



**HAL**  
open science

## Contribution à la caractérisation des précurseurs d'arôme glycosylés du bois de chêne

Davide Slaghenaufi

► **To cite this version:**

Davide Slaghenaufi. Contribution à la caractérisation des précurseurs d'arôme glycosylés du bois de chêne. Ingénierie des aliments. Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), 2012. Français. NNT : . tel-02811287

**HAL Id: tel-02811287**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02811287>**

Submitted on 6 Jun 2020

**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.

Année 2012

Thèse n° 1987

# THÈSE

pour le

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Ecole doctorale**

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Œnologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 13 décembre 2012

Par Davide SLAGHENAUF I

Né le 21 février 1983 à Rovereto (Italie)

### **Contribution à la caractérisation des précurseurs d'arôme glycosylés du bois de chêne**

#### **Membres du Jury**

M. P. BARTHELEMY, Professeur, Université Bordeaux Segalen .....Président  
M. Z. GUNATA, Professeur, Université Montpellier 2 ..... Rapporteur  
M.R. GOUGEON, Professeur, Université de Bourgogne..... Rapporteur  
M. F. MATTIVI, Docteur, Fondazione Edmund Mach (Italie)..... Examineur  
M. N. VIVAS, Docteur, Université Bordeaux 1 ..... Examineur  
M. G. de REVEL, Professeur, Université Bordeaux Segalen ..... Directeur de thèse



# Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur Gilles de Revel, Professeur à la faculté d'œnologie Université Bordeaux Segalen, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse passionnante. Tout en me laissant une totale liberté de travail, il m'a toujours soutenu et encouragé dans les nombreux moments de doute.

Mes remerciements vont également aux membres du jury de ma soutenance de thèse.

Monsieur Philippe Barthélémy, Professeur à l'Université Bordeaux Segalen, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Monsieur Zya Gunata, Professeur à l'Université Montpellier 2, pour ses précieux conseils apportés tout au long de ce travail qu'il a jugé avec passion et rigueur.

Monsieur Régis Gougeon, Professeur à l'Université Bourgogne, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger, et pour les encouragements exprimés.

Je remercie profondément Monsieur Fulvio Mattivi, Docteur Responsable du Département qualité alimentaire et nutrition de la Fondazione Edmund Mach (Italie), qui m'a fait l'honneur de prendre part à ce jury. Pour la grande disponibilité qu'il m'a toujours témoignée, je l'en remercie vivement.

Je remercie également Monsieur Nicolas Vivas, Docteur Directeur Recherche et Développement de la Tonnellerie Demptos et chercheur à l'Université Bordeaux 1, pour avoir participé au jury de ma soutenance de thèse, en apportant avec sa grande connaissance du bois de chêne des éléments de discussion très intéressants.

Je tiens à remercier chaleureusement Madame Nathalie Mora-Soumille, Maître de Conférences à l'Université d'Avignon, pour m'avoir accueilli dans le laboratoire en guidant mes premiers pas dans le monde de la synthèse organique. Je la remercie également pour m'avoir fait découvrir la ville d'Avignon et le Vaucluse. Je remercie aussi Hugues Soumille pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans la collaboration du Groupe d'Etude des substances Végétales. C'est pour cela que je tiens à remercier très vivement le professeur Jean-Michel Mérillon et le professeur Jean-Pierre Monti pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie profondément Monsieur Tristan Richard, Maître de Conférences à l'Université Bordeaux Segalen, qui m'a initié à la Résonance Magnétique Nucléaire, pour sa patience et sa disponibilité. Je remercie également Pierre Waffo-Téguo, Maître de Conférences à l'Université Bordeaux Segalen, pour avoir partagé ses connaissances de la chromatographie de partage centrifuge. Je remercie Axel Marchal, post-doc à l'Université Bordeaux Segalen, pour les conseils apportés et pour l'analyse FT-MS.

Je tiens à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et le Conseil interprofessionnel des Vins de Bordeaux pour leurs soutiens financiers.

J'adresse mes plus vifs remerciements à toute l'équipe du groupe de Chimie analytique, en particulier Stéphanie Marchand-Marion, Maître de Conférences à l'Université Bordeaux Segalen, pour son amitié et ses conseils ; Marie-Claire Perello, pour son professionnalisme et ses qualités humaines incontestables ; Céline Franc pour les discussions autour de la chimie et pour son amitié ; Laurent Riquier pour avoir été toujours prêt à m'aider pour le bricolage des appareils. Je remercie également Monsieur Jean Christophe Barbe, Maître de Conférences à l'Université Bordeaux Sciences Agro, Marie-Hélène Schaaper, Magali Picard, Vivian Burin, Daniele Rodrigues et Eléonore Cuzange.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel de l'ISVV, les enseignants, les chercheurs, le personnel administratif, les thésards et plus particulièrement : Isabelle, Bénédicte, mon copain de cordée Julien, Grégory Schmauch, Takis, Guilherme, Kleopatra, Nerea, Cristina López-Vázquez, Mariette et les nouveaux copains de la hall techno.

Je tiens à remercier tout le personnel du GESVAB, en particulier Alison Pawlus, Gérard Fondeville, Eric Pedrot, Elodie Renouf et Jonathan Bisson pour leur disponibilité et l'aide qu'ils m'ont toujours apportée.

Un remerciement particulier va à Maria, Grégory Pasquier et Armin pour l'aide, l'encouragement, leurs conseils et leur sympathie, ainsi qu'au maître du concept abstract Andrea Romano.

Un grand merci à Julie, koubaraki mou, pour ta joie et ton amitié.

Je remercie également Sophie, sans ton aide, ton soutien et les rigolades avec toi je n'aurais jamais réussi.

Un remerciement spécial à mes proches :

Il n'y a pas des mots pour traduire la gratitude que j'ai envers mes parents et ma sœur Giulia et les personnes extraordinaires de l'A-Team qui m'ont fait l'honneur d'être mes amis.

Pour finir un remerciement tout spécial à Marion, pour ta patience, ton soutien et ton aide.

### **Communications avec actes**

- CEno 2011. 9ème edition du Symposium d'Oenologie. Bordeaux, France. 15-17 Juin 2011. Poster. "Wood characterization according to their content in flavor precursors".
- WAC 2011. International Symposium on Wine Active Compounds. Beaune, France. 24-26 Mars 2011. Presentation oral. "Oak aroma precursors: synthesis, separation and characterization of phenolic-aldehydes glycosides".

### **Communications sans actes**

- Macrowine 2012, Bordeaux, France. 18-21 Juin 2012. Présentation oral "Characterization of galloyl glucoside derivatives as precursors of volatile compounds in oak wood".
- Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, France, 28 Mars 2012. Poster. "Caractérisation chimique des précurseurs d'arôme glycolyses dans le bois de chêne"
- 13th Weurman Flavour Research Symposium. Saragosse, Espagne. 27-30 Septembre 2011. Poster et short presentation. "Oak aroma precursors".
- Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, France, avril 2011. Poster. "Recherche des précurseurs d'arôme glycolyses dans le bois de chêne"

### **Articles**

- "Centrifugal partition chromatography applied to the isolation of oak aroma precursors " Food Chem, soumis.

# Liste des figures :

Figure 1. Molécules volatiles identifiées dans le bois de chêne frais et apportant des notes typiques boisées aux vins.....	6
Figure 2. Exemples de coumarines et lignanes retrouvées dans le bois de chêne. ....	9
Figure 3. Présence de spores (Sp), hyphe (Spm) et mycélium (M) à la surface d'un échantillon de chêne après 6 mois de séchage naturel (Photo Vivas <i>et al.</i> 1996).....	11
Figure 4. Composés issus de la thermodégradation de la composante polysaccharidique du bois et réaction de Maillard .....	14
Figure 5. Phénols présents dans le bois et produits par la chauffe .....	15
Figure 6. Voie de dégradation des lignines (d'après Nonier <i>et al.</i> 2006) .....	16
Figure 7. Accumulation en vanilline d'un vin modèle élevé en barrique de chêne américain et français (d'après Spillman <i>et al.</i> 1998a).....	19
Figure 8. Exemples de la partie osidique des précurseurs des monoterpénols retrouvés dans les raisins.....	27
Figure 9. Précurseurs de la whiskylactone retrouvés dans le bois de chêne (Masson <i>et al.</i> 2000 ; Hayasaka 2007). ....	29
Figure 10. Composés identifiés par Ishimaru <i>et al.</i> (1987) dans des chênes asiatiques. ....	30
Figure 11. <b>Composés identifiés par Nonaka <i>et al.</i> (1982) dans le bois de chêne asiatique (<i>Quercus acutissima</i> et <i>Quercus mongolica</i>)</b> .....	31
Figure 12. Analyse des précurseurs d'arômes glycoconjugués (d'après Winterhalter <i>et al.</i> , 1997).....	33
Figure 13. Schéma général du protocole de purification des précurseurs d'arômes glycosylés dans le bois de chêne utilisé dans ce travail.....	36
Figure 14. Représentation d'une CPC avec le détail du rotor et des cellules de partage, (d'après Toribbio 2007). ....	38
Figure 15. Schéma des deux modes d'élution en CPC (d'après Toribbio 2007).....	40
Figure 16. Représentation de deux chromatogrammes pouvant être obtenus avec un $K_{ca}^X = 1$ .....	42
Figure 17. Corrélacion COSY. ....	56
Figure 18. Corrélacion ROESY. ....	56
Figure 19. Corrélacion HSQC.....	57
Figure 20. Corrélacion HMBC.....	57
Figure 21. Schéma général de synthèse .....	65
Figure 22. Monoglycosides synthétisés.....	67



Figure 23. Chromatogramme FT-MS (mode négatif) d'un extrait de bois (A) dopé avec de la glucovanilline à 1,4 µg/L (B) et à 144 µg/L (C). Chromatogramme extrait de l'ion adduit avec du <sup>35</sup> Cl <i>m/z</i> : 349,0703 et du <sup>37</sup> Cl <i>m/z</i> : 351,0673 dans une fenêtre de masse de 1 ppm.....	71
Figure 24. Chromatogramme FT-MS (mode négatif) d'un extrait de bois (A) dopé avec de la xylovanilline à 0,9 µg/L (B) et à 92 µg/L (C). Chromatogramme extrait de l'ion adduit chlorure <i>m/z</i> : 319,05988 dans une fenêtre de masse de 1 ppm. ....	72
Figure 25. Chromatogramme FT-MS (mode négatif) d'un extrait de bois (A) avec ajout de la glucoconiféraldéhyde à 0,9 µg/L (B) et à 85 µg/L (C). Extraction de l'ion adduit avec du <sup>35</sup> Cl <i>m/z</i> : 375,0863 dans une fenêtre de masse de 1 ppm. ....	73
Figure 26. Chromatogramme GC-MS de la fraction cyclohexane. On observe la présence de <i>trans</i> -whiskylactone (RT: 24,91 min) ; <i>cis</i> -whiskylactone (RT: 27,09 min). ....	79
Figure 27. Chromatogramme GC-MS de la fraction dichlorométhane. Eugénol (RT: 33,91 min) ; vanilline (RT: 44,79 min); syringaldéhyde (RT: 54,28 min) ; coniféraldéhyde (59,74 min). ....	80
Figure 28. Libération des composés volatiles par hydrolyse enzymatique de la fraction acétate d'éthyle. Témoin en vert, hydrolyse en rouge. ....	81
Figure 29. Chromatogramme CPC de l'extrait EtOAc de bois de chêne (Rouge : 254 nm ; bleu : 280 nm ; vert : 313 nm ; violet 330 nm). ....	83
Figure 30. Chromatogramme GC-MS en SCAN de la fraction CPC I ; en vert les composés volatiles libérés par hydrolyse enzymatique, en rouge le témoin sans hydrolyse. RT : 33,8 min. eugénol ; 44,63 min vanilline ; 46,35 min 3-oxo- $\alpha$ -ionol ; 57,40 min 3,4,5-tryméthoxyphénol. ....	85
Figure 31. Chromatogramme HPLC-UV de la fraction CPC-I, détection à 280 nm. ....	86
Figure 32. Spectres EI-MS des aglycones libérés par hydrolyse enzymatique respectivement du composé A (I), du composé B (II), du composé C (III), du composé D (IV) et du composé C par hydrolyse acide (V). ....	89
Figure 33. Spectre de masse du composé A, acquisition scan en mode négatif. ....	90
Figure 34. Spectre de masse du composé A, acquisition SCAN en mode positif. ....	90
Figure 35. MS <sup>2</sup> en mode négatif de l'ion précurseur <i>m/z</i> : 465. ....	91
Figure 36. Structure du composé A, identifié comme la vanilline-(6'- <i>O</i> -galloyl)- <i>O</i> - $\beta$ -glucopyranoside (VGG). ....	94
Figure 37. <b>Détail de la carte HSQC du composé A</b> .....	94
Figure 38. Détail de la carte HMBC du composé A.....	95
Figure 39. Spectre de masse du composé B, acquisition scan en mode positif.....	96
Figure 40. Spectre de masse du composé A, acquisition scan en mode négatif. ....	97
Figure 41. Spectre MS <sup>2</sup> en mode négatif de l'ion précurseur <i>m/z</i> : 497. ....	97
Figure 42. Structure du composé B, le 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'- <i>O</i> -galloyl)- <i>O</i> - $\beta$ -glucopyranoside (TMPGG). ....	98

Figure 43. Carte HMBC du 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'-O-galloyl)-O-β-glucopyranoside .....	100
Figure 44. Spectre de masse du composé C, acquisition SCAN en mode négatif. ....	101
Figure 45. Spectre de masse du composé C, acquisition scan en mode positif. ....	102
Figure 46. MS <sup>2</sup> en mode négatif de l'ion précurseur <i>m/z</i> : 521. ....	102
Figure 47. Schéma de fragmentation interne au sucre.....	103
Figure 48. Structure du composé C identifié comme le (6 <i>R</i> ,9 <i>R</i> )-3-oxo-α-ionol-9- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -galloyl)-β-glucopyranoside (macarangioside E).....	104
Figure 49. Détail de la carte HMBC du composé C.....	107
Figure 50. Aquisition MS-SCAN du composé D, mode négatif (A) et positif (B). ....	108
Figure 51. Aquisition MS <sup>2</sup> en mode négatif du composé D, ion précurseur sélectionné <i>m/z</i> : 609.....	109
Figure 52. Extraction de la VGG, du TMPGG et du macarangioside E en fonction du temps, (solvant d'extraction eau/acétone, 3 : 7).....	114
Figure 53. Pourcentage de récupération en vanilline-galloyl-glucoside (VGG), 3,4,5-triméthoxyphényl-galloyl-glucoside (TMPGG) et macarangioside E (MAC E) pour chaque série d'extraction. ....	115
Figure 54. Récupération en VGG, TMPGG et macarangioside E pour chaque extraction (les barres d'erreurs représentent l'écart type sur trois répétitions).....	115
Figure 55. Courbes de calibration de la vanilline galloylglucoside (A), du 3,4,5-triméthoxyphénolgalloylglucoside (B) et du macarangioside E(C). L'étalon interne (EI) utilisé est la xylovanilline.....	117
Figure 56. Chromatogramme MRM de l'analyse HPLC-QqQ-MS d'un Armagnac. A) xylovanilline, B) VGG, C)TMPGG, D) macarangioside E .....	118
Figure 57. Résultats des dosages de la VGG, TMPGG et macarangioside E dans les Armagnacs, d'origines et d'âges différents.....	119
Figure 58. Structures des produits de dégradation thermique du macarangioside E. ....	123
Figure 59. Proportion de réponses en fonction de la concentration permettant le calcul du seuil de détection dans l'eau (P=0,5). (●) points expérimentaux, (—) modélisation.....	127
Figure 60. Proportion de réponses en fonction de la concentration permettant le calcul du seuil de détection dans le vin rouge (P=0,5). (●) points expérimentaux, (—) modélisation.....	128
Figure 61. Etude de la linéarité pour la 4-oxo-isophorone (en bleu) et la mégastigmatriénone (en rouge). ....	129
Figure 62. Chromatogramme GC-MS aquis en modalité SIM d'un extrait de bois 1) octan-3-ol (EI) ; 2) isophorone (EI) ; 3) 4-oxo-isophorone ; 4, 5 , 6 , 7) mégastigmatriénone ; 8) 3-oxo-α-ionol. ....	131
Figure 63. Teneurs en 4-oxo-isophorone, mégastigmatriénone et 3-oxo-α-ionol présents lors de la chauffe du bois de chêne français (■) et chêne américain (■).....	132

# Liste des tableaux

Tableau 1. Liste non exhaustive des composés volatils présents dans le bois de chêne.....	7
Tableau 2. Comparaison entre séchage naturel à l'air libre et séchage artificiel (Chatonnet 1995)....	13
Tableau 3. Incidence de l'intensité de brûlage sur la formation des différents isomères de la whiskylactone (Chatonnet 1991) .....	17
Tableau 4. Paramètres de dosage des composés volatils du bois de chêne employés pour l'analyse GC-MS.....	46
Tableau 5. Paramètres de dosage mégastigmatriénone, 4-oxo-isophorone et 3-oxo- $\alpha$ -ionol dans le bois de chêne .....	49
Tableau 6. Paramètres d'analyse optimisés pour les composés : vanilline galloylglucoside (VGG) ; 3,4,5-triméthoxyphénol galloylglucoside (TMPGG) ; macarangioside E (MAC E) ; vanilline- $\beta$ -xyloside. .....	52
Tableau 7. Gammes étalons réalisées dans un extrait de bois de chêne pour la glucovanilline, xylovanilline et glucoconiféraldéhyde.....	53
Tableau 8. Ions analysés par FT/MS pour la glucovanilline, xylovanilline et glucoconiféraldéhyde.....	54
Tableau 9. Rendements de la réaction de glycosylation ; (C) = coniféraldéhyde, (V) = vanilline.....	66
Tableau 10. Données $^1\text{H}$ -RMN : $\delta\text{H}$ , J (Hz). Acquisitions effectuées dans $\text{D}_2\text{O}$ .....	68
Tableau 11. Données $^{13}\text{C}$ -RMN : $\delta\text{H}$ , J (Hz). Acquisitions effectuées dans $\text{D}_2\text{O}$ .....	69
Tableau 12. Richesse des différentes fractions HPLC en précurseurs révélés par libération des aglycones ( $\mu\text{g/L}$ ) à l'aide de l'hydrolyse enzymatique. ....	76
Tableau 13. Libération de composés volatiles du bois de chêne par hydrolyse enzymatique, en fonction du solvant d'extraction. Résultats exprimés en surface relative (aire du pic/aire étalon interne), écart type entre parenthèses. ....	77
Tableau 14. Présence de précurseurs d'arômes du bois de chêne pour chaque extraction liquide/liquide. Révélation effectuée par hydrolyse enzymatique et analyse GC-MS de l'aglycone. Résultats exprimés en surface relative (aire du pic/aire étalon interne).....	78
Tableau 15. Systèmes de solvants testés pour l'isolement des précurseurs glycosylés. ....	82
Tableau 16. Poids obtenu pour chaque fraction CPC.....	84
Tableau 17. Libération des aglycones par hydrolyse enzymatique dans les différentes fractions CPC. Quantification par GC-MS exprimée par la surface relative. ....	85
Tableau 18. Données $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ RMN obtenues pour le composé A dans l'acétone- $d_6$ . ....	93

Tableau 19. Données RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé B obtenu en méthanol- $d_4$ .	99
Tableau 20. Données RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé C obtenu en méthanol- $d_4$ .	105
Tableau 21. Extraction par différents solvants, résultats normalisés.	113
Tableau 22. Limites de détection et de quantification respectivement pour la vanilline galloylglucoside (VGG), le 3,4,5-triméthoxyphénolgalloylglucoside (TMPGG) et le macarangioside E.	116
Tableau 23. Teneurs en mg/kg en vanilline galloylglucoside (VGG), 3,4,5-triméthoxyphénol galloylglucoside (TMPGG) et macarangioside E (MAC E) dans le bois de chêne français en fonction de la température de chauffe (CF).	121
Tableau 24. Teneurs en mg/kg en vanilline galloylglucoside (VGG), 3,4,5-triméthoxyphénol galloylglucoside (TMPGG) et macarangioside E dans le bois de chêne américain en fonction de la température de chauffe (CA).	121
Tableau 25. Résultats de l'analyse GC-O du mégastigmatriénone commercial (Symrise, Holzminden, Allemagne). Descripteurs employés et nombre de citations relatives pour un panel de 8 juges.	126
Tableau 26. Répétabilité de la méthode et limites de détection (LD) et de quantification (LQ) du 4-oxo-isophorone, du total des mégastigmatriénone et de la 3-oxo- $\alpha$ -ionol.	130
Tableau 27. Détection et estimation de la concentration en mégastigmatriénone et en 4-oxo-isophorone dans quelques vins.	133

## Liste des abréviations

$^1\text{H}$	Proton
$^{13}\text{C}$	Carbone 13
$\delta$	Déplacement chimique en ppm
$\mu\text{g}$ , mg, g, Kg	Microgramme, milligramme, gramme, kilogramme
$\mu\text{L}$ , mL, L	Microlitre, millilitre, litre
amu	Unité de masse
Da	Dalton
J	Constante de couplage en Hertz
$m/z$	Rapport masse sur charge
u	Unité de masse atomique
rpm	Rotation par minute
ppb	Partie par milliard
ppm	Partie par million
AcOEt	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
Hept	<i>n</i> -heptane
MeOH	méthanol
TFA	acide trifluoroacétique
COSY	COrelated SpectroscopY
CPC	Chromatographie de partage centrifuge
ESI	Ionisation par électro-nébulisation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Spectrométrie de masse
FT/MS	Spectrométrie de masse à transformé de Fourier
UV	Ultraviolet
VGG	Vanilline-6''-O-galloyl)- $\beta$ -O-glucopyranoside,
TMPGG	3,4,5-triméthoxyphénol-(6''-O-galloyl)- $\beta$ -O-glucopyranoside



# Sommaire

Introduction.....	1
CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. Le bois de chêne de tonnellerie .....	3
1.1 Composition du bois de chêne .....	4
1.2 Diversité moléculaire des composés volatiles.....	5
1.3 Les composés non-volatils.....	8
1.4 Evolution du profil au cours du procédé de tonnellerie .....	10
1.5 L'affinage du merrain .....	10
1.6 Les chauffes de cintrage et de brûlage.....	13
2. Le bois et le vin.....	17
2.1 La fermentation alcoolique sous bois .....	21
2.2 Interactions entre le bois et les bactéries lactiques.....	22
3. Les précurseurs d'arôme glycosylés.....	25
3.1 Importance des précurseurs d'arôme glycosylés en œnologie.....	26
3.2 Caractérisation des précurseurs d'arôme glycosylés dans le bois de chêne .....	28
3.3 Méthodes de purification et d'analyse des précurseurs glycosylés d'arôme .....	31
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES .....	34
1. Matériel végétal .....	34
2. Protocole d'extraction et de purification des précurseurs d'arôme glycosylés.....	35
2.1 Extractions solide/liquide du bois .....	36
2.2 Prépurification de l'extrait brut.....	36
2.3 Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge .....	37
2.3.1. Principe de fonctionnement.....	37
2.3.2. Appareillage.....	41

2.3.3. Sélection du système de solvants pour l'analyse CPC.....	41
2.3.4. Conditions séparatives en CPC.....	43
2.4 Fractionnement par HPLC semi-préparative.....	44
3. Analyse GC-MS.....	44
3.1 Méthode d'analyse des composés volatiles du bois.....	44
3.2 Analyse des aglycones sur un volume réduit.....	47
3.3 Libération enzymatique des arômes liés.....	47
3.4 Analyse des composés formés par thermolyse du macarangioside E.....	48
3.5 Méthode d'analyse GC-MS du 4-oxo-isophorone et mégastigmatriénone dans les bois	48
3.6 Analyse olfactométrique couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-O).....	50
4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (MS).....	50
4.1 Dosages des précurseurs isolés par HPLC-QqQ-MS.....	50
4.1.1. Préparation de l'échantillon.....	50
4.1.2. Conditions d'analyse HPLC-ESI-QqQ-MS.....	51
4.2 Analyse par UHPLC-ESI-FT/MS.....	52
5. Analyse structurale des molécules isolées.....	55
5.1 Analyse par HPLC-ESI-IT-MS.....	57
5.2 Analyse à l'aide de la technique TOF-HRMS.....	58
5.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	58
6. Analyse sensorielle.....	59
6.1 Seuils de détection.....	59
6.2 Composés testés et matrices utilisées.....	59
6.3 Interprétation statistique.....	60
7. Synthèse de la glucovanilline, de la xylovanilline et de la glucoconiféraldéhyde.....	60
7.1 Procédure générale d'acétylation.....	61
7.2 Procédure générale de bromation.....	61



7.3	Procédure générale de glycosylation par transfert de phase .....	62
7.4	Procédure générale de déprotection .....	62
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION .....		63
1.	Extraction et identification de précurseurs d'arôme glycosidiques dans le bois de chêne. .	63
1.1	Recherche de précurseurs glycosidiques non acylés dans le bois de chêne.....	63
1.1.1.	Synthèse des précurseurs monoglycosides.....	64
1.1.2.	Analyse du bois de chêne par spectrométrie de masse à Transformée de Fourier (UPLC-FT-MS).....	70
1.2	Mise en évidence de la présence de précurseurs d'arômes autres que les monoglycosides « simples ».....	74
1.3	Isolement de précurseurs galloylglucosidiques de molécules volatiles dans le bois de chêne. 77	
1.3.1.	Extraction solide/liquide .....	77
1.3.2.	Extractions liquide/liquide .....	78
1.3.3.	Séparation par chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	81
1.3.4.	Purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC semi- préparative).....	86
1.4	Analyse des aglycones .....	87
1.5	Identification du composé « A ».....	89
1.5.1.	Résultats obtenus par spectrométrie de masse ESI-MS.....	89
1.5.2.	Résultats obtenus par RMN.....	91
1.6	Identification du précurseur « B ».....	96
1.6.1.	Résultats obtenus par spectrométrie de masse ESI-MS.....	96
1.6.2.	Résultats obtenus par RMN.....	97
1.7	Identification du précurseur « C ».....	101
1.7.1.	Résultats obtenus par spectrométrie de masse ESI-MS.....	101
1.7.2.	Résultats obtenus par RMN.....	103
1.8	Tentative d'identification du précurseur « D » .....	107

1.9	Discussions .....	109
2.	Quantification des précurseurs identifiés dans le bois, vin et eaux-de-vie et des aglycones correspondants et impact œnologique.....	112
2.1	Dosage des VGG, TMPGG et macarangioside E dans le bois de chêne.....	112
2.1.1.	Développement d'une méthode de dosage des précurseurs galloylglucosidiques par HPLC-MS .....	112
2.1.2.	Analyse des précurseurs galloylglucosidiques dans quelques vins et Armagnacs....	118
2.1.3.	Effets de différents paramètres de tonnellerie sur la teneur en précurseurs galloylglucosidiques.....	120
2.2	Etude des composés formés par dégradation thermique du macarangioside E. ....	122
2.2.1.	Caractérisation aromatique des arômes formés par dégradation du macarangioside E .....	124
2.2.2.	Développement d'une méthode d'analyse du 4-oxo-isophorone et mégastigmatriénones dans le bois.....	128
2.2.3.	Teneur en 4-oxo-isophorone et mégastigmatriénone dans le bois de chêne .....	131
2.2.4.	Recherche de la mégastigmatriénone dans les vins .....	133
2.3	Discussions .....	134
	Conclusion générale .....	136
	Annexes .....	139
	Références bibliographiques.....	142

# Introduction

Au cours de la vinification et de l'élevage du vin, le contact avec le bois enrichit le vin en composés volatils tels que la vanilline, la whiskylactone ou l'eugénol. Le rôle de ces composés volatils responsables des notes boisées a largement été étudié. Cependant, peu d'études concernent l'importance de la fraction liée (glycosylée) des arômes du bois de chêne et le potentiel aromatique qu'elle représente. En effet, pendant les processus de maturation du merrain, les concentrations de certaines molécules odoriférantes augmentent (Vivas *et al.* 1996). La même observation est constatée pour le bois qui subit un traitement thermique lors de la chauffe (Chatonnet 1995). Ce dernier phénomène est généralement expliqué par la dépolymérisation de la lignine en simples aldéhydes phénoliques et phénols volatiles.

Toutefois, il a été démontré que les teneurs en vanilline et autres aldéhydes phénoliques peuvent aussi augmenter pendant la fermentation malolactique en barrique (de Revel *et al.* 2005). L'activité glycosidase des bactéries lactiques est soupçonnée être impliquée dans ce phénomène, suggérant l'existence de précurseurs d'arômes glycosidiques dans le bois de chêne (Bloem *et al.* 2008). En fait, deux formes précurseurs glycosilées de la whiskylactone avaient déjà été isolées à partir de bois de chêne : l'acide (3S, 4S)-3-méthyl-4-O-(6'-O-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyloctanoïque (galloylglucoside) (Masson *et al.* 2000) et l'acide (3S, 4R)-3-méthyl-4-O- $\beta$ -D-glucopyranosyloctanoïque (Hayasaka *et al.* 2007).

Parallèlement, d'autres précurseurs d'arômes de bois de chêne ont été étudiés par analyse GC-MS de l'extrait trifluoroacétylé (Nonier *et al.* 2005). Les auteurs avaient postulés que la vanilline, la syringaldéhyde, la coniféraldéhyde, l'eugénol et la mégastigmatriénone étaient directement liés au glucose, mais l'identification n'avait pas été effectuée.

Le but du travail de recherche était d'isoler et d'identifier des formes précurseurs glycosidiques d'arôme du bois de chêne, notamment de la vanilline, afin de pouvoir envisager une étude plus fine du potentiel aromatique du bois. Il s'agit d'une étape nécessaire pour envisager les interactions bois/microorganismes et, plus généralement, contribuer à une meilleure connaissance de l'arôme boisé et de son équilibre avec les autres constituants du vin.

Une première approche prévoit la synthèse des molécules, suggérées par les expériences précédentes d'hydrolyse enzymatique (Bloem *et al.* 2008). Ces composés pourraient ultérieurement être utilisés comme standards pour l'analyse UPLC-FT/MS des extraits du bois de chêne et la mise en place d'une méthode de quantification. La deuxième approche comporte la purification d'un extrait de bois afin d'obtenir les molécules d'autres formes inconnues et potentiellement présentes des précurseurs d'arôme. L'identification est effectuée par la suite à l'aide des techniques de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire. Dans cette partie, la technique de chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été employée pour pré-purifier une grande quantité de matière, en limitant les pertes en composés.

Une dernière partie du travail concerne l'aspect œnologique et l'importance de ces précurseurs. Pour cela une méthode d'analyse HPLC-QqQ-MS pour la quantification dans le bois de chêne des précurseurs isolés a été développée. Concernant les aglycones, il a été envisagé une étude sensorielle qualitative et quantitative. Il serait alors possible d'envisager des évolutions selon l'origine et la préparation du bois de chêne ou en fonction des conditions d'utilisation œnologiques.

# CHAPITRE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Le bois de chêne de tonnellerie

Le chêne est un arbre appartenant au genre *Quercus* dont font partie environ 500 autres espèces d'arbres et arbrisseaux. En raison du climat, différentes espèces se développent essentiellement dans l'hémisphère nord (Amérique du Nord, Europe et Asie). Deux sous-genres existent (Camus 1936; 1938) : le *Cyclobalanopsis*, localisé dans les régions tropicales et subtropicales, et plus rarement dans les régions tempérées de l'Asie ; et l'*Euquercus*. Ce dernier est le sous-genre le plus représenté, et contient les chênes de type *cerris*, *mesobalanus*, *macrobalanus*, *protobalanus*, *erythrobalanus* et *lepidobalanus*.

Les espèces les plus utilisées pour la production du merrain en tonnellerie appartiennent à la division *Lepidobalanus*. Ce sont le chêne blanc d'Amérique *Quercus albae*, le chêne pédonculé ou *Quercus robur* (*Q. pedunculata*), et le chêne sessile ou rouvre ou *Quercus petraea* (*Q. sessiflora*). Sur le plan de la constitution chimique, ces deux espèces sont différentes (Mosedale *et al.* 1998 ; Prida *et al.* 2007), mais la structure de leur bois est similaire (Schoch *et al.* 2004).

En œnologie, on parle habituellement de chêne « français » (*Q. petrae*) pour désigner le bois provenant d'une forêt française et appartenant au genre sessile ou pédonculé. Parallèlement, par chêne « américain », on désigne le bois provenant des Etats-Unis et dont l'espèce majoritaire est le *Q. albae*.

Le chêne pédonculé pousse dans la quasi-totalité du territoire français métropolitain, excepté dans le Sud-est (Alpes du Sud, Provence, Languedoc-Roussillon) en raison du climat méditerranéen et d'une saison estivale trop sèche. Le chêne rouvre ou sessile est surtout présent dans la moitié Nord du pays, le Massif central et les Pyrénées (jusqu'à 1600 mètres), mais il est absent dans le Sud-ouest et le Sud-est, respectivement remplacé par les chênes tauzin et pubescent.

Ces trois chênes (*Q. albae*, *Q. robur* et *Q. petraea*) font partie des espèces de chênes spontanés à feuilles caduques. Cinq autres espèces de ce type ont été trouvées en France,

en particulier le chêne pubescent ou *Q. pubescens*, le chêne tauzin ou *Q. toza*, et le chêne chevelu ou *Q. cerris*. Les bois de chêne à feuilles caduques diffèrent des chênes à feuilles persistantes, comme le *Quercus ilex*, par plusieurs aspects qui les rendent plus aptes à la fabrication du merrain (Keller R. 1992).

Tout d'abord, ils présentent une zone initiale poreuse (du fait de nombreux gros vaisseaux conducteurs de sève) au début de chaque cerne, dans le bois initial ou de « printemps ». Cette zone poreuse est atténuée voire presque inexistante chez les espèces à feuilles persistantes. De plus, les chênes à feuilles caduques contiennent proportionnellement moins de fibres (éléments denses et durs), davantage de vaisseaux (éléments tendres), et moins de rayons ligneux. Ils sont ainsi généralement plus tendres et moins denses, ce qui les rend beaucoup plus faciles à travailler que les bois de chêne à feuilles persistantes (Keller 1992).

Plus particulièrement, les chênes pédonculé et sessile sont les principales espèces utilisées en tonnellerie, car ils présentent des caractéristiques favorisant la confection des barriques et les échanges bois / vin. Ils offrent un bois résistant, facilement débitable par fendage, facile à courber lors du cintrage, et conférant une bonne isolation thermique. Ils présentent enfin une porosité idéale : elle est suffisante pour induire des phénomènes d'oxydation et autres phénomènes physico-chimiques durant l'élevage du vin, tout en restant insuffisante pour laisser échapper le liquide.

Les bois des chênes pédonculé et sessile permettent donc la fabrication de barriques à la fois solides, étanches et aptes à transférer des colorations et arômes particuliers aux liquides, et notamment aux vins, tout en apportant des éléments de structure tels que les tannins ellagiques.

## **1.1 Composition du bois de chêne**

Sur le plan macromoléculaire, le bois de chêne ne diffère pas des autres plantes : il est constitué à 85 % de macromolécules polysaccharidiques (cellulose et hémicellulose) et polyphénoliques (lignine) qui forment la paroi végétale.

- La cellulose, qui constitue 40 % de la masse du bois, est un homopolymère formé par des chaînes linéaires d'unités D-glucopyrannose, reliées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1-4).

- L'hémicellulose (25 % de la masse du bois) est un hétéropolymère branché. Ses unités monomériques sont le D-xylose, le D-glucose, le D-mannose, le D-galactose, le D-rhamnose, le L-arabinose et les acides uroniques.
- La lignine provient de la polymérisation de trois alcools phénoliques : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Monties *et al.* 1980).

Ces trois macromolécules, cellulose, hémicellulose et lignine ne sont extractibles qu'après hydrolyse (Monties 1987). Les lignines sont liées entre elles et aux polysaccharides par des ponts ester, le plus souvent d'acide férulique, d'acide *p*-coumarique (Vivas 1997), d'éther ou encore des liaisons glycosidiques (Haluk *et al.* 1998). Les composés extractibles, volatils ou non, représentent entre 2 et 10 % de la masse du bois sec (Monties 1987 ; Puech 1992). Ils sont susceptibles d'être extraits par le vin et ainsi de le modifier sur un plan gustatif et aromatique. Cependant, les opérations de transformation du bois à usage œnologique induisent des modifications de la qualité, de la quantité et de l'extractibilité des molécules à caractère organoleptique (Vivas *et al.* 1997).

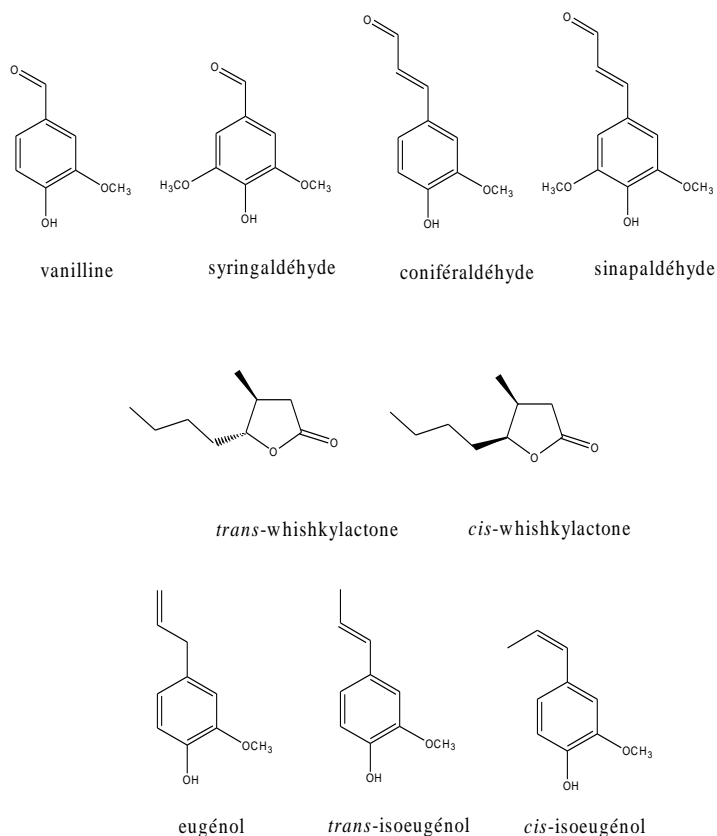
## 1.2 Diversité moléculaire des composés volatiles

Le bois de chêne possède de très nombreuses molécules odorantes, dont quelques unes marquent plus fortement l'arôme du bois. Certaines d'entre elles sont issues du bois frais, d'autres sont produites au cours des traitements subits lors de la fabrication des contenants. Leur teneur dépend de l'espèce et de l'origine du chêne, mais surtout des procédés de tonnellerie comme le séchage (maturation naturelle ou artificielle) ou le « brûlage » (variable selon la température et le temps de chauffe).

Des centaines de composés volatils ont été répertoriés qui complexifient l'odeur du bois de chêne (Nishimura *et al.* 1983 ; Maga 1984 ; Nabeta 1986 ; Sefton *et al.* 1990). Toutefois, quelques molécules suffisent à reconstituer un arôme simplifié, et parfois simpliste, rappelant le chêne. Ces molécules clés sont la vanilline (note de vanille), l'eugénol (note de clou de girofle), l'iso-eugénol (note de fumée) ainsi que la *trans* et la *cis*  $\beta$ -méthyl- $\gamma$ -octalactone (whiskylactone) qui apportent une odeur de noix de coco (Figure 1), la forme *cis* de la whiskylactone étant beaucoup plus odorante et abondante que la *trans* (Chatonnet

1995). Toutes ces molécules (Tableau 1) sont présentes à des teneurs élevées dans le vin, souvent au dessus de leur seuil de perception.

Parmi les autres molécules présentes, on retrouve des aldéhydes phénoliques (syringaldéhyde, coniféraldéhyde, sinapaldéhyde) (Black *et al.* 1953 ; Guymon *et al.* 1968), des acides aliphatiques, des lactones ( $\gamma$ -nonalactone et  $\gamma$ -déalactone) et des terpènes (terpinéol, bornéol, myrtol,  $\alpha$ -eudesmol,  $\beta$ -eudesmol,  $\gamma$ -eudesmol,  $\gamma$ -muurolène, etc.) (Nishimura *et al.* 1983).



**Figure 1.** Molécules volatiles identifiées dans le bois de chêne frais et apportant des notes typiques boisées aux vins.

Des norisoprénoides sont aussi présents dans le chêne frais (Sefton *et al.* 1990). Ces composés jouent un rôle très important, car la plupart d'entre eux ont un seuil de détection très bas (Guth 1997). Ainsi, même à de faibles concentrations, ils peuvent participer à l'arôme global (Ohloff 1978). La  $\beta$ -ionone a été très tôt identifiée dans le bois de chêne par Nishimura *et al.* (1983). Son odeur caractéristique de violette est très puissante. Le 3-oxo- $\alpha$ -ionol a également été dosé dans le bois de chêne. Présentant des notes de tabac (Aasen *et al.* 1971), il est le principal composé dérivé des caroténoïdes dans le chêne français (Sefton



*et al.* 1990). Les teneurs en 3-oxo- $\alpha$ -ionol et 9-hydroxymégastigma-5-ène-4-one dans le chêne américain (*Q. alba*) sont inférieures à celles dosées dans le chêne français. Concernant les autres norisoprénoïdes, le chêne américain est beaucoup plus riche. C'est le cas du blumenol C, de la 9-hydroxymégastigma-4,6-dien-3-one, du 3,4-dihydro-3-oxoactinidol, (5*S*,9*R*)-3,4-dihydro-3-oxoedulan et du (5*R*,9*R*)-3,4-dihydro-3-oxoedulan (Sefton *et al.* 1990).

**Tableau 1.** Liste non exhaustive des composés volatils présents dans le bois de chêne.

Structures chimiques	Molécules	Origine dans le bois	Caractéristiques organoleptiques	Seuil de détection ( $\mu\text{g/l}$ )	Seuls la concentration composé volatiles d'origine bois sont réportés
<i>Aldéhydes insaturés</i>	trans-2-nonéanal		Sciure de bois, mousse [1]	600 (SM) [1]	
<i>Norisoprénoïdes</i>	3-oxo- $\alpha$ -ionol	(F)	Tabac [1]	/	
	Mégastigmatriénone	(F)	Tabac [2]	/	
	2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione	(F)	Citrus, épice [4]	25 (SM) (V)[4]	
<i>Lactones</i>	trans- $\beta$ -méthyl- $\gamma$ -octalactone	(F)	Noix de coco, boisé [1]	790 (SM) [1]	
	cis- $\beta$ -méthyl- $\gamma$ -octalactone	(F)	Noix de coco, boisé [1]	67 (SM) [1]	
<i>Aldéhydes furaniques</i>	Furfural	(C)	Toasté, amande amère [2]	15000 (SM) 65000 (V) [14]	
	5-méthylfurfural	(C)	Toasté, amande amère [2]	16000 (V) 52000 (V) [2]	
<i>Phénols</i>	Gaïacol	(C)	Fumé [2]	9,5 (SM) [7] ; 95 (V) [2]	
	Méthyl-4-gaïacol	(C)	Épice, clou de girofle [2]	65 (V) [2]	
	Ethyl-4-gaïacol	(C)	Phénolique, pharmaceutique, épice [2]	47 (SM) ; 70 (V) [2]	
	Vinyl-4-gaïacol	(C)	Épice, fumé [2]	40 (SM) ; 130 (SM) [2]	
	Eugénol	(F)	Clou de girofle [2]	15 (SM) 100 (V) [2]	
	Isoeugénol	(F)	Clou de girofle, épice, boisé [2]	6 (SM) [2]	
	Syringol	(F)	Fumé, épice [2]	/	
	<i>o</i> -crésol	(C)	Bitume	60 (V) [2]	
	<i>m</i> -crésol	(C)	Pharmaceutique [2]	180 (V) [2]	
	<i>p</i> -crésol	(C)	/	/	
<i>Aldéhydes phénoliques</i>	Vanilline	(F)	Vanillé [3]	65 (SM) [3]	
	Syringaldéhyde	(F)	/	50000 (SM) [2]	
	Coniféraldéhyde	(F)	/	/	
	Sinapaldéhyde	(F)	/	/	
	Acétovanillone	(C)	Vanillé [1]	1000 (SM) [1]	
	Alcool vanillique	(F)		50000 [1]	

[1] Chatonnet 1991, 1995

[2] Boidron *et al.* 1988

[3] Maga 1984

[4] Rogerson *et al.* 2001

(SM) : seuil de détection mesuré en solution modèle

(F) : présent dans le bois frais

(C) : formé lors de la chauffe

(V) : seuil de détection mesuré dans le vin

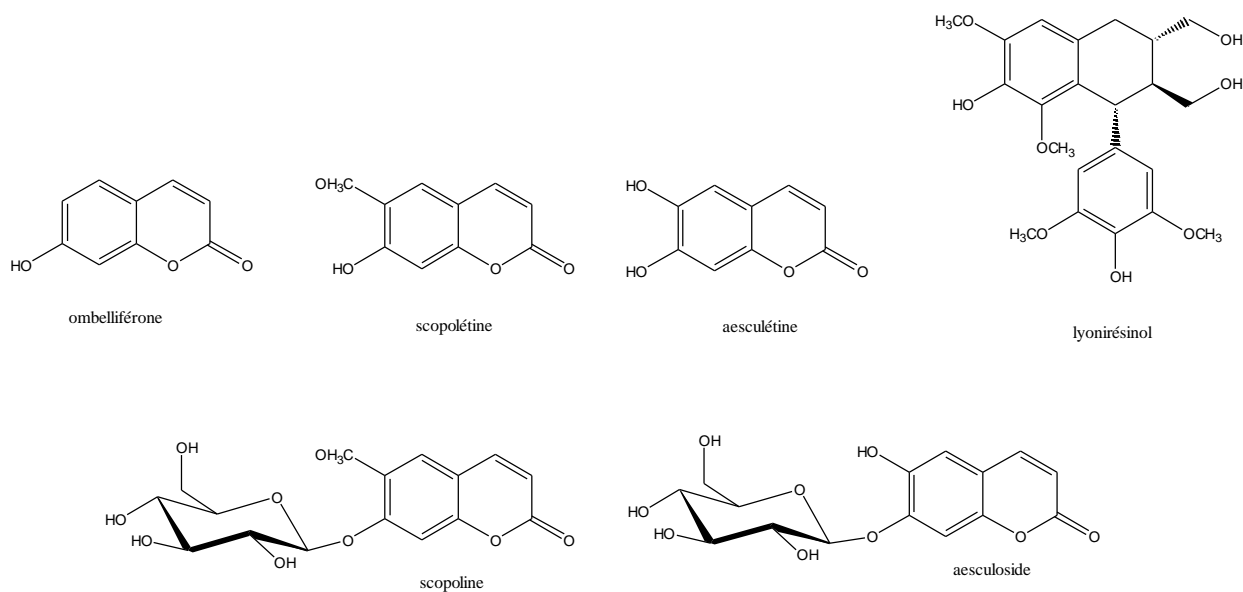
### 1.3 Les composés non-volatils

Les composés extractibles du bois de chêne sont majoritairement des tannins. Une faible quantité de tannins est présente sous forme condensée, dans les écorces et les feuilles, mais la majeure partie se trouve sous forme hydrolysable dans toute la plante. Les tannins hydrolysables sont divisés en deux sous groupes selon les unités de base qui les constituent : les gallotannins (acide gallique) et les ellagitannins (acide ellagique). Il a été mis en évidence que dans le bois de chêne, la teneur en acide ellagique est supérieure à l'acide gallique, le rapport se situant autour de  $^{10}/_1$  (Scalbert *et al.* 1987). Les monomères sont principalement la vescalagine, la castalagine, la grandinine et la roburine A-E et peuvent constituer jusqu'à 50 % du total des ellagitannins.

Si l'on s'intéresse aux molécules de plus faible masse moléculaire, on retrouve d'autres familles de composés, comme les lignanes, généralement associées à un goût amer. Les premières lignanes identifiées dans le bois de chêne sont le lyonirésinol et son conjugué xyloside. Ce sont également les plus abondantes (Seikel 1971; Nabeta *et al.* 1986).

Outre les dérivés de la lignine, riches en unités gäïacol et syringil, la composante extractible du bois de chêne présente des coumarines en forme libre (scopolétine, esculine, umbelliférone, méthyl-4-umbelliférone) et liée à des sucres (scopoline, esculoside) (Salagoity *et al.* 1987) (Figure 2).

Ces sont des dérivés benzo-*O*-pyrones, issus des acides hydroxycinnamiques. Les coumarines ont un goût acide et donnent un caractère de dureté. Leurs formes hétérosidiques apportent plutôt un goût amer. La présence de la scopolétine dans le vin est un indicateur de sa conservation en contact avec le bois. Elle est la forme la plus abondante parmi les coumarines (Puech *et al.* 1988; Salagoity 1992).



**Figure 2.** Exemples de coumarines et lignanes retrouvées dans le bois de chêne.

La présence de caroténoïdes a également été démontrée dans le chêne sessile, le chêne pédonculé et le chêne blanc américain (Masson *et al.* 1997; Nonier *et al.* 2004). Il s'agit de  $\beta$ -carotène, de xanthophyllyes (lutéine, violaxanthine, néoxanthine), qui sont probablement présents sous forme estérifiés dans le bois de chêne (Masson *et al.* 1997). La dégradation oxydative d'origine chimique ou enzymatique de ces composés conduit à la formation des norisoprénoïdes dont certains sont odorants (Schwartz *et al.* 2001).

D'un autre côté, les triterpènes pentacycliques sont des composés à haut poids moléculaire largement répandus dans les végétaux et notamment dans le bois de chêne. L'acide barthogénique (acide  $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyléan-12-ène-24,28-dioïque) et son homologue glycosylé (acide  $28\text{-}\beta\text{-D}$ -glucopyranosyl- $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihydroxyléan-12-ène-24,28-dioïque) ont été identifiés dans les feuilles de chêne (Romussi *et al.* 1994) puis dans le bois (Arramon *et al.* 2002). L'acide  $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -23-tétrahydroxyléan-12-ène-24,28-dioïque et l'acide  $28\text{-}\beta\text{-D}$ -glucopyranosyl- $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -23-tétrahydroxyléan-12-ène-24,28-dioïque ont également été identifiés et dosés. Leur concentration totale dans les bois *Q. robur* et *Q. petrae* atteint les 800 mg/Kg (Arramon *et al.* 2002). L'acide barthogénique possède un goût amer, alors que d'autres triterpénoïdes galloylés et glycosylés (QTT I et QTT II) isolés récemment du chêne présentent un goût sucré (Marchal *et al.* 2011).

## **1.4 Evolution du profil au cours du procédé de tonnellerie**

La composition du bois de chêne évolue aussi au cours des procédés de tonnellerie. Des différences entre les espèces ont tout d'abord été remarquées au niveau de la constitution de la composante extractible ainsi que de l'ultra structure du bois (porosité). La forêt de provenance peut aussi jouer un rôle non négligeable mais discuté, par un effet terroir plus ou moins identifié et par la répartition des espèces dans ces zones forestières. Les autres étapes cruciales sont le séchage, avec une procédure d'affinage du merrain et enfin la chauffe.

## **1.5 L'affinage du merrain**

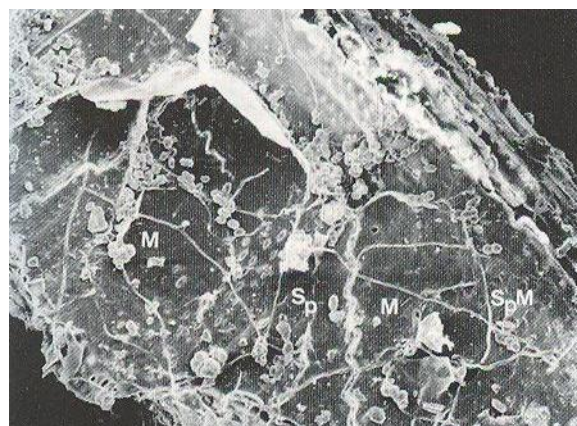
Dans cette étape, on laisse traditionnellement le bois frais sécher à l'air libre pendant 24 à 36 mois. Le bois frais possède 65 à 75 % d'humidité. Il se déshydrate lentement jusqu'aux alentours de 12 % en été et 15-18 % en automne, hiver et printemps (moyenne en France). Ceci provoque également une diminution du volume de 15 %, qui se stabilise avec le temps. Cette diminution est estimée en mesurant les dimensions du bois à l'état saturé et à l'état sec. Le phénomène de séchage dure 10 à 12 mois, indépendamment de la dimension des douelles, de l'origine géographique du bois, et du type de grain (Vivas & Glories 1996). La pluie peut humecter la partie externe du bois sans pour autant réhydrater considérablement le bois. Au contraire l'absence de pluie rend le séchage trop rapide, ce qui engendre des ruptures de fibres.

Le séchage est donc une étape fondamentale pour stabiliser le volume du bois et éviter toute fissuration ou déformation de la barrique. Quand la barrique est remplie de vin, l'humidité relative du bois est d'environ 30 %, ce qui entraîne un gonflement des pièces de bois baignées par le vin, permettant l'étanchéité de la barrique.

Durant le séchage à l'air libre, le bois est soumis à des facteurs environnementaux comme la pluie, le vent ou le soleil. Ceux-ci conduisent à des phénomènes de lessivage et d'oxydation qui ont des répercussions sur la composition du bois. Les pluies peuvent éliminer les

substances hydrosolubles du bois (surtout dans les six premiers mois lorsque le bois est encore vert). La perte annuelle d'extraits secs est d'environ 6 mg/Kg de bois. Dans cette perte, seulement 0,035 % des extractibles sont entraînés par le lessivage (Vivas & Glories 1996). Ce dernier a donc un effet sur les caractéristiques organoleptiques du bois. Les bois exposés à l'action de la pluie sont ainsi trouvés plus amers et moins aromatiques.

Des réactions enzymatiques ont également lieu, causées par des champignons colonisant le bois (Vivas *et al.* 1997). L'effet de cette flore fongique est très important. Elle a notamment la capacité d'hydrolyser une bonne partie des hétérosides du bois de chêne comme les tannins hydrolysables, les coumarines et les polysaccharides, ce qui sur le plan gustatif se traduit par une diminution de l'amertume et de l'astringence (Vivas *et al.* 1991, 1993). Cependant Chatonnet (1995) a observé une diminution de la teneur en coumarines glycosilées pendant le séchage artificiel. L'auteur suggère que des réactions d'hydrolyse acide auraient lieu au cours de la maturation du merrain. Mais ce phénomène serait moins flagrant que l'action microbienne. Les spores de trois moisissures, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma komingii*, recouvrent rapidement la surface du bois (Figure 3). Une faible partie d'entre eux (environ 3 à 6 %) est capable de germer. Le mycélium colonise alors les couches supérieures du bois. Cette colonisation reste plutôt superficielle, alors que l'observation en microscopie électronique en transition des couches plus internes (10 mm), a permis de montrer qu'une grosse partie de la flore du bois est localisée à l'intérieur des parois cellulaires (Vivas *et al.* 1996)



**Figure 3.** Présence de spores (Sp), hyphe (Spm) et mycélium (M) à la surface d'un échantillon de chêne après 6 mois de séchage naturel (Photo Vivas *et al.* 1996).

Après 24 à 36 mois d'affinage, la flore fongique se diversifie, et l'on observe une augmentation des espèces de type *Geotrichum*, *Geomyces* et *Penicillium*. Ce dernier possède des enzymes capables de dégrader les xylanes, et les esters (Chávez *et al.* 2006). Roulland *et al.* (1999) ont pu démontrer que les espèces qui colonisent l'intérieur des douelles de chêne sont les levures du genre *Candida*, *Paecilomyces variotii*, *Phialemonium*. En milieu synthétique, ces espèces seraient capables d'hydrolyser la cellulose, les xylanes et esculins, mais seul *Phialemonium* possède un bon taux de croissance sur cellulose. Des bactéries ont également été retrouvées dans le bois de chêne. Sur la surface du bois séché, des *Streptomyces* ont été isolés. *Bacillus megaterium* (75 % des isollements), *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* (moins de 10 % des isollements) sont présents dans tous les bois (Chatonnet *et al.* 1994). Leur capacité à dégrader la lignine reste discutée (Vivas *et al.* 1993; Chatonnet *et al.* 1994).

La composante aromatique est aussi affectée par le séchage. En effet, la teneur en plusieurs arômes du bois (guaïacol, furfural, syringol, alcool furfurylique, 2-phényléthanol, vanilline, eugénol et whiskylactone) est considérablement augmentée par l'activité de la flore fongique (Petruzzi *et al.* 2010; Chatonnet 1991), qui en même temps dégrade les ellagitannins. Aucune étude n'a pu démontrer que les composés volatils soient produits *de novo* par les microorganismes. L'augmentation d'arômes serait plutôt dû à l'action catalytique des microorganismes, comme les activités glucosidases responsables de la libération des coumarines à partir de leur conjugué glycosylé.

Le séchage sur parc (à l'air libre) est une phase nécessaire à la qualité finale de la barrique puis du vin. Cependant il s'agit d'une phase industriellement délicate, car elle immobilise le bois pendant des années et sa maîtrise reste assez empirique.

Le séchage artificiel semble une technique intéressante. Il permet de rendre le séchage moins onéreux et de réduire considérablement le temps d'immobilisation du bois. Ce dernier reste durant environ un mois dans une étuve ventilée et chauffée entre 40 et 60 °C. Mais le bois qui en sort est plus amer et astringent, tout en étant moins puissant au niveau aromatique (Vivas *et al.* 1996). Les différences de constitution entre les deux techniques sont bien évidentes (Tableau 2).

**Tableau 2.** Comparaison entre séchage naturel à l'air libre et séchage artificiel (Chatonnet 1995).

	Origine Limousin		Origine Centre	
	Séchage naturel	Séchage artificiel	Séchage naturel	Séchage artificiel
Extrait sec (mg/g)	135	145	90	113
Polyphénols totaux (DO 280)	30,4	31,2	22,4	27,2
Couleur (DO 420)	0,040	0,038	0,024	0,030
Catéchine (mg/g)	0,59	0,56	0,30	0,60
Ellagitannins (mg/g)	15,5	17,2	7,8	11,9
cis-Whiskylactone (µg/g)	12	0,85	77	25
trans-Whiskylactone (µg/g)	4,5	0,22	10	124
Eugénol (µg/g)	2	0,3	8	4
Vanilline (µg/g)	11	0,5	15	0,3

Pour accélérer l'étape de séchage du bois sans perdre les effets positifs du développement fongique, il est possible d'inoculer des champignons (Petruzzi *et al.* 2010), voire de traiter avec une solution d'enzymes produites par ces derniers. Cette dernière alternative permettrait de passer de 12 à 36 mois d'affinage à 1 seul mois, sans trop s'éloigner de la qualité du séchage traditionnel à l'air libre (Jourez *et al.* 2003). L'inoculation du merrain pour accélérer l'étape d'affinage est une technique prometteuse mais encore peu connue. Par exemple, l'action des microorganismes dans l'augmentation des composés odorants n'a pas encore été élucidée.

## 1.6 Les chauffe de cintrage et de brûlage

Une fois le séchage terminé, les douelles de bois sont assemblées puis courbées de façon à prendre la forme cintrée de la barrique. Pour qu'elles se courbent sans casser et gardent leur forme, les douelles sont chauffées et humidifiées.

Cette phase est appelée « chauffe de cintrage ». Elle est basée sur l'existence dans le bois de polymères pariétaux thermoplastiques, notamment l'hémicellulose et la lignine. Lorsque l'on chauffe le bois, ces deux polymères atteignent le stade de transition vitreuse et passent à l'état de gel. Les températures nécessaires pour atteindre cet état sont de 50 à

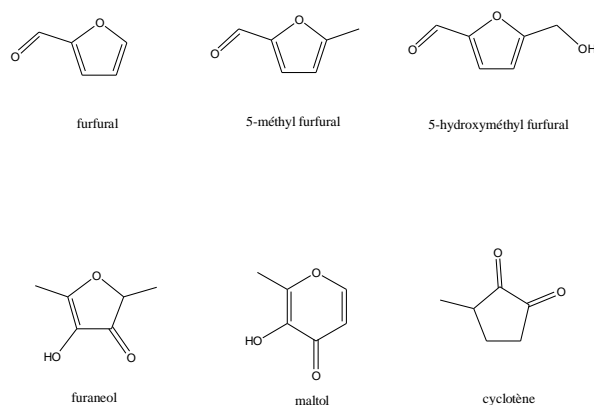
60 °C pour l'hémicellulose et de 90 à 100 °C pour la lignine (Goring 1963).

Pendant cette opération, qui dure de 20 à 30 minutes, la face interne des douelles est chauffée graduellement environ à 7 °C par minute (Chatonnet 1995).

La « chauffe de brûlage » ou « bousinage » a ensuite pour but de fixer définitivement la forme du fût. Cette opération influence fortement la qualité finale du bois et donc du vin, selon le combustible utilisé, l'homogénéité de la chauffe, la modalité (à coque ouverte ou fermée), l'intensité et la durée (Chatonnet 1991). Généralement, les tonnellerie distinguent les chaufes légère, moyenne et forte. Les conditions et les critères de classification varient d'une tonnellerie à l'autre, mais de manière générale, la chauffe légère correspond à une durée de 5 minutes pour atteindre 120-180 °C en surface, la chauffe moyenne à 10 minutes pour 200 °C, et la chauffe forte à 15 minutes pour 230 °C.

Le bousinage modifie considérablement la composition chimique du bois. Sur le plan gustatif, les ellagitannins sont dégradés à mesure que la chauffe augmente. La dégradation thermique de macromolécules libère des molécules volatiles, tandis que les réactions dues à la chauffe génèrent de nouveaux composés aromatiques.

La dégradation des polysaccharides conduit à la formation d'aldéhydes furaniques, présentées dans la figure 4. Les pentoses constituant l'hémicellulose forment du furfural, et le glucose provenant de la cellulose forme du 5-hydroxyméthyl furfural (HMF) et du 5-méthylfurfural (MF) (Hodge 1967). Ces molécules sont ensuite retrouvées dans le vin, mais à des concentrations inférieures à leur seuil de perception. Le HMF est, quant à lui, inodore.



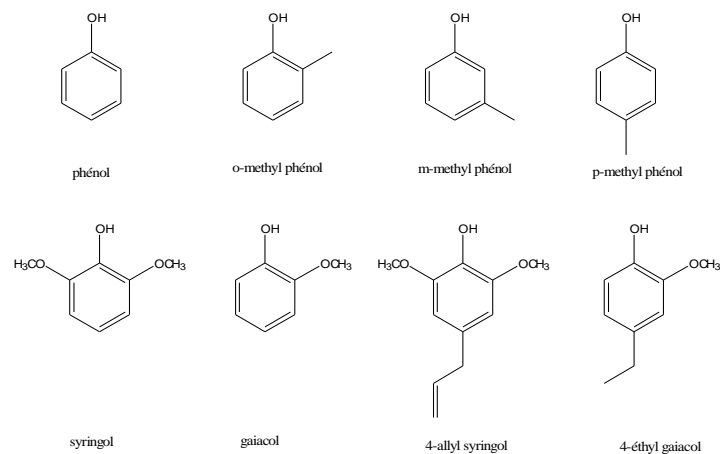
**Figure 4.** Composés issus de la thermodégradation de la composante polysaccharidique du bois et réaction de Maillard



La dégradation thermique des sucres conduit également à la formation d'autres composés volatils, caractérisés par des notes de caramel ou de grillé. Parmi ces molécules, nous retrouvons l'hydroxy-3-méthyl-2-pyrone (maltol), le 3-méthyl-2-cyclopentèn-1-one (cyclotène), et le 2,5-furandicarboxaldéhyde (furanéol) (Nishimura *et al.* 1983).

La réaction Maillard nécessite la présence de sucres, d'acides aminés ainsi qu'une température élevée. En fonction de l'acide aminé qui entre en jeu les produits formés sont différents. La réaction avec la phénylalanine produit du 2,5-furanedicarboxaldéhyde et du furylhydroxyméthylcétone, caractérisés par des notes de miel et de rancio (Cutzach *et al.* 1999). Au contraire, avec la proline, la réaction donne de l'hydroxymaltol, responsable de notes de caramel et de toasté (Cutzach *et al.* 1997).

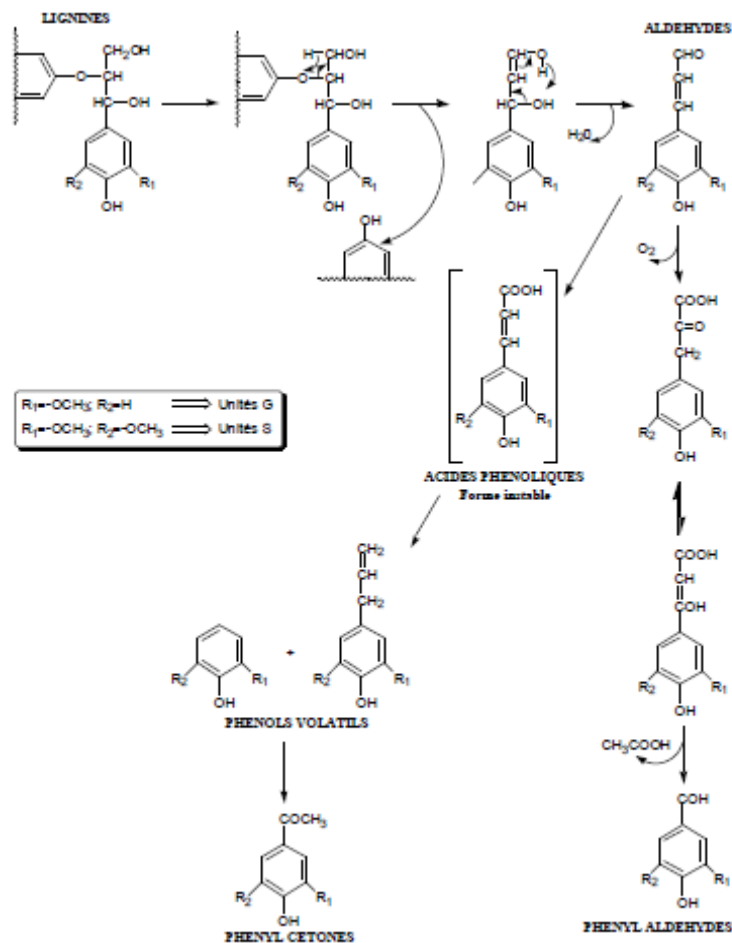
D'un autre côté, la dépolymérisation thermique de la lignine libère des phénols volatils responsables de notes épicées et fumées (phénols et méthylphénols) (Figure 5), notamment les dérivés monométhoxylés en quantité plus importante comme le gaïacol, 4-méthylgaïacol, le 4-éthylgaïacol et le 4-vinylgaïacol ; ainsi que des dérivés diméthoxylés comme le syringol et le 4-allylsyringol (Chatonnet 1995 ; Nonier *et al.* 2006).



**Figure 5.** Phénols présents dans le bois et produits par la chauffe

Des molécules déjà présentes dans le bois frais voient leurs teneurs augmentées, comme l'eugénol, l'isoeugénol, mais également les phényl-cétones (acétophénone, acétovanillone, acétosyringone, propiosyringone) et les aldéhydes phénoliques (vanilline, syringaldéhyde, coniféraldéhyde, sinapaldéhyde) (Nishimura 1983 ; Boidron *et al.* 1988). Ces derniers sont considérés comme les produits de la dégradation thermique des unités terminales des

lignines. Les aldéhydes phénoliques peuvent à leur tour être dégradés par voie thermique, donnant des acides phénols, puis par décarboxylation de ces derniers, donner des phénols, comme illustré dans la figure 6 (Nonier *et al.* 2006).



**Figure 6.** Voie de dégradation des lignines (d'après Nonier *et al.* 2006)

La thermolyse des lipides se traduit, quant à elle, par une augmentation de la concentration en acides gras. La dégradation thermique des acides gras hydroxylés pourrait être à l'origine de l'augmentation de la *cis*-whiskylactone dans les couches superficielles du bois de chêne brûlé. Tandis que le *trans*-whiskylactone reste à la même concentration, le rapport *cis/trans* double avec la chauffe (Tableau 3).

Mais l'existence dans le chêne de précurseurs glycosidiques de la whiskylactone pourrait également expliquer cette augmentation au cours de la chauffe (Masson *et al.* 2000 ; Hayasaka *et al.* 2007). La thermolyse de la liaison glycosidique ou ester, suivie de la

lactonisation, seraient alors à l'origine de l'augmentation de la *cis*-whiskylactone (Wilkinson *et al.* 2004).

**Tableau 3.** Incidence de l'intensité de brûlage sur la formation des différents isomères de la whiskylactone (Chatonnet 1991)

Molécules (mg/L)	Intensité de brûlage (3 répétitions)									
	Non chauffé	Légère (5 minutes, 300 °C)			Moyenne (10 minutes, 300 °C)			Forte (15 minutes, 300 °C)		
		<i>L 1</i>	<i>L 2</i>	<i>L 3</i>	<i>M 1</i>	<i>M 2</i>	<i>M 3</i>	<i>F 1</i>	<i>F 2</i>	<i>F 3</i>
<i>Trans</i> whiskylactone	0,16	0,09	0,16	0,09	0,06	0,13	0,13	0,07	0,2	0,16
<i>cis</i> -whiskylactone	0,64	0,46	0,64	0,61	0,7	1,75	1,68	0,76	1,8	2,2
<i>cis+trans</i> whiskylactone	0,8	0,54	0,8	0,7	0,76	1,88	1,81	0,83	2	2,36
Rapport <i>cis/trans</i>	4	5	4	6,8	11,7	13,5	12,9	10,9	9	13,7

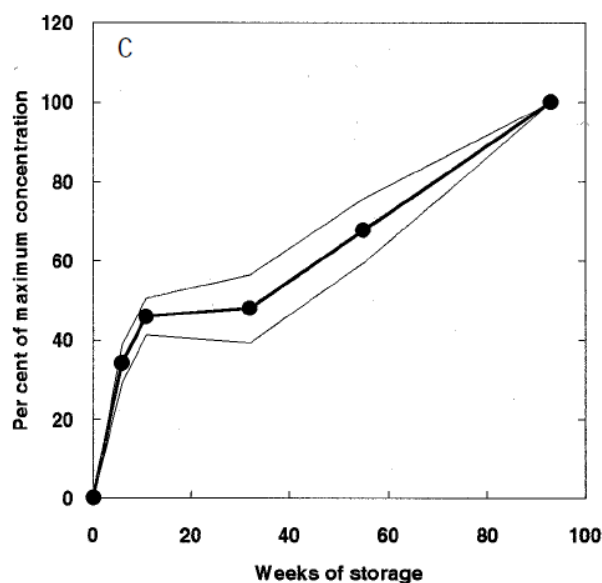
## 2. Le bois et le vin

Comme nous l'avons vu précédemment, le passage en fût de chêne modifie le vin sur les plans aromatique et gustatif. Plusieurs phénomènes sont responsables de ces changements : l'extraction, l'hydrolyse acide, l'oxydoréduction, l'interaction entre le bois et la microflore du vin.

Les vins en contact avec le bois s'enrichissent de nombreux composés, volatils ou non. En parallèle, l'élevage dans le bois permet une évolution des composés du vin. Les barriques sont plus perméables que les cuves en ciment ou en inox. Des réactions d'oxydo-réduction sont notamment favorisées par la mise en barrique, dont l'une des conséquences visibles est l'évolution de la couleur vers des teintes plus mauves-rouges. La porosité du bois permet en effet des échanges gazeux, et des traces d'oxygène vont se dissoudre dans le vin. La dissolution d'oxygène se fait principalement au travers des interstices entre les douelles

(63 %) et au travers du trou de bonde non hermétique (21 %). Des phénomènes d'oxydation dit « ménagés » ont alors lieu et font évoluer le vin. Ce dernier s'assouplit grâce à la condensation des tannins par des ponts d'éthanal. Les réactions d'oxydoréduction sont catalysées par des cations métalliques tels que le fer et le cuivre (Alteyrac *et al.* 1995). Vivas (1997) a observé qu'après 12 mois d'élevage, les vins en barrique ont tendance à contenir plus de fer que les mêmes vins en cuve, alors que la teneur en cuivre ne semble pas affectée. La teneur en nickel et en chrome est augmentée, mais le taux des apports varie fortement d'une barrique à l'autre. Le bois peut également modifier la composition en minéraux du vin par des phénomènes d'adsorption ou de chélation. Par exemple, il a été démontré que le fer peut être associé aux ellagitanins (Mila *et al.* 1995) ou à l'acide ellagique (Srivastava *et al.* 2007). La variabilité retrouvée dans les différentes barriques concernant leur teneur en composés minéraux se remarque également lorsque l'on s'intéresse aux composés volatils. Towey & Waterhouse (1996) ont démontré la grande diversité de ces composés d'une barrique à l'autre. Ainsi, au sein d'une même tonnellerie, les barriques présentent une très forte diversité en composés volatils (Chatonnet 1995).

En outre, les composés odorants cédés au vin sont nombreux. Leur concentration dépend de plusieurs facteurs. Des études sur la cinétique d'extraction montrent une forte solubilisation dans le vin pendant les deux premiers mois de contact. Dans les mois qui suivent, la concentration d'arômes du bois dans le vin augmente très lentement. Il est possible que certains composés comme l'eugénol soient presque totalement extraits durant la première année d'utilisation de la barrique. Cela limite la durée d'utilisation d'une barrique de 3 à 5 ans. Cependant, la concentration en whiskylactone dosée dans un vin provenant d'une barrique utilisée depuis plus d'un an serait supérieure au même vin conservé en barrique neuve (Towey & Waterhouse 1996 ; Jarauta *et al.* 2005). L'explication apportée par Towey & Waterhouse (1996) porte sur l'action déshydratante qu'aurait le dioxyde de soufre, utilisé pour stériliser la barrique entre les utilisations, sur la forme ouverte de l'acide gras précurseur de la whiskylactone. La cinétique d'extraction d'un autre arôme clé du bois, la vanilline, a été étudiée par Spillman *et al.* (1998a). Les auteurs ont observé un profil d'extraction assez particulier. Au cours des 32 premières semaines, la teneur augmente asymptotiquement, puis devient linéaire (Figure 7).



**Figure 7.** Accumulation en vanilline d'un vin modèle élevé en barrique de chêne américain et français (d'après Spillman *et al.* 1998a)

Cela fait penser à une source potentielle qui relargue de la vanilline régulièrement. La lignine, comme déjà vu dans le chapitre précédent, peut fournir des aldéhydes phénoliques. Dans ce contexte, l'éthanololyse de la lignine a été étudiée par Nishimura *et al.* (1983). Elle serait évidemment plus intéressante pour les eaux-de-vie que pour le vin. Les résultats montrent de faibles rendements dans la production d'unités monomères, telles que la vanilline et la syringaldéhyde. L'éthanololyse des lignines natives n'est donc pas un acteur principal du vieillissement en barrique. Dans les barriques, les lignines natives sont presque totalement transformées par la chauffe. Les monomères formés (aldéhydes phénoliques et phénols), sont dans un premier temps extraits par le vin ou les eaux de vie, puis transformés par des réactions d'oxydation et d'estérification. Par exemple, l'oxydation de la vanilline conduit à la formation d'acide vanillique, qui donne ensuite de l'éthyle vanillate par estérification.

Le vin est un milieu acide. Ainsi au cours du temps, des réactions d'hydrolyse des liaisons ester peuvent se produire. Ce type d'hydrolyse peut se produire dès 1 mois de conservation pour les glycosides des alcools tertiaires (linalol), alors que les alcools primaires sont plus stables (Voirin *et al.* 1990). Même après 5 ans de conservation, les dérivés glycosidiques

d'alcools primaires peuvent être présents (Gunata *et al.* 1986). La partie osidique n'influence pas la cinétique de la réaction, même dans le cas des diglycosides.

Les polysaccharides du bois influencent également le goût du vin, diminuant l'astringence et augmentant la sensation de « gras ». Certaines molécules non volatiles à pouvoir sucrant vont également participer à moduler la sensation gustative (Marchal *et al.* 2011).

L'apport organoleptique du bois au vin est généralement positif. D'ailleurs, un des composés apporté par le bois, la vanilline, est un agent aromatisant largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour ses propriétés appétantes et sa note aromatique appréciée du plus grand nombre.

Toutefois la richesse des notes aromatiques apportées par le bois peut aussi avoir un effet négatif sur l'équilibre aromatique des vins. Moio *et al.* (1993) ont démontré que l'augmentation des notes boisées (bois, vanille, pain grillé etc.) provoque une diminution de la complexité du vin. Des effets de masquage des notes fruitées et florales par les notes boisées ont notamment été suggérés. A partir de ces observations, Atanosova *et al.* (2004) ont établi l'existence d'une interaction sensorielle entre les notes fruitées et boisées. Ces auteurs ont réussi à démontrer des phénomènes de masquages en utilisant comme modèles la whiskylactone ou le gaiacol pour l'arôme « boisé » et l'acétate d'isoamyle ou le butyrate d'éthyle pour l'arôme « fruité ». Les molécules volatiles du bois peuvent donc apporter de nouveaux arômes au vin mais aussi diminuer ou cacher son propre caractère. Une maîtrise parfaite de l'utilisation du bois (barriques et substituts) est donc fondamentale à la production d'un vin de qualité. « L'odeur de bois ne doit pas effacer les autres arômes, elle ne doit pas s'y substituer et constituer à elle seule le bouquet » (Peynaud, 2006).

Sur le plan organoleptique les interactions bois/vin sont très complexes. Différents aspects de la vinification peuvent impacter le boisage. Dans ce chapitre, certains aspects physicochimiques ont été illustrés. Dans les deux chapitres suivants, nous focaliserons notre attention sur l'interaction microorganismes/bois pendant la fermentation alcoolique (chapitre 2.1) puis pendant la fermentation malolactique (chapitre 2.2).

## 2.1 La fermentation alcoolique sous bois

La teneur en composés du bois extraits par le moût pendant la fermentation alcoolique (FA), peut rester constante (c'est-à-dire qu'il n'existe aucune interaction des microorganismes avec les molécules du bois), augmenter ou diminuer. Le manque d'observations claires complique l'établissement des hypothèses mécanistiques.

Une diminution signifie que le composé est métabolisé par les levures, alors qu'une augmentation peut résulter de la synthèse *de novo* à partir d'éléments fournis par le bois ou par la lyse de précurseurs. Ce dernier cas est souvent attribué à l'action des enzymes microbiennes sur des précurseurs glycosidiques.

Dans des conditions de fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* présente de faibles activités  $\alpha$ -arabinosidase et  $\alpha$ -rhamnosidase (Delcroix *et al.* 1994). Chez *S. cerevisiae*, l'enzyme  $\beta$ -glucosidase est très instable : à un pH de 2,8, elle perd 95 % de son activité maximale. Cependant, l'inhibition par le glucose est moins prononcée que pour les  $\beta$ -glucosidases du raisin. Les enzymes glycosidases de *S. cerevisiae* sont probablement excrétées dans le moût dont le pH rend les enzymes peu actives, d'où la faible activité  $\beta$ -glucosidase durant la FA. De légères augmentations de l'activité  $\beta$ -glucosidase sont attribuables à l'incrémentation de la biomasse pendant la phase exponentielle (Delcroix *et al.* 1994).

Pourtant, la contribution de *S. cerevisiae* dans la libération d'arômes à partir de précurseurs glycosidiques pendant la FA a été prouvée (Ugliano *et al.* 2006b ; Loscos *et al.* 2007 ; Hernández-Orte *et al.* 2008). Des enzymes autres que le  $\beta$ -glucosidase interviendraient donc dans la libération d'arôme. En effet, Darriet *et al.* (1988) ont démontré que des osidases localisées dans l'espace péri-plasmique de *S. cerevisiae* peuvent hydrolyser les mono-terpènes glycosides.

Certaines levures non-*Saccharomyces* possèdent également des activités glycosidases. Les enzymes peuvent être extracellulaires, comme chez les genres *Debaryomyces* et *Candida* (Rosi *et al.* 1994 ; McMahon *et al.* 1999). Dans les levures du genre *Hanseniaspora* et *Kloeckera*, les enzymes sont plutôt localisées à l'intérieur de la cellule (Vasserot *et al.* 1989, 1990 ; Rosi *et al.* 1994). Les genres *Pichia*, *Dekkera*, *Brettanomyces* et *Hansenula* semblent produire des glucosidases à la fois intra et extracellulaires (Rosi *et al.* 1994 ; McMahon *et al.* 1999). Ces enzymes pourraient participer à l'hydrolyse des précurseurs aromatiques du

raisin et du bois de chêne, mais leur activité glucosidase est fortement inhibée par la teneur en glucose élevée dans les premières phases de la FA.

D'autres levures non-*Saccharomyces* du genre *Hanseniaspora* (*H. osmophilia* et *H. uvarum*) et *Pichia* (*P. anomala*) possèdent des activités  $\beta$ -xylosidases, considérablement moins sensibles à la concentration en glucose et en alcool (Manzanares *et al.* 1999). Les enzymes impliquées dans ces activités peuvent participer à la libération d'arômes durant la FA. En effet, Manzanares *et al.* (1999) ont montré qu'au pH du vin testé (3-3,8), les enzymes responsables de l'activité  $\beta$ -xylosidases chez *Pichia* et *Hanseniaspora* sont respectivement à 30 et 70 % de leur activité maximale.

La plupart des travaux mesurent l'activité glycosidase des levures sur les précurseurs des terpénoïdes. Mais lors de la FA sous bois, les levures agissent sur la teneur en arôme du bois (vanilline, whiskylactone, etc.) (Gómez García-Carpintero *et al.* 2012). Une étude plus détaillée de la relation bois-levure est donc nécessaire.

Un autre aspect de la FA en barrique concerne la nuance de l'arôme boisé dans le vin. En effet, les vins fermentés en barrique ont un arôme moins boisé que les vins mis en barrique après la FA (Chatonnet *et al.* 1992). Les aldéhydes, comme la vanilline et le furfural, sont réduits en alcools correspondants (Marsal *et al.* 1988 ; Spillman *et al.* 1998b). La conversion de la vanilline en alcool vanillique comporte une perte en arôme vanillé car ce dernier est quasiment inodore. Il a été démontré que quand un vin est fermenté dans des barriques d'origines diverses présentant des teneurs en vanilline différentes, la concentration finale en vanilline est la même dans tous les échantillons (Spillman *et al.* 1997). Les levures pourraient donc être responsables de cette homogénéisation du produit.

## **2.2 Interactions entre le bois et les bactéries lactiques**

Du point de vue organoleptique, les vins ayant subi une fermentation malolactique (FML) en barrique diffèrent des vins issus d'une FML en cuve. Selon Ribéreau-Gayon *et al.* 1998, ils sont perçus comme plus complexes et plus fins, avec des tannins plus souples et un arôme boisé moins intense.



Il est bien connu que la FML influence les caractéristiques organoleptiques du vin (Acree *et al.* 1976 ; Henick-Kling *et al.* 1994 ; Sauvageot & Vivier 1997 ; Gambaro *et al.* 2001 ; du Plessis *et al.* 2002). L'intensification des notes beurrées est liée à la production du diacétyle par les bactéries lactiques. Le diacétyle semble aussi jouer un rôle sur les autres descripteurs du vin, notamment sur le caractère fruité, car cette molécule est responsable d'un effet masquant (Lytra *et al.* 2013). Quand la FML est réalisée en barrique, l'arôme du vin apparaît à 2 mois beaucoup plus marqué par des notes boisées, grillées, fumées et épicées. Cette différence est moins marquée, mais encore présente après 15 mois d'élevage (de Revel, 2002).

Sur le plan analytique, ces différences sont évidentes. On constate une concentration plus importante en composés volatils tels que la vanilline, la whiskylactone, l'isoeugénol et l'eugénol pour les vins réalisant la FML en barrique (de Revel *et al.* 1999). Il a été montré que ce phénomène est lié à la capacité des bactéries lactiques d'hydrolyser les liaisons osidiques des précurseurs d'arôme du bois de chêne (Bloem *et al.* 2008). Plusieurs activités glycosidases pourraient être susceptibles d'intervenir dans cette libération. Bloem *et al.* (2008) ont corrélé la libération d'arôme du bois de chêne dans le vin à des activités arabinosidases, xylosidases, glucosidases et, dans une moindre mesure, rhamnosidases.

En effet, des études ont démontré la capacité d'*O. oeni*, pendant la FML, à hydrolyser les précurseurs d'arômes glycosylés présents dans le vin (Grimaldi *et al.* 2000; Ugliano *et al.* 2003; D'Incecco *et al.* 2004). Très récemment, les gènes codant pour les glycosidases intracellulaires ont été identifiés chez *O. oeni* (Michlmayr *et al.* 2010, 2011 ; Capaldo *et al.* 2011). Il s'agit de l'enzyme  $\beta$ -glucosidase ( $Bgl_{O.oeni}$ ) et  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ( $Abf_{O.oeni}$ ) possédant les activités suivantes :  $\beta$ -glucosidase ( $81 \text{ U mg}^{-1}$ ),  $\beta$ -xylosidase ( $46 \text{ U mg}^{-1}$ ),  $\alpha$ -arabinosidase ( $5,7 \text{ U mg}^{-1}$ ). Aucune rhamnosidase n'a été détectée. L' $Abf_{O.oeni}$  identifiée est très spécifique. Une faible activité  $\beta$ -D-xylopyranosidase a également été détectée. L'enzyme est inhibée par l'arabinose (25 % de réduction d'activité à 37,5 g/L d'arabinose) mais pas par le glucose ni par le xylose. L'alcool à une teneur de 12 % v/v diminue l'activité de 50 %. Au contraire  $Bgl_{O.oeni}$  semblait être stimulée par la présence d'alcool concernant son activité  $\beta$ -glucosidase, mais l'activité  $\alpha$ -arabinofuranosidase est réduite à 23 %. L'effet stimulant de l'alcool avait déjà été mis en évidence par Grimaldi *et al.* (2000, 2005) et par Barbagallo *et al.* (2004).

Il est à noter que pour Bgl<sub>O.oeni</sub>, le glucose inhibe l'activité secondaire arabinosidase, mais pas l'activité glucosidase. L'expression de ces gènes dans des conditions réelles, dans le vin et au cours de la FML doit encore être étudiée. Pour autant, une grande variabilité de l'activité glycosidase entre les souches d'*O. oeni* a déjà été mise en évidence (Gagné *et al.* 2011). L'affinité des enzymes produites par les bactéries est influencée par la nature du substrat. Les souches qui présentent une activité importante par mesure avec des substrats synthétiques (*pNP-βglu*, *pNP-αglu*, *pNP-βxyl*, *pNP-αara*, *pNP-αrha*), peuvent ne pas être très performantes quand la mesure est effectuée avec un substrat naturel (Gagné *et al.* 2010).

Selon Bloem (2005) chez *O. oeni*, une enzyme α-L-arabinosidase serait fortement impliquée dans la libération d'arôme du bois de chêne. Mais cette enzyme n'a été que partiellement purifiée et n'a pas pu être séquencée.

La libération d'arômes par *O. oeni* ne semble pas être stoechiométrique, ce qui signifie que les composés volatils sont libérés en quantité inférieure à ceux que la consommation de précurseurs laissait penser (Boido *et al.* 2002 ; Ugliano & Moio 2006). Les composés manquants rentrent en jeu dans d'autres processus, comme des phénomènes de sorption (Boido *et al.* 2002 ; Dufour & Bayonove 1999). D'autre part les aglycones libérés pourraient être en partie métabolisés. Il a été démontré par Bloem *et al.* (2006), que lorsqu'elle est cultivée en présence de vanilline, *O. oeni* est capable de réduire la vanilline en alcool vanillique. La formation d'un arôme clé du bois de chêne, comme la vanilline, par d'autres voies que l'hydrolyse enzymatique des précurseurs glycosidiques a été envisagée par Bloem *et al.* (2006). Les auteurs ont démontré une corrélation entre la dégradation de l'acide férulique par *O. oeni* et la production de vanilline pendant la croissance, mais le rendement est très faible. La transformation du 4-vinylguaïacol en vanilline est aussi peu productive (< 2,6 %).

Une concentration supérieure en whisky-lactone, 3-oxo-α-ionol, composés furaniques et vanilline a été retrouvée dans les vins en contact avec du bois pendant la FML plutôt que pendant la FA (Gómez García-Carpintero *et al.* 2012).

Cette différence pourrait s'expliquer de la manière suivante : la macération étant plus longue en FML qu'en FA, elle provoquerait une extraction majeure de certains arômes du bois (Arapitsas *et al.* 2004).

Par ailleurs, le bois a un effet sur la croissance bactérienne : les bactéries se développent moins facilement dans les barriques que dans les cuves, et leur phase exponentielle est retardée, ce qui implique une consommation d'acide malique moins rapide (Ducruet *et al.* 1997).

Les composés phénoliques du bois de chêne, une fois solubilisés dans le vin, ont des effets à la fois positifs et négatifs sur la viabilité bactérienne (Vivas *et al.* 1995). Ces effets sont positifs dans le cas de l'acide gallique, et négatifs dans le cas des ellagitannins (Vivas *et al.* 2000). Des phénols simples issus du bois de chêne, comme l'isoeugénol et l'eugénol, ont un effet négatif sur la croissance d'*O. oeni* (Bloem *et al.* 2006).

La chauffe du bois a également un effet positif sur la viabilité des bactéries par rapport au bois frais (de Revel *et al.* 2005).

Finalement, la FML réalisée en barrique donne lieu à des vins profondément différents de ceux réalisés en cuve. Cela est en partie dû à une augmentation de la teneur en arômes du bois de chêne. Il a été prouvé que cette augmentation est liée à l'activité bactérienne et notamment aux enzymes glycosidases d'*O. oeni*. Cela implique l'existence dans le bois de chêne de précurseurs d'arôme de type glycosides.

### **3. Les précurseurs d'arôme glycosylés**

Les arômes peuvent exister à l'état de précurseurs glycosylés et sont alors trop hydrophiles et non volatiles. Les précurseurs sont formés d'une partie aglycone, liée *a minima* à un ou plusieurs sucres. La partie aglycone peut être constituée d'alcanols, d'alcénols, de dérivés de l'acide shikimique (phénols), ou de dérivés de voies de synthèse de terpènes (monoterpenoïdes, C13-norisoprénoïdes, sesquiterpénoïdes).

Le groupement hydroxyle de l'aglycone forme une liaison osidique avec l'hydroxyle du carbone anomérique du sucre (l'alcool porté par le carbone hémi-acétal). Généralement, la partie glycone directement liée à la partie aglycone est un  $\beta$ -D-glucopyranoside, et peut être substituée avec un ou plusieurs sucres, ou estérifiée par des acides. L' $\alpha$ -L-arabinofuranose,

l' $\alpha$ -L-rhamnopyranose, le  $\beta$ -D-apiofuranose, et le  $\beta$ -D-glucose ont été identifiés comme deuxième sucre. Cela implique la nécessité de l'intervention séquentielle de deux glycosidases pour libérer l'aglycone (Gunata *et al.* 1998).

Pour être odorante, une substance doit tout d'abord être volatile. Mais lorsque les composés sont liés à des sucres, leur volatilité diminue considérablement. Le groupement osidique provoque également une forte augmentation de la polarité et une diminution de la réactivité. Ces propriétés leur permettent d'être transportés dans les organes de la plante (Wils *et al.* 1979). Cependant, la solubilité dans l'eau de certains composés glycosilés, comme par exemple le thymol glucoside augmente très faiblement. Cela a conduit Stahl-Biskup *et al.* (1993) à soulever des doutes sur le rôle de transporteur des glycosides. Les glycosides pourraient aussi avoir une fonction de stockage (Wilson *et al.* 1984). En effet, il a été observé dans les fruits en maturation, une quantité de précurseurs supérieure à la quantité d'aglycones (Gunata *et al.* 1985b ; Kramer *et al.* 1991 ; Perez *et al.* 1997 ; Chassagne *et al.* 1996). Un autre rôle de la glycosylation chez les plantes serait la détoxification de certains composés nocifs (Berger *et al.* 1988).

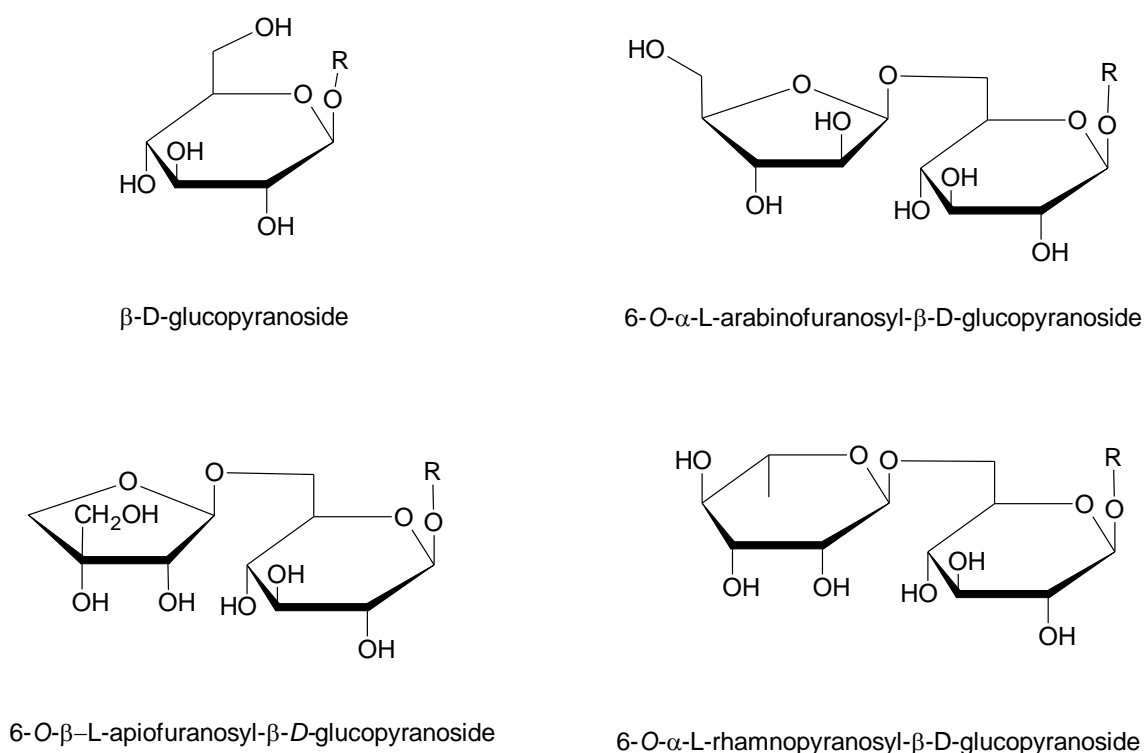
Sarry & Gunata (2004) ont reporté que plus de 200 aglycones différents ont été identifiés dans 150 tissus végétaux de plantes (Stahl-Biskup *et al.* 1993 ; Vasserot *et al.* 1995 ; Winterhalter & Skouroumounis, 1997), comme les pétales de rose, les raisins, les abricots, les papayes, les mangues, les gousses de vanille, les fruits de la passion et les racines de thé de façon non exhaustive.

### **3.1 Importance des précurseurs d'arôme glycosylés en œnologie**

Les précurseurs glycosylés sont une source potentielle d'arômes qui peuvent être exploités. Dans le vin, les précurseurs d'arôme glycosilés proviennent du raisin ou du bois. Les plus fréquents dans la baie de raisin et donc dans le moût sont les glycosides de terpénols et de norisoprénoides. Williams *et al.* (1982) et ensuite Gunata *et al.* (1985) avaient démontré

pour la première fois l'existence de précurseurs non-odorants des terpènes. Dans les années suivantes, ce résultat a été confirmé par l'identification de certains terpénols sous forme de glycosides. Les sucres impliqués sont le glucose, l'arabinose, le rhamnose et l'apiose.

Quatre formes de terpénols glycosides ont été identifiées dans les raisins : les dérivés 6-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, 6-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (rutinoside), 6-O- $\beta$ -L-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, et le  $\beta$ -D-glucopyranoside, le seul monoglycoside (Williams *et al.* 1982, 1983 ; Wilson *et al.* 1984 ; Voirin *et al.* 1990) (Figure 8).



**Figure 8.** Exemples de la partie osidique des précurseurs des monoterpénols retrouvés dans les raisins.

Les terpénol-glycosides sont présents particulièrement dans les cépages de muscat. Les aglycones sont les composés clés de l'arôme de ces cépages. Les formes liées de terpénols sont plus abondantes que les formes libres. Comme pour les formes libres, les formes liées sont localisées principalement dans la pellicule du raisin, mais les deux sont retrouvées dans tous les organes (Gunata *et al.* 1985b).

Les norisoprénoides sont issus de la dégradation des caroténoïdes. Certains norisoprénoides existent dans le raisin sous forme glycosylés. Pour cette classe de composés, le  $\beta$ -D-

glucopyranoside est le seul sucre identifié constituant la partie osidique (Skouroumounis *et al.* 1994).

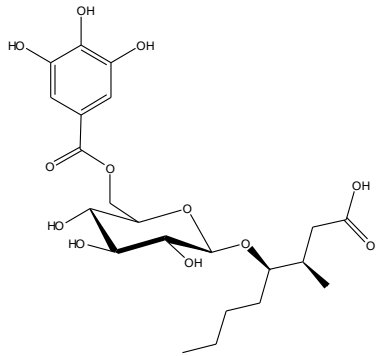
### 3.2 Caractérisation des précurseurs d'arôme glycosylés dans le bois de chêne

Comme nous l'avons vu précédemment, la concentration de certains composés odorants présents dans le bois de chêne frais est directement augmentée par la chauffe, l'action de champignons et d'enzymes, mais aussi dans le vin et dans les extraits du bois par l'action de bactéries, d'enzymes glycosidases et de l'hydrolyse acide. Ces différentes observations indiquent l'existence de précurseurs glycosylés dans le bois de chêne. Un grand nombre des précurseurs d'arômes glycosylés ont été identifiés dans les fruits et dans le vin, mais peu de travaux ont tenté d'identifier les précurseurs glycosylés du bois de chêne.

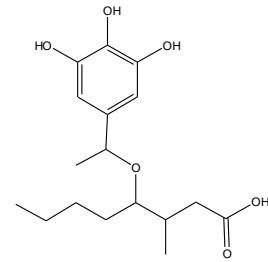
La plupart des travaux s'intéresse à l'origine de la whiskylactone (Masson *et al.* 2000) ainsi qu'à l'identification dans le bois de chêne du dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque, précédemment isolé du bois de *Platycarya strobilacea* (Tanaka *et al.* 1996). Le clivage de la liaison glycosidique de ce précurseur libère de l'aglycone acide-alcool, qui lactonise ensuite pour former la whiskylactone.

L'hypothèse de la présence du précurseur non acylé, l'acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque, avait d'abord été faite par Wilkinson *et al.* (2004). Son existence a ensuite été démontrée par Hayasaka *et al.* (2007) (figure 9). Dans ce dernier article, les auteurs proposent la possibilité de l'existence dans le chêne d'autres précurseurs de la whiskylactone, notamment l'acide 3-méthyl-4-(3'-O-galloyl)-octanoïque et le dérivé hypothétique rutinoside de l'acide 3-méthyl-4-hydroxyoctanoïque (forme ouverte de la whiskylactone).

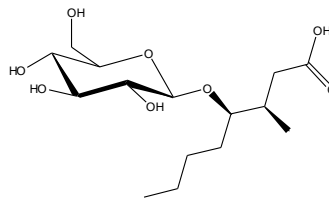
Par ailleurs, Nonier *et al.* (2005) ont démontré l'existence de formes liées pour la whiskylactone, la vanilline, la syringaldéhyde, la mégastigmatriénone et l'eugénol. L'analyse GC-MS des dérivés tri-fluoroacétylés a permis de montrer qu'ils étaient liés à des sucres par liaison glycosidique, mais aucun de ces sucres n'a clairement été identifié.



acide (3S,4S)-4-(6'-O-galloyl)-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque



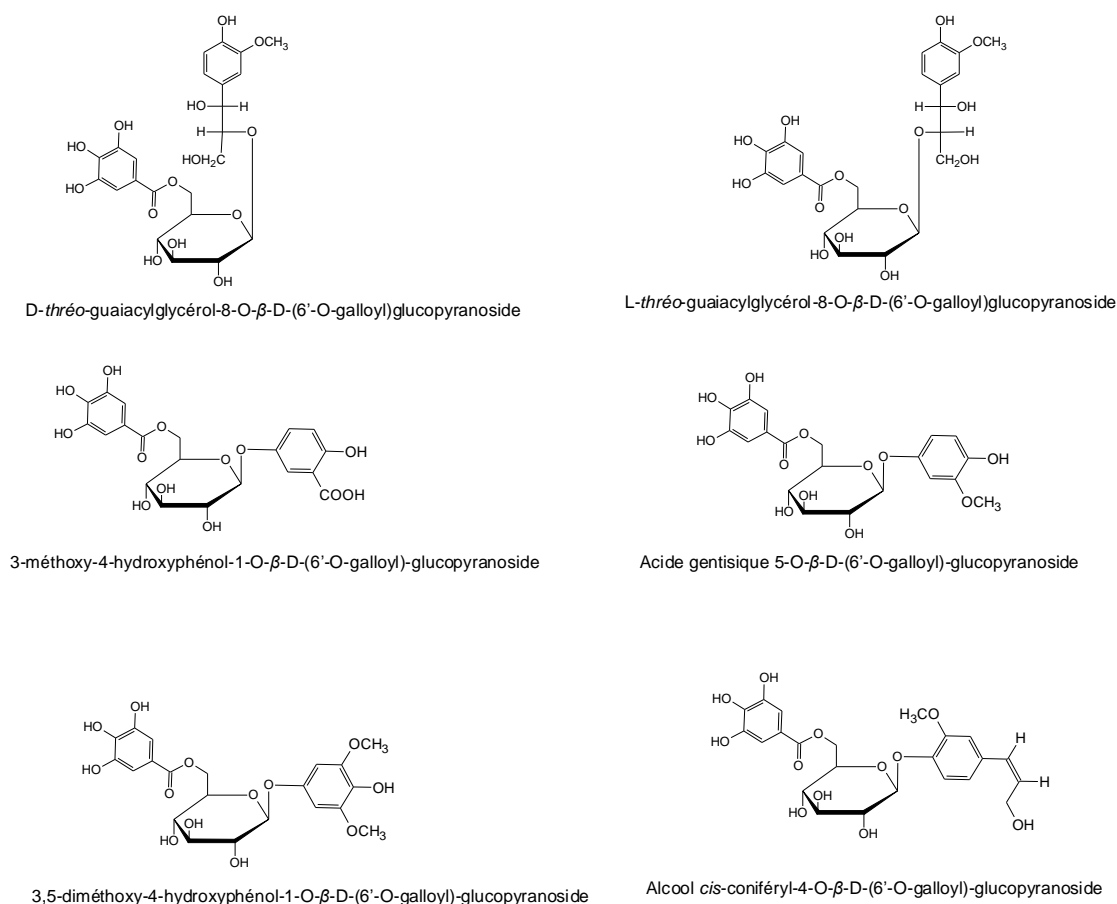
3-méthyl-4-(3'-O-galloyl)-octanoïque



acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque

**Figure 9.** Précurseurs de la whiskylactone retrouvés dans le bois de chêne (Masson *et al.* 2000 ; Hayasaka 2007).

Plusieurs dérivés galloyl glucosidiques ont été retrouvés dans différentes parties du chêne ainsi que dans plusieurs espèces. Ishimaru *et al.* (1987) ont isolé six phénols glucosides gallates dans les glands de *Q. mongolica* et dans les écorces de *Q. acutissima*, deux espèces de chêne asiatique (figure 10). Ils s'agit des *D-thréo*-guaiacylglycérol-8-O-β-D-(6'-O-galloyl)glucopyranoside, *L-thréo*-guaiacylglycérol-8-O-β-D-(6'-O-galloyl)glucopyranoside, 3-méthoxy-4-hydroxyphénol-1-O-β-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside, acide gentisique 5-O-β-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside, 3,5-diméthoxy-4-hydroxyphénol-1-O-β-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside et de l'alcool *cis*-coniféryl-4-O-β-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside.

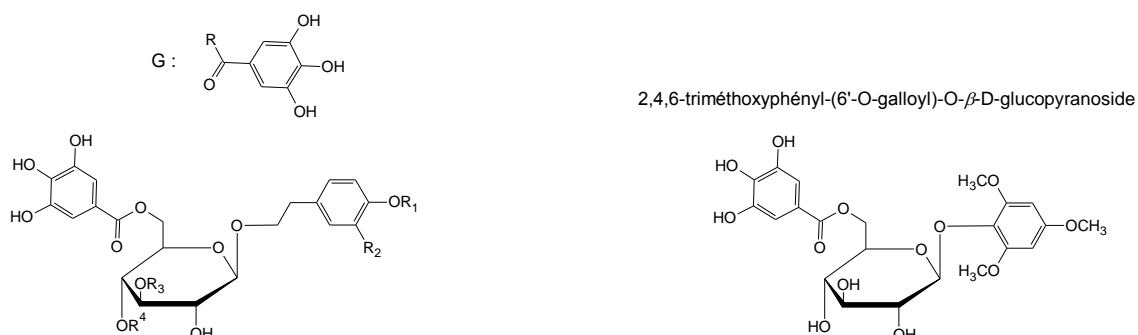


**Figure 10.** Composés identifiés par Ishimaru *et al.* (1987) dans des chênes asiatiques.

Précédemment, à partir des écorces de *Q. stenophylla* (chêne japonais), Nonaka *et al.* (1982) avaient isolé des phénols glucoconjugués et galloylés (figure 11). Les différentes positions du gallate sur le sucre montrent la possibilité pour un même composé d'avoir plusieurs isomères de position dans le bois de chêne. Des doutes sur ces résultats pourraient tout de même être soulevés, car la position de l'ester galloyl sur le glucose est déterminée uniquement par les déplacements chimiques des spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , et non par une corrélation hétéronucléaire à longue distance (HMBC). Les composés identifiés par Nonaka *et al.* (1982) ont été les dérivés 6'-O-gallate ; 3'-O-gallate ; 4,6'-di-O-gallate, 4',6'-di-O-gallate et 3',4',6'-tri-O-gallate du salidroside (l'alcool *p*-hydroxyphénéthyl-1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside ainsi que l'alcool 3,4-dihydroxyphénéthyl-1-O- $\beta$ -D-(6'-O-galloyl) glucopyranoside et le 2,4,6-triméthoxyphényl-O- $\beta$ -D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside. Cette dernière molécule a probablement été confondue par Ishimaru *et al.* (1987), car ils rapportent l'isolement dans



*Q. acutissima*, d'une molécule identifiée comme le 3,4,5-triméthoxyphénol-O-β-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside. Ishimaru *et al.* (1987) ne donnent pas de données spectroscopiques pour ce composé car elles ont déjà été rapportées par Nonaka *et al.* (1982). Cependant ces derniers ne parlent pourtant pas du 3,4,5-triméthoxyphénol-O-β-D-(6'-O-galloyl)-glucopyranoside dans leurs article. Ce composé, a un intérêt médical pour son activité antiplasmodiale (Verrotta *et al.* 2001). En effet *Plasmodium falciparum* est l'agent pathogène du paludisme.



Salidroside-(6'-O-galloyl)-O-β-D-glucopyranoside :  $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$

Salidroside-(4,6'di-O-galloyl)-O-β-D-glucopyranoside :  $R_1 = R_4 = R_3 = H ; R_2 = G$

Salidroside-(4',6'di-O-galloyl)-O-β-D-glucopyranoside :  $R_1 = R_2 = R_3 = H ; R_4 = G$

Salidroside-(3',4',6'di-O-galloyl)-O-β-D-glucopyranoside :  $R_1 = R_2 = H ; R_3 = R_4 = G$

Alcool 3,4-dihydroxyphényl-(6'di-O-galloyl)-O-β-D-glucopyranoside :  $R_1 = R_3 = R_4 = H ; R_2 = OH$

Figure 11. Composés identifiés par Nonaka *et al.* (1982) dans le bois de chêne asiatique (*Quercus acutissima* et *Quercus mongolica*)

### 3.3 Méthodes de purification et d'analyse des précurseurs glycosylés d'arôme

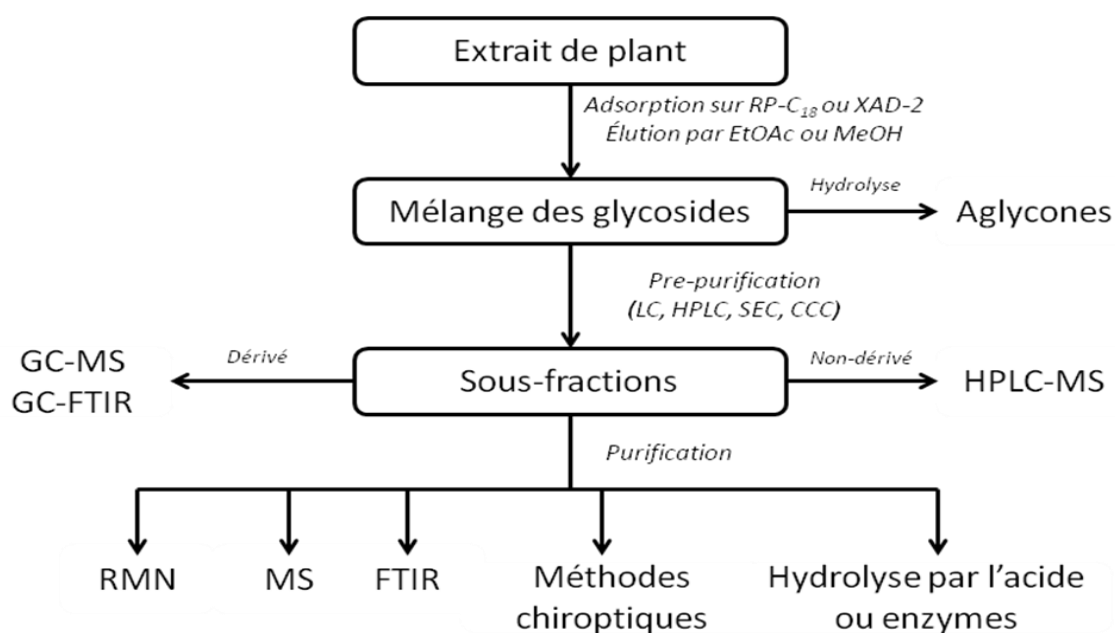
Les précurseurs d'arôme se trouvent dans des matrices très complexes souvent polaires, comme le jus de fruit ou les tissus des plantes. Ces précurseurs se retrouvent sous forme d'aglycones liés à une partie glucidique, entraînant une grande solubilité dans l'eau de ces composés et donc une certaine difficulté à les isoler.

Des méthodes séparatives ont été développées pour résoudre le problème (Figure 12 ). Des purifications partielles ou totales des produits ont été réalisées par adsorption des précurseurs sur une phase inversée C<sub>18</sub> (Williams *et al.* 1982) ou sur résine XAD-2 (Gunata *et al.* 1985a). Dans les deux cas, une première élution par l'eau permet d'éliminer les sucres présents dans la matrice. Les molécules apolaires sont ensuite éluées avec des solvants apolaires, comme le pentane. La fraction liée est récupérée par élution à l'acétate d'éthyle. L'analyse de cette fraction « liée », après dérivation par GC-MS, a conduit à l'identification de nombreux précurseurs glycosidiques des terpènes dans le raisin et dans d'autres fruits (Gunata *et al.* 1985a ; Winterhalter *et al.* 1997).

L'analyse de monoterpènes glycosylés a également été effectuée par chromatographie liquide (HPLC) (Bitteur *et al.* 1989) et couplée au spectromètre de masse (HPLC-MS) (Salles *et al.* 1988).

Une autre méthode a été développée et utilisée pour identifier les formes liées des monoterpénoïdes, norisoprénoïdes et phénols du jus de raisin ou du vin Riesling (Strauss *et al.* 1987 ; Winterhalter *et al.* 1990). Dans cette méthode, une nouvelle technique séparative a été employée : la chromatographie à contre-courant ou DCCC (Droplet Counter Current Chromatography). La DCCC est une chromatographie liquide-liquide sans support solide. On peut la considérer comme un processus discontinu d'extractions successives. A chaque cellule (à considérer comme une ampoule à décanter), les solutés se partagent dans les deux phases selon leur polarité et caractéristiques physico-chimiques.

Le système biphasique utilisé en DCCC par Strauss *et al.* (1987) et par Winterhalter *et al.* (1990) était un mélange de CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (7/13/8 ; v/v/v). Les mêmes solvants, mais en rapport (70 : 30 : 4 ; v/v/v) ont été utilisés en chromatographie de partage centrifuge (CPC) pour isoler la coniferaldéhyde glucoside et la sinapaldéhyde glucoside dans un extrait de *Eleutherococcus senticosus* (Slacanin *et al.* 1991). La CPC est une évolution technique de la DCCC. Elle permet de réduire considérablement le temps d'analyse (quelques heures en CPC contre quelques jours en DCCC) et d'augmenter le volume d'injection. Depuis les années 90, la CPC est une technique préparative largement utilisée en phytochimie. Les composés purs peuvent ensuite être purifiés par chromatographie sur support solide et les analyses structurales nécessaires à la caractérisation moléculaire peuvent être effectuées.



**Figure 12.** Analyse des précurseurs d'arômes glycoconjugués (d'après Winterhalter *et al.*, 1997)

Les fractions d'intérêt contenant les composés liés sont déterminées par analyse GC-MS des aglycones libérés par des enzymes glycosidiques ajoutées, de la même façon que dans les méthodes de Williams *et al.* (1982) et Gunata *et al.* (1985a).

La façon la plus simple de doser les précurseurs d'arômes glycosilés est de couper la liaison glycosidique par hydrolyse enzymatique ou acide. Les composés volatils libérés sont par la suite analysés (Williams *et al.* 1982). Ces procédures ne permettent pas de quantifier directement les composés mais donnent une bonne estimation. Elles sont faciles à mettre en œuvre et, d'un point de vue œnologique, se rapprochent des phénomènes d'hydrolyse qui ont lieu dans le vin. Il a été démontré que certains arômes peuvent avoir plusieurs formes de précurseurs.

L'hydrolyse acide permet d'agir sur toutes ces formes (Ibarz *et al.* 2006). Cependant, des réactions chimiques parasites peuvent avoir lieu et invalider la mesure. Il a par exemple été démontré qu'en milieu acide, les aldéhydes phénoliques peuvent réagir avec un nucléophile tel que les catéchines et former un adduit anthocyanidine-vanilline-catéchine (Sousa *et al.* 2007). Dans une étude comparative entre analyse directe et indirecte par hydrolyse acide, du précurseur de la whiskylactone dans le chêne sessile (Masson *et al.* 2001), il a été mis en

évidence une différence entre la concentration mesurée par hydrolyse acide et celle beaucoup plus élevée mesurée directement par HPLC-UV. Une raison du déficit de la méthode indirecte peut être le fait que l'acide 3-méthyl-4-hydroxyoctanoïque n'est pas totalement libérée et ce dernier n'est pas bien lactonisé dans ces conditions. D'après les résultats obtenus par Masson *et al.* (2001), la quantité de précurseurs de la whiskylactone mesurée par méthode indirecte représente à peu près un tiers de celle obtenue par méthode directe.

L'inconvénient de l'hydrolyse enzymatique est la forte spécificité des enzymes vis-à-vis du substrat. Il est donc nécessaire d'utiliser différentes enzymes. Loscos *et al.* (2009) a comparé les deux types d'hydrolyses : acide (pH 2,5, 100 °C, 1h) et enzymatique (AR2000, pH 5, 40 °C, 16 h).

Le dosage des glycosides est communément réalisé après conversion des glycosides en dérivés triméthylsilylés, trifluoroacétylés, acétylés ou méthylés (Voirin *et al.* 1992A ; Voirin *et al.* 1992b ; Chassagne *et al.* 1995 ; Chassagne *et al.* 1997) qui sont ensuite analysés par GC-MS. En général, une pré-purification sur colonne C<sub>18</sub> ou XAD-2 est préalablement effectuée. D'autres méthodes portent sur la détermination enzymatique des sucres libérés dans l'hydrolyse, indicateurs de la teneur en précurseurs dans l'échantillon (Williams *et al.* 1995). L'analyse quantitative de glycosides par spectrométrie de masse en tandem est réalisée en utilisant la technique de dilution isotopique (Fudge *et al.* 2008 ; Dungey *et al.* 2011). Ce type d'analyse est très précis mais limité du fait de la nécessité de synthétiser, pour chaque composé à doser, son homologue deutéré.

## CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

### 1. Matériel végétal

Pour l'étude d'identification des précurseurs, du chêne français (chêne sessile) fourni par un tonnelier a été utilisé. Le bois a été réduit manuellement en morceaux de dimension inférieure à 2 cm.

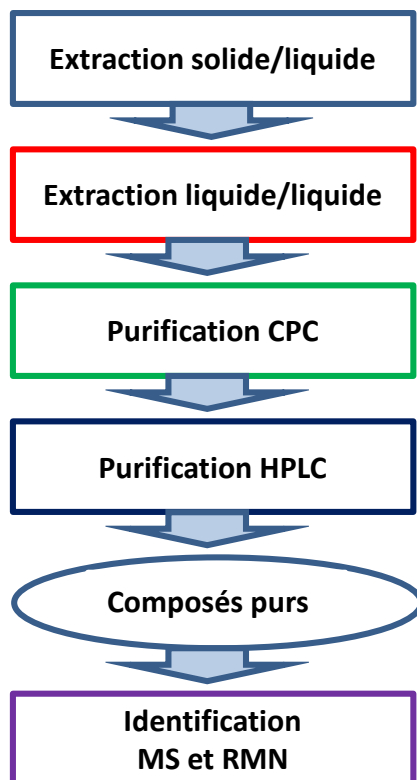
Des copeaux commerciaux non traités, ni chauffés, de chêne français (mélange de *Q. robur* et *Q. petrae*) et de chêne blanc américain ont été achetés dans le commerce.

Les copeaux de bois destinés à l'étude sur les effets de la chauffe ont été disposés sur un plat et couverts par du papier aluminium alimentaire de manière à réduire les mouvements d'air. Le tout a été chauffé dans un four ventilé pendant 30 minutes et à différentes températures : 120 °C, 200 °C et 230 °C.

## **2. Protocole d'extraction et de purification des précurseurs d'arôme glycosylés**

Compte tenu de la complexité de la matrice bois de chêne, de la méconnaissance des structures des molécules recherchées et de leurs faibles teneurs supposées, un protocole de purification multi-étapes a été utilisé (Figure 13). Chaque étape de ce protocole est décrite en détails dans la suite de ce chapitre.

Dans une première étape, les composés sont extraits du bois au moyen d'une macération dans un mélange de solvant organique et d'eau. L'extrait aqueux est ensuite fractionné, par des extractions liquide/liquide avec des solvants de polarités croissantes. La présence des précurseurs dans les différentes fractions a été vérifiée par hydrolyse enzymatique de la phase et quantification des aglycones libérés. Une fois la bonne fraction trouvée, celle-ci a été purifiée par une technique de chromatographie sans support solide, puis par chromatographie sur colonne à phase inverse C<sub>18</sub>.



**Figure 13.** Schéma général du protocole de purification des précurseurs d'arômes glycosylés dans le bois de chêne utilisé dans ce travail.

## 2.1 Extractions solide/liquide du bois

Chaque lot de 1,4 kg de bois a été extrait avec trois fois 2 L d'un mélange eau/acétone 1:1 (v/v). Chaque extraction a été effectuée par agitation sur table à la vitesse de 2000 rpm et chaque extraction a été conduite pendant 24 heures. Le bois est séparé du milieu liquide par filtration (pores  $\varnothing=0,45 \mu\text{m}$ ). L'acétone est évaporée sous pression réduite ( $T < 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ). On obtient 500 mL d'extrait aqueux.

## 2.2 Prépuration de l'extrait brut

L'extrait brut est lavé 3 fois avec 300 mL de cyclohexane. Les 3 phases organiques ont été assemblées. La phase aqueuse restante a ensuite été lavée 3 fois avec 300 mL de

dichlorométhane. Après avoir vérifié l'absence de précurseurs d'arôme par hydrolyse enzymatique, les phases organiques cyclohexane et dichlorométhane ont été éliminées.

La fraction aqueuse restante a été lyophilisée pour éliminer toutes traces des autres solvants. Puis la poudre marron foncé obtenue, 23,7 g, a été dissoute dans 500 mL d'eau mQ et extraite 7 fois par 200 mL d'acétate d'éthyle. Les différentes fractions organiques ont été assemblées, évaporées et lyophilisées. Une poudre de 9,2 g marron clair/orangé a été obtenue. On parlera par la suite d'« extraits AcOEt ».

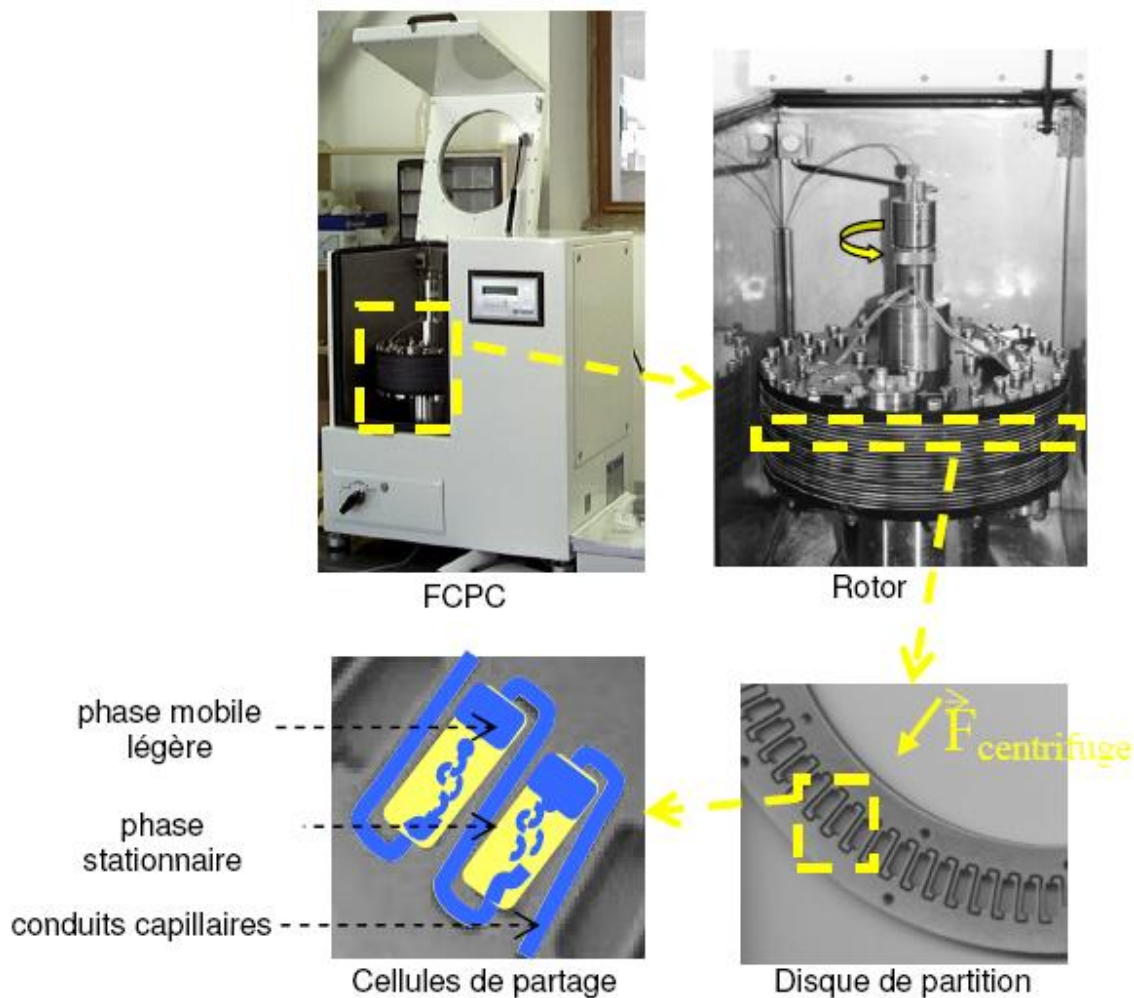
## **2.3 Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge**

### ***2.3.1. Principe de fonctionnement***

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) est basée sur la répartition des solutés entre deux phases liquides non miscibles. Elle a été développée par Nunogaki et présentée pour la première fois en 1982 (Murayama *et al.* 1982). L'originalité de cette technique est l'absence de phase stationnaire solide. En effet, une des deux phases employées est utilisée comme phase stationnaire, tandis que l'autre est utilisée comme phase mobile.

Dans la pratique, la CPC est constituée d'un rotor, formé par la superposition de disques en acier inox téflonisé ou non, sur lesquels de petites cellules sont gravées (figure 14). Ces cellules sont interconnectées. Chaque cellule peut être assimilée à une mini ampoule à décanter.

Le rotor constitue la colonne. La séparation a lieu dans les cellules. La colonne est remplie par la phase stationnaire et la phase mobile est pompée dans la colonne à travers la phase stationnaire. La phase stationnaire est maintenue dans la colonne grâce à la force centrifuge générée par la rotation du rotor autour d'un axe fixe. Cette percolation permet le transfert de masse entre les phases, ce qui constitue la base de la séparation.



**Figure 14.** Représentation d'une CPC avec le détail du rotor et des cellules de partage, (d'après Toribbio 2007).

L'échantillon est donc injecté. En fonction de leur affinité, les solutés se partagent entre les deux phases. On peut considérer la CPC comme une série d'extractions successives liquide/liquide. Le volume d'élution et donc l'ordre de sortie de chaque composé, sont définis par l'équation suivante, qui est caractéristique de la chromatographie liquide/liquide :

$$V_r^X = V_{mob} + K_D^X V_{stat}$$

Avec :

- $V_r^X$  volume de rétention de la substance X
- $V_{mob}$  volume occupé par la phase mobile dans la colonne
- $V_{stat}$  volume de la phase stationnaire
- $K_D^X$  coefficient de distribution de la substance X



Le coefficient de distribution  $K_D$  est une constante physique caractéristique d'une molécule. Il est défini pour une molécule dans un système biphasique donné et à l'équilibre, comme le rapport de la concentration de la molécule dans la phase stationnaire sur sa concentration dans la phase mobile.

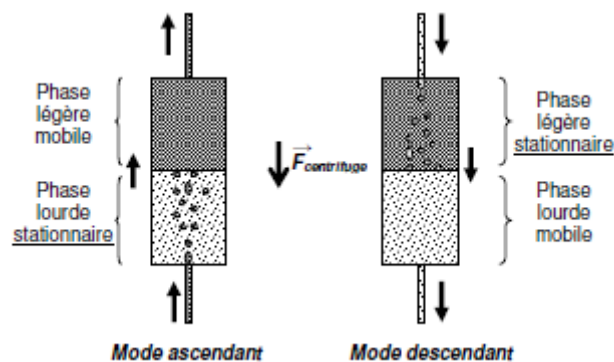
$$K_D^X = \frac{C_{stat}^X}{C_{mob}^X}$$

Pour que la séparation CPC soit efficace, le coefficient  $K_D$  doit être compris entre 0,2 et 5. Un coefficient inférieur à 0,2 signifie que le composé n'est pas retenu par la phase stationnaire. Un coefficient supérieur à 5 indique que le composé a une forte affinité avec la phase stationnaire et son élution nécessite un volume de phase mobile très importante, ce qui implique l'augmentation du temps d'analyse et une baisse drastique de la résolution. En mode de développement par élution, comme dans notre cas, un  $K_D$  proche de 1 pour le composé à purifier et des  $K_D < 0,2$  ou  $> 5$  pour les contaminants sont recherchés.

Pour les composés absorbant en UV/Vis, le coefficient de partage peut être mesuré selon la méthode décrite par Renault (2002). Cette méthode prévoit tout simplement la préparation, dans un tube à essai, de 1 mL de chacune des phases. Une fois que les deux phases ont atteint l'équilibre, une quantité connue de l'échantillon y est dissoute. Les phases sont agitées puis séparées après décantation. Le coefficient de partage est alors calculé par :

$$K_p = \frac{Abs_{sch}^{Org} - Abs_{Ref}}{Abs_{sch}^{Aq} - Abs_{Ref}}$$

En CPC il y a deux modes d'élution : ascendant, dans lequel la phase stationnaire est la plus lourde, et descendant, dans lequel la phase stationnaire est la plus légère (figure 15). Autre que la détection par UV-Vis, la quantification du composé dans les deux phases peut être réalisée par analyse GC ou HPLC couplée à la spectrométrie de masse (Bisson *et al.* 2011 ; Wei *et al.* 2011).



**Figure 15.** Schéma des deux modes d'élution en CPC (d'après Toribio 2007).

La sélection du système biphasique est fondamentale pour la réussite de la séparation. Si l'on fait un rapprochement avec l'HPLC, c'est comme si l'on sélectionnait à la fois la colonne et l'éluant. Les systèmes biphasiques peuvent être constitués de deux ou de plusieurs solvants. En CPC, tous les systèmes biphasiques peuvent être utilisés, la seule contrainte étant que la phase stationnaire soit bien retenue par la colonne. Pour choisir le système de solvants à utiliser, plusieurs méthodes existent. Très souvent, ce choix est basé sur les données fournies pour les systèmes de solvants déjà employés avec succès dans la purification des molécules similaires à la molécule cible. Une approche plus expérimentale est la méthode dite du « bon solvant ». On choisit d'abord le solvant dans lequel le composé est très soluble, puis on ajoute deux autres solvants, un plus polaire et l'autre moins polaire que le « bon solvant ». Les proportions de chacun sont ajustées selon le diagramme ternaire correspondant (Foucault & Chevolot 1998). La méthode la plus utilisée est basée sur le coefficient de partage ( $K_c$ ) des solutés à séparer. Ce coefficient doit se situer autour de 1 pour avoir une bonne séparation.

La CPC présente certains avantages. Il n'y a pas de support solide, donc pas de perte des solutés par adsorption irréversible des composés sur la colonne ou dégradation/dénaturation. L'échantillon est récupéré dans sa totalité. De plus, elle offre un large choix de système biphasique, sans restriction.

### **2.3.2. Appareillage**

Pour la purification de l'extrait de bois de chêne, un appareil CPC FCPC 1000 Kromaton® Technologies (Angers, France) a été utilisé. Le rotor est constitué de 45 disques en acier inoxydable formant 1440 cellules de séparation. Le volume total du rotor est de 940 mL. Les phases ont été pompées grâce à une pompe binaire à haute pression Gilson 321-H1. L'effluent est piloté par un détecteur Kromaton UV-VIS (Angers, France). Le fractionnement a été effectué avec un collecteur automatique Advantec CHF 122SC.

### **2.3.3. Sélection du système de solvants pour l'analyse CPC**

Dans le passé, des systèmes chloroforme/méthanol/eau ont été utilisés dans la purification de précurseurs d'arômes (Strauss *et al.* 1987 ; Winterhalter *et al.* 1990 ; Slacanin *et al.* 1991). Nous avons voulu rechercher un système de solvants mieux adapté aux composés à purifier. Nous nous sommes donc dirigés vers les systèmes plus polaires (B, F, K) de la gamme ARIZONA (Foucault and Chevotot, 1998) ainsi que vers des systèmes ternaires polaires constitués d'acétate d'éthyle/propan-2-ol/eau développés par Köhler *et al.* (2008). L'utilisation de solvants moins toxiques a été privilégiée.

Pour sélectionner le système de solvants adapté à la purification de l'extrait AcOEt, 50 mg d'extraits ont été dissous dans le système à tester (2 mL de phase mobile et 2 mL de phase stationnaire). Le tout est agité au vortex pendant une minute. Après avoir atteint l'équilibre, un aliquote (0,9 mL) de chaque phase a été évaporé, repris avec 0,2 mL d'un mélange eau/MeOH (9:1 ; v/v) puis additionné de 0,2 mL de la solution enzymatique AR 2000 (70 mg/mL dans l'eau) riche en activités glycosidases. Après 24h sous agitation à 37 °C, les aglycones libérés ont été quantifiés par GC-MS.

Le coefficient de partition  $K_{ca}$  a été calculé comme étant le rapport entre la concentration d'aglycones libérés dans la phase stationnaire sur la concentration d'aglycones libérées dans la phase mobile :

$$K_{ca}^X = \frac{A_{stat}^X}{A_{mob}^X}$$

- $A_{stat}^X$  concentration de l'aglycone du composé X libéré dans la phase stationnaire par l'action enzymatique.
- $A_{mob}^X$  concentration de l'aglycone du composé X libéré dans la phase mobile par l'action enzymatique.
- $K_{ca}^X$  coefficient de partage d'activité.

Le coefficient de partage proche de 1 indique, soit qu'un seul composé, substrat de l'enzyme, est réparti équitablement entre les deux phases, soit que plusieurs composés sont hydrolysés par l'enzyme, mais avec une affinité inverse pour les deux phases. Dans ce dernier cas, au moins deux groupes de composés d'intérêt pourraient être séparés. Un exemple est reporté dans la figure suivante (figure 16) :

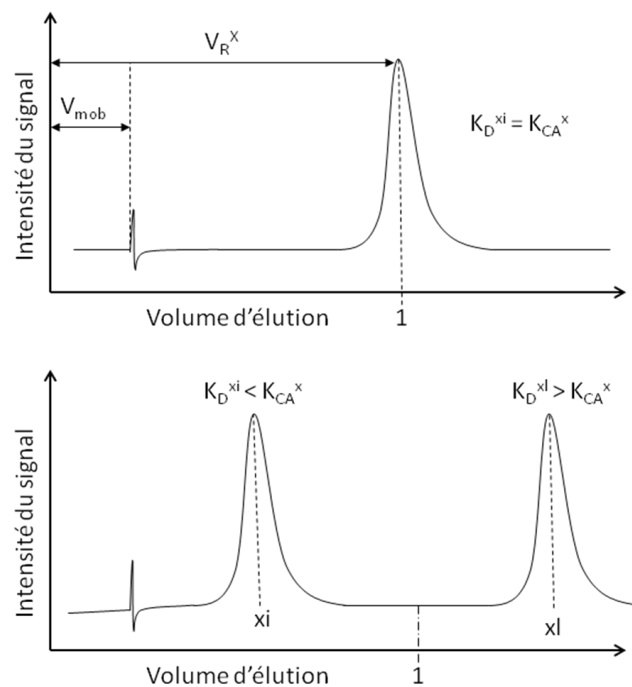


Figure 16. Représentation de deux chromatogrammes pouvant être obtenus avec un  $K_{ca}^X = 1$ .

## **2.3.4. Conditions séparatives en CPC**

### **2.3.1.1 Préparation de solvants**

Les deux phases, mobile et stationnaire ont été préparées. Pour cela, 1000 mL d'eau ultra-pure, 25 mL de propan-2-ol et 1000 mL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés dans une ampoule à décanter et agités manuellement pendant une minute. Après 30 minutes de repos, les deux phases ont été séparées et dégazées dans un bain à ultrasons. La procédure a été répétée 4 fois afin d'obtenir suffisamment de phase pour procéder à la séparation par CPC.

### **2.3.1.2 Méthode séparative CPC**

La séparation a eu lieu en modalité ascendante. Premièrement, le rotor a été rempli avec la phase stationnaire (inférieure, riche en eau). 2 L de phase ont été pompés à 20 mL/min. Une rotation de 1000 rpm a été fixée.

La phase mobile (supérieur, riche en acétate d'éthyle) a ensuite été introduite dans la colonne au débit de 20 mL/min. Un volume de 80 mL de phase stationnaire a été expulsé avant que la phase mobile ne commence à sortir de la colonne. Ce volume correspond au volume mort.

L'échantillon (2,5 g) a été dissout dans environ 20 mL de phase stationnaire et 10 mL de phase mobile, et injecté dans le système. L'effluent a été collecté chaque minute. Après 90 minutes de séparation chromatographique, le mode d'élution a été changé. 1 L de la phase inférieure (phase stationnaire) a été pompé dans la colonne. Une fois tous les composés élués, la colonne a été nettoyée en pompant 2 L d'un mélange eau/acétone (1:1 ; v/v).

## 2.4 Fractionnement par HPLC semi-préparative

Dans le but d'obtenir des composés purs, les fractions d'intérêt mise en évidence par hydrolyse enzymatique issues de la purification par CPC, après évaporation et lyophilisation ont été purifiées à l'aide de l'HPLC en phase inverse.

Les conditions chromatographiques ont été les suivantes :

**Appareil** : Waters 600 (St-Quentin Yvelins, France)

**Colonne** : NUCLEODUR C18 end-capped 250 mm x 10 mm; 5 µm. Macherey-Nagel (Hoerd, Allemagne).

**Débit** : 4 mL/min

**Détection** : 280 nm et 313 nm

**Volume injecté** : 500 µL

**Solvant A** : eau + 0,1% TFA

**Solvant B** : acétonitrile

**Gradient** :

Temps (min)	0	15	35	50	70	80	85	90	110	115	135
% B	15	15	18	18	29	29	35	90	90	15	15

**Fractionnement** : les fractions ont été collectées toutes les 30 secondes à l'aide d'un collecteur automatique Teledyne Isco Foxy Jr. (Lincoln, USA).

## 3. Analyse GC-MS

### 3.1 Méthode d'analyse des composés volatiles du bois

Les composés volatils du bois de chêne cédés au vin sont quantifiés par une adaptation (Bloem 2005) de la méthode décrite par Barbe et Bertrand (1996).

Une quantité de dodécanol (100 µL à 400 mg/L) est ajoutée comme étalon interne à 50 mL d'échantillon (vin ou solution modèle). Les composés volatils sont extraits successivement

par 4mL, 2mL et 2 mL de dichlorométhane. L'extraction a été effectuée à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 5 minutes. Les trois phases organiques sont réunies, puis centrifugées pour casser l'émulsion. La phase organique restante est séchée par du sulfate de sodium anhydre (environ 4 g). L'extrait est enfin prêt à l'injection en GC-MS.

*Conditions chromatographiques:*

Appareil : Perkin-Elmer AutoSystem XL (Shelton, USA)

Système d'acquisition : Turbomass software, version 5.0

Gaz vecteur : He N55 à 2 mL/min

Volume d'injection : 2 µL

Injecteur : splitless (30 s), température : 250 °C

Colonne : BP21 40 m × 0.32 mm ; épaisseur de film 0,25 µm

Programme de température : 60 °C pendant 10 min, augmentée jusqu'à 220 °C à 3 °C/min puis maintenue pendant 40 min.

Ligne de transfert : 200 °C

Détecteur : spectromètre de masse Perkin-Elmer Turbomass Gold (electronic impact = 70 eV), température de la source 180 °C ; la quantification est réalisée en mode SIR (select ion recording). Les ions sélectionnés pour chaque molécule sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 4).

**Tableau 4.** Paramètres de dosage des composés volatils du bois de chêne employés pour l'analyse GC-MS.

Composé	Temps de rétention sur colonne BP 21 (min)	Ion quantificateur ( <i>m/z</i> )	Ion de qualification ( <i>m/z</i> )
Furfural	11,10	95	
5-méthyl furfural	14,67	110	
4-oxoisophorone	18,35	96	152 ; 109 ; 68
Gaïacol	24,33	124	
<i>trans</i> -whiskylactone	24,91	99	
<i>cis</i> -whiskylactone	27,09	99	
Dodécanol (EI)	28,05	83	
4-éthylguaïacol	29,76	137	
Mégastigmatriénone I	33,30	190	175 ; 147 ; 134
Mégastigmatriénone II	33,75	190	175 ; 147 ; 133
Eugénol	33,91	164	
4-éthylphénol	34,29	107	
<i>trans</i> -isoeugénol	34,30	164	
Mégastigmatriénone III	34,64	190	175 ; 147 ; 133
Mégastigmatriénone IV	36,40	190	175 ; 147 ; 133
Syringol	37,00	154	
Mégastigmatriénone V	37,37	190	175 ; 147 ; 133
<i>cis</i> -isoeugénol	39,15	164	
Vanilline acétate	43,31	194	
Éthylvanilline	43,76	166	
Vanilline	44,79	151	
3-oxo- $\alpha$ -ionol	46,49	108	151, 160
Acétovanillone	46,69	151	
Alcool vanillique	50,96	154	
Syringaldéhyde	54,46	182	
Acétosyringone	55,48	181	
3,4,5-triméthoxyphénol	57,67	169	
Coniféraldéhyde	59,84	178	
Sinapaldéhyde	79,32	208	



### **3.2 Analyse des aglycones sur un volume réduit**

Pendant ces travaux, le volume d'échantillon disponible pour l'analyse des aglycones a été souvent réduit, alors que la méthode décrite précédemment nécessite un volume assez important. C'est pour cela qu'une méthode simplifiée par extraction volume à volume a été employée (Bloem 2005).

10  $\mu$ L d'étalon interne (dodecanol 400 mg/L) ont été ajoutés à 1,5 mL d'échantillon. Celui-ci est extrait avec 1,5 mL de dichlorométhane pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex. Après séparation, la phase organique a été centrifugée pendant 10 min à 5000 rpm. L'extrait a été séché par ajout d'environ 1 g de sulfate de sodium anhydre et concentré sous flux d'azote jusqu'à environ 200  $\mu$ L. L'extrait concentré a par la suite été injecté en GC-MS. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que précédemment.

### **3.3 Libération enzymatique des arômes liés**

L'enzyme commerciale Rapidase® AR2000 a été utilisée. Ce produit possède plusieurs activités enzymatiques (Sarry & Gunata 2004). Les activités glycosidases suivantes sont notamment présentes :  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase,  $\alpha$ -rhamnosidase et  $\beta$ -apiosidase. L'avantage est d'hydrolyser la plupart des glycosides des composés aromatiques, y compris les O-diglycosides.

Une petite quantité (environ 2 mg) du lyophilisat de chaque fraction issue des différentes étapes de purification, a été mise dans un tube à essai et dissoute dans 2 mL d'un tampon d'acétate de sodium pH 5 (10 mM), dans lequel 200  $\mu$ L de préparation enzymatique AR 2000 (70 mg/mL) ont été ajoutés. Le mélange a été maintenu sous agitation à 37 °C. Après 24 heures, les composés volatils libérés par l'action enzymatique ont été extraits et analysés selon le protocole précédemment décrit

Des  $\beta$ -glucosidase (source amande douce) ou  $\beta$ -xylosidase (source *Aspergillus niger* ; activités secondaires <3 % :  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase,  $\beta$ -galactosidase, et  $\alpha$ -galactosidase) ou naringinase (source *Penicillium decumbens*) ont été également utilisées (Sigma aldrich).

### **3.4 Analyse des composés formés par thermolyse du macarangioside E**

Une quantité de macarangioside E (0,2 mg) a été mise dans un flacon et fermée hermétiquement. Celui-ci a ensuite été chauffé dans un four à 230 °C pendant 30 minutes. Une fois refroidi, le flacon a été ouvert et 1 mL de dichlorométhane a été ajouté. Après agitation au vortex, la solution organique a été déshydratée par ajout d'1 g de sulfate de sodium anhydre. La solution a été transférée dans un autre flacon et analysée par GC-MS.

Les conditions chromatographiques sont les mêmes que précédemment décrites mais l'acquisition a été faite en modalité SCAN. Les paramètres d'acquisition ont été : mass range 60-300  $m/z$  ; scan time 0,2 s ; interdelay scan time 0,1 s.

Les composés formés ont été identifiés dans un premier temps par comparaison de leur spectre de masse avec les bases de données NIST/EPA/NIH et NBS/Wiley. Puis la comparaison des temps de rétention et des spectres obtenus par l'injection des composés purs de référence a permis de confirmer l'identification.

### **3.5 Méthode d'analyse GC-MS du 4-oxo-isophorone et mégastigmatriénone dans les bois**

L'échantillon de bois est réduit manuellement (l'utilisation d'un brouilleur entrainerait la chauffe du bois) à des dimensions inférieures à 2 mm. Une quantité d'échantillon (1 g) est mise à macérer pendant 24 heures, dans 10 mL de dichlorométhane. Une quantité d'isophorone (50  $\mu$ L à 600 mg/L) et 3-octanol (50  $\mu$ L à 400 mg/L) sont ajoutés comme

étalons internes au solvant d'extraction. L'extraction est faite à l'abri de la lumière et sous agitation 230 rpm. Après 24 heures l'échantillon est filtré, séché par du sulfate de sodium anhydre (environ 1 g) et concentré sous flux d'azote jusqu'à environ 1 mL. L'extrait est enfin prêt à l'injection en GC-MS.

*Conditions chromatographiques:*

**Appareil :** Perkin-Elmer AutoSystem XL (Shelton, USA)

**Système d'acquisition :** Turbomass software, version 5.0

**Gaz vecteur :** He N55 à 2 mL/min

**Volume d'injection :** 2 µL

**Injecteur :** splitless (30 s), température : 250 °C

**Colonne :** HP5ms 30 m × 0,25 mm ; épaisseur de film 0,25 µm

**Programme de température :** 30 °C pendant 10 min, augmenté jusqu'à 130 °C à 1,5 °C/min puis maintenu pendant 10 min, puis augmenté jusqu'à 230 °C à 3 °C/min puis maintenu pendant 10 min.

**Ligne de transfert :** 200 °C

**Détecteur :** spectromètre de masse Perkin-Elmer Turbomass Gold (electronic impact = 70 eV), température de la source 180 °C ; la quantification est réalisée en mode SIR (select ion recording). Les ions sélectionnés pour chaque molécule sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5. Paramètres de dosage mégastigmatriénone, 4-oxo-isophorone et 3-oxo- $\alpha$ -ionol dans le bois de chêne**

Composé	Temps de rétention sur colonne HP-5 ms (min)	Ion quantificateur (m/z)	Ion de qualification (m/z)
Octanol (EI)	17,4	95	
Isophorone (EI)	28,05	83	
4-oxoisophorone	30,9	96	152 ; 109 ; 68
Mégastigmatriénone II	76,8	190	175 ; 147 ; 133
Mégastigmatriénone III	79,5	190	175 ; 147 ; 133
Mégastigmatriénone IV	82,8	190	175 ; 147 ; 133
Mégastigmatriénone V	83,4	190	175 ; 147 ; 133
3-oxo- $\alpha$ -ionol	87,0	108	151, 160

### **3.6 Analyse olfactométrique couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-O)**

Des analyses olfactométriques ont été effectuées pour vérifier que la mégastigmatriénone, qui nous a été fournie généreusement par Symrise AG (Allemagne), utilisée dans la détermination du seuil de perception et comme référence dans les analyses GC-MS, ne contiennent pas d'impuretés odorantes.

Le chromatographe utilisé est un Hewlett Packard HP-4890 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) équipé d'un port d'olfactométrie (SGE, Victoria, Australia) et d'un détecteur à ionisation de flamme. L'analyse est réalisée sur une colonne capillaire BP-21 (SGE, 50 m, 0,32 mm de diamètre interne, 0,25 µm d'épaisseur de film) dans les conditions d'analyse décrites en 3.1. avec quelques modifications. Le volume injecté a été de 2 µL de produit à une concentration d'environ 200 µg/L. Le gaz vecteur est l'hydrogène 5.5 avec une pression en tête de colonne de 15 psi. Afin d'éviter une déshydratation nasale au niveau du port olfactométrique, le flux de gaz chromatographique est combiné avec de l'azote humidifié. L'analyse avec détection olfactométrique a d'abord été réalisée, suivie de l'analyse avec détection à ionisation de flamme.

## **4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (MS)**

### **4.1 Dosages des précurseurs isolés par HPLC-QqQ-MS**

#### ***4.1.1. Préparation de l'échantillon***

Considérant l'inexistence de méthodes d'analyse des précurseurs acylés dans le bois de chêne, il a été nécessaire de développer une méthode d'extraction simple et efficace (tableau 6). L'échantillon de bois a été réduit en granulats de dimensions inférieures à 7 mm. Un gramme a été pesé et extrait 3 fois consécutivement avec 100 mL d'un mélange acétone/eau (7 : 3). Le temps pour chaque extraction a été de 4 heures. Pendant ce temps,

le mélange a été maintenu sous agitation à 230 rpm. Les trois extraits ont ensuite été assemblés et évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor à 30 °C. Ensuite, l'extrait a été repris avec 2 mL d'H<sub>2</sub>O/ACN (9/1; v/v) et filtré à 0,45 µm avant l'injection.

#### **4.1.2. Conditions d'analyse HPLC-ESI-QqQ-MS**

La quantification a été effectuée par une méthode Multiple Reaction Monitoring (MRM), le premier quadripôle ne sélectionne que les ions parents d'intérêt : il fonctionne comme une simple modalité SIM. Le deuxième quadripôle opère comme une cellule de collision, dans laquelle l'application d'une énergie déterminée produit des ions fragments qui sont typiques de l'ion parent sélectionné. Le dernier quadripôle sélectionne seulement l'ion fragment à analyser. Les avantages de cette technique par rapport à une méthode SIM sont la diminution considérable du bruit de fond et une plus grande spécificité. Généralement, pour chaque composé, au moins deux (plus souvent trois) transitions sont enregistrées. La quantification est faite sur une seule des transitions réalisées par composé, les autres servant à confirmer l'identification.

##### **Système HPLC**

**Pompe binaire** : Agilent 1260

**Dégazeur** : Agilent 1260

**Injecteur automatique** : Agilent 1290

**Four colonnes** : Agilent 1290

**Colonne** : Zorbax Eclipse plus C18, 100 mm x 4,6 mm ; 3,5 µm. Agilent (USA).

**Débit** : 0,4 mL/min

**Volume injecté** : 10 µL

**Solvant A** : eau + 0,1 % acide formique

**Solvant B** : acétonitrile + 0,1 % acide formique

**Gradient** :

<b>Temps (min)</b>	0	2	20	21	26	27	33
<b>% B</b>	10	10	45	100	100	10	10

**Spectromètre de masse** : Agilent 6430 Triple Quad LC/MS

Température de la source : 350 °C

Débit du gaz : 11 L/min

Nébulisateur : 40 psi

Capillaire : 4000 V

Ionisation : négative

**Tableau 6.** Paramètres d'analyse optimisés pour les composés : vanilline galloylglucoside (VGG) ; 3,4,5-triméthoxyphénol galloylglucoside (TMPGG) ; macarangioside E (MAC E) ; vanilline- $\beta$ -xyloside.

Molécule	Ion précurseur	Ion fils	fragmenteur	Energie de collision	Cell Accelerator voltage
VGG	465	313	200	10	5
VGG	465	169	200	24	3
VGG	465	151	200	30	3
TMPGG	497	327	230	21	3
TMPGG	497	313	230	24	3
TMPGG	497	183	230	25	3
MAC E	521	331	230	10	3
MAC E	521	271	230	20	5
MAC E	521	211	230	37	5
VX	599	299	122	8	5
VX	583	167	120	8	5
VX	299	167	178	8	5

## 4.2 Analyse par UHPLC-ESI-FT/MS

### *Détermination de la limite de détection des précurseurs synthétisés*

Les limites de détection de la méthode UPLC-FT/MS, pour la glucovanilline, xylovanilline et glucoconiféraldéhyde, ont été déterminées en fonction du signal obtenu à des concentrations définies des composés (tableau 8). Pour cela, 100 g de copeaux de bois de

chêne français ont été mis à macérer dans une solution acétone/eau 7 : 3 (v/v). Après filtration et évaporation, l'extrait a été lyophilisé pour obtenir une poudre. Une solution à 4 mg/L de cette poudre a été réalisée dans un mélange eau/acétonitrile (9 : 1 ; v/v). Des solutions mères de glucovanilline 7,2 mg/L, de xylovanilline 17 mg/L et de glucoconiféraldéhyde 18,4 mg/L ont été préparées. La gamme réalisée est reportée dans le tableau 7.

Les extraits de bois ont été analysés à environ 100 mg/L. Les vins ont été dilués 2 fois avec de l'eau milliQ tandis que les Armagnacs ont été dilués 25 fois. Avant injection, tous les échantillons ont été filtrés à 0,45 µm.

**Tableau 7.** Gammes étalons réalisées dans un extrait de bois de chêne pour la glucovanilline, xylovanilline et glucoconiféraldéhyde.

Molécule	Concentrations (µg/L)					
	1	2	3	4	5	6
Glucovanilline	0,3	1,4	14,4	28,8	72,0	144,0
Xylovanilline	0,2	0,9	9,2	18,4	46,0	92,0
Glucoconiféraldéhyde	0,2	0,9	8,5	17,0	42,5	85,0

### Conditions d'analyses

**Appareil HPLC :** Accela (Thermo Fisher Scientific) U-HPLC

**Colonne :** Hypersil Gold C18 100 mm x 2,1 mm 1,9 µm

**Débit :** 0,6 mL/min

**Volume injecté :** 10 µL

**Solvant A :** eau

**Solvant B :** acétonitrile

**Gradient :**

Temps (min)	0	0,5	6	6,2	9	9,1	10,5
% B	5	5	40	98	98	5	5

**Spectromètre de masse** : FT/MS Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific)

**Température de la source** : 320 °C

**Température du capillaire** : 350 °C

**Débit du « sheath gas »** : 80

**Débit du gaz auxiliaire** : 15

**Débit du « sweep gas »** : 0

**Spray** : 3,5 V

**Capillaire** : - 42,5 V

**Tube lens** : - 105 V

**Skimmer** : - 18 V

**Ionisation** : négative

**Calibrage** : externe

**Tableau 8.** Ions analysés par FT/MS pour la glucovanilline, xylovanilline et glucoconiféraldéhyde.

	Temps de rétention (min)	Ion $m/z$	Espèce
Glucovanilline	2,28	349,0703	$[M+^{35}\text{Cl}]^-$
		351,0673	$[M+^{37}\text{Cl}]^-$
Xylovanilline	3,20	319,05988	$[M+\text{Cl}]^-$
Glucoconiféraldéhyde	3,19	375,0863	$[M+\text{Cl}]^-$



## 5. Analyse structurale des molécules isolées

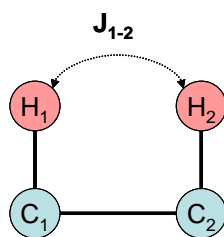
Pour déterminer la structure des composés isolés, des techniques comme la spectrométrie de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN), ont été utilisées. Les acquisitions des spectres de masse et de RMN ont été réalisées à la plateforme Métabolome-Fluxome de l'Université de Bordeaux dans une collaboration avec Dr. Tristan Richard (EA 3675 – GESVAB – Université de Bordeaux).

La spectrométrie de masse permet, après ionisation de l'analyte, de mesurer le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) de l'ion moléculaire et de ses fragments et d'obtenir ainsi la masse moléculaire du composé. La mesure effectuée à haute résolution donne la masse exacte du composé, grâce à laquelle il est possible d'en déduire la formule brute du composé étudié.

Des informations structurales peuvent être obtenues par l'analyse des fragments formés par la rupture de l'ion moléculaire. Dans le cas spécifique de ce manuscrit, des composés glycosylés sont analysés. La présence de nombreux groupements hydroxyles appartenant au sucre a comme effet de former des adduits, très souvent avec du sodium  $[M+Na]^+$ . Dans la plupart des cas, l'analyse en ionisation négative est plus efficace. La perte dans l'ion moléculaire d'une partie osidique se traduit par l'observation d'un signal M-162 dans le cas d'un hexose, et M-132 pour un pentose.

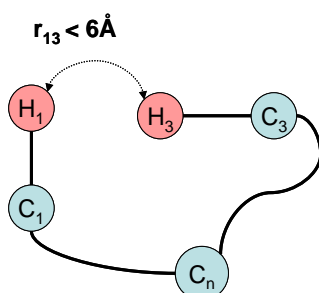
Parmi les techniques utilisées pour la détermination structurale, la résonance magnétique nucléaire (RMN) a été cependant la plus importante. Un grand nombre d'informations a été obtenu par les expériences de RMN bidimensionnelles en plus des expériences monodimensionnelles  $^1H$  et  $^{13}C$  RMN. La structure moléculaire des composés étudiés a été obtenue par combinaison de différentes expériences de RMN bidimensionnelles  $^1H$ - $^1H$  COSY, ( $^1H$ - $^1H$ ) ROESY, ( $^1H$ - $^{13}C$ ) HSQC et ( $^1H$ - $^{13}C$ ) HMBC. Il est brièvement décrit ci-dessous les principales expériences de RMN bidimensionnelles utilisées.

L'expérience COSY (CORrelation Spectroscopy) a été la première expérience de RMN à deux dimensions inventée et elle est encore largement utilisée. La COSY est une expérience de corrélation scalaire homonucléaire par transfert de polarisation entre protons couplés  $^2J$ ,  $^3J$  ou  $^4J$  (Nagayama *et al.* 1980) (figure 17).



**Figure 17.** Corrélation COSY.

La ROESY (Rotating-frame Overhauser Spectroscopy) est une expérience homonucléaire utilisant les corrélations dipolaires (dans l'espace) (figure 18). Elle met en évidence le phénomène du ROE (Rotating frame Overhauser-Effet) qui est similaire au NOE (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (Bothner-By *et al.* 1984). Le ROE dépend donc de la distance entre les noyaux, et est ainsi très utile pour étudier la stéréochimie des centres chiraux. Cependant, les corrélations ROE sont toujours positives. L'expérience ROESY est particulièrement utile pour les molécules de taille moyenne dont le poids moléculaire est d'environ 1000 Da.



**Figure 18.** Corrélation ROESY.

Le HSQC (Hétéronucléaire Single Quantum Coherence) est une corrélation scalaire hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  qui permet de déterminer pour chaque proton le carbone qui le porte (Bodenhausen & Ruben, 1980) (figure 19).

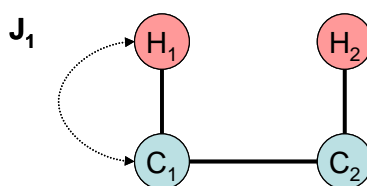


Figure 19. Corrélation HSQC.

L'HMBC (Heteronuclear Multiple bond Connectivity) est une corrélation scalaire hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , mais cette fois-ci à travers le couplage longue distance  $^2\text{J}$  ou  $^3\text{J}$  (figure 20). Avec cette expérience, il est donc possible d'observer les carbones quaternaires et de les relier dans la molécule (Bax & Summers, 1986). Cette expérience est moins sensible que les autres.

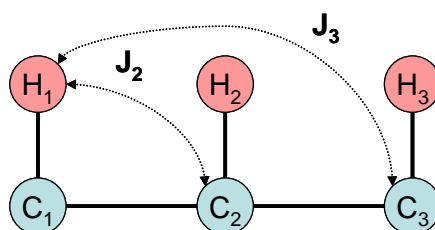


Figure 20. Corrélation HMBC.

## 5.1 Analyse par HPLC-ESI-IT-MS

**Appareil HPLC** : Agilent 1200

**Colonne** : NUCLEODUR C18 end-capped 150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ . Macherey-Nagel (Hoerd, Germany).

**Débit** : 0,8 mL/min

**Détection** : 280nm et 313 nm

**Volume injecté** : 10  $\mu\text{L}$

**Solvant A** : eau + 0,1% acide formique

**Solvant B** : acétonitrile + 0,1 % acide formique

**Gradient** :

Temps (min)	0	5	25	35	45	55	60	70
% B	17	17	25	38	100	100	17	17

**Spectromètre de masse** : Bruker-Daltonics Esquire 3000+

L'éluant provenant de la colonne HPLC a été divisé avec un splitter passif en rapport 1 : 100. Le débit du « drying gas » ( $N_2$ ) a été établi à 5,0 mL/min et à une température de 325 °C. La pression de nébulisation a été de 15 psi. Un voltage de 3700 V a été appliqué au capillaire. Le trap drive a été fixé à 46 V.

## 5.2 Analyse à l'aide de la technique TOF-HRMS

Pour l'analyse de masse à haute résolution des composés isolés visant à déterminer leur formule brute, nous avons fait appel au service de spectrométrie de masse du Centre d'Etude Structurale et d'Analyse des Molécules Organiques CESAMO (Université Bordeaux 1). L'analyse a été effectuée avec un spectromètre Qstar – Applied Biosystems

**Type** : QTof

**Pouvoir de résolution** : 15000 FWHM à la masse 956

**Gamme de masses** : 5 à 40000 m/z

**Précision de la mesure en masse** : < 2 ppm en calibration interne et < 5 ppm en calibration externe

**Source** (ions positifs et négatifs) : electrospray ESI

## 5.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les données RMN ont été acquises avec un spectromètre BRUKER AVANCE III de 600 MHz. Elles ont été enregistrées à 300 K dans de l'acétone- $d_6$  ou du méthanol- $d_4$ . Les signaux des solvants, l'acétone- $d_6$  ( $\delta_H$  2,06 and  $\delta_C$  29,9 ppm) ou le méthanol- $d_4$  ( $\delta_H$  3,31 and  $\delta_C$  49,0 ppm) ont été utilisés comme références dans l'attribution des déplacements chimiques. L'identification des composés a été conduite par des expériences 2D-RMN : COSY, ROESY, HSQC et HMBC.

## **6. Analyse sensorielle**

### **6.1 Seuils de détection**

Pour effectuer les mesures de seuils de détection, nous avons utilisé la technique à choix forcé de 1 parmi 3 (3-AFC ISO 13301, 2002) à difficulté décroissante.

Le test prévoit que trois verres sont proposés aux dégustateurs. Deux contiennent seulement la matrice et un la matrice dans laquelle l'arôme à tester est ajouté. Le sujet doit indiquer le verre perçu comme différent. Dix concentrations croissantes ont été proposées. Pour répondre aux lois de la psychophysique, la concentration a été doublée à chaque niveau.

Pour éliminer toutes sortes d'erreurs, certaines mesures ont été adoptées. Le panel a été divisé en trois groupes et l'ordre de présentation des verres était équilibré entre les groupes. Chaque verre a été codé par trois chiffres aléatoires. Les tests ont eu lieu dans une salle équipée pour l'analyse sensorielle : absence d'odeur contaminante, et en surpression (NF EN ISO 8589, 2010). Les juges n'ont pas été informés de la nature des composés testés. Le panel était constitué de 18 personnes, 11 femmes et 7 hommes, d'âge compris entre 24 et 51 ans.

### **6.2 Composés testés et matrices utilisées**

Le composé testé pour évaluer les seuils de détection a été la mégastigmatriénone E. La mégastigmatriénone utilisée était constituée d'un mélange des mégastigma-4,7,9-trièn-3-one ; (6Z,8E)-mégastigma-4,6,8-trièn-3-one ; (6Z,8Z)-mégastigma-4,6,8-trièn-3-one ; (6E,8E)-mégastigma-4,6,8-trièn-3-one ; (6E,8Z)-mégastigma-4,6,8-trièn-3-one ; le rapport entre les isomères est 26,6 / 3,7 / 12,1 / 1 / 7,8.

Les seuils ont été réalisés dans de l'eau osmosée et dans un vin rouge Merlot IGP Pays d'Occitanie sans défaut apparent.

### 6.3 Interprétation statistique

D'après la norme ISO 13301 deux méthodes de calcul de seuil sont possibles. La première est dite BET (Best Estimate Threshold). Le seuil de détection est calculé comme la moyenne géométrique entre la concentration la plus basse à partir de laquelle on a une suite de bonnes réponses, et la concentration qui la précède. Mais cette méthode n'est pas valide si l'on considère la définition du seuil de détection comme une zone de doute olfactif (zone liminaire). De plus, elle ne tient pas compte de l'"effet fatigue" du sujet.

Pour cela, une adaptation graphique de la seconde méthode de calcul a été choisie (Cometto-Muñiz et Abraham, 2008). Une courbe sigmoïdale de probabilité de détection a été construite selon la fonction psychométrique ci-dessous :

:

$$P = \frac{P_{max}}{\left(1 + e^{-\frac{(x-x_0)}{D}}\right)}$$

où  $x$  est la concentration exprimée en  $\log_{10}$  ;

$x_0$  est le seuil de détection absolu ;

$P$  est la prédiction de la réponse correcte. Le seuil de détection a été associé à une probabilité de détection  $P = 0,5$ . Si on assume  $P = 0,5$  on obtiendrait  $x = x_0$ .

## 7. Synthèse de la glucovanilline, de la xylovanilline et de la glucoconiféraldéhyde

Le protocole de synthèse prévoit deux étapes principales : la condensation du sucre acétylé avec le composé d'arôme de glycosylation de l'arôme par un sucre peracétylé et la déprotection du glycoside obtenu.

La première étape utilise du bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl pour les synthèses des glucosides et du bromure de 2,3,4-tri-O-acétyl- $\alpha$ -D-xylopyranosyl pour les synthèses de xylosides. Pour des raisons économiques, le second a été préparé au laboratoire, par l'acétylation des groupes hydroxyles suivie de la bromation du carbone anomérique.

### **7.1 Procédure générale d'acétylation**

A une solution de xylose (27,7 mmol) dans 25 mL de pyridine à 0 °C, de l'anhydride acétique (25 mL) a été ajouté goutte à goutte. A la fin de l'addition, le mélange a été agité à température ambiante pendant 8 heures. La réaction a été suivie par CCM sur plaque de silice kieselgel (Cyclohexane/AcOEt ; 6/4 ; v/v). La solution obtenue a été versée dans de l'eau glacée et extraite avec de l'AcOEt. La phase organique a été lavée successivement avec une solution d'HCl 1 M, de l'eau et une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée, et séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après filtration, elle est concentrée sous pression réduite pour conduire au composé attendu.

### **7.2 Procédure générale de bromation**

Une solution d' HBr/AcOH 33 % a été ajoutée, très lentement et sous argon, à une solution de xylose peracétylé dans le dichlorométhane distillé et anhydre à froid (utilisé sans purification). Le milieu a été agité pendant 2 heures à température ambiante. La réaction a été suivie par CCM (Cyclohexane/AcOEt ; 6/4 ; v/v). La solution obtenue a été diluée dans du dichlorométhane. La phase organique a été lavée successivement avec de l'eau, une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée (3 fois) et du NaCl. Elle a ensuite été séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avant d'être concentrée sous pression réduite pour conduire au composé attendu.

### 7.3 Procédure générale de glycosylation par transfert de phase

Dans un ballon de 100 mL, de l'aldéhyde phénolique (0,0112 mole) a été dissoute dans une solution de  $\text{KHCO}_3$  1M/  $\text{KCl}$  1M (25 mL) et de tris(2-(2-méthoxyéthoxyéthyl)amine (TMEA ;  $\text{MM}= 323,43$  g/mol ;  $d=1,011$ ) (1,5 éq / fonction OH).

Le bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- $\beta$ -D-glucopyranosyde ou le bromure de 2,3,4-tri-O-acétyl- $\beta$ -D-xylopyranosyde (1,5 éq /fonction OH) est additionné rapidement avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (25 mL), afin d'éviter l'hydrolyse de l'acétobromoglycose.

Le mélange réactionnel a été porté à reflux du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pendant 24 h. L'évolution de la réaction a été suivie en CCM (Cyclohexane/AcOEt : 6/4 ; v/v) : UV- $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Le composé a ensuite été hydrolysé par ajout de 100 mL d'eau et extrait au  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  100 mL). Les phases organiques ont été rassemblées et lavées successivement avec une solution d'HCl 1M (2  $\times$  100 mL) et de l'eau (2  $\times$  100 mL). Après séchage de la solution sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , cette dernière a été filtrée et concentrée sous pression réduite. Afin d'isoler le composé attendu, une purification par chromatographie s'est avérée nécessaire. Le brut réactionnel a été purifié sur colonne chromatographique de gel de silice avec le mélange cyclohexane/AcOEt : 6/4 v/v ( $R_f$  1/3 sur silice kieselgel).

### 7.4 Procédure générale de déprotection

Le peracétylglycoside a été dissout dans 12 mL de MeOH et 0,6 mL d'une solution NaMeO/MeOH (0,3 M). La réaction a été suivie par CCM (AcOEt/MeOH ; 3:1). La réaction terminée, le mélange a été neutralisé par une résine acide de type Amberlite IRC-50, puis filtré et concentrée sous pression réduite. Afin d'isoler le composé attendu, une purification par chromatographie sur gel de silice a été effectuée.



# CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSION

## 1. Extraction et identification de précurseurs d'arôme glycosidiques dans le bois de chêne.

### 1.1 Recherche de précurseurs glycosidiques non acylés dans le bois de chêne.

L'existence de plusieurs formes de précurseurs d'arômes a été envisagée. L'exemple du précurseur de la whiskylactone indique que certaines formes monoglucosides pourraient éventuellement exister dans le bois de chêne (Hayasaka *et al.* 2007). Dans ses travaux portant sur la libération d'arômes par différents types d'enzymes glycosidases, Bloem (2005) avait supposé l'existence du précurseur de la vanilline liée à différents sucres : le glucose, le xylose, l'arabinose et le rhamnose. En effet, dans la nature, le précurseur de la vanilline a le plus souvent été retrouvé sous forme de  $\beta$ -D-glucopyranoside (Leong *et al.* 1989). Grâce aux essais réalisés avec différentes enzymes, Bloem (2005), avait conclu que la vanilline serait liée majoritairement à l'arabinose, et de manière secondaire au xylose, glucose ou rhamnose. Compte tenu de ces résultats, la stratégie que nous avons décidé d'employer a été de synthétiser les précurseurs monoglycosidiques mis en hypothèse par Bloem (2005), ces molécules sont par la suite utilisées comme références dans l'analyse HPLC-MS d'extrait de bois. Les molécules synthétisées peuvent ensuite être utilisées dans le développement d'une méthode de dosage.

Afin de détecter ces formes monoglycosidiques simples, nous avons employé la spectrométrie de masse à Transformée de Fourier (Orbitrap) pour sa puissance analytique.

### **1.1.1. Synthèse des précurseurs monoglycosides.**

Comme nous l'avons déjà évoqué, les travaux précédemment menés au laboratoire ont montré la libération des arômes d'intérêt par action d'enzymes glycosidases (Bloem 2006) ou par hydrolyse acide (Nonier *et al.* 2004). C'est pourquoi nous avons posé l'hypothèse de la présence de précurseurs mono glycosilés des arômes du bois de chêne. Il a donc été envisagé de procéder à la synthèse de la vanilline-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, de la vanilline-O- $\alpha$ -L-arabinofuranoside, de la vanilline-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside et de la vanilline-O- $\beta$ -D-xylopyranoside. Les dérivés glycosidiques homologues ont été envisagés pour la coniféraldéhyde, la syringaldéhyde et l'eugénol.

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec le Dr. N. Mora-Soumille (Laboratoire Qualité et Sécurité des Aliments d'Origine Végétale, UMR A408, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse).

Classiquement, la synthèse d'aryles glycosides est effectuée par la méthode de Michaël et reprise par la suite par Koenigs et Knorr (1901). Celle-ci prévoit une réaction entre le glycoside peracétylé halogéné et l'alcool, en présence d'oxyde d'argent ou de carbonate d'argent comme catalyseurs de la réaction. La stéréochimie du carbone anomérique est assurée par la participation du groupe acétyle en position 2 du sucre.

La première étape est donc la préparation du sucre d'intérêt peracétylé et bromé. Au moment de l'expérience, seul le tétracétate 1-bromo- $\alpha$ -D-glucopyranose était disponible commercialement. Nous avons donc procédé à la préparation d'autres sucres, notamment du D-xylose. Les sucres sont peracétylés par réaction avec l'anhydride acétique en présence de pyridine comme décrit au chapitre Matériels et Méthodes. Le rendement de la réaction est de 92 %.

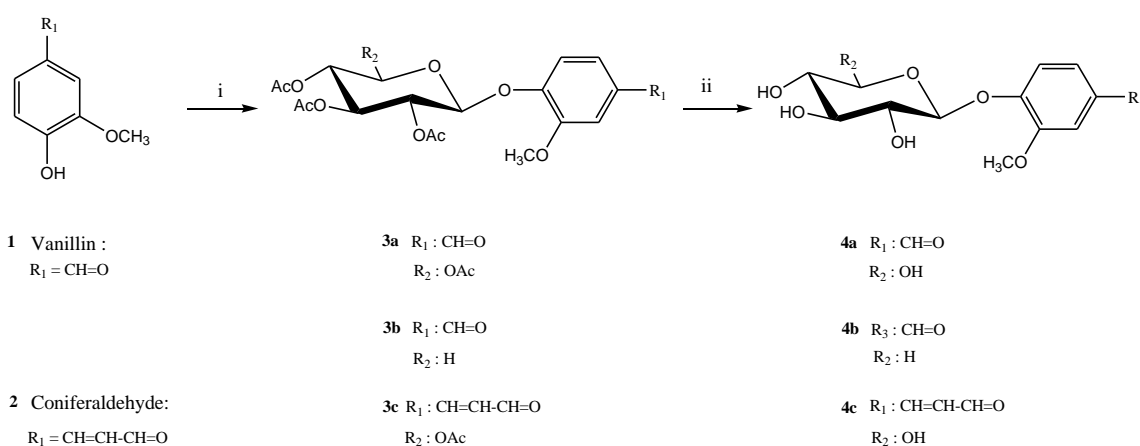
La bromation du carbone anomérique est effectuée par réaction à l'acide bromhydrique (HBr) comme décrit au chapitre Matériels et Méthodes. Le rendement de la réaction est de 96,5 %. La réaction conduit essentiellement au brome en position axiale comme indiqué par les constantes de couplage des protons anomériques de 2 Hz dans les spectres RMN  $^1\text{H}$ .

Le sucre était ainsi prêt pour la réaction de glycosylation. Dans l'objectif de préserver de l'oxydation les groupements phénols, portés par les aglycones aromatiques, et de la dégradation, la technique de glycosylation par transfert de phase a été choisie. Cette

technique a été employée avec succès dans la synthèse de O-aryl-β-D-glucosides (Alluis & Dangles 1999 ; Galland *et al.* 2007).

La glycosylation par transfert de phase (figure 21) a lieu dans un système biphasique constitué de dichlorométhane, d'une solution de bicarbonate de sodium (1M), de chlorure de potassium (1M), et de l'agent de transfert de phase, le tris [2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl]amine (TMEA) qui est un complexant spécifique du cation potassium. Le phénol est converti en phénate qui est faiblement soluble dans la phase organique. Au cours de la réaction, la consommation d'ions dans la phase organique déplace l'équilibre en faveur du phénate.

Dans ces conditions, la réaction de glycosylation est favorisée car le phénate est peu solvaté et le contre-ion est séquestré par la TMEA.



**Figure 21. Schéma général de synthèse**

**i) 2,3,4,6-tétracétate 1-Bromo-α-D-glucopyranose ou 2,3,4-triacétate 1-bromo-α-D-xylopyranose (1,5 equiv.), tris(2-(2-méthoxyéthoxy)éthyl)amine, TMEA (1,5 equiv.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1M NaHCO<sub>3</sub>/1M KCl (1:1) (5 mL), 40 °C, 48 heures.**

**ii) NaMeO/MeOH (0,3 M).**

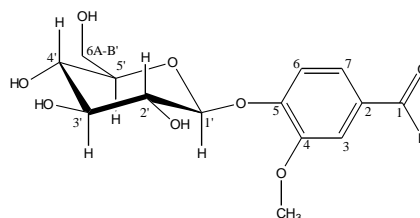
Après purification sur gel de silice, la vanilline(2,3,4,6-tétra-O-acétyl)-β-D-glucopyranoside, la vanilline(2,3,4-tri-O-acétyl)-β-O-D-xylopyranoside et la coniféraldéhyde(2,3,4,6-tétra-O-acétyl)-β-D-glucopyranosyde ont été obtenues pures avec des rendements respectifs de 75, 61 et 37 % (tableau 9).

**Tableau 9. Rendements de la réaction de glycosylation ; (C) = coniféraldéhyde, (V) = vanilline.**

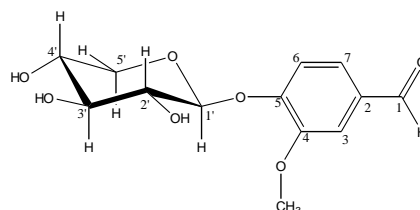
Sucre de départ	Masse aglycone (g)	Quantité (mmole)	Masse théorique (g) après réaction	Masse pure obtenue (g)	Rendement %	Solvant chromatographique Cyclohexane/AcOEt
Br-D-Xylose(OAc) <sub>3</sub>	0,7 (V)	4,4	1,8	1,1	61,1	7 : 3
Br-D-glucose(OAc) <sub>4</sub>	0,5 (V)	3,3	1,6	1,2	75,1	6 : 4
Br-D-glucose(OAc) <sub>4</sub>	2 (C)	11,2	5,7	2,1	36,8	6 : 4

Les pertes s'expliqueraient principalement par l'hydrolyse du bromure de 2,3,4,6-tétra-O-acétyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyle et du bromure de 2,3,4-tri-O-acétyl- $\alpha$ -D-xylopyranosyle, conduisant à la formation des sucres réducteurs (hémiacétal). La déprotection a été effectuée avec du méthanolate de sodium (NaMeO/MeOH (0,3 M)), par des purifications successives sur colonne conduisant aux produits purs : la vanilline- $\beta$ -D-glucopyranoside, la vanilline- $\beta$ -O-D-xylopyranosyde et le coniféraldéhyde- $\beta$ -D-glucopyranosyde, avec des rendements respectifs de 60, 43 et 59%. Tous les composés ont été caractérisés par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C. Les structures développées des composés effectivement synthétisés sont présentées à la figure 22. Deux autres tentatives de synthèses ont été effectuées, les composés ciblés étant la vanilline- $\alpha$ -O-L-arabinofuranoside et la vanilline- $\alpha$ -O-L-rhamnopyranoside. Dans le premier cas, nous avons obtenu la vanilline- $\beta$ -O-L-arabinopyranoside, et dans le deuxième nous avons réussi à préparer le sucre peracétylé et bromé, mais nous n'avons pas pu procéder à la réaction de glycosilation. Ces travaux ayant été effectués à l'université d'Avignon, nous étions malheureusement limités par le temps d'accueil.

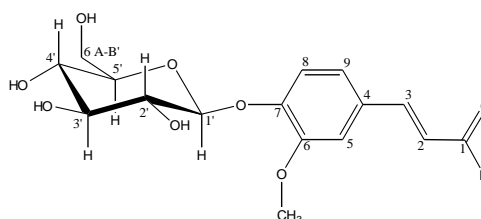
Vanilline-β-D-glucopyranoside



Vanilline-β-D-xylopyranoside



Coniféraldéhyde-β-D-glucopyranoside



**Figure 22. Monoglycosides synthétisés.**

Le signal RMN  $^1\text{H}$  du proton anomérique se situe à  $\delta$  5,07 ppm. Une constante de couplage  $3J_{\text{H}1'-\text{H}2'}$  de l'ordre de 7 Hz indique un couplage axial-axial, correspondant à la configuration anomérique  $\beta$ . Cette constante serait beaucoup plus faible, de l'ordre de 3 Hz, pour l'anomère  $\alpha$ . Le proton aldéhydique apparaît clairement dans les trois composés à  $\delta$  9,87 ; 9,78 et 9,53 ppm. Les 3 protons aromatiques de la vanilline sont situés à 7,5 (H-6), 7,49 (H-2), 7,23 (H-5) ppm. Pour le coniféraldéhyde, ils sont situés à 7,32 (H-2), 7,27 (H-6), 7,15 (H-5). La position de chaque proton est déterminée par la constante de couplage. Concernant la coniféraldéhyde, les protons vinyliques sont situés à  $\delta$  6,62 et 7,65 ppm et ont un couplage de 15,9 Hz qui comporte une configuration E. Les données de RMN sont résumées dans les tableaux 11 et 12.

**Tableau 10.** Données  $^1\text{H}$ -RMN :  $\delta\text{H}$ , J (Hz). Acquisitions effectuées dans  $\text{D}_2\text{O}$ .

N° Proton	Vanilline- $\beta$ -D-glucopyranoside	Vanilline- $\beta$ -D-xylopyranoside	Coniféraldéhyde- $\beta$ -D-glucopyranoside
	$\delta\text{H}$ , J (Hz)	$\delta\text{H}$ , J (Hz)	$\delta\text{H}$ , J (Hz)
2	7,49 d (1,5)	7,49 d (1,5)	7,32 d (1,8)
5	7,27 d (8,4)	7,23 d (8,4)	7,15 d (8,5)
6	7,52 dd (1,5, 8,4)	7,54 dd (1,5, 8,4)	7,27 dd (1,8, 8,5)
7	9,87 s	9,78 s	7,65 d (15,9)
8			6,72 dd (7,9, 15,9)
9			9,53 d (7,9)
OCH3	3,86 s	3,87 s	3,86 s
1'	5,07 d (7,0)	5,07 d (7,7)	5,05 d (7,4)
2'	a)	3,51 dd (7,7, 9,1)	b)
3'	3,45 à 3,51	3,45 t (9)	3,45 à 3,52
4'	3,39 m	3,59 dd (5,4, 9,5)	3,39 m
5'	3,45 à 3,51	3,90 dd (5,4, 11,4) 3,39 t (11,0)	3,45 à 3,52
6'	3,80 dd (1,9, 12,4)		3,78 dd (2,0, 12,4)
	3,64 dd (5,3, 12,4)		3,65 dd (5,4, 12,4)

**Tableau 11.** Données  $^{13}\text{C}$ -RMN :  $\delta\text{H}$ , J (Hz). Acquisitions effectuées dans  $\text{D}_2\text{O}$ .

N° Carbone	Vanilline- $\beta$ -D- glucopyranoside	Vanilline- $\beta$ -D- xylopyranoside	Coniféraldéhyde- $\beta$ -D- glucopyranoside
	$\delta\text{H}$ , J (Hz)	$\delta\text{H}$ , J (Hz)	$\delta\text{H}$ , J (Hz)
1	133,2	131,5	128,4
2	112,2	110,4	111,9
3	151,7	150,0	149,6
4	153,9	151,8	149,7
5	116,9	115,1	115,4
6	127,3	125,4	123,7
7	193,3	191,6	127,4
8			153,9
9			194,7
OCH3	57,0	55,2	55,2
1'	102,2	100,9	99,9
2'	75,1	73,0	73,6
3'	78,3	76,1	76,7
4'	71,6	69,5	69,5
5'	78,8	65,6	77,2
6'	62,8		63,1

### **1.1.2. Analyse du bois de chêne par spectrométrie de masse à Transformée de Fourier (UPLC-FT-MS)**

L'analyse par UPLC-FT-MS a été effectuée dans le cadre d'une collaboration interne à l'USC œnologie avec Axel Marchal.

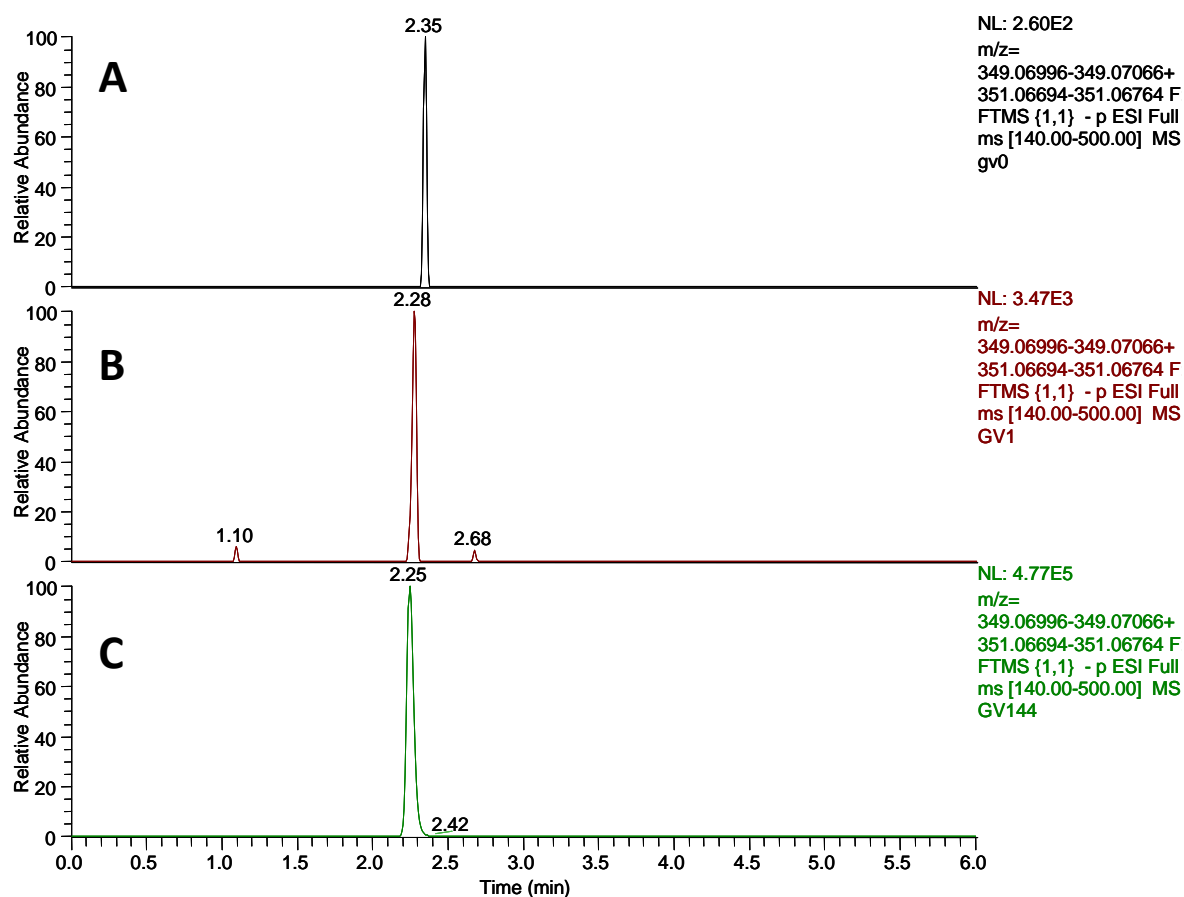
Les composés synthétisés ont été utilisés comme références pour optimiser les conditions d'ionisation et comme références chromatographiques pour identifier leur temps de rétention. Comme attendu pour les glycosides, les trois composés ne forment quasiment que des adduits, et l'ion moléculaire est difficilement observable.

Une fois les conditions analytiques optimisées, la vanilline-O-β-D-glucopyranoside, la vanilline-O-β-D-xylopyranoside et la coniféraldéhyde-O-β-D-glucopyranoside ont été recherchées dans des extraits de bois de différents chênes, dans du vin boisé et dans des Armagnacs âgés de 15 et 30 ans. Une gamme étalon dans un extrait de bois a également été réalisée dans le but de déterminer les limites analytiques de ces composés dans nos conditions. Ces limites ne font pas référence au rapport signal sur bruit de fond, qui est encore très intense en comparaison aux limites décrites par la suite, mais plutôt à la résolution du massif isotopique.

Le chromatogramme des adduits chlorures extraits pour la glucovanilline est reporté dans la figure 23. Nous pouvons voir que le signal de l'ajout à 1,4 µg/L est encore relativement intense ( $10^3$ ). On observe également un pic dans l'extrait de bois brut sans ajout à 2,35 minutes. Ce temps de rétention est décalé de 0,1 minute par rapport au même extrait avec les ajouts de 1,4 µg/L et de 144 µg/L.

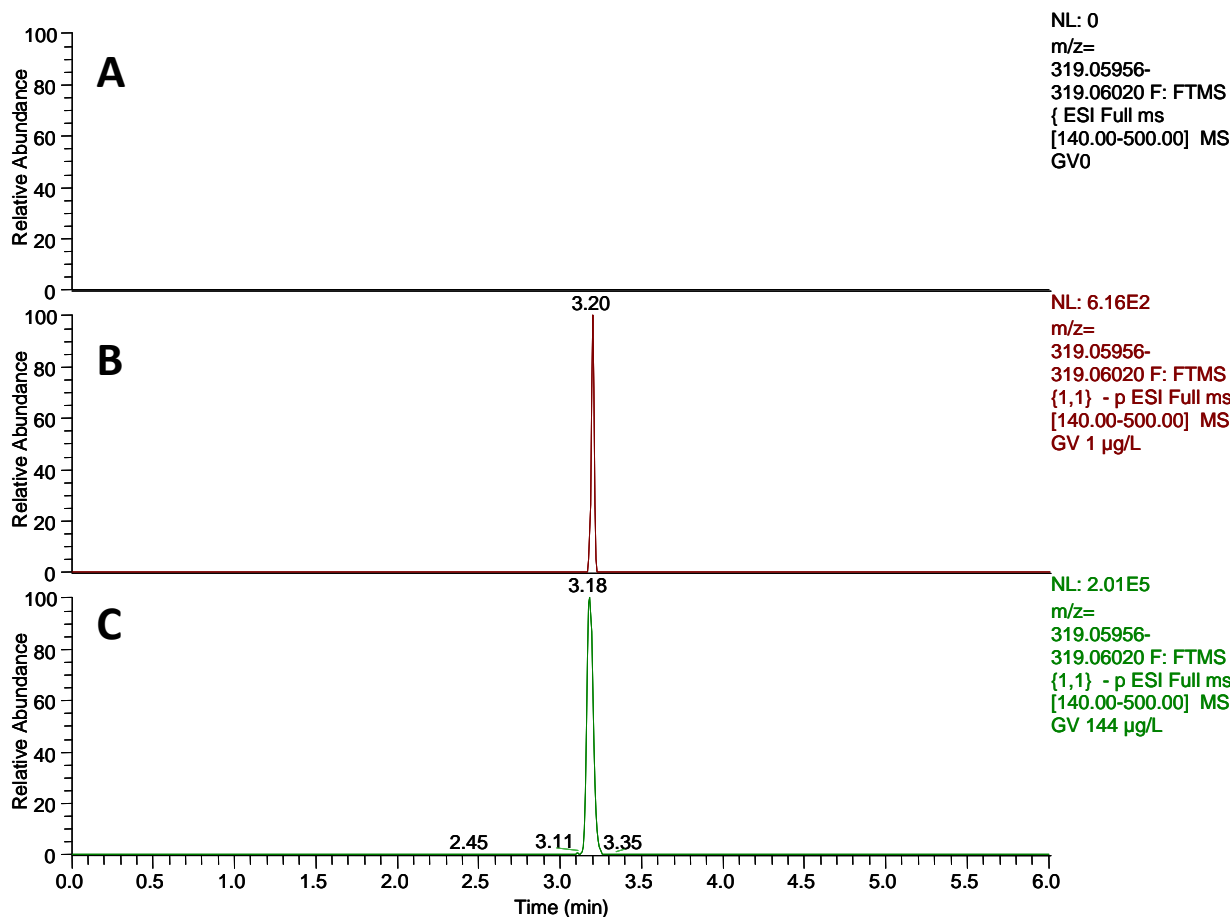
Cette variation est faible mais suffisante pour créer des doutes, d'autant plus que le pic à 2,35 minutes de l'extrait brut ne présente pas tous les adduits obtenus dans les extraits supplémentés en glucovanilline, notamment l'ion formate. L'adduit formate n'est pas non plus observé. On peut donc raisonnablement dire que le pic à 2,35 minutes ne correspond pas à la glucovanilline, ou alors avec une teneur inférieure à 1,4 µg/L.





**Figure 23.** Chromatogramme FT-MS (mode négatif) d'un extrait de bois (A) dopé avec de la glucovanilline à 1,4 µg/L (B) et à 144 µg/L (C). Chromatogramme extrait de l'ion adduit avec du  $^{35}\text{Cl}$   $m/z$  : 349,0703 et du  $^{37}\text{Cl}$   $m/z$  : 351,0673 dans une fenêtre de masse de 1 ppm.

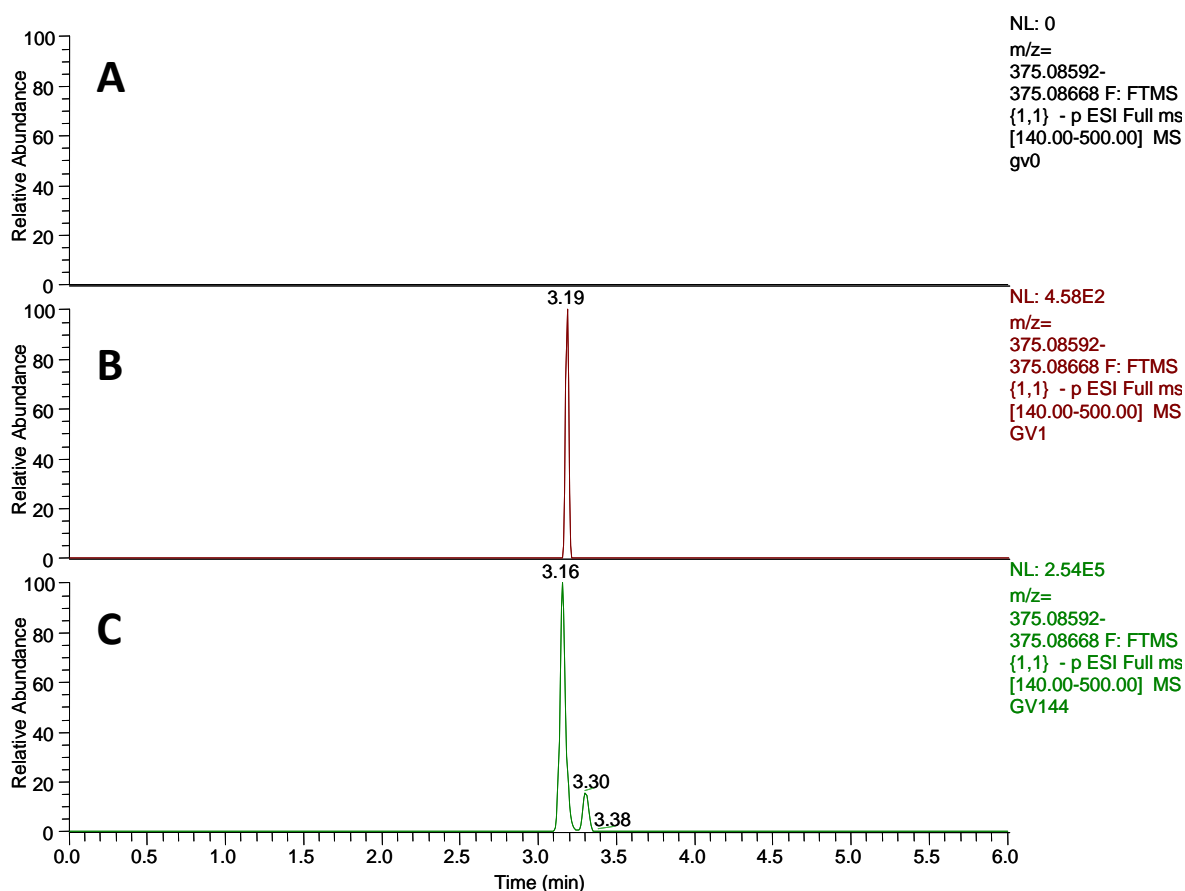
De la même manière, la xylovanilline a été recherchée. Le chromatogramme **A** dans la figure 24 montre bien l'absence d'ion correspondant à la xylovanilline ou à des isomères, comme d'autres dérivés pentosides de la vanilline. Dans ce même cas, la limite de détection de la vanilline-*O*-β-D-xylopyranoside a été établie à 0,9 µg/L.



**Figure 24.** Chromatogramme FT-MS (mode négatif) d'un extrait de bois (A) dopé avec de la xylovanilline à 0,9 µg/L (B) et à 92 µg/L (C). Chromatogramme extrait de l'ion adduit chlorure  $m/z$  : 319,05988 dans une fenêtre de masse de 1 ppm.

La coniféraldéhyde-*O*-β-D-glucopyranoside présente également une limite de détection d'environ 1 µg/L. Pour toutes les concentrations à l'exception de la limite de détection, nous pouvons observer un petit pic à 3,3 minutes, correspondant à environ 8 % du pic de la coniféraldéhyde-*O*-β-D-glucopyranoside (Figure 25). Cela pourrait être du à la présence dans le produit de synthèse de l'isomère Z de la coniféraldéhyde. Cependant aucun des deux pics correspondant à la coniféraldéhyde-*O*-β-D-glucopyranoside, ni à des pics correspondants à la vanilline-*O*-β-D-xylopyranoside ou à la vanilline-*O*-β-D-glucopyranoside n'a été détecté dans les extraits de bois de chêne, d'Armagnac ou de vin. Aucun autre pic correspondant à des isomères n'a non plus été observé. Cela nous fait penser que les dérivés monoglycosides simples, autres que ceux synthétisés, ne sont pas présents à des concentrations détectables dans les extraits de bois de chêne. Cela pourrait soulever des doutes sur la véritable

existence de précurseurs d'arômes monoglycosides dans le bois de chêne. En élargissant, on pourrait donc également émettre un doute sur l'existence du précurseur de la whiskylactone, l'acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthylactanoïque, identifié par Hayasaka *et al.* (2007). En effet, la coniféraldéhyde-O-β-D-glucopyranoside est un intermédiaire dans la biosynthèse de la lignine dans les gymnospermes et dans certains angiospermes comme le frêne (*Fraxinus*) (Terazawa *et al.* 1984 ; Yukiko *et al.* 2005). Mais cela ne semble pas être le cas pour le chêne d'après les résultats que nous avons obtenu sur les échantillons de chêne français que nous avons analysés.



**Figure 25.** Chromatogramme FT-MS (mode négatif) d'un extrait de bois (A) avec ajout de la glucoconiféraldéhyde à 0,9 µg/L (B) et à 85 µg/L (C). Extraction de l'ion adduit avec du <sup>35</sup>Cl *m/z* : 375,0863 dans une fenêtre de masse de 1 ppm.

En conclusion la vanilline-O-β-D-glucopyranoside, la vanilline-O-β-D-xylopyranoside et la coniféraldéhyde-O-β-D-glucopyranoside ne semblaient pas être présentes dans nos échantillons de bois de chêne français, vins et armagnac, ou du moins pas au-delà de 1 µg/L.

Cependant une étude systématique élargie à plusieurs espèces serait nécessaire pour rejeter avec certitude l'hypothèse de départ.

## **1.2 Mise en évidence de la présence de précurseurs d'arômes autres que les monoglycosides « simples ».**

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que les précurseurs d'arôme de la vanilline liés simplement à un seul sucre n'existaient pas dans le bois de chêne. L'hypothèse formulée précédemment à partir d'analyses indirectes et à partir des activités enzymatiques n'a pas été confirmée. Les précurseurs, s'ils existent, sont soit à des concentrations non détectables dans nos conditions, soit sous une forme plus complexe. Ceci nous a poussé à employer une nouvelle approche sans à priori par purification et caractérisation chimique.

Des copeaux de chêne non chauffés ont été extraits à l'aide d'un mélange eau/acétone (1 : 1 v/v). Après dégraissage et nettoyage par extraction liquide/liquide avec du cyclohexane et du dichlorométhane, ils ont été concentrés et fractionnés par HPLC. L'utilisation d'une colonne HPLC semi-préparative a été nécessaire pour éviter la saturation de la phase stationnaire et l'asymétrie des pics. Les fractions contenant des précurseurs ont été révélées par hydrolyse enzymatique et analyse des aglycones par GC-MS. La préparation enzymatique AR 2000 possédant différentes activités parmi lesquelles des glycosidases ( $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase, et  $\alpha$ -arabinofuranoside), a été utilisée pour n'exclure aucune piste. Le résultat de l'analyse en précurseurs des différentes fractions obtenues a été reporté dans le tableau 13. Cette méthode permet de repérer la présence éventuelle de plusieurs formes de précurseurs. On observe que la whiskylactone est libérée dans plusieurs fractions et que la distribution des concentrations dans ces fractions n'est pas gaussienne. Cela laisse supposer que différents précurseurs seraient élués l'un après l'autre et qu'une résolution séparative trop faible entraîne des fractions de coélution. En effet, comme indiqué dans l'étude bibliographique, plusieurs formes de précurseurs de la whiskylactone ont par le passé été identifiées. L'injection d'une quantité de référence, courtoisement fournie par

Axel Marchal, a permis de vérifier que le composé élué à partir de la fraction 28 était bien le précurseur 6'-*O*-gallate de l'acide (3*S*,4*S*)-4-β-*D*-glucopyranosyloxy-3-méthyl-octanoïque. Les fractions 7 et 8, les plus polaires, libèrent de faibles quantités de vanilline, syringaldéhyde, alcool vanillique et acide vanillique. Ces deux derniers composés ne sont libérés dans aucune autre fraction (dans les limites de détection du système). Au contraire, la vanilline et la syringaldéhyde ont aussi été libérées dans d'autres fractions et en quantité plus importante. L'augmentation maximale en vanilline se retrouve dans la fraction 31 et à priori, composée de molécules plus apolaires que les précurseurs synthétisés (tous les deux élués avant la fraction n° 20). L'eugénol sort dans un seul groupe dans les fractions 31-32.

Etant donnée l'importance olfactive et la quantité d'arômes libérés, l'attention a été portée sur la fraction 31, et plus précisément sur la vanilline. Cette fraction a donc été analysée par HPLC-ESI-IT-MS. Une recherche en scan de l'ion fragment de vanilline a été effectuée en alternant les modes d'ionisation positif et négatif. Dans ces conditions d'analyse, un pic a été observé à  $m/z$  : 465 en négatif. Cet ion en MS<sup>2</sup> présente l'ion de la vanilline  $m/z$  : 151 ; les ions  $m/z$  : 313 et  $m/z$  : 169 ont aussi été observés. Afin d'identifier ce composé, nous avons fait appel à la LC-RMN en modalité « stop-flown » et en LC-SPE-RMN. La séparation chromatographique a été arrêtée au temps de rétention auquel l'ion avait été localisé. Dans le cas de la LC-SPE-RMN, l'éluant sortant de la colonne HPLC a été piégé sur des mini-cartouches SPE. Les composés piégés (plusieurs cycles de piégeages sont possibles pour capturer davantage de composés) sont désorbés et envoyés à la sonde RMN par du solvant deutéré. Malheureusement, aucun signal exploitable n'a pu être obtenu. La quantité de précurseurs était certainement trop faible pour être analysée par des méthodes directes. De plus, l'extrait de bois était trop riche en composés divers, qui rendent difficiles toute analyse. Une extraction plus fine et une méthode de purification efficace s'avèrent donc nécessaire.

**Tableau 12.** Richesse des différentes fractions HPLC en précurseurs révélés par libération des aglycones ( $\mu\text{g/L}$ ) à l'aide de l'hydrolyse enzymatique.

Fractions	<i>trans</i> - whiskylactone	<i>cis</i> -whiskylactone	Vanilline	Eugéno	syringaldéhyde	alcool vanilique	acide vanilique
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	4,674	-	9,882	86,887	25,149
8	-	-	-	-	32,796	-	,,064
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	6,103	-	-	-	-
14	-	-	14,656	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	125,073	-	-
18	-	-	-	-	5,892	-	-
19	-	2,739	-	-	-	-	-
20	-	3,539	-	-	-	-	-
21	1,832	3,106	-	-	-	-	-
22	1,505	10,434	-	-	-	-	-
23	-	24,088	-	-	-	-	-
24	-	46,096	-	-	-	-	-
25	95,827	493,045	18,468	-	-	-	-
26	6,663	135,220	-	-	-	-	-
27	23,141	112,495	-	-	-	-	-
28	20,413	1366,227	1,073	-	-	-	-
29	655,362	2282,992	3,367	-	-	-	-
30	395,954	552,457	-	-	-	-	-
31	195,926	333,102	100,917	95,922	11,032	-	-
32	47,958	70,867	20,870	20,049	1,640	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-

### 1.3 Isolement de précurseurs galloylglucosidiques de molécules volatiles dans le bois de chêne.

L'existence de précurseurs glycosylés dans le bois de chêne a déjà été prouvée, mais ceux-ci n'ont pas été totalement caractérisés par le passé. Pour cela, l'obtention de composés purifiés en quantité suffisante pour effectuer les analyses spectroscopiques (MS, RMN) s'est avérée nécessaire. L'extrait acétone/eau (1/1 ; v/v) du bois de chêne est une matrice très complexe, comme déjà reporté dans l'étude bibliographique. Une grande quantité de molécules y étant retrouvée, un protocole de plusieurs étapes de purification a été mis en place.

Les précurseurs recherchés étaient inconnus ainsi que leurs caractéristiques physico-chimiques. Pour suivre le processus d'isolement, les précurseurs ont été analysés par méthode indirecte. Cette méthode implique le clivage des molécules par des enzymes aux activités glycosidiques, puis l'analyse des aglycones libérés par GC-MS.

#### 1.3.1. Extraction solide/liquide

Plusieurs solvants ont été testés. La quantité de précurseurs extraits a été évaluée selon la teneur en aglycones libérés après hydrolyse enzymatique (tableau 14). Parmi les solvants testés, le mélange eau/acétone 3 : 7 (v/v) a été choisi car il permet d'extraire du bois des quantités supérieures en précurseurs de la whiskylactone, vanilline, eugénol et syringaldéhyde.

**Tableau 13.** Libération de composés volatiles du bois de chêne par hydrolyse enzymatique, en fonction du solvant d'extraction. Résultats exprimés en surface relative (aire du pic/aire étalon interne), écart type entre parenthèses.

Aglycones libérés	eau	éthanol	Méthanol	acétone	eau/éthanol (1:1)	eau/méthanol (1:1)	eau/acétone (3:7)
<i>trans</i> -whiskylactone	6,1 (±1,6)	2,7 (±1,1)	8,3 (±1,9)	2,3 (±0,6)	9,2 (±3,5)	8,1 (±1,4)	11,7 (±2,0)

<i>cis</i> -whiskylactone	35,1 (±7,8)	15,7 (±6,5)	41,2 (±9,9)	11,8 (±0,6)	56,7 (±10,4)	47,1 (±7,4)	62,6 (±10,1)
vanilline	33,1 (±2,7)	0,4 (±0,1)	49,2 (±6,2)	32,8 (±8,9)	49,8 (±22,1)	61,4 (±8,8)	78,2 (±23,5)
eugénol	0,5 (±0,2)	0,1 (±0,3)	3,3 (±0,6)	0,2 (±0,1)	4,8 (±1,1)	4,0 (±0,3)	6,0 (±1,5)
syringaldéhyde	119,2(±1,6)	1,3 (±0,6)	146,3 (±48,2)	64,8 (±38,0)	214,1 (±146)	188,4 (±25,3)	269,1 (±169,4)

### 1.3.2. Extractions liquide/liquide

L'extrait de bois de chêne est une matrice très riche en composés. Pour faciliter l'isolement de molécules par des techniques ultérieures de chromatographie, l'extrait doit être simplifié. Dans ce but, des extractions liquide/liquide à polarité croissante ont été effectuées. Le solvant organique de l'extrait de bois brut eau/acétone (3/7 ; v/v) a été évaporé jusqu'à obtenir 500 mL de phase aqueuse qui par la suite ont été extraits consécutivement par le cyclohexane, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle.

L'extraction au cyclohexane est riche en composés apolaires comme la whiskylactone (Figure 26), mais aucune augmentation dans la teneur en composés volatils n'a été observée après hydrolyse enzymatique. Nous n'avons donc pas pu extraire de précurseurs glycosidiques présents en quantité significative dans cette phase organique (Tableau 15).

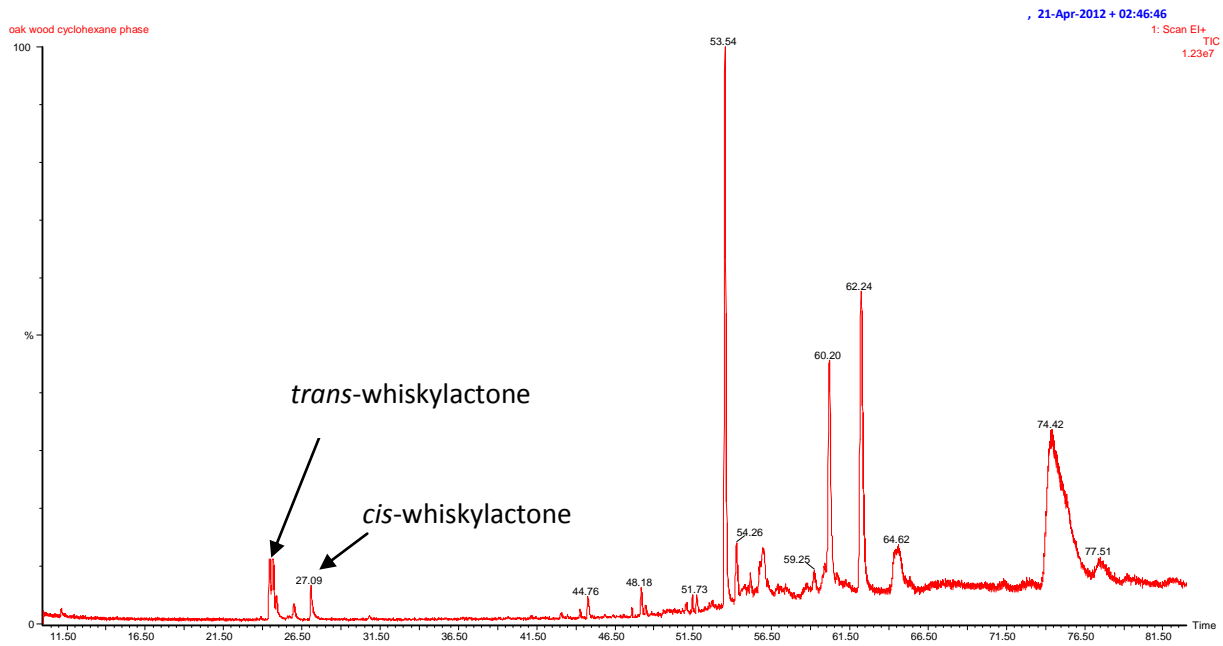
**Tableau 14.** Présence de précurseurs d'arômes du bois de chêne pour chaque extraction liquide/liquide. Révélation effectuée par hydrolyse enzymatique et analyse GC-MS de l'aglycone. Résultats exprimés en surface relative (aire du pic/aire étalon interne).

Aglycones libérés	Extr. cyclohexane	Extr. dichlorométhane	Extr. acétate d'éthyle	Résidu aqueux
<i>Trans</i> -whiskylactone	Nd	nd	8335	476
<i>Cis</i> -whiskylactone	Nd	2	51962	5587
Vanilline	Nd	314	11257	923
Eugénol	16	12	1701	336
Syringaldéhyde	83	238	12881	2910

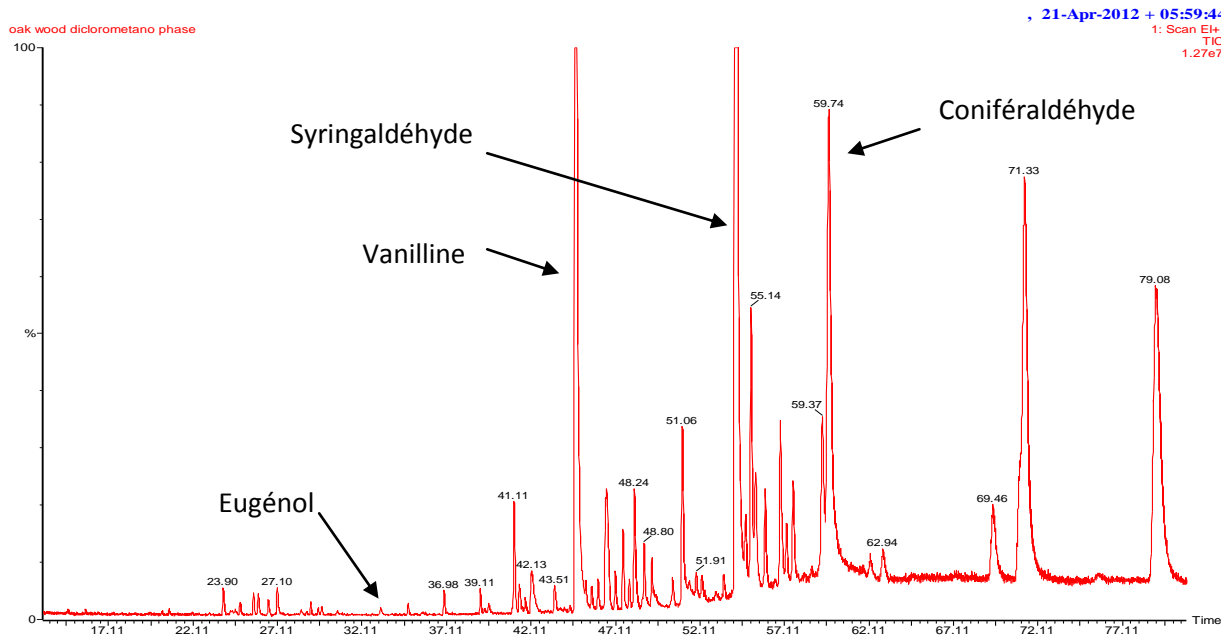


Le dichlorométhane est un solvant plus polaire que le cyclohexane. Cette fraction est riche en molécules odoriférantes. En fait, la plupart des arômes du bois sont extraits par ce solvant, comme le montre la richesse du chromatogramme (Figure 27).

De très faibles variations dans la teneur en composés volatils ont été observées après hydrolyse enzymatique ou hydrolyse acide, comprises dans l'incertitude analytique. Des précurseurs glycosidiques pourraient être extraits en très faibles quantités par ce solvant, mais insuffisantes pour procéder à leur isolement et à leur identification.



**Figure 26.** Chromatogramme GC-MS de la fraction cyclohexane. On observe la présence de *trans*-whiskylactone (RT: 24,91 min) ; *cis*-whiskylactone (RT: 27,09 min).



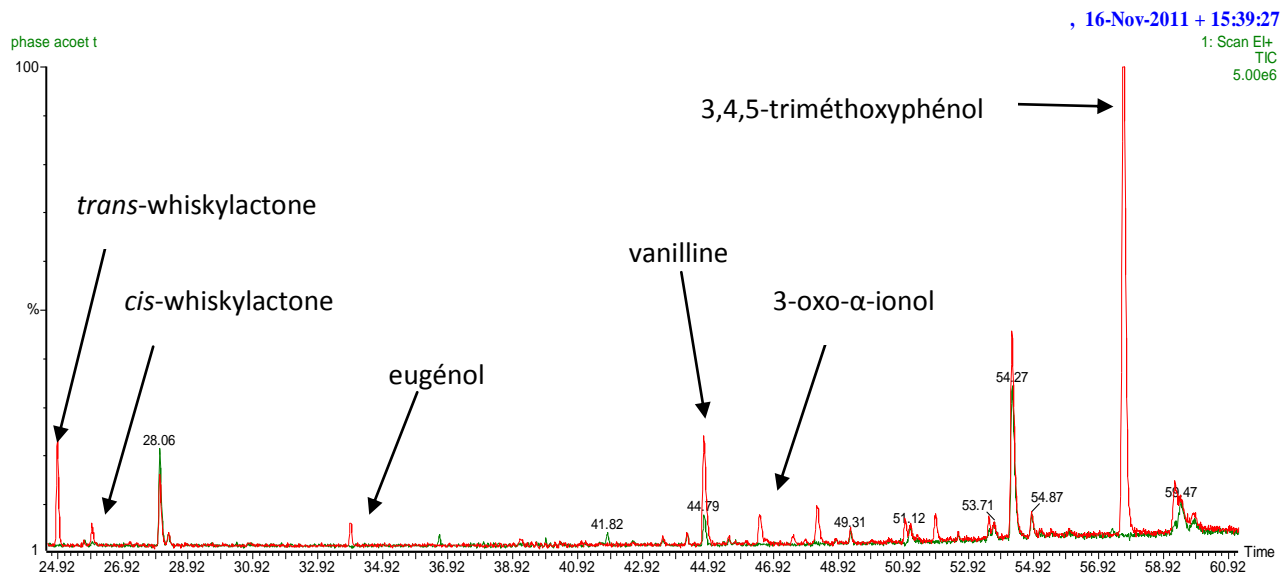
**Figure 27.** Chromatogramme GC-MS de la fraction dichlorométhane. Eugénol (RT: 33,91 min) ; vanilline (RT: 44,79 min); syringaldéhyde (RT: 54,28 min) ; coniféraldéhyde (59,74 min).

La perte entraînée par l'extraction au dichlorométhane est ici négligeable pour la troisième extraction liquide/liquide à l'acétate d'éthyle.

Cette fraction contient très peu de composés volatils, car ils ont été extraits presque totalement par le dichlorométhane. L'acétate d'éthyle possède une polarité plus élevée que le dichlorométhane. Le chromatogramme GC-MS du contrôle est en effet très pauvre en molécules odoriférantes. Par contre, l'analyse après hydrolyse enzymatique de l'extrait montre l'apparition de la vanilline, de la syringaldéhyde, de la 3-oxo- $\alpha$ -ionol et du 3,4,5-triméthoxyphénol en proportions importantes (Figure 28).

La même observation avait été faite par Nonier *et al.* (2005), qui eux n'avaient pas constaté d'augmentation du 3-oxo- $\alpha$ -ionol, mais avaient noté l'apparition de la mégastigmatriénone. Ceci s'explique par le fait que, dans l'expérience, l'hydrolyse avait été conduite avec de l'acide et à température élevée. Or, en milieu modérément acide et sous l'action thermique, le 3-oxo- $\alpha$ -ionol se déshydrate et se dégrade en mégastigmatriénone (Aasen *et al.* 1972).

On en conclut que la majorité des précurseurs glycosidiques du bois de chêne sont extraits par l'acétate d'éthyle. Cette fraction a donc été retenue pour les purifications successives



**Figure 28.** Libération des composés volatiles par hydrolyse enzymatique de la fraction acétate d'éthyle. Témoin en vert, hydrolyse en rouge.

### 1.3.3. Séparation par chromatographie de partage centrifuge (CPC)

L'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de chêne est très complexe et riche en composés. De plus, les précurseurs ne semblent pas être les espèces majoritaires. Il y avait donc nécessité d'utiliser une technique séparative efficace et permettant de limiter les pertes en composés. La chromatographie de partage centrifuge (CPC) répond à ces critères et se trouvait disponible à l'ISVV.

#### 1.3.3.1. Nouvelle approche dans la détermination des coefficients de partage par activité enzymatique.

Afin d'optimiser la purification des précurseurs, une nouvelle approche a été développée pour la sélection du système de solvant CPC. Habituellement, cette sélection est basée sur la

valeur du coefficient de partage (*Kca*) de la molécule cible. Un *Kca* proche de 1 permet une bonne séparation du composé d'intérêt vis-à-vis des autres molécules.

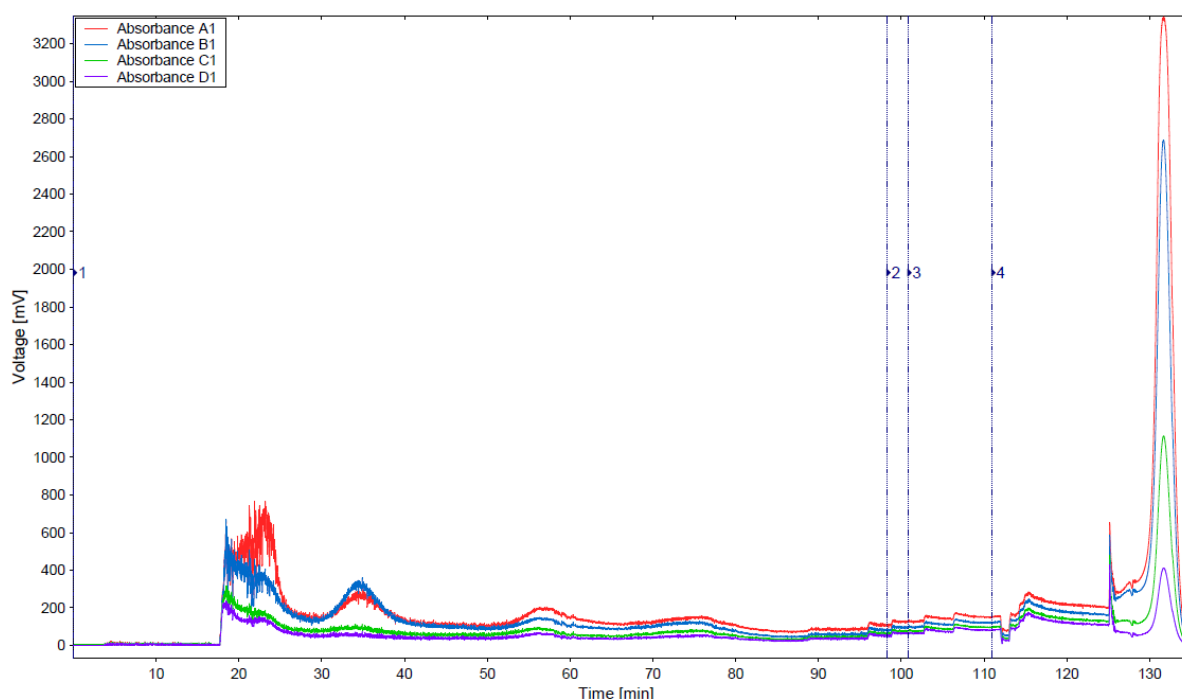
Dans notre cas, les molécules étant au départ inconnues, les *Kca* des formes précurseurs ne pouvaient pas être déterminés par analyse directe de leur répartition dans les deux phases des systèmes à tester. Le choix a donc été basé sur la mesure d'une activité glycosidique pour chaque phase. Le *Kca* représente donc la répartition dans les phases supérieure et inférieure des composés capables de libérer des arômes après hydrolyse enzymatique. Les résultats reportés dans le tableau 16 montrent que dans le système acétate d'éthyle / isopropanol / eau (40 : 1 : 40), la vanilline, l'eugénol et le 3-oxo- $\alpha$ -ionol ont un *Kca* proche de 1. Cela signifie que les précurseurs de ces 3 molécules sont élués lorsqu'un volume de phase mobile est passé à travers la phase stationnaire. En considérant les valeurs de *Kca* assez proches, ces 3 précurseurs d'arôme seront donc élués dans les mêmes fractions. Cela permettrait d'éliminer une grosse partie des molécules non désirées.

**Tableau 15.** Systèmes de solvants testés pour l'isolement des précurseurs glycosylés.

No.	Système de solvants	Rapport des volumes	Valeur de <i>Kca</i> pour la vanilline libérée	Valeur de <i>Kca</i> pour la 3-oxo- $\alpha$ -ionol libérée	Valeur de <i>Kca</i> pour l'eugénol libéré	Valeur de <i>Kca</i> pour le 3,4,5-triméthoxyphénol libéré	
I	EtOAc/isoPrOH/H <sub>2</sub> O	40:1:40	1,10	0,85	0,54	1,05	
II	EtOAc/isoPrOH/H <sub>2</sub> O	20:1:20	2,19	1,98	0,65	1,06	
III	EtOAc/1-BuOH/H <sub>2</sub> O	14:1:15	5,45	9,9	2,06	0,02	
Gamme ARIZONA	B	Hep/EtOAc/MeOH/H <sub>2</sub> O	1:19:1:19	1,49	1,82	0,44	1,44
	F	Hep/EtOAc/MeOH/H <sub>2</sub> O	1:5:1:5	1,24	0,42	0,22	1,31
	K	Hep/EtOAc/MeOH/H <sub>2</sub> O	1:2:1:2	0,86	0,03	0,01	0,85

### 1.3.3.2. Résultats de la séparation.

Une fois le système de solvants sélectionné (acétate d'éthyle / isopropanol / eau ; 40 : 1 : 40), la fraction acétate d'éthyle a été séparée par CPC. Le chromatogramme UV montre plusieurs zones d'élution (Figure 29). Une de ces zones est éluée entre 50 et 60 minutes de séparation, ce qui correspond à l'élution d'un volume de colonne. Si le calcul du coefficient de partage est correct, cette troisième zone devrait contenir les précurseurs d'intérêt.



**Figure 29.** Chromatogramme CPC de l'extrait EtOAc de bois de chêne (Rouge : 254 nm ; bleu : 280 nm ; vert : 313 nm ; violet 330 nm).

Dans les premiers tubes récoltés (entre 10 et 15 selon l'expérience), la présence de deux phases est observable.

Après l'élution de 2 volumes de colonne, l'efficacité de la séparation diminue fortement. Les composés trop polaires restent dans la phase stationnaire et leur avancement dans la colonne devient très lent. A partir de 90 minutes, nous avons effectué l'extrusion, c'est à dire que la phase stationnaire a été pompée dans la colonne à la place de la phase mobile. De cette manière la phase stationnaire déjà présente dans la colonne a été remplacée par la nouvelle phase stationnaire « propre ». Les composés restés dans la phase stationnaire ont

donc été poussés vers la sortie de la colonne. Le pic observé à 130 minutes correspond à l'élution de ces composés.

Les tubes correspondant à chaque bloc ont été regroupés, évaporés et lyophilisés. La masse de chaque groupe reconstitué a été reportée dans le tableau 17.

La présence de précurseurs glycosidiques a été recherchée dans les différents groupes par hydrolyse enzymatique et par hydrolyse acide (Tableau 18).

**Tableau 16.** Poids obtenu pour chaque fraction CPC.

Fractions	Temps (min)	Masse (mg.)	Couleur
A	0-16	0	-
B	17-19	202	Brun
C	20-25	228	Brun foncé
D	26-29	69	Jaune clair
E	30-33	100	Jaune
F	34-39	179	Jaune
G	40-51	103	Jaune
H	52-55	37	Jaune clair
I	56-59	43	Jaune clair
L	60-69	83	Orange-jaune clair
M	70-80	84	Blanchâtre
N	81-87	29	Blanchâtre
O	88-94	22	Blanchâtre
P	95-109 « exctrusion »	110	Blanchâtre
Q	110-125 « exctrusion »	183	Blanchâtre
R	125-128 « exctrusion »	117	Marron très foncé

Les précurseurs de la whiskylactone sont moins retenus par la phase stationnaire car ils sont élués au début du chromatogramme peu de temps après l'élution du volume mort. Dans les fractions H et I, correspondant au troisième bloc et à l'élution d'un volume de colonne, l'hydrolyse enzymatique libère de la vanilline, du 3-oxo- $\alpha$ -ionol, de l'eugénol et du 3,4,5-triméthoxyphénol (Figure 30). Le précurseur de la whiskylactone est donc moins polaire que

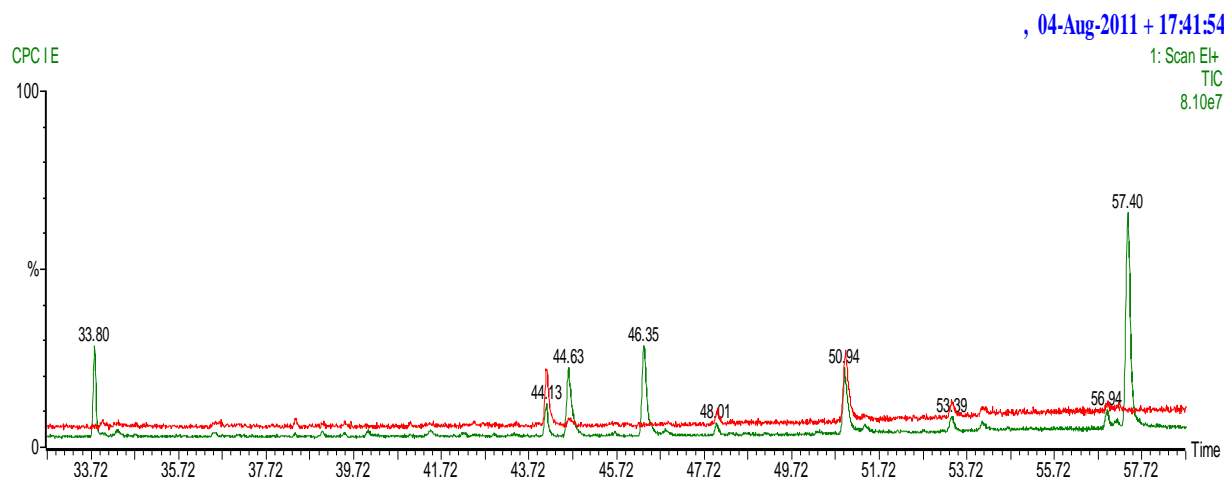
les précurseurs présents dans les fractions H et I (Tableau 18). En effet, le précurseur de la whiskylactone, le dérivé 6'-O-gallate de l'acide (3S,4S)-4-β-D-glucopyranosyloxy-3-méthylactanoïque, a été purifié par CPC en utilisant le système de solvants G de la gamme ARIZONA (Marchal *et al.* 2011). Ce système est moins polaire que le système employé ici.

La sélection du système de solvants et la prévision d'éluion des molécules inconnues par la détermination du  $K_{ca}$  ont donc été correctes et efficaces.

Les fractions H et I ont ainsi été retenues pour la suite de la purification.

**Tableau 17.** Libération des aglycones par hydrolyse enzymatique dans les différentes fractions CPC. Quantification par GC-MS exprimée par la surface relative.

	Fractions CPC														
	B	C	D	E	F	G	H	I	M	N	O	L	P	Q	R
<i>Trans</i> -whiskylactone	-	123	234	439	-	-	-	-	-	-	-	-	1475	188	-
<i>Cis</i> -whiskylactone	326	565	1213	6215	-	-	-	-	-	-	-	-	1322	611	-
Eugénol	-	-	-	-	-	15	316	669	-	-	-	-	-	-	-
3-oxo-α-ionol	-	-	-	-	-	-	111	268	40	-	-	-	-	-	-
Vanilline	-	-	-	-	-	-	150	376	-	-	-	-	-	-	-

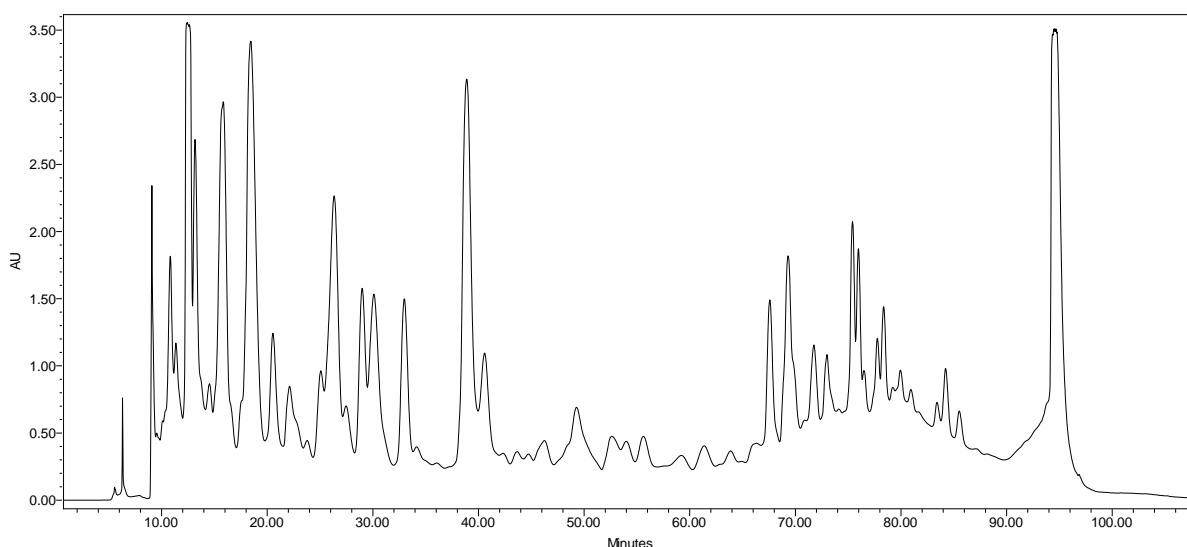


**Figure 30.** Chromatogramme GC-MS en SCAN de la fraction CPC I ; en vert les composés volatiles libérés par hydrolyse enzymatique, en rouge le témoin sans hydrolyse. RT : 33,8 min. eugénol ; 44,63 min vanilline ; 46,35 min 3-oxo-α-ionol ; 57,40 min 3,4,5-tryméthoxyphénol.

Après extrusion, le nettoyage de la colonne par 2 L d'eau/acétone (1 : 1) amène à la récupération de seulement 17 mg de matière, restée collée dans le rotor et l'injecteur. Le grand avantage de la CPC, auquel elle doit sa réputation, est d'obtenir des rendements de purification élevés. En effet, la perte de matière la plus importante a lieu dans l'étape de filtration avant l'injection. La matière perdue sur les filtres a été estimée à environ 1 g. Cette étape critique de filtration est rendue encore plus difficile par la viscosité élevée du système de solvants utilisé.

#### ***1.3.4. Purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC semi-préparative).***

L'analyse HPLC-UV des fractions H et I a révélé que l'extrait reste très riche, malgré l'élimination d'une grande partie des composés. Les pics observés à 280 nm (Figure 31) recouvrent tout le chromatogramme, indiquant la diversité physico-chimique des composés présents dans les fractions. Les fractions H et I regroupées ont été purifiées ultérieurement par HPLC semi-préparative.



**Figure 31.** Chromatogramme HPLC-UV de la fraction CPC-I, détection à 280 nm.



La purification a eu lieu sur une colonne en phase inverse C<sub>18</sub>. Le gradient chromatographique a été développé, après un certain nombre d'essais, de manière à séparer au mieux les pics. L'éluant a été collecté dans 90 tubes à la vitesse d'un tube par minute. La présence des précurseurs a été recherchée par hydrolyse enzymatique (AR 2000) et analyse GC-MS dans les 90 fractions récoltées.

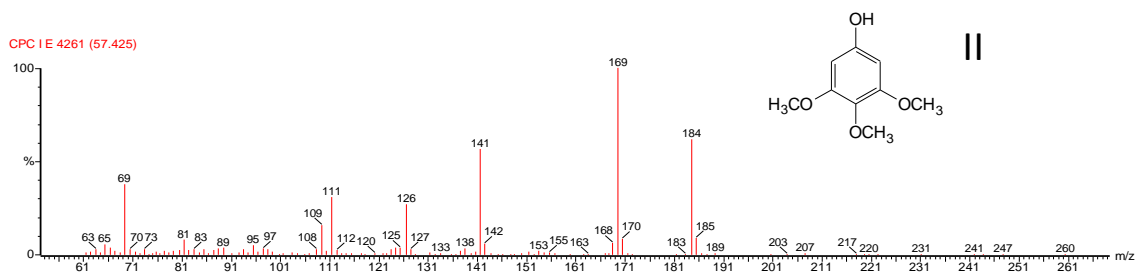
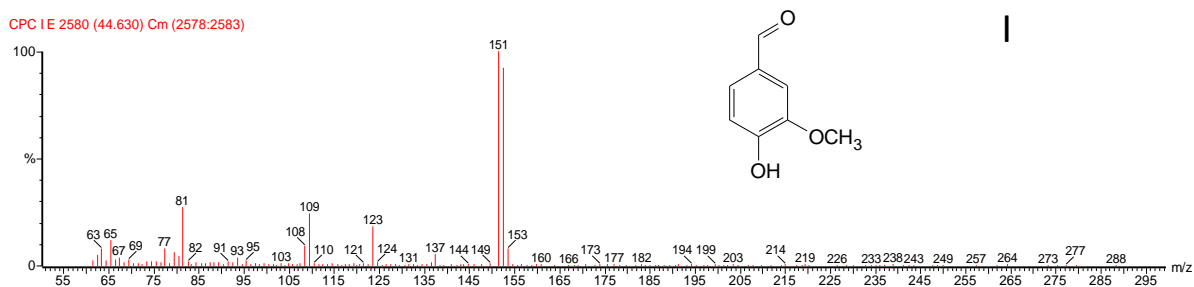
Dans quatre tubes distincts, des composés volatils ont été libérés lors de l'hydrolyse enzymatique. Ils correspondent au tube 23 (tr : 33 min), au tube 28 (tr : 38 min), au tube 58 (tr : 68 min), et au tube 69 (tr : 79 min). Chacun de ces tubes amène à un composé distinct, dont la pureté a été vérifiée par analyse HPLC-UV analytique et par HPLC-ESI-IT-MS. Les composés présents dans les tubes 23, 28, 58 et 69 ont été nommés respectivement **A**, **B**, **C** et **D**. Ces quatre composés ont été évaporés et lyophilisés avant de passer à l'analyse structurale par MS et RMN.

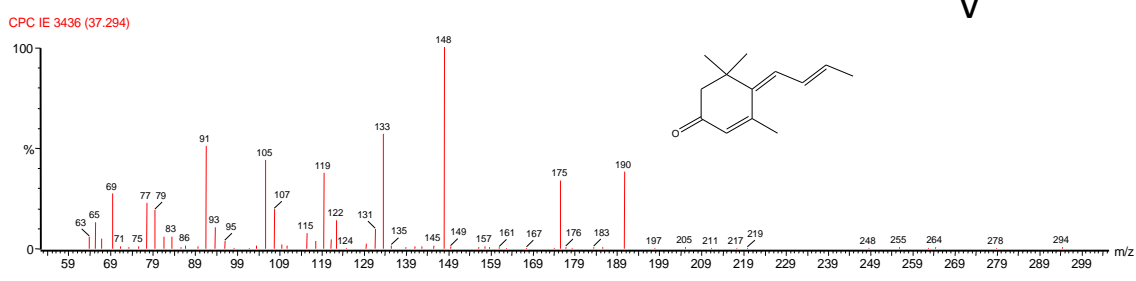
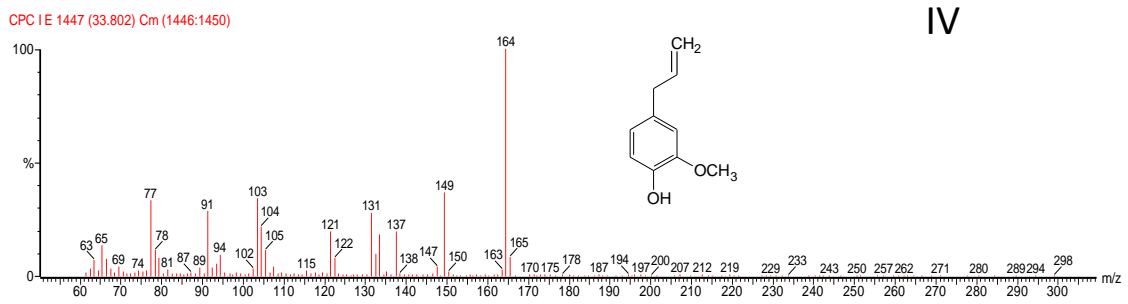
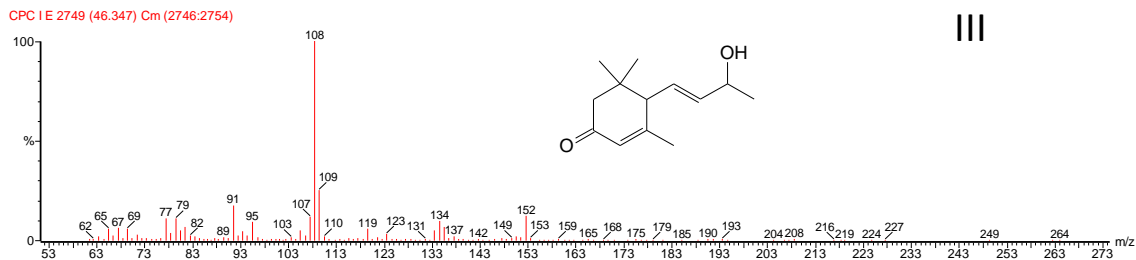
Pour le composé **A**, 0,2 mg de poudre blanche ont été obtenus. Le composé **B** a formé 0,8 mg d'une poudre blanche. Le composé **C** a donné 1,2 mg de poudre blanc-jaune, la pureté n'étant peut-être pas maximale. Enfin, le composé **D** a donné 0,5 mg de poudre jaunâtre, irrégulière avec des zones plus foncées, indiquant que le composé n'était pas très pur.

## 1.4 Analyse des aglycones

Pendant la dernière étape de purification par fractionnement HPLC, les quatre composés isolés A, B, C, et D ont été soumis d'une part à l'hydrolyse enzymatique et d'autre part, à l'hydrolyse acide. Le but était de détecter les fractions d'intérêt contenant des précurseurs d'arôme. Mais les deux techniques d'hydrolyse nous ont aussi donné des renseignements préliminaires sur la constitution des composés isolés. L'aglycone libéré par chaque composé a été analysé par GC-MS. Dans ce cas, l'utilisation d'un mélange de  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase et naringinase pour l'hydrolyse enzymatique et non de l'AR 2000, nous permet de dire que les aglycones libérés pourraient être liés à des sucres.

Le composé A libère avec les deux techniques (hydrolyse acide et enzymatique) de la vanilline (Figure 32). Les composés B et D, libèrent dans les deux cas, respectivement le 3,4,5-triméthoxyphénol et l'eugénol. On peut donc affirmer que ces trois aglycones seront retrouvés dans la structure de chacune des molécules A, B et D. Le composé C donne par hydrolyse enzymatique du 3-oxo- $\alpha$ -ionol, mais par hydrolyse acide nous obtenons de la mégastigmatriénone. Ce dernier est décrit dans la bibliographie comme le produit de déshydratation du 3-oxo- $\alpha$ -ionol (Aasen *et al.* 1972). Nous pensons donc retrouver la structure du 3-oxo- $\alpha$ -ionol dans une partie du squelette formant le composé C. Les spectres des aglycones libérés par les composés A, B, C, et D sont présentés dans la figure 32. Comme nous le verrons par la suite, la connaissance de la partie aglycone est une aide précieuse dans l'identification structurale des composés. L'enzymage des composés A, B, et C par de  $\beta$ -glucosidase d'amande douce ne permet pas la libération des aglycones respectifs alors que l'utilisation de  $\beta$ -xylosidase et de naringinase d'origine fongique, permet de libérer les aglycones dans la même proportion environ que l'utilisation d'enzyme pectolitique œnologique AR 2000.





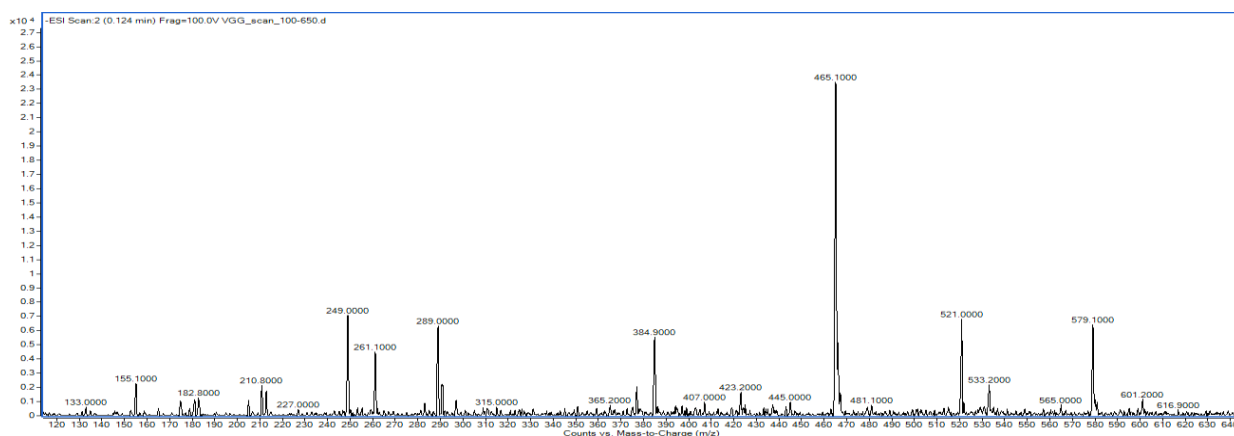
**Figure 32.** Spectres EI-MS des aglycones libérés par hydrolyse enzymatique respectivement du composé A (I), du composé B (II), du composé C (III), du composé D (IV) et du composé C par hydrolyse acide (V).

## 1.5 Identification du composé « A »

### 1.5.1. Résultats obtenus par spectrométrie de masse ESI-MS

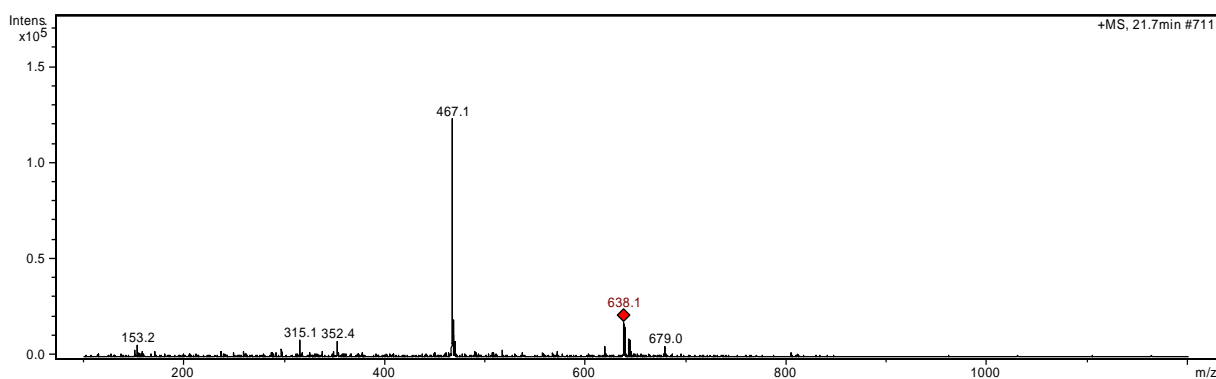
L'analyse HPLC-MS du composé **A** a été effectuée. Dans un premier temps, l'échantillon a été analysé en ionisation négative et positive. En ionisation négative (Figure 33), le composé **A** présente un pic majoritaire d'un ion ayant un rapport masse sur charge de  $m/z$  : 465 qui correspond à l'ion pseudo-moléculaire  $[M-H]^-$ . Ce résultat est confirmé par la présence de

l'ion  $m/z$  : 521. En effet, la différence de masse entre ces deux ions est de 46 u, correspondant à l'adduit formé avec l'acide formique  $[M+HCOOH]^-$ .



**Figure 33.** Spectre de masse du composé A, acquisition scan en mode négatif.

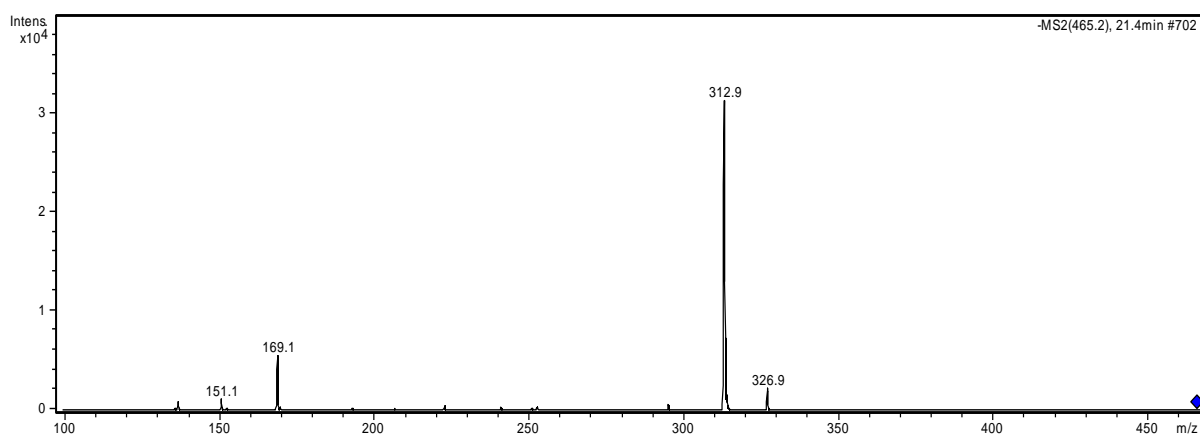
En ionisation positive (Figure 34), le spectre obtenu a permis d'observer l'ion  $[M+H]^+$   $m/z$  : 467, ce qui fournit une aide supplémentaire dans la détermination de la masse nominale du composé **A**. Cette dernière a donc été déterminée à 466 u. Grâce à l'hydrolyse enzymatique, il a été mis en évidence que le composé **A** est formé d'une partie aglycone, correspondant à la vanilline, et d'une partie osidique. L'ion  $m/z$  : 465 a été fragmenté durant l'analyse IT-MS<sup>2</sup>.



**Figure 34.** Spectre de masse du composé A, acquisition SCAN en mode positif.

Les principaux ions ainsi obtenus sont le  $m/z$  : 313, 169 et 151. La vanilline possède une masse moléculaire de 152 u. La formation de ce fragment donne lieu à l'ion  $[152-H]^-$   $m/z$  : 151. La présence d'un groupe gallate dans la molécule a été supposée par l'observation d'un fragment  $m/z$  : 169 (Figure 35). Comme vu précédemment dans l'étude bibliographique, les glycosides du bois de chêne sont souvent estérifiés par l'acide gallique (Nonaka *et al.* 1982 ;

Ishimaru *et al.* 1987). De plus, le principal précurseur d'arôme de la whiskylactone a été retrouvé dans le chêne dans cette conformation (Masson *et al.* 2001).



**Figure 35.** MS<sup>2</sup> en mode négatif de l'ion précurseur  $m/z$  : 465.

L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (TOF-HRMS) du composé **A** a fourni une masse exacte  $[M-H]^-$   $m/z$  465,1054. La formule brute générée est  $C_{21}H_{21}O_{12}$ . (Attendu  $m/z$  : 465,1038) avec une erreur de 3,3323 ppm

### 1.5.2. Résultats obtenus par RMN

La partie aglycone du composé **A**, c'est-à-dire la vanilline, est caractérisée par le proton aldéhydique à  $\delta$  9,83 (s, H-7), par trois protons du groupe méthoxy à  $\delta$  3,88 (s, 3 H) et par trois protons aromatiques. Les constantes de couplages nous permettent de dire qu'ils se trouvent dans le même système de spin. Le proton à  $\delta$  7,51 est un doublet de doublet avec des constantes de couplages  $J = 8,3$  Hz et  $J = 1,9$  Hz. Cela indique que ce proton est situé sur le cycle entre deux autres protons, un proche à  $\delta$  7,38 ppm (1H, d,  $J=8,3$  Hz, H-5) et l'autre plus éloigné à  $\delta$  7,41 ppm (1H, d,  $J=1,9$  Hz, H-2). Comme attendu, la carte COSY montre des tâches de corrélations du proton H-6 avec H-5 et H-2. Un autre signal aromatique est présent à 7,15 (s) intégrant pour deux protons. Ces deux protons ne sont pas corrélés par COSY avec les autres protons, il s'agit donc d'un autre groupement.

La présence d'un sucre est suggérée par les déplacements chimiques typiques d'un hexose, 5,21 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H), 3,60 (m, 2H), 3,53 (m, 1H), 3,96 (m, 1H), 4,67 (dd,  $J = 12,1, 1,9$  Hz,

1H) et 4,32 (dd,  $J = 12,1, 7,1$  Hz, 1H) ppm correspondant respectivement à H-1', H-2' et H-3' superposés, H-4', H-5', H-6'a et H-6'b. Par les constantes des couplages  $^1\text{H}$  du sucre et par la carte COSY, on peut individualiser les protons qui sont proches et donc attribuer leur position (Tableau 18).

Le signal du  $^1\text{H}$  anomérique présent est un doublet avec une constante de couplage de 7,1 Hz qui détermine un couplage diaxial ( $J^{\text{H}1'-\text{H}2'}$ ). La stéréochimie de la liaison glycosidique est donc confirmée à être en  $\beta$ . La ROESY met en évidence des corrélations entre H-2 et les protons du groupement méthoxy localisés sur le C-3 ainsi que le H-6 avec le proton aldéhydique. Les corrélations ROESY du proton anomérique du sucre H-1' ( $\delta$  5,21 ppm) avec H-2 et H-5 sont possibles par la libre rotation de la vanilline sur la liaison glycosidique.

La carte ROESY donne des indications spatiales très importantes pour l'identification du sucre. Le glucose dans sa conformation favorisée, en chaise, présente les protons (à part le proton anomérique) en position axiale. Cela conduit à une série de tâches entre H-2' et H-4'. Des interactions spatiales en position équatoriale sont improbables. Le sucre a donc été identifié comme le glucopyranose. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature en termes de déplacements chimiques et de constantes de couplage

Les déplacements chimiques des carbones ont été obtenus par analyse des HSQC et HMBC. Les attributions respectives sont reportées dans le tableau 18.

L'analyse du  $^{13}\text{C}$ , montre la présence de la fonction aldéhyde à  $\delta_{\text{C}}$  190,7 ppm. Nous retrouvons également un signal à  $\delta_{\text{C}}$  166,6 ppm correspondant au carbone d'une fonction carboxyle. Une série de 11 signaux, dont deux superpositions, correspondent à des carbones aromatiques ou à des alcènes qui sont situés à  $\delta_{\text{C}}$  152,7 (C-4) ; 150,1 (C-3); 146,6 (C-3'' et C-5''); 138,4 (C-4''); 125,2 (C-6); 121,4 (C-1''); 115,9 (C-5); 110,4 (C-2) et 109,9 (C-2'' et C-6'') ppm. Un groupe méthoxy est présent à  $\delta_{\text{C}}$  56,2 ppm. L'expérience HSQC a permis d'attribuer pour chaque  $^1\text{H}$  le carbone qui le porte. Le carbone anomérique est situé à  $\delta_{\text{C}}$  101,1 ppm. Le déplacement chimique du carbone anomérique est en accord avec une liaison glycosidique en  $\beta$ . Les autres carbones présentent les déplacements chimiques typiques d'un hexose à  $\delta$  74,9 (C-2), 77,7 (C-3), 71,8 (C-4), 75,2 (C-5), 64,7 (C-6) ppm.

La présence d'un sucre dans la molécule **A** a donc été prouvée. Après l'identification de l'aglycone vanilline et du sucre auquel elle est liée, il nous reste à identifier le deuxième groupement aromatique. Grâce à l'expérience HSQC, nous observons que le signal du

carbone aromatique à 109,9 ppm est corrélé avec les deux protons aromatiques (s) à  $\delta$  7,15 ppm (H-2'' et H-6'')(Figure 37).

**Tableau 18.** Données  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  RMN obtenues pour le composé A dans l'acétone- $d_6$ .

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	
Aglycone	1	-	152.7
	2	7.41 (d, $J = 1.9$ Hz,)	110.4
	3	-	150.1
	4	-	152.7
	5	7.38 (d, $J = 8.3$ Hz)	115.9
	6	7.51 (dd, $J = 8.3$ Hz, 1.9 Hz)	125.2
	7	9.83 (s)	190.7
	OCH <sub>3</sub>	3.88 (s)	56.2
Glucopyranoside	1'	5.21 (d, $J = 7.1$ Hz)	101.1
	2'	3.60 (m)	74.9
	3'	3.60 (m)	77.7
	4'	3.53 (m)	71.8
	5'	3.96 (m)	75.2
	6'	4.67 (dd, $J = 12.1, 1.9$ Hz) 4.32 ( $J = 12.1, 7.1$ Hz)	64.7
Gallate	1''	-	121.4
	2'', 6''	7.15 (s)	109.9
	3'', 5''	-	146.6
	4''	-	138.4
	C=O	-	166.7

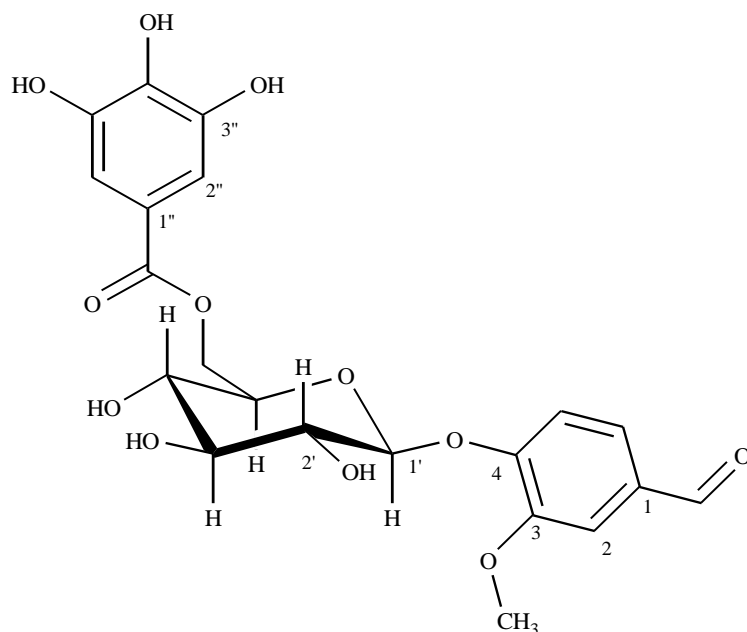


Figure 36. Structure du composé A, identifié comme la vanilline-(6'-O-galloyl)-O- $\beta$ -glucopyranoside (VGG).

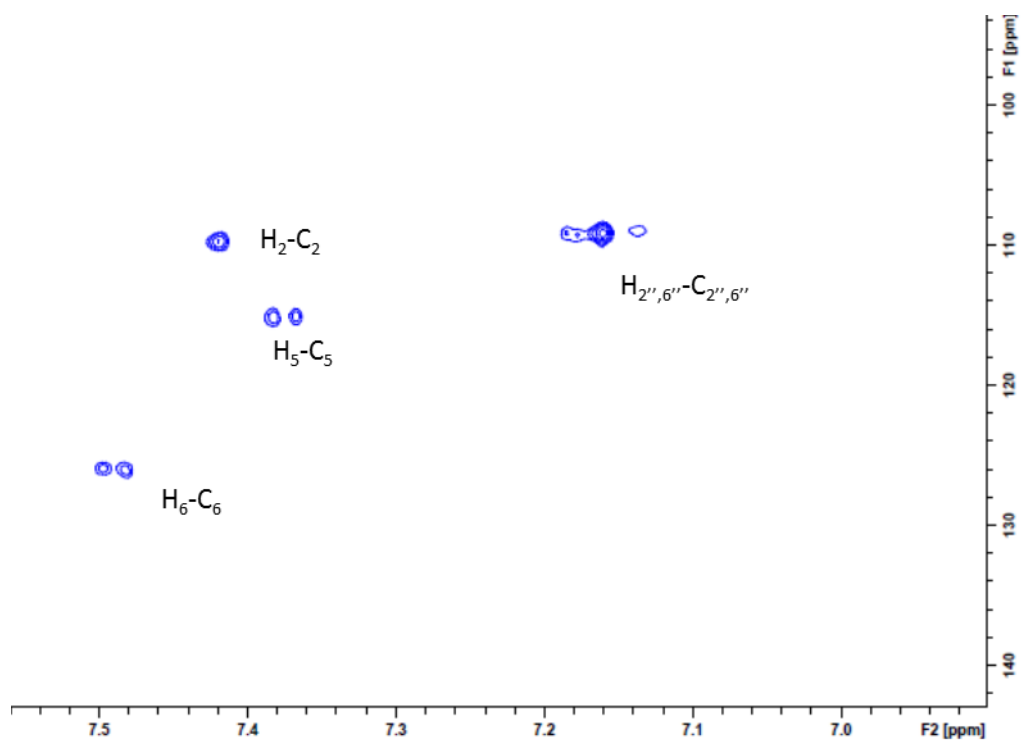
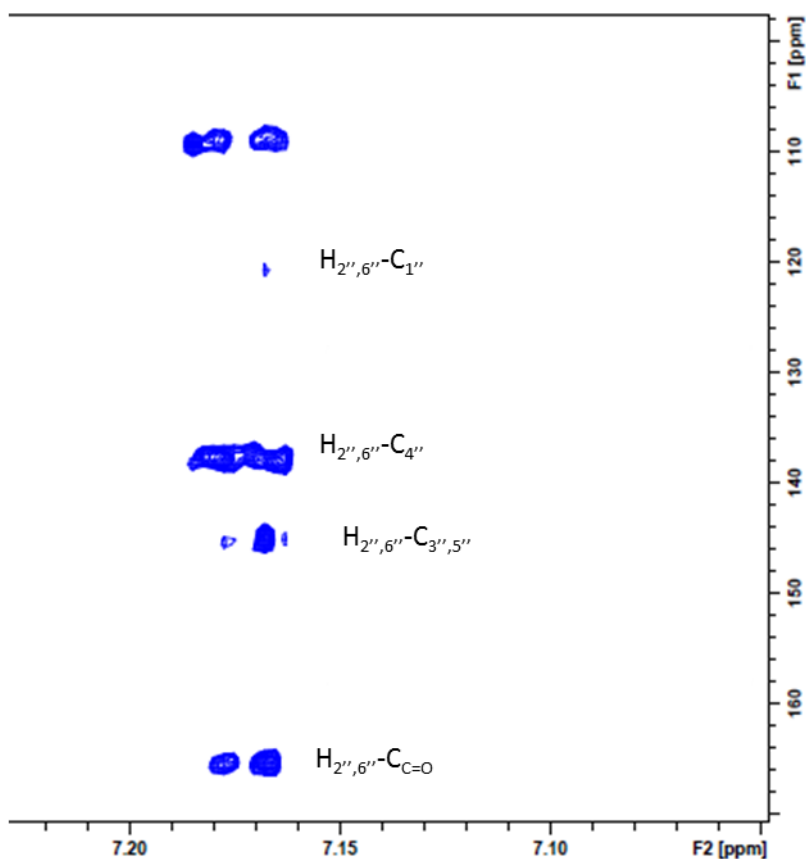


Figure 37. Détail de la carte HSQC du composé A

La carte HMBC (Figure 38) montre une tâche de corrélation entre ces protons aromatiques et le carbone carboxylique  $\delta$  166,7 mais également avec les carbones aromatiques à  $\delta$  146,6,  $\delta$  138,4 et  $\delta$  121,4 ppm. Ceci permet de déduire que ces signaux font partie d'un acide



benzoïque trisubstitué de manière symétrique. Les positions hydroxylés sont les 3'', 4'' et 5''. Nous en déduisons qu'il s'agit de l'acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque (acide gallique). Le groupement galloyl est lié par estérification à l'alcool primaire du C-6' du glucose.



**Figure 38.** Détail de la carte HMBC du composé A.

Sur la carte HMBC, la corrélation entre le H-2 et le groupement méthoxy indique la position de ce dernier. Sur la carte ROESY, la corrélation observée entre (H-1'— H-2) et (H-1'—H-6) indique la position du glucose. L'absence de corrélation entre le sucre et le groupement gallate ne nous permet pas de déterminer la position du galloyl avec certitude. Cependant, la comparaison des déplacements chimiques de notre composé (déblindage important de deux protons du méthylène du sucre) avec ceux de la vanilline glucoside indiquent que le groupement gallate se situe en position 6 du glucose. De plus, les déplacements chimiques de la partie glycone du précurseur (6''-O-galloyl)-glucoside de la whiskylactone (Masson *et al.* 2000) sont très similaires à ceux que nous avons obtenu, et renforcent le positionnement du groupement gallate dans le composé **A**.

Le composé **A** a donc été identifié comme la vaniline-(6'-O-galloyl)-O- $\beta$ -glucopyranoside (figure 36). Ce composé a été identifié pour la première fois dans la nature.

## 1.6 Identification du précurseur « B »

### 1.6.1. Résultats obtenus par spectrométrie de masse ESI-MS

Dans une première étude du composé B par spectrométrie de masse à basse résolution, les ions  $m/z$  : 499 en mode positif et  $m/z$  : 497 en mode négatif ont été attribués respectivement aux espèces  $[M+H]^+$  et  $[M-H]^-$  (Figures 39 et 40). Une masse nominale de 498 u a été déterminée pour le composé **B**. L'analyse de la masse exacte (TOF-MS) en ionisation positive du composé **B** a montré un pic très intense à  $m/z$  : 521,1274, qui pourrait correspondre à  $C_{22}H_{26}O_{13}Na$ , avec une erreur de 1,6071 ppm.

L'aglycone du composé **B** est le 3,4,5-triméthoxyphénol. Cet aglycone présente une masse moléculaire de 184 u. En effet, la fragmentation en mode négatif de l'ion  $m/z$  : 497 produit un ion fragment  $m/z$  : 183 qui correspond bien à l'aglycone 3,4,5-triméthoxyphénol. Un autre ion fragment est présent à  $m/z$  : 169 (Figure 41). Comme vu précédemment, cette espèce peut correspondre à un groupement gallate.

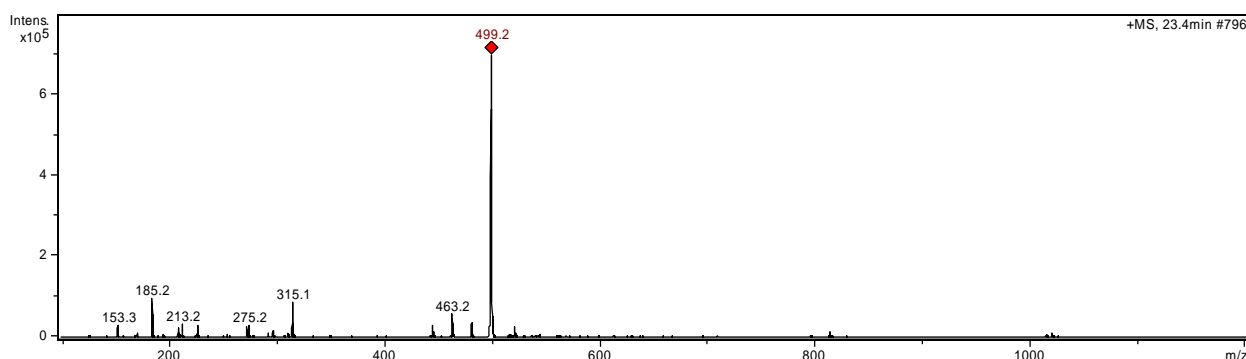


Figure 39. Spectre de masse du composé B, acquisition scan en mode positif.

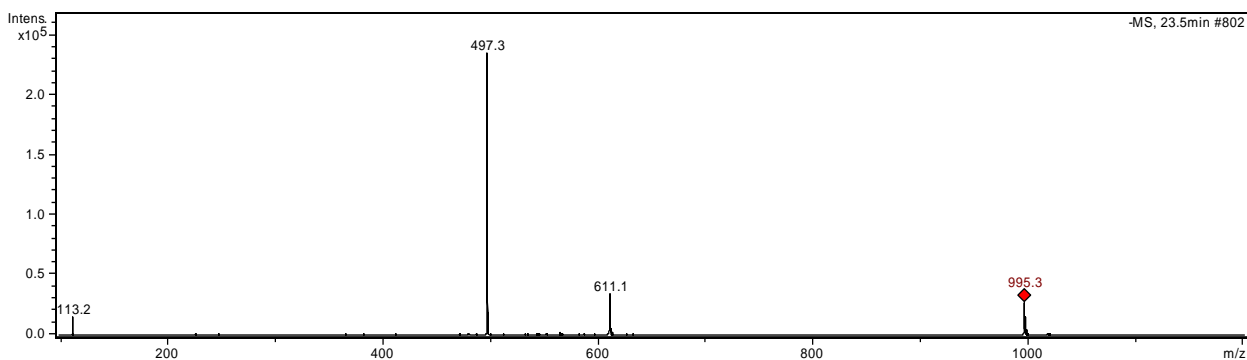


Figure 40. Spectre de masse du composé A, acquisition scan en mode négatif.

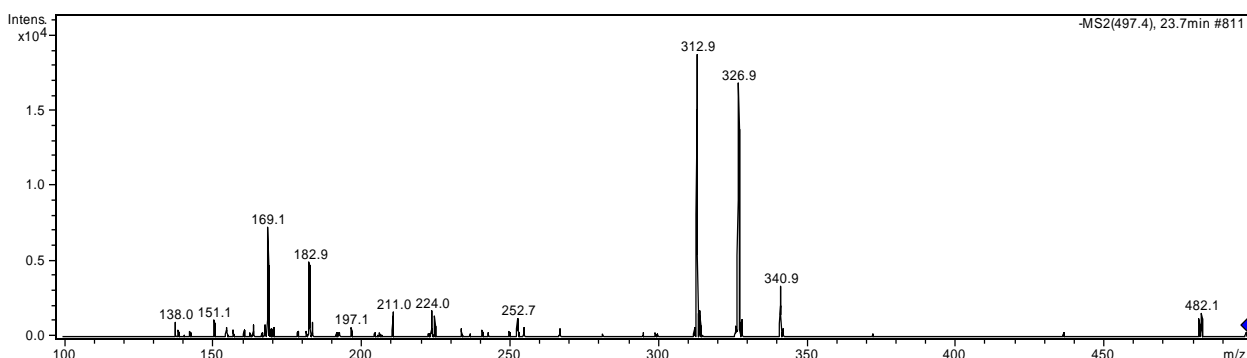


Figure 41. Spectre MS<sup>2</sup> en mode négatif de l'ion précurseur  $m/z$  : 497.

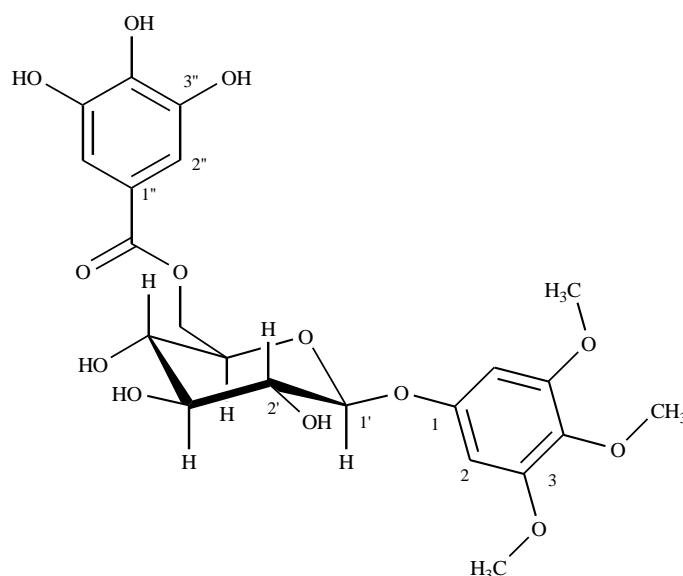
### 1.6.2. Résultats obtenus par RMN

Le spectre RMN du proton montre deux singulets dans la zone des protons aromatiques. Un signal à 6,39 ppm et un à 7,05 ppm, chaque singulet intégrant pour deux protons. Avec les informations obtenues par spectrométrie de masse, on peut déduire qu'un des deux signaux correspond aux protons aromatiques d'un groupement gallate et l'autre singulet à ceux de l'aglycone, le 3,4,5-triméthoxyphényle. Deux singulets à  $\delta$  3,66 et  $\delta$  3,67 ppm, intégrant respectivement pour 6 et pour 3 protons indiquent la présence de trois groupes méthoxylés dont deux équivalents (Tableau 19).

Le signal d'un proton anomérique a été observé à  $\delta$  4,83 (d,  $J=7,9$  Hz). Des signaux dans le même système de spin sont situés entre  $\delta$  3,45 (m), 3,50 (m, 1H), 3,43 (m, 1H), 3,76 (m, 1H), 4,62 (dd,  $J = 12,1, 2,1$  Hz, 1H) et  $\delta$  4,42 (dd,  $J = 12,1, 6,8$  Hz, 1H) ppm.

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  a mis en évidence la présence d'un signal à  $\delta$  168,8 ppm correspondant à une fonction carboxyle. Deux groupes méthoxyles distincts sont observables à  $\delta$  56,4 et  $\delta$  60,8 ppm. On observe également 8 signaux dans la zone des carbones aromatiques plus ou moins substitués. Parmi eux, 6 correspondent à des carbones quaternaires à  $\delta$  154,3, 153,8, 146,3, 139,7, 134,2 et  $\delta$  121,1 ppm. Dans l'aglycone, la présence des groupements méthoxy sur les carbones 3, 4, 5 et du groupement hydroxy au carbone 1 permet d'expliquer le fort déblindage à 96,1 ppm des carbones aromatiques C-2 et C-6.

Dans la zone comprise entre 103 et 64,1 ppm, 6 carbones sont présents, correspondant aux carbones d'un sucre. Le carbone anomérique est situé à  $\delta$  103,0 ppm. Comme pour le composé **A**, le déplacement chimique du carbone anomérique et la constante de couplage du proton indiquent une liaison glycosidique en  $\beta$ . Comme déjà vu dans le cas du composé **A**, l'observation des constantes de couplage des protons H1'', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6a''a et H-6b'', et des cartes COSY, HSQC et ROESY nous permet d'identifier un groupement  $\beta$ -glucopyranoside qui est lié à l'aglycone, le 3,4,5-triméthoxyphénol (Figure 42).



**Figure 42.** Structure du composé B, le 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'-O-galloyl)-O- $\beta$ -glucopyranoside (TMPGG).

**Tableau 19.** Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé B obtenu en méthanol- $d_4$ .

		$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
Aglycone	1	-	153,8
	2, 6	6,39 (s, 2H)	96,1
	3, 5	-	154,3
	4	-	134,2
	OCH <sub>3</sub>	3,66 (s, 9H)	56,4
	OCH <sub>3</sub>	3,67 (s)	60,8
Glucopyranoside	1'	4,83 (d, J = 7.9 Hz, 1H)	103,0
	2'	3,45 (m, 1H)	74,6
	3'	3,50 (m, 1H)	77,4
	4'	3,43 (m, 1H)	71,4
	5'	3,76 (m, 1H)	75,4
	6'	4,62 (dd, J = 12,1, 2,1 Hz, 1H) 4,42 (dd, J = 12,1, 6,8 Hz, 1H)	64,1
Gallate	1''	-	121,1
	2'', 6''	7,05 (s, 2H)	110,1
	3'', 5''	-	146,3
	4''	-	139,7
	C=O	-	168,8

Grâce à l'expérience HSQC, nous observons que les deux protons à 7,05 ppm (s) (à H-2'' et H-6'') sont portés par les deux carbones superposés à 110,1 ppm. Les mêmes protons donnent une tâche de corrélations HMBC avec les carbones aromatiques à  $\delta$  146,3 ;  $\delta$  139,7 et  $\delta$  121,1 ppm et le carbone carboxylique  $\delta$  168,8. Comme pour le composé A, on en déduit que ce deuxième groupement aromatique correspond à l'acide gallique.

Le groupement galloyl est lié par estérification à l'alcool primaire du C-6' du glucose. La liaison a été établie par une tâche de corrélation dans la carte HMBC, entre les deux protons

H-6a' et H-6b' du sucre avec le carbone carboxylique du gallate (figure 43). Une confirmation ultérieure vient du déblindage de ces deux protons.

Ces résultats sont en accord avec les observations faites en spectrométrie de masse. La structure proposée est représentée dans la figure 42. Il s'agit du 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'-O-galloyl)-O-β-glucopyranoside. Pour faciliter la lecture dans la suite du manuscrit le nom de ce composé sera abrégé en « TMPGG ».

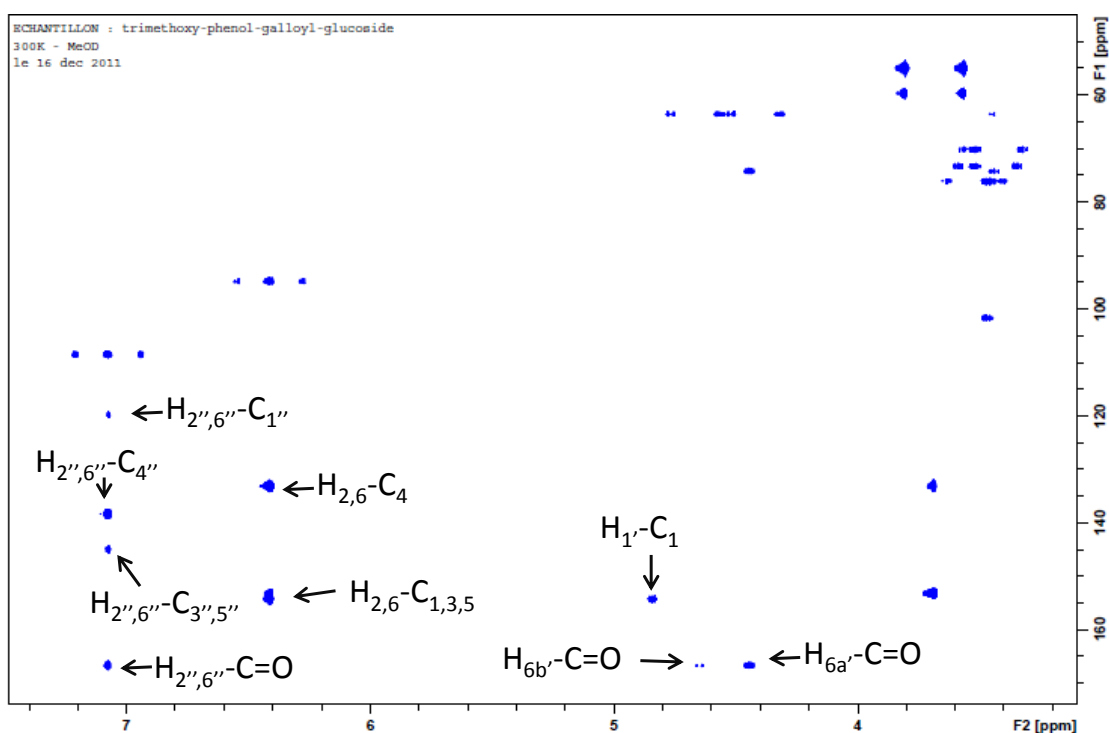


Figure 43. Carte HMBC du 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'-O-galloyl)-O-β-glucopyranoside

Ishimaru *et al.* (1987) avaient isolé ce composé à partir du chêne asiatique, mais aucune donnée spectroscopique n'avait été fournie car les auteurs faisaient référence aux données pour ce composé fournies dans l'article écrit par Nonaka *et al.* (1982). Il en est de même dans l'article de Yun *et al.* (2000). Mais Nonaka *et al.* (1982) n'avaient pas isolé le 3,4,5-triméthoxyphényl-(6'-O-galloyl)-O-β-glucopyranoside mais le 2,4,6-triméthoxyphényl-(6'-O-galloyl)-O-β-glucopyranoside. Verrotta *et al.* (2001) ont donc été les premiers à identifier ce composé, mais dans d'autres plantes, du genre *Tristaniopsis*. L'identification présentée ici

permet de certifier la présence de cette molécule dans le chêne européen pour la première fois.

Concernant les propriétés pharmacologiques du TMPGG, il semblerait posséder une action d'inhibition de la peroxydation des lipides (Yun *et al.* 2000). Une activité antiplasmodique a été observée dans les tests in vitro (Verrotta *et al.* 2001). Ces auteurs n'ont pas retrouvé de toxicité importante pour le TMPGG.

## 1.7 Identification du précurseur « C »

### 1.7.1. Résultats obtenus par spectrométrie de masse ESI-MS

Dans le spectre de masse ESI-IT-MS du composé **C** en mode négatif, nous observons l'ion pseudomoléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z$  : 521. Cette attribution est corroborée par la présence des adduits  $[M+TFA-H]^-$  et  $[M+M-H]^-$ . En mode positif, le résultat est confirmé par l'ion  $m/z$  : 523. La masse nominale du composé **C** a été établie à 522 u.

L'analyse  $MS^2$  en mode négatif de l'ion parent  $m/z$  : 521 révèle la présence de trois ions fils  $m/z$  : 211 ; 271 et 331 très intenses et d'autres ions avec une intensité plus faible, mais importants dans l'étude structurale, comme le  $m/z$  : 169 (Figures 44, 45 et 46).

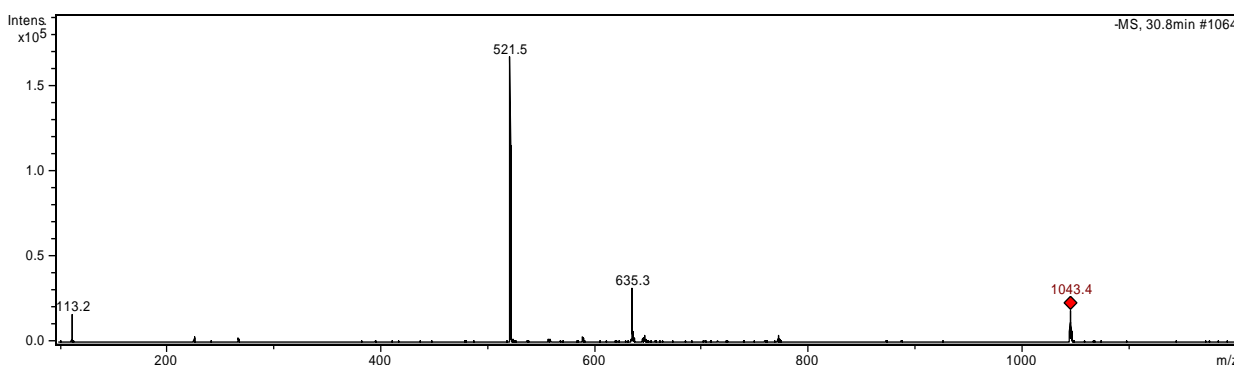
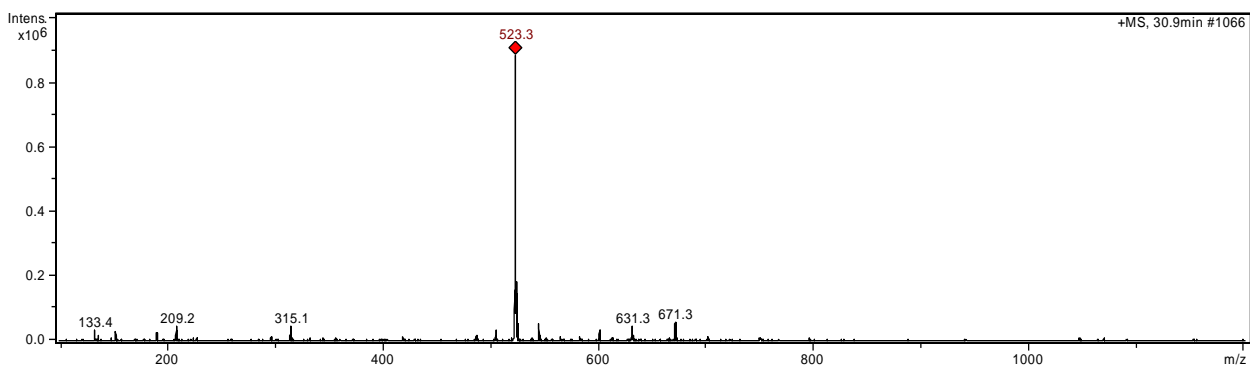
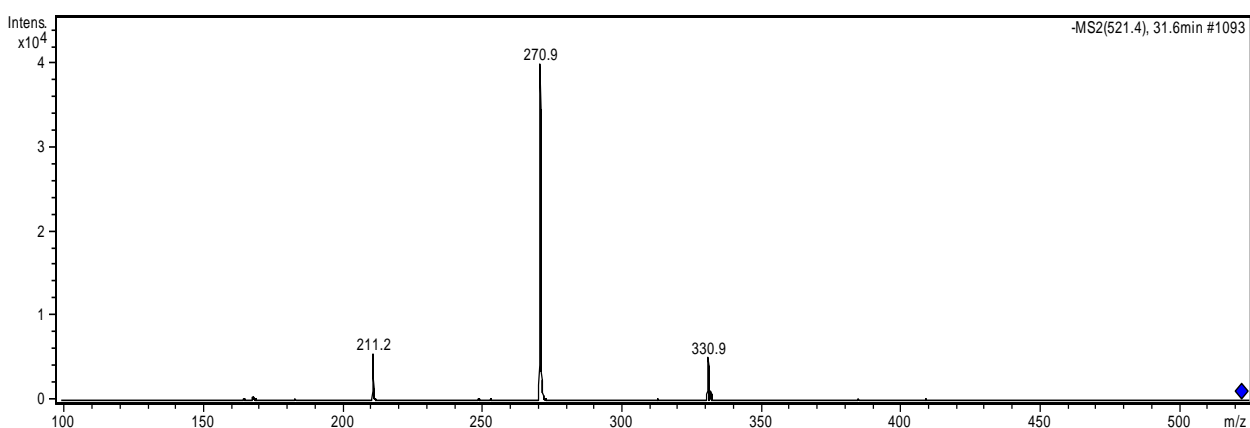


Figure 44. Spectre de masse du composé C, acquisition SCAN en mode négatif.



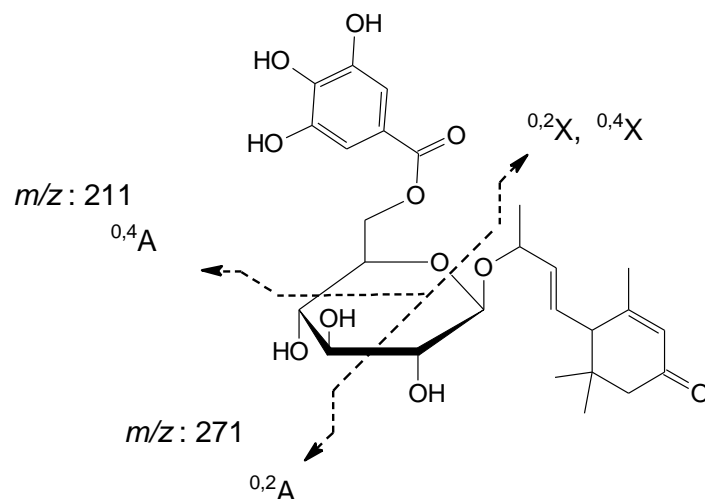
**Figure 45.** Spectre de masse du composé C, acquisition scan en mode positif.



**Figure 46.** MS<sup>2</sup> en mode négatif de l'ion précurseur  $m/z$  : 521.

L'ion  $m/z$  : 331 résulte de la perte de 190 u. Ceci est expliqué par le clivage de l'aglycone, le 3-oxo- $\alpha$ -ionol. L'ion  $m/z$  : 169 suggère encore une fois la présence d'un gallate. La fragmentation de l'ion  $m/z$  : 331 moins le résidu gallate donne une perte de 162 u correspondant à un hexose. En soutien de cette argumentation, l'ion fragment est observé à  $m/z$  : 271, qui correspondrait à la rupture interne <sup>0,2</sup>A de l'hexose (Figure 47). L'ion  $m/z$  : 211 comporte par rapport au fragment  $m/z$  : 271 une perte ultérieure de 60 u, qui raisonnablement comporterait le clivage d'un autre résidu C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Il s'agirait donc de la rupture interne au sucre <sup>0,4</sup>A. Le gallate se trouverait sur la position 6.





**Figure 47.** Schéma de fragmentation interne au sucre

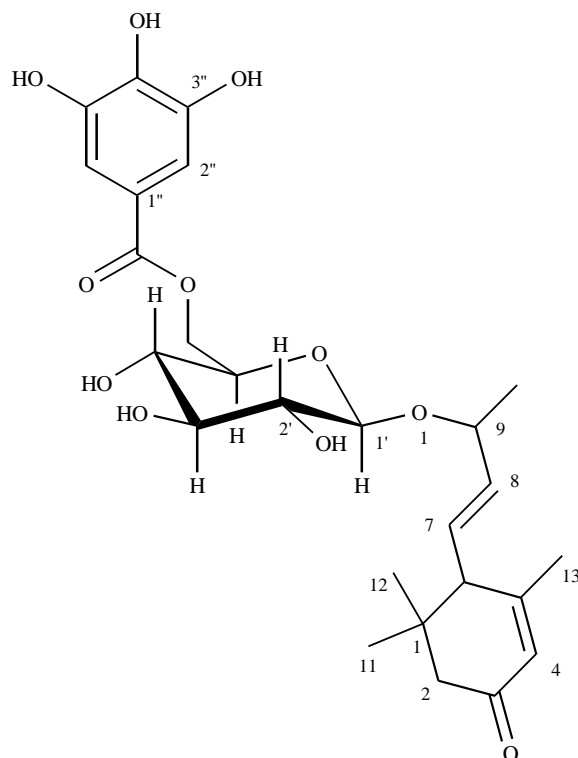
La mesure de la masse exacte procure un ion  $m/z$  : 545,2020 ce qui amène à la détermination de la formule brute  $C_{26}H_{34}O_{11}Na$ , avec une erreur de 4,8908 ppm (calculé  $m/z$  : 545,1993). Dans la bibliographie, le précurseur gallate du 3-oxo- $\alpha$ -ionol glucoside, comme les indices spectrométriques le suggèrent ici, a déjà été décrit par Matsunami *et al.* (2009). Le composé, appelé macarangioside E (figure 48), isolé par Matsunami, présente une masse exacte  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  : 545,1990. La masse exacte du composé **C** est très proche. L'hypothèse peut être confirmée par la détermination de la structure du composé par analyse RMN.

### 1.7.2. Résultats obtenus par RMN

Le spectre RMN  $^1H$  montre la présence d'un singulet aromatique à 7,10 (2H) (tableau 20). Deux protons doublet de doublet oléfiniques sont présents à 5,54 et 5,69 ppm. Les constantes de couplages de ces deux protons montrent qu'ils sont dans le même système de spin. L'orientation de la double liaison en *E* est indiquée par le  $J=15,4$  Hz. Un autre proton oléfinique singulet se trouve à 5,79 ppm. L'absence de dédoublement du signal peut indiquer que ce proton se trouve lié à un carbone positionné entre deux carbones quaternaires. Les trois singulets à  $\delta$  1,82 ; 0,87 et 0,86 ppm intègrent chacun pour trois

protons, cela indique qu'ils correspondent à des groupements méthyl. Ces protons se trouvent donc en  $^2J$  d'un carbone quaternaire. Un autre groupement méthyl non singulet est présent à 1,28 (d,  $J=6,6$  Hz, 3H). Les signaux compris entre  $\delta$  4,58 et 3,21 ppm comme déjà vu précédemment sont associés à la partie sucre.

L'HSQC a permis de lier ces protons avec les carbones qui les portent. Les attributions sont reportées dans le tableau 20. En sachant que par hydrolyse enzymatique le composé **C** libère de la 3-oxo- $\alpha$ -ionol, les signaux correspondant ont été recherchés dans un premier temps. La partie restante de la molécule a ensuite été identifiée. L'hypothèse émise après l'analyse MS, d'avoir isolé le précurseur galloyl glucoside du 3-oxo- $\alpha$ -ionol, a été vérifiée en comparant les spectres  $^1H$  et  $^{13}C$  obtenus avec ceux reportés par Matsunami *et al.* (2009). En effet les spectres  $^1H$  et  $^{13}C$  RMN sont quasi identiques.



**Figure 48.** Structure du composé **C** identifié comme le (6*R*,9*R*)-3-oxo- $\alpha$ -ionol-9-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -glucopyranoside (macarangioside E).

**Tableau 20.** Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé C obtenu en méthanol- $d_4$ .

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	
Aglycone	1	-	36,5
	2	2,32 (d, J = 16,6 Hz, 1H)	48,1
		1,94 (d, J = 16,6 Hz, 1H)	
	3	-	201,7
	4	5,79 (s, 1H)	125,7
	5	-	165,5
	6	2,40 (d, J = 9,0 Hz, 1H)	56,0
	7	5,54 (dd, J = 15,4, 9,0 Hz, 1H)	129,3
	8	5,69 (dd, J = 15,4, 7,0 Hz, 1H)	137,6
	9	4,29 (m, 1H)	77,8
	10	1,28 (d, J = 6,6 Hz, 3H)	21,2
	11	0,87 (s, 3H)	27,2
	12	0,86 (s, 3H)	27,4
13	1,82 (brs, 3H)	23,4	
Glucopyranoside	1'	4,37 (d, J = 7,9 Hz, 1H)	103,0
	2'	3,21 (dd, J = 8,8, 7,9 Hz, 1H)	74,9
	3'	3,36 (m, 1H)	77,7
	4'	3,34 (m, 1H)	71,8
	5'	3,51 (m, 1H)	75,2
	6'	<i>a</i> 4,58 (dd, J = 11,8, 2,1 Hz, 1H) <i>b</i> 4,29 (dd, J = 11,8, 7,0 Hz, 1H)	64,7
Gallate	1''	-	121,2
	2'', 6''	7,10 (s, 2H)	109,9
	3'', 5''	-	146,6
	4''	-	139,6
	C=O	-	168,2

Le carbone de la fonction cétone a été repéré à  $\delta$  201,7 ppm. Ce carbone est corrélé dans la carte HMBC avec les deux protons  $\delta$  2,32 et 1,94 ppm (figure 49). Les deux protons, portés

par le carbone  $\delta$  48,1 ppm, sont aussi corrélés avec un autre carbone quaternaire  $\delta$  36,5 ppm, qui à son tour est corrélé avec les protons méthyles à  $\delta$  0,87 et 0,86 ppm. Le carbone à  $\delta$  56,0 ppm est corrélé avec plusieurs protons, indiquant qu'il occupe une position clé dans la molécule. Tout d'abord, il est lié dans la carte HMBC avec les protons méthyles  $\delta$  0,87 et 0,86 ppm. Une tâche de corrélation a également été observée avec le proton  $\delta$  2,32 ppm et avec le proton vinylique  $\delta$  5,69 ppm. Ce dernier fait partie d'une chaîne alcénique  $\alpha$  substituée, observable par les déplacements chimiques et les corrélations COSY des protons  $\delta$  5,54 ; 5,69 ; 4,29 ppm et le groupement méthyl terminal  $\delta$  1,28 ppm. Le proton  $\delta$  2,40 ppm, positionné sur le carbone  $\delta$  56,0 ppm, permet de voir une corrélation HMBC avec le proton du singulet à  $\delta$  5,79 ppm. Ce proton est également corrélé sur la carte COSY avec les 3 protons méthyles à  $\delta$  1,82 ppm à leur tour corrélés  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  avec le proton à  $\delta$  2,40 ppm. En réassemblant tous ces éléments, le squelette d'un mégastigmane apparaît clairement, la structure de la partie aglycone est bien le 3-oxo- $\alpha$ -ionol.

La connectivité des protons entre  $\delta$  4,58 et 3,21 ppm a été vérifiée par COSY. Les constantes de couplages élevées indiquent la position di-axiale de ces protons, ce qui signifie que le sucre est un glucopyranose. Le proton anomérique  $\delta$  4,37 est aussi en position axiale ( $J=7,9$  Hz). La liaison glycosidique est donc en  $\beta$ .

Les carbones  $\delta$  168,2 ppm indiquent la présence d'un acide, identifié par les expériences COSY, HSQC, et HMBC comme l'acide gallique. Les détails de l'identification de cette partie du composé **C** ont déjà été développés précédemment.

Le composé (6*R*,9*R*)-3-oxo- $\alpha$ -ionol-9-*O*-(6'-*O*-galloyl)- $\beta$ -glucopyranoside (Figure 48) dans la littérature est retrouvé sous le nom de macarangioside E du nom de la plante, *Macaranga tanarius*, d'où il a été isolé pour la première fois dans les feuilles (Matsunami *et al.* 2009). Ce composé possède une activité anti-oxydante. Matsunami *et al.* (2009) ont mesuré une valeur de DPPH inférieure au Trolox de 0,55 fois. Ce composé n'a pas démontré de cytotoxicité significative. Il est ici pour la première fois isolé du chêne.

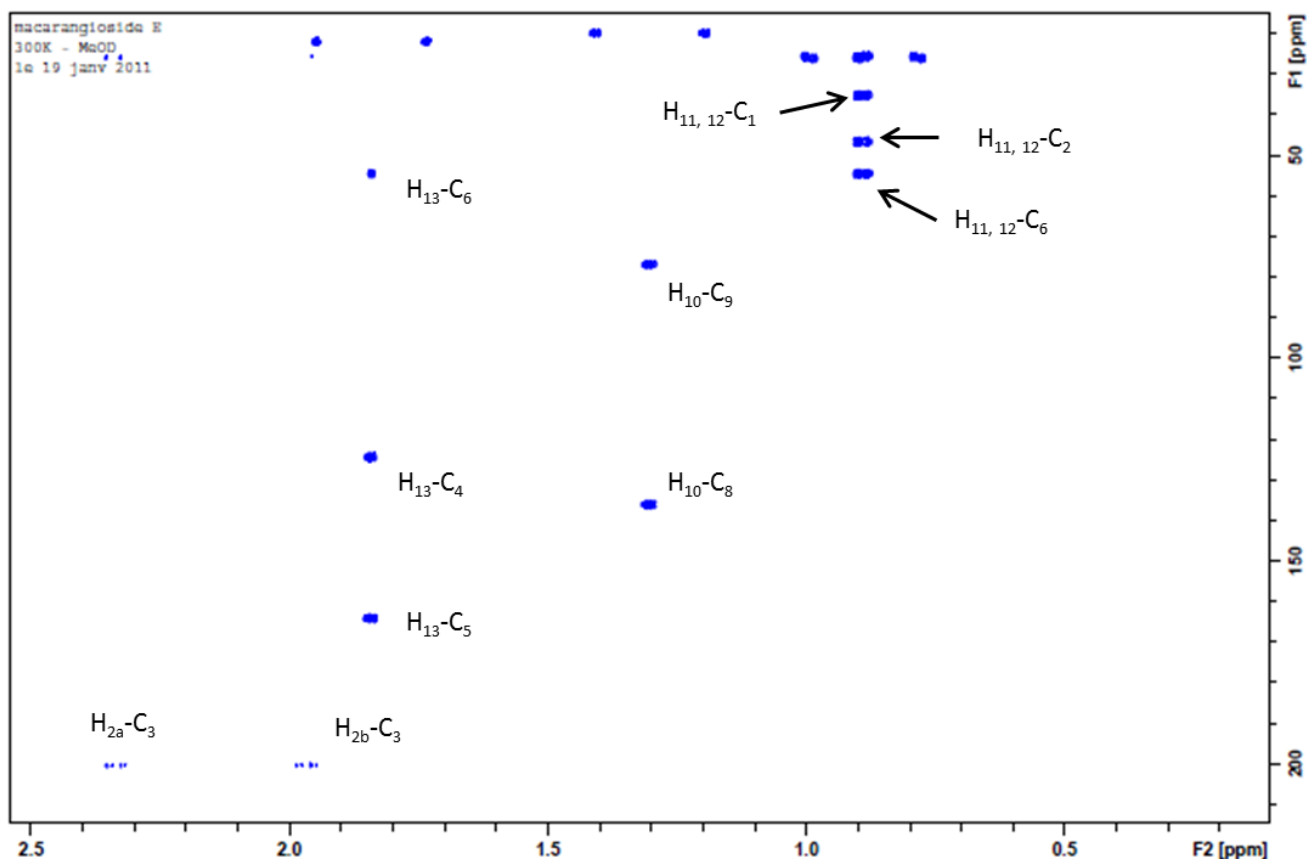
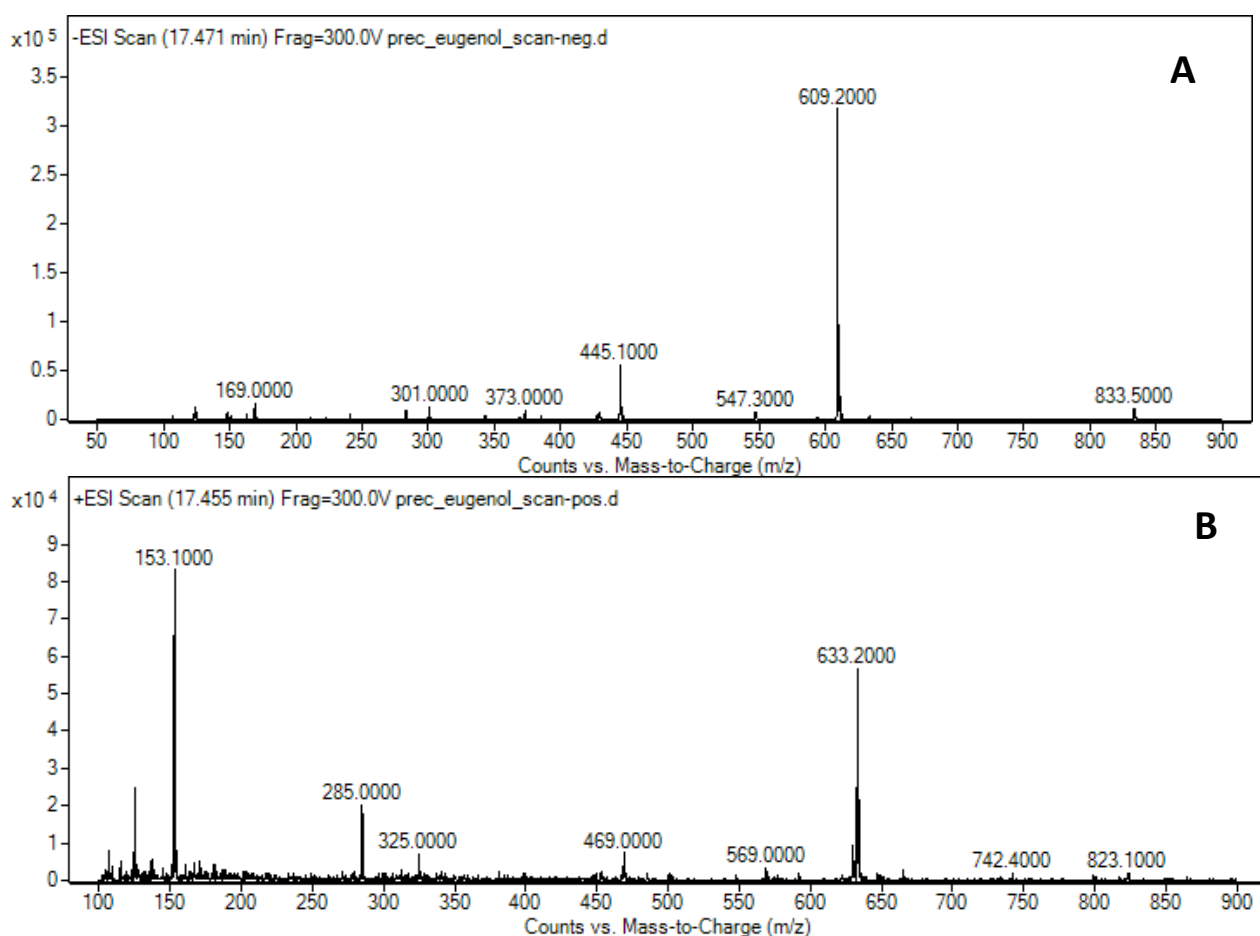


Figure 49. Détail de la carte HMBC du composé C.

## 1.8 Tentative d'identification du précurseur « D »

L'analyse MS en mode négatif révèle la présence d'un ion principal  $m/z$  : 609. Des ions assimilables à des fragments sont observés à  $m/z$  : 547 ; 445 ; 373 ; 301 et 169. L'identification de l'ion  $m/z$  : 609 comme  $[M-H]^-$  est soutenue par le spectre acquis en mode positif où l'adduit  $[M+Na]^+$   $m/z$  : 633 est présent. La masse nominale du composé **D** a donc été établie à 610 u (Figure 50).

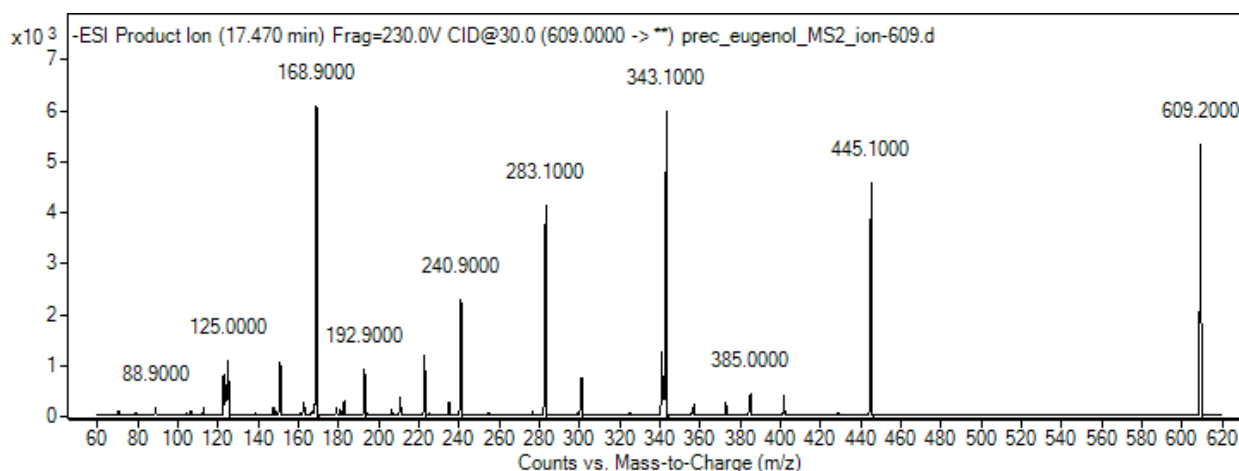
On a vu que l'acquisition en mode négatif présente des fragments, parmi lesquels l'ion  $m/z$  : 169, pourrait indiquer un groupement gallate dans la molécule. Par  $MS^2$  on a pu déterminer que cet ion fragment appartient au parent  $m/z$  : 609.



**Figure 50.** Acquisition MS-SCAN du composé D, mode négatif (A) et positif (B).

Le spectre MS<sup>2</sup> obtenu avec une faible énergie de collision produit peu de fragments. L'ion pseudo-moléculaire reste très abondant mais on observe également le fragment  $m/z$  : 445 qui correspond à une perte de 164 u, attribuée au clivage de l'eugénol (Figure 51). En augmentant l'énergie de collision à 30 V, on voit apparaître des signaux, la plupart inférieurs à  $m/z$  : 445. Les rapports des intensités des différents ions suggèrent que l'ion  $m/z$  : 445 en se fragmentant donne lieu aux ions  $m/z$  : 343 ; 301 ; 283 et 169. Le spectre MS<sup>2</sup> réalisé en prenant comme ion précurseur le  $m/z$  : 445 confirme ce résultat. Le fragment  $m/z$  : 283 correspond à la perte de 162 u par le  $m/z$  : 445, pouvant correspondre à la rupture d'un hexose. Ces fragments correspondent aussi à la perte d'une molécule d'eau par le fragment  $m/z$  : 301. Ce fragment, le  $m/z$  : 301, diffère du  $m/z$  : 445 de 144 u. Cette valeur pourrait bien correspondre à un hexose ayant perdu 2 molécules d'eau. Ce sucre serait donc

disubstitué. Entre l'ion du gallate et le  $m/z$  : 301, il y a une perte de 132 u, pouvant être expliquée par l'élimination d'un pentose.



**Figure 51.** Acquisition MS<sup>2</sup> en mode négatif du composé D, ion précurseur sélectionné  $m/z$  : 609.

D'après ces considérations, nous émettons l'hypothèse que le composé D est le précurseur de l'eugénol. Contrairement aux autres précurseurs ici identifiés, il s'agirait d'un dérivé gallate de l'eugénol dissaccharide, et nous supposons que le sucre attaché à l'eugénol est un hexose, lequel est lié à un pentose lui-même estérifié par de l'acide gallique.

Cela ne reste qu'une supposition car l'analyse RMN du composé D n'a pas pu être effectuée à cause des impuretés encore présentes.

## 1.9 Discussions

La recherche du précurseur de la vanilline dans le bois de chêne nous a conduit, sur la base des études précédentes (Bloem 2005), à la synthèse de la vanilline- $\beta$ -D-glucopyranoside, de la vanilline- $\beta$ -D-xylopyranoside et de la coniféraldéhyde- $\beta$ -D-glucopyranoside. Mais l'analyse par UHPLC-FT/MS des extraits de bois de chêne français n'a pas permis d'identifier les composés synthétisés, ni dans le chêne français, ni dans les vins, ni dans les eaux-de-vie. Cela n'exclut pas l'existence de précurseurs monoglycosides non-acylés. Mais leur teneur est certainement très faible, en tout cas insuffisant pour expliquer l'augmentation en aglycones

obtenus lors de l'hydrolyse enzymatique des extraits de bois de chêne (Bloem 2005 ; Gagné *et al.* 2011).

Le principal précurseur de la vanilline a été identifié dans ce travail comme la vanilline-(6''-O-galloyl)- $\beta$ -O-glucopyranoside. Ce composé n'avait jamais été identifié auparavant.

La technique de purification employée, la CPC, a été cruciale pour parvenir à l'identification de ce composé. L'approche utilisée dans le choix du système des solvants à utiliser, par la mesure du  $K_{ca}$  est innovatrice. Elle permet de sélectionner le système biphasique adapté, même si les composés d'intérêt sont inconnus. Cette approche pourrait donc être élargie et développée pour d'autres activités biologiques et ouvre donc des perspectives intéressantes. La même procédure de purification a également permis d'isoler le 3-oxo- $\alpha$ -ionol-(6''-O-galloyl)- $\beta$ -O-glucopyranoside, appelé macarangioside E, qui n'avait jamais été identifié dans les bois de chêne, ainsi que le 3,4,5-triméthoxyphénol-(6''-O-galloyl)- $\beta$ -O-glucopyranoside qui avait déjà été identifié dans des chênes asiatiques (Ishimaru *et al.* 1987), mais pas encore dans des chênes européen ou américain. Comme pour la whiskylactone, les principaux précurseurs glycosidiques des composés volatiles identifiés ici dans le bois de chêne sont des dérivés glucosidiques estérifiés par l'acide gallique. La présence d'un gallate est très importante pour la libération efficace de l'aglycone opérée par les enzymes de type glycosidase des levures ou des bactéries. Nous avons démontré que la  $\beta$ -glucosidase commerciale issue de l'amande douce a une très faible activité sur ce type de composé. Au contraire, la  $\beta$ -xylosidase d'*Aspergillus niger*, la naringinase et la préparation commerciale AR 2000 libèrent de fortes quantités des aglycones. Selon le fournisseur des deux premiers (Sigma aldrich) et selon Sarry & Gunata (2004) pour AR 2000, des activités annexes seraient également présentes, ce qui nous fait penser que l'hydrolyse des galloylglucoside était due à d'autres enzymes présentes dans ces préparations. Aucune activité estérase n'est à notre connaissance présente dans les préparations enzymatiques utilisées. Cela reste inconnu pour nous en ce qui concerne l'AR 2000. Ces derniers points sur les activités enzymatiques, nous permettent de comprendre les observations faites par Bloem (2005) et Gagné *et al.* (2011). Ces auteurs avaient mis en évidence que parmi les activités glycosidases présentes chez *O. oeni*, l' $\alpha$ -arabinofuranosidase était la plus importante, suivie par la  $\beta$ -xylosidase, et enfin très faiblement la  $\beta$ -glucosidase. Nous avançons donc l'hypothèse que les enzymes  $\alpha$ -arabinosidase et  $\beta$ -xylosidase peuvent cliver la liaison  $\beta$ -O-glucoside du dérivé 6''-O-gallate



en une seule étape. L'absence de ces enzymes chez *S. cerevisiae*, ou leur inactivité, dans les conditions œnologiques et, au contraire, leur présence chez *O. oeni* pourraient expliquer la forte augmentation de la teneur en certains composés volatils du bois pendant la FML et non pendant la FA (Gómez García-Carpintero *et al.* 2012).

La tentative d'identification d'un autre précurseur a été faite. Il pourrait correspondre à priori à celui de l'eugénol. Mais le composé n'est pas encore assez purifié pour pouvoir effectuer les analyses RMN nécessaires. L'approche expérimentale que nous avons employée pourrait aisément servir à l'avenir à la purification d'autres précurseurs d'arômes glycosylés du bois de chêne et en particulier pour les autres aldéhydes phénoliques. Ainsi notre connaissance de la composition du bois de chêne pourrait en être grandement renforcé.

## **2. Quantification des précurseurs identifiés dans le bois, vin et eaux-de-vie et des aglycones correspondants et impact œnologique.**

### **2.1 Dosage des VGG, TMPGG et macarangioside E dans le bois de chêne**

Le dosage des composés glycoconjugués est une tâche assez complexe du fait de la présence de la partie osidique. La difficulté est d'autant plus grande que la quantité de composé est faible, comme dans le vin où elle serait de l'ordre de la centaine de  $\mu\text{g/L}$  (Bloem, 2005).

Une des approches classiques consiste à dériver les fonctions hydroxyles du sucre de façon à rendre la molécule apolaire, volatile, et donc analysable par chromatographie en phase gazeuse. Cette approche reste assez laborieuse et compliquée du fait de la richesse des extraits de bois, produisant de chromatogrammes difficiles à interpréter.

L'analyse par chromatographie HPLC couplée à la spectrométrie de masse a donc finalement été choisie, car elle est adaptée à l'analyse de molécules non volatiles. De plus, la séparation chromatographique permet d'analyser les composés en réduisant, voir en éliminant l'étape de pré-purification. La détection a été effectuée par la méthode Multiple Reaction Monitoring (MRM) à l'aide d'un analyseur triple quadripôles.

#### ***2.1.1. Développement d'une méthode de dosage des précurseurs galloylglucosidiques par HPLC-MS***

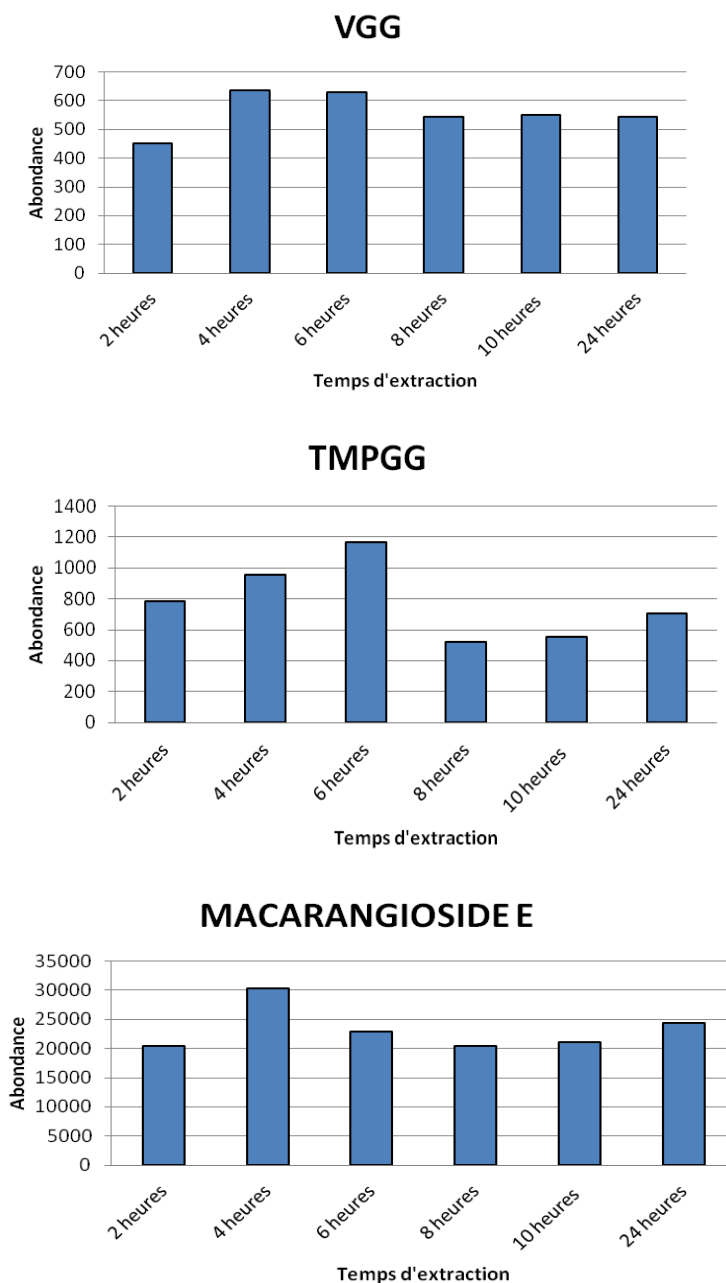
Pour effectuer le dosage à partir d'une matrice solide comme le bois, la totalité des précurseurs extractibles doit être récupérée.

Dans le développement de la méthode d'analyse, plusieurs paramètres ont donc été considérés, à commencer par le solvant d'extraction (tableau 21). L'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le mélange éthanol/eau 50 %, acétone/eau 70 %, ont été testés avec des copeaux de bois de chêne à 10 g/L et sous agitation (table d'agitation : 250 rpm). Le mélange acétone/eau (7 : 3 ; v/v) s'est avéré être le plus efficace pour l'extraction de la vanilline galloyl glucoside et du macarangioside E. Le méthanol est de peu supérieur aux autres solvants dans l'extraction du 3,4,5-triméthoxyphénol galloylglucoside, mais le gain n'est pas suffisant pour abandonner le mélange acétone/eau. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par hydrolyse enzymatique (cf. Résultats et discussions chapitre 1.3).

**Tableau 21.** Extraction par différents solvants, résultats normalisés.

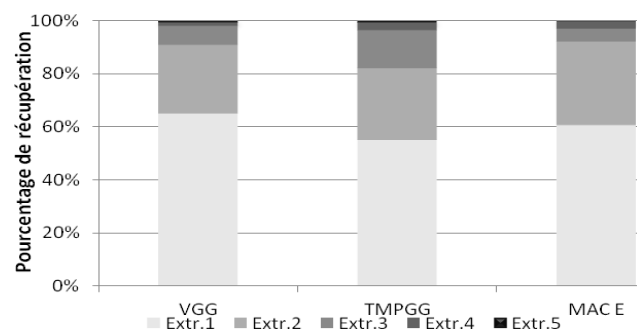
	VGG	TMPGG	MACARANGIOSIDE E
H <sub>2</sub> O	37	26	38
MeOH	76	100	72
EtOH	11	27	27
EtOH/ H <sub>2</sub> O (1 : 1)	95	72	65
Acetone/ H <sub>2</sub> O (7 : 3)	100	86	100
AcOEt	17	45	12

A partir du mélange acétone/eau (7 : 3 v/v) comme solvant d'extraction, l'influence du temps de macération a été déterminée. La concentration des trois composés dans l'extrait est maximale entre 4 et 6 heures, puis elle diminue légèrement, pour enfin rester stable dans l'intervalle de temps de 10 à 24 heures (Figure 52). Cette diminution pourrait être due à des phénomènes de sorption sur le bois lui même.

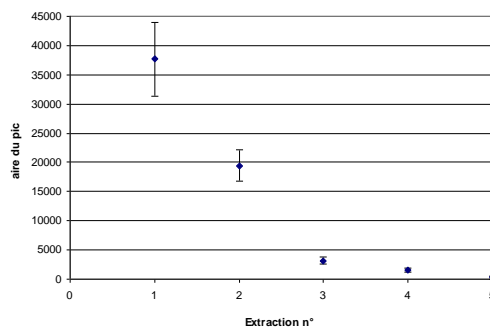
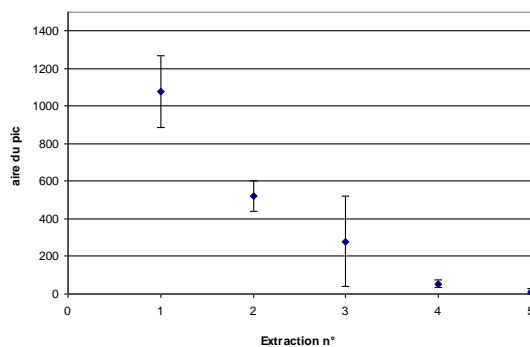
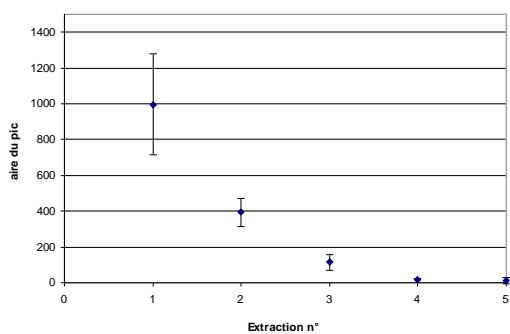


**Figure 52.** Extraction de la VGG, du TMPGG et du macarangioside E en fonction du temps, (solvant d'extraction eau/acétone, 3 : 7)

Le temps de macération a été établi à 4 heures, ce qui permettrait des analyses suffisamment rapides. La courbe d'épuisement lors de l'extraction successive du bois frais montre que la quasi-totalité des précurseurs extractibles est récupérée à la 3<sup>ème</sup> extraction (Figure 53). Il est respectivement récupéré 98, 96 et 97 % des glycosides VGG, TMPGG et macarangioside E extractibles. Par ailleurs, au-delà de la troisième extraction, la récupération n'est plus significative (figures 53 et 54).



**Figure 53.** Pourcentage de récupération en vanilline-galloyl-glucoside (VGG), 3,4,5-triméthoxyphényl-galloyle-glucoside (TMPGG) et macarangioside E (MAC E) pour chaque série d'extraction.



**Figure 54.** Récupération en VGG, TMPGG et macarangioside E pour chaque extraction (les barres d'erreurs représentent l'écart type sur trois répétitions).

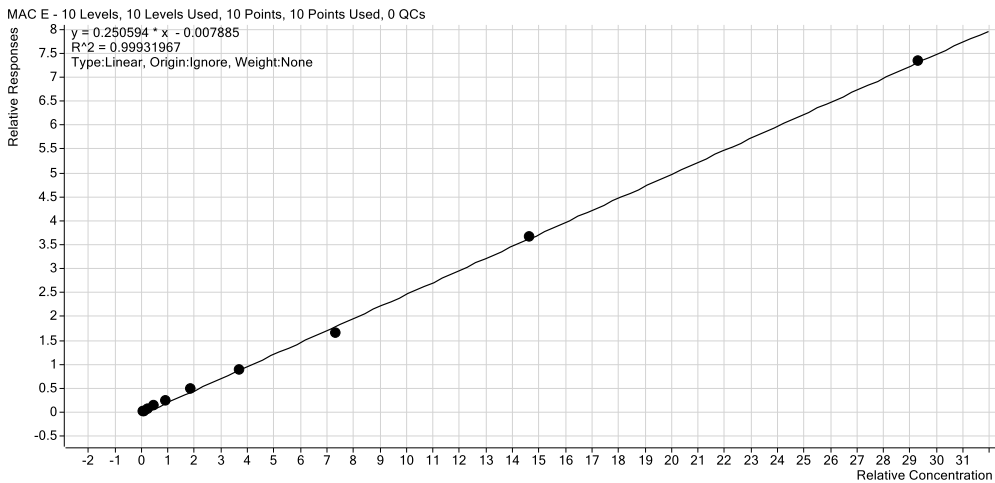
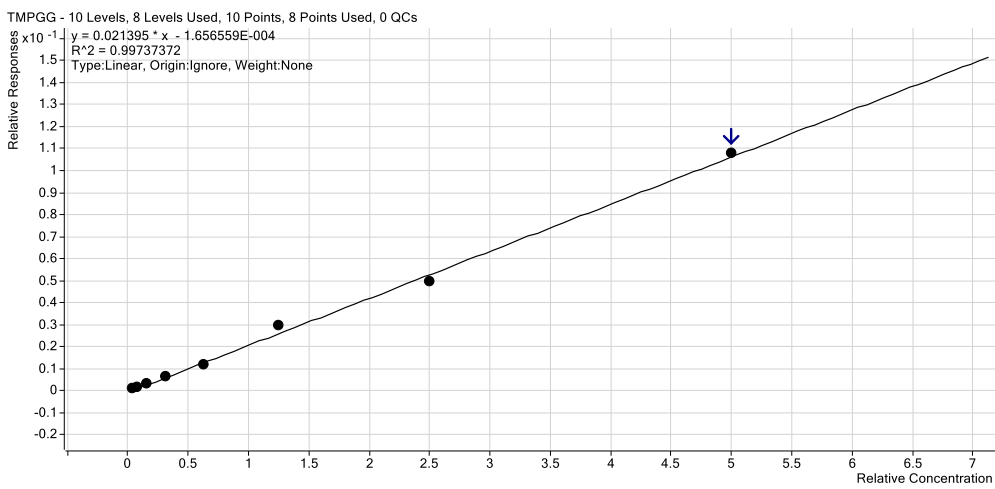
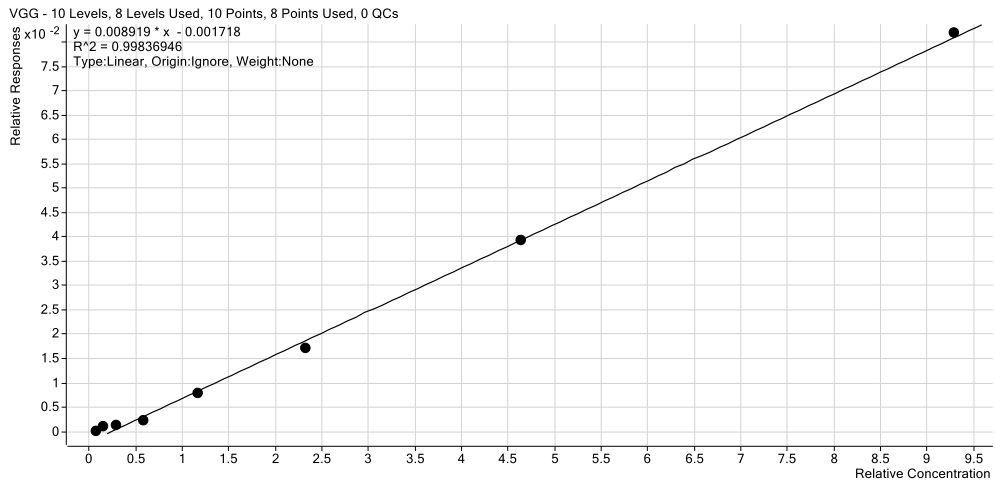
Depuis ces essais, les conditions conciliant aspects pratiques de mise en œuvre et extraction optimale ont pu être fixées : il s'agit de trois macérations consécutives de 4 heures chacune, sous agitation (230 rpm) dans un mélange acétone/eau (7 : 3 v/v), à température ambiante. Les paramètres du spectromètre de masse ont été optimisés manuellement. Afin de diminuer l'erreur de mesure, l'étalonnage interne a été utilisé. Etant donné que dans la première partie, nous avons démontré que dans le bois de chêne, la vanilline- $\beta$ -D-xylopyranoside n'existe pas, ou tout du moins n'est pas détectable, nous l'avons choisie ici comme étalon interne.

Des gammes étalons ont été réalisées par ajout dosé dans du vin et dans un extrait de bois. Pour les trois composés, nous avons obtenu des réponses analytiques linéaires dans les intervalles de concentration étudiés (Figure 55).

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en calculant respectivement 3 fois et 10 fois le rapport signal sur bruit (S/N) (Tableau 22).

**Tableau 22.** Limites de détection et de quantification respectivement pour la vanilline galloylglucoside (VGG), le 3,4,5-triméthoxyphénolgalloylglucoside (TMPGG) et le macarangioside E.

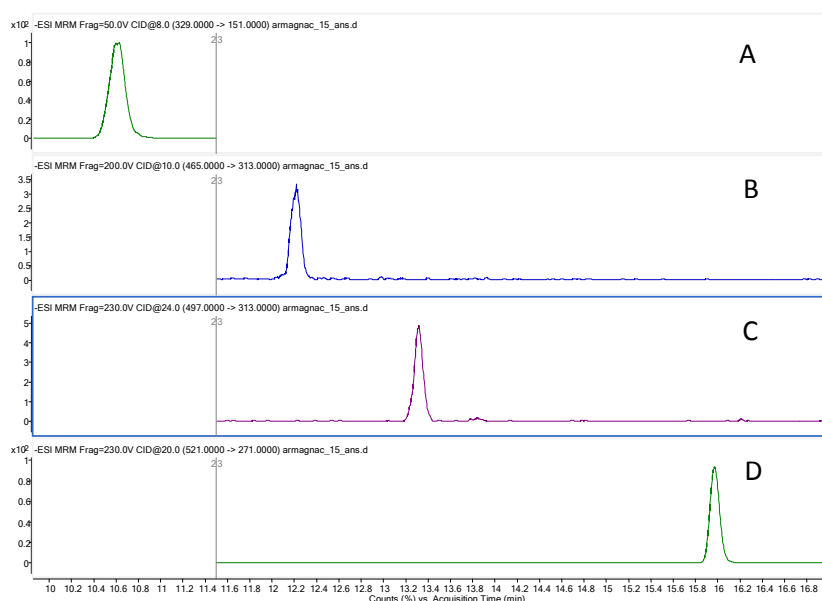
Matrice		LD $\mu\text{g/L}$	LQ $\mu\text{g/L}$	CV %
Vin	VGG	38	120	4,18
	TMPGG	26	90	3,98
	Macarangioside E	12	40	5,15
Eau de vie	VGG	56	186	9,83
	TMPGG	65	216	3,98
	Macarangioside E	32	109	8,94
Bois	VGG	58	195	12,05
	TMPGG	46	156	10,18
	Macarangioside E	8	32	11,67



**Figure 55.** Courbes de calibration de la vanilline galloylglucoside (A), du 3,4,5-triméthoxyphénolgalloylglucoside (B) et du macarangioside E(C). L'étalon interne (EI) utilisé est la xylovanilline.

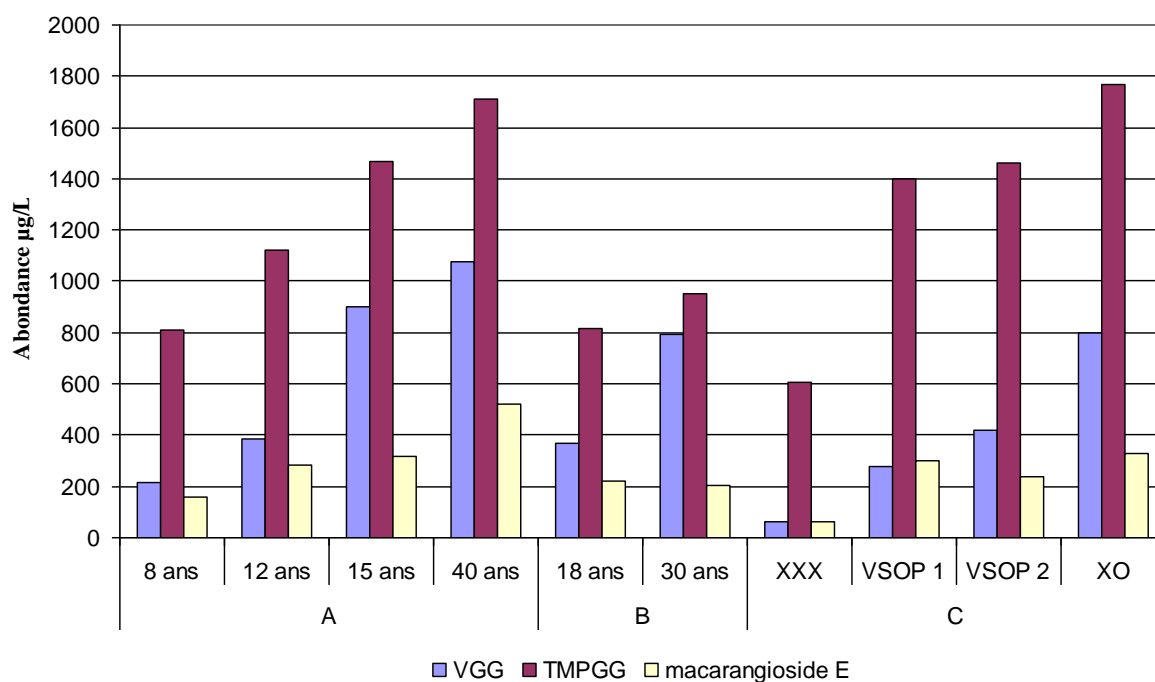
### 2.1.2. Analyse des précurseurs galloylglucosidiques dans quelques vins et Armagnacs

Les précurseurs identifiés ont été recherchés dans quelques vins et eaux-de-vie (21 vins et 10 Armagnacs). Les échantillons sont des produits prêts à la consommation. Dans les conditions actuelles d'analyse, la VGG, le TMPGG et le macarangioside E n'ont pas été détectés dans les vins analysés. Seul le macarangioside E a été détecté dans deux échantillons de vin rouge, vieillis 2 ans en barriques. Il est possible que le temps de contact entre le bois et le vin soit trop court pour accumuler des quantités de composés suffisantes à la détection dans les conditions actuelles. Comme nos résultats nous montrent, la teneur en éthanol juoDe plus, la présence de microorganismes ou d'enzymes, même résiduels, pourrait très rapidement hydrolyser les précurseurs présents dans le milieu. Le faible pH du vin pourrait également induire l'hydrolyse acide des précurseurs extraits. Cependant les études de Bloem (2005) ont démontré que les précurseurs jouent un rôle important dans la FML en barriques. Il serait donc nécessaire de regarder en détail ces techniques œnologiques (vinification intégrale ou partielle en barrique) avec ces marqueurs (VGG, TMPGG, macarangioside E) et ce nouvel outil à disposition.



**Figure 56.** Chromatogramme MRM de l'analyse HPLC-QqQ-MS d'un Armagnac. A) xylovanilline, B) VGG, C)TMPGG, D) macarangioside E





**Figure 57.** Résultats des dosages de la VGG, TMPGG et macarangioside E dans les Armagnacs, d'origines et d'âges différents.

Au contraire, dans les Armagnacs, les trois composés, VGG, TMPGG et macarangioside E sont présents dans des teneurs importantes et quantifiables (figures 56 et 57).

Parmi les trois précurseurs, le TMPGG a été retrouvé comme le plus abondant dans les Armagnacs analysés, dans des teneurs supérieures à 600 µg/L et présentant une valeur moyenne de 1200 µg/L. La VGG est retrouvée en moyenne à 500 µg/L et le macarangioside E à 260 µg/L. Une tendance positive est observée entre la teneur en précurseurs et le temps de vieillissement en fûts du produit. En effet, la teneur la plus élevée a été retrouvée dans l'Armagnac vieilli pendant 40 ans. Cela nous amène à considérer que la cinétique d'hydrolyse acide des précurseurs est plutôt lente. Elle ne permet pas d'hydrolyser la totalité des précurseurs solubilisés dans l'eau-de-vie. Mais elle doit permettre d'enrichir continuellement le spiritueux en arômes boisés.

Un autre aspect mis en évidence, est la différence trouvée dans les teneurs des produits provenant de différents producteurs. Derrière cet effet producteur très importants, il existe sans doute une diversité au niveau du bois utilisé, concernant l'espèce, la provenance, la

chauffe, les utilisations antérieures, etc. La gestion des fûts pourrait donc avoir des répercussions sur la quantité du potentiel aromatique à disposition.

Plus l'eau-de-vie est jeune, moins elle contient de précurseurs. Les faibles teneurs retrouvées dans l'Armagnac triple étoiles (minimum 2 ans sous bois), pourrait expliquer par similitude pourquoi les précurseurs n'ont pas été retrouvés dans les vins, dont l'élevage en barriques ne dépassait pas une année. Bien sûr, tout le travail reste à faire sur les teneurs en précurseurs et sur leur rôle. Il n'est ici présenté qu'une très courte application de la technique, qui reste très puissante mais perfectible.

### ***2.1.3. Effets de différents paramètres de tonnellerie sur la teneur en précurseurs galloylglucosidiques***

Grâce à la méthode développée, nous avons pu analyser directement, sans purification préalable, la teneur en précurseurs dans le bois de chêne. L'extrait eau/acétone, après concentration et filtration est injecté dans l'HPLC-MS. Les analyses des bois frais non chauffés (Tableaux 23 et 24) montrent que l'échantillon de chêne américain est plus riche en VGG et TMPGG que l'échantillon de chêne français. Cependant la situation est inversée pour le macarangioside E. Globalement, une forte variation de la teneur a été observée pour des échantillons provenant du même lot de bois. Dans le cas du bois frais, cette variation peut atteindre 33 %. En effet, le bois de chêne est bien connu chez les tonneliers pour son importante hétérogénéité moléculaire, et ceci même au sein d'un même arbre (Masson *et al.* 1995). L'analyse du précurseur glucosidique de la whiskylactone dans le bois de chêne avait mis en évidence une forte variation intra et inter espèces (Fudge *et al.* 2008). Les teneurs en précurseurs ont été comparées dans les deux chênes frais. Un risque  $\alpha=0,08$  est associé par un test de Student. Par la différence des teneurs en VGG des deux lots de bois, une significativité supérieure a été obtenue pour la teneur en TMPGG ( $\alpha=0,05$ ). Au contraire

le macarangioside E ne présente pas de différences significatives et une tendance ne se dégage pas non plus entre les deux types de chêne analysés.

**Tableau 23.** Teneurs en mg/kg en vanilline galloylglucoside (VGG), 3,4,5-triméthoxyphénol galloylglucoside (TMPGG) et macarangioside E (MAC E) dans le bois de chêne français en fonction de la température de chauffe (CF).

	CF	CV	CF 120 °C	CV	CF 200 °C	CV	CF 230 °C	CV
	moyenne	%	moyenne	%	moyenne	%	moyenne	%
VGG	0,35	9,4	0,29	9,5	0,24	18,7	0,21	22,3
TMPGG	0,82	20,5	0,65	18,2	0,37	13,4	0,17	27,3
macarangioside E	19,1	12,4	21,1	3,3	14,22	15,3	3,41	41,6

**Tableau 24.** Teneurs en mg/kg en vanilline galloylglucoside (VGG), 3,4,5-triméthoxyphénol galloylglucoside (TMPGG) et macarangioside E dans le bois de chêne américain en fonction de la température de chauffe (CA).

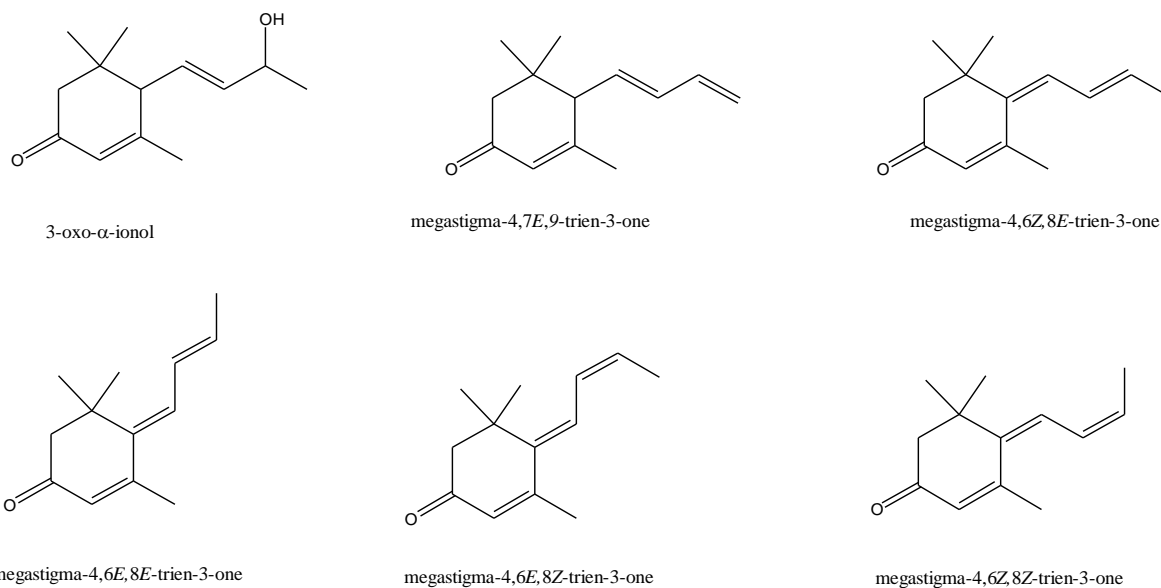
	CA	CV	CA 120°C	CV	CA 200°C	CV	CA 230°C	CV
	moyenne	%	moyenne	%	moyenne	%	moyenne	%
VGG	0,94	33,3	0,90	27,1	0,94	16,4	0,61	21,2
TMPGG	1,53	23,2	1,73	43,1	1,04	10,0	0,25	32,0
macarangioside E	17,61	28,4	18,88	18,4	9,63	40,7	2,47	13,8

Les copeaux de chêne français et américain ont été toastés dans les mêmes conditions à différentes températures. L'effet du temps de chauffe n'a pas été étudié ici. Tout d'abord, nous observons un effet négatif d'une température élevée (230 °C) sur la teneur en précurseurs tableaux 23, 24. Plus la température est élevée et plus les précurseurs sont dégradés. Cependant dans le chêne français, la VGG ne semble pas subir l'influence des températures élevées. La comparaison entre le bois frais et le bois chauffé à 230 °C ne montre pas une différence statistiquement significative. Au contraire dans le chêne américain, cette différence est significative ( $\alpha = 0,015$ ). La dégradation des précurseurs devient significative à partir de 200 °C. Une tendance positive mais non significative a été observée à des températures inférieures à 120 °C, pour le macarangioside E.

Malgré une forte diminution, la totalité des précurseurs ne disparaît pas aux conditions de chauffe de 230 °C pendant 30 minutes. Environ 20 % des précurseurs ne sont pas dégradés. Selon Wilkinson *et al.* (2004), les conditions les plus extrêmes de notre expérience correspondraient à une chauffe « forte ». Une perte en précurseurs d'arôme se produit donc lors de la chauffe, mais une quantité non négligeable est susceptible d'être extraite ensuite par le vin et donc de représenter un potentiel aromatique exploitable.

## **2.2 Etude des composés formés par dégradation thermique du macarangioside E.**

Dans la littérature, l'aglycone du macarangioside E, le 3-oxo- $\alpha$ -ionol, est cité pour donner des notes aromatiques de tabac, mais aucune donnée concernant son seuil de détection dans le vin n'a été trouvée. Par ailleurs, la 3-oxo- $\alpha$ -ionol a déjà été retrouvée dans le raisin, le vin et le bois (Sefton *et al.* 1990). Cet auteur a montré que ce composé est presque deux fois plus abondant dans le chêne français que dans le chêne américain. Le 3-oxo- $\alpha$ -ionol est également présent dans le tabac. Des esters de cet alcool ont été proposés comme agents aromatisants des cigarettes. L'intérêt aromatique de cette molécule porte aussi sur ses produits de dégradation acide et thermique. Car dans ces conditions, le 3-oxo- $\alpha$ -ionol se déshydrate. Le composé formé est le mégastigmatriénone (Aasen *et al.* 1971). Il s'agit de 5 isomères dont 4 diastéréoisomères ((6Z,8E)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, (6Z,8Z)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, (6E,8E)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, (6E,8Z)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one) et un isomère de position le (7E)-4,7,9-mégastigmatrién-3-one, (Figure 58) (Aasen *et al.* 1972). Les mégastigmatriénones ont été retrouvés dans le chêne (Sefton *et al.* 1990), le tabac (Aasen *et al.* 1972), le miel (Montenegro *et al.* 2009) ainsi que dans le vin (Robinson *et al.* 2011). Ils sont caractérisés par des notes de tabac et d'épices.



**Figure 58.** Structures des produits de dégradation thermique du macarangioside E.

A l'inverse du 3-oxo- $\alpha$ -ionol, le mégastigmatriénone est plus présent dans le chêne américain, mais ses quantités restent faibles (Sefton *et al.* 1990). La déshydratation acide du 3-oxo- $\alpha$ -ionol en mégastigmatriénone a été envisagée par Sefton *et al.* (1990) et Nonier *et al.* (2004). Mais le premier auteur affirme que cette réaction est improbable au pH du vin. Beaucoup d'importance a été donnée au pH, mais l'influence de la chauffe seule n'a pas été envisagée. La formation du mégastigmatriénone au détriment du 3-oxo- $\alpha$ -ionol pourrait avoir lieu bien avant le contact avec le vin. Un essai a donc été réalisé ici. Dans cette étude une quantité de macarangioside E a été mise dans des tubes à hydrolyse fermés hermétiquement. Tout solvant avait préalablement été éliminé par lyophilisation.

Dans une première série de tests, les tubes ont été chauffés pendant 30 minutes à 100 °C. Une fois les tubes refroidis, les composés volatils produits ont été analysés par GC-MS en modalité scan puis en SIM, portant attention aux ions caractéristiques du 3-oxo- $\alpha$ -ionol et du mégastigmatriénone. D'après ces analyses, aucun composé ne s'est formé dans ces conditions.

Dans une deuxième série de tests, la température a été augmentée à 230 °C. Nous avons cette fois-ci observé la formation dans les tubes des composés volatils suivants : 3-oxo- $\alpha$ -ionol, mégastigmatriénone et 2,6,6-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione (4-oxo-isophorone). Seulement 4 isomères de mégastigmatriénone se sont formés. En effet, l'isomère de position (7E)-4,7,9-mégastigmatrién-3-one n'a pas été observé en modalité scan. Cependant

au temps de rétention du 4,7,9-mégastigmatrién-3-one, un très faible signal est présent sur le chromatogramme SIM pour l'ion  $m/z$  : 190. Ce signal est de l'ordre de 1/1000 du comparaison avec l'isomère (6Z,8E)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, ce qui correspondrait à la proportions trouvée par Aasen *et al.* (1972) dans le tabac.

Le 4-oxo-isophorone avait été identifié dans le bois de chêne (Sefton *et al.* 1990) et son origine a été attribuée à la dégradation thermique du  $\beta$ -carotène (Kanasawud & Crouzet 1990) ou de l'hydrolyse acide du 3-oxo- $\alpha$ -ionol (Strauss *et al.* 1987b). Sefton (1998) avait également retrouvé le 4-oxo-isophorone dans un moût de merlot traité par une préparation d'enzymes fongiques, *Rohpect C* (Röhm, Allemagne). On retrouve également ce composé dans les miels ayant subi un traitement thermique (Radovic *et al.* 2001), dans le safran (Semiond *et al.* 1996), ainsi que dans le vin (Rogerson *et al.* 2001) et dans le tabac (Fujimori *et al.* 1976).

La présence de la partie glucoside gallate, semble donner une certaine stabilité au 3-oxo- $\alpha$ -ionol, qui est donc moins affecté par la chaleur que l'aglycone, celui-ci étant facilement modifié comme semblent l'indiquer ces expériences.

### **2.2.1. Caractérisation aromatique des arômes formés par dégradation du macarangioside E**

Rogerson *et al.* (2001) ont pu déterminer le seuil de détection de la 4-oxo-isophorone dans le vin à 25  $\mu\text{g/L}$ . Cependant la teneur retrouvée dans cette étude dans 19 vins reste bien en-dessous de cette valeur, de l'ordre de 2 à 3  $\mu\text{g/L}$ . D'autres auteurs ont démontré que par hydrolyse acide, la teneur dans le vin blanc pourrait augmenter jusqu'à 20  $\mu\text{g/L}$  (Sefton *et al.* 1993), et ainsi s'approcher du seuil de détection.

Pour le 3-oxo- $\alpha$ -ionol, peu de données ont été trouvées concernant les aspects sensoriels. Ce composé n'est pas commercialisé. Par manque de temps, nous n'avons pas pu le purifier et procéder à sa caractérisation sensorielle.

Quelques recherches ont été effectuées sur la mégastigmatriénone, considérée parmi les principaux constituants de l'arôme du tabac (Ohloff 1978). Cependant la plupart des recherches sont centrées sur l'identification de ce composé dans différents produits naturels, comme le tabac ou le lulo (Osorio *et al.* 2003). Les descripteurs communément associés à ces molécules sont des odeurs boisées ou des odeurs de tabac. Mais différentes nuances aromatiques sont observées selon les auteurs. En effet, il a été suggéré par Weyerstahl & Licha (1997) que les tonalités peuvent être différentes selon la stéréochimie de la molécule. Un fort arôme de tabac de Virginie, avec des notes douces et agréables de prune et de bois serait propre à l'isomère (*E,E*), alors que l'isomère (*Z,E*) serait plus boisé avec un caractère de tabac moins marqué. D'autres auteurs décrivent l'odeur des mégastigmatriénones comme tabac, épice et poivré (Sefton *et al.* 1990 ; Lloyd *et al.* 1976).

Dans le but de vérifier si une différence aromatique existe entre les différents isomères de la mégastigmatriénone, nous avons procédé à l'analyse GC-O d'un mélange des 5 isomères. Même si les isomères sont bien séparés par chromatographie gazeuse sur une colonne BP-21, un fond boisé a été perçu du premier pic jusqu'à l'élution du dernier isomère. L'observation des résultats (Tableau 25) permet de retrouver pour les trois premiers isomères, (6*Z*,8*E*)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, (7*E*)-4,7,9-mégastigmatrién-3-one, (6*Z*,8*Z*)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, des notes douces boisées, de miel et de tabac. Les deux derniers isomères ont un arôme toujours boisé mais qui vire vers des notes de brûlé, grillé presque phénolé. Un des points intéressants pourrait être la note d'encens retrouvée pour le (6*Z*,8*E*)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one. Chatonnet (1991) avait déjà reporté ce descripteur dans l'analyse GC-O d'un extrait au dichlorométhane de bois de chêne.

Aucune étude antérieure n'avait déterminé les seuils de détection dans le vin. L'évaluation de l'impact aromatique des mégastigmatiénones a été effectuée ici dans l'eau et dans un vin rouge. Même si la pureté du produit est seulement de 78 %, les résultats donnent une idée de l'impact sur l'arôme global du vin.

**Tableau 25.** Résultats de l'analyse GC-O du mégastigmatriénone commercial (Symrise, Holzminden, Allemagne). Descripteurs employés et nombre de citations relatives pour un panel de 8 juges.

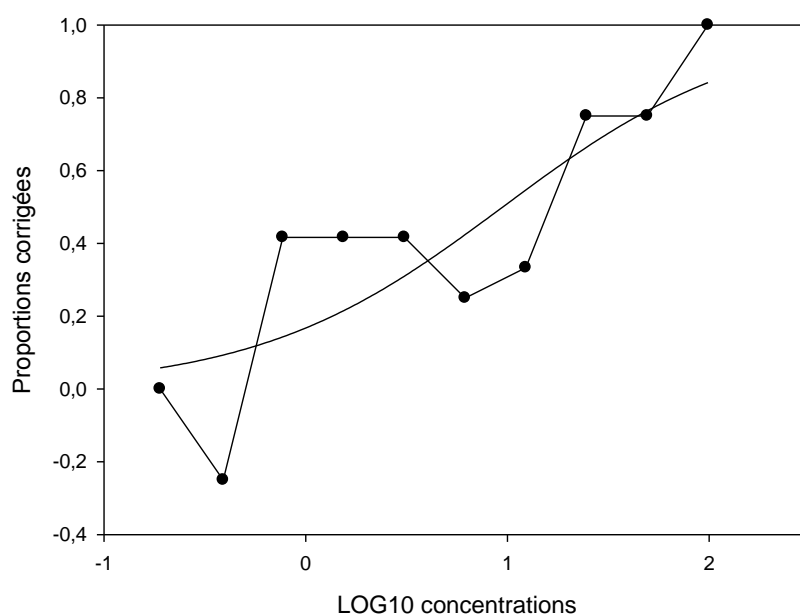
Temps de rétention	Descripteurs	Citations
<b>Isomère</b>		
37,6 min	Poivré	++
(6Z,8E)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one	Brûlé/grillé	++
	Epicé/boisé/vanillé	++++
	Eglise/encens	+
	Tabac	+
	Sel de celeri	+
38,2 min	Tabac	+++
(7E)-4,7,9-mégastigmatrién-3-one	Résine/miel	++
	Pêche	++
	Epicé/boisé/vanillé/santal	++
	Brûlé	++
38,9 min	Feuilles sèches	+
(6Z,8Z)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one	Brûlé /fumé	++
	Tabac/boisé	+++
41,1 min	Phénolé/brûlé	++++++
(6E,8E)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one		
42,0 min	Brûlé/grillé	+++++++
(6E,8Z)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one	Boisé	++++
	Epicé/poivré	++

Les seuils ici présentés correspondent donc à un mélange des 5 isomères (6Z,8E)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, (7E)-4,7,9-mégastigmatrién-3-one, (6Z,8Z)-4,6,8-mégastigmatrién-3-



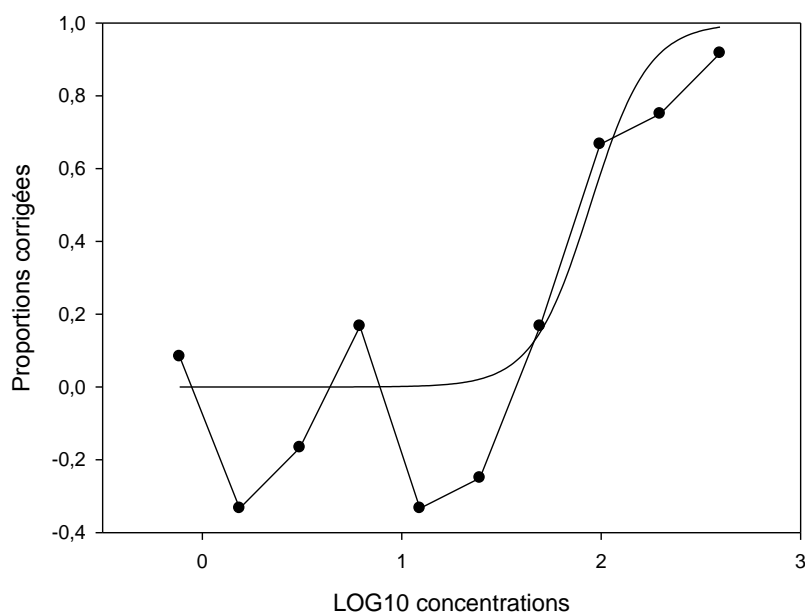
one, (6E,8E)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, (6E,8Z)-4,6,8-mégastigmatrién-3-one, dans un rapport respectif de 1,6 / 4,8 / 5,5 / 1 / 3,2.

Le test AFC effectué par un panel de 17 personnes a permis de déterminer un seuil de détection dans l'eau de 9,5 µg/L, qualité de la modélisation  $R^2=0,97$  (Figure 59). Ce seuil est relativement bas, mais plus élevé que d'autres norisoprénoïdes comme la β-ionone (100 fois plus faible). Il a aussi été remarqué que ce composé pourrait induire une sensation somesthésique pouvant influencer la détection. De plus, cette sensation de fraîcheur a été perçue par le panel, ce qui a pu rendre plus complexe l'identification de l'odeur.



**Figure 59.** Proportion de réponses en fonction de la concentration permettant le calcul du seuil de détection dans l'eau ( $P=0,5$ ). (●) points expérimentaux, (—) modélisation.

La mesure effectuée dans un vin rouge, cv Merlot, a permis d'établir un seuil de détection à 88 µg/L, avec une qualité de la modélisation  $R^2=0,89$  (figure 60). Il existe donc une nette augmentation du seuil classiquement observée dans une matrice plus complexe telle que le vin.



**Figure 60.** Proportion de réponses en fonction de la concentration permettant le calcul du seuil de détection dans le vin rouge ( $P=0,5$ ). (●) points expérimentaux, (—) modélisation.

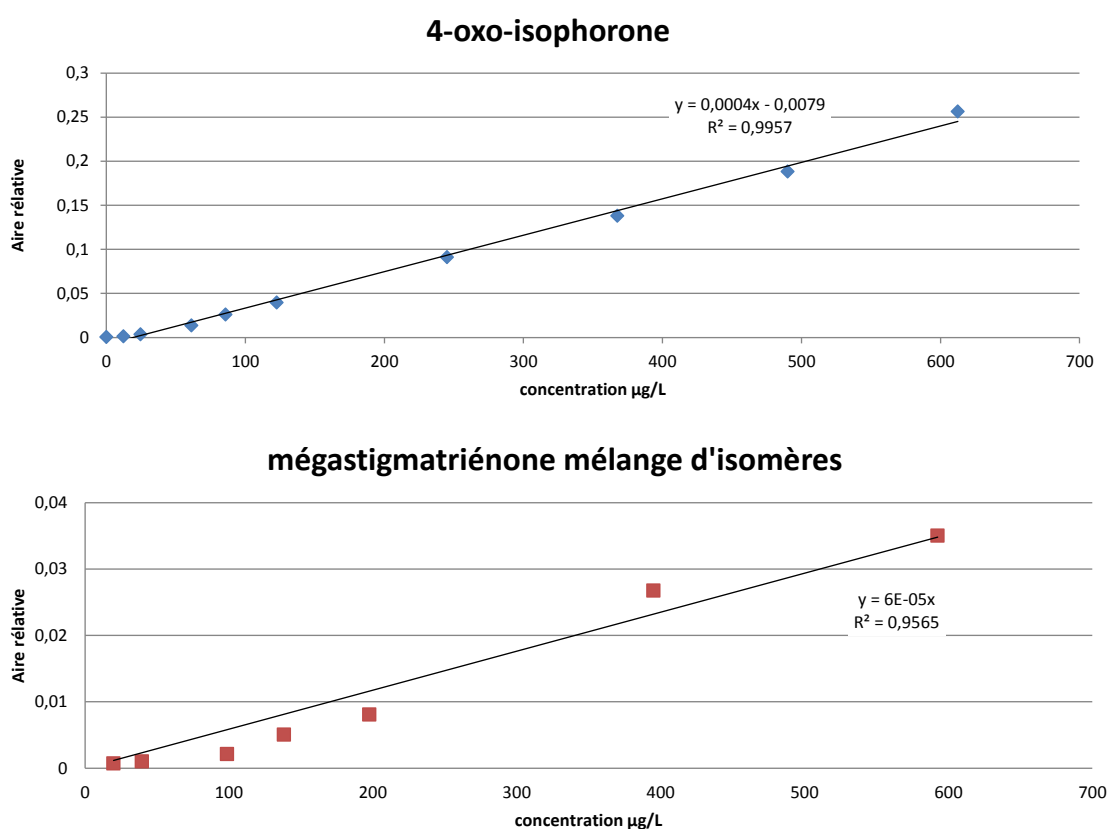
Il serait intéressant de confronter ces résultats aux teneurs dans le vin, mais aucune référence concernant la teneur en mégastigmatriénones dans le vin n'a été trouvée. Les mégastigmatriénones ont seulement été détectées dans le vin (Robinson *et al.* 2011). Cependant, elles pourraient participer à la complexité aromatique du vin et notamment aux caractères tabac et encens.

### ***2.2.2. Développement d'une méthode d'analyse du 4-oxo-isophorone et mégastigmatriénones dans le bois.***

Pour étudier la teneur en 4-oxo-isophorone et en mégastigmatriénones dans le bois, aucune méthode de dosage, validée ou non, n'a été publiée. Nous avons donc développé une méthode d'analyse spécifique. L'extraction solide/liquide des composés du bois par le solvant dichlorométhane permet de diminuer des étapes de purification, comme les extractions liquide/liquide ou l'extraction sur cartouche (SPE). La méthode employée permet

donc une injection directe de l'extrait organique en GC-MS. L'utilisation de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permet une bonne sélectivité (ions sélectifs). Dans la pré-étude, des interférants ont été observés pour le 3-oxo- $\alpha$ -ionol. En effet, ce composé présente sur une colonne polaire BP-21, un temps de rétention très proche de l'acétovanillone. Ces deux composés possèdent de plus les mêmes ions spécifiques, bien que d'intensités relatives différentes. Pour éliminer ce biais, nous avons utilisé une colonne chromatographique relativement apolaire (HP-5ms). Cela nous a permis, avec un gradient de température adapté, une bonne séparation de ces deux composés (figure 62).

En premier lieu, nous avons vérifié la linéarité de l'analyse, par des ajouts dosés dans une matrice bois extraite au dichlorométhane. Dans la gamme de concentration entre 12 et 612  $\mu\text{g/L}$ , l'analyse de la 4-oxo-isophorone est linéaire (vérifiée sur 10 points) avec un coefficient de corrélation satisfaisant ( $R^2=0,9951$ ). La mégastigmatriénone présente dans une gamme comprise entre 19 et 592  $\mu\text{g/L}$ , un coefficient de corrélation de  $R^2=0,961$ . La méthode est donc linéaire dans les domaines de concentrations donnés (Figure 61).



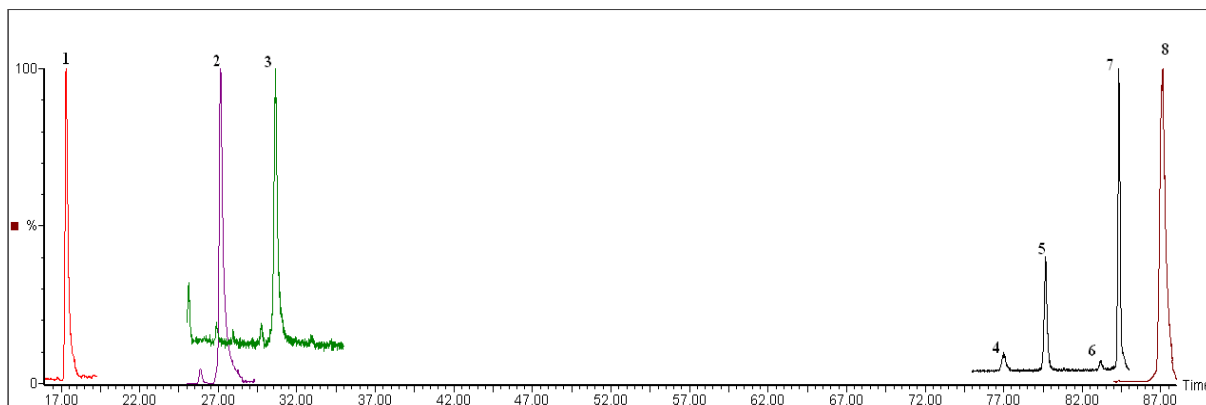
**Figure 61.** Etude de la linéarité pour la 4-oxo-isophorone (en bleu) et la mégastigmatriénone (en rouge).

La répétabilité a été mesurée au centre du domaine de linéarité et pour dix répétitions dans la matrice bois (copeaux de chêne provenant du même lot). Les résultats présentés dans le tableau montrent une bonne répétabilité de la 4-oxo-isophorone (variation inférieure à 10 %), tandis que les mégastigmatriénones présentent une forte variation à 11 %. Ces variations, bien qu'importantes restent honorables dans l'échelle de Horwitz (admissible 23%). Lorsque l'analyse est effectuée sur une matrice non homogène comme c'est souvent le cas pour des solides, la répétabilité de la mesure peut être très affectée. Cependant, pour améliorer les performances analytiques, une optimisation des paramètres de la méthode est en cours dans notre laboratoire.

**Tableau 26.** Répétabilité de la méthode et limites de détection (LD) et de quantification (LQ) du 4-oxo-isophorone, du total des mégastigmatriénone et de la 3-oxo- $\alpha$ -ionol.

	Moyenne	Écart type	Coefficient de variation CV %	LD $\mu\text{g/L}$	LQ $\mu\text{g/L}$	Recouvrement %
4-oxo-isophorone	0,133	0,013	9,89	4,9	16,3	97
Mégastigmatriénone	0,018	0,003	10,82	15,8	52,6	93
3-oxo- $\alpha$ -ionol	0,141	0,028	20,26	-	-	-

Dans cette étude, nous nous sommes aussi intéressés à la 3-oxo- $\alpha$ -ionol. Malheureusement ce composé n'est pas commercialisé et nous n'avons pas eu le temps de le synthétiser ou de l'isoler. Le pic correspondant au composé a toutefois été identifié dans le chromatogramme GC par injection de la fraction organique d'un extrait de bois de chêne, qui contient naturellement la 3-oxo- $\alpha$ -ionol (Sefton *et al.* 1990). Le spectre MS obtenu a été comparé avec les bases de données. Une répétabilité autour de 20 % a été le seul paramètre que nous avons pu obtenir pour ce composé.



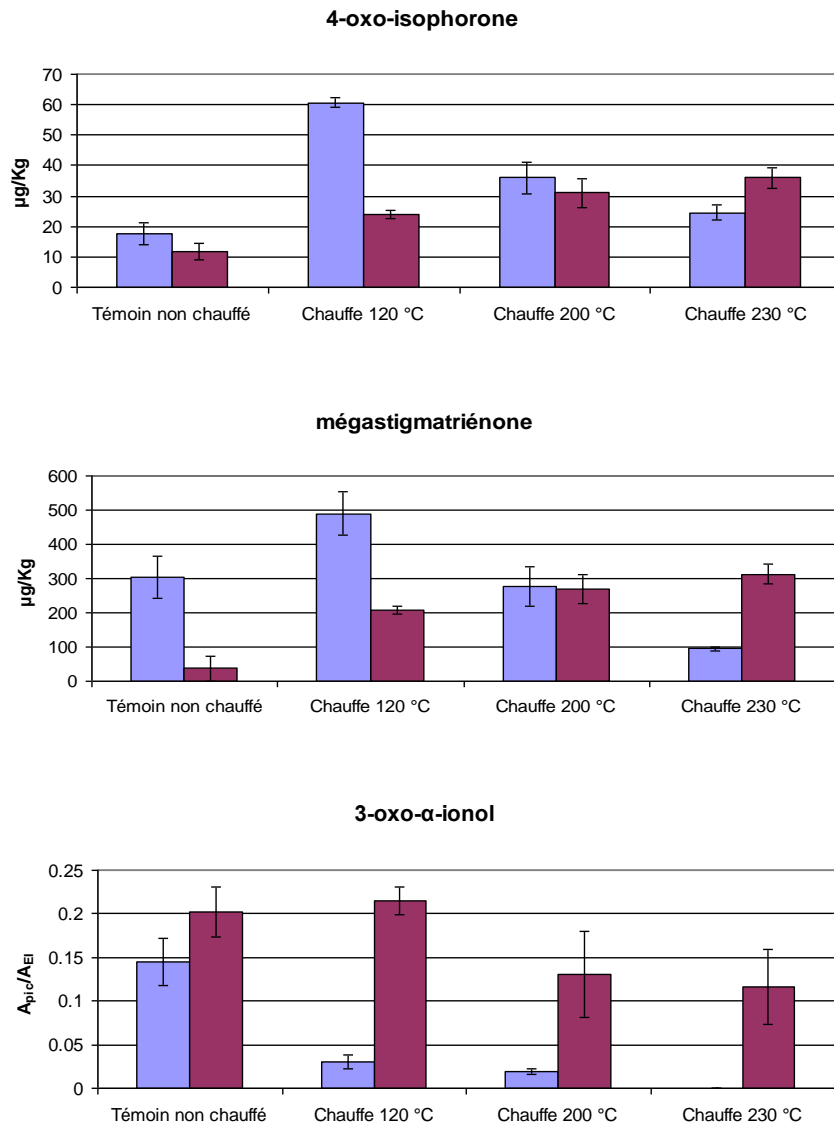
**Figure 62.** Chromatogramme GC-MS acquis en modalité SIM d'un extrait de bois 1) octan-3-ol (EI) ; 2) isophorone (EI) ; 3) 4-oxo-isophorone ; 4, 5 , 6 , 7) mégastigmatriénone ; 8) 3-oxo- $\alpha$ -ionol.

### **2.2.3. Teneur en 4-oxo-isophorone et mégastigmatriénone dans le bois de chêne**

Grâce à la méthode développée précédemment, nous avons pu étudier la teneur en produits odorants générés par la dégradation du macarangioside E présent dans le bois de chêne. Dans le bois de chêne français frais, la quantité de mégastigmatriénone est supérieure à celle trouvée dans le chêne américain (figure 63). Pour le 4-oxo-isophorone et le 3-oxo- $\alpha$ -ionol, les différences trouvées ne sont cependant pas significatives. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Sefton *et al.* (1990). En effet, ces auteurs trouvaient des teneurs en 4-oxo-isophorone et mégastigmatriénone plus importantes dans le chêne américain que dans le chêne des Vosges et, dans ce dernier, une teneur en 3-oxo- $\alpha$ -ionol bien supérieure à celle du chêne américain. Des différences dans l'affinage du merrain pourraient avoir une influence sur la teneur des norisoprenoïdes qui seraient donc à l'origine de la différence entre nos résultats et ceux de Sefton *et al.* (1990). Un autre paramètre pouvant affecter les résultats est le protocole d'extraction des norisoprenoïdes. Sefton décrit une macération des copeaux de bois dans un vin modèle pendant 7 jours à une température de 50 °C. Mais Nonier *et al.* (2004) ont mis en évidence qu'une macération de 7 jours à une température de

55 °C peut conduire à la dégradation des caroténoïdes avec production de norisoprénoïdes, et dans un même temps, certains norisoprénoïdes peuvent être dégradés.

Le mégastigmatriénone dans le chêne américain augmente en fonction de la chauffe, alors que dans le chêne français, la teneur ne varie pas et a même tendance à diminuer lors d'une chauffe plus intense (230 °C). Une situation analogue est retrouvée avec la 4-oxo-isophorone.



**Figure 63.** Teneurs en 4-oxo-isophorone, mégastigmatriénone et 3-oxo-α-ionol présents lors de la chauffe du bois de chêne français (■) et chêne américain (■).

## 2.2.4. Recherche de la mégastigmatriénone dans les vins

L'impact de la mégastigmatriénone dans le vin n'avait pas encore été étudié. Après avoir déterminé les seuils dans l'eau et dans un vin rouge, nous nous sommes intéressés à déterminer si ce composé est répandu dans les vins boisés. Nous avons donc utilisé une méthode extractive, classiquement utilisée au laboratoire pour l'analyse des composés volatils du bois dans le vin. L'analyse a été conduite dans les conditions chromatographiques optimisées pour la mégastigmatriénone et la 4-oxo-isophorone dans le bois.

La méthode employée n'a pas été validée et elle présente de nombreux points d'optimisation. Mais elle nous a toutefois permis de détecter la mégastigmatriénone dans quasiment tous les vins analysés. Les teneurs ont été estimées par des ajouts dosés dans les vins (tableau 27). La mégastigmatriénone se trouverait de l'ordre de quelques dizaines de µg/L. L'estimation de la teneur en 4-oxo-isophorone serait plutôt en accord avec les résultats de Rogerson *et al.* (2000), pour qui ce composé serait de l'ordre du µg/l (tableau 27).

Il est nécessaire de développer une méthode de quantification fiable et précise pour pouvoir quantifier la mégastigmatriénone dans les vins conjointement aux études sensorielles. Ceci permettrait de déterminer l'importance œnologique de ce composé ainsi que sa participation à l'arôme boisé et à la note de tabac dans le vin. Ces quelques dosages ne suffisent pas à montrer l'importance relative de ces composés et il est nécessaire d'évaluer à l'avenir un plus grand nombre de vins, notamment pour ceux qui ont un long élevage en fûts. Il serait aussi intéressant de regarder comment s'expriment les vins travaillés avec des alternatifs différentes et de qualités variables.

**Tableau 27.** Détection et estimation de la concentration en mégastigmatriénone et en 4-oxo-isophorone dans quelques vins.

Teneurs en µg/l	Côtes du Rhône 2008	St Julien 1986	Banyuls 1998	Sancerre 2006	St Emilion 2000	Médoc 2007	Graves 2008	Sauterne 2006	Bordeaux blanc 2009
4-oxo-isophorone	1	trace		1	0,5	1	trace	1	0,5
Mégastigmatriénones	3	0,5	16	20	10	5	15	50	10

## 2.3 Discussions

Nous avons tout d'abord développé une méthode d'analyse par HPLC-MS des précurseurs galloylglucosides identifiés dans ce travail. Nous envisageons prochainement la synthèse des standards deutérés pour une méthode de quantification qui sera optimisée. Dans ces premiers pas exploratoires, nous avons déterminé les conditions d'un protocole d'analyse simple mais efficace. L'analyse par cette méthode des extraits de copeaux de chêne français et américain a encore une fois mis en évidence de fortes variabilités intra et inter espèces.

L'analyse d'un certain nombre d'Armagnacs a permis de déterminer que ces précurseurs sont présents à des concentrations non négligeables. Ce potentiel aromatique semble être en relation avec les années que l'eau de-vie a passé en fût. Le rôle d'une hydrolyse acide dans la dégradation des précurseurs semble être moins important que l'extraction de précurseurs du bois. Cependant ces réactions méritent des études plus approfondies. La qualité du bois utilisé est peut être plus importante que le temps passé en fûts par l'eau-de-vie sur la teneur en précurseurs, comme semble l'indiquer la variabilité présente entre les différentes productions d'Armagnac.

L'analyse de vins n'a malheureusement pas permis de quantifier les précurseurs galloylglucosides. Le macarangioside E et le TMPGG ont été détectés dans quelques vins, mais la méthode d'analyse doit visiblement être améliorée afin de pouvoir analyser des quantités inférieures à la dizaine de  $\mu\text{g/L}$ . Il est possible qu'un choix plus judicieux de vins nous conduise à des résultats plus intéressants.

Le macarangioside E traité thermiquement peut donner lieu à la 4-oxo-isophorone et aux 4 stéréoisomères de la 4,6,8-mégastigmatrién-3-one. Cette dégradation du glucoside a lieu lors de la chauffe du bois et conduit à la formation du 3-oxo- $\alpha$ -ionol. Ce dernier est à la base de ces 2 molécules odorantes. Cependant d'autres phénomènes concomittants pourraient avoir lieu pendant la chauffe et rendre plus complexe la compréhension du système. La chauffe pourrait libérer des arômes, mais en même temps certains seraient perdus par volatilisation. Il est ici montré que des systèmes de formations complexes en cascade se produisent et peuvent dépendre des paramètres d'obtention du bois. Il est nécessaire d'analyser ces composés dans le bois directement en tonellerie afin de mieux comprendre



les phénomènes complexes impliqués. Les outils proposés dans ce travail peuvent cependant améliorer la compréhension des mécanismes, aussi bien sur la nature et l'importance des précurseurs, que sur la genèse d'arômes intéressant les vinificateurs. La tonnellerie et les producteurs de substituts pourraient être intéressés par la mesure de ce potentiel aromatique que ce travail contribue à étoffer. Des mesures spécifiques pourraient être développées pour gérer au mieux ce potentiel aromatique par les professionnels.

Une méthode d'analyse de la mégastigmatriénone doit être développée, car ce composé a été détecté dans des vins boisés. Le dosage de ce composé dans le vin est nécessaire afin de déterminer son importance dans la contribution à l'arôme boisé et aux notes de tabac des vins. Mais d'après ces premiers résultats et estimations, nous pouvons dire que la mégastigmatriénone peut contribuer à la complexité aromatique des vins. Cependant ce composé n'est pas dominant dans les vins. Sa présence ne se ferait pas au détriment de l'arôme fruité du vin mais apporterait plutôt une complexification de la perception du produit.

# Conclusion générale

Le premier acquis de ce travail correspond à l'identification d'un précurseur de la vanilline dans le bois de chêne. Des indices de sa réalité avaient été fournis précédemment par des méthodes indirectes, comme les approches enzymatiques. Dans le bois de chêne, la vanilline ne se présente pas sous forme de monoglycoside simple mais sous forme estérifiée par l'acide gallique. C'est la première fois que la vanilline-(6'-*O*-galloyl)-*O*- $\beta$ -glucopyranoside est identifiée dans un produit naturel.

Bien que la vanilline galloylglucoside soit difficilement clivée par l'enzyme à activité  $\beta$ -glucosidase, la  $\beta$ -xylosidase et la naranginase ont la capacité d'hydrolyser la liaison glycosidique et de libérer ainsi la vanilline. Le mécanisme exact reste à élucider, mais ces observations permettent de comprendre les résultats des études précédentes qui, dans un premier temps, nous avaient conduit à caractériser et à tenter de quantifier les monoglycosides.

L'absence, dans les limites de l'analyse, de monoglycosides simples pourrait être en accord avec des données générales. En effet, les monolignols comme la coniféraldéhyde glucoside et la vanilline glucoside sont typiques des gymnospermes et plus rarement rencontrés chez les angiospermes comme le chêne.

La technique de chromatographie CPC utilisée, ici couplée au nouveau concept de *Kca*, semble prometteuse et généralisable aux études des précurseurs d'arôme. Le concept du coefficient de partage d'activité pourrait être développé et élargi à la purification de composés inconnus sensibles ou catalysant d'autres activités biologiques.

L'approche a aussi permis l'identification de deux autres précurseurs glycosidiques. Il s'agit du 3,4,5-triméthoxyphénol-(6'-*O*-galloyl)-*O*- $\beta$ -glucopyranoside et du 3-oxo- $\alpha$ -ionol-(6'-*O*-galloyl)-*O*- $\beta$ -glucopyranoside (macarangioside E). Le premier est ici identifié pour la première fois dans du chêne européen, le deuxième est identifié pour la première fois dans du chêne. Enfin, l'identification d'un quatrième précurseur, celui de l'eugénol, est en cours.

Le 3,4,5-triméthoxyphénol-(6'-*O*-galloyl)-*O*- $\beta$ -glucopyranoside possède des propriétés antioxydantes et photochimiques intéressantes, mais sans doute de plus faible intérêt œnologique, l'aglycone étant peu puissant olfactivement. Le macarangioside E a, en plus de

propriétés antioxydantes, un intérêt œnologique car il est le précurseur du 3-oxo- $\alpha$ -ionol. Bien que cet aglycone ne possède un arôme de tabac, il est lui-même un précurseur de la mégastigmatriénone, une des molécules clés de la note tabac.

Dans ce travail, l'étude organoleptique et analytique de la mégastigmatriénone a été envisagée. Un seuil de détection de 9,5  $\mu\text{g/L}$  dans l'eau et de 88  $\mu\text{g/L}$  dans le vin rouge a été obtenu. Le descripteur de tabac se complexifie par des notes d'encens en fonction des isomères et pourraient être particulièrement intéressants dans l'étude de la genèse du bouquet des vins.

Le dosage des précurseurs d'arôme est un outil très important pour les tonneliers. Les critères de sélections des bois peuvent tenir compte de ce potentiel aromatique aussi bien au niveau de la coupe des grumes que lors de la sélection des merrains après la maturation sur parc. Ce potentiel peut être en partie exprimé par la microflore colonisant le bois au cours de l'affinage du merrain. Nous avons débuté une étude concernant une autre étape cruciale dans la fabrication de bois à usage œnologique, la chauffe. Les résultats que nous avons obtenus nous montrent que les précurseurs présents dans le bois frais sont dégradés par la chaleur. Le macarangioside E donne lieu, par traitement thermique du bois, à la 4-oxo-isophorone, à la 3-oxo- $\alpha$ -ionol et aux quatre isomères de la mégastigmatriénone. L'étude préliminaire permet d'explorer l'effet de la chauffe sur la dégradation du macarangioside E. En favorisant la formation d'arômes nouveaux et spécifiques au cours du processus technologique, ce précurseur serait intéressant dans l'obtention des bois à destination de l'œnologie.

L'hypothèse souvent reproduite, selon laquelle l'augmentation en vanilline au cours de la chauffe est due uniquement à la dégradation de la lignine doit être complétée, car les précurseurs galloylglucosides isolés peuvent aussi participer à la production de composés odorants.

La méthode de dosage des précurseurs, VGG, TMPGG et macarangioside E pourrait être encore améliorée pour pouvoir diminuer les limites de détection et de quantification dans les vins. Cela pourrait être fait par pré-purification de l'échantillon sur cartouche SPE. Le laboratoire a récemment été équipé d'un système SPE automatique qui permettrait une standardisation et une forte répétabilité dans la préparation de l'échantillon. D'autre part, la

synthèse de la VGG, TMPGG et du macarangioside E deutéré permettrait également des mesures encore plus précises et plus fiables.

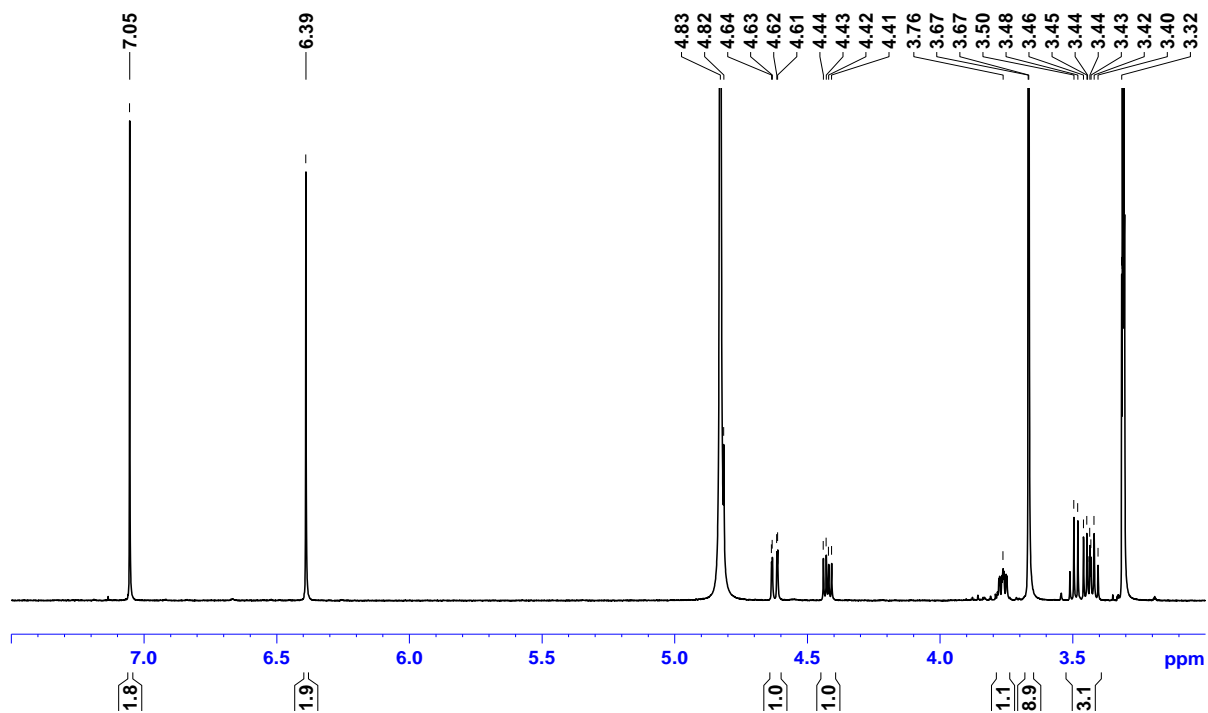
Enfin, l'identification des précurseurs du bois de chêne ouvre la porte à de futures études au niveau microbiologique. La capacité des différentes espèces levuriennes et bactériennes pourrait être évaluée. Ainsi la connaissance fine des précurseurs du bois de chêne permettra d'étudier les différentes capacités des souches d'*O. oeni* à libérer les arômes mises en évidence par Gagné *et al.* (2011). Les critères de sélection des levains selon l'activité glycosidase doivent être revus à la lumière de nos résultats.

Il s'agit de travaux très intéressants pour l'œnologie. Non seulement sur l'étude des capacités des microorganismes lors de la fermentation, mais aussi sur la persistance possible de ces levures ou bactéries au cours de l'élevage et du vieillissement. Les capacités de survie des microorganismes d'altération sont également un challenge d'avenir que ce travail permet d'aborder aussi.

# Annexes

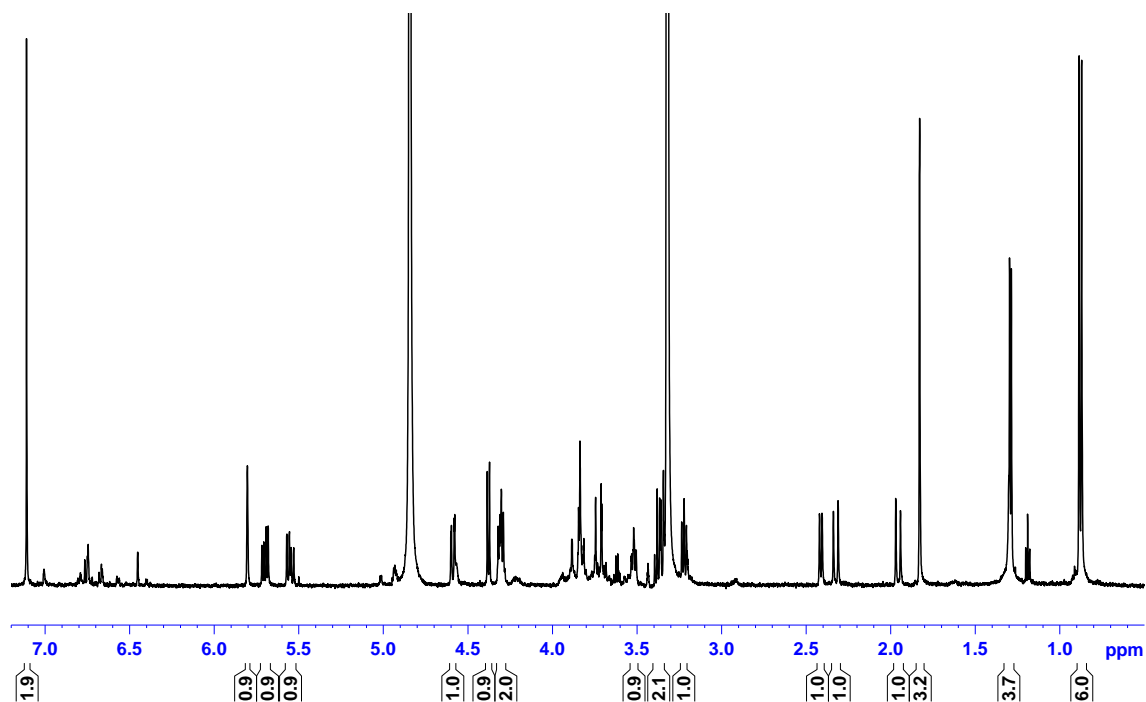
## Spectre proton du TMPGG acquis dans du MeOD.

trimethoxy-phenyl-galloyl-glucoside  
300K - methanol-d4  
16 dec 2011



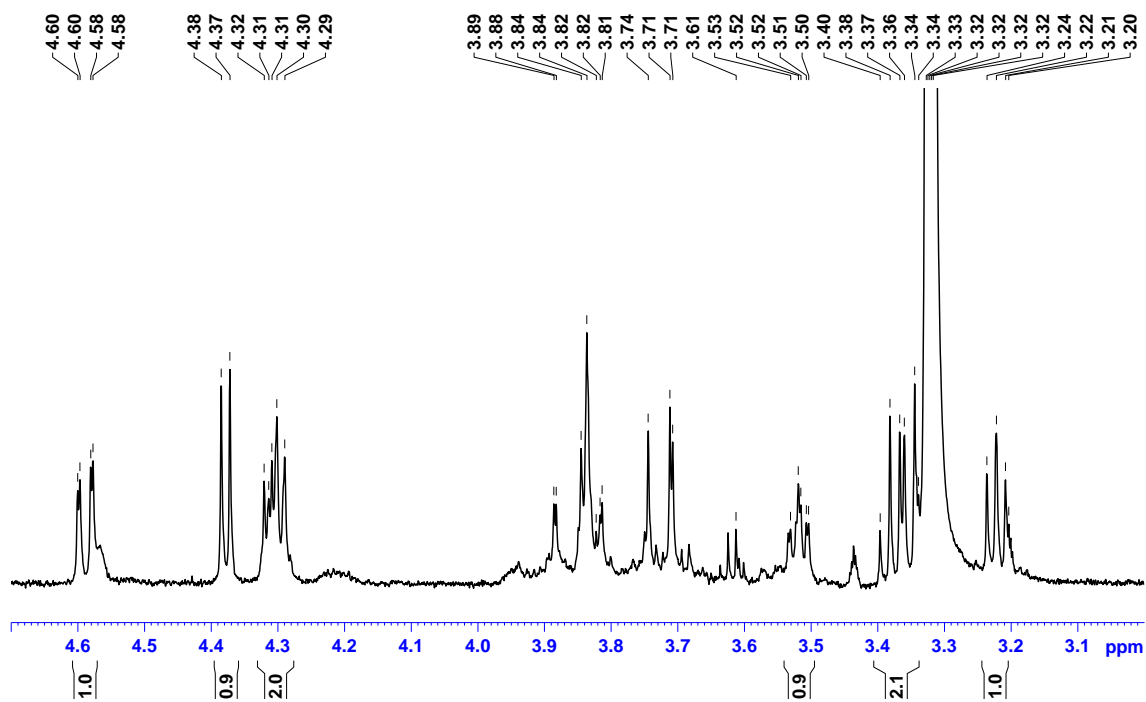
## Spectre proton du macarangioside E acquis dans du MeOD.

macarangioside E  
300K - methanol-d4  
le 19 janv 2011



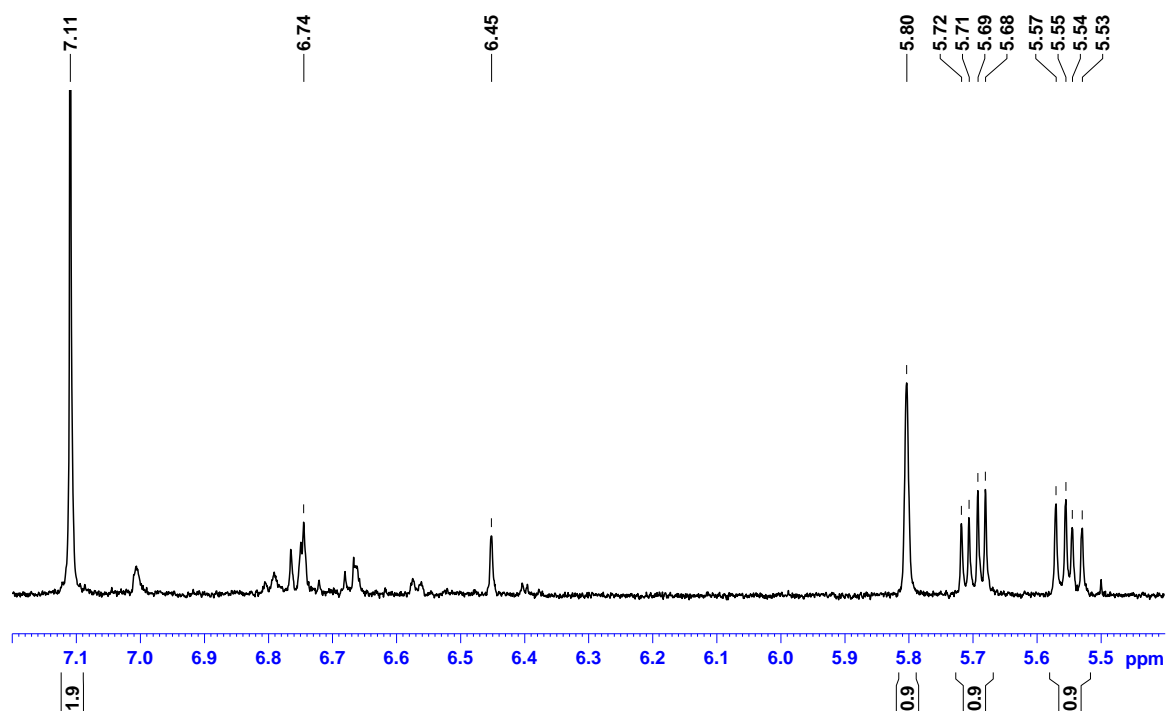
## Détail du sucre proton du macarangioside E

macarangioside E  
300K - methanol-d4  
le 19 janv 2011



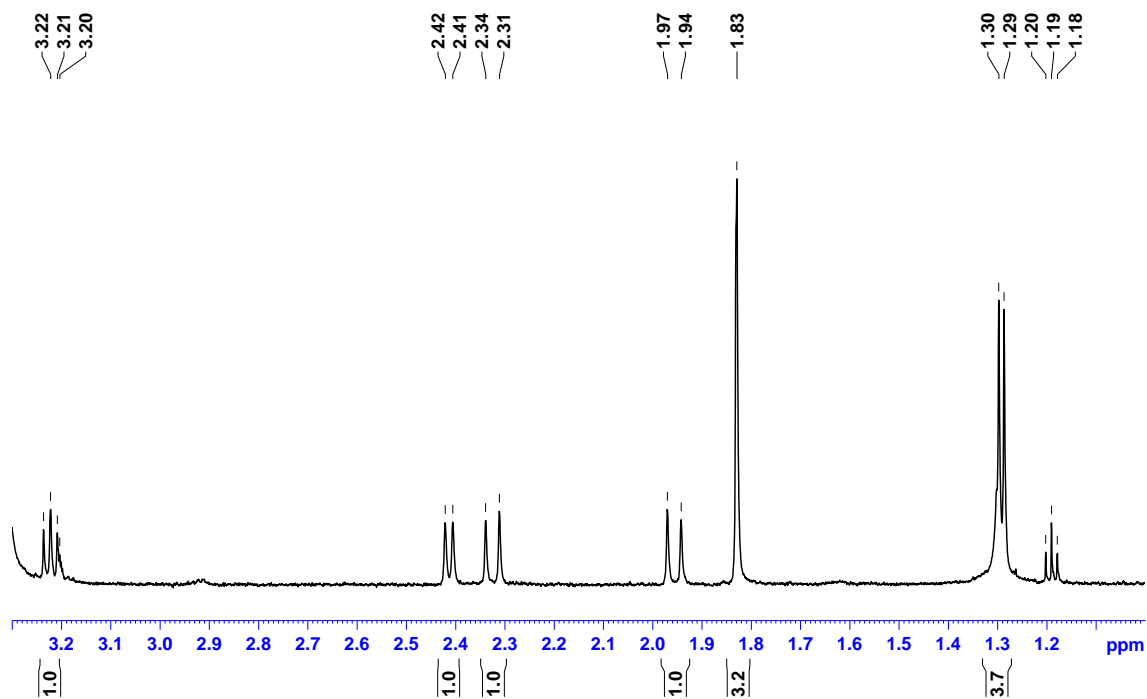
### Détail du spectre proton du macarangioside E, entre 7,1 et 5,5 ppm.

macarangioside E  
300K - methanol-d4  
le 19 janv 2011



### Détail du spectre proton du macarangioside E, entre 3,2 et 1,2 ppm.

macarangioside E  
300K - methanol-d4  
le 19 janv 2011



# Références bibliographiques

Aasen A.J., Bjarne K., Almqvist S.O., Enzell C. R. The structures of five isomeric megastigmatrienones. *Acta Chem. Scand.* **1972**, 26, 6, 2573-2576.

Aasen A.J., Kimland B., Enzell C.R. Structure and synthesis of 3-oxo- $\alpha$ -ionol, a new tobacco constituent. *Acta Chem. Scand.* **1971**, 25, 1481.

Acree T.E., Butts R.M., Nelson R.R., Lee C.Y. Sniffer to determine the odor of gas chromatographic effluents. *Anal. Chem.* **1976**, 48, 1821-1822.

Alluis B., Dangles O., Quercetin glycosides and sulfates: chemical synthesis complexation and antioxidant properties. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, 82, 2201-2210.

Alteyrac J., Augagneur S., Medina B., Vivas N., Glories Y. Mise au point d'une méthode de dosage des éléments minéraux du bois de chêne par ablation laser ICP-MS. *Analisis.* **1995**, 23, 523-526.

Arapitsas P., Antonopoulos A., Stefanou E., Dourtoglou V.G. Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chem.* **2004**, 86, 563-570.

Arramon G., Saucier C., Colombani D., Glories Y. Identification of Triterpene Saponins in *Quercus robur* L. and *Q. petraea* Liebl. Heartwood by LC-ESI/MS and NMR. *Phytochem. Anal.* **2002**, 13, 305-310.

Atanasova B., Danguin T.T., Langlois D., Nicklaus S., Etievant P. Perceptual interaction between fruity and woody notes of wine. *Flavour Fragr. J.* **2004**, 19, 476-482.

Barbagallo R.N., Spagna G., Palmeri R., Torriani S. Assessment of  $\beta$ -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enz. Microb. Technol.* **2004**, 34, 292-296.

Barbe J.C & Bertrand A. Quantitative analysis of volatile compounds stemming from oak wood. *J. Sci. Tech. Tonnellerie.* **1996**, 2, 77-88.



Bax A., Summers M.F.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 2093-2094.

Berger R.G., Drawert F. Glycosylation of terpenols and aromatic alcohols by cell suspension cultures of peppermint (*Mentha piperita* L.) *Z. Naturforsch.* **1988**, 43c, 485-490.

Bisson J., Poupard P., Pawlus A.D., Pons A., Darriet P., Mérillon J.M., Waffo-Téguo P. Development of hybrid systems for efficient purification of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chrom. A.* **2011**, 36, 6079-6084.

Bitteur S., Günata Z., Brillouet J.M., Bayonove C., Cordonnier R. GC and HPLC of grape monoterpenyl glycosides. *J. Sci. Food Agric.* **1989**, 47, 341-352.

Black, R.A., Rosen A.A., Adams. S.L. The chromatographic separation of hardwood extractive components giving color with phloroglucinol. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 5344-5346.

Bloem A. Activités glycosidases chez *Oenococcus oeni* : importance dans la libération de la vanilline à partir de bois de chêne. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux II. **2005**.

Bloem A., Lonvaud A., Bertrand A., de Revel G. Ability of *Oenococcus oeni* to influence vanillin levels. *Developments in food science.* **2006**, 43, 137-140.

Bloem A., Lonvaud-Funel A., de Revel G. Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* **2008**, 25, 99-104.

Bodenhausen G. & Ruben D.J. Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 69, 185-189.

Boido E., Lloret A., Medina K., Carrau F., Dellacassa E. Effect of  $\beta$ -glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2344-2349.

Boidron J.N., Chatonnet P., Pons M. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Conn. Vigne et vin.* **1988**, 22, 275-294.

Bothner-By A.A., Stephens R.L., Lee J.M., Warren C.D., Jeanloz R.W. Structure determination of a tetrasaccharide : transient nuclear overhauser effects in the rotating frame. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 811-813.

Camus A. Les Chênes. Monographie du Genre *Quercus*. 2 vols. Lechevalier and Fils, Paris (1936-1938)

Capaldo A., Walker M.E., Ford C.M., Jiranek V.  $\beta$ -Glucoside metabolism in *Oenococcus oeni*: cloning and characterization of the phospho- $\beta$ -glucosidase bgID. *Food Chem.* **2011**, 125, 476-482.

Chassagne D., Crouzet J., Baumes R.L., Lepoutre J.P., Bayonove C. L. Determination of trifluoroacetylated glycosides by gas chromatography coupled to methane negative chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 694, 441-451.

Chassagne, D., Crouzet, J. C., Bayonove, C. L., Brillouet, J. M., & Baumes, R. L. (). 6-O-a-L-arabinopyranosyl-b-D-glucopyranosides as aroma precursors from passion fruit. *Phytochemistry* **1996**, 41, 1497–1500.

Chassagne D., Crouzet J., Bayonove C.L., Baumes R.L. Glycosidically bound eugenol and methyl salicylate in the fruit of edible *Passiflora* species. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2685-2689.

Chatonnet P., Boidron J.N., Dubourdiou D. Nature et évolution de la microflore du bois de chêne au cours de son séchage et de son vieillissement à l'air libre. *J. Int. Sci. Vigne vin* **1994**, 28, 181-201.

Chatonnet P. Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins. Diplôme d'étude et de recherche de l'Université de Bordeaux II. **1991**.

Chatonnet P. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et les qualités des vins élevés en futs de chêne. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux II. **1995**.

Chatonnet P., Dubourdiou D., Boidron J.N. Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sci. Aliments* **1992**, 12, 666-685.

Chávez R., Bull P., Eyzaguirre J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J. Biotechnol.* **2006**, 123, 413–433.

Cometto-Muñiz J.E. & Abraham M.H. Human olfactory detection of homologous n-alcohols measured via concentration- response functions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2008**, 89, 279-291.

Cordonnier R., Bayonove C. Mise en évidence dans la baie de raisin, variété Muscat d'Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *C.R. Acad. Sci., Paris, Sér. D.* 278, 3387-3390. **1974**.

Cutzach I., Chatonnet P., Henry R., Dubourdieu D. Identification of Volatile Compounds with a "Toasty" Aroma in Heated Oak Used in Barrelmaking. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2217-2224.

Cutzach I., Chatonnet P., Henry R., Dubourdieu D. Identifying new volatile compounds in toasted oak. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1663-1667.

Darriet P., Boidron J.N., Dubordieu D. L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du muscat à petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*. *Connaiss. Vigne vin* **1988**, 189-195.

Delcroix A., Günata Z., Sapis J., Salomon J.M., Bayonove C. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, 45, 291–296.

de Revel G., Martin N., Pripis-Nicolau L., Lonvaud-Funel A., Bertrand A. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4003-4008.

de Revel G. Fermentation malolactique. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **2002**, n° hors série, 7-16.

de Revel G., Bloem A., Augustin M., Lonvaud-Funel A., Bertrand A. Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiol.* **2005**, 22, 569-575.

D'Incecco N., Bartowsky E., Kassara S., Lante A., Spettoli P., Henschke P. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.* **2004**, 21, 257–265.

Ducruet J. Effect of storage mode at the time of malolactic fermentation on the quality of red wines. *J. Sci. Tech. Tonnelerie*. **1997**, 3, 67-71.

Dufour C., Bayonove C. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 671-677.

Dungey K.A., Hayasaka Y., Wilkinson K.L. Quantitative analysis of glycoconjugate precursors of guaiacol in smoke-affected grapes using liquid chromatography–tandem mass spectrometry based stable isotope dilution analysis. *Food Chem.* **2011**, 126, 801-806.

Du Plessis H.W., Steger C.L.C., du Toit M., Lambrechts M.G. The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, 92, 1005-1013.

Flanzy C. *Enología Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. AMV-Mundi Prensa, Madrid, Spain. 137–168, **2003**.

Fernández de Simón B., Cadahía E., del Álamo M., Nevares I. Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 660, 211-220.

Foucault A.P., Chevotot L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 808, 3-22.

Fudge A.L., Elsey G.M., Hayasaka Y., Wilkinson K.L. Quantitative analysis of  $\beta$ -d-glucopyranoside of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid, a potential precursor to *cis*-oak lactone, in oak extracts using liquid chromatography–tandem mass spectrometry based stable isotope dilution analysis. *J. Chromatogr. A.* **2008**, 1215, 51-56.

Fujimori T., Kasuga R., Matsushita H., Kaneki H., Noguchi M. Neutral aroma constituents in burley tobacco. *Agric. Biol. Chem.* **1976**, 40, 303-315.

Gagné S., Lucas P. M., Perello M. C., Claisse O., Lonvaud-funel A., de Revel G. Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, 110, 218-228.

Galland S., Mora N., Abert-Vian M., Rakotomanomana N., Dangles O. Chemical synthesis of hydroxycinnamic acid glucosides and evaluation of their ability to stabilize natural colors via anthocyanin copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 7573-7579.

Gambaro A., Boido E., Zlotejablko A., Medina K., Lloret A., Dellacassa E., Carrau F., Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2001**, 7, 27-32.

Gómez García-Carpintero E., Gómez Gallego M.A., Sánchez-Palomo E., González Viñas M.A. Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chem.* **2012**, 134, 851-863.

Goring D.A.I. Thermal softening of lignin, hemicellulose and cellulose. *Pulp paper mag. Can.* **1963**, 64, 517-527.

Grimaldi A., McLean H., Jiranek V. Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, 362-369.

Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V.A. Survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, 105, 233-244.

Guchu E., Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S., Viñas G., Ibáñez C. Volatile composition and sensory characteristics of Chardonnay wines treated with American and Hungarian oak chips. *Food Chem.* **2006**, 99, 350-359.

Guymon J.F., Crowell E.A. Separation of vanillin, syringaldehyde, and other aromatic compounds in the extracts of French and American oak woods by brandy and aqueous alcohol solutions. *Qual. Plant. Mater. Veg.* **1968**, 16, 320-333.

Gunata Y.Z., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier R. The aroma of grapes: extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* **1985a**, 331, 83-90.

Gunata Y.Z., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier R. The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv Muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1985b**, 36, 857-862.

Gunata Z., Bayonove C., Baumes R., Cordonnier R. stability of free and bound fractions of some aroma components of grape cv Muscat during the wine processing. *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, 37, 112-114.

Gunata Z., Blondeel C., Valiier M.J., Lepoutre J.P., Sapis J.C., Watanabe N. An endoglycosidase from grape berry skin of cv M. Alexandrie, hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 2748-2753.

Guth H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3027-3032.

Haluk J.P. Irmouli M. Les constituants polymers fixes du chene de tonnellerie: cellulose, hemicelluloses et lignine. *J. Sci. Tech. Tonnellerie* **1998**, 4, 1-41.

Hayasaka Y., Wilkinson K.L., Eley G.M., Sefton M.A. Identification of natural oak lactone precursors in extracts of American and French oak woods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 9195-9201.

Henick-Kling, T., Acree, T.E., Krieger S., Laurent, A., Edinger W.D. Modification of wine flavor by malolactic fermentation. *Wine yeast* **1994**, 4, 8-15 et 29-30.

Hernández-Orte P., Cersosimo M., Loscos N., Cacho J., Garcia-Moruni E., Ferreira V. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. *Food Chem.* **2008**, 107, 1064-1077.

Hodge J.E. Origin of flavor in foods: Nonenzymatic browning reactions. In *Chemistry and Physiology of Flavors*; H. W. Schultz; E. A. Day and L. M. Libbey, Eds.; AVI Publishing Company, Inc., Westport, CT, **1967**, 465-491.

Ibarz M.J., Ferreira V., Hernández-Orte P., Loscos N., Cacho J. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *J.Chromatogr. A.* **2006**, 1116, 217-229.

Ishimaru K., Nonaka G.I., Nishioka I. Phenolic glucoside gallates from *Quercus mongolica* and *Q. acutissima*. *Phytochemistry.* **1987**, 26, 1147-1152.

Jarauta I., Cacho J., Ferreira V. Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: an analytical study. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4166-4177.

Jourez B., Charron S., Quin G.P. Propriétés des merrains affinés dans une solution d'enzymes naturelles et destinés à la tonnellerie. *Ann. Forest. Sci.* **2003**, 60, 123-133.

Kanasawud P., Crouzet J.C. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1.  $\beta$ -Carotene degradation. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 237-243.

Keller R. Les chênes dans le monde les chênes de tonnellerie en France : *Quercus petrae* et *Quercus robur*. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1992**, n° hors série, 7-28.

Krammer, G., Winterhalter, P., Schwab, M., & Schreier, P. Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of Prunus species: Apricot (*P. armeniaca*, L.), peach (*P. persica*, L.), yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 778–781.

Koenigs W & Knorr E. Ueber einige Derivate des Traubenzuckers und der Galactose. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, 34, 957–981.

Köhler N., Wray V., Winterhalter P. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2008**, 1177, 114-125.

Leong G., Archavlis A., Derbesy M. Research on the glucoside fraction of the vanilla bean. *J. Ess. Oil. Res.* **1989**, 1, 33-41.

Lloyd R.A., Miller C.W., Roberts D.L., Giles J.A., Dickerson J.P., Nelson N.H., Rix C.E., Ayers P.H. Flue-cured tobacco flavour 1. Essence and essential oil components. *Tob. Sci.* **1976**, 20, 387-400.

Loscos N., Hernández-Orte P., Cacho J., Ferreira V. Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 6674-6684.

Loscos N., Hernández-Orte P., Cacho J., Ferreira V. Comparison of the suitability of different hydrolytic strategies to predict aroma potential of different grape varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 2468-2480.

Lytra G., Tempere S., de Revel G., Barbe J.C. Impact of perceptive interactions on red wine fruity aroma. *J. Agric. Food Chem.* Accepted **2013**.

Maga, J. A. Flavor contribution of wood in alcoholic beverages. In: *Progress in Flavour Research*. J. Adda (Ed.). Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam 409-416, **1984**.

Manzanares P., Ramón D., Querol A. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of  $\beta$ -D-xylosidase activity. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, 46, 105-112.

Marchal A., Waffo-Tégou P., Génin E., Mérillon J.M., Dubourdieu D. Identification of new natural sweet compounds in wine using centrifugal partition chromatography-gustatometry and Fourier transformation mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 9629-9637.

Marsal F., Sarre C., Dubourdieu D., Boidron J.N. Rôle de la levure dans la transformation de certains constituants volatils du bois de chêne au cours de l'élaboration en barrique des vins blancs secs. *Connaiss. Vigne Vin* **1988**, 22, 33-38.

Masson E., Baumes R., Le Guernevé C., Puech J.L. Identification of a precursor of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone in the wood of Sessile oak (*Quercus petrae* (Matt.) Liebl.). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 4306-4309.

Masson E., Baumes R., Puech J.L. Comparison of direct and indirect methods of measuring the precursors of  $\beta$ -methyl- $\gamma$ -octalactone and their application to the analysis of Sessile oak wood [*Quercus petrae* (Matt.) Liebl.]. *J. Chromatogr. A.* **2001**, 905, 183-191.

Masson G., Baumes R., Puech J.L., Razungles A. Demonstration of the presence of carotenoids in wood: Quantitative study of cooperage oak. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1649-1652.

Masson G., Moutounet M., Puech J.L. Ellagitannin content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, 262-268.

Matsunami K., Otsuka H., Kondo K., Shinzato T., Kawahata M., Yamaguchi K., Takeda Y. Absolute configuration of (+)-pinoresinol 4-O-[6''-O-galloyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside, macarangiosides E, and F isolated from the leaves of *Macaranga tanarius*. *Phytochem.* **2009**, 70, 1277-1285.

McMahon H., Zoecklein B.W., Fugelsang K., Jasinski Y. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 24, 123-129.

Michael, *Am. Chem. J.*, **1879**, 1, 355.



Michlmayr H., Wurbs P., Rogl V. A  $\beta$ -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 26, 1281–1289.

Michlmayr H., Schümann C., Kulbe K.D., Hierro A.M. Heterologously expressed family 51  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases from *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 1528-1531.

Mila I., Scalbert A., Hervé du Penhoat C., Expert D. Ellagitannins in Europe oak and chestnut : Iron deprivation and wood durability. In *Polyphenols 94*, Brouillard R., Jay M. and Scalbert A. (Eds.) INRA editions n° 69, Paris 365-366, **1995**.

Moio L., Schlich P., Etiévant P. Description de la typicité aromatique de vins de bourgogne issus du cépage Chardonnay. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **1993**, 27, 179-189.

Montenegro G., Gómez M., Casaubon G., Belancic A., Mujica A.M., Peña R.C. Analysis of volatile compounds in three unifloral native Chilean honeys. *Phyton.* **2009**, 78, 61-65.

Monties B. Les lignines. In : les polymères végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés. Paris Ed. Gauthier Villars, 122-155, **1980**.

Monties B. Composition chimique des bois de chêne: composés phénoliques, relation avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. *Connaissance Vigne Vin* **1987**, 21, 169-190.

Mosedale J.R., Feuillat F., Baumes R., Dupouey J.L., Puech J.L. Variability of wood extractives among *Quercus robur* and *Quercus petraea* trees from mixed stands and their relation to wood anatomy and leaf morphology. *Canadian Journal of Forest Research.* **1998**, 28, 994-1006.

Murayama W., Kobayashi T., Kosuge Y., Yano H., Nunogaki Y., Nunogaki K. A new centrifugal countercurrent chromatogram and its application. *J. Chromatogr.* **1982**, 239, 643-649.

Nabeta K., Yonekubo J., Miyake M. Analysis of volatile constituents of European and Japanese oaks. *Mokuzai Gakkaishi.* **1986**, 33, 408-415.

Nagayama K., Kumar A., Wuthrich K., Ernst R.R. Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **1980**, 40, 321-334.

NF EN ISO 8589 Mai 2010. Analyse sensorielle – Directives générales pour la conception de locaux destinés à l'analyse

Nishimura K., Onishi M., Masuda M., Koga K., Matsuyama R.. Reactions of wood components during maturation. *J.R. Piggott (Ed.), Flavour of distilled beverages: Origin and development, Ellis Horwood Limited, England.* 241–255, **1983**.

Nonaka G.I., Nishimura H., Nishioka I. Seven new phenol glucoside gallates from *Quercus stenophylla* Makino. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, 30, 2061-2067.

Nonier M.F., Vivas De Gaulejac N., Vivas N., Vitry C. Characterization of carotenoids and their degradation products in oak wood. Incidence on the flavor of wood. *C. R. Chimie.* **2004**, 7, 689-698.

Nonier M.F., Vivas De Gaulejac N., Vivas N., Vitry C. Glycosidically bound flavour compounds in *Quercus petrae* Liebl. wood. *Flavour Fragr. J.* **2005**, 20, 567-572.

Nonier M.F., Vivas N., Vivas de Gaulejac N., Absalon C., Soulie Ph., Fouquet E. Pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry of *Quercus sp.* Wood application to structural elucidation of macromolecules and aromatic profiles of different species. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **2006**, 75, 181-193.

Nonier M.F. Recherche sur les macromolécules du bois de chêne de tonnellerie interactions avec les flavan-3-ols des vins et les aldéhydes du bois de chêne. Thèse pour le doctorat de l'Université de Bordeaux I. **2007**.

Ohloff G. Importance of minor components in flavors and fragrances. *Perfum. Flavor.* **1978**, 3, 11-22.

Osorio C., Duque C., Batista-Viera F. Studies on aroma generation in lulo (*Solanum quitoense*): enzymatic hydrolysis of glycosides from leaves. *Food Chem.* **2003**, 81, 333-340.

Perez A. G., Cert A., Rios J., Olias J. M. Free and glycosidically bound volatile compounds from two banana cultivars, Valery and Pequena Enana. *J Agric Food Chem.* **1997**, 45, 4393–4397.

Peynaud E., Blouin J. Le gout du vin. DUNOD, 4<sup>ème</sup> édition, Paris, **2006**.

Petruzzi L., Bevilacqua A., Ciccarone C., Gambacorta G., Irlante G., Pati S., Sinigaglia M. Use of micro fungi in the treatment of oak chips: possible effects on wine. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, 90, 2617-2626.

Prida A., Ducouso A., Petit R.J., Nepveu G., Puech J.L. Variation in wood volatile compounds in a mixed oak stand: strong species and spatial differentiation in whisky-lactone content. *Ann. Sci. Forest* **2007**, 64, 313-320.

Puech J.L., Moutounet M. Liquid chromatographic determination of Scopoletin in hydroalcoholic extract of oak wood and distilled alcoholic beverages. *J. Assoc. Anal. Chem.* **1988**, 71, 512-514.

Puech, J.L. Influence du Bois de Chêne sur les Caractéristiques Analytiques des Eaux-de-Vie. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, Hors Série, 123-134.

Radovic B.S., Careri M., Mangia A., Musci M., Gerboles M., Anklam E. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chem.* **2001**, 72, 511-520.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. *Traité d'œnologie*. Tome I., Dunod, Paris, **1998**.

Renault J.H., Nuzillard J.M., Intes O., Maciuk A. Solvent systems. *Countercurrent chromatography- The support-free liquid stationary phase*. Ed: Berthod A. Elsevier Science B.V. Amsterdam. 49-83, **2002**.

Robinson A.L., Boss P.K., Heymann H., Solomon P.S., Trengove R.D. Development of a sensitive non-target method for characterizing the wine volatile profile using headspace solid-phase microextraction comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chrom. A.* **2011**, 1218, 504-517.

Rogersons F.S.S., Castro H., Fortunato N., Azevedo Z., Macedo A., De Freitas V.A.P. Chemicals with sweet aroma descriptors found in portuguese wines from the Duoro region: 2,6,6-trimethylcyclohex-2-ene-1,4-dione and diacetyl. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 263-269.

Romussi G., Parodi B., Pizza C., De Tommasi N. Constituents of fagaceae (Cupuliferae). XIX : Triterpene saponins and acylated flavonoids from *Quercus robur* L. var. *stenocarpa* Beck. *Arch Pharm.* **1994**, 327, 643-645.

Rosi I., Vinella M., Domizio P. Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.* **1994**, 77, 519-527.

Roulland C., Snackers G., Cantagrel R. Approche expérimentale du rôle des micro-organismes dans le processus de maturation des bois de tonnellerie. *J. Int. Sci Vigne Vin* **1999**, 33, 67-78.

Salagoity M.H., Tricard C., Sudraud P. Simultaneous analysis of aromatic aldehydes and coumarins with high pressure liquid chromatography. Application to wines and brandies stored in oak barrels. *J. Chromatogr.* **1987**, 392, 379-387.

Salagoity M.H. La Scopolétine: un marqueur de la conservation en fût de chêne. *J. Int. Sci. Vigne et Vin* **1992**, Hors série, 105-120.

Salles C., Essaïed H., Chalier P., Jallageas J.C., Crouzet J. Evidence and characterization of glycosidically bound volatile components in fruits. In *Bioflavour 87*; Schreier P., Ed. De Gruyter: Berlin, New York, 145-160, **1988**.

Sarry J.E., Gunata Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* **2004**, 87, 509-521.

Sauvageot F., Vivier P. Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four burgundy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, 48, 187-192.

Scalbert A., Monties B., Janin G. Comparaison des méthodes de dosage des tanins : application à différentes espèces. *Actes du 2eme colloque Sciences et Industries du bois*. Tome II, 261-268, **1987**.

Schoch W., Heller I., Schweingruber F.H., Kienast F. Wood anatomy of central European Species. **2004**. Online version: [www.woodanatomy.ch](http://www.woodanatomy.ch)

Sefton M.A., Francis I.L., Williams P.J. Volatile norisoprenoid compounds as constituents of oak woods used in wine and spirit maturation. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 2045-2049.

Sefton M.A., Francis I.L., Williams P.J. The volatile composition of chardonnay juices: A study by flavour precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, 44, 359-370.

Sefton M.A. Hydrolytically-released volatile secondary metabolites from a juice of *Vitis vinifera* grape cvs Merlot and Cabernet Sauvignon. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1998**, 4, 30-38.

Seikel M.K., Phenolics of *Quercus rubra*. *Phytochemistry.* **1971**, 10, 2249-2251.

Semiond D., Dautraix S., Desage M., Majdalani R., Casabianca H., Brazier J. L. Identification and isotopic analysis of safranal from supercritical fluid extraction and alcoholic extracts of saffron. *Anal. Lett.* **1996**, 29, 1027-1039.

Schwartz S. H., Qin X., Zeevaart J. A. D. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 25208.

Slacanin I., Marston A., Hostettmann K., Guédon D., Abbe P. The isolation of *eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography *Phytochem. Anal.* **1991**, 2, 137-142.

Sousa C., Mateus N., Silva A.M.S., González-Paramás A.M., Santos-Buelga C., de Freitas V. Structural and chromatic characterization of a new malvidin 3-glucoside-vanillyl-catechin pigment. *Food Chem.* **2007**, 102, 1344-1351.

Spillman P. J., Pollnitz A. P., Liacopoulos D., Skouroumounis G. K., Sefton M.A. The accumulation of vanillin during barrel-aging of white, red and model wines. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2584-2589.

Spillman P.J., Iland P.G., Sefton M.A. Accumulation of volatile oak compounds in a model wine stored in American and Limousin oak barrels. *Aust. J. of Grape Wine Res.* **1998a**, 4, 67-73.

Spillman P.J., Pollnitz A.P., Liacopoulos D., Pardon K.H., Sefton M.A. Formation and degradation of furfuryl alcohol, 5-methylfurfuryl alcohol, vanillyl alcohol, and their ethyl ethers in barrel-aged wines. *J. Agric. Food Chem.* **1998b**, 46, 657-663.

Skouroumounis G.K., Winterhalter P. Glycosidically bound norisoprenoids from *Vitis vinifera* cv Riesling leaves. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1068-1072.

Srivastava A., Jagan Mohan Rao L., Shivanandappa T. Isolation of ellegic acid from the aqueous extract of roots of *Decalepsis hamiltonii*: antioxidant activity and cytoprotective effect. *Food Chem.* **2007**, 103, 224-233.

Stahl-Biskup E, Intert F, Holthuijzen J, Stengele M, Schulz G Glycosidically bound volatiles- a review 1986-1991. *J. Flav. Frag.* **1993**, 8, 61-80.

Strauss R.C., Gooley P.R., Wilson B., Williams P.J. Application of droplet countercurrent chromatography to the analysis of conjugated forms of terpenoids, phenols, and other constituents of grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 519-524.

Strauss C.R., Wilson B., Williams P.J. 3-Oxo- $\alpha$ -ionol, vomifoliol and roseoside in *Vitis vinifera* fruit. *Phytochemistry.* **1987b**, 26, 1995-1997.

Tanaka T., Kouno I. Whiskylactone precursors from the wood of *Platycarya strobilacea*. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 997-999.

Terazawa M., Okuyama H., Miyake M. Phenolic compounds in living tissues of woods I Phenolic  $\beta$ -glucosides of 4-hydroxycinnamyl alcohol derivatives in the cambial sap of woods. *Mokuzai Gakkaishi* **1984**, 30, 322-328.

Toribbio A. Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt. Thèse pour le doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne. **2007**.

Towey J.P., Waterhouse A.L. The extraction of volatile compounds from French and American oak barrels in chardonnay during three successive vintages. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, 47, 167-172.

Ugliano M., Genovese A., Moio L. Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem.* **2003**, 51, 5073-5078

Ugliano M., Moio L. The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine. *J. Sci. Food. Agric.* **2006a**, 86, 2468-2476.

Ugliano M., Bartowsky E.J., McCarthy J., Moio L., Henschke P.A. Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeasts strains. *J. Agric. Food Chem.* **2006b**, 54, 6322-6331.

Vasserot Y., Christiaens H., Chemardin P., Arnaud A., Galzy P. Purification and properties of a  $\beta$ -glucosidase of *Hanseniaspora viniae* Van der Walt and Tschuschner with the view to its utilisation in fruit aroma liberation. *J. Appl. Bacteriol.* **1989**, 66, 271-279.

Vasserot Y., Chemardin P., Arnaud A., Galzy P. Evidence for the  $\beta$ -glucosidase activity and cellobiose fermentation by various *Kloeckera* strains. *Acta Biotechnol.* **1990**, 5, 439-445.

Vasserot, V., Arnaud, A., & Galzy, P. Monoterpenol glycosides in plants and their biotechnological transformation. *Acta Biotechnology*, **1995**, 15, 77-95.

Verotta L., Dell'Agli M., Giolito A., Guerrini M., Cabalion P., Bosisio E. In vitro antiplasmodial activity of extracts of *Tristaniopsis* species and identification of the active constituents: ellagic acid and 3,4,5-triméthoxyphenyl- (6'-O-galloyl)-O- $\beta$ -D-glucopyranoside. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 603-607.

Vivas N., Glories Y., Doneche B., Gueho E. Observation sur la microflore du bois de chêne (*Quercus* sp.) au cours de son séchage naturel. *Ann. Sci. Nat. Bot.* **1991**, 11, 149-153.

Vivas N., Glories Y. Etude de la flore fongique du chêne (*Quercus* sp.) caractéristique du séchage naturel des bois destinés à la tonnellerie. *Cryptogr. Mycol.* **1993**, 14, 127-148.

Vivas N., Lonvaud-Funel A., Glories Y., Augustin M. Incidence de la fermentation malolactique en barriques et en cuves sur la composition et la qualité des vins rouge. *J. Sc.i Technol. Tonnell.* **1995**, 1, 49-64.

Vivas N., Glories Y. étude et optimisation des phénomènes impliqués dans le séchage naturel du bois de chêne. *Rev. Fr. œnol.* **1996**, 158, 28-35.

Vivas N., Saint-Cricq De Gaulejac N., Doneche B., Glories Y. Incidence de la durée du séchage naturel de *Quercus petraea* Liebl. et *Quercus robur* L. sur la diversité de la flore fongique en place et sur quelques aspects de son écologie. *J. Sci. Technol. Tonnell.* **1997**, 3, 17-25.

Vivas N., Augustin M., Lonvaud-Funel A. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Ænococcus æni* (*Leuconostoc oenos*, 8413). *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1675-1678.

Voirin S., Baumes R., Bitteur S., Gunata Z., Bayonove C. Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1373-1378.

Voirin S.G., Baumes R.L., Gunata Z.Y., Bitteur S.M., Bayonove C.L., Tapiero C. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. I. XAD-2 extraction and gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic glycosides. *J. Chromatogr.* **1992a**, 590, 313-328.

Voirin S.G., Baumes R.L., Sapis J.-C., Bayonove C.L. Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatogr.* **1992b**, 595, 269-281.

Wei Y., Sardar M.R., Sutherland I.A., Fisher D. Separation of delphinidin-3-O-sambubioside, cyaniding-3-O-sambubioside and *p*-coumaric acid from cranberry by CCC followed by prep-HPLC using robotic CCC solvent system selection. *Chromatographia.* **2011**, 74, 367-373.

Weyerstahl P., Licha K. Synthesis and olfactory properties of the "Inverse" megastigmatienone and its analogs. *Liebigs Ann./Recueil.* **1997**, 1919-1924.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R. Use of C18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromatogr.* **1982**, 235, 471-480.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R. Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene  $\beta$ -D-glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, 30, 1219-1223.

Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B., Massy-Westropp R. Glycosides of 2-phenylethanol and benzyl alcohol in *Vitis vinifera* grapes. *Phytochemistry* **1983**, 22, 2039-2041.

Wills R.B.H, Scriven F.M. Metabolism of geraniol by apples in relation to the development of storage breakdown. *Phytochemistry* **1979**, 18, 785-786.

Williams P.J., Cynkar W., Francis I.L., Gray J.D., Iland P.G., Coombe B.G. Quantification of Glycosides in Grapes, Juices, and Wines through a Determination of Glycosyl Glucose. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 121-128

Wilkinson K.L., Elsey G.M., Prager R.H., Tanaka T., Sefton M.A. Precursors to oak lactone. Part 2: Synthesis, separation and cleavage of several  $\beta$ -D-glucopyranosides of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid. *Tetrahedron.* **2004**, 60, 6091-6100.



Wilson B., Strauss C.R., Williams P.J. Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing Muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, 32, 919-924.

Winterhalter P., Skouroumounis G.K. glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1997**, 55 , 73-105.

Winterhalter P., Sefton M.A., Williams P.J. Two-dimensional GC-DCCC analysis of the glycoconjugates of monoterpenes, norisoprenoids, and shikimate-derived metabolites from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38, 1041-1048.

Yukiko T., Chen F., Yasuda S., Fukushima K. Unexpected behaviour of coniferin in lignin biosynthesis. *Planta.* **2005**, 222, 58-69.

Yun B.S., Lee I.K., Kim J.P., Chung S.H., Shim G.S., Yoo I.D. Lipid peroxidation inhibitory activity of some constituents isolated from stem bark of *Eucalyptus globulus*. *Arch. Pharm. Res.* **2000**, 23, 147-150.

## RESUME

La présence d'un métabolisme actif des bactéries lactiques dans le vin logé en fûts de chêne induit une augmentation de la concentration des composés volatils du bois. Ce phénomène a récemment été attribué à l'activité glycosidique des bactéries. Le glucoside précurseur d'un composé majeur de l'arôme boisé (whiskylactone) a déjà été identifié et quantifié dans le bois de chêne. Mais aucune donnée n'était disponible jusqu'à présent concernant l'identification formelle des précurseurs pour d'autres arômes du bois de chêne.

Un premier travail a permis de montrer que les précurseurs monoglycosides n'existaient pas dans le bois de chêne, dans les spiritueux et dans le vin. L'étude a été réalisée à l'aide de la technique UPLC-FT/MS, en utilisant la vanilline- $\beta$ -D-glucopyranoside, la vanilline- $\beta$ -D-xylopyranoside, et la coniféraldéhyde- $\beta$ -D-glucopyranoside, synthétisées par réaction par transfert de phase.

Dans un deuxième temps, une purification des précurseurs glycosidiques complexes a été réalisée à l'aide de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) à partir d'un extrait de bois de chêne. Le choix du système de solvants a été basé sur une égale répartition dans les deux phases de la libération d'arômes par hydrolyse enzymatique. Cela a conduit à la détermination du nouveau concept de coefficient de partage d'activité  $K_{ca}$ . Après purification et fractionnement, la vanilline galloylglucoside, le triméthoxyphénol-galloylglucoside et le macarangioside E ont été isolés du bois et identifiés par HPLC-ESI-MS et RMN. Ces précurseurs ont été quantifiés dans différentes espèces de chêne par HPLC-QqQ-MS. Ces trois composés sont les précurseurs respectivement de la vanilline, du 3,4,5-triméthoxyphénol et du 3-oxo- $\alpha$ -ionol. Par dégradation thermique, le macarangioside E peut conduire à la mégastigmatriénone et à la 4-oxo-isophorone, dont les notes aromatiques sont le tabac et l'encens. Ces composés complètent la connaissance que nous avons de l'arôme boisé du vin et contribuent ainsi à une meilleure compréhension de la genèse du bouquet tertiaire.

**Mots clés :** Bois de chêne, chromatographie de partage centrifuge, précurseurs d'arôme, galloylglucosydes, vanilline, 3,4,5-triméthoxyphénol, 3-oxo- $\alpha$ -ionol, mégastigmatriénone.

## ABSTRACT

The presence of lactic acid bacteria (LAB) in oak barrels induces an increase in wood volatile compounds concentration. This phenomenon could be due to the glycosidic activity of LAB. The glucosidic precursor of a major woody aroma compound (oak lactone) was identified and quantified in oak wood but no data was available concerning the presence of other flavor precursors in oak wood.

This study showed that monoglycosidic precursors did not exist in oak, in spirits and in wines. The study was performed by UPLC-FT/MS, using vanillin- $\beta$ -D-glucopyranoside, vanillin- $\beta$ -D-xylopyranoside, and coniferaldehyde- $\beta$ -D-glucopyranoside as standards. These molecules were synthesized by phase transfer reaction.

Purification of a vanillin glycoside precursor was done by centrifugal partition chromatography (CPC). The choice of the solvent system was based on an equal distribution in both phases of the aromas released by enzymatic hydrolysis. This led to the determination of the new concept, the activity partition coefficient  $K_{ca}$ . After purification and fractionation, vanillin galloylglucoside, trimethoxyphenol-galloylglucoside and macarangioside E were isolated from wood and identified by HPLC-ESI-MS and NMR analysis. These precursors were quantified in different oak species by HPLC-QqQ-MS. These three compounds are precursors of vanillin, 3,4,5-trimethoxyphenol and 3-oxo- $\alpha$ -ionol respectively. The macarangioside E can lead by thermal degradation, to megastigmatrienone and 4-oxo-isophorone which have aromatic notes of tobacco and incense. These compounds are involved in the woody aroma of the wine and the genesis of the bouquet.

**Key words :** oak wood, centrifugal partition chromatography, aroma precursors, galloylglucoside, vanillin, 3,4,5-trimethoxyphenol, 3-oxo- $\alpha$ -ionol, megastigmatrienone.