, and R.M. Butts. 1977.** Methyl Anthranilate as an Aroma Constituent of American Wine. *Journal of Food Science* 42 (1): 57–59.
- Nestrud, M.A., and H.T. Lawless. 2008.** Perceptual Mapping of Citrus Juices Using Projective Mapping and Profiling Data from Culinary Professionals and Consumers. *Food Quality and Preference* 19 (4): 431–38.
- NF EN ISO 4120. 2007.** Analyse Sensorielle - Méthodologie - Essai Triangulaire. In *Analyse Sensorielle: Recueil, Normes, Agroalimentaire*. AFNOR.
- NF EN ISO 5492. 2009.** Analyse Sensorielle - Vocabulaire. In *Analyse Sensorielle: Recueil, Normes, Agroalimentaire*. AFNOR.
- NF EN ISO 8589. 2010.** Analyse Sensorielle - Directives Générales pour la Conception de Locaux Destinés à l'Analyse. In *Analyse Sensorielle: Recueil, Normes, Agroalimentaire*. AFNOR.
- NF ISO 8587. 2006.** Analyse Sensorielle - Méthodologie - Classement par Rangs. In *Analyse Sensorielle: Recueil, Normes, Agroalimentaire*. AFNOR.
- Nordström, K. 1962.** Formation of Ethyl Acetate in Fermentation with Brewer's Yeast. III. Participation of Coenzyme A. *J. Inst. Brew* 68: 398–407.
- Nykänen, L. 1986.** Formation and Occurrence of Flavor Compounds in Wine and Distilled Alcoholic Beverages. *American Journal of Enology and Viticulture* 37 (1): 84–96.

## O

- Ott, A., L.B. Fay, and A. Chaintreau. 1997.** Determination and Origin of the Aroma Impact Compounds of Yogurt Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (3): 850–58.

## P

- Pagès, J. 2003.** Direct Collection of Sensory Distances: Application to the Evaluation of Ten White Wines of the Loire Valley. *Sciences des Aliments* 23 (5-6): 679–88.

- Pagès, J. 2005.** Collection and Analysis of Perceived Product Inter-Distances Using Multiple Factor Analysis: Application to the Study of 10 White Wines from the Loire Valley. *Food Quality and Preference* 16 (7): 642–49.
- Palamand, S.R., G.D. Nelson, and W.A. Hardwick. 1970.** Some Vicinal Dicarboxyl Compounds in Beer and Their Influence on Beer Flavor. In *Tech. Quart. Master Brew. Assoc. Am.* 7: 111–15.
- Papadopoulou, D., and I.G. Roussis. 2008.** Inhibition of the Decrease of Volatile Esters and Terpenes during Storage of a White Wine and a Model Wine Medium by Glutathione and N-Acetylcysteine. *International Journal of Food Science and Technology* 43 (6): 1053–57.
- Parker, R. 2009.** *Guide Parker Des Vins de France*. Solar.
- Peinado, R.A., J.A. Moreno, D. Muñoz, M. Medina, and J. Moreno. 2004.** Gas Chromatographic Quantification of Major Volatile Compounds and Polyols in Wine by Direct Injection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (21): 6389–93.
- Perrin, L. 2008.** Contribution Méthodologique à l'Analyse Sensorielle du Vin. Thèse pour le doctorat de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Perrin, L., and J. Pagès. 2009.** Construction of a Product Space from the Ultra-Flash Profiling Method: Application to 10 Red Wines from the Loire Valley. *Journal of Sensory Studies* 24 (3): 372–95.
- Perrin, L., R. Symoneaux, I. Maître, C. Asselin, F. Jourjon, and J. Pagès. 2008.** Comparison of Three Sensory Methods for Use with the Napping® Procedure: Case of Ten Wines from Loire Valley. *Food Quality and Preference* 19 (1): 1–11.
- Pet'ka, J., J. Mocák, P. Farkaš, B. Balla, and M. Kováč. 2001.** Classification of Slovak Varietal White Wines by Volatile Compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81 (15): 1533–39.
- Peynaud, E. 1980.** *Le Goût Du Vin: Le Grand Livre de La Dégustation*. Dunod. Paris.
- Peynaud, E. 1981.** *Connaissance et Travail Du Vin*. Dunod. Paris.
- Peyrot des Gachons, C., T. Tominaga, and D. Dubourdieu. 2002.** Localization of S-Cysteine Conjugates in the Berry: Effect of Skin Contact on Aromatic Potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc Must. *American Journal of Enology and Viticulture* 53 (2): 144–46.
- Pilone, G.J., R.E. Kunkee, and A.D. Webb. 1966.** Chemical Characterization of Wines Fermented with Various Malo-Lactic Bacteria. *Applied Microbiology* 14 (4): 608–15.
- Pineau, B. 2007.** Contribution à l'Etude de l'Arôme Fruité Spécifique des Vins Rouges de *Vitis vinifera* L. Cv. Merlot Noir et Cabernet-Sauvignon. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Pineau, B., J.C. Barbe, C.V. Leeuwen, and D. Dubourdieu. 2010.** Olfactory Specificity of Red-and Black-Berry Fruit Aromas in Red Wines and Contribution to the Red Bordeaux Wine Concept. *Journal International des Sciences de La Vigne et Du Vin* 44 (1): 39–49.
- Pineau, B., J.C. Barbe, C. Van Leeuwen, and D. Dubourdieu. 2007.** Which Impact for  $\beta$ -Damascenone on Red Wines Aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (10): 4103–8.
- Pineau, B., J.C. Barbe, C. Van Leeuwen, and D. Dubourdieu. 2009.** “Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific ‘Red-’ and ‘Black-Berry’ Aromas in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (9): 3702–8.
- Pino, J.A., and Y. Febles. 2013.** Odour-Active Compounds in Banana Fruit Cv. Giant Cavendish. *Food Chemistry* 141 (2): 795–801.
- Piombino, P., S. Nicklaus, Y. Le Fur, L. Moio, and J.L. Le Quéré. 2003.** ‘Berry’ Aroma of Wine: Sensory and Olfactory Analysis. In *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century: Proceedings of the 10th Weurman Flavour Research Symposium*, Lavoisier, 702–5. Paris, France: Editions Tec & Doc.
- Plotto, A., K.W. Barnes, and K.L. Goodner. 2006.** Specific Anosmia Observed for  $\beta$ -Ionone, but Not for  $\alpha$ -Ionone: Significance for Flavor Research. *Journal of Food Science* 71 (5): S401–6.
- Pons, A., V. Lavigne, F. Eric, P. Darriet, and D. Dubourdieu. 2008.** Identification of Volatile Compounds Responsible for Prune Aroma in Prematurely Aged Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (13): 5285–90.
- Postel, W., and B. Meier. 1983.** The Behaviour of 2-Acetylactate, 2-Acetoxybutyrate, Diacetyl, 2,3-Pentandione and Acetoin during the Fermentation of the Grape Must. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 176 (2): 113–15.

- Pripis-Nicolau, L., G. De Revel, A. Bertrand, and A. Lonvaud-Funel. 2004.** Methionine Catabolism and Production of Volatile Sulphur Compounds by *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 96 (5): 1176–84.
- Pripis-Nicolau, L., G. De Revel, A. Bertrand, and A. Maujean. 2000.** Formation of Flavor Components by the Reaction of Amino Acid and Carbonyl Compounds in Mild Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (9): 3761–66.
- Pueyo, E., A. Martínez-Rodríguez, M.C. Polo, G. Santa-María, and B. Bartolomé. 1999.** Release of Lipids during Yeast Autolysis in a Model Wine System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (1): 116–22.

## R

- Radler, F. 1993.** Yeast-Metabolism of Organic Acids. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, 165–82. Chur, Switzerland: Fleet, G.H.
- Ramey, D., and C.S. Ough. 1980.** Volatile Ester Hydrolysis or Formation during Storage of Model Solutions of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 928–34.
- Rankine, B.C. 1963.** Nature, Origin and Prevention of Hydrogen Sulphide Aroma in Wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 14 (2): 79–91.
- Rankine, B.C. 1967.** Formation of Higher Alcohols by Wine Yeasts, and Relationship to Taste Thresholds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 18 (12): 583–89.
- Rankine, B.C. 1972.** Influence of Yeast Strain and Malo-Lactic Fermentation on Composition and Quality of Table Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 23 (4): 152–58.
- Rankine, B.C., J.C.M. Fornachon, and D.A. Bridson. 1969.** Diacetyl in Australian Dry Red Wines and Its Significance in Wine Quality. *Vitis* 8: 129–34.
- Rankine, B.C., and K.F. Pocock. 1969.** Beta-Phenethanol and N-Hexanol in Wines: Influence of Yeast Strain Grape Variety and Other Factors; and Taste Thresholds. *Vitis* 8: 23–37.
- Rapp, A., and H. Mandery. 1986.** Wine Aroma. *Experientia* 42 (8): 873–84.
- Rapp, A., and G. Versini. 1991.** Influence of Nitrogen Compounds in Grapes on Aroma Compounds of Wine. In *Proceeding of the International symposium on nitrogen in grapes and wines*, 156–64. Davis, CA: American Society for Enology and Viticulture: Rantz.
- Rauhut, D. 1993.** Yeasts - Production of Sulfur Compounds. In *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, 27–54. Chur, Switzerland: Fleet, G.H.
- Rauhut, D., and H. Kurbel. 1996.** Identification of Wine Aroma Defects Caused Bur Sulfur-Containing Metabolites of Yeasts.” In *Oenologie 95, 5ème Symposium International d'oenologie*, 515–19. Bordeaux, France.
- Rauhut, D., H. Kurbel, H.H. Dittrich, and M.K. Grossmann. 1996.** Properties and Differences of Commercial Yeast Strains with Respect to Their Formation of Sulfur Compounds. *Vitic. Enol. Sci.* 51: 187–92.
- Ribéreau-Gayon, P., and A. Bertrand. 1971.** Simultaneous Determination of Organic Acids, Polyalcohols and Sugars in Wine. Applications. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles* 273 (19): 1761–62.
- Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdiou, B. Donèche, and A. Lonvaud. 2012a.** *Traité d'Œnologie - Tome 1 - 6e Éd. - Microbiologie du Vin. Vinifications.* Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, and D. Dubourdiou. 2012b.** *Traité d'Œnologie - Tome 2 - 6e Éd. - Chimie du Vin. Stabilisation et Traitements.* Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., and E. Peynaud. 1964.** *Traité d'Œnologie.* Vol. 1. Béranger.
- Rigou, P., A. Triay, and A. Razungles. 2014.** Influence of Volatile Thiols in the Development of Blackcurrant Aroma in Red Wine. *Food Chemistry* 142: 242–48.
- Risvik, E., J.A. McEwan, J.S. Colwill, R. Rogers, and D.H. Lyon. 1994.** Projective Mapping: A Tool for Sensory Analysis and Consumer Research. *Food Quality and Preference* 5 (4): 263–69.
- Risvik, E., J.A. McEwan, and M. Rødbotten. 1997.** Evaluation of Sensory Profiling and Projective Mapping Data. *Food Quality and Preference* 8 (1): 63–71.

- Rocha, S., V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo, and M.A. Coimbra. 2001.** Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11): 5142–51.
- Roussis, I.G., I. Lambropoulos, and D. Papadopoulou. 2005.** Inhibition of the Decline of Volatile Esters and Terpenols during Oxidative Storage of Muscat-White and Xinomavro-Red Wine by Caffeic Acid and N-Acetyl-Cysteine. *Food Chemistry* 93 (3): 485–92.
- Ruiz, P., P.M. Izquierdo, S. Seseña, E. García, and M.L. Palop. 2012.** Malolactic Fermentation and Secondary Metabolite Production by *Oenococcus oeni* Strains in Low pH Wines. *Journal of Food Science* 77 (10): M579–85.

## S

- Saerens, S.M.G., F.R. Delvaux, K.J. Verstrepen, and J.M. Thevelein. 2010.** Production and Biological Function of Volatile Esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology* 3 (2): 165–77.
- Saerens, S.M.G., F. Delvaux, K.J. Verstrepen, P. Van Dijck, J.M. Thevelein, and F.R. Delvaux. 2008.** Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (2): 454–61.
- Saerens, S.M.G., K.J. Verstrepen, S.D.M. Van Laere, A.R.D. Voet, P. Van Dijck, F.R. Delvaux, and J.M. Thevelein. 2006.** The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 Genes Encode Novel Enzymes with Medium-Chain Fatty Acid Ethyl Ester Synthesis and Hydrolysis Capacity. *Journal of Biological Chemistry* 281 (7): 4446–56.
- Sarrazin, E., D. Dubourdieu, and P. Darriet. 2007a.** Characterization of Key-Aroma Compounds of Botrytized Wines, Influence of Grape Botrytization. *Food Chemistry* 103 (2): 536–45.
- Sarrazin, E., S. Shinkaruk, M. Pons, C. Thibon, B. Bennetau, and P. Darriet. 2010.** Elucidation of the 1,3-Sulfanylalcohol Oxidation Mechanism: An Unusual Identification of the Disulfide of 3-Sulfanylhexanol in Sauternes Botrytized Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (19): 10606–13.
- Sarrazin, E., S. Shinkaruk, T. Tominaga, B. Bennetau, E. Frérot, and D. Dubourdieu. 2007b.** Odorous Impact of Volatile Thiols on the Aroma of Young Botrytized Sweet Wines: Identification and Quantification of New Sulfanyl Alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (4): 1437–44.
- Sauvageot, F., and P. Vivier. 1997.** Effects of Malolactic Fermentation on Sensory Properties of Four Burgundy Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 48 (2): 187–92.
- Schneider, R., F. Charrier, A. Razungles, and R. Baumes. 2006.** Evidence for an Alternative Biogenetic Pathway Leading to 3-Mercaptohexanol and 4-Mercapto-4-Methylpentan-2-One in Wines. *Analytica Chimica Acta* 563 (1-2 SPEC. ISS.): 58–64.
- Schneider, R., Y. Kotseridis, J.L. Ray, C. Augier, and R. Baumes. 2003.** Quantitative Determination of Sulfur-Containing Wine Odorants at Sub Parts per Billion Levels. 2. Development and Application of a Stable Isotope Dilution Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (11): 3243–48.
- Schneider, R., A. Razungles, C. Augier, and R. Baumes. 2001.** Monoterpenic and Norisoprenoid Glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. Cv. Melon B. as Precursors of Odortants in Muscadet Wines. In *ExTech 2005: 7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*, 936 (1-2):145–57.
- Schreier, P., and F. Drawert. 1974.** Investigation of volatile components in wine by gaschromatography and mass-spectrometry - I. Nonpolar Compounds of Wine-Flavour. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 154 (5): 273–78.
- Schreier, P., F. Drawert, and M. Schmid. 1978.** Changes in the Composition of Neutral Volatile Components during the Production of Apple Brandy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29 (8): 728–36.
- Schreier, P., F. Drawert, and F. Winkler. 1979.** Composition of Neutral Volatile Constituents in Grape Brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27 (2): 365–72.
- Schulthess, D., and L. Ettlinger. 1978.** Influence of the Concentration of Branched Chain Amino Acids on the Formation of Fusuel Alcohols. *Journal of the Institute of Brewing* 84 (4): 240–43.
- Segurel, M.A., R.L. Baumes, D. Langlois, C. Riou, and A.J. Razungles. 2009.** Role of Glycosidic Aroma Precursors on the Odorant Profiles of Grenache Noir and Syrah Wines from the Rhone Valley. Part 2:

- Characterisation of Derived Compounds. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* 43 (4): 213–23.
- Segurel, M.A., A.J. Razungles, C. Riou, M. Salles, and R.L. Baumes. 2004.** Contribution of Dimethyl Sulfide to the Aroma of Syrah and Grenache Noir Wines and Estimation of Its Potential in Grapes of These Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (23): 7084–93.
- Segurel, M.A., A.J. Razungles, C. Riou, M.G.L. Trigueiro, and R.L. Baumes. 2005.** Ability of Possible DMS Precursors to Release DMS during Wine Aging and in the Conditions of Heat-Alkaline Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (7): 2637–45.
- Serratos, M.P., A. Marquez, L. Moyano, L. Zea, and J. Merida. 2014.** Chemical and Morphological Characterization of Chardonnay and Gewürztraminer Grapes and Changes during Chamber-Drying under Controlled Conditions. *Food Chemistry* 159: 128–36.
- Shimazu, Y., M. Uehara, and M. Watanabe. 1985.** Transformation of Citric Acid to Acetic Acid, Acetoin and Diacetyl by Wine Making Lactic Acid Bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (7): 2147–57.
- Shinohara, T., T.I. Shimizu, and Y. Shimazu. 1979.** Esterification Rates of Main Organic Acids in Wines. *Agricultural and Biological Chemistry* 43 (11): 2351–58.
- Siebert, T.E., C. Wood, G.M. Elsey, and A.P. Pollnitz. 2008.** Determination of Rotundone, the Pepper Aroma Impact Compound, in Grapes and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (10): 3745–48.
- Simpson, R.F., and G.C. Miller. 1984.** Aroma Composition of Chardonnay Wines. *Vitis* 23: 143–58.
- Spettoli, P., M.P. Nuti, and A. Zamorani. 1984.** Properties of Malolactic Activity Purified from *Leuconostoc oenos* ML34 by Affinity Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* 48 (4): 900–901.
- Spiropoulos, A., J. Tanaka, I. Flerianos, and L.F. Bisson. 2000.** Characterization of Hydrogen Sulfide Formation in Commercial and Natural Wine Isolates of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (3): 233–48.
- Stamatopoulos, P., E. Frérot, S. Tempère, A. Pons, and P. Darriet. 2014.** Identification of a New Lactone Contributing to Override Orange Aroma in Bordeaux Dessert Wines via Perceptual Interaction Phenomena. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (12): 2469–78.
- Stone, H., and J.L. Sidel. 1998.** Quantitative Descriptive Analysis: Developments, Applications, and the Future. *Food Technology* 52 (8): 48–52.
- Stone, H., J.L. Sidel, S. Oliviers, A. Woosley, and R.C. Singleton. 1974.** Sensory Evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. *Food Technology*, 24–28.
- Strauss, C.R., B. Wilson, R. Anderson, and P.J. Williams. 1987.** Development of Precursors of C13 Nor-Isoprenoid Flavorants in Riesling Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 38 (1): 23–27.
- Šuklje, K., G. Antalick, Z. Coetzee, L.M. Schmidtke, H. Baša Česnik, J. Brandt, W.J. du Toit, K. Lisjak, and A. Deloire. 2014.** Effect of Leaf Removal and Ultraviolet Radiation on the Composition and Sensory Perception of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc Wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20 (2): 223–33.
- Sumby, K.M., P.R. Grbin, and V. Jiranek. 2010.** Microbial Modulation of Aromatic Esters in Wine: Current Knowledge and Future Prospects. *Food Chemistry* 121 (1): 1–16.
- Sumby, K.M., P.R. Grbin, and V. Jiranek. 2013a.** Characterization of EstCOo8 and EstC34, Intracellular Esterases, from the Wine-Associated Lactic Acid Bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology* 114 (2): 413–22.
- Sumby, K.M., V. Jiranek, and P.R. Grbin. 2013b.** Ester Synthesis and Hydrolysis in an Aqueous Environment, and Strain Specific Changes during Malolactic Fermentation in Wine with *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry* 141 (3): 1673–80.
- Sumby, K.M., A.H. Matthews, P.R. Grbin, and V. Jiranek. 2009.** Cloning and Characterization of an Intracellular Esterase from the Wine-Associated Lactic Acid Bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (21): 6729–35.
- Sun, S.Y., C.Y. Che, T.F. Sun, Z.Z. Lv, S.X. He, H.N. Gu, W.J. Shen, D.C. Chi, and Y. Gao. 2013.** Evaluation of Sequential Inoculation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* Strains on the Chemical and Aromatic Profiles of Cherry Wines. *Food Chemistry* 138 (4): 2233–41.

## T

- Takush, D.G., and J.P. Osborne. 2012.** Impact of Yeast on the Aroma and Flavour of Oregon Pinot Noir Wine: Yeast and Wine Aroma. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18 (2): 131–37.
- Tat, L., P. Comuzzo, F. Battistutta, and R. Zironi. 2007.** Sweet-like off-Flavor in Aglianico Del Vulture Wine: Ethyl Phenylacetate as the Mainly Involved Compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (13): 5205–12.
- Tempere, S., E. Cuzange, J. Malak, J.C. Bougeant, G. De Revel, and G. Sicard. 2011.** The Training Level of Experts Influences Their Detection Thresholds for Key Wine Compounds. *Chemosensory Perception* 4 (3): 99–115.
- Tesnières, C., M.Z. Nicol, C. Romien, and C. Flanzky. 1991.** Effect of Increasing Exogenous Ethanol on the Anaerobic Metabolism of Grape Berries. *Sciences Des Aliments* 11: 111–24.
- Thibon, C., S. Shinkaruk, T. Tominaga, B. Bennetau, and D. Dubourdieu. 2008.** Analysis of the Diastereoisomers of the Cysteinylated Aroma Precursor of 3-Sulfanylhexanol in *Vitis vinifera* Grape Must by Gas Chromatography Coupled with Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1183 (1-2): 150–57.
- Tiwari, R., R. Köffel, and R. Schneiter. 2007.** An Acetylation/deacetylation Cycle Controls the Export of Sterols and Steroids from *S. cerevisiae*. *EMBO Journal* 26 (24): 5109–19.
- Tominaga, T., L. Blanchard, P. Darriet, and D. Dubourdieu. 2000.** A Powerful Aromatic Volatile Thiol, 2-Furanmethanethiol, Exhibiting Roast Coffee Aroma in Wines Made from Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5): 1799–1802.
- Tominaga, T., A. Furrer, R. Henry, and D. Dubourdieu. 1998.** Identification of New Volatile Thiols in the Aroma of *Vitis vinifera* L. Var. Sauvignon Blanc Wines. *Flavour and Fragrance Journal* 13 (3): 159–62.

## U

- Ugliano, M., and L. Moio. 2005.** Changes in the Concentration of Yeast-Derived Volatile Compounds of Red Wine during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (26): 10134–39.
- Ugliano, M., and L. Moio. 2008.** Free and Hydrolytically Released Volatile Compounds of *Vitis vinifera* L. Cv. Fiano Grapes as Odour-Active Constituents of Fiano Wine. *Analytica Chimica Acta* 621 (1): 79–85.
- Ugliano, M., B. Travis, I.L. Francis, and P.A. Henschke. 2010.** Volatile Composition and Sensory Properties of Shiraz Wines as Affected by Nitrogen Supplementation and Yeast Species: Rationalizing Nitrogen Modulation of Wine Aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (23): 12417–25.
- Umamo, K., Y. Hagi, K. Nakahara, A. Shoji, and T. Shibamoto. 1992.** Volatile Constituents of Green and Ripened Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (4): 599–603.

## V

- Vallet, A. 2007.** Etude de la Synthèse des Composés Soufrés Volatils Issus du Catabolisme de la Méthionine par *Oenococcus oeni*. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Van Den Ouweland, G.A.M., and H.G. Peer. 1975.** Components Contributing to Beef Flavor. Volatile Compounds Produced by the Reaction of 4-Hydroxy-5-Methyl-3(2H)-Furanone and Its Thio Analog with Hydrogen Sulfide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23 (3): 501–5.
- Versini, G., A. Dalla Serra, and R. Pelligrini. 1984.** Aspects of Wine Aroma Attributable to Carbonic Maceration. *Food Sci. Tech. Abstracts* 20: 871–78.
- Verstrepen, K.J., G. Derdelinckx, J.P. Dufour, J. Winderickx, I.S. Pretorius, J.M. Thevelein, and F.R. Delvaux. 2003.** The *Saccharomyces cerevisiae* Alcohol Acetyl Transferase Gene ATF1 Is a Target of the cAMP/PKA and FGM Nutrient-Signalling Pathways. *FEMS Yeast Research* 4 (3): 285–96.

- Vestner, J., S. Malherbe, M. Du Toit, H.H. Nieuwoudt, A. Mostafa, T. Górecki, A.G.J. Tredoux, and A. de Villiers. 2011.** Investigation of the Volatile Composition of Pinotage Wines Fermented with Different Malolactic Starter Cultures Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC×GC-TOF-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (24): 12732–44.
- Vilanova, M., I. Masneuf-Pomarède, and D. Dubourdieu. 2005.** Influence of *Saccharomyces cerevisiae* Strains on General Composition and Sensorial Properties of White Wines Made from *Vitis vinifera* Cv. Albariño. *Food Technology and Biotechnology* 43 (1): 79–83.
- Villanova, M., and C. Martinez. 2007.** First Study of Determination of Aromatic Compounds of Red Wine from *Vitis vinifera* Cv. Castanal Grown in Galicia (NW Spain). *Eur Food Res Technol* 224: 431–36.

## W

- Walradt, J.P., A.O. Pittet, T.E. Kinlin, R. Muralidhara, and A. Sanderson. 1971.** Volatile Components of Roasted Peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19 (5): 972–79.
- Wanikawa, A., K. Hosoi, and T. Kato. 2000.** Conversion of Unsaturated Fatty Acids to Precursors of  $\gamma$ -Lactones by Lactic Acid Bacteria during the Production of Malt Whisky. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 58 (2): 51–56.
- Webb, A.D., and R.E. Kepner. 1962.** The Aroma of Flor Sherry. *American Journal of Enology and Viticulture* 13 (1): 1–14.

## Y

- Yoshimoto, H., D. Fujiwara, T. Momma, C. Ito, H. Sone, Y. Kaneko, and Y. Tamai. 1998.** Characterization of the ATF1 and Lg-ATF1 Genes Encoding Alcohol Acetyltransferases in the Bottom Fermenting Yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86 (1): 15–20.
- Yoshimoto, H., T. Fukushige, T. Yonezawa, and H. Sone. 2002.** Genetic and Physiological Analysis of Branched-Chain Alcohols and Isoamyl Acetate Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (4-5): 501–8.

## Z

- Zea, L., L. Moyano, J. Moreno, B. Cortes, and M. Medina. 2001.** Discrimination of the Aroma Fraction of Sherry Wines Obtained by Oxidative and Biological Ageing. *Food Chemistry* 75 (1): 79–84.
- Zeeman, W., J.P. Snyman, and C.J. van Wyck. 1980.** The Influence of Yeast Strain and Malolactic Fermentation on Some Volatile Bouquet Substances and on Quality of Table Wines. In *Grape and Wine Centennial Symposium*. Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis.
- Zimmer, A. 2013.** Etude du Déterminisme Génétique de la Phase de Latence chez *Saccharomyces cerevisiae* en Conditions Œnologiques. Impact des Mécanismes de Résistance au SO<sub>2</sub>. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux 2.
- Zoecklein, B.W., K.C. Fugelsang, B.H. Gump, and F.S. Nury. 1990.** Nitrogenous Compounds. In *Production Wine Analysis*, Van Nostrand Reinhold, 330. New-York.
- Zott, K., O. Claisse, P. Lucas, J. Coulon, A. Lonvaud-Funel, and I. Masneuf-Pomarede. 2010.** Characterization of the Yeast Ecosystem in Grape Must and Wine Using Real-Time PCR. *Food Microbiology* 27 (5): 559–67.

## **ANNEXES**

# ANNEXE 1 : Méthodes expérimentales

## Matériels et méthodes de la première partie

### Chapitre 1 : Etude de l'effet couple levures/bactéries

#### Etude de l'influence de six couples levures/bactéries lactiques sur la composition chimique d'un vin rouge

##### Méthodes d'analyses des principales molécules volatiles

##### *Analyses par injection directe et par espace de tête*

Les analyses GC par injection directe ou par espace de tête sont des techniques rapides qui ne nécessitent que d'un faible volume d'échantillon. Elles sont utilisées pour quantifier les composés présents en grande quantité (injection directe) ou très volatils (technique de l'espace de tête).

#### - Les alcools supérieurs par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme.

La méthode officielle J.O. des Communautés Européennes (29 décembre 2000) permet le dosage des principaux alcools supérieurs : propan-1-ol, 2-méthylpropan-1-ol, butan-1-ol et les alcools isoamyliques mais également la détection du méthanol, de l'acétate d'éthyle et de l'éthanal.

50 µL d'une solution d'étalon interne (4-méthylpentan-2-ol à 14 g/L en solution hydroalcoolique à 50 %) sont ajoutés à 5 mL de vin et l'ensemble est homogénéisé avant injection directe.

Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 7**.

**Tableau 7.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des alcools supérieurs.

Principe :	Injection directe	Gaz vecteur :	Hydrogène 5.5
Appareil :	HP 5890	Débit :	2 mL/min
Colonne :	CPWAX 57 CB 50 m x 0,25 mm Epaisseur de film 0,2 µm	Programmation de température :	40 °C pendant 5 min 4 °C/min jusqu'à 200 °C
Injecteur :	Mode : <i>split</i> rapport de division 1/60 Volume injecté : 0,4 µL Température : 200 °C	Détecteur :	Ionisation de flamme (FID) Température : 240 °C

#### - Les composés acétoïniques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme.

Cette méthode développée et validée au laboratoire (de Revel, 1992) permet le dosage de l'acétoïne, de l'acétol et des butan-2,3-diol D(-) et méso.

50  $\mu\text{L}$  d'une solution d'étalon interne (butan-1,4-diol à 1 g/L en solution hydroalcoolique, 40 % vol) sont ajoutés à 1 mL de vin. Le tout est dilué avec 2 mL de méthanol. Les conditions expérimentales sont présentées le **Tableau 8**.

**Tableau 8.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des composés acétoïniques.

Principe :	Gaz vecteur :
Injection directe	Hydrogène 5.5
Appareil :	Débit : 2 mL/min
Agilent 6890N	Programmation de température :
Colonne :	80 °C pendant 5 min
BP21	3 °C/min jusqu'à 200 °C maintenu 15 min
50 m x 0,32 mm	Détecteur :
Épaisseur de film 0,25 $\mu\text{m}$	Ionisation de flamme (FID)
Injecteur :	Température : 240 °C
Mode : <i>split</i> rapport de division 1/60	
Volume injecté : 0,5 $\mu\text{L}$	
Température : 200 °C	

#### - Les composés soufrés légers par chromatographie en phase gazeuse couplée à la photométrie de flamme.

Les composés soufrés dits « légers » ont un point d'ébullition inférieur à 90 °C. La méthode de dosage développée et validée par (Anocibar Beloqui, 1998) permet la quantification du sulfure d'hydrogène, du méthane-thiol, de l'éthane-thiol, du diméthyl-disulfure, du diméthyl-sulfure, du disulfure de carbone. Parmi tous les composés soufrés, deux molécules ont été quantifiées dans le cadre de cette étude :  $\text{H}_2\text{S}$  et DMS.

Dans un flacon d'une capacité de 125 mL, 100 mL de vin sont additionnés de 10  $\mu\text{L}$  de solution d'étalon interne (thiophène à 300 mg/L en solution alcoolique). Le flacon est fermé hermétiquement par un bouchon perforable et serti avec une capsule métallique. Après stabilisation pendant 24 heures à une température de 22 °C, il est injecté 1 mL du volume gazeux. Les conditions expérimentales sont résumées le **Tableau 9**.

**Tableau 9.** Conditions expérimentales de la HS-GC-FPD pour le dosage des composés soufrés.

Principe :	Gaz vecteur :
Injection par espace de tête	Hydrogène 5.5
Appareil :	Débit : 2 mL/min
HP5890	Programmation de température :
Colonne :	32 °C pendant 1 min
HP5	10 °C/min jusqu'à 80 °C
30 m x 0,25 mm	20 °C/min jusqu'à 180 °C
Épaisseur de film 0,25 $\mu\text{m}$	Détecteur :
Injecteur :	Photométrie de flamme (FPD)
Volume injecté : 1 mL	Température : 200 °C
Température : 70 °C	

#### *Analyses des molécules volatiles par extraction liquide/liquide*

L'extraction liquide-liquide est une opération qui permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux phases liquides non-miscibles. Elle est utilisée pour des composés présents en concentration plus faible et dont la volatilité est moins importante que ceux décrits précédemment.

**- Les acides volatils par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme.**

Ce dosage permet, entre autre, la détection de l'acide isobutyrique ( $iC_4$ ), de l'acide butyrique ( $C_4$ ), de l'acide isovalériannique ( $iC_5$ ), de l'acide hexanoïque ( $C_6$ ), de l'acide octanoïque ( $C_8$ ), de l'acide décanoïque ( $C_{10}$ ), de l'acide dodécanoïque ( $C_{12}$ ) (Bertrand, 1975).

200  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne (octan-3-ol à 400 mg/L en solution hydroalcoolique, 40% vol) sont ajoutés à 50 mL de vin avec 0,3 mL d' $H_3PO_4$  dilué au 1/3 pour libérer les acides de leurs sels. L'échantillon est successivement extrait par 4, 2 et 2 mL d'un mélange éther-isohexane (1 : 1, v/v) pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases organiques et aqueuses sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les phases organiques sont recueillies dans un pilulier de 20 mL et l'émulsion est cassée à l'aide d'un barreau magnétique. Les quelques gouttes de solution aqueuse encore présentes sont enlevées avec soin. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 10**.

**Tableau 10.** Conditions expérimentales de la GC-FID pour le dosage des acides volatils.

Principe :	Gaz vecteur :
Extraction liquide-liquide	Hydrogène N50
Appareil :	Débit : 2 mL/min
HP 5890	Programmation de température :
Colonne :	40 °C pendant 5 min
BP21	3 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu 30 min
50 m x 0,32 mm	Détecteur :
Épaisseur de film 0,25 $\mu$ m	Ionisation de flamme (FID)
Injecteur :	Température : 250 °C
Mode : <i>splitless/split</i>	
Division : 30 mL/min	
Temps sans division : 0,5 min	
Température : 200 °C	
volume injecté : 1 $\mu$ L	

**- Les composés dicarboxylés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.**

La méthode utilisée permettant le dosage du diacétyle, du glyoxal, du méthylglyoxal et de la pentan-2,3-dione a été développée et validée par de Revel *et al.* (2000).

100  $\mu$ L d'une solution d'étalon interne (hexan-2,3-dione à 3,80 g/L en solution hydroalcoolique, 50 % vol) sont ajoutés à 50 mL de vin et 5 mL de solution aqueuse de 1,2-diaminobenzène à 6,5 g/L (agent de dérivatisation). Le pH est ajusté à 8 avec de la soude (10M). Après 3 heures à 60 °C, le mélange est acidifié à pH 2 avec une solution d'acide sulfurique 2M, puis extrait 2 fois avec 5 mL de dichlorométhane pendant 5 min. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 11**.

Le **Tableau 12** présente les ions utilisés pour la détection des différents composés dicarboxylés nous intéressant.

**Tableau 11.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour le dosage des composés dicarboxylés.

Principe :	Extraction liquide-liquide après dérivation	Gaz vecteur :	Hélium N55
Appareil :	Agilent 6890N	Débit :	1,4 mL/min
Colonne :	HP5 30 m x 0,25 mm Epaisseur de film 0,25 µm	Programmation de température :	60 °C pendant 1 min 2 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu pendant 20 min
Injecteur :	Mode : <i>splitless</i> (30 s) Volume injecté : 2 µL Température : 250 °C	Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : Agilent 5973 <i>inert</i> Energie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> ) Quantification avec les ions totaux sélectionnés

**Tableau 12.** Ions spécifiques utilisés pour la détection des composés dicarboxylés.

Composés	Ions (m/Z)
Glyoxal	130, 103, 76
Méthylglyoxal	144, 117, 76, 103
Diacétyl	158, 117, 76
Pentan-2,4-dione	171, 130
Hexan-2,3-dione (EI)	158, 171, 117, 143

#### - Les esters hydroxylés et autres composés polaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Cette méthode a été adaptée et validée par Antalick (2010). Les composés aromatiques du vin dits "polaires" correspondent à des composés dont le coefficient de partage octanol/eau est faible (c'est à dire log p inférieur à 1) ou négatif. Il s'agit du linalol, de certains acides gras branchés (acide isobutyrique, acide 2-méthylbutyrique et acide isovalérique) ; et d'esters polaires (lactate d'éthyle, succinate de diéthyle, succinate de monoéthyle, 3-hydroxybutyrate d'éthyle, 2-hydroxyhexanoate d'éthyle, 6-hydroxyhexanoate d'éthyle, leucate d'éthyle et frambinone).

10 µL d'une solution d'étalon interne (2-hydroxyisobutyrate d'éthyle à 0,96 g/L, en solution alcoolique) sont ajoutés à 50 mL de vin. Le mélange est extrait successivement avec 4, 2 et 2 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases, organiques et aqueuses, sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les trois phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 20 mL et l'émulsion est cassée à l'aide d'un barreau magnétique tournant lentement. Les traces d'eau de la phase organique sont éliminées à l'aide de sulfate de sodium anhydre. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 13**. Le **Tableau 14** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés aromatiques nous intéressant.

**Tableau 13.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour le dosage des composés polaires.

Principe :	Extraction liquide-liquide	Gaz vecteur :	Hélium N55
Appareil :	HP 5890	Débit :	2 mL/min
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Épaisseur de film 0,25 µm	Programmation de température :	60 °C pendant 5 min 3 °C/min jusqu'à 200 °C maintenu pendant 50 min
Injecteur :	Mode : <i>splitless</i> (45 s) Volume injecté : 1 µL Température : 250 °C	Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : HP 5972 Énergie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

**Tableau 14.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des composés polaires.

Composés	Abréviations	Ions (m/Z)
Acide isobutyrique	iC <sub>4</sub>	<b>73</b> , 43,88
Acide 2-méthylbutyrique	2mC <sub>4</sub>	<b>60</b> , 87
Acide isovalérique	iC <sub>5</sub>	<b>74</b> , 87
Lactate d'éthyle	LacC <sub>2</sub>	<b>45</b> , 75
Succinate de diéthyle	SDE	<b>101</b> , 128
Succinate de monoéthyle	SME	<b>101</b> , 129
3-hydroxybutyrate d'éthyle	3OHC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>87</b> , 71, 88
2-hydroxyhexanoate d'éthyle	2OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	<b>87</b>
6-hydroxyhexanoate d'éthyle	6OHC <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	<b>88</b> , 97, 101, 115
Leucate d'éthyle	LeuC <sub>2</sub>	<b>87</b>
Frambinone	Framb	<b>107</b>
2-hydroxyisobutyrate d'éthyle	EI	<b>59</b>

### *Analyses par microextraction sur phase solide*

L'extraction liquide-liquide est une technique qui demande du temps, un volume d'échantillon important et surtout de grandes quantités de solvant de haute pureté. La microextraction en phase solide est une méthode d'extraction de molécules organiques sans solvant, plus facile à automatiser. Les composés sont extraits par adsorption sur une fibre ou un barreau de silice fondue revêtue d'un polymère qui sera soit introduite directement dans l'échantillon, soit exposée à l'espace de tête.

#### **- Les C<sub>13</sub>-norisoprénoides et lactones par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.**

Cette méthode, développée et validée par Antalick (2010) permet le dosage de six lactones :  $\gamma$ -octalactone,  $\gamma$ -nonalactone,  $\gamma$ -décalactone,  $\delta$ -décalactone,  $\gamma$ -undécalactone,  $\gamma$ -dodécalactone et de quatre norisoprénoides :  $\beta$ -damascone,  $\beta$ -damascénone,  $\alpha$ -ionone et  $\beta$ -ionone.

25 µL d'une solution d'étalon interne (cinnamate d'éthyle-*d*<sub>5</sub> à 1,74 g/L en solution alcoolique) sont ajoutés à 25 mL de vin. Après homogénéisation, un volume de 20 mL d'échantillon est prélevé et transféré dans un pilulier de 20 mL. Le barreau magnétique Twister® de 126 µL de volume de phase stationnaire est placé dans le pilulier pour agitation à 900 tr/min pendant 60 minutes. Le barreau est ensuite rincé à l'eau milliQ, séché sur papier absorbant et placé dans le tube de désorption. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les

conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 15**. Le **Tableau 16** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés aromatiques nous intéressant.

**Tableau 15.** Conditions expérimentales de la SBSE-GC-MS pour le dosage des C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes et lactones.

Principe :	Microextraction sur phase solide, SBSE	Gaz vecteur :	Hélium N55
Appareil :	HP 6890	Débit :	2 mL/min
Colonne :	BP21	Programmation de température :	60 °C maintenu 6 min
	50 m x 0,32 mm		6 °C/min jusqu'à 164 °C
	Epaisseur de film 0,25 µm		1 °C/min jusqu'à 190 °C
Injecteur (Gerstel) :			4 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu 20 min
TDS :		Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique
	Température : 50 °C puis 60 °C/min jusqu'à 280 °C maintenu 10 min		Appareil : HP 5972
	Cryolocalisation des composés dans le CIS à -100 °C		Energie d'ionisation : 70 eV
	Ligne de transfert TDS/CIS à 300 °C		Température : 280 °C
	Mode : <i>splitless</i>		Détection en mode SIM
CIS :			
	Température : 12 °C/min jusqu'à 290 °C maintenu 5 min		
GC :			
	Mode <i>solvent vent</i> (45 s)		

**Tableau 16.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des C<sub>13</sub>-norisoprénoïdes et lactones.

Composés	Abréviations	Ions (m/Z)
γ-octalactone	γ-C8	<b>85</b> , 100
γ-nonolactone	γ-C9	<b>85</b> , 99
γ-décalactone	γ-C10	<b>85</b> , 128
δ-décalactone	δ-C10	<b>99</b> , 70, 114
γ-undécalactone	γ-C11	<b>85</b> , 128
γ-dodécalactone	γ-C12	<b>85</b> , 100, 128
β-damascone	β-dam	<b>192</b> , 123, 177
β-damascénone	β-done	<b>190</b> , 121, 69
α-ionone	α-i	<b>136</b> , 121, 93
β-ionone	β-i	<b>177</b> , 192
cinnamate d'éthyle-d <sub>5</sub>	EI	<b>181</b> , 131

#### - Les esters apolaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

La méthode (Antalick *et al.*, 2010) permet la quantification de 32 esters, listés dans le **Tableau 18**.

Pour ce dosage, quatre étalons internes en solution alcoolique sont utilisés : butyrate d'éthyle-d<sub>5</sub> (187 mg/L), hexanoate d'éthyle-d<sub>5</sub> (271 mg/L), octanoate d'éthyle-d<sub>5</sub> (262 mg/L), cinnamate d'éthyle-d<sub>5</sub> (174 mg/L). 20 µL de la solution d'étalons internes sont ajoutés à 25 mL de vin. Le mélange est homogénéisé puis un prélèvement de 10 mL est placé dans un vial SPME préalablement rempli de 3,5 g de NaCl. Le vial est serti avec une capsule métallique recouverte d'un septum en silicone puis agité quelques secondes pour homogénéiser son contenu. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 17**.

Le **Tableau 18** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés aromatiques nous intéressant.

**Tableau 17.** Conditions expérimentales de la HS-SPME-GC-MS pour le dosage des esters apolaires.

Principe :	Microextraction sur phase solide, HS-SPME	Gaz vecteur :	Hélium N55
Appareil :	HP 5890	Débit :	2 mL/min
Colonne :	BP21 50 m x 0,32 mm Epaisseur de film 0,25 µm	Programmation de température :	40 °C maintenu 5 min 5 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu 30 min
Injecteur :	Paramètres d'adsorption : Fibre en PDMS (polydiméthylsiloxane) Epaisseur de film : 100 µm Température d'adsorption : 40 °C pendant 30 min Vitesse d'agitation : 500 tr/min Paramètres de désorption : Température injecteur : 250 °C Désorption pendant 15 min Mode <i>splitless</i> (45 s)	Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique Appareil : HP 5972 Energie d'ionisation : 70 eV Température : 280 °C Détection en mode SIM

**Tableau 18.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des esters apolaires.

Composés	Abréviations	Ions (m/Z)
Propionate d'éthyle	C <sub>3</sub> C <sub>2</sub>	<b>102/57/75</b>
Isobutyrate d'éthyle	iC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>116/88/71</b>
Acétate de propyle	C <sub>2</sub> C <sub>3</sub>	<b>61/43</b>
Butyrate de méthyle	C <sub>4</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87/71</b>
Acétate d'isobutyle	C <sub>2</sub> iC <sub>4</sub>	<b>56/43</b>
Butyrate d'éthyle	C <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/71/60</b>
2-méthylbutyrate d'éthyle	2mC <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	<b>102/57/85</b>
Isovalérate d'éthyle	iC <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/85/57</b>
Acétate de butyle	C <sub>2</sub> C <sub>4</sub>	<b>56/43</b>
Acétate d'isoamyle	C <sub>2</sub> iC <sub>5</sub>	<b>70/55/43</b>
Valérate d'éthyle	C <sub>5</sub> C <sub>2</sub>	<b>85/88/101</b>
Hexanoate de méthyle	C <sub>6</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87/99</b>
Hexanoate d'éthyle	C <sub>6</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/99/60</b>
Butyrate d'isoamyle	C <sub>4</sub> iC <sub>5</sub>	<b>71/70/55</b>
Acétate d'hexyle	C <sub>2</sub> C <sub>6</sub>	<b>56/43</b>
Heptanoate d'éthyle	C <sub>7</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
<i>Trans</i> -2-hexénoate d'éthyle	HexC <sub>2</sub>	<b>99/97/55</b>
Hexanoate d'isobutyle	C <sub>6</sub> iC <sub>4</sub>	<b>99/56/71</b>
Octanoate de méthyle	C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87/127</b>
Octanoate d'éthyle	C <sub>8</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101/127</b>
Hexanoate d'isoamyle	C <sub>6</sub> iC <sub>5</sub>	<b>99/70</b>
Acétate d'octyle	C <sub>2</sub> C <sub>8</sub>	<b>56/43</b>
Nonanoate d'éthyle	C <sub>9</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
Décanoate de méthyle	C <sub>10</sub> C <sub>1</sub>	<b>74/87</b>
Décanoate d'éthyle	C <sub>10</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
Octanoate d'isoamyle	C <sub>8</sub> iC <sub>5</sub>	<b>127/70</b>
<i>Trans</i> -géranate de méthyle	gerC <sub>1</sub>	<b>114/69</b>
Phénylacétate d'éthyle	PhC <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	<b>91/105</b>
Acétate de 2-phényléthyle	C <sub>2</sub> PhC <sub>2</sub>	<b>104/91/43</b>
Dodécanoate d'éthyle	C <sub>12</sub> C <sub>2</sub>	<b>88/101</b>
Dihydrocinnamate d'éthyle	dhCinC <sub>2</sub>	<b>104/91/178</b>
Cinnamate d'éthyle	CinC <sub>2</sub>	<b>176/131</b>
Butyrate d'éthyle-d <sub>5</sub>	EI	<b>93/106</b>
Hexanoate d'éthyle-d <sub>5</sub>	EI	<b>106/93</b>
Octanoate d'éthyle-d <sub>5</sub>	EI	<b>106/93</b>
Cinnamate d'éthyle-d <sub>5</sub>	EI	<b>181/131</b>

## Description du plan expérimental

### *Caractéristiques des souches de levures et de bactéries utilisées*

#### - Les souches de levures sèches actives

La levure Actiflore cerevisiae® ou **522D** (Laffort, Floirac, France) est la première souche industrialisée sous forme de levure sèche active (LSA) et est utilisée dans une grande partie du vignoble bordelais. Elle est décrite comme étant une souche technique assurant des fermentations complètes et rapides, qui ne modifie pas les caractéristiques organoleptiques du vin ("neutralité" aromatique), ce qui en fait une souche témoin idéale.

La levure Zymaflore **FX10**® (Laffort, Floirac, France) a été obtenue par croisement. Cette technique de sélection consiste à croiser deux souches, sans avoir recours aux technologies OGM, puis à isoler dans leur descendance une souche fille hybride conjuguant les caractéristiques parentales recherchées. La souche **FX10** a été obtenue à partir de la souche F10 dans le but d'améliorer sa résistance aux températures élevées (Marullo *et al.*, 2009). Ses principales caractéristiques organoleptiques et aromatiques revendiquées sont une forte production de polysaccharides et une faible production d'arômes fermentaires.

Enfin, la levure Excellence **XR** (Lamothe-Abiet, Canéjan, France) obtenue par croisements a été sélectionnée pour ses capacités fermentaires et sa bonne production de polysaccharides et de glycérol. Elle est réputée pour donner des vins puissants et structurés.

#### - Les souches de bactéries lactiques

La bactérie Lactoenos **450** PreAc® (Laffort, Floirac, France) a été sélectionnée pour son activité malolactique élevée. Elle est caractérisée par une faible production d'acidité volatile, de diacétyle et de lactate d'éthyle et ne produit pas d'amines biogènes.

La souche Lactoenos **B28** PreAc® (Laffort, Floirac, France) est considérée comme particulièrement bien adaptée aux vins cumulant des conditions stressantes pour les bactéries (teneurs moyennes en acides gras C8 et C10, faibles concentrations en acide malique, fortes teneurs en acide tartrique, IPT élevés, pH bas, TAV important) et permet un déclenchement rapide de l'activité malolactique dans des conditions difficiles.

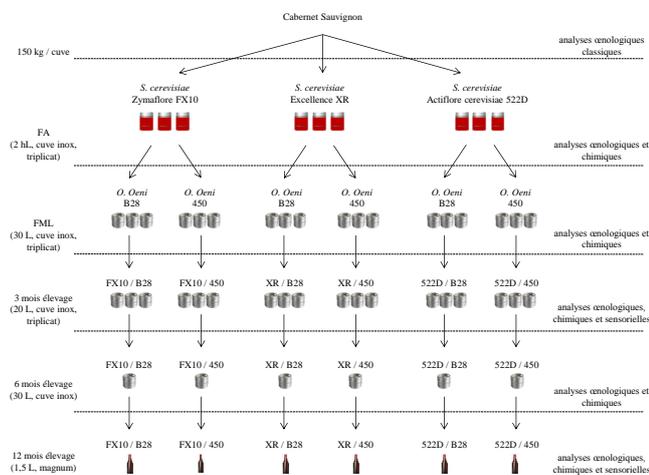
### *Méthodes d'analyses classiques et contrôles d'implantation*

Les analyses œnologiques "classiques" du moût et du vin (dosage des sucres, de l'azote assimilable, du SO<sub>2</sub> libre et total, de l'acide L-malique, de l'acidité totale, mesure du titre alcoométrique volumique (TAV) et du pH) ont été réalisées par le laboratoire Sarco (Laffort Œnologie, Floirac, France) selon les méthodes officielles ou celles recommandées par l'OIV.

Les contrôles d'implantation des levures ont été réalisés par PCR par le laboratoire Sarco. Les contrôles d'implantation des bactéries ont été effectués par le laboratoire Microflora® (ISVV, Univ. Bordeaux, France) grâce à la méthode développée par Claisse et Lonvaud-Funel (2012).

### *Protocole de vinification*

Au cours du millésime 2011, un plan expérimental complet en micro-vinifications a été mis en place dans le chai d'application de la société Laffort (WEC) dans les Graves de Vayres. Toutes les combinaisons de couples levures/BL ont pu être testées en triplicats (**Figure 4**).



**Figure 4.** Plan expérimental des micro-vinifications réalisées en 2011 au WEC.

Des raisins de Cabernet Sauvignon ont été récoltés à la main, égrappés, foulés et répartis de façon homogène dans neuf cuves en acier inoxydable de 2 hL (150 kg de raisins dans chaque cuve). Un échantillon de chaque lot a été prélevé avant FA afin de déterminer la concentration en sucre, la teneur en azote, l'acidité totale et le pH. Afin d'obtenir les effets d'une macération pré-fermentaire, une préparation enzymatique contenant des pectinases (6 700 PGNU/g) a été ajoutée aux moûts à 3g/100kg (Lafase® fruit, Laffort, Floirac, France). Après analyse, la concentration en azote assimilable des moûts a été corrigée à environ 210 mg/L.

La fermentation alcoolique a été réalisée à une température régulée entre 19-22 °C et initiée par inoculation de levures industrielles. Les LSA ont été réhydratées selon les recommandations du fabricant (ajout de nutriments Superstart/Dynastart®, Laffort Œnologie, Floirac, France) et inoculées à 20 g/hL. Trois souches de levures ont été utilisées pour réaliser la FA : **FX10**, **522D** et **XR** et les expérimentations ont été conduites en triplicat. Des contrôles d'implantation ont été réalisés à mi-fermentation (densité  $\approx$  1.04) pour chaque cuve. A la fin de la FA (concentration en glucose/fructose < 0,2 g/L) des analyses œnologiques classiques du vin ont été réalisées (dosage des sucres réducteurs, de l'acide malique et du SO<sub>2</sub> libre et total, acidité totale, TAV, pH). Des prélèvements de chaque cuve ont été effectués dans des bouteilles de 0,75 L pour analyser les composés volatiles. Les bouteilles ont été sulfitées à 5 g/hL et conservées une semaine à 10 °C. Après décantation, le vin a été aliquoté dans des flacons et conservé à -18 °C jusqu'à l'analyse.

Le vin de chaque cuve a ensuite été réparti dans deux fûts en acier inoxydable de 30 L et inoculé avec des bactéries lactiques préalablement réhydratées (ajout de nutriment Energizer®, Laffort, Floirac, France) selon les recommandations du fabricant. La FML a été réalisée en triplicat avec deux souches de BL : **B28** et **450**. Des prélèvements hebdomadaires ont été effectués afin de suivre l'évolution de la FML par un dosage de l'acide L-malique. Des contrôles d'implantation ont été réalisés à mi-fermentation (diminution de 50 % de la concentration en acide malique) pour chaque fût. A la fin de la FML (concentration en acide L-malique < 0,1 g/L), des échantillons de vin ont été prélevés pour analyses œnologiques et chimiques (bouteilles de 0,75 L) et le vin de

chaque fût a été sulfité par ajout de SO<sub>2</sub> à raison de 5 g/hL. Les échantillons prélevés ont été traités de la même façon que ceux réalisés après FA (sulfités à 5 g/hL, décantés à 10 °C, aliquotés et stockés à -18 °C).

Le vin a ensuite été transféré dans des fûts en acier inoxydable de 20 L pour éviter qu'il soit en vidange et s'oxyde prématurément. Après 3 mois d'élevage en fûts, des prélèvements ont été effectués pour analyses œnologiques et chimiques et comme décrit précédemment. Les vins ont ensuite été dégustés afin de vérifier l'absence de défaut puis assemblés par triplicat dans un fût en acier inoxydable de 30 L. Un prélèvement de chaque assemblage a été effectué (bouteille de 0,75 L) et des tests d'analyses sensorielles ont été réalisés dans les 2 jours.

Après 3 mois d'élevage supplémentaires, soit 6 mois d'élevage au total, une partie du vin a été prélevé pour des analyses œnologiques et chimiques. Le reste a été conservé en magnum de 1,5 L à 10 °C pour 6 mois supplémentaires. La concentration en SO<sub>2</sub> libre a été ajustée si nécessaire à 30 mg/L. A la fin de ces 12 mois d'élevage, une partie du vin a été utilisé pour des analyses œnologiques et chimiques, l'autre pour des tests d'analyse sensorielle.

## Chapitre 2 : Prédominance de la souche de levures sur la concentration des esters au cours de la vinification et de l'élevage

### **Influence de la souche de levures sur la synthèse des esters dans les vins rouges lors de la fermentation alcoolique et au cours de l'élevage**

#### **Conditions expérimentales de l'étude et méthodes d'analyse**

En complément du millésime 2011, trois nouvelles expérimentations ont été mises en place avec les cépages Cabernet Sauvignon et Merlot. L'essai de micro-vinification au WEC a été répété sur le millésime 2012 (WEC 2012). Des essais à taille réelle, dans deux châteaux situés sur les appellations Pessac-Léognan (PL) et Saint-Emilion (SE) ont également été réalisés afin de s'assurer que les résultats observés en volume réduit sont reproductibles au chai. Un bilan analytique a été établi pour 32 esters en mesurant leur concentration dans les 4 vins (WEC 11, WEC 12, PL et SE) et à 5 étapes de leur élaboration : après FA, après FML et au bout de 3, 6 et 12 mois d'élevage (**Figure 11**).

#### ***Vinification***

##### *Protocole de vinification*

#### **- Macro-vinification de moût de Cabernet Sauvignon thermovinifié**

Au cours du millésime 2012, un deuxième plan expérimental complet en micro-vinifications a été mis en place dans le chai d'application de la société Laffort (WEC) dans les Graves de Vayres. Toutes les combinaisons de couples levure/BL ont de nouveau été testées en triplicats (**Figure 11**). Les raisins ont préalablement été traités par thermovinification (chauffage à 70 °C pendant 6 heures) avant vinification. Neuf cuves en acier inoxydable de 2 hL ont été remplies de 1,5 hL de moût et un échantillon de chaque lot a été prélevé avant FA afin de déterminer la concentration en sucre, la teneur en azote, l'acidité totale et le pH. La

concentration en azote assimilable des moûts a été corrigée à environ 210 mg/L par ajout de sulfate d'ammonium. Les fermentations alcooliques et malolactiques se sont déroulées suivant le protocole décrit précédemment (Chapitre 1.II.B.). Des contrôles d'implantation ont également été réalisés à mi-fermentation (densité  $\approx 1,04$  pour la FA ; diminution de 50 % de la concentration en acide malique pour la FML) pour chaque cuve. L'élevage des vins a été réalisé dans des fûts en acier inoxydable comme décrit dans le chapitre 1. Le  $\text{SO}_2$  libre a été ajusté à 30 mg/L si nécessaire à chaque étape du vieillissement. Des prélèvements après FA, FML, 3, 6 et 12 mois d'élevage pour analyses œnologiques classiques, analyses chimiques et analyses sensorielles (à 3 et 12 mois seulement) ont été effectués.

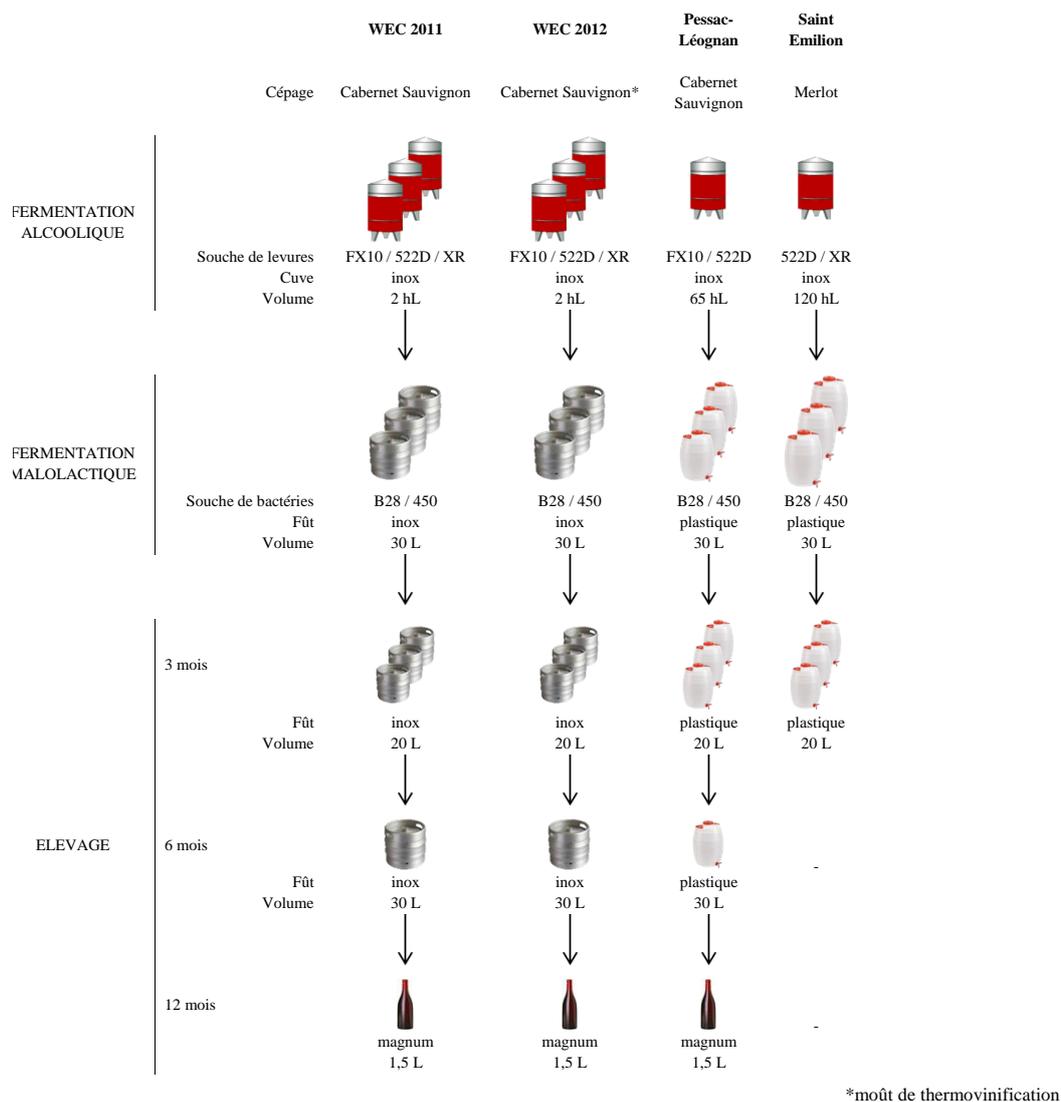
#### - Vinification de Cabernet Sauvignon au chai

Un premier essai au chai a été réalisé avec des raisins de Cabernet Sauvignon de l'appellation Pessac-Léognan répartis de façon homogène dans deux cuves en acier inoxydable de 65 hL. La fermentation alcoolique a été initiée par les souches de levures **FX10** ou **522D**. La concentration en azote assimilable a été corrigée à 210 mg/L au préalable. A mi-fermentation (densité  $\approx 1,04$ ), des contrôles d'implantation des levures ont été réalisés. Après la FA, le vin de chaque cuve a été réparti de façon homogène dans six bidons en plastique alimentaire de 30 L adaptés à la vinification afin de réaliser la FML en triplicats. Les souches de BL utilisées sont les mêmes que pour les autres essais (**B28** et **450**). A la fin de la FML, les vins ont été sulfités à 5 g/hL de  $\text{SO}_2$  et transvasés dans des fûts en plastique alimentaire de 20 L pour 3 mois d'élevage. A la fin de cette période, les triplicats ont été assemblés en un seul bidon de 30 L pour 3 mois d'élevage supplémentaire. Après 6 mois d'élevage, une partie du vin a été conservée en magnum à 10 °C pendant 6 mois (**Figure 11**). Le  $\text{SO}_2$  libre a été ajusté à 30 mg/L au préalable. Des prélèvements aux mêmes étapes de l'élaboration des vins et suivant le protocole décrit au chapitre 1 ont été effectués pour les analyses œnologiques classiques, le dosage des esters et les tests d'analyse sensorielle (vin de 3 et 12 mois d'élevage seulement).

#### - Vinification de Merlot au chai

Un second essai au chai a été réalisé avec des raisins de Merlot de l'appellation Saint-Emilion répartis de façon homogène dans deux cuves en acier inoxydable de 120 hL. Le moût a été analysé et sa concentration en azote a été ajustée à 210 mg/L. La cuvaison comporte trois phases : une macération pré fermentaire à froid, la fermentation, réalisée par les souches de levures **XR** ou **522D**, et une macération post fermentaire. Comme pour les vins PL, le vin de chaque cuve a été réparti de façon homogène dans six bidons en plastique alimentaire de 30 L afin de réaliser la FML en triplicats (souches **B28** et **450**).

A la fin de la FML, les vins ont été sulfités à 5 g/hL de  $\text{SO}_2$  et transvasés dans des fûts en plastique alimentaire de 20 L pour 3 mois d'élevage (**Figure 11**). Chaque triplicat a été assemblé en fût de 30 L pour 3 mois d'élevage supplémentaires. L'expérimentation a été arrêtée après 6 mois d'élevage à cause de contaminations microbiologiques de certaines modalités ayant engendré des déviations aromatiques de types phénols. Les analyses chimiques et sensorielles n'ont donc été réalisées que sur les vins après FA, FML et 3 mois d'élevage, exempts de tout problème.



**Figure 11.** Plan expérimental des vinifications réalisées en 2011 et 2012 au WEC, Pessac-Léognan et Saint-Emilion.

### *Suivi de 32 esters odorants au cours de la vinification et de l'élevage*

La méthode utilisée est décrite p.222 (Antalick *et al.*, 2010). Suite à l'évolution de la méthode au cours du doctorat, quatre nouveaux étalons internes commerciaux en solution alcoolique sont utilisés : butyrate d'éthyle- 4,4,4-d<sub>3</sub> (200 mg/L), hexanoate d'éthyle-d<sub>11</sub> (204 mg/L), octanoate d'éthyle-d<sub>15</sub> (276 mg/L), *trans*-cinnamate d'éthyle-d<sub>5</sub> (phenyl-d<sub>5</sub>) (192 mg/L) (Cluzeau, Sainte Foy la Grande, France). Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales différentes de la méthode décrites p.223 sont résumées dans le **Tableau 25**.

**Tableau 25.** Conditions expérimentales de la HS-SPME-GC-MS pour le dosage des esters apolaires.

Principe :	Microextraction sur phase solide, HS-SPME
Appareil :	Agilent 7890A
Détecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique
	Appareil : Agilent 5975C
	Energie d'ionisation : 70 eV
	Température : 280 °C
	Détection en mode SIM ( <i>Selected Ion Monitoring</i> )

**Tableau 26.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) des étalons internes.

Composés	Ions (m/Z)
Butyrate d'éthyle-4,4,4-d <sub>3</sub>	<b>74/89</b>
Hexanoate d'éthyle-d <sub>11</sub>	<b>91/110</b>
Octanoate d'éthyle-d <sub>15</sub>	<b>91/142</b>
<i>Trans</i> -cinnamate d'éthyle-d <sub>5</sub> (phenyl-d <sub>5</sub> )	<b>136/181</b>

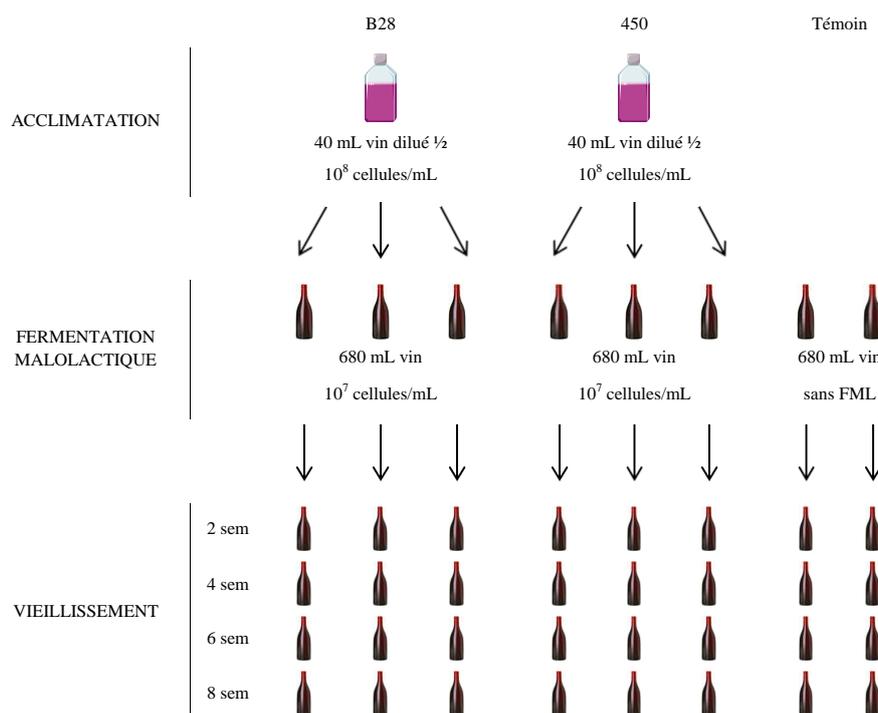
## Influence limitée de la fermentation malolactique et de la souche de bactéries lactiques sur les teneurs en esters

### Etude de l'influence de la souche de bactéries lactiques sur l'évolution de la concentration en esters au cours de l'élevage. Modélisation au laboratoire

L'objectif de cette partie est donc d'étudier si l'effet "bactéries" observé dans plusieurs vins au cours de l'élevage est dû à des métabolismes microbiens distincts pendant la FML pouvant avoir un impact au moment de l'élevage, ou à des cinétiques fermentaires différentes liées à la population bactérienne à l'inoculation. Des FML ont été réalisées au laboratoire avec les souches de BL utilisées dans les expérimentations précédentes. Les vins obtenus ont subi une période de "vieillessement", et l'ensemble des modalités a été conduit en triplicat. Le plan expérimental complet est présenté **Figure 19**.

#### *Protocole de la micro-vinification*

Le vin utilisé pour cet essai est issu du même moût thermovinifié que les vins WEC 2012 précédemment décrits. Après fermentation alcoolique, le vin a été stabilisé par filtration sur plaques de 0,60 µm (LAFFORT L15) puis conservé à 4 °C. Deux filtrations stérilisantes ont été réalisées : une première sur des plaques de 2 µm (LAFFORT L5) puis une deuxième sur plaques de 0,35 µm (LAFFORT L60) afin d'éliminer les bactéries indigènes. Les souches de BL utilisées pour réaliser la FML sont **B28** et **450**.



**Figure 19.** Plan expérimental des micro-vinifications réalisées en laboratoire.

### *Acclimatation des bactéries et dénombrement de la population bactérienne par épifluorescence*

La phase d'acclimatation permet de réduire le choc subit par les BL consécutivement au changement de milieu et améliore la viabilité cellulaire. Elle consiste à placer les souches bactériennes dans du vin dilué au demi par de l'eau osmosée, pendant 24h à 20 °C.

Une population bactérienne équivalente à  $10^6$  cellules/mL est nécessaire pour enclencher le départ de la FML et par mesure de précaution, le taux d'inoculation des vins a été fixé à  $10^7$  cellules/mL. Lors de la phase d'acclimatation des bactéries, le risque de mortalité a été pris en compte et la population à acclimater a été surestimée aux alentours de  $10^9$  cellules/mL. Pour chaque souche, un flacon stérile de 50 mL contenant 20 mL d'eau osmosée stérile, 20 mL de vin filtré et 5 g d'Energizer® (Laffort, Floirac) est inoculé avec 1 g de bactéries lyophilisées et placé dans une étuve à 20 °C pendant 24h. La population théorique est ainsi de  $2,5 \cdot 10^9$  cellules/mL.

Après 24h, un comptage bactérien par épifluorescence à double coloration est réalisé afin de déterminer la biomasse réelle. Cette méthode permet l'estimation immédiate de la population bactérienne totale d'un échantillon et la différenciation des cellules viables ou non (Favier, 2012). Le principe de la technique repose sur la dégradation d'un substrat, l'acétate de fluorescéine en un fluorochrome, la fluorescéine, par une estérase intracellulaire. Les cellules viables sont caractérisées par une activité estérasique et une intégrité membranaire. Elles émettent donc une lumière de fluorescence verte et peuvent être facilement dénombrées à l'aide d'un microscope. Pour les cellules non viables, la détection est basée sur l'utilisation d'une substance lipophile, l'iodure de propidium, qui pénètre dans la cellule à travers la membrane ayant perdu son intégrité. Il se fixe aux acides nucléiques de la cellule, et émet alors une fluorescence rouge détectable au microscope.

La limite de détection de la méthode étant de  $10^3$  cellules/mL, l'échantillon de vin est dilué au 1/1000 avant d'être filtré sur une membrane de porosité de  $0,4 \mu\text{m}$  (Chemunex, Marcy l'Etoile, France). Cette membrane est ensuite déposée sur un support imbibé d'une solution de marquage composée de  $500 \mu\text{L}$  de solution tampon Chemsol B16, de  $2,5 \mu\text{L}$  d'acétate de fluorescéine ChemChrome V6 (Chemunex), et de  $5 \mu\text{L}$  d'iodure de propidium en solution à  $1 \text{ mg/L}$  (Sigma-Aldrich). Le tout est incubé pendant 25 minutes à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  dans l'obscurité totale. La membrane est ensuite déposée entre lame et lamelle et observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus BX51) équipé du filtre approprié (Olympus 467803) au grossissement  $\times 1000$ . Les cellules sont comptées dans 10 ou 20 champs puis la valeur moyenne est multipliée par le nombre de champs composant la membrane, donnant ainsi le nombre de cellules viables et non viables contenues dans l'échantillon filtré.

La population bactérienne dénombrée en fin de phase d'acclimatation pour chaque modalité est de :

- souche **B28** :  $5,86 \cdot 10^8$  cellules/mL
- souche **450** :  $6,9 \cdot 10^8$  cellules/mL

#### *Inoculation des bactéries lactiques et suivi de la fermentation malolactique*

Pour cette expérimentation, les FML sont réalisées en triplicat dans des bouteilles en verre stériles de  $750 \text{ mL}$  bouchées avec du coton cardé. Un volume de  $680 \text{ mL}$  de vin total est inoculé en BL à hauteur de  $10^7$  cellules/mL soit pour chaque modalité un volume de vin acclimaté de :

- souche **B28** :  $11,6 \text{ mL}$
- souche **450** :  $9,86 \text{ mL}$

Deux bouteilles supplémentaires n'ont pas étéensemencées afin d'être utilisées comme témoin n'ayant pas réalisé la FML.

Toutes les bouteilles sont ensuite inertées au  $\text{CO}_2$  ( $0,5 \text{ bar}$ , 30 secondes) puis placées dans une étuve à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ , sans agitation, pour la durée de la FML.

Pour suivre l'évolution de la FML, la teneur en acide L-malique est mesurée quotidiennement (laboratoire Sarco). Un dénombrement bactérien par microscopie à épifluorescence est effectué deux jours après le lancement des FML afin de contrôler l'évolution de la population. Le contrôle d'implantation est réalisé à 50 % de la FML comme décrit pour les expérimentations en chai. Chaque bouteille est systématiquement inertée au  $\text{CO}_2$  ( $0,5 \text{ bar}$ , 30 secondes) à la suite d'un prélèvement afin d'éviter le développement de micro-organismes aérobies indésirables. La fermentation est considérée comme achevée lorsque la concentration en acide L-malique est inférieure à  $0,01 \text{ g/L}$ .

#### *Vieillessement des vins et dosage des esters*

A la fin de la FML, les vins sont stabilisés par ajout de  $\text{SO}_2$  à  $5 \text{ g/hL}$  et chaque modalité est aliquotée dans des flacons en verre brun stériles de  $60 \text{ mL}$ . Afin de simuler le vieillissement des vins et d'accélérer l'hydrolyse des esters au cours du temps, les flacons sont placés dans une étuve à  $31 \text{ }^\circ\text{C}$  (Marais, 1980). Un flacon est prélevé toutes les deux semaines afin de doser la concentration en esters éthyliques d'acides gras et acétates d'alcools supérieurs dans les différentes modalités. La méthode de dosage par SPME est décrite dans le paragraphe II. 2.

## Chapitre 3 : Etude sensorielle de la modulation de l'arôme fruité par les microorganismes

### Etude de l'effet des microorganismes sur la modulation de l'arôme fruité : perception par les dégustateurs

Les différentes analyses sensorielles ont été réalisées à partir des vins de micro-vinification du WEC sur les millésimes 2011 et 2012 (WEC 11, WEC 12) ainsi qu'à partir des vins vinifiés aux chais durant le millésime 2012 (PL et SE), après 3 et 12 mois d'élevage (excepté SE). Elles ont toutes porté sur les perceptions orthonasale et gustative.

Plusieurs facteurs peuvent affecter la réponse sensorielle : les variations interindividuelles (sexe, âge, sensibilité) mais également l'environnement de la séance de dégustation, le verre utilisé, la température de la pièce ou de l'échantillon. (Martin et de Revel, 1999). Afin d'écarter toute perturbation pouvant affecter les résultats de la dégustation, la norme NF EN ISO 8589 : 2010 définit les conditions normalisées de l'analyse sensorielle : une température de confort à  $\pm 20$  °C, un éclairage uniforme, une isolation acoustique et un isolement des sujets entre eux pour garantir l'indépendance du jugement. Toutes les séances d'analyse sensorielle ont été effectuées dans la salle de dégustation du laboratoire de recherche de l'ISVV qui répond à cette norme. Les verres utilisés sont des verres incolores correspondant à la norme ISO 3591 : 1977, codés par un nombre aléatoire à trois chiffres et recouverts par une boîte de Pétri. Les vins ont été sortis de la chambre froide à 10 °C quelques heures avant la séance de dégustation et servis à température ambiante. Ils ont été présentés simultanément, disposés dans un ordre aléatoire et équilibré entre tous les sujets. Enfin, tous les juges, membres des différentes unités de recherche de l'ISVV ou de la société Laffort ont été choisis pour leur expérience dans l'analyse sensorielle et peuvent donc être considérés comme expérimentés.

### Caractérisation globale analysée par la méthode du Napping®

#### *Méthodologie de l'épreuve*

Les juges ont évalué les vins de façon globale (vue, odorat et goût) et étaient libres de les goûter autant de fois qu'ils souhaitaient, sans limite de temps. Ils disposaient d'une feuille de papier blanc, de dimension 40 x 60 cm, et ont reçu la consigne suivante :

#### Principe :

*Il vous est demandé d'évaluer les ressemblances (ou dissemblances) entre plusieurs vins, et ce, selon vos propres critères, ceux qui sont importants pour vous. Il n'y a pas de bonnes et de mauvaises réponses.*

#### Mode opératoire :

*Placez les vins sur une feuille de papier blanc ; deux vins sont d'autant plus proches qu'ils vous paraissent semblables. Deux vins sont éloignés s'ils vous paraissent différents. Et encore une fois, ceci selon vos propres critères. N'hésitez pas à marquer les différences, c'est-à-dire à utiliser toute la feuille disponible. Quand l'opération est terminée, indiquez par des croix les emplacements occupés par les verres et reportez les numéros des vins.*

Il a ensuite été demandé aux juges d'écrire, à côté des vins, des termes qui leur semblaient caractériser le vin (ou groupe de vins). La consigne était la suivante :

**Mode opératoire :**

*Indiquez, à côté de l'emplacement de chaque produit, ou chaque groupe de produits, les mots qui vous viennent à l'esprit pour le caractériser. UTILISER DES MOTS QUANTIFIABLES et non des phrases. Ces mots doivent permettre une description OBJECTIVE des vins. Evitez les adverbes (plus, moins...) et les termes hédoniques.*

Deux séances ont été réalisées :

- **Séance 1 :** vin WEC 2011 (6 couples levure/bactérie) après **3 mois d'élevage** en mars 2012 avec 15 dégustateurs (5 hommes, 10 femmes) âgés de  $36,6 \pm 8,5$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 2 :** vin WEC 2011 (6 couples levure/bactérie) après **12 mois d'élevage** en février 2012 avec 22 dégustateurs (10 hommes, 12 femmes) âgés de  $34 \pm 7,5$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)

Les résultats ont été traités par AFM comme décrit par Pagès (2005). Les données correspondent aux coordonnées de l'emplacement des produits sur la feuille, pour chaque juge. On obtient donc des valeurs de X (abscisse) comprises entre 0 et 60 et des valeurs de Y (ordonnée) comprises entre 0 et 40, pour chaque vin et pour chaque juge. Les mots associés à chaque vin sur chaque nappe ont été recueillis de façon collective (**Figure 22**). Les descripteurs cités par l'ensemble des juges sont sommés de façon à obtenir un tableau de contingence, qui est simplifié par la suite : les termes utilisés par un seul juge ainsi que les mots à caractère hédonique ont par exemple été écartés. Les descripteurs évoquant la même idée ont été assemblés : par exemple, les mots "fraise", "framboise" et "fruits rouges" ont été regroupés sous le terme "fruits rouges" (**Figure 22**). La fréquence de citation de chaque descripteur retenu pour chaque échantillon est ensuite relevée. On obtient alors une table structurée en  $n$  sous-tableaux, correspondant aux  $n$  juges, de 6 lignes, correspondant aux 6 vins testés (**Figure 23**).

## Confirmation du rôle essentiel de la souche de levures par un test de classement

### *Méthodologie de l'épreuve*

Les juges ont classé les différents vins par ordre croissant d'intensité de la note fruitée (pas d'ex aequo possible). Cinq séances ont été réalisées :

- **Séance 3 :** vin WEC 2012 (6 couples levure/bactérie) après **3 mois d'élevage** en avril 2013 avec 22 dégustateurs (8 hommes, 14 femmes) âgés de  $34,5 \pm 8,8$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 4 :** vin PL 2012 (4 couples levure/bactérie) après **3 mois d'élevage** en avril 2013 avec 24 dégustateurs (9 hommes, 15 femmes) âgés de  $35 \pm 8,7$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 5 :** vin SE 2012 (4 couples levure/bactérie) après **3 mois d'élevage** en mars 2013 avec 21 dégustateurs (9 hommes, 12 femmes) âgés de  $33,4 \pm 7,7$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 6 :** vin WEC 2012 (6 couples levure/bactérie) après **12 mois d'élevage** en janvier 2014 avec 18 dégustateurs (7 hommes, 11 femmes) âgés de  $37,1 \pm 8,7$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 7 :** vin PL 2012 (4 couples levure/bactérie) après **12 mois d'élevage** en janvier 2014 avec 18 dégustateurs (6 hommes, 12 femmes) âgés de  $37,2 \pm 8,5$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)

La modalité vin SE 2012 après 12 mois d'élevage n'a pas pu être testée à cause de contaminations microbiologiques de certains échantillons durant l'élevage.

La fiche de dégustation présentée au panel est fournie en annexe 3.

Le but de ces tests est d'étudier l'influence du couple levure/bactérie sur l'intensité de l'arôme fruité des vins. Il n'existe donc pas de hiérarchie supposée entre les différents échantillons. Selon la norme NF ISO 8587 : 2006, le test statistique à appliquer est le test de Friedman.

Les  $p$  modalités sont classées par ordre croissant par les  $n$  sujets et les sommes des rangs  $R_1, R_2, R_3, \dots, R_p$  sont déterminées. On calcule la valeur  $F$  :

$$F = \frac{12 \cdot \sum_{i=1}^p R_i^2}{n \cdot p \cdot (p + 1)} - 3 \cdot n \cdot (p + 1)$$

On compare ensuite  $F$  aux valeurs critiques de la loi du  $\chi^2$  à  $(p - 1)$  degré de liberté :

- Si  $F > \chi^2$  (5 %), les produits sont considérés comme étant significativement différents.
- Si  $F \leq \chi^2$  (5 %), les produits sont considérés comme n'étant pas différenciables.

Dans le cas où une différence globale entre les échantillons est statistiquement prouvée, un test supplémentaire de comparaison multiple des sommes des rangs peut permettre de déterminer la différence éventuelle des échantillons deux à deux. On calcule la plus petite différence significative (PPDS) que l'on compare à la valeur absolue de la différence entre les sommes de rangs de deux produits :

$$PPDS = 1,96 \sqrt{n \cdot p \cdot (p + 1) / 6}$$

- Si  $|R_i - R_j| > PPDS$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme différentes au risque de 5 %
- Si  $|R_i - R_j| < PPDS$ , les modalités  $i$  et  $j$  sont considérées comme non différenciables

## Caractérisation de l'effet souche de levures par un profil sensoriel

### *Méthodologie de l'épreuve*

Selon la norme ISO 13299 : 2003, une liste de descripteurs a été préétablie à l'aide des mots générés par les dégustateurs aux cours des séances de Napping®. Nous avons retenu 5 descripteurs olfactifs : "fruits frais", "fruits confiturés", "arôme fermentaire", caractéristiques des vins rouges de Bordeaux selon Pineau *et al.* (2010) ainsi que "fumé/grillé" et "végétal" pouvant moduler la note fruitée (Keim *et al.*, 2002 ; Antalick, 2010). Chaque descripteur a été évalué et positionné en fonction de son intensité sur une échelle de notation structurée de 0 à 7 (où 0 indique qu'aucune odeur n'est perçue et 7 indique une intensité très élevée) (Martin et de Revel, 1999). Tous les profils ont été réalisés au cours des séances 3 à 7, à la suite du test de classement. La fiche de dégustation présentée au panel est fournie en annexe 4. Il s'agit d'une fiche imposée, présentée sous forme d'un profil comparé.

Afin d'évaluer statistiquement l'impact du couple et des souches de levures et de bactéries sur la modulation de la note fruitée, des ANOVA à deux facteurs (levures / bactéries / levures x bactéries) ont été réalisées pour chaque descripteur suivi d'un test *post hoc* par paire de Duncan pour confirmer les différences entre échantillons. Les tests statistiques ont été réalisés à partir de données centrées-réduites afin de limiter l'effet juge.

## Matériels et méthodes de la deuxième partie

### Chapitre 4 : Elaboration d'une stratégie guidée par l'analyse sensorielle dans le but d'isoler une fraction odorante d'intérêt

#### Analyses préliminaires

##### Méthodologie

##### *Extraction liquide-liquide suivie du fractionnement par HPLC*

100 mL de vin sont extraits successivement avec 8, 4 et 4 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases, organiques et aqueuses, sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les trois phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 50 mL et l'émulsion est cassée à l'aide d'un barreau magnétique tournant lentement. Les traces d'eau de la phase organique sont éliminées à l'aide de sulfate de sodium anhydre. L'extrait est ensuite concentré sous flux de diazote jusqu'à un volume final de 250 µL puis fractionné par HPLC. Les conditions chromatographiques, optimisées par Pineau (2007) sont présentées dans le **Tableau 38**. Les fractions sont recueillies toutes les 2 minutes, afin d'obtenir 25 fractions de 1 mL en phase aqueuse plus ou moins riches en éthanol.

**Tableau 38.** Conditions expérimentales de l'HPLC pour le fractionnement d'un extrait brut.

Appareil :	Phase mobile :
Pompe : L-6200 A (Merk-Hitachi, Germany)	Solvant A : eau distillée
Carousel : Model 2110 Fraction Collector (Bio-Rad, USA)	Solvant B : éthanol (pureté > 99,9 %)
Colonne :	Débit : 0,5 mL/min
Nova-Pak C18 (phase inverse)	Gradient linéaire :
30 m x 3,9 mm	Temps (min) 0 2 50
Diamètre des pores 4 µm	% de B 0 0 100
Injection :	Remise à zéro :
200 µL, à l'aide d'un injecteur manuel	Solvant : 100 % A
	Temps : 15 min

##### *Reconstitutions aromatiques*

Les fractions aromatiques utilisées pour les reconstitutions provenaient de différents vins :

- vin de Cabernet Sauvignon de Pays d'Oc, disponible au laboratoire
- vin de Cabernet Sauvignon de la région de Bordeaux, également disponible
- vin WEC 2011, 3 mois d'élevage
- vin WEC 2012, 3 mois d'élevage
- vin PL 2012, 3 mois d'élevage

Les reconstitutions aromatiques élaborées à partir des 25 fractions obtenues par CLHP ont été préparées en assemblant toutes les fractions et en les mettant en solution de telle sorte que le volume final obtenu corresponde

au volume de vin à l'origine de ces fractions (soit 100 mL). La matrice obtenue était une matrice hydro-alcoolique constituée d'eau distillée et d'éthanol absolu (VWR, pureté > 99,9 %) avec un TAV de 12 % v/v.

## Validation de la méthode et sélection des vins

Plusieurs dégustations ont été organisées dans les conditions décrites p.230 (Martin et de Revel, 1999). Les verres utilisés sont des verres noirs correspondant à la norme ISO 3591 : 1977. Toutes les analyses sensorielles ont porté exclusivement sur la perception orthonasale.

### Validation de la méthode

#### Méthodologie de l'analyse sensorielle

Avant d'utiliser les fractions obtenues par HPLC pour élaborer diverses reconstitutions aromatiques, le premier objectif a été d'évaluer la validité et la répétabilité de la méthode d'extraction et de fractionnement. S'il a déjà été montré dans l'étude bibliographique que l'arôme du vin était différent de celui de la RA totale, nous voulions nous assurer que les différences observées entre deux vins étaient également observables entre les RA de ces mêmes vins (séances 1 et 2, **Tableau 39**). La répétabilité de la méthode a été évaluée en comparant les RA totales de deux échantillons (a et b) d'un même vin (séances 3 et 4, **Tableau 39**).

**Tableau 39.** Echantillons utilisés lors des différents tests triangulaires.

	Matrice	Echantillons comparés	
Séance 1	vin	Pays d'Oc	Bordeaux
Séance 2	RA (1 à 25)	Pays d'Oc	Bordeaux
Séance 3	RA (1 à 25)	Pays d'Oc (a)	Pays d'Oc (b)
Séance 4	RA (1 à 25)	Bordeaux (a)	Bordeaux (b)

RA : Reconstitution aromatique

Les différents échantillons ont été évalués par un test triangulaire (NF EN ISO 4120 : 2007). Le but de cette épreuve discriminative est de comparer deux vins dont on cherche à évaluer s'ils présentent ou non des différences sensorielles (Martin et de Revel, 1999). Pour ce faire, trois échantillons, dont deux sont identiques, sont présentés simultanément aux juges qui doivent désigner l'échantillon différent. Six présentations sont possibles suivant la nature du produit répété (A ou B) et la position de l'échantillon unique : AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB. L'ordre de présentation des verres est équilibré sur l'ensemble des individus. Le traitement statistique de ce test est basé sur la loi binomiale : l'hypothèse initiale est l'identité entre les deux produits (hypothèse nulle  $H_0$ , probabilité de réponse correcte  $p = 1/3$ ). La probabilité que l'hypothèse initiale, notée  $P$ , soit vraie est calculée comme suit :

$$P = \sum_{i=r}^n C \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

Avec  $r$  : nombre de réponses correctes

n : nombre de sujets

q :  $1 - p = 2/3$

Plus  $P$  est faible, c'est-à-dire proche de 0, moins l'hypothèse d'identité des modalités est vraisemblable. Les valeurs limites de significativité généralement adoptées sont 0,05 ; 0,01 et 0,001. Ainsi, lorsque  $P$  est inférieur à ces valeurs, les échantillons sont considérés comme différents au risque de 5 %, 1 % et 0,1 % respectivement. Afin de faciliter l'analyse des réponses, des tables, dites tables de la loi binomiale sont disponibles dans la littérature (NF EN ISO 4120 : 2007 ; Martin et de Revel, 1999).

Le panel utilisé pour les quatre séances est constitué de 15 dégustateurs (6 hommes, 9 femmes) âgés de  $33 \pm 6,8$  ans (moyenne  $\pm$  écart type).

La fiche de dégustation présentée au panel est fournie en annexe 3.

### *Sélection des vins*

#### *Méthodologie de l'analyse sensorielle*

Les juges ont classé les reconstitutions aromatiques issues des différents vins par ordre croissant d'intensité de la note fruitée (pas d'ex aequo possible). La méthodologie de l'analyse sensorielle est identique à celle décrite au chapitre 3.II.B. Deux séances ont été réalisées :

- **Séance 1** : Reconstitutions aromatiques (1 à 25) des vins PL (4 couples levures/bactéries) après **3 mois d'élevage** avec 19 dégustateurs (6 hommes, 13 femmes) âgés de  $35 \pm 7,1$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)
- **Séance 2** : Reconstitutions aromatiques (1 à 25) des vins WEC 2012 (6 couples levures/bactéries) après **3 mois d'élevage** avec 21 dégustateurs (9 hommes, 12 femmes) âgés de  $34 \pm 8,3$  ans (moyenne  $\pm$  écart type)

## **Description olfactive des fractions obtenues par HPLC issues d'un vin de Cabernet Sauvignon fermenté par deux souches de levures différentes à plusieurs étapes de vinification et d'élevage**

### **Conditions de l'analyse sensorielle**

Les vins de l'expérimentation PL après FA, FML, 3 et 6 mois d'élevage ont été extraits et fractionnés selon le protocole décrit dans le chapitre 4.II.

Un panel de 3 à 6 juges, considérés comme spécialistes de l'arôme des vins (2 hommes, 4 femmes âgés de  $41 \pm 5,1$  ans), a été utilisé pour réaliser les analyses descriptives des fractions ainsi que de divers essais préliminaires concernant les RA. La sélection des fractions a été réalisée par olfaction directe de celles-ci. Pour chaque étape de prélèvement, les fractions ont été comparées deux à deux. L'objectif de cette partie est de mettre en évidence la ou les fractions responsables des différences olfactives observées au chapitre 3 entre les modalités fermentées par différentes souches de levures, donc, toutes les combinaisons n'ont pas été testées.

Ainsi, nous avons demandé au panel de comparer deux à deux les fractions des modalités :

- fin FA : **522D vs FX10**
- fin FML, 3 mois et 6 mois : **522D/B28 vs FX10/B28**  
**522D/450 vs FX10/450**

Trois questions ont été posées au panel :

(1) Ces deux fractions sont-elles différentes ?

(2) Si oui, laquelle des deux vous semble la plus intense ?

(3) Quel(s) descripteur(s) caractérise(nt) le mieux, selon vous, ces fractions (vocabulaire libre) ?

La fiche de dégustation est disponible en annexe 5.

Les fractions ont été présentées aux juges dans un ordre aléatoire, codées par un nombre à deux chiffres compris entre 26 et 99 (1 à 25 pouvant influencer les juges).

## Mise en évidence d'une fraction d'intérêt grâce à des tests d'omission

### Recherche des fractions d'intérêt

#### *Méthodologie de l'analyse sensorielle*

Les vins de l'expérimentation PL après FML, 3 et 6 mois d'élevage ont été extraits et fractionnés selon le même protocole décrit dans le chapitre 4.II. Une solution hydro-alcoolique de 12 % v/v a également été injectée afin d'obtenir 25 fractions hydro-alcoolique exemptes de composés volatils. Lors des tests d'omission, les fractions qui n'ont pas été ajoutées à la RA ont été remplacées par les fractions non odorantes correspondantes.

Pour chaque RA, 40 µL de chaque fraction ont été prélevés pour un volume final de 1 mL, dans lequel 3 mL d'eau distillée ont été ajoutés pour obtenir un TAV de 12 % v/v. Ainsi, toutes les combinaisons testées, présentées dans le **Tableau 44**, étaient issues des mêmes échantillons fractionnés. Le nombre d'échantillons testés étant important (13 au total), l'ensemble des combinaisons n'a été testé qu'une seule fois, entre les modalités **FX10/B28** et **522D/B28**.

**Tableau 44.** Composition des reconstitutions aromatiques présentées lors des différents tests. Le premier test de chaque expérience est un test d'omission d'un groupe de fractions. Pour le second, les groupes de fractions testés ont été échangés et mélangés à la RA issue de l'autre levure. Les modalités comparées sont **FX10/B28** vs **522D/B28** issues des vins PL après FML.

Témoin	Echantillons comparés	
	RA (1 à 25)	RA (1 à 25)
Expérience 1	RA (1 à 25) - (2 à 5)	RA (1 à 25) - (2 à 5)
	RA (1 à 25) + (2 à 5)	RA (1 à 25) + (2 à 5)
Expérience 2	RA (1 à 25) - (6 à 8)	RA (1 à 25) - (6 à 8)
	RA (1 à 25) + (6 à 8)	RA (1 à 25) + (6 à 8)
Expérience 3	RA (1 à 25) - (9 à 11)	RA (1 à 25) - (9 à 11)
	RA (1 à 25) + (9 à 11)	RA (1 à 25) + (9 à 11)
Expérience 4	RA (1 à 25) - (12 à 13)	RA (1 à 25) - (12 à 13)
	RA (1 à 25) + (12 à 13)	RA (1 à 25) + (12 à 13)
Expérience 5	RA (1 à 25) - (14 à 16)	RA (1 à 25) - (14 à 16)
	RA (1 à 25) + (14 à 16)	RA (1 à 25) + (14 à 16)
Expérience 6	RA (1 à 25) - (17 à 21)	RA (1 à 25) - (17 à 21)
	RA (1 à 25) + (17 à 21)	RA (1 à 25) + (17 à 21)

RA : Reconstitution Aromatique

Les RA étaient présentées dans des flacons de 20 mL à deux juges (un homme et une femme âgés de  $28,5 \pm 2,5$  ans) entraînés à la dégustation. Pour chaque test, il leur a été demandé d'indiquer l'échantillon le plus fruité. Afin d'évaluer l'impact d'un groupe de fractions donné sur la modulation de la note fruitée, deux tests ont été réalisés :

- l'omission de ce groupe de fractions.
- l'échange de fractions : par exemple dans l'expérience 1, les fractions (2 à 5) de la modalité **FX10/B28** ont été ajoutées aux fractions (1 et (6 à 25)) de la modalité **522D/B28** et inversement.

## Confirmation de l'importance de la fraction 12 dans la perception de l'arôme fruité

### *Méthodologie de l'analyse sensorielle*

Des séances d'analyse sensorielle avec un panel de dégustateurs entraînés ont été réalisées dans le but de (1) identifier quelle fraction, 12 ou 13, a un impact sur l'intensité de l'arôme fruité, et de confirmer l'effet de cette fraction (2) sur un vin commercial et (3) entre les modalités **522D** et **FX10**.

Pour chaque RA, 40  $\mu$ L de chaque fraction ont été prélevés pour un volume final de 1 mL, dans lequel 3 mL d'eau distillée ont été ajoutés pour obtenir un TAV de 12 % v/v. Les échantillons ont été présentés dans des verres noirs dans les conditions de dégustation décrites dans le chapitre 3. Il a été demandé aux juges de comparer olfactivement les échantillons présentés dans le **Tableau 45** et de noter l'intensité de la note fruitée pour chaque échantillon, sur une échelle discontinue allant de 0 à 7.

#### • Expérience 1

Les fractions aromatiques obtenues selon le même protocole décrit dans le chapitre 4.II., provenaient d'un cru classé Pessac-Léognan du millésime 2003. Ce vin particulièrement fruité est issu d'un assemblage de cépages bordelais (56 % de cabernet sauvignon, 38 % de merlot et 6 % de cabernet franc) est caractérisé par des notes de groseille, de cassis et de cerise (Parker, 2009). Le panel était constitué de 19 dégustateurs (9 hommes, 10 femmes) âgés de  $30,9 \pm 4,3$  ans (moyenne  $\pm$  écart type).

**Tableau 45.** Composition des reconstitutions aromatiques présentées lors des différents tests de profil. Les RA utilisées pour l'expérience 1 sont issues d'un vin de Château Haut-Bailly 2005. Les modalités comparées au cours de l'expérience 2 sont **FX10/B28** vs **522D/B28**, issues des vins PL après 3 mois d'élevage.

		Echantillons comparés	
Expérience 1		RA (1 à 25)	RA (1 à 25) - (12 à 13)
		RA (1 à 25)	RA (1 à 25) - (12)
		RA (1 à 25)	RA (1 à 25) - (13)
Expérience 2		RA (1 à 25)	RA (1 à 25)
		RA (1 à 25) - (12)	RA (1 à 25) - (12)
		RA (1 à 25) + (12)	RA (1 à 25) + (12)

RA : Reconstitution Aromatique

### • Expérience 2

Les fractions aromatiques provenaient des vins PL après 3 mois d'élevage. Seules les modalités **FX10/B28** et **522D/B28** ont été comparées. Le panel était constitué de 16 dégustateurs (8 hommes, 8 femmes) âgés de  $32 \pm 6,4$  ans (moyenne  $\pm$  écart type). Il a été demandé aux juges de comparer les RA totales (1 à 25), les RA ne contenant pas la fraction 12 puis les RA contenant la fraction 12 de l'autre modalité.

## Chapitre 5 : Identification des molécules présentes dans la fraction d'intérêt

### Matériel et méthodes

#### Analyse de la fraction 12 par GC-MS

Les fractions 12 issues des vins PL après 3 mois d'élevage ont été analysées par GC-MS. Trois mL d'eau milliQ sont ajoutés à 1 mL de la fraction afin d'obtenir un TAV de 12 % v/v. Le mélange est extrait deux fois successives par 2 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). A l'issue de chaque extraction, les phases organiques et aqueuses sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les deux phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 20 mL et les traces d'eau sont éliminées à l'aide de sulfate de sodium anhydre. L'extrait est ensuite concentré sous flux de diazote pour atteindre un volume final de 250  $\mu$ L. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 46**.

L'acquisition des résultats est effectuée en utilisant le logiciel MPS2-GCMS Data Analysis pourvu de la bibliothèque NIST 2008 MS (US National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA). La tentative d'identification des composés présents dans la fraction 12 est faite par la comparaison de leur spectre de masse et leur temps de rétention avec ceux des composés de références analysés dans les mêmes conditions.

**Tableau 46.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour l'analyse de la fraction 12.

Principe :	Gaz vecteur :
Extraction liquide-liquide	Hélium N55
Appareil :	Débit : 2 mL/min
Agilent 7890A	Programmation de température :
Colonne :	Température initiale : 40 °C
BP21	3 °C/min jusqu'à 220 °C maintenu pendant 20 min
50 m x 0,32 mm	Détecteur :
Epaisseur de film 0,25 $\mu$ m	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique
Injecteur :	Appareil : Agilent 5975C
Mode : <i>splitless</i> (45 s)	Energie d'ionisation : 70 eV
Volume injecté : 1 $\mu$ L	Température : 280 °C
Température : 250 °C	Détection en mode SCAN ( <i>m/z</i> 40 à 350)

#### Composés de référence commerciaux

L'alcool benzylique (99,8 % pureté), le phényléthanol (99 %), le 3-méthylbutan-1-ol (99 %), le 2-méthylbutan-1-ol (99 %) et le malate de diéthyle (99 %) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). La 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one (97 %) a été obtenu auprès de Lancaster (USA).

### *Synthèse du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle*

Le composé n'étant pas disponible au laboratoire et le délai de livraison du fabricant s'élevant à plusieurs mois, nous avons choisi, dans un premier temps, de le synthétiser à partir de l'acide correspondant. Sa synthèse a permis son identification dans la fraction 12 ainsi qu'une estimation de sa concentration dans les vins (semi-quantification).

Pour cela, 1 g d'acide 2-hydroxy-3-méthylbutanoïque (99 %, Sigma-Aldrich), 50 mL d'éthanol (99,9 %, Merck, Allemagne), 5/6 gouttes d'acide sulfurique à 2M et quelques grains de pierre ponce sont introduits dans un ballon. Le tout est chauffé à reflux pendant trois heures. Le composé est ensuite purifié sur colonne de silice et élué avec un solvant éther/isohexane (50/50 v/v). La partie solvant a ensuite été évaporée au Rotavapor®. Une poudre blanchâtre a été obtenue, pesée à 0,813 g et dissoute dans 25 mL d'éthanol pour obtenir une concentration théorique en ester de 32,52 g/L, en supposant que la réaction d'estérification soit totale. Cette hypothèse est étayée par la concentration largement excessive en l'un des réactifs (l'éthanol). L'analyse GC-MS du tout réactionnel montre un seul pic chromatographique, dont le spectre de masse est cohérent avec celui de l'ester concerné. Son aire représente 96 % de l'air totale des ions. Ces observations tendent à confirmer l'hypothèse d'une réaction totale.

### **Quantification des composés dans le vin**

Les différents composés ont été dosés dans les vins PL après 3 mois d'élevage (triplicats biologiques). Le phényléthanol, le 3-méthylbutan-1-ol et le 2-méthylbutan-1-ol ont été quantifiés par la méthode de dosage GC-FID des alcools supérieurs décrite p.217. La température du four ainsi que la programmation ont été modifiées afin de pouvoir doser dans la même méthode le phényléthanol (40 °C pendant 5 min puis 4 °/min jusqu'à 100 °C et enfin 2 °C/min jusqu'à 160 °C, température maintenue 5 min).

L'alcool benzylique, le malate de diéthyle, la 2-méthyltétrahydrothiophène-3-one et le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle ont été quantifiés par GC-MS après une extraction liquide/liquide au dichlorométhane. Au préalable, 20 µL d'une solution d'étalon interne (octan-3-ol à 1,04 g/L, en solution alcoolique) sont ajoutés à 100 mL de vin. Le mélange est extrait successivement avec 8, 4 et 4 mL de dichlorométhane pendant 5 minutes sous agitation (700 tr/min). Les phases organiques et aqueuses sont séparées par décantation dans une ampoule pendant 5 minutes. Les trois phases organiques sont assemblées dans un pilulier de 20 mL et l'émulsion restante est cassée à l'aide d'un barreau magnétique tournant lentement. L'extrait organique obtenu est séché sur sulfate de sodium anhydre et concentré au Rotavapor® (température du bain maintenue constante à 20 °C) jusqu'à obtenir un volume d'environ 1 mL, puis sous flux de diazote jusqu'à un volume final de 250 µL. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 46**. Le **Tableau 47** présente les ions utilisés pour la détection et la quantification des différents composés.

Une courbe de calibration est réalisée en duplicata à partir des composés de référence (commerciaux et synthétisés). Un vin est supplémenté avec 5 concentrations croissantes des composés à doser (**Tableau 47**). Les rapports entre les surfaces des pics de l'ion quantificateur du composé et de l'étalon interne ainsi que l'équation de la droite de régression sont déterminés à l'aide du logiciel Enhanced ChemStation, MSD ChemStation,

Agilent Technologie Inc. Les coefficients de corrélation trouvés pour chaque composé sont indiqués dans le **Tableau 47**.

**Tableau 47.** Ions spécifiques (ions de quantification en gras) utilisés pour la détection des composés présents dans la fraction 12 et données de la courbe de calibration réalisée pour quatre composés.

Composés	Ions (m/Z)	Gamme de concentration (µg/L)	R <sup>2</sup>
Alcool benzylique	<b>108</b> , 107, 79	330 à 720	0,9967
Malate de diéthyle	<b>117</b> , 71, 89	330 à 720	0,9973
2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one	<b>60</b> , 116, 88	5 à 85	0,9999
2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle	<b>73</b> , 55, 76	5 à 85	0,9998
Octan-3-ol (EI)	<b>83</b> , 101, 43		

## Chapitre 6 : Quantification dans le vin de la 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one et du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle

### Matériel et méthodes

La 2-méthyltétrahydrothiophèn-3-one et le 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle (2OH3C1C4C2) ont été quantifiés ou semi-quantifiés dans toutes les modalités issues des vins WEC 12, PL et SE. Les vins de l'expérimentation WEC11 n'ont pas pu être analysés par manque de volume. Les échantillons ont été préparés selon le même protocole et dans les mêmes conditions chromatographiques décrits dans le chapitre 5.I.B. Aucun réplicat analytique n'a pu être réalisé.

Le 2OH3C1C4C2 présente une structure chimique proche du leucate d'éthyle (2-hydroxy-4-méthylpentanoate d'éthyle), composé intéressant pour son rôle d'exhausteur de l'arôme fruité récemment mis en évidence au laboratoire. Le comportement dans le vin de ces deux esters ainsi que l'influence du couple levures/BL sur leurs concentrations seront comparés et discutés. La teneur en leucate d'éthyle des vins WEC12, PL et SE ainsi que des vins réalisés en micro-vinification au laboratoire a donc également été déterminée par la méthode de dosage des esters par HS-SPME-GC-MS décrite au chapitre 2.II.A.2. L'étalon interne utilisé pour sa quantification est l'hexanoate d'éthyle-d11. Les ions sélectionnés pour le dosage du leucate d'éthyle ont pour rapport m/z = 69 pour l'ion quantificateur et m/z = 87 et m/z = 104 pour les ions identificateurs.

Afin de vérifier la présence d'énantiomères du 2OH3C1C4C2 et leur distribution, tous les échantillons ont également été analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne chirale ( $\gamma$ -cyclodextrine). Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont résumées dans le **Tableau 48**. Les ions utilisés pour la détection sont les mêmes que ceux indiqués précédemment (chapitre 5.I.B.).

**Tableau 48.** Conditions expérimentales de la GC-MS pour l'analyse des énantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle.

Principe :	Gaz vecteur :
Extraction liquide-liquide	Hélium N55
Appareil :	Débit : 1,5 mL/min
Agilent 6890N	Programmation de température :
Colonne :	40 °C tenu 1 min
Astec® CHIRALDEX G-TA	1 °C/min jusqu'à 100 °C
50 m x 0,25 mm	3 °C/min jusqu'à 180 °C maintenu pendant 5 min
Épaisseur de film 0,12 µm	Détecteur :
Injecteur :	Spectromètre de masse fonctionnant en impact électronique
Mode : <i>split</i> (ratio 10 :1)	Appareil : Agilent 5973 <i>inert</i>
Débit de purge : 15 mL/min	Energie d'ionisation : 70 eV
Volume injecté : 1 µL	Température : 280 °C
Température : 200 °C	Détection en mode SIM

Enfin, l'étude olfactive des énantiomères R et S du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle synthétisés à notre demande par la société Hangzhou Imaginechem Co., Ltd (98 %, Hangzhou, Chine) a été réalisée par GC-O. Un panel constitué de 6 juges entraînés (3 hommes, 3 femmes âgés de  $34 \pm 9$  ans) a été utilisé lors de l'analyse descriptive. Les caractéristiques techniques de l'appareil utilisé et les conditions expérimentales de la méthode sont présentées dans le **Tableau 49**.

**Tableau 49.** Conditions expérimentales de la GC-O pour l'étude olfactive des énantiomères du 2-hydroxy-3-méthylbutanoate d'éthyle.

Appareil :	Gaz vecteur :
HP 4890A	Hydrogène 5.5
Colonne :	Débit : 1,5 mL/min
BP21	Programmation de température :
50 m x 0,32 mm	35 °C tenu 1 min
Épaisseur de film 0,25 µm	4 °C/min jusqu'à 100 °C
Injecteur :	200 °C maintenu pendant 10 min
Volume injecté : 1 µL	Détecteur :
Température : 250 °C	Olfactory detector SGE

## ANNEXE 2 : Concentrations en esters dosés dans les vins WEC11, WEC12, PL et SE à différents stades de leur élaboration

WEC11 (moyenne des réplicats ± intervalle de confiance à 5 % en, µg/L)

		après FA					après FML				
Esters		XR	52D2	FX10	Esters	XR/B28	XR/450	522/B28	522/450	FX10/B28	FX10/450
C3C2		331,9 ± 0,6	425 ± 2	260 ± 4	C3C2	279 ± 10	278 ± 8	445 ± 5	438 ± 11	258 ± 19	260 ± 14
C4C2		182 ± 8	193 ± 11	196 ± 7	C4C2	183 ± 6	162 ± 12	218 ± 24	208 ± 14	192 ± 1	188 ± 14
C6C2		342 ± 17	406 ± 36	482 ± 39	C6C2	279 ± 11	284 ± 24	310 ± 51	311 ± 44	348 ± 12	350 ± 51
C8C2		353 ± 20	371 ± 52	402 ± 7	C8C2	284 ± 9	337 ± 22	359 ± 10	356 ± 23	433 ± 4	443 ± 4
C10C2		173 ± 19	186 ± 23	178 ± 12	C10C2	136 ± 18	149 ± 39	159 ± 43	160 ± 19	160 ± 30	169 ± 43
C12C2		19 ± 1	13,8 ± 0,4	23 ± 1	C12C2	12 ± 2	10,2 ± 0,6	11 ± 2	11 ± 1	12,2 ± 0,9	11 ± 2
iC4C2		29,0 ± 0,5	32 ± 2	26,3 ± 0,8	iC4C2	43 ± 2	36 ± 2	45 ± 3	46 ± 3	35 ± 1	31 ± 1
2-mC4C2		5,7 ± 0,2	6,8 ± 0,1	3,60 ± 0,07	2-mC4C2	8,8 ± 0,7	7,2 ± 0,2	11 ± 1	10 ± 1	5,0 ± 0,7	3 ± 1
iC5C2		7,99 ± 0,06	8,41 ± 0,02	5,48 ± 0,03	iC5C2	12,4 ± 0,5	10,5 ± 0,1	13,3 ± 0,7	12 ± 2	7,9 ± 0,1	7 ± 1
PhC2C2		2,3 ± 0,1	3,57 ± 0,07	2,6 ± 0,2	PhC2C2	2,3 ± 0,1	2,46 ± 0,08	3,8 ± 0,2	3,7 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,2
C2C3		19,0 ± 0,7	25 ± 2	23,8 ± 0,8	C2C3	18 ± 2	13,9 ± 0,5	24 ± 2	20 ± 2	21,6 ± 0,6	21 ± 2
C2iC4		47,7 ± 0,3	64,9 ± 0,9	67 ± 2	C2iC4	41 ± 1	33 ± 2	56 ± 4	51 ± 4	56,3 ± 0,1	46 ± 4
C2C4		0,79 ± 0,09	1,78 ± 0,09	1,70 ± 0,07	C2C4	0,88 ± 0,07	0,82 ± 0,04	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,5	1,60 ± 0,00	1,6 ± 0,2
C2iC5		1324 ± 19	1869 ± 265	1879 ± 177	C2iC5	1173 ± 72	1075 ± 63	1411 ± 77	1330 ± 246	1723 ± 58	1521 ± 229
C2C6		6,9 ± 0,2	10,7 ± 0,7	10,3 ± 0,8	C2C6	7 ± 2	9 ± 1	9 ± 3	10,3 ± 0,9	10 ± 1	9 ± 3
C2C8		0,30 ± 0,02	0,4 ± 0,1	0,42 ± 0,04	C2C8	0,13 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,06	0,21 ± 0,03
C2-2PhC2		109 ± 10	208 ± 11	134 ± 3	C2-2PhC2	74 ± 5	78 ± 13	132 ± 25	151 ± 2	106 ± 3	132 ± 25
C4C1		0,90 ± 0,01	1,06 ± 0,03	0,94 ± 0,03	C4C1	1,0 ± 0,1	0,69 ± 0,01	1,21 ± 0,07	1,1 ± 0,1	0,92 ± 0,04	0,9 ± 0,1
C6C1		1,91 ± 0,02	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	C6C1	1,44 ± 0,07	1,37 ± 0,07	1,95 ± 0,06	1,9 ± 0,1	1,68 ± 0,09	1,55 ± 0,06
C8C1		1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,96 ± 0,07	C8C1	1,54 ± 0,06	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
C10C1		0,85 ± 0,04	0,90 ± 0,09	0,85 ± 0,01	C10C1	0,60 ± 0,05	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,91 ± 0,09	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1
C5C2		0,7 ± 0,1	1,04 ± 0,09	0,36 ± 0,01	C5C2	0,84 ± 0,07	0,96 ± 0,03	0,98 ± 0,09	0,99 ± 0,09	0,82 ± 0,03	0,98 ± 0,09
C7C2		1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1	0,81 ± 0,01	C7C2	1,1 ± 0,2	0,95 ± 0,07	1,30 ± 0,05	1,32 ± 0,09	0,83 ± 0,05	0,78 ± 0,05
C9C2		1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1	0,82 ± 0,02	C9C2	2,0 ± 0,8	1,5 ± 0,3	3 ± 1	2,1 ± 0,4	1,3 ± 0,1	1 ± 1
C4iC5		0,73 ± 0,06	0,84 ± 0,08	0,72 ± 0,03	C4iC5	0,71 ± 0,05	0,77 ± 0,08	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,75 ± 0,06	0,8 ± 0,1
C6iC5		2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,4	2,99 ± 0,05	C6iC5	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,3	2,3 ± 0,1	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,3
C8iC5		8 ± 1	7,9 ± 0,8	8,0 ± 0,7	C8iC5	7 ± 1	5,5 ± 0,9	8 ± 2	7,2 ± 0,3	8 ± 2	7 ± 2
hexC2		2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,0 ± 0,2	hexC2	2,0 ± 0,3	1,9 ± 0,1	1,91 ± 0,07	1,7 ± 0,4	2,0 ± 0,1	1,91 ± 0,07
C6iC4		0,26 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,00	C6iC4	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,02
gerC1		0,23 ± 0,03	0,36 ± 0,05	0,48 ± 0,03	gerC1	0,20 ± 0,05	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,36 ± 0,07	0,31 ± 0,03	0,39 ± 0,04
dhCimC2		1,9 ± 0,2	2,2 ± 0,3	1,6 ± 0,1	dhCimC2	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,43 ± 0,09	1,5 ± 0,1
cinC2		2,67 ± 0,05	2,4 ± 0,2	2,74 ± 0,07	cinC2	2,30 ± 0,08	2,43 ± 0,02	2,21 ± 0,03	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,1	2,61 ± 0,03



Esters	après 12 mois					
	XR/B28	XR/450	522/B28	522/450	FX10/B28	FX10/450
C3C2	277 ± 7	250 ± 20	394 ± 35	293 ± 32	204 ± 4	222 ± 4
C4C2	123,50 ± 0,01	138 ± 5	143 ± 14	169 ± 38	136 ± 5	158 ± 49
C6C2	180 ± 3	217 ± 12	207 ± 28	228 ± 3	210 ± 17	202 ± 16
C8C2	179 ± 19	203 ± 9	195 ± 20	209 ± 3	204 ± 9	221 ± 14
C10C2	59 ± 7	72 ± 3	64 ± 3	77 ± 6	73 ± 2	81 ± 4
C12C2	8,0 ± 0,4	10,01 ± 0,04	6,51 ± 0,08	9,43 ± 0,08	7,6 ± 0,7	13,5 ± 0,5
iC4C2	53 ± 8	59 ± 3	55 ± 4	66 ± 10	50,8 ± 0,4	60 ± 3
2-mC4C2	14,6 ± 0,1	13,2 ± 0,4	20 ± 4	16,1 ± 0,3	8,55 ± 0,05	8,8 ± 0,1
iC5C2	18,4 ± 0,3	24,8 ± 0,9	22 ± 1	26 ± 3	19 ± 2	22 ± 2
PhC2C2	6,3 ± 0,1	6,4 ± 0,1	10,9 ± 0,6	11,0 ± 0,8	5,3 ± 0,4	5,9 ± 0,7
C2C3	18 ± 1	15,6 ± 0,2	22,7 ± 0,3	19,15 ± 0,06	21,9 ± 0,4	17,1 ± 0,9
C2C4	31 ± 2	32,3 ± 0,6	39 ± 2	43 ± 2	41,8 ± 0,4	39 ± 2
C2C4	1,23 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,32 ± 0,01	1,33 ± 0,37	0,9 ± 0,2	1 ± 1
C2C5	681 ± 29	700 ± 35	866 ± 4	924 ± 15	967 ± 29	1008 ± 37
C2C6	4,13 ± 0,09	5,3 ± 0,2	4,7 ± 0,4	5,9 ± 0,4	5,7 ± 0,4	5,2 ± 0,4
C2C8	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,08 ± 0,00
C2-2PhC2	118 ± 2	101 ± 12	185 ± 27	171 ± 7	166 ± 13	152 ± 20
C4C1	0,85 ± 0,00	0,85 ± 0,05	1,1 ± 0,1	1,09 ± 0,05	0,89 ± 0,05	0,95 ± 0,01
C6C1	1,21 ± 0,05	1,17 ± 0,05	1,4 ± 0,1	1,43 ± 0,08	1,24 ± 0,01	1,29 ± 0,09
C8C1	1,02 ± 0,06	1,06 ± 0,01	1,17 ± 0,05	1,20 ± 0,08	1,24 ± 0,05	1,18 ± 0,03
C10C1	0,31 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,48 ± 0,03
C5C2	0,56 ± 0,07	0,41 ± 0,03	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,59 ± 0,04	1,00 ± 0,05
C7C2	0,70 ± 0,04	0,72 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,81 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,59 ± 0,03
C9C2	0,67 ± 0,00	0,57 ± 0,04	0,78 ± 0,02	0,66 ± 0,05	0,66 ± 0,03	0,60 ± 0,05
C4C5	0,49 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,63 ± 0,03	0,56 ± 0,06	0,43 ± 0,05	0,52 ± 0,04
C6C5	1,37 ± 0,04	1,43 ± 0,05	1,46 ± 0,09	1,45 ± 0,01	1,51 ± 0,03	1,46 ± 0,02
C8C5	2,1 ± 0,2	2,17 ± 0,07	2,3 ± 0,1	2,14 ± 0,07	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,1
hexC2	1,60 ± 0,09	1,72 ± 0,02	1,4 ± 0,2	1,62 ± 0,01	1,56 ± 0,02	1,8 ± 0,2
C6C4	0,12 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01
gerC1	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00
dhCmC2	2,2 ± 0,2	2,20 ± 0,21	1,9 ± 0,2	1,93 ± 0,04	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,2
cinC2	2,36 ± 0,07	2,31 ± 0,04	2,24 ± 0,05	2,29 ± 0,06	2,55 ± 0,01	2,5 ± 0,2

WEC12 (moyenne des répliquats  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % en,  $\mu\text{g/L}$ )

Esters	après FA				après FML					
	XR	522D	FX10	Esters	XR/B28	XR/450	522D/B28	522D/450	FX10/B28	FX10/450
C3C2	49 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	C3C2	66 $\pm$ 2	65 $\pm$ 2	63,1 $\pm$ 0,9	63 $\pm$ 2	49 $\pm$ 3	48 $\pm$ 2
C4C2	218 $\pm$ 8	210 $\pm$ 4	224 $\pm$ 7	C4C2	209 $\pm$ 6	208 $\pm$ 4	204 $\pm$ 4	205 $\pm$ 4	220 $\pm$ 7	218 $\pm$ 4
C6C2	749 $\pm$ 27	744 $\pm$ 20	1012 $\pm$ 36	C6C2	546 $\pm$ 20	529 $\pm$ 5	542 $\pm$ 6	539 $\pm$ 5	719 $\pm$ 26	715 $\pm$ 20
C8C2	2431 $\pm$ 74	2080 $\pm$ 47	2949 $\pm$ 118	C8C2	1908 $\pm$ 122	1779 $\pm$ 37	1918 $\pm$ 12	1865 $\pm$ 81	2194 $\pm$ 118	2166 $\pm$ 64
C10C2	1199 $\pm$ 37	1047 $\pm$ 53	1345 $\pm$ 15	C10C2	1184 $\pm$ 99	1076 $\pm$ 25	1147 $\pm$ 10	1123 $\pm$ 107	1114 $\pm$ 40	1152 $\pm$ 22
C12C2	120 $\pm$ 6	92 $\pm$ 6	136 $\pm$ 9	C12C2	120 $\pm$ 14	113 $\pm$ 6	123 $\pm$ 7	104 $\pm$ 16	96 $\pm$ 5	106 $\pm$ 3
iC4C2	158 $\pm$ 0,4	19,6 $\pm$ 0,6	15 $\pm$ 1	iC4C2	51,7 $\pm$ 0,7	50 $\pm$ 1	58,0 $\pm$ 0,9	56 $\pm$ 1	49 $\pm$ 4	48 $\pm$ 3
2-mC4C2	1,63 $\pm$ 0,05	1,95 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,09	2-mC4C2	5,2 $\pm$ 0,1	5,1 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2
iC5C2	2,7 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,1	iC5C2	7,2 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,2	8,9 $\pm$ 0,3	8,8 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,2
PhC2C2	1,09 $\pm$ 0,06	1,53 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,03	PhC2C2	1,37 $\pm$ 0,04	1,37 $\pm$ 0,03	2,29 $\pm$ 0,04	2,10 $\pm$ 0,04	1,14 $\pm$ 0,04	1,12 $\pm$ 0,04
C2C3	27,3 $\pm$ 0,5	35 $\pm$ 2	34 $\pm$ 2	C2C3	25,5 $\pm$ 0,7	25,0 $\pm$ 0,3	32 $\pm$ 3	32 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2	31 $\pm$ 2
C2iC4	134 $\pm$ 3	189 $\pm$ 9	165 $\pm$ 5	C2iC4	112 $\pm$ 1	111,6 $\pm$ 0,5	160 $\pm$ 8	161 $\pm$ 10	141 $\pm$ 5	142 $\pm$ 3
C2C4	2,53 $\pm$ 0,07	3,70 $\pm$ 0,15	3,8 $\pm$ 0,4	C2C4	1,62 $\pm$ 0,07	1,51 $\pm$ 0,07	2,62 $\pm$ 0,05	3,7 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1
C2iC5	4495 $\pm$ 137	7076 $\pm$ 134	6944 $\pm$ 545	C2iC5	3172 $\pm$ 55	3232 $\pm$ 33	5213 $\pm$ 121	5375 $\pm$ 163	5188 $\pm$ 341	5248 $\pm$ 344
C2C6	211 $\pm$ 6	266 $\pm$ 2	279 $\pm$ 38	C2C6	96 $\pm$ 1	99 $\pm$ 1	135 $\pm$ 3	142 $\pm$ 2	144 $\pm$ 14	154 $\pm$ 19
C2C8	2,7 $\pm$ 0,1	3,07 $\pm$ 0,09	1,48 $\pm$ 0,07	C2C8	0,36 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,01
C2 2-PhC2	764 $\pm$ 23	1492 $\pm$ 35	1270 $\pm$ 147	C2 2-PhC2	500 $\pm$ 13	530 $\pm$ 11	1139 $\pm$ 32	1125 $\pm$ 40	815 $\pm$ 83	868 $\pm$ 83
C4C1	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	C4C1	0,02 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,3 $\pm$ 0,1	0,26 $\pm$ 0,02	0,23 $\pm$ 0,01
C6C1	0,66 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,03	C6C1	0,43 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,02
C8C1	1,66 $\pm$ 0,06	1,55 $\pm$ 0,02	2,0 $\pm$ 0,1	C8C1	1,24 $\pm$ 0,06	1,20 $\pm$ 0,01	1,19 $\pm$ 0,01	1,26 $\pm$ 0,05	1,57 $\pm$ 0,08	1,44 $\pm$ 0,05
C10C1	1,00 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,01	C10C1	0,92 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,04	0,91 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,02
C5C2	0,59 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,04	0,56 $\pm$ 0,03	C5C2	0,75 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,03
C7C2	1,10 $\pm$ 0,03	0,91 $\pm$ 0,04	0,57 $\pm$ 0,05	C7C2	0,59 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,08	0,6 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03
C9C2	3,01 $\pm$ 0,04	1,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2	C9C2	1,43 $\pm$ 0,05	1,32 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,05	1,34 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,09
C4iC5	0,50 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02	C4iC5	0,43 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02
C6iC5	4,9 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,1	C6iC5	3,4 $\pm$ 0,2	3,18 $\pm$ 0,04	3,61 $\pm$ 0,04	3,51 $\pm$ 0,06	3,2 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1
C8iC5	11,9 $\pm$ 0,6	10,1 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 0,4	C8iC5	11,7 $\pm$ 0,6	10,2 $\pm$ 0,2	12,1 $\pm$ 0,2	11,5 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,5	8,9 $\pm$ 0,3
hexC2	2,8 $\pm$ 0,1	3,02 $\pm$ 0,08	4,1 $\pm$ 0,3	hexC2	3,2 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1	3,43 $\pm$ 0,07	3,3 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,3
C6iC4	0,33 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,02	C6iC4	0,22 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02
gerC1	9 $\pm$ 2	3,4 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,3	gerC1	8 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	6 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2	1,6 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2
dhCinC2	0,88 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,02	dhCinC2	0,80 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,06
CinC2	0,29 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	CinC2	0,23 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,03

Esters	après 3 mois					après 6 mois					
	XR/B28	XR/450	522D/B28	522D/450	FX10/450	XR/B28	XR/450	522D/B28	522D/450	FX10/B28	FX10/450
C3C2	74 ± 3	73 ± 2	74 ± 1	74 ± 2	57 ± 2	85 ± 4	85 ± 5	88,5 ± 0,8	85 ± 3	71 ± 2	70 ± 2
C4C2	206 ± 3	204 ± 4	202 ± 5	199 ± 4	213 ± 4	195 ± 4	196 ± 5	194 ± 3	195 ± 3	204 ± 3	206 ± 4
C6C2	503 ± 7	500 ± 10	496 ± 11	489 ± 7	676 ± 15	464 ± 9	469 ± 13	465 ± 10	464 ± 12	621 ± 6	615 ± 12
C8C2	1171 ± 17	1167 ± 17	1070 ± 86	1048 ± 64	1545 ± 61	932 ± 8	997 ± 49	890 ± 30	941 ± 47	1267 ± 43	1256 ± 27
C10C2	771 ± 11	780 ± 12	687 ± 109	662 ± 69	834 ± 24	738 ± 31	774 ± 61	694 ± 22	716 ± 74	855 ± 6	822 ± 71
C12C2	79 ± 3	82 ± 2	67 ± 10	62 ± 6	73 ± 2	102 ± 2	102 ± 11	84 ± 3	86 ± 12	100 ± 8	95 ± 12
iC4C2	67 ± 2	68 ± 2	78 ± 1	79 ± 1	66 ± 5	89,3 ± 0,7	89 ± 3	104 ± 2	104 ± 2	87 ± 1	88 ± 2
2-mtC4C2	7,1 ± 0,3	7,1 ± 0,2	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,2	4,4 ± 0,3	9,2 ± 0,1	9,3 ± 0,2	9,8 ± 0,4	10,1 ± 0,2	5,70 ± 0,05	5,8 ± 0,2
iC5C2	10,3 ± 0,6	9,9 ± 0,4	10,9 ± 0,6	11,2 ± 0,3	9,0 ± 0,5	12,3 ± 0,3	13 ± 1	14,9 ± 0,8	16 ± 2	11,1 ± 0,1	12 ± 1
PhC2C2	1,54 ± 0,08	1,50 ± 0,06	2,32 ± 0,05	2,33 ± 0,06	1,18 ± 0,04	1,18 ± 0,04	1,23 ± 0,07	1,90 ± 0,04	1,87 ± 0,03	0,91 ± 0,02	0,89 ± 0,01
C2C3	23,3 ± 0,3	23,5 ± 0,4	30 ± 3	31 ± 2	29 ± 2	22,3 ± 0,9	22 ± 2	29 ± 1	28 ± 1	28,1 ± 0,3	27 ± 1
C2C4	103,3 ± 0,8	103,1 ± 0,7	149 ± 9	146 ± 8	130 ± 3	92 ± 2	92 ± 3	131 ± 1	131 ± 2	116 ± 2	117 ± 3
C2C5	2,2 ± 0,1	1,71 ± 0,09	3,2 ± 0,3	3,07 ± 0,28	3,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,55 ± 0,09	2,6 ± 0,3	2,33 ± 0,08	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2
C2C6	2919 ± 43	2820 ± 32	4824 ± 102	4594 ± 123	4779 ± 281	2322 ± 27	2414 ± 52	3754 ± 179	3999 ± 48	3679 ± 22	3888 ± 85
C2C8	83 ± 1	75,4 ± 0,4	118 ± 3	107 ± 2	128 ± 14	50,8 ± 0,8	58 ± 2	75,2 ± 0,7	85 ± 2	79,8 ± 0,7	92 ± 2
C2.2-PhC2	0,19 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,27 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01
C4C1	448 ± 5	404 ± 6	906 ± 20	828 ± 26	719 ± 68	222 ± 5	255 ± 13	456 ± 8	512 ± 13	360 ± 3	402 ± 5
C6C1	0,1 ± 0,1	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,08	0,2 ± 0,1	0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,28 ± 0,02
C8C1	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,04
C10C1	0,77 ± 0,02	0,76 ± 0,02	0,71 ± 0,04	0,68 ± 0,05	1,01 ± 0,04	0,67 ± 0,09	0,72 ± 0,08	0,7 ± 0,1	0,72 ± 0,06	0,9 ± 0,1	0,94 ± 0,05
C5C2	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,49 ± 0,09	0,46 ± 0,07	0,63 ± 0,01	0,49 ± 0,09	0,55 ± 0,08	0,46 ± 0,08	0,5 ± 0,1	0,58 ± 0,06	0,60 ± 0,09
C7C2	0,73 ± 0,02	0,74 ± 0,04	0,88 ± 0,05	0,82 ± 0,05	0,72 ± 0,04	0,78 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,84 ± 0,02	0,88 ± 0,09	0,73 ± 0,05	0,77 ± 0,07
C9C2	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,02	0,46 ± 0,05	0,46 ± 0,04	0,37 ± 0,02	0,45 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,47 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,36 ± 0,01
C4C5	0,43 ± 0,00	0,43 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,02
C6C5	2,07 ± 0,03	2,09 ± 0,03	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,33 ± 0,07	1,92 ± 0,09	2,1 ± 0,1	1,93 ± 0,02	2,0 ± 0,2	2,27 ± 0,02	2,23 ± 0,03
C8C5	6,2 ± 0,1	6,31 ± 0,04	6 ± 1	5,3 ± 0,7	6,0 ± 0,1	6,3 ± 0,8	7 ± 1	6,4 ± 0,8	7 ± 1	7,0 ± 0,1	6,8 ± 0,9
hexC2	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	4,6 ± 0,4	3,22 ± 0,08	3,19 ± 0,06	3,49 ± 0,08	3,45 ± 0,03	4,54 ± 0,02	4,5 ± 0,1
C6C4	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01
gerC1	6 ± 1	5,7 ± 0,9	2,9 ± 0,6	2,8 ± 0,7	1,1 ± 0,2	5,2 ± 0,8	5,8 ± 0,9	3,4 ± 0,5	3,6 ± 0,7	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2
dhCmC2	0,74 ± 0,02	0,71 ± 0,01	0,82 ± 0,01	0,78 ± 0,01	0,63 ± 0,05	0,54 ± 0,01	0,57 ± 0,02	0,62 ± 0,01	0,62 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,01
CmC2	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01

Esters	après 12 mois					
	XR/B28	XR/450	522D/B28	522D/450	FX10/B28	FX10/450
C3C2	100 ± 4	99 ± 3	98 ± 12	101 ± 2	85 ± 3	83 ± 7
C4C2	191 ± 3	194 ± 2	188 ± 12	190 ± 6	201 ± 2	202 ± 10
C6C2	479 ± 8	482 ± 10	471 ± 23	464 ± 20	629 ± 14	636 ± 16
C8C2	947 ± 138	915 ± 91	910 ± 141	864 ± 86	1219 ± 148	1212 ± 68
C10C2	696 ± 165	668 ± 102	635 ± 135	608 ± 65	754 ± 117	755 ± 47
C12C2	97 ± 28	90 ± 11	80 ± 21	74 ± 6	95 ± 23	91 ± 12
iC4C2	111 ± 3	111,9 ± 0,3	126 ± 13	128 ± 4	107,7 ± 0,3	108 ± 5
2-mC4C2	11,3 ± 0,4	11,50 ± 0,02	12,2 ± 0,9	12,3 ± 0,5	6,94 ± 0,09	7,1 ± 0,3
iC5C2	17,9 ± 0,2	18 ± 1	21 ± 3	21 ± 1	15,5 ± 0,8	16 ± 1
PhC2C2	1,50 ± 0,02	1,52 ± 0,03	2,4 ± 0,2	2,27 ± 0,06	1,12 ± 0,04	1,09 ± 0,02
C2C3	21,4 ± 0,3	21,7 ± 0,4	27 ± 2	27,4 ± 0,4	27,2 ± 0,9	26 ± 2
C2C4	87 ± 1	88 ± 2	121 ± 8	123 ± 4	111 ± 2	111 ± 6
C2C4	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,5	0,1 ± 0,2
C2C5	2120 ± 30	2248 ± 34	3535 ± 252	3701 ± 140	3581 ± 63	3757 ± 212
C2C6	35,2 ± 0,4	40,8 ± 0,6	53 ± 3	59 ± 2	57 ± 1	71 ± 2
C2C8	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C2.2-PhC2	187 ± 3	210 ± 4	388 ± 23	422 ± 11	315 ± 9	361 ± 12
C4C1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
C6C1	0,38 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,36 ± 0,08	0,40 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,48 ± 0,02
C8C1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
C10C1	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,2
C5C2	0,88 ± 0,07	0,81 ± 0,03	0,9 ± 0,2	1,01 ± 0,03	0,72 ± 0,09	0,7 ± 0,4
C7C2	0,6 ± 0,2	0,49 ± 0,06	0,52 ± 0,05	0,49 ± 0,08	0,40 ± 0,05	0,41 ± 0,06
C9C2	2 ± 2	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,4
C4C5	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01
C6C5	2,1 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,5	2,0 ± 0,4	2,2 ± 0,5	2,2 ± 0,3
C8C5	7 ± 3	6 ± 2	6 ± 3	6 ± 2	7 ± 2	7 ± 1
hexC2	3,03 ± 0,04	3,03 ± 0,04	3,2 ± 0,1	3,14 ± 0,05	4,19 ± 0,06	4,3 ± 0,1
C6C4	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02
gerC1	5 ± 2	5 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	1,0 ± 0,4	1,1 ± 0,3
dhCmC2	0,61 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,69 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,53 ± 0,01
CmC2	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,00

Pessac-Léognan (moyenne des répliquats  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % en,  $\mu\text{g/L}$ )

Esters	après FA			après FML			après 3 mois			
	522D	FX10	FX10/B28	522D/450	FX10/B28	FX10/450	522D/B28	522D/450	FX10/B28	FX10/450
C3C2	187 ± 2	132,9 ± 0,6	142 ± 2	198 ± 6	142 ± 2	141,8 ± 1,5	201 ± 2	197 ± 2	151 ± 2	149 ± 1
C4C2	155,4 ± 0,2	168,8 ± 0,7	150 ± 1	151,7 ± 0,3	157 ± 1	159 ± 1	147,1 ± 0,5	145,1 ± 0,8	156,8 ± 0,6	153,5 ± 0,7
C6C2	304 ± 2	355,65 ± 0,03	238 ± 5	238 ± 3	268 ± 3	275 ± 3	196 ± 4	195 ± 3	232 ± 3	224 ± 6
C8C2	308 ± 2	400 ± 1	153 ± 14	154 ± 7	190 ± 9	188 ± 13	74 ± 4	69 ± 3	101 ± 5	97 ± 3
C10C2	185 ± 3	267 ± 6	53 ± 5	47 ± 5	74 ± 2	74 ± 3	19,6 ± 0,7	20,3 ± 0,9	28 ± 1	26 ± 1
C12C2	98 ± 0,2	19,5 ± 0,4	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,3	2,1 ± 0,2	0,17 ± 0,01	0,30 ± 0,07	0,22 ± 0,03	0,26 ± 0,05
iC4C2	43,7 ± 0,7	35,3 ± 0,4	68 ± 1	67,7 ± 1,0	53,9 ± 0,7	54,2 ± 0,9	83,4 ± 0,5	81,0 ± 0,6	66,7 ± 0,6	65,8 ± 0,4
2-mC4C2	11,43 ± 0,03	5,51 ± 0,07	15,9 ± 0,3	16,1 ± 0,4	7,5 ± 0,1	7,7 ± 0,1	19,2 ± 0,2	18,8 ± 0,2	9,1 ± 0,1	8,9 ± 0,1
iC5C2	15,15 ± 0,08	9,70 ± 0,02	20,6 ± 0,4	20,7 ± 0,5	13,5 ± 0,4	13,9 ± 0,3	24,8 ± 0,5	25 ± 1	17 ± 1	16,0 ± 0,6
PhC2C2	2,81 ± 0,06	1,33 ± 0,04	3,4 ± 0,1	3,33 ± 0,06	1,49 ± 0,02	1,51 ± 0,04	3,89 ± 0,06	3,85 ± 0,07	1,63 ± 0,03	1,65 ± 0,02
C2C3	16,0 ± 0,2	16,8 ± 0,6	15,4 ± 0,4	15,7 ± 0,4	16,2 ± 0,5	16,6 ± 0,2	15,1 ± 0,4	14,3 ± 0,3	16,3 ± 0,3	16,1 ± 0,3
C2iC4	47,5 ± 0,5	48,4 ± 0,1	42,2 ± 0,5	42,9 ± 0,5	43,2 ± 0,3	43,8 ± 0,2	40,6 ± 0,2	39,2 ± 0,2	42,8 ± 0,5	41,3 ± 0,4
C2C4	1,32 ± 0,09	1,25 ± 0,03	1,02 ± 0,06	1,07 ± 0,08	0,91 ± 0,03	1,00 ± 0,04	1,05 ± 0,04	1,01 ± 0,06	0,97 ± 0,06	0,77 ± 0,03
C2iC5	1235 ± 8	1259 ± 19	999 ± 11	974 ± 13	987 ± 17	996 ± 29	929 ± 12	906 ± 5	945 ± 8	910 ± 10
C2C6	7,88 ± 0,08	9,97 ± 0,07	5,1 ± 0,1	5,0 ± 0,2	6,36 ± 0,06	6,63 ± 0,05	3,9 ± 0,1	3,75 ± 0,07	5,10 ± 0,08	4,9 ± 0,1
C2C8	0,11 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
C2,2-PhC2	88,1 ± 0,4	62,3 ± 0,4	70 ± 2	67 ± 2	52,4 ± 0,8	53 ± 1	66 ± 1	63,9 ± 0,6	49,5 ± 0,7	49,4 ± 0,8
C4C1	0,80 ± 0,02	0,8 ± 0,2	0,85 ± 0,05	0,73 ± 0,07	0,81 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,76 ± 0,04	0,78 ± 0,04	0,84 ± 0,04	0,83 ± 0,05
C6C1	1,06 ± 0,00	1,05 ± 0,00	0,94 ± 0,02	0,94 ± 0,04	0,90 ± 0,02	0,91 ± 0,04	0,79 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,83 ± 0,02	0,82 ± 0,01
C8C1	0,95 ± 0,03	1,20 ± 0,01	0,51 ± 0,05	0,52 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,65 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,01
C10C1	0,50 ± 0,00	0,71 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,00
C5C2	0,72 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,64 ± 0,05	0,51 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,51 ± 0,02	0,49 ± 0,01
C7C2	0,61 ± 0,03	0,43 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,01
C9C2	0,96 ± 0,01	0,61 ± 0,00	0,33 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,13 ± 0,01
C4iC5	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,25 ± 0,01
C6iC5	1,83 ± 0,01	1,86 ± 0,01	0,70 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,73 ± 0,03	0,75 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,36 ± 0,02
C8iC5	3,03 ± 0,03	3,84 ± 0,09	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,79 ± 0,06	1,7 ± 0,1	0,79 ± 0,04	0,80 ± 0,03	0,98 ± 0,04	0,91 ± 0,03
hexC2	2,31 ± 0,02	2,39 ± 0,04	2,15 ± 0,05	2,13 ± 0,06	2,11 ± 0,02	2,16 ± 0,04	1,87 ± 0,02	1,85 ± 0,03	1,91 ± 0,03	1,86 ± 0,03
C6iC4	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
gerC1	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00
dhCmC2	0,76 ± 0,07	0,51 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01
CinC2	0,9 ± 0,2	0,89 ± 0,05	0,64 ± 0,01	0,64 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,53 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,61 ± 0,02



Saint-Emilion (moyenne des répliquats  $\pm$  intervalle de confiance à 5 % en,  $\mu\text{g/L}$ )

Esters	après FA			après FML			après 3 mois				
	XR	522D	Esters	XR/B28	XR/450	522/B28	522/450	XR/B28	XR/450	522/B28	522/450
C3C2	135 $\pm$ 2	142 $\pm$ 1	C3C2	134 $\pm$ 2	135 $\pm$ 2	145 $\pm$ 2	149,1 $\pm$ 0,7	135 $\pm$ 1	138 $\pm$ 2	149 $\pm$ 2	153 $\pm$ 2
C4C2	179 $\pm$ 2	179,2 $\pm$ 0,2	C4C2	167 $\pm$ 1	169 $\pm$ 1	171 $\pm$ 1	171 $\pm$ 2	160 $\pm$ 1	164,4 $\pm$ 0,8	165 $\pm$ 2	172,2 $\pm$ 0,8
C6C2	361 $\pm$ 5	438,7 $\pm$ 0,6	C6C2	280 $\pm$ 8	285 $\pm$ 2	310 $\pm$ 3	322 $\pm$ 8	220 $\pm$ 8	230 $\pm$ 1	247 $\pm$ 2	263 $\pm$ 8
C8C2	491 $\pm$ 6	765 $\pm$ 6	C8C2	289 $\pm$ 9	271 $\pm$ 2	323 $\pm$ 10	316 $\pm$ 20	149 $\pm$ 20	152 $\pm$ 7	207 $\pm$ 8	231 $\pm$ 35
C10C2	288 $\pm$ 9	413 $\pm$ 13	C10C2	93 $\pm$ 3	92 $\pm$ 2	113 $\pm$ 5	115 $\pm$ 11	30 $\pm$ 4	27 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1	37 $\pm$ 5
C12C2	31,4 $\pm$ 0,7	40 $\pm$ 1	C12C2	7,3 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 0,2	9,0 $\pm$ 0,6	8,9 $\pm$ 0,8	0,73 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,09	1,1 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,5
iC4C2	36,1 $\pm$ 0,6	34,8 $\pm$ 0,5	iC4C2	49,4 $\pm$ 0,4	49,5 $\pm$ 0,5	51 $\pm$ 1	51 $\pm$ 2	65,4 $\pm$ 0,8	67 $\pm$ 1	66 $\pm$ 2	69 $\pm$ 2
2-mC4C2	5,86 $\pm$ 0,06	6,11 $\pm$ 0,09	2-mC4C2	7,5 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,1	8,3 $\pm$ 0,3	8,5 $\pm$ 0,3	9,5 $\pm$ 0,1	9,67 $\pm$ 0,08	10,6 $\pm$ 0,3	11,0 $\pm$ 0,3
iC5C2	8,87 $\pm$ 0,07	8,5 $\pm$ 0,2	iC5C2	11,5 $\pm$ 0,2	12,0 $\pm$ 0,7	12,0 $\pm$ 0,5	12,0 $\pm$ 0,6	15,3 $\pm$ 0,8	15,8 $\pm$ 0,7	16 $\pm$ 1	15,9 $\pm$ 0,5
PhC2C2	0,99 $\pm$ 0,01	1,70 $\pm$ 0,05	PhC2C2	1,05 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,01	1,93 $\pm$ 0,06	1,91 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,01	1,17 $\pm$ 0,01	2,28 $\pm$ 0,05	2,28 $\pm$ 0,07
C2C3	9,0 $\pm$ 0,3	11,0 $\pm$ 0,3	C2C3	8,5 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 0,2	10,6 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,2	9,9 $\pm$ 0,3	9,6 $\pm$ 0,2
C2iC4	38,7 $\pm$ 0,6	40,9 $\pm$ 0,3	C2iC4	36,4 $\pm$ 0,4	36,4 $\pm$ 0,4	38,11 $\pm$ 0,08	38,6 $\pm$ 0,2	35,4 $\pm$ 0,3	35,3 $\pm$ 0,3	35,6 $\pm$ 0,4	36,11 $\pm$ 0,05
C2C4	0,67 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,09	C2C4	0,55 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,06	1,0 $\pm$ 0,1	0,91 $\pm$ 0,04	0,55 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,05	0,84 $\pm$ 0,03
C2iC5	609 $\pm$ 7	822 $\pm$ 2	C2iC5	518 $\pm$ 32	543 $\pm$ 5	662 $\pm$ 38	722 $\pm$ 11	490 $\pm$ 6	498 $\pm$ 4	626 $\pm$ 3	657 $\pm$ 10
C2C6	1,25 $\pm$ 0,01	2,53 $\pm$ 0,04	C2C6	0,93 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,02	1,63 $\pm$ 0,03	1,65 $\pm$ 0,03	0,64 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,03
C2C8	0,05 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,00	C2C8	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
C2,2-PhC2	24,1 $\pm$ 0,4	48 $\pm$ 1	C2,2-PhC2	21,3 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,4	39,1 $\pm$ 0,6	39,3 $\pm$ 0,5	20,5 $\pm$ 0,1	19,4 $\pm$ 0,4	36,3 $\pm$ 0,3	35,0 $\pm$ 0,6
C4C1	1,17 $\pm$ 0,03	1,35 $\pm$ 0,02	C4C1	1,3 $\pm$ 0,1	1,15 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,07	1,26 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,06	1,11 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,06	1,23 $\pm$ 0,03
C6C1	1,59 $\pm$ 0,06	2,07 $\pm$ 0,02	C6C1	1,36 $\pm$ 0,07	1,39 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,1	1,58 $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,03	1,18 $\pm$ 0,03	1,31 $\pm$ 0,01	1,37 $\pm$ 0,05
C8C1	2,14 $\pm$ 0,05	3,36 $\pm$ 0,01	C8C1	1,40 $\pm$ 0,05	1,34 $\pm$ 0,01	1,57 $\pm$ 0,06	1,6 $\pm$ 0,1	0,81 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,04	1,2 $\pm$ 0,1
C10C1	1,13 $\pm$ 0,03	1,75 $\pm$ 0,05	C10C1	0,34 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00	0,10 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01
C5C2	0,93 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,02	C5C2	0,83 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,01	0,9 $\pm$ 0,1	1,01 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,02	1,04 $\pm$ 0,02
C7C2	0,56 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,01	C7C2	0,38 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,03
C9C2	2,11 $\pm$ 0,05	4,37 $\pm$ 0,08	C9C2	0,57 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,06
C4iC5	0,49 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,01	C4iC5	0,37 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,00	0,38 $\pm$ 0,00	0,41 $\pm$ 0,01
C6iC5	2,34 $\pm$ 0,04	3,73 $\pm$ 0,03	C6iC5	1,26 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,01	1,55 $\pm$ 0,07	1,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,79 $\pm$ 0,03	1,14 $\pm$ 0,06	1,3 $\pm$ 0,2
C8iC5	5,8 $\pm$ 0,2	9,0 $\pm$ 0,3	C8iC5	3,0 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,1	4,3 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,2	1,65 $\pm$ 0,05	3,0 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,6
hexC2	1,73 $\pm$ 0,01	2,39 $\pm$ 0,04	hexC2	1,52 $\pm$ 0,04	1,50 $\pm$ 0,02	2,04 $\pm$ 0,03	2,01 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,03	1,27 $\pm$ 0,03	1,69 $\pm$ 0,01	1,67 $\pm$ 0,04
C6iC4	0,22 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	C6iC4	0,13 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,01
gerC1	0,85 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,03	gerC1	0,34 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01
diCinC2	0,50 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,01	diCinC2	0,45 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,00	0,59 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,00	0,39 $\pm$ 0,00	0,53 $\pm$ 0,00	0,54 $\pm$ 0,02
CinC2	0,65 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	CinC2	0,60 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01

## ANNEXE 3 : Fiche de dégustation pour un test de classement et un test triangulaire

### Test de classement

*Poste 1*

Date : 17/04/13

Nom et Prénom :

Précisez si vous êtes malade :

Evaluer ces 6 vins, **en nez ET en bouche**, dans l'ordre indiqué :

**143, 263, 183, 192, 739, 272**

puis classer ces vins par ordre croissant suivant l'arôme fruité :

- fruité  <  <  <  <  <  + fruité

**NOM**

**PRENOM**

### Test triangulaire

Veillez examiner (évaluation orthonasale) les trois échantillons proposés. Entourez le numéro de l'échantillon que vous trouvez différent. Il est indispensable que vous fassiez un choix.

124

330

740

Justifiez votre réponse (facultatif) :

# ANNEXE 4 : Fiche de dégustation pour un test de profil comparé

## Feuille de dégustation

Poste 1

Date :

Nom et Prénom :

Précisez si vous êtes malade :

		échantillons	abs	1	2	3	4	5	6	7	
<b>Nez</b>	<b>fermentaire/ amylique</b>	522	<input type="checkbox"/>								
		590	<input type="checkbox"/>								
		667	<input type="checkbox"/>								
		494	<input type="checkbox"/>								
		943	<input type="checkbox"/>								
		907	<input type="checkbox"/>								
	<b>fruits frais</b>	522	<input type="checkbox"/>								
		590	<input type="checkbox"/>								
		667	<input type="checkbox"/>								
		494	<input type="checkbox"/>								
		943	<input type="checkbox"/>								
		907	<input type="checkbox"/>								
	<b>fruits confiturés</b>	522	<input type="checkbox"/>								
		590	<input type="checkbox"/>								
		667	<input type="checkbox"/>								
		494	<input type="checkbox"/>								
		943	<input type="checkbox"/>								
		907	<input type="checkbox"/>								
	<b>végétal</b>	522	<input type="checkbox"/>								
		590	<input type="checkbox"/>								
		667	<input type="checkbox"/>								
		494	<input type="checkbox"/>								
		943	<input type="checkbox"/>								
		907	<input type="checkbox"/>								
<b>fumé/grillé</b>	522	<input type="checkbox"/>									
	590	<input type="checkbox"/>									
	667	<input type="checkbox"/>									
	494	<input type="checkbox"/>									
	943	<input type="checkbox"/>									
	907	<input type="checkbox"/>									

	échantillons	abs	1	2	3	4	5	6	7	
<b>Bouche</b>	<b>acidité</b>	522	<input type="checkbox"/>							
		590	<input type="checkbox"/>							
		667	<input type="checkbox"/>							
		494	<input type="checkbox"/>							
		943	<input type="checkbox"/>							
		907	<input type="checkbox"/>							
	<b>astringence</b>	522	<input type="checkbox"/>							
		590	<input type="checkbox"/>							
		667	<input type="checkbox"/>							
		494	<input type="checkbox"/>							
		943	<input type="checkbox"/>							
		907	<input type="checkbox"/>							
	<b>structure</b>	522	<input type="checkbox"/>							
		590	<input type="checkbox"/>							
		667	<input type="checkbox"/>							
		494	<input type="checkbox"/>							
		943	<input type="checkbox"/>							
		907	<input type="checkbox"/>							

**Commentaires libres :** -----

## ANNEXE 5 : Fiche de dégustation pour la comparaison directe de fractions deux à deux

Date

Poste 1 - Juge 1

	Différence ?		Le + intense ?		Descripteurs (libre)
	OUI	NON	A	B	
Fraction 61	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 80	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 65	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 85	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 56	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 90	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 70	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 84	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 72	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 66	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 74	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 28	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 93	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 44	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 81	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 54	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 58	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 26	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 99	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 40	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 88	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Fraction 49	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____