



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE**

PREPAREE A l'Institut Universitaire de la Vigne de Vin, Jules Guyot

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologie UMRA 02 102

Equipe Physico Chimie des Aliments et du Vin

Ecole doctorale n°554

Ecole doctorale Environnements Santé

Doctorat en Sciences des Aliments

Par

Rémy ROMANET

Contribution à l'étude moléculaire de la stabilité oxydative des vins blancs de Bourgogne

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 4 Juillet 2019

Composition du Jury :

Mme Stéphanie MARCHAND	Maître de Conférences HDR, Université de Bordeaux	Rapporteur
M. Maurizio UGLIANO	Professeur, Université de Vérone	Rapporteur
M. Philippe JEANDET	Professeur, Université de Reims Champagne Ardennes	Examineur
M. Christian COELHO	Maitre de Conférences, Université de Bourgogne	Co-encadrant
Mme Maria NIKOLANTONAKI	Maitre de Conférences, Université de Bourgogne	Co-encadrant
M. Régis GOUGEON	Professeur, Université de Bourgogne	Directeur de thèse

Contribution à l'étude moléculaire de la stabilité oxydative des vins blancs de bourgogne

Mots clés : Vin blanc, Chardonnay, oxydation, DPPH, métabolomique

Résumé : Dans l'optique de comprendre et maîtriser le vieillissement des vins, en particulier des vins blancs, il est nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes physico-chimiques d'oxydation liés aux processus d'oxygénation. Pour cela, il est important d'avoir des outils permettant la quantification de la capacité antioxydante des vins blancs, et l'identification des composés impliqués dans celle-ci, afin de pouvoir anticiper l'aptitude au vieillissement d'un vin.

Lors de cette étude, des analyses de la capacité antioxydante par DPPH et Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) ont été réalisées sur un grand nombre de vins en cours d'élevage et issus de plusieurs millésimes. En parallèle des analyses métabolomiques, principalement par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (UPLC-Q-TOF-MS) mais également par Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions et à Transformée de Fourier (FT-ICR-MS) ont été réalisées.

L'optimisation de la méthode DPPH, pour l'analyse des vins blancs a révélé une réactivité importante des composés soufrés, avec des capacités antioxydantes similaires à celles des composés phénoliques. La comparaison de cette méthode optimisée à la méthode de référence du laboratoire (RPE) sur plus de 106 vins, a montré la complémentarité de l'information apportée par ces deux différentes méthodes de mesure de capacité antioxydante. Le traitement statistique des corrélations avec les analyses métabolomiques réalisées sur 287 vins a permis de révéler une liste de 380 marqueurs moléculaires associés à la capacité antioxydante des vins. Une méthode alternative de mesure du potentiel antioxydant des vins blancs a également été développée,

qui repose sur l'identification de composés nucléophiles présents et susceptibles de piéger les quinones formées au cours de mécanismes d'oxydation. Outre des composés soufrés, nous avons montré que différents peptides ayant des propriétés antioxydantes présentent de telles propriétés nucléophiles. Dans un second temps, l'étude de différentes pratiques œnologiques (élevage, hyperoxygénation ou sulfitage) a permis de déterminer leurs impacts sur la capacité antioxydante des vins mais également sur les marqueurs moléculaires associés. Il apparaît ainsi une augmentation significative de la capacité antioxydante des vins au cours de l'élevage. De plus, cette augmentation de la capacité antioxydante est associée à une consommation de peptides en début d'élevage, ainsi qu'à l'apparition de nouveaux composés dans les vins et ce indépendamment du millésime. Les composés qui apparaissent semblent être majoritairement des composés phénoliques provenant potentiellement du bois ou de l'autolyse des levures. Les vins issus de moûts protégés par l'ajout précoce de sulfites ont une capacité antioxydante plus élevée par rapport aux vins issus de moûts hyperoxygénés. De plus, la protection du moût a un impact important sur la composante moléculaire soufrée retrouvée dans les vins. Ainsi, il a été observé une quantité beaucoup plus faible de composés soufrés (peptides ou non) dans les vins issus de moûts hyperoxygénés montrant donc une consommation de ces composés dans les mécanismes d'oxydation du vin. En résumé, ces résultats révèlent pour la première fois l'importance des composés soufrés dans les mécanismes de protection des vins blancs de Bourgogne vis-à-vis de l'oxydation, par leur capacité de piègeur de radicaux mais également de piègeur de quinones.

Contribution to the molecular study of the oxidative stability of white wines from Burgundy

Keywords: White wines, Chardonnay, oxidation, DPPH, metabolomics

Abstract: In order to understand and control the aging of wines, particularly white wines, it is necessary to deepen our knowledge about the physico-chemical mechanisms of oxidation related to oxygenation processes. For this, it is important to have tools to quantify the antioxidant capacity of white wines, and to identify the compounds involved, in order to anticipate the aging ability of a wine.

In this study, analyzes of the antioxidant capacity by DPPH and Electron Paramagnetic Resonance (EPR) were carried out on a large number of wines during aging and from several vintages, in parallel with metabolomic analyzes, mainly carried out by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) but also by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR-MS).

Optimization of the DPPH method for the analysis of white wines, showed a high reactivity of sulfur compounds with similar antioxidant capacities to those of phenolic compounds. The comparison of this optimized method with the laboratory reference method (EPR) on more than 106 wines, showed the complementarity of the information provided by these two different methods of measuring an antioxidant capacity.

Combining antioxidant capacity measurements and metabolomic analyzes, it was possible to determine a list of molecular markers related to the antioxidant capacity of white wines. During this study, a focus on nucleophilic compounds present in wines has also been realized, these compounds being able to react with the

quinones formed during oxidation and thus to play a role in the oxidation mechanisms of white wines. Besides sulfur compounds, we showed that several peptides with antioxidant properties could exhibit such nucleophilic behavior. In a second step, the study of different oenological practices (aging, hyperoxygenation or adding SO₂ to must) allowed to determine their impacts on the antioxidant capacity of wines but also on the associated molecular markers. It thus appears a significant increase in the antioxidant capacity of the wines during aging. In addition, this increase in antioxidant capacity is associated with a consumption of peptides at the beginning of aging, but also with the appearance of compounds in wines, regardless of the vintage. The compounds that appear are potentially phenolic compounds which can come from wood or lees autolysis. Wines from protected musts with sulfites addition, have a higher antioxidant capacity compared to wines from hyperoxygenated musts. In addition, the protection of musts has a significant impact on the sulfur component found in wines. Thus, a much smaller amount of sulfur compounds (peptides or not) has been observed in wines derived from hyperoxygenated musts, showing a consumption of these compounds in the oxidation mechanisms. Overall, these results reveal for the first time the importance of sulfur compounds in the mechanisms of protection of white wines from Burgundy against oxidation, by radical scavenging capacity and quinone trapping.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR Procédé Alimentaire et Microbiologique (PAM) dans l'équipe Physico-Chimie des Aliments et du Vin (PCAV) à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV) de Dijon.

Je remercie les financeurs de ce projet sans qui celui-ci n'aurait pas été possible, la région Bourgogne, le FEDER ainsi que le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB), mais également les domaines qui ont permis cette étude par un don d'échantillons : le domaine Chanson, le Domaine Olivier Leflaive, la Maison Albert Bichot, le domaine Bonneau du Martray, le domaine Leflaive, le domaine Prieur ainsi que le BIVB.

Je remercie chaleureusement Regis Gougeon, Maria Nikolantonaki et Christian Coelho de m'avoir fait confiance et permis de réaliser ce travail de thèse. Je les remercie également pour leur aide et leur soutien au cours de ces 3 années. Ce projet ne s'étant pas déroulé comme prévu, à force de persévérance, nous l'avons mené à bien.

Je tiens également à remercier Philippe Jeandet, Maurizio Ugliano ainsi que Stéphanie Marchand d'avoir accepté d'évaluer mon travail, c'est un véritable honneur. Je remercie Philippe Cayot, Elias Bou Maroun et Philippe Schmitt Kopplin pour leur participation aux comités de suivi de thèse. Merci plus particulièrement à Philippe Schmitt Kopplin pour ta gentillesse et ton accueil chaleureux à Munich. Je tiens également à remercier Sarah Foley et Bruno Cardey qui m'ont encadré lors de mes stages de licence et de master et m'ont donné envie de poursuivre en thèse.

Merci à l'ensemble des membres de l'IUVV pour leur accueil. Merci Laurence pour ta disponibilité et Franck, pour tes coups de mains pour le « bricolage » ainsi que ta bonne humeur au quotidien. J'ai également pris un réel plaisir lors des vendanges du domaine de l'université qui se déroulent toujours dans la joie et la bonne humeur. Merci à tous les doctorants et post-doc (Cédric, Cédric, Youzhong, Jana, Antoine (mon ami), Craquotte, Scotty999, Fred, Neuneu, Florian, Hany, Pablo, Manon, Alexis, Seb, Thierry, Elissar, Fanny, David et Nolween) pour les échanges scientifiques et pas que. Je remercie tout particulièrement Youzhong (Maitre) pour avoir toujours été disponible pour m'aider (nous aider) que ce soit en programmation ou pour du traitement de données, toujours avec gentillesse et sourire (Félicitations ! Très intelligent !). Merci pour ces bons moments passés au labo ou non, la St Patrick (tu veux une moustache Fred ?), le Movember, les dégustations, les soirées Tuches, le jardin (oui Pablo avec plein de

fleurs), les 3 Brasseurs, les Copains de Corton, la méthyl cellulose, les parties de molky et tout ce que j'oublie. Merci à vous d'être devenu des amis.

Pour finir, je tiens à remercier mes proches. Merci à tous les membres de l'US Arbois, même si c'était difficile de venir aux entraînements, ça a toujours été un plaisir de jouer avec les copains le week end (même contre Chenôve). Merci à ma famille pour le soutien au cours de ces 3 ans et plus particulièrement mes parents, car si je suis là aujourd'hui c'est grâce à vous ! Bien sûr, merci et félicitations à Eléonore pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de cette aventure, en particulier durant la rédaction. Merci pour ton amour.

Table des matières

Liste des travaux	I
1. Articles publiés	I
2. Articles soumis	I
3. Présentations orales et posters	I
Liste des abréviations	III
Introduction générale	1
Etude bibliographique	5
1. Qu'est-ce que la stabilité oxydative des vins blancs ?	6
1.1. Effet du vieillissement sur les propriétés organoleptiques du vin blanc	6
1.1.1. Impact du vieillissement	6
1.1.2. Du vieillissement à un état oxydé	7
1.2. Mécanismes d'oxydation	8
1.2.1. Rôle de l'oxygène	8
1.2.2. Processus d'activation de l'oxydation	9
1.2.3. Composés antioxydants du vin	13
1.3. Facteurs impactant la capacité antioxydante du Chardonnay	18
1.3.1. Opérations pré-fermentaires	18
1.3.2. Elevage	20
2. Détermination de la capacité antioxydante du vin	22
2.1. Voltamétrie	24
2.2. Principe de la méthode DPPH	25
2.3. Analyse à l'aide de la RPE	26
3. Analyse moléculaire des vins : métabolomique	29
3.1. Approche ciblée	30
3.1.1. Chromatographie gazeuse	30
3.1.2. Chromatographie liquide	30
3.2. Principe de la métabolomique	31
3.3. Méthode analytique	32
3.3.1. Spectrométrie de masse	32
3.4. Traitement de données de spectrométrie de masse	34
3.4.1. Analyses Statistiques	35
3.4.2. Identification des métabolites d'intérêts	38
3.5. Cas spécial des composés soufrés : dérivatisation	42
Objectifs	45

Matériels et Méthodes	47
1. Solvants et réactifs	48
2. Echantillonnage	48
2.1. Vins analysés en cours d'élevage	49
2.1.1. Vins utilisés pour l'analyse de l'effet de l'élevage	49
2.1.2. Vins utilisés pour l'étude des pratiques pré-fermentaires	49
2.1.3. Autres vins suivis pendant l'élevage	50
2.2. Vins issus d'une verticale	51
3. Analyse de la capacité antioxydante	52
3.1. Analyse DPPH	52
3.2. Analyse par RPE	53
4. Analyses métabolomiques	55
4.1. Analyse par LC-MS	55
4.1.1. Analyse standardisée « SOP »	55
4.1.2. Workflow pour le traitement de données LC-MS	56
4.1.3. Analyse des composés nucléophiles	57
4.2. Analyse par FT-ICR-MS	58
4.2.1. Acquisition de données	58
4.2.2. Traitement de données FT-ICR-MS	59
4.3. Identifications des masses détectées	59
5. Détermination des marqueurs moléculaire corrélés à la capacité antioxydante	60
Résultats et discussions	61
Partie 1 : Développement Méthodologique	63
Chapitre 1 : Analyse de la capacité antioxydante de vins blancs	65
1. Analyse de la capacité antioxydante de vins blancs à l'aide de la méthode DPPH	65
2. Complémentarité des méthodes DPPH et RPE	77
2.1. Utilisation de la méthode RPE	77
2.2. Comparaison des méthodes RPE et DPPH	79
2.3. Caractérisation moléculaire des composés corrélés aux méthodes DPPH et RPE	80
2.4. Discrimination des vins en fonction de leur capacité antioxydante	84
Chapitre 2 : Marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante des vins blancs	87
Chapitre 3 : Analyse non ciblée des composés nucléophiles du vin par LC-QToF-MS	93
1. Développement de méthode de dérivation	93
2. Isolation de composés nucléophiles du vin blanc	123

3. Comparaison aux marqueurs moléculaires corrélés à la capacité antioxydante	123
<i>Partie 2 : Etude de l'impact de différentes pratiques œnologiques sur la stabilité oxydative des vins blancs</i>	125
<i>Chapitre 4 : Effet de l'élevage</i>	127
1. Impact de l'élevage sur la capacité antioxydante des vins blancs	127
2. Evolution des marqueurs moléculaires impliqués dans la stabilité oxydative des vins	129
3. Evolution des composés nucléophiles au cours de l'élevage	133
<i>Chapitre 5 : Effet de différentes pratiques pré-fermentaires</i>	137
1. Evolution de la capacité antioxydante des vins en fonction du sulfitage ou de l'hydroxygénation du moût	137
2. Impact du sulfitage et de l'hydroxygénation du moût sur les marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante	139
3. Modifications de la teneur en composés nucléophiles du vin par la protection ou l'oxydation du moût	142
<i>Conclusions et perspectives</i>	147
<i>Références bibliographiques</i>	153
<i>Table des illustrations</i>	163
<i>Annexes</i>	169

Liste des travaux

1. Articles publiés

- Romanet, R.; Coelho, C.; Liu, Y.; Bahut, F.; Ballester, J.; Nikolantonaki, M.; Gougeon, R.D. The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds: An Optimized DPPH Assay. *Molecules* **2019**, *24*, 1353.
- Bahut, F. ; Lui, Y. ; Romanet, R. ; Coelho, C. ; Sieczkowski, N. ; Alexandre, H. ; Schmitt-Kopplin, P. ; Nikolantonaki, M. ; Gougeon, R.D. Metabolic diversity conveyed by the process leading to glutathione accumulation in inactivated dry yeast: a synthetic media study

2. Articles soumis

- Romanet, R. ; Bahut, F. ; Nikolantonaki, M. ; Gougeon, R.D. Molecular characterization of white wines nucleophilic potential by ultra high performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Analytical Chemistry*

3. Présentations orales et posters

- Romanet, R ; Coelho, C ; Nikolantonaki, M. ; Gougeon, R.D. Contribution à l'étude moléculaire de la stabilité oxydative des vins blancs de Bourgogne. FJC 2016, Dijon, France (Poster)
- Romanet, R ; Coelho, C ; Nikolantonaki, M. ; Gougeon, R.D. Revisiting the DPPH assay for measuring the antioxidant potential of white wine active compounds. Wine Active Compound (WAC) 2017, Beaune, France (Poster)
- Romanet, R ; Ben Chaaben, A. ; Coelho, C ; Nikolantonaki, M. ; Gougeon, R.D. Oxidative stability indices of dry white wines: comparison between DPPH assay, ESR measurements and sensory analysis. In *Vino Analytical Scientia (IVAS) 2017*, Salamanca, Espagne (Poster)
- Romanet, R ; Coelho, C ; Nikolantonaki, M. ; Gougeon, R.D. Contribution à l'étude moléculaire de la stabilité oxydative des vins blancs de Bourgogne. FJC 2018, Besançon, France (Oral)

- Romanet, R ; Bahut, F. ; Nikolantonaki, M. ; Gougeon, R.D. Molecular characterization of wines nucleophilic potential by ultra-performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry. IVAS 2019, Bordeaux, France (Oral)

Liste des abréviations

<i>Abréviations</i>	<i>Définitions</i>
<i>AAPH</i>	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
<i>ABTS</i>	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<i>ACP</i>	Analyse en Composante Principale
<i>APCI</i>	Ionisation chimique à pression atmosphérique
<i>APPI</i>	Photoionisation à pression atmosphérique
<i>BIVB</i>	Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne
<i>BMPO</i>	5-tert-butoxycarbonyl 5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde
<i>CAH</i>	Cluster Ascendant Hiérarchique
<i>CUPRAC</i>	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
<i>Cys</i>	Cystéine
<i>DESI</i>	Désorption-electrospray
<i>DIOS</i>	Désorption-ionisation laser sur silicium poreux
<i>DMPO</i>	5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde
<i>DPPH</i>	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
<i>Ec₂₀</i>	Quantité permettant à réduire de 20% la concentration initiale de DPPH
<i>Ec₅₀</i>	Quantité permettant à réduire de 50% la concentration initiale de DPPH
<i>EMPO</i>	5-éthoxycarbonyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde
<i>ERO</i>	Espèces réactives de l'oxygène
<i>ESI</i>	Sources électrospray
<i>EtOH</i>	Ethanol
<i>fin FA</i>	Fin de Fermentation Alcoolique
<i>FRAP</i>	Ferric Reducing Antioxidant Power
<i>FT-ICR-MS</i>	Spectrométrie de Masse à Transformée de Fourier à Résonance Cyclonique Ionique
<i>FWHM</i>	Full Width at Half Maximum peak height
<i>GC-MS</i>	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
<i>GRP</i>	Grape Reaction Product
<i>GSH</i>	Glutathion
<i>HCys</i>	Homocystéine
<i>HER</i>	Radical hydroxy-éthyle
<i>HO₂[•]</i>	Radical hydroperoxyde
<i>HSO₃⁻</i>	Anion bisulfite
<i>KEGG</i>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
<i>LC-QToF-MS</i>	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse à Temps de Vol
<i>m/z</i>	Rapport Masse sur Charge
<i>m/z-TR</i>	Couple Masse-Temps de Rétention

<i>MALDI</i>	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
<i>Max</i>	Maximum
<i>MS</i>	Spectrométrie de Masse
<i>MS²</i>	Spectrométrie de Masse Tandem
<i>OIV</i>	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
<i>ORAC</i>	Oxygen Radical Absorption Capacity
<i>OTR</i>	Oxygen Transmission Rate
<i>PBN</i>	l'α-phényl-N-tert-butylnitron
<i>PDO</i>	horseradish peroxydase
<i>PLS</i>	Partial Least Square
<i>PLS-DA</i>	Analyse Discriminante PLS
<i>POBN</i>	α-(4-Pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitron
<i>PPO</i>	Polyphénol oxydase
<i>Q</i>	4-méthyl-1,2-benzoquinone
<i>QC</i>	Quality Control
<i>RMN</i>	Résonance magnétique nucléaire
<i>RPE</i>	Résonance Paramagnétique Electronique
<i>SO₂</i>	Sulfites
<i>SO₃^{•-}</i>	Radical bisulfite
<i>SO₄^{•-}</i>	Radical sulfate
<i>SO₅^{•-}</i>	Radical peroxomonosulfate
<i>TE</i>	Transfert d'électron
<i>TR</i>	Temps de Rétention
<i>T_{Max}</i>	Temps au Maximum
<i>ToF</i>	Temps de Vol
<i>TP</i>	Transfert de proton
<i>TRAP</i>	Total Peroxyl Radical Trapping antioxidant parameter
<i>UHPLC</i>	Chromatographie Liquide à Ultra Haute Pression
<i>YMDB</i>	Yeast Metabolome Database

Introduction générale

La France est le deuxième producteur mondial de vins, après l'Italie, avec 44 millions d'hectolitres produits en moyenne entre 2014 et 2018 (OIV). La Bourgogne représente 4% du vignoble français, avec une production moyenne de 1,41 millions d'hectolitres, entre 2013 et 2017. Les deux principaux cépages bourguignons sont le Chardonnay et le Pinot Noir représentant 50% et 41% de l'encépagement régional¹. Avec près de 60% de la production, les vins blancs de Bourgogne sont mondialement reconnus pour leurs qualités organoleptiques avec des appellations de prestige telles que Corton-Charlemagne, Puligny-Montrachet ou encore Meursault. Un seul cépage, le Chardonnay, est capable de conduire à une diversité aromatique importante avec des vins très différents d'une appellation à une autre. Ces différences sont dues non seulement aux caractéristiques du lieu où est produit le raisin, mais également au travail du vigneron, via les différentes pratiques œnologiques utilisées. Les vins blancs de Bourgogne ont également de remarquables potentiels de garde, qui leur permet d'atteindre un optimum organoleptique après plusieurs années, voire plusieurs décennies. En revanche, depuis plus de 25 ans, ces vins sont confrontés à un phénomène appelé oxydation prématurée. Ce vieillissement non voulu et non maîtrisé, apparaît de façon aléatoire sur l'ensemble des vins blancs secs à l'échelle mondiale, avec cependant un impact particulier sur les vins blancs de Bourgogne, compte tenu de leur renommée.

Afin de mieux comprendre le vieillissement des vins, en particulier des vins blancs de Bourgogne, il est donc nécessaire d'améliorer nos connaissances quant aux mécanismes physico chimiques impliqués dans la stabilité oxydative des vins blancs. L'hypothèse sur laquelle repose ce travail est qu'un vin ayant une capacité antioxydante élevée, aura une stabilité oxydative importante et donc un potentiel de garde élevé. Pour cela, il est important d'avoir un outil de détermination de la capacité antioxydante des vins blancs, afin de pouvoir en déduire une aptitude au vieillissement. Certains outils ont déjà été utilisés dans la littérature, tels que la mesure de la capacité antioxydante par RPE, ou par voltamétrie, mais les mesures colorimétriques ont été les plus mises en avant avec notamment les tests DPPH, ABTS ou encore ORAC. Ces différents outils permettent de caractériser la capacité antioxydante de vins par leurs aptitudes à piéger des radicaux libres, inhiber une cascade radicalaire ainsi qu'à protéger un composé cible de l'oxydation. Cependant, pour la plupart de ces études, la mesure de la capacité antioxydante s'est focalisée sur l'étude des composés phénoliques, alors que de nombreux autres composés, tels que des composés soufrés dont la teneur est comparable, peuvent jouer un rôle important dans la capacité antioxydante des vins blancs. Ainsi, réussir à prévoir le potentiel de vieillissement des vins blancs nécessite d'une part de pouvoir mesurer

des paramètres physico-chimiques pertinents pour ces matrices, et d'autre part de pouvoir identifier les composés moléculaires à l'origine de ce potentiel.

Au cours de précédentes études sur l'analyse métabolomique de séries verticales de vins, il a été montré que l'analyse instantanée de la diversité chimique d'un vin permettait de révéler des signatures moléculaires relatives à l'historique d'élaboration de ce vin, notamment en ce qui concerne le millésime ou les pratiques œnologiques à l'œuvre au moment de son élaboration. La deuxième hypothèse sur laquelle repose cette étude est donc qu'il existe également une signature moléculaire de potentiel de garde, mesurable dès le début de la période d'élevage, c'est à dire pour des vins qui viennent de terminer leur fermentation alcoolique. Dans cet objectif de détermination de marqueurs moléculaires précoces de la stabilité oxydative, les vins analysés au cours de cette étude seront majoritairement des vins blancs en cours d'élevage.

Les objectifs de cette étude sont donc dans un premier temps de déterminer la capacité antioxydante de vins blancs en cours d'élevage afin de pouvoir dans un second temps isoler les marqueurs moléculaires de cette capacité antioxydante. Pour cela, deux méthodes de détermination de la capacité antioxydante seront utilisées et comparées, les mesures par RPE et DPPH. Une approche alternative originale sera développée, qui repose sur la l'identification du pool de composés nucléophiles d'un vin, considérés comme des pièges à quinones formées durant les mécanismes d'oxydation. La combinaison de ces mesures avec des analyses métabolomiques par LC-QToF-MS et FT-ICR-MS permettra la détermination des marqueurs moléculaires impliqués. Enfin dans un dernier temps, nous étudierons l'impact de certaines pratiques œnologiques, telles que l'élevage ou le sulfitage du moût de raisin sur la capacité antioxydante des vins ainsi que sur les marqueurs moléculaires associés.

Etude bibliographique

1. Qu'est-ce que la stabilité oxydative des vins blancs ?

1.1. Effet du vieillissement sur les propriétés organoleptiques du vin blanc

1.1.1. Impact du vieillissement

L'oxydation est un phénomène naturel qui a lieu dans le vin, ou toute autre matrice alimentaire, et qui est dû à la présence d'oxygène. Les processus d'oxydation sont des phénomènes lents qui ont lieu tout au long de la vie du vin, du début de la vinification jusqu'au vieillissement en bouteilles. Plusieurs paramètres ont un rôle important sur le vieillissement du vin, tels que la température et l'hygrométrie lors du stockage des bouteilles mais également la perméabilité des bouchons qui va influencer sur la quantité d'oxygène apportée au vin au cours de son vieillissement^{2,3}. L'impact des conditions de stockage sur l'évolution du vin a par exemple été étudiée sur 400 bouteilles de Sangiovese (cépage rouge Italien), au travers de la comparaison entre une conservation en conditions optimales (température entre 15 et 17°C, humidité relative de 70%) représentant un vieillissement en cave, et un vieillissement reproduisant les conditions d'une maison ou d'un appartement (fluctuation de la température entre 20 et 27°C et de l'humidité en fonction des saisons)⁴. Les résultats ont montré un vieillissement 3 à 4 fois plus rapide pour les vins stockés dans les conditions reproduisant un appartement, par comparaison au vieillissement en cave⁴. L'impact de la température de stockage a également été étudié sur les propriétés sensorielles de Sauvignon blanc^{5,6}. Lors de ces études, trois températures de stockage (5, 10 et 18°C) ont été étudiées durant un an. Ici encore, les vins stockés dans des conditions plus froides (5 et 10°C) étaient caractérisés par des arômes fruités alors que les vins stockés à des températures plus élevées étaient caractérisés par des notes boisés, beurrés ou encore d'asperges⁵.

Durant le vieillissement, un faible apport d'oxygène peu amener à une augmentation du bouquet aromatique des vins blancs. Par exemple, dans le cas des vins de Champagne élevés sur lies en l'absence de contact avec du bois, les vins âgés développent des descripteurs aromatiques tels que toasté, brioché ou de café torréfié^{7,8}. Il a été montré que l'évolution de ces modifications peut être associée à des composés aromatiques hétérocycliques contenant des atomes de soufre, d'oxygène et d'azote⁹. Ces composés sont formés lors du vieillissement par réaction de Maillard entre un acide aminé et un composé carbonyle. L'étude de Champagnes âgés de 2 à 27 ans a montré une augmentation de la concentration en 5-méthyle furfural, 2-acétylfurane et de 2-méthyle pyrazine avec l'augmentation de l'âge du vin, et ce indépendamment du cépage (Chardonnay, Pinot noir et Meunier)⁸. De plus, il a été montré une corrélation entre la concentration en composés hétérocycliques et en acides aminés. La quantité

d'acides aminés n'étant pas corrélée au vieillissement des vins, il semble donc que d'autres facteurs impactent cette concentration, tels que les paramètres de vinification par exemple ⁸.

1.1.2. Du vieillissement à un état oxydé

Les vins blancs ayant une concentration plus faible en composés phénoliques que les vins rouges (10 à 20 fois moins) et de ce fait une capacité antioxydante plus faible, ils sont plus sensibles à l'oxydation ¹⁰⁻¹⁴. La quantité d'oxygène reçue par le vin est très dépendante du type d'obturateur, cette quantité est définie par le taux de transfert d'oxygène (Oxygen Transmission Rate OTR en anglais). Cette valeur OTR est très dépendante du type de bouchon, liège, synthétique ou encore capsule à vis ^{3,15}. Les obturateurs peuvent être classés par perméabilité à l'oxygène décroissante avec : bouchon synthétique > capsule à vis > liège naturel > bouchon micro-agglomérés ³; mais ce classement peut différer avec la méthode utilisée pour la mesure et également avec la qualité du bouchon analysé ¹⁵. L'étude de l'oxygénation contrôlée de vins de Champagne durant l'élevage sur lies avec des capsules de différentes perméabilité à l'oxygène (0,2, 0,7 et 1,8 mg/L/an d'O₂) a montré une évolution différentes des vins en fonction de la quantité d'oxygène reçue après plusieurs années d'élevage ¹⁶. A l'aide de la détermination d'un score sensoriel REDOX permettant la classification de l'état oxydatif des vins sur une échelle variant de -5 à 5, pour des vins allant de très réduits à très oxydés, plusieurs études ont ainsi comparé l'utilisation de capsules à vis avec des bouchons synthétiques pour la conservation du vin (Chardonnay), montrant une évolution plus rapide de celui-ci avec les bouchons synthétiques et ce sur plusieurs millésimes (2008, 2009 et 2010) après 5, 6 et 7 ans de vieillissement ¹⁷⁻¹⁹.

Lors de l'oxydation les propriétés organoleptiques des vins blancs vont évoluer. Ces modifications sont principalement un changement de couleur via un brunissement du vin, une perte d'arômes floraux et fruités ainsi que l'apparition de flaveurs dites d'oxydation telles que des arômes de miel, de noix, de foin ou encore de curry, de légumes cuits, de liqueur ou de cidre (Figure 1) ^{15,20}. Il a été montré que ces modifications sont dues principalement à la formation d'aldéhydes, tel que la phenylacétaldéhyde, le méthional, l'o-aminoacetophenone, 3-(methylthio)propionaldehyde, mais également d'une lactone avec le sotolon, ou du 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphtalene (TDN) ^{17,21,22}.

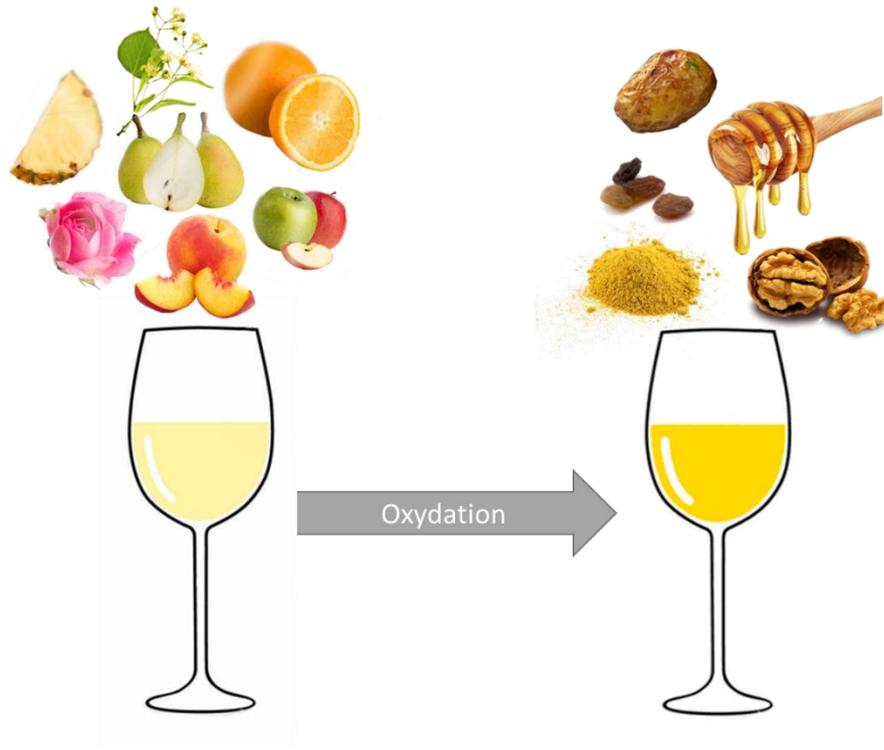


Figure 1 : Schématisation de l'impact de l'oxydation du vin blanc sur ces propriétés organoleptiques.

1.2. Mécanismes d'oxydation

1.2.1. Rôle de l'oxygène

Le principal agent oxydant du vin est l'oxygène (O_2). Dans des conditions normales de pression et de température, sa solubilité maximale est 8,6 mg/L dans le vin ²³. L'oxygène va être réduit progressivement en anion radical hydroperoxyde ($O_2^{\cdot-}$), en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en radical hydroxyle (HO^{\cdot}) et enfin en eau (H_2O), produisant des espèces appelées « espèces réactives de l'oxygène » (ERO) ou « reactive oxygen species » (ROS) en anglais (Figure 2) ²⁴. La configuration électronique de l'oxygène à l'état fondamental est l'état triplet, celui-ci peut ainsi être considéré comme un diradical ²⁵. Le principe d'exclusion de Pauli limite la réactivité de l'oxygène. C'est pourquoi, l'oxygène doit être « activé » afin de passer dans une configuration électronique singulet ²⁴. Il a été noté, que sous forme singulet, l'oxygène peut réagir directement avec des caroténoïdes, des oléfines ou des polyphénols ²⁵. De plus, il apparaît que d'un point de vue thermodynamique la réaction entre l'oxygène et des composés phénoliques tels que la catéchine ou l'acide caféique est défavorisée, le potentiel rédox des couples O_2/H_2O_2 , de la catéchine et de l'acide caféique avec leurs quinones respectives étant 0,57, 0,58 et 0,60 V ²⁵. C'est pourquoi, une réaction de catalyse est nécessaire afin de réaliser

la première réaction de réduction de l'oxygène (O_2 en HO_2^\bullet). Dans le moût les enzymes oxydases auront ce rôle et dans le vin se sera principalement les ions Fe^{2+} ²⁵. Le radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet) peut réagir directement avec les composés phénoliques du vin, car c'est un oxydant plus fort que l'oxygène avec un potentiel redox qui vaut 1,23V contre -0,09V à pH 3,5 pour O_2 ²⁵. Le peroxyde d'hydrogène est formé par la réduction de HO_2^\bullet , ce qui en présence de fer mène à la réaction de Fenton et à la production du radical hydroxyle. HO^\bullet réagira à son tour de façon non sélective, en raison de son fort pouvoir oxydant, formant le dernier produit de réduction de l'oxygène, une molécule d'eau.

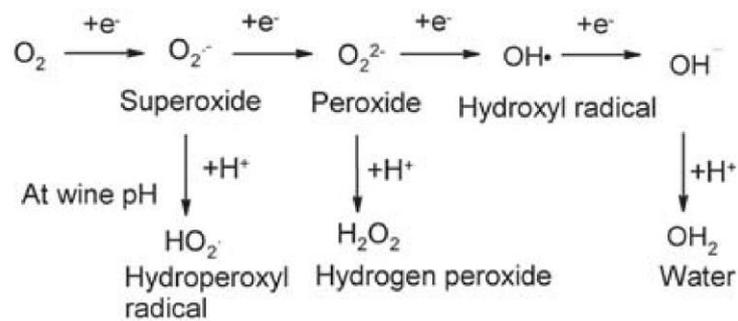


Figure 2 : Représentation de la réduction de l'oxygène jusqu'à une molécule d'eau avec la formation des ERO et de leurs formes majoritaires au pH du vin (entre 3 et 4) ²⁴.

1.2.2. Processus d'activation de l'oxydation

1.2.2.1. Oxydation enzymatique

L'oxydation enzymatique se produit dans le moût via la présence d'oxygène dissous et d'enzymes oxydoréductases. Deux enzymes principales sont responsables du brunissement du moût : la peroxydase (PDO) appelé horseradish peroxydase (E.C.1.11.1.7) et la polyphénol oxydase (PPO), qui comprend la catéchol oxydase aussi appelé tyrosinase (E.C. 1.10.3.1) et la laccase (E.C.1.10.3.2) ^{26,27}. La PPO est une enzyme contenant du cuivre alors que la PDO contient du fer. La tyrosinase est naturellement présente dans la baie de raisin et est capable d'oxyder des mono et diphénols ^{23,26}, alors que la laccase est produite par des moisissures (*Botrytis cinerea*) et est capable d'oxyder de nombreux substrats, en particulier des 1,2 et 1,4-dihydroxybenzenes ^{26,28}. L'activité de la PDO est dépendante de la présence de peroxyde d'hydrogène, cependant il a été montré que le brunissement dû à la présence de PDO n'est pas significatif mais que sa présence avec PPO peut augmenter la dégradation des composés phénoliques ²⁹.

Dans le moût, le brunissement est fortement corrélé à la présence d'hydroxycinnamates, tels que l'acide caftarique ou l'acide coutarique, et il est également favorisé par les flavan-3-ol³⁰⁻³³. L'oxydation des composés phénoliques mène à la formation de quinones. Ces quinones, en raison de leurs propriétés redox et électrophiles, vont subir d'autres réactions. Ainsi, elles peuvent oxyder des composés ayant un potentiel redox plus bas tels que des polyphénols, l'acide ascorbique ou le SO₂, ce qui les réduit sous leur forme d'origine (ortho-diphénol)²⁹. Des réactions de polymérisations et de condensations peuvent également avoir lieu avec de nombreux composés, menant ainsi à la formation de pigments bruns, et causant le brunissement du moût, Figure 3²⁹. En tant qu'électrophiles, les quinones peuvent également réagir avec des composés nucléophiles, tels que des acides aminés ou des composés soufrés³⁴. En effet, la quinone formée par oxydation de l'acide caftarique par la PPO, va réagir avec le glutathion (GSH) formant un composé appelé « Grape Reaction Product » (GRP) ou acide 2-S-gluthathionyl caftarique. Le GRP ne pouvant être oxydé par la PPO, la présence de GSH va inhiber les processus d'oxydation et ainsi limiter le brunissement en empêchant la polymérisation des quinones avec les composés phénoliques^{28,33,35,36}.

L'utilisation de sulfites permet d'inhiber l'activité de la tyrosinase, mais moins de la laccase qui est plus résistante, ce qui va limiter l'oxydation enzymatique²⁸. Au cours de l'oxydation enzymatique, la concentration et l'activité de la PPO vont diminuer. Enfin, la production d'éthanol lors de la fermentation alcoolique, ainsi que l'ajout de SO₂ et le collage font qu'aucune PPO n'est retrouvée dans le vin²⁶.

Il est intéressant de noter que l'oxydation enzymatique n'est pas forcément négative pour la qualité du vin final. En effet, les moûts de vins blancs peuvent subir une hyperoxygénation visant à diminuer le potentiel de brunissement du vin. Ainsi, les vins issus de moûts hyperoxygénés ayant des quantités plus faibles de composés phénoliques, et plus de GRP, seraient plus stables au brunissement²⁶.

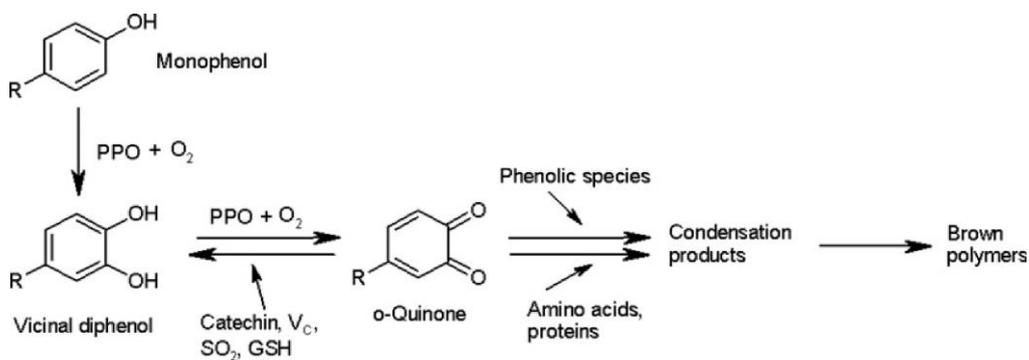


Figure 3 : Mécanismes d'oxydation menant au brunissement dans le moût²⁶.

1.2.2.2. Oxydation non-enzymatique ou oxydation chimique

Dans le vin, l'activation de la réduction de l'oxygène ne peut être réalisée par les enzymes, car elles ont été éliminées au cours de la fermentation alcoolique, et cela ne peut provenir d'une photocatalyse étant donné que le vin est généralement à l'abri de la lumière^{37,38}. Il a été montré que cette catalyse est réalisée par des métaux, en particulier le fer, le cuivre et le manganèse^{24,25,39}. On retrouve ces métaux à des concentrations allant jusqu'à 10 mg/L pour le fer et le manganèse et 1 mg/L pour le cuivre (limite légale fixée par l'OIV)^{25,39,40}. En solution aqueuse, telle que le vin, les ions ferriques et ferreux sont sous forme hexa-hydratée. En présence de ligands plus puissants, tels que des catéchols, des molécules vont être substituées^{25,39}, provoquant l'oxydation des catéchols et réduisant Fe^{3+} en Fe^{2+} ²⁵. L'oxygène va alors réoxyder Fe^{2+} en Fe^{3+} permettant de recycler celui-ci, en formant la radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet). Si l'on s'intéresse aux potentiels redox des couples $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ et $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$, on constate que la réaction est possible d'un point de vue thermodynamique mais peu favorisée, avec un potentiel redox respectivement de 0,77 et 0,78V à pH 0. En revanche, la présence de ligands puissants, tels que des ions phénolate ou hydroxyde peut déplacer l'équilibre en réduisant le potentiel redox du couple $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Ceci a pour effet de rendre l'ion Fe^{2+} plus réducteur et l'ion Fe^{3+} moins oxydant, favorisant l'oxydation de Fe^{2+} par l'oxygène. En présence de 6 fois plus d'acide tartrique que de fer, le couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ est réduit à 0,36V à pH 3,5⁴¹. Dans les vins blancs, les acides tartrique et malique sont en quantité très importante par rapport aux composés phénoliques pouvant se complexer avec le fer, ce qui en fait des ligands dominants qui peuvent diminuer le potentiel redox du fer et faciliter l'oxydation des composés phénoliques⁴². Le rôle du cuivre et du manganèse dans les mécanismes d'oxydation est différent de celui du fer. Tout comme le fer, le manganèse peut complexer des molécules d'acides tartrique⁴³. En revanche contrairement à celui-ci, il ne peut être recyclé dans un cycle redox, ne permettant pas ou peu l'oxydation des composés phénoliques³⁹. L'action oxydante du manganèse semble venir du fait qu'il va faciliter le cycle redox du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ permettant ainsi une augmentation de l'oxydation des composés phénoliques³⁹. Le cuivre a une action similaire en catalysant la réduction de l'oxygène par Fe^{2+} , l'ion Cu^+ formé est alors réoxydé par une molécule d'oxygène permettant un cycle redox, comme dans le cas du fer²⁵.

La catalyse due à la présence de métaux, en particulier du fer, va permettre la réduction de l'oxygène en radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet), provoquant la réaction de celui-ci avec des catéchols, qui sont la principale espèce réagissant avec ce radical²⁴. Il y a alors formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'une semi quinone, qui par une seconde réaction d'oxydation

formera une quinone. La réactivité des composés phénoliques avec le radical hydroperoxyde dépend de la stabilité de l'intermédiaire réactionnel. Ainsi, les composés contenant un groupement pyrogallol ou catéchol sont plus facilement oxydables en raison de la stabilisation du radical semi quinone par résonance avec le second atome d'oxygène.

La présence simultanément de Fe^{2+} et H_2O_2 va occasionner la formation du radical hydroxyle via la réaction de Fenton. Ce radical qui est très instable, va réagir immédiatement et de façon non sélective avec les composés qui l'entourent. La probabilité pour un composé d'être oxydé dépendra donc de sa concentration. Ainsi, les principaux produits de cette réaction sont l'acétaldéhyde et des céto-acides qui correspondent à l'oxydation de l'éthanol et d'acides organiques. De nombreux autres produits peuvent être formés résultant de l'oxydation du glycérol, d'acides, de sucres ou d'autres composés du vin ^{24,44}. Cette dernière étape de la réduction de l'oxygène mène à la formation d'une molécule d'eau. Cependant, la formation d'un radical carboné, lors de l'oxydation de l'éthanol en radical hydroxy-éthyle (HER) par OH^\bullet , peut mener à l'oxydation d'une nouvelle molécule d' O_2 , formant un nouveau radical hydroperoxyde et permettant un nouveau cycle de réduction des ERO et d'oxydation des composés phénoliques du vin ²⁴.

Au cours de l'oxydation, les composés majoritairement formés sont des quinones, des aldéhydes et des céto-acide tels que l'acide pyruvique ²⁴. Ces composés vont réagir avec d'autres composés du vin formant alors des produits secondaires de l'oxydation, qui peuvent dans certains cas mener à un brunissement du vin. Deux processus peuvent amener à un brunissement. Le premier est dû à la condensation de quinones formées au cours de l'oxydation avec des composés phénoliques, le dimère formé peut se convertir de la forme quinone-phénol en diphénol, formant ainsi un nouveau composé avec un potentiel redox plus faible et donc plus facilement oxydable ^{26,44}. Par ré-oxydation de ce dimère, puis par polymérisation, des pigments bruns peuvent se former ²⁶. La deuxième voie de formation de pigments bruns, provient des produits d'oxydation de l'éthanol et de l'acide tartrique qui sont des composés majoritaires des vins blancs, l'acétaldéhyde et l'acide glyoxylique. Ils peuvent se condenser avec des catéchols, formant après oxydation et polymérisation, le cation xanthylum qui est un pigment coloré ²⁶.

Des composés antioxydants peuvent venir limiter ces effets de brunissement, c'est le cas par exemple du SO_2 ou des composés soufrés. Leurs mécanismes d'action seront discutés dans le paragraphe suivant.

1.2.3. Composés antioxydants du vin

1.2.3.1. Impact du SO₂

Le dioxyde de soufre (SO₂) est un des additifs les plus utilisés dans le vin en raison de ses capacités antimicrobiennes et antioxydantes ⁴⁵, mais est également produit naturellement par les levures au cours de la fermentation alcoolique ⁴⁶. Ajouté dans le moût, il permet une inhibition des enzymes oxydases, limitant l'oxydation enzymatique. Certains chercheurs pensent que le SO₂ réagit avec l'oxygène et prévient ainsi de l'oxydation des composés phénoliques ⁴⁷, cependant des études en solutions modèles montrent que la réaction entre le SO₂ et O₂ est extrêmement lente et insignifiante ²⁴. La principale action du SO₂ serait de réduire H₂O₂, formé lors de l'oxydation des polyphénols, empêchant ainsi la formation du radical hydroxyle. Le SO₂ joue également un rôle important permettant la réduction des quinones formées lors de l'oxydation sous la forme de dihydroxy, mais également en piégeant des aldéhydes et cétones par condensation ^{24,44}. Cette fraction de SO₂ est appelée SO₂ combiné. Au pH du vin, la forme libre majoritaire des sulfites est sous forme d'anion bisulfite, HSO₃⁻, et seulement une très faible proportion de SO₂ est disponible, mais généralement l'appellation « SO₂ » désigne à la fois la forme SO₂ et HSO₃⁻ (pK_a = 1,86 pour le couple SO₂ / HSO₃⁻).

Tout comme les composés phénoliques, la réaction entre les sulfites et l'oxygène est interdite par le principe d'exclusion de Pauli, la réaction est également catalysée par la présence de fer, permettant l'oxydation de l'anion bisulfite (HSO₃⁻) en radical bisulfite (SO₃^{•-}). Celui-ci va à son tour réagir avec O₂, formant le radical peroxomonosulfate (SO₅^{•-}) et le radical hydroperoxy (HO₂[•]). SO₅^{•-} qui est un oxydant fort, est plus efficace que l'oxygène pour recycler l'ion Fe²⁺ en ion Fe³⁺, et va ainsi permettre un nouveau cycle d'oxydation de Fe³⁺. Le radical SO₅^{•-} peut être consommé selon 2 voies, la première par réduction à l'aide d'un anion bisulfite (HSO₃⁻), qui formera un nouvel anion radical bisulfite (SO₃^{•-}). La seconde voie mène à la formation de SO₄^{•-} qui est un radical dont le pouvoir oxydant est similaire à celui du radical hydroxyle (E₀ = 2 V) ⁴⁷. La réduction de SO₄^{•-} par un anion bisulfite produira alors un anion sulfate ainsi qu'un nouveau radical bisulfite. On constate alors que ces 2 voies de consommation mènent à une chaîne de propagation radicalaire avec la formation du radical bisulfite. La voie de formation du radical sulfate (SO₄^{•-}) peut-être inhibée par la présence de composés phénoliques qui seront oxydés en semi-quinone. Danilewicz conclut, que prise de façon isolée, l'auto-oxydation des sulfites avec l'oxygène crée une chaîne de propagation radicalaire qui va former des intermédiaires radicalaires très réactifs (SO₄^{•-}) ⁴⁷. D'autre part, l'oxydation des composés phénoliques par l'oxygène, produit du peroxyde d'hydrogène, qui via la réaction de

Fenton va oxyder l'éthanol ; ce qui dans un sens favorise l'oxydation. En revanche, le SO₂ en bloquant H₂O₂ va avoir un rôle antioxydant, et les composés phénoliques également en inhibant la formation d'espèces radicalaire hautement oxydantes (SO₄^{•-}). C'est donc lorsque les sulfites et les composés phénoliques sont présents ensemble que leur capacité antioxydante est la plus forte ⁴⁷.

Récemment plusieurs études ont montré que le SO₂ peut se lier à un grand nombre de composés tel que l'acide pyruvique, l'acide 2-céto-glutarique, le glycéraldéhyde, le 3-hydroxybutanone, le glucose, le fructose, l'acide galacturonique et des anthocyanes, mais également des indoles, des acides aminés et des peptides ^{4,45,48-50}. Ainsi pour la première fois, Arapitsas *et al.* ont montré la formation d'adduits sulfonés du glutathion, de cystéine et de pantéthéine ⁵¹. La formation de ces adduits sulfonés peut expliquer le fait qu'aucun dimère de GSH (GSSG) ne soit retrouvé dans le vin lors de l'oxydation ^{15,52}. Cette formation d'adduits s'ajoute à la formation d'adduits produite par réaction nucléophile entre les quinones et les composés soufrés, tel que GSH.

Roullier-Gall *et al.* ont montré à l'aide de FT-ICR-MS que même après plusieurs années de vieillissement en bouteille, la composition chimique de vins de Chardonnay reste fortement impactée par l'ajout de SO₂ dans le moût (0, 4 et 8 g/hL SO₂). En effet, les vins ayant reçu 8 g/hL de SO₂ montrent un nombre plus important de composés CHOS et CHONS que les vins non sulfités ⁴⁸. Ces composés peuvent provenir de la sulfonation de composés phénoliques et d'acides aminés, tels que l'acide gallique ou encore l'acide caftarique, en raison d'une faible teneur en anthocyanes et flavanols, l'addition de SO₂ serait réalisée préférentiellement sur des indoles et des acides aminés ^{45,48}. D'autre part, Hoeniche *et al.* ont montré que la sulfonation d'acide indole-3-acétique peut être responsable lors de sa dégradation, de la formation de 2-aminoacetophenone qui est suspecté d'être responsable de la flaveur appelée « vieillissement atypique » ⁵³. Arapitsas estime que de nouvelles études sont nécessaires afin de déterminer l'impact de ces adduits sulfonés sur la stabilité oxydative ainsi que les propriétés organoleptiques du vin ⁴⁵.

1.2.3.2. Rôles des composés soufrés : exemple du glutathion

Le glutathion (GSH) est le composé soufré le plus étudié dans le vin pour ces capacités antioxydantes. Le GSH est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) qui est naturellement synthétisé par les cellules des plantes, principalement afin de réguler l'équilibre redox des cellules via ses

propriétés antioxydantes et les détoxifier, grâce à la capacité des thiols à fixer les métaux lourds⁵⁴. Dans le vin, le GSH joue essentiellement un rôle en tant que composé antioxydant. Sa présence va permettre d'inhiber le brunissement du moût ou du vin, en venant piéger les quinones formées par l'oxydation d'ortho-diphénols, et empêchant ainsi la polymérisation de ces quinones, causant un brunissement. Outre la limitation du brunissement, il a également été montré que le GSH permet une protection des arômes du vin. En effet, plusieurs études ont montré que les esters d'alcools supérieurs et les terpènes, qui sont respectivement responsables de l'arôme fruité des vins et apportent des notes florales, de rose, de coriandre ou encore de camphre, vont être protégées de l'oxydation par la présence de GSH, entraînant une diminution plus faible de leurs concentrations au cours du vieillissement⁵⁴. Une autre famille de composés aromatiques est également protégée en présence de GSH : les thiols variétaux, qui sont des composés caractéristiques du Sauvignon blanc. Ces composés sont très sensibles à l'oxydation et peuvent réagir avec les quinones formées lors de l'oxydation. Le mécanisme de protection du GSH serait une réaction de compétition avec les quinones, agissant alors comme composé sacrificiel pour préserver les thiols variétaux^{52,55}.

Plus récemment, Nikolantonaki *et al.* ont montré à l'aide de FT-ICR-MS et d'analyses statistiques multivariées que le GSH permet une stabilité contre l'oxydation grâce au métabolome antioxydant du vin, qui comprend des composés azotés et soufrés tel que des acides aminés, des composés aromatiques et des peptides¹⁹. Il est connu que des peptides antioxydants peuvent être formés au cours de fermentations⁵⁶. La capacité des peptides à réagir avec les radicaux libres dépend de leur composition en acides aminés. Les acides aminés les plus réactifs contiennent du soufre (Cys et Met), des cycles aromatiques (Trp, Tyr et Phe) ou un groupement imidazole (His)^{56,57}. De plus, il a été montré que la majorité des peptides antioxydants contiennent un acide aminé hydrophobe en position N terminal (Val, Leu ou Ile) et Pro, His, Tyr, Trp et Met dans leur séquence⁵⁶. Les peptides peuvent donc jouer un rôle dans les mécanismes de prévention de l'oxydation de par leurs capacités à piéger les radicaux libres mais également en réagissant avec les quinones formées au cours de l'oxydation grâce à leurs propriétés nucléophiles (principalement grâce à Cys).

Pour conclure cette partie sur les mécanismes d'oxydation du vin, un schéma réactionnel global est représenté en Figure 4. Il permet de mettre en avant le cycle catalytique mis en place en présence de métaux, les cascades oxydatives qui en découlent par l'intermédiaire de composés phénoliques mais également de sulfites (HSO_3^-) et qui peut mener à une dégradation

des propriétés organoleptiques du vin. Le rôle joué dans la stabilité oxydative des composés phénoliques, des sulfites et des composés nucléophiles, en limitant la production d'espèces fortement oxydantes (OH^\bullet et $\text{SO}_4^{\bullet-}$) et/ou limitant le brunissement du vin est aussi évoqué. En revanche, ce schéma ne fait pas apparaître les propriétés de piègeur de radicaux des composés soufrés, tel que des peptides et acides aminés, et ne mentionne pas non plus la dégradation de composés ayant un rôle dans les propriétés aromatiques du vin (thiols variétaux, esters d'alcool supérieur ou terpènes par exemple), car ils seront protégés par une diminution de la quantité de ERO produites, et par l'oxydation sacrificielle de certains composés (composés soufrés par exemple).

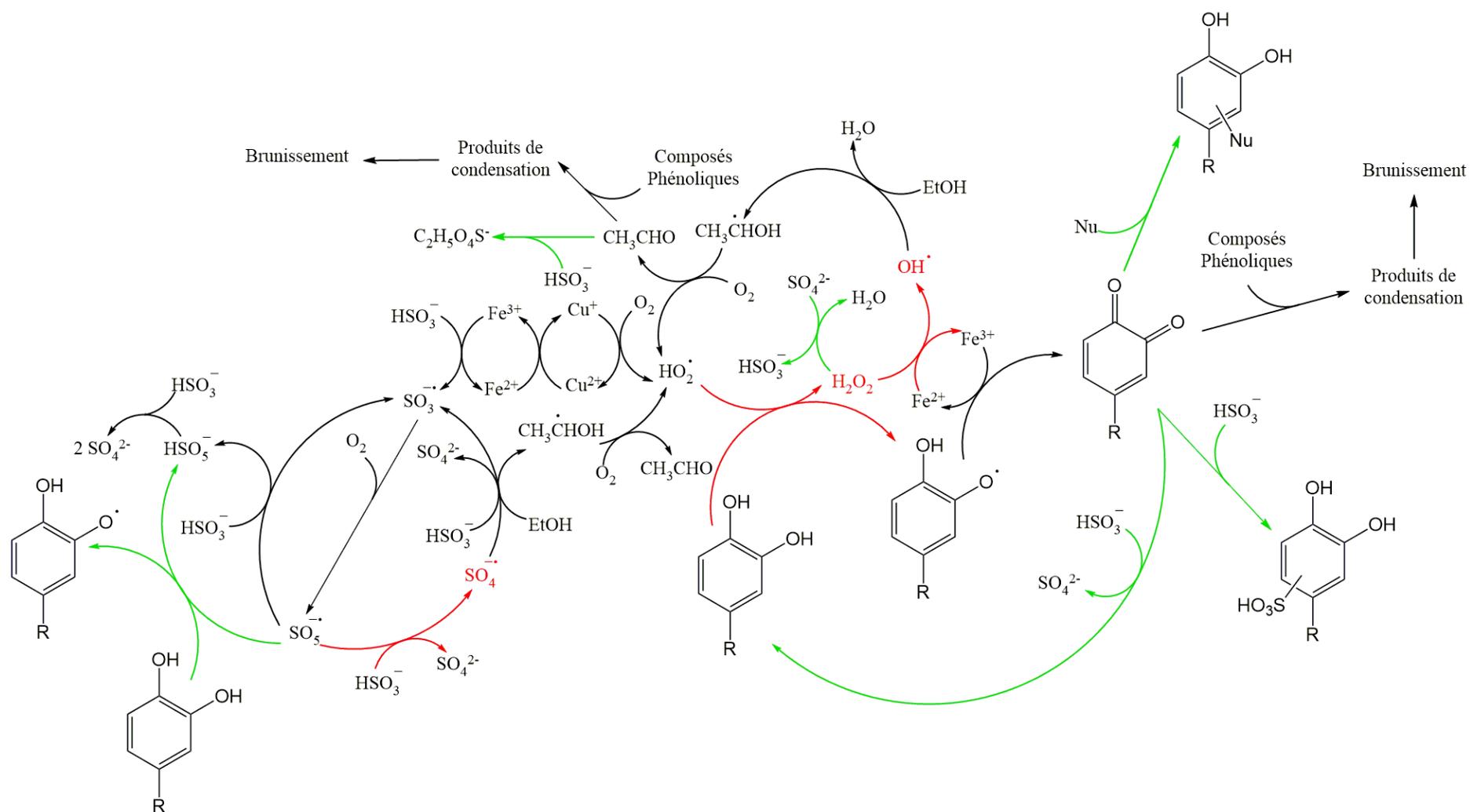


Figure 4 : Schéma global des réactions d'oxydo-réduction en œuvres dans le vin. Les flèches réactionnelles rouges signifient la création d'espèces radicalaires hautement réactives, les vertes indiquent un effet antioxydant de la réaction. Nu représente un composé nucléophile.

1.3. Facteurs impactant la capacité antioxydante du Chardonnay

Comme nous venons de le voir, la composition du vin est un facteur central quant à sa capacité à lutter contre l'oxydation. Différents facteurs peuvent influencer cette composition. Le premier provient directement du raisin, via le cépage mais également l'origine géographique avec la nature du sol ou les conditions météorologiques, par exemple. Il a été montré des différences de concentrations en composés phénoliques et en capacités antioxydantes pour des vins blancs Verdelho de l'île de Madère issus du même millésime mais de domaines différents¹². Ces vins étant issus du même millésime et du même cépage, ces différences peuvent donc provenir des paramètres de vinification, ou encore de la nature des sols dont est issu le raisin. En effet, il a été montré que des vins issus d'un même cépage et d'appellations proches, possèdent des signatures moléculaires distinctes. A l'aide d'analyses métabolomiques (LC-QToF-MS et FT-ICR-MS), Roullier-Gall *et al.* ont ainsi discriminé des Chardonnay de Bourgogne provenant de plusieurs appellations (Meursault, Corton-Charlemagne et Chablis) et ce indépendamment du millésime⁵⁸.

Au cours de la vinification, les différentes pratiques œnologiques appliquées jouent également un rôle important, que ce soit des étapes de macération, d'hyperoxygénation, la dose de sulfite ajoutée, un élevage sur lies, une vinification en fûts ou encore le collage. Tous ces paramètres ont un impact sur la composition et les qualités organoleptiques du vin, et par conséquent sur sa stabilité oxydative. L'étude de l'impact de la turbidité (300, 600 et 800 NTU) de moûts de Chardonnay sur le niveau d'oxydation du vin après plusieurs années de vieillissement en bouteilles (5 et 6 ans) a montré une corrélation entre le niveau de turbidité et le score sensoriel REDOX¹⁸. Ainsi, les vins issus de moûts ayant une turbidité faible (300 NTU) ont révélé une meilleure stabilité oxydative que les vins issus de moûts avec une turbidité plus élevée (800 NTU) et ce indépendamment du millésime étudié (2009 et 2010)¹⁸.

Dans les paragraphes suivants, l'impact d'opérations pré-fermentaires telles que la protection du moût, et l'effet de l'élevage sur les composés pouvant être impliqués dans les mécanismes antioxydants du vin seront abordés plus en détails.

1.3.1. Opérations pré-fermentaires

Diverses étapes ayant lieu au cours de la vinification sont classées dans cette catégorie d'étape pré-fermentaire, que ce soit des étapes de macérations, le pressurage ou encore le débourage et l'hyperoxygénation du moût. Nous allons nous intéresser ici à

l'hydroxygénation du moût. Comme nous l'avons vu précédemment, en présence d'oxygène, les enzymes oxydases jouent un rôle important dans l'oxydation des composés phénolique du moût de raisin, causant un brunissement de celui-ci. Or, une hydroxygénation peut être bénéfique pour la qualité du vin ainsi que sa stabilité oxydative. Il a été montré qu'après fermentation alcoolique, un vin issu d'un moût de Chardonnay hydroxygéné ne révèle aucune différence de couleur chromatique (profil Lab) avec un vin issu d'un moût « classique », cependant la quantité de composés phénolique dans la modalité hydroxygénée est significativement plus faible ⁵⁹. En revanche après un an de vieillissement en bouteilles, il apparaît une coloration jaune (coordonnée b) moins intense pour le vin issu du moût hydroxygéné, montrant une meilleure résistance au brunissement. De plus, l'analyse des composés volatils des vin issus des deux modalités montre une plus grande quantité de composés aromatiques dans le vin issu d'un moût hydroxygéné ⁵⁹⁻⁶¹. Par analyse sensorielle les vins provenant d'un moût hydroxygéné obtiennent généralement une meilleure note hédonique ^{59,61}. Cejudo-Bastante *et al.* ont également montré que les vins hydroxygénés ont un arôme de banane plus prononcé ainsi qu'une intensité plus faible pour les arômes floraux et herbacés, comparé au vin témoin ⁵⁹.

Plusieurs études ont étudié l'impact de la dose de sulfites sur la diversité chimique du vin ^{48,62}. Coelho *et al.* ont analysé 43 vins issus de moûts ayant reçu des quantités de sulfites croissantes (0, 4 et 8 g/hL) et provenant de 2 millésimes (2006 et 2007). L'utilisation de spectroscopie de fluorescence 3D combinée à l'analyse statistique PARAFAC a permis de discriminer les vins en fonction de la quantité de sulfites ajoutée grâce à la décomposition des spectres en 4 composantes, ou zone de fluorescence ⁶². D'autre part, des analyses FT-ICR-MS sur ces mêmes échantillons ont permis de déterminer les empreintes moléculaires de chacune des modalités étudiées, permettant d'associer une signature moléculaire à chacune des 4 composantes. Ainsi, la composante 1, qui est corrélée positivement avec l'ajout de sulfites, est majoritairement associée à des composés de formules élémentaires CHOS et CHONS, montrant la protection des composés soufrés par l'ajout de sulfite dans le moût ⁴⁸. La composante 2 qui est corrélée négativement à l'ajout de SO₂, est associée à une diminution de nombre de CHO. Dans les modalités sans sulfites, cette composante sera plus intense caractérisant ainsi une perte de composés CHO ⁴⁸.

1.3.2. Elevage

Une technique couramment utilisée en Bourgogne est l'élevage sur lies après vinification en fût de chêne. Lors de cet élevage, le vin interagit avec plusieurs éléments, le bois, les lies et l'oxygène. Les deux premiers éléments vont transmettre des composés antioxydant au vin, protégeant ainsi de l'apport en oxygène.

1.3.2.1. Impact des lies

L'élevage sur lies est une méthode qui est réputée pour augmenter les qualités organoleptiques du vin, avec une diminution de l'astringence et une augmentation de la sensation en bouche, de l'intensité aromatique ainsi que de la stabilité de la couleur^{63,64}. Les lies sont principalement formées de microorganismes, des levures mais également des bactéries après fermentation malolactique. Elles contiennent également des acides organiques (majoritairement de l'acide tartrique), des carbohydrates insolubles, des sels inorganiques, des lignines, des protéines et des composés phénoliques^{63,65,66}. Au cours de l'élevage, les lies vont s'autolyser relarguant un certain nombre de substances dans le vin. Ces composés intracellulaires sont de natures différentes, des protéines, des acides nucléiques, des lipides ou encore des polysaccharides^{65,67}. Les lies ont une influence sur les propriétés aromatiques du vin, en influençant la composition en composés volatiles odorant. Il a cependant été reporté des effets différents et parfois contradictoires dans la littérature. Les lies peuvent ainsi causer une perte de la saveur fuitée des vins⁶³, mais d'un autre côté, elles peuvent favoriser la synthèse d'esters augmentant donc la qualité des vins⁶³. Il existe également un risque de production d'espèces soufrées ayant un impact négatif sur les propriétés sensorielles du vin, telles que le sulfure d'hydrogène, et l'éthanthiol par exemple^{63,68,69}.

Des composés non volatils peuvent aussi interagir avec les lies : les composés phénoliques. Ces composés sont impliqués dans les mécanismes antioxydant du vin et jouent donc un rôle important dans sa stabilité oxydative. Il a été montré que des composés phénoliques peuvent être adsorbés à la surface des lies. Plusieurs composés phénoliques ont été détectés et quantifiés dans les lies, comprenant des flavonoïdes, des acides phénoliques et des stilbènes⁶⁵. D'autre part, il a été montré que les composés phénoliques représentent environ la moitié de la capacité antioxydante de la surface des lies, et environ 20% pour les composés soufrés⁷⁰. Malgré une diminution globale de la capacité antioxydante de la surface des lies au cours de l'élevage, cette proportion n'évolue pas au cours de l'élevage.

Lors de l'autolyse, les lies relarguent des mannoprotéines dans le vin. La quantité de macromolécules mesurée dans le vin augmente significativement avec le recours du batonnage, qui est une méthode couramment utilisée en Bourgogne ⁶³. Ces mannoprotéines peuvent interagir avec les composés phénoliques favorisant la stabilité de la couleur du vin et diminuant l'astringence, en particulier pour les vins rouges. L'hydrolyse de ces macromolécules, qui ont des tailles variables, entre 5 et 800 kDa, produit des peptides de tailles plus faibles. De plus, l'étude en solution modèle des composés pouvant être relargués par les lies montrent une grande quantité d'acides aminés et de peptides ⁶⁷, qui peuvent jouer un rôle dans la stabilité oxydative des vins ^{56,57}.

1.3.2.2. Impact du bois

De même qu'avec les lies, un échange de composés a lieu entre le vin et le bois au cours de l'élevage. Ces processus sont assez lents, d'où la nécessité d'un élevage en fûts de plusieurs mois. L'impact du bois a un effet important sur les arômes, la couleur et la stabilité du vin. De nombreuses études ont porté sur l'évolution de la concentration de plusieurs composés du bois dans le vin au cours de l'élevage, le furfural, la vanilline ou le guaiacol par exemple ^{71,72}. Ce relargage de composés est influencé par plusieurs paramètres, la composition initiale du vin, la composition du bois, le temps de contact entre le vin et le bois mais également le nombre d'utilisation du fût ⁷¹. Le bois est majoritairement composé de cellulose, d'hémicellulose et de lignine qui présentent des cavités hydrophobes, permettant l'adsorption de composés du vin, parmi lesquels, des alcools, des esters, des acides volatiles ou des aldéhydes ⁷³⁻⁷⁶. *Coelho et al.* ont montré, à l'aide d'un vin fortifié, la sorption de composés volatiles du vin dans le bois, suggérant que ces composés pourront être désorbés lors d'une utilisation ultérieure du fût pour l'élevage d'un autre vin, ou d'un spiritueux permettant ainsi un transfert ⁷³. A l'inverse, le bois peut également transférer des composés au vin. Il a été montré une augmentation de la concentration en acide p-coumarique, férulique, gallique, protocatéchique, caféique ainsi qu'en aldéhyde protocatéchique durant l'élevage ^{77,78}. De plus, il apparaît que l'élevage du vin en fût, mais également d'autres boissons telles que le cognac, le whisky ou le vinaigre, permet une augmentation de leur capacité antioxydante ^{77,79,80}, dû à un apport de composés phénolique du bois.

2. Détermination de la capacité antioxydante du vin

La capacité antioxydante est liée à la capacité d'un composé à protéger un système biologique contre des processus ou des réactions impliquant des dérivés réactifs de l'oxygène ou de l'azote. Cette capacité peut s'exprimer de plusieurs manières, en empêchant le passage des ERO via une barrière physique, par un piégeage des radicaux libre, par une neutralisation des ERO ou encore par une inactivation des métaux afin de prévenir la formation des ERO. Il existe donc plusieurs mécanismes d'action pour qu'un composé soit considéré comme ayant une capacité antioxydante. C'est pourquoi, il existe diverses méthodes pour mesurer la capacité antioxydante d'un composé, qui varient en fonction du mécanisme d'oxydation, de l'espèce oxydante ou cible, des conditions d'analyses mais également dans l'expression des résultats. Ces mécanismes peuvent généralement être séparés en deux catégories, via des mécanismes de transfert d'électron (TE) ou de transfert de proton (TP). Dans la plupart des cas, ces deux processus ont lieu ensemble ce qui rend difficile la compréhension des mécanismes. Les méthodes de détermination de la capacité antioxydante peuvent être classées en 3 catégories, une mesure de la capacité à stopper les radicaux libres par don d'un atome d'hydrogène (TP), par le don d'un électron (TE) et via les deux mécanismes. La réaction de TP est une réaction qui est indépendante du pH et du solvant, c'est également une réaction assez rapide qui est complète en quelques secondes ou minutes. En revanche, la réaction TE est pH dépendante, et est généralement assez lente, requérant plusieurs heures pour être complètes ⁸¹.

Plusieurs méthodes sont couramment utilisées dans la littérature afin de déterminer la capacité antioxydante par TP. Parmi elle, deux méthodes relativement similaire ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) et TRAP (Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter) permettent de mesurer la capacité d'un composé ou d'un mélange de composés à inhiber le radical peroxy qui est formé par la dégradation du 2,2'-azobis-(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH). Par mesure de la dégradation d'une sonde fluorescente, la fluorescéine, il est possible de déterminer la capacité antioxydante d'un composé, en regardant sa capacité à protéger la fluorescéine de l'oxydation ⁸¹⁻⁸³.

Les principales méthodes reposant sur la mesure de la capacité antioxydante par TE sont les méthodes FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity). Ces deux analyses sont basées sur le même principe, la réduction d'un ion métallique. Ainsi, la méthode FRAP permet de suivre la réduction du complexe ferrique TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) par le composé antioxydant. Le complexe de Fe²⁺ formé étant de couleur bleu, le suivi de la réaction peut être réalisé par lecture de l'absorbance

au spectrophotomètre ^{81,82}. Dans le cas de la méthode CUPRAC, la réduction de l'ion Cu^{2+} est étudiée. En présence de néocuproïne, Cu^+ forme un complexe jaune dont la concentration est suivie par spectrophotométrie ^{81,82,84}.

Enfin une dernière classe de méthodes permet la détermination de la capacité antioxydante par TP et TE, il s'agit principalement des mesures DPPH, ABTS et du test de Folin-Ciocalteu (ou dosage des composés phénoliques totaux) ⁸¹. La méthode DPPH sera développée dans le paragraphe suivant, étant donné que c'est une méthode utilisée et optimisée au cours de cette étude. La méthode ABTS repose sur le piégeage d'un radical stable, le radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ étant coloré (vert-bleu), la diminution de la coloration est suivie lors de sa réduction par spectrophotométrie ^{81,82}. Cette méthode permet la mesure du pouvoir antioxydant de composés hydrophiles mais également hydrophobes ⁸⁵. Le principe de la mesure par Folin-Ciocalteu repose sur la réduction d'un complexe phosphomolybdique qui forme un complexe bleu. Celle-ci est également suivie par lectures spectrophotométriques.

On constate que ces mesures reposent sur des mesures spectrophotométriques, ou de fluorescences. D'autres méthodes existent utilisant des outils électrochimiques, telles que la voltamétrie cyclique, l'ampérométrie ou la biampérométrie ⁸². En voltamétrie cyclique, le potentiel de l'électrode de travail augmente de façon linéaire au cours du temps jusqu'à une valeur de consigne, puis retourne au potentiel de départ. Ce cycle peut être réalisé à plusieurs reprises au cours de la même analyse. Le courant formé est alors tracé contre le potentiel appliqué ce qui permet d'obtenir le voltamogramme cyclique. Il est ainsi possible de déterminer le potentiel et le courant anodique et cathodique. Les propriétés antioxydantes des composés sont ensuite estimées à l'aide de ces valeurs. Dans le cas de la mesure ampérométrique et bi ampérométrique, une valeur de potentiel est fixée, et l'intensité de courant créée est mesurée ⁸².

Une dernière catégorie d'analyse utilise la mesure par résonance paramagnétique électronique (RPE) afin de mesurer la quantité d'espèces radicalaires présentes, par exemple des ERO. Cette analyse sera développée dans le paragraphe suivant.

2.1. Voltamétrie

La voltamétrie est une méthode électrochimique qui permet d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur de nombreux composés du vin, et notamment sur les composés antioxydants ⁸⁶. Le courant voltamétrique est en effet fonction de la concentration et du potentiel appliqué : les composés les plus facilement oxydables génèrent un courant aux faibles potentiels tandis que les composés faiblement oxydables seront détectés pour des voltages plus élevés. Ainsi, l'épigallocatechine gallate ou l'épicatéchine (noyaux B) seraient parmi les polyphénols les plus facilement oxydables avec respectivement, des potentiels de 325 mV et 335 mV, tandis que des acides phénols tels que l'acide gallique ou l'acide protocatéchuique seraient moins facilement oxydables, avec respectivement, des potentiels de 473 mV et 535 mV ⁸⁷. L'impact de composés antioxydants (GSH, SO₂ et acide ascorbique) sur la protection de plusieurs composés phénoliques (catéchine, acide caféique, quercétine et rutoside) a également été étudié, montrant que ces composés sont d'excellents réducteurs ^{44,88}. Le SO₂ et le GSH réagissent rapidement avec les quinones formées par l'oxydation, les réduisant sous forme de polyphénols ou créant de nouveaux adduits par addition nucléophile ⁸⁸. Cependant, les composés antioxydants soufrés, et notamment le SO₂ ne sont pas aisément détectables avec de simples électrodes inertes ^{89,90}.

Ugliano a développé un outil de mesure rapide de la fraction polyphénolique oxydable des vins, basé sur l'utilisation d'électrodes imprimées jetables ⁸⁷. Grâce à cette méthode, des vins blancs issus de plusieurs cépages ont pu être discriminés en fonction de leur profil voltamétrique (Figure 5) ⁸⁷. En utilisant la première dérivée du courant mesuré, l'auteur a montré que le Chardonnay et le Viognier se distinguaient des autres cépages par l'existence d'un courant anodique à un potentiel élevé de 830 mV, qui n'est cependant pas expliqué. Par comparaison, de vins blancs avant et après oxydation, il est également possible de visualiser les modifications chimiques apportées par celle-ci, et donc créer une image de l'oxydation du vin ⁹¹. Ces profils d'oxydation peuvent être très différents, montrant une diversité des composés impliqués dans les mécanismes d'oxydation. Ainsi, pour certains vins, l'oxydation provoque une large diminution du signal entre 0 et 400 mV, impliquant une consommation par l'oxygène des composés facilement oxydables. En revanche, cette région peut être relativement stable pour d'autres vins, révélant qu'aucun composé n'a été affecté par l'oxydation. Lors de l'oxydation des différences apparaissent également pour des composés moins facilement oxydables (680-815 mV) ⁹¹. Ces différences peuvent être dues à la consommation du SO₂ libre ⁸⁹, mais les profils obtenus étant variés d'autres réactions peuvent également être

impliquées ⁹¹. Il est difficile avec cette approche de déterminer spécifiquement quels sont les composés impliqués dans les réactions d'oxydation en raison d'une forte convolution du signal voltamétrique obtenu ⁹¹.

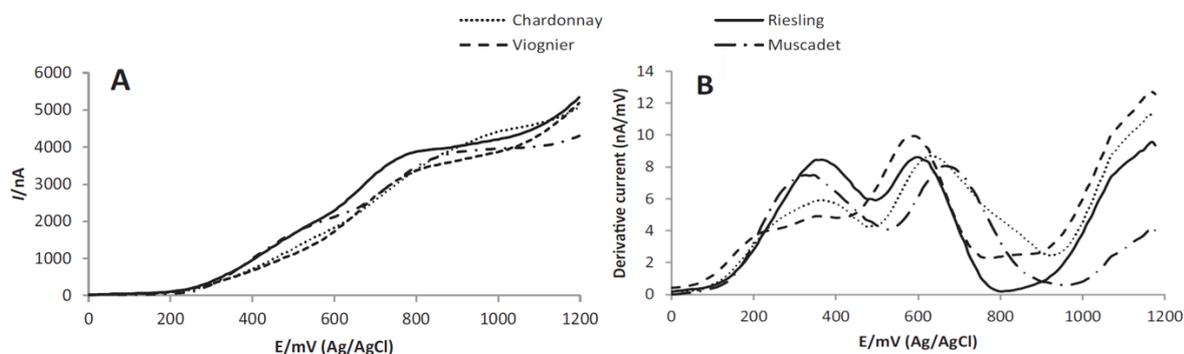


Figure 5 A : Voltammogrammes linéaires obtenus pour différents vins blancs issus de plusieurs cépages, B : Dérivée des courant obtenus. D'après les travaux d'Ugliano ⁸⁷.

L'étude des voltammogrammes et notamment de ceux obtenus par voltamétrie cyclique peut en outre être étendue à des approches non ciblées par traitement statistique, avec des mesures hautement sélectives, comme cela a été montré pour l'évaluation de l'état d'oxydation d'un vin ⁹², ou pour la discrimination fine d'adultérations ⁹³.

2.2. Principe de la méthode DPPH

La méthode DPPH utilise le radical stable 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl comme radical cible permettant de classer les échantillons en fonction de leur capacité à le réduire par échange de proton ou d'électron. C'est une méthode simple, rapide et peu coûteuse qui permet d'analyser un grand nombre d'échantillons en un temps réduit. Il est couramment utilisé dans la littérature afin de déterminer la capacité antioxydante de diverses matrices biologiques (plantes, fruits, vins, ...) ou de composés d'intérêts ^{13,94-96}. Sous forme radicalaire, le DPPH à une couleur violette qui devient jaune lors de sa réduction, permettant de suivre l'avancement de la réaction par spectrophotométrie dans la gamme 515-520 nm (Figure 6). Le plus souvent la capacité antioxydante d'un composé ou d'une matrice d'intérêt est exprimée en calculant la concentration efficace (EC_{50}) qui correspond à la quantité nécessaire à réduire 50% du DPPH initialement présent. Cette relation entre la quantité de composé antioxydant et la diminution de l'absorbance est linéaire, cependant, plusieurs études ont montré qu'aux alentours de 40% de diminution, il peut y avoir une perte de la linéarité compliquant la détermination de EC_{50} ^{81,97-99}. Pour cela, des variantes ont été proposées pour l'analyse des résultats, comme le

développement d'un logiciel statistique permettant d'utiliser différents modèles de régression, ou bien l'utilisation d'un nouveau paramètre Ec_{20} , qui permet ainsi de rester dans la zone de linéarité et calculant la quantité d'antioxydant nécessaire afin de réduire de 20% la concentration initiale de DPPH^{94,99}.



Figure 6 : Changement de couleur de la solution de DPPH dû à la réduction du radical DPPH par différentes concentrations d'acide gallique (concentrations croissantes de gauche à droite, 0 à 0,5 mM).

Le DPPH permet l'analyse de composés hydrophiles et hydrophobes. Le plus couramment, le DPPH est utilisé pour déterminer la capacité antioxydante de composés à caractère hydrophobe tels que, les composés phénoliques^{13,94,95,98,100,101}. En effet, l'utilisation d'un solvant généralement organique (principalement de l'éthanol ou du méthanol) minimise la participation des composés hydrophiles^{85,102}. Pour cela, l'utilisation d'un mélange de tampon acétate à pH 4,5 et de méthanol (40% et 60% respectivement) a été utilisé pour déterminer la capacité antioxydante d'additifs du vin (SO_2 , GSH, lies) permettant une meilleure solubilité de ces composés mais n'étant pas au pH du vin, et pouvant ainsi modifier la réactivité de certaines espèces chimiques⁹⁶.

2.3. Analyse à l'aide de la RPE

La résonance paramagnétique électronique est une méthode de spectroscopie d'absorption qui a été utilisée pour la première fois en 1944 par le physicien russe E. Zavoisky¹⁰³. La RPE est employée pour l'étude des composés comportant des électrons non appariés, tels que des radicaux ou des métaux de transition. L'analyse repose sur l'interaction d'une onde électromagnétique avec le moment magnétique de l'électron. Un électron est caractérisé par plusieurs grandeurs physiques, le nombre quantique de spin ($S = 1/2$), le moment magnétique (μ) et l'état de spin ($m_s = +/- 1/2$). L'état de spin des électrons est dit dégénéré en

l'absence de champ magnétique. Lors de l'application du champ magnétique B_0 , le moment magnétique des électrons va alors s'aligner parallèlement ($m_s = -1/2$) ou antiparallèlement ($m_s = +1/2$) à B_0 . Cela implique deux états de spin ayant des énergies différentes. Ces niveaux d'énergies sont appelés niveaux de Zeeman. Il est possible de forcer la transition entre deux niveaux de Zeeman par l'application d'un champ électromagnétique B_1 perpendiculaire à B_0 . Cette transition correspond à une modification du moment magnétique de l'électron. Lors de cette transition entre les niveaux de Zeeman, la matière paramagnétique va absorber une partie de l'onde. Ainsi la mesure RPE repose sur la mesure et la quantification de cette absorption, par détection du champ électromagnétique résiduel.

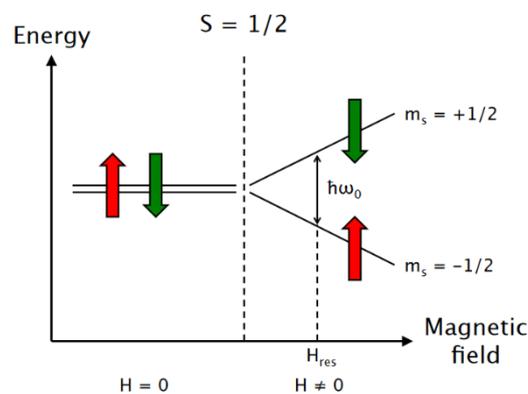


Figure 7 : Schématisation de la dégenérescence des électrons avec l'application d'un champ magnétique et l'apparition des niveaux de Zeeman.¹⁰⁴

En pratique, la fréquence ν_μ du champ B_1 est fixe, et l'on fait varier le champ B_0 . Lorsque le champ B_0 délivre l'énergie permettant la transition entre 2 niveaux de Zeeman, il y a absorption, ce qui peut se représenter comme sur la Figure 7. Communément, ce n'est pas l'absorption qui est représentée en fonction du champ magnétique, mais sa dérivée première (Figure 8). Cela permet d'augmenter le rapport signal sur bruit tout en facilitant la mesure d'absorption¹⁰⁵.

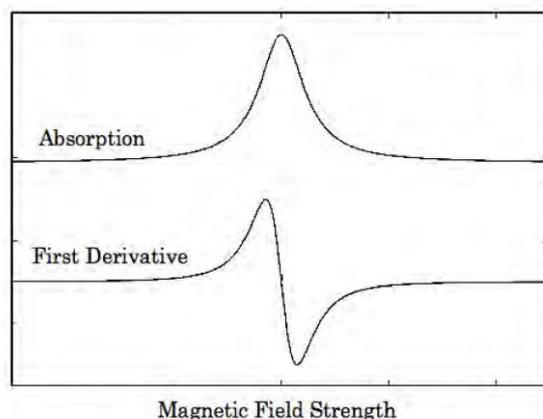


Figure 8 : Visualisation du signal d'absorption du champ magnétique en fonction du champ B_0 appliqué, ainsi que sa dérivée 1^{ère} ¹⁰³.

Les espèces radicalaires ayant un temps de vie très court, il n'est en général pas possible de les observer par RPE en milieu liquide (sauf à très basse température). C'est pourquoi, la détection des radicaux est réalisée par méthode indirecte, à l'aide d'un composé piègeur de spin, cette méthode est appelée « spin trapping ». Ce composé piègeur est spécifique d'une ou plusieurs espèces radicalaires et permet de suivre leurs accumulations et leurs évolutions. Il existe plusieurs piègeurs de spin, les plus utilisés sont 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO), le 5-tert-butoxycarbonyl 5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde (BMPO), le 5-éthoxycarbonyl-5-méthyl-1-pyrroline N-oxyde (EMPO) et l' α -phényl-N-tert-butylnitronne (PBN) ou l' α -(4-Pyridyl N-oxide)-N-tert-butylnitronne (POBN). Ces composés font partie des nitrones, qui forment des adduits relativement stables avec les radicaux libres ¹⁰⁵.

Plusieurs études sont intéressées à la formation de radicaux libres dans les vins. Ainsi, Stasko *et al.* ont étudié l'impact de plusieurs générateurs de radicaux ($K_2S_2O_8$, AAPH, $ABTS^{+}$ et DPPH) sur le signal obtenu à l'aide de la sonde DMPO, montrant une capacité antioxydante plus faible pour les vins blancs en comparaison à des vins rouges, et ce dans toutes les conditions ^{106,107}. Plus récemment, Elias *et al.* ont montré que l'oxydation de l'éthanol par le radical hydroxyle mène à la formation du radical hydroxy-éthyle (HER) ¹⁰⁸, le tout à l'aide de la sonde POBN, celui-ci étant spécifique au radical HER. L'étude de la réactivité du radical HER envers différents composés du vin peut également être suivie par RPE. Il a ainsi été montré en solution modèle, une diminution significative de l'intensité de l'adduit PBN-HER formé par oxydation chimique (réaction de Fenton) en présence d'acide caféique ou férulique, avec 69% et 55% de réduction par rapport au témoin ¹⁰⁹. Cette réduction est plus importante en présence de composés soufrés, tel que Cys, GSH, 3MH permettant de réduire de 88%, 87% et 96%

respectivement l'intensité de l'adduit PBN-HER détecté ¹⁰⁹. Cette diminution est due à un piégeage du radical HER par ces composés, permettant une diminution de la quantité d'acétaldéhyde formée, mesurant ainsi une forme de capacité antioxydante pour les composés étudiés. Il est donc possible de déterminer la capacité antioxydante des vins en mesurant leur capacité à protéger l'éthanol de l'oxydation initiée par la réaction de Fenton, via la mesure de la formation de l'adduit POBN-HER au cours du temps (Figure 9) ¹¹⁰. A l'aide de cette cinétique, il est possible de déterminer l'amplitude maximale obtenue pour l'adduit POBN-HER ainsi que la pente au début de la cinétique, permettant une discrimination des vins en fonction de leur capacité antioxydante.

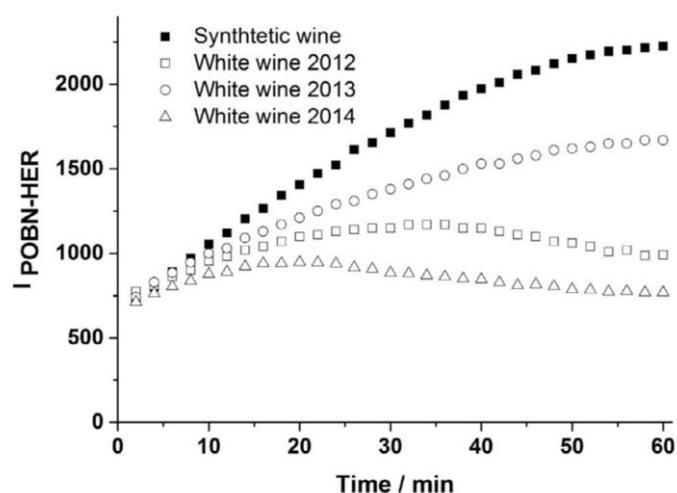


Figure 9 : Cinétique de formation de l'adduit POBN-HER obtenue après initiation de l'oxydation par la réaction de Fenton pour des Chardonnays de différents millésimes en comparaison à un vin modèle ¹¹⁰.

3. Analyse moléculaire des vins : métabolomique

En ce qui concerne les analyses du vin nous nous concentrerons ici sur la description d'analyses métabolomiques, non ciblées. En revanche, nous n'aborderons que succinctement les analyses ciblées, même si de nombreuses études ciblées ont été réalisées sur les vins afin de déterminer leurs compositions.

3.1. Approche ciblée

Ces méthodes d'analyses peuvent être séparées en deux catégories, les méthodes utilisant une séparation chromatographique en phase gazeuse et les méthodes utilisant une séparation en phase liquide. Ces outils de séparation sont couplés à un détecteur qui peut être de différentes natures. On retrouve des détecteurs de spectrophotométrie UV, de fluorescence ou encore de spectrométrie de masse, et des réfractomètres.

3.1.1. Chromatographie gazeuse

La chromatographie gazeuse est une méthode de séparation des composés volatils ou qui peuvent être volatilisés par chauffage. Ces composés seront séparés en fonction de leur affinité avec une colonne et élués à l'aide de gaz inerte (azote ou hélium). Les détecteurs couplés au système GC sont variés, allant du détecteur à ionisation de flamme (FID) qui est le plus couramment utilisé, jusqu'à l'olfactométrie (GCO) et passant par les détecteurs par photométrie à flamme pulsé (PFPD) ou MS. Les composés responsables des arômes d'oxydation du vin blanc ont pu être déterminés à l'aide de GC-MS et de GC-O par Ferreira *et al.*, avec notamment le 3-(methylthio)propionaldehyde, le TDN et le sotolon²¹. Le détecteur PFPD qui est spécifique aux composés soufrés a permis également la détection de composés responsables des saveurs de réduction (oignon, œuf pourri) dans le vin, H₂S, méthane-thiol ou éthane-thiol¹¹¹. Ces composés ayant des seuils de perception très bas, il est donc nécessaire de pouvoir les analyser à des concentrations très faibles. On les retrouve ainsi à des concentrations de l'ordre de quelques µg/L à quelques dizaines de µg/L¹¹¹.

3.1.2. Chromatographie liquide

La chromatographie liquide est une technique séparatrice basée sur l'affinité des composés non volatils envers une phase mobile et une phase stationnaire. Les principaux détecteurs couplés à la LC sont des détecteurs UV, de fluorescence, DAD et MS. Le développement de Chromatographie Liquide à Ultra Haute Pression (UHPLC) a permis d'améliorer la résolution des pics tout en augmentant la sensibilité et la vitesse d'analyse.

Les analyses LC sont couramment utilisées pour l'étude de la composition des vins, le dosage des composés phénoliques étant sans doute l'analyse la plus réalisée. D'autres composés ont été étudiés, tels que les sucres, les acides aminés ou encore les macromolécules avec les

protéines et les polysaccharides. L'utilisation de LC-DAD a permis par exemple de suivre l'évolution de composés phénoliques au cours du vieillissement de vins blancs sur une période de 9 mois, montrant une consommation de plusieurs d'entre eux, notamment les acides caftarique, coutarique, gallique et également la catéchine et l'epi-catéchine¹¹². Il est également possible de suivre certains produits d'oxydation, à l'aide de LC-DAD, tels que l'acétaldéhyde, le glycéraldéhyde, l'acide pyruvique, l'acide cetoglutarique, le formaldéhyde ou encore le sotolon^{113,114}.

L'utilisation du couplage LC-MS est de plus en plus répandu, permettant une augmentation de la sensibilité, mais également d'identifier des composés inconnus à l'aide d'analyses MS². Pour aller plus loin dans la connaissance de la composition des vins, l'utilisation de méthodes non ciblées s'avère nécessaire afin d'identifier des composés pouvant jouer un rôle important mais n'étant pas encore connus.

3.2. Principe de la métabolomique

Le terme métabolomique est apparu pour la première fois à la fin des années 1990, pour décrire l'ensemble des métabolites synthétisés par un organisme. La métabolomique est le dernier volet des méthodes « omique », génomique, transcriptomique et protéomique. Elle repose sur l'obtention d'empreintes métaboliques les plus exhaustives possibles, c'est-à-dire l'analyse la plus complète des métabolites présents dans un échantillon à un instant donné. Un métabolite est défini comme un composé de faible poids moléculaire (<1500 Da) qui joue un rôle important dans les processus physiologiques.

Il existe différentes approches possibles en métabolomique, l'approche ciblée et l'approche non ciblée. L'approche non ciblée est la plus générale des deux démarches, son but est d'analyser de manière la plus large possible l'ensemble des métabolites présents dans l'échantillon. Il n'est pas question ici d'identifier ni de quantifier tous les métabolites observés, mais de comparer les profils métaboliques de plusieurs échantillons, afin d'en déterminer les différences statistiques. Les métabolites d'intérêts devront ensuite être identifiés, si l'on veut comprendre les mécanismes biologiques ou chimiques en jeu¹¹⁵⁻¹¹⁷.

La deuxième approche est dite ciblée, c'est-à-dire qu'elle s'intéresse de façon plus spécifique à certaines classes de métabolites, impliqués dans une voie spécifique ou d'une famille chimique précise^{115,118,119}.

3.3. Méthode analytique

Les analyses métabolomiques sont basées principalement sur deux méthodes, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS). La RMN est une méthode historiquement très utilisée et qui présente de nombreux avantages, étant non destructrice, rapide, robuste et quantitative. Elle permet également d'obtenir des informations structurales directes des métabolites analysés. En revanche, pour une matrice complexe l'attribution des signaux peut s'avérer compliquée, du fait du recouvrement des multiplets des différents métabolites. La RMN bidimensionnelle permet de résoudre ces problèmes de recouvrement, cependant de par sa sensibilité, la RMN ne permet pas de quantifier des composés faiblement concentrés. Des méthodes de couplage avec de la chromatographie peuvent également être mises en œuvre afin d'augmenter la résolution ¹¹⁶.

3.3.1. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse consiste en l'analyse du rapport masse/charge (m/z) d'espèces élémentaires ou moléculaires. Cette méthode a de nombreux avantages pour les analyses métabolomiques, car c'est une méthode sensible qui permet donc la détection de composés à des concentrations très faible (de l'ordre du μM) rendant possible la détection de certains métabolites à leurs concentrations physiologiques. De plus, l'obtention de la masse moléculaire des métabolites observés ainsi que l'étude de leurs fragments, par MS^2 , permet une identification de ces métabolites par comparaison à des banques de données, et/ou à un composé de référence (standard).

De façon générale, un spectromètre de masse contient les éléments suivants : un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ionisation, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les ions générés dans la source, un détecteur et un système de traitement de données qui permet l'acquisition des spectres de masses.

3.3.1.1. Sources d'ionisation

Il existe différentes sources d'ionisation, qui peuvent être séparées en deux catégories : les sources basées sur l'ionisation en phase gazeuse (sous vide ou non) et les sources basées sur la désorption (sous vide ou non). Les sources d'ionisation en phase gazeuse sont généralement utilisées en couplage GC-MS, il s'agit des sources à impact électronique et à ionisation

chimique, qui ont lieu sous vide, ainsi que de l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). Les sources basées sur la désorption, MALDI (Désorption-ionisation laser assistée par matrice) et DIOS (Désorption-ionisation laser sur silicium poreux) fonctionnent à l'aide d'un support solide. La source DIOS permet l'ionisation de petite molécules alors que la source MALDI est plus utilisée pour des molécules plus importante (>1000 Da) ¹¹⁶. Les sources électrospray (ESI) et désorption-électrospray (DESI) impliquent la formation d'un nébulisat. Par application d'un champ électrique sur le nébulisat, les charges électriques vont se concentrer à la surface du liquide, formant des gouttelettes fortement chargées. Par évaporation du solvant, leur taille va réduire jusqu'à ionisation des espèces présentes. Cette méthode d'ionisation douce permet une faible fragmentation de l'ion moléculaire et permet l'ionisation de composés polaires et moyennement polaires. C'est une méthode très utilisée pour le couplage LC-MS.

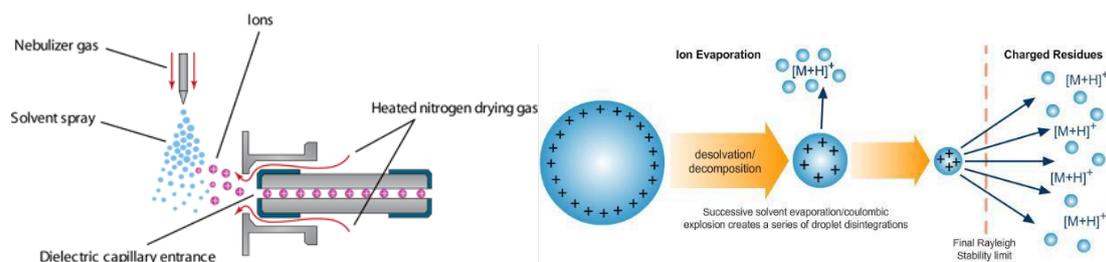


Figure 10 : Schéma d'une source d'ionisation électrospray ¹¹⁵.

3.3.1.2. Analyseurs

De nombreux analyseurs existent, ayant des propriétés et des performances différentes. On peut distinguer deux types d'analyseurs, les analyseurs à faisceaux d'ions, tel que les quadripôles et les analyseurs à temps de vol (ToF pour Time of Flight), ainsi que les analyseurs à piégeage d'ions comme les pièges ioniques linéaire, l'Orbitrap® ou l'analyseur par résonance cyclotronique d'ions à transformée de Fourier (FT-ICR). Ces analyseurs diffèrent par leurs propriétés, et peuvent être comparés selon 2 critères, la résolution et l'exactitude de masse. La résolution correspond à la capacité de l'analyseur à séparer des masses (m/z) très proches. Elle est calculée en prenant le rapport $m/\Delta m$, où Δm est la largeur à mi-hauteur du pic, on parle alors de FWHM (Full Width at Half Maximum peak height). Et l'exactitude de masse correspond à l'erreur de mesure réalisée lors de l'analyse. Elle est généralement exprimée en ppm tel que :

$Err_{ppm} = \frac{M_{exp} - M_{th}}{M_{th}} * 10^6$, où M_{exp} représente la masse détectée et M_{th} la masse théorique du composé. Dans un analyseur ToF, les ions sont accélérés par une différence de potentiel vers la

zone de vol. Toutes les particules sont accélérées avec la même énergie cinétique et sont donc séparées en fonction de la vitesse acquise ($E = mv^2$). Ainsi, plus une particule est légère, plus sa vitesse sera élevée, elle sera donc détectée avant les particules plus lourdes. Il existe aujourd'hui des analyseurs hybrides, avec des quadripôles et un ToF en série. Ces analyseurs permettent une sensibilité équivalente à celle d'un triple quadripôle tout en ayant une très bonne résolution et précision de masse (<10ppm). Des analyseurs à très haute résolution ont été développés (> 50000, FWHM à m/z 400), il s'agit de la FT-ICR-MS et de l'Orbitrap®. Ces méthodes permettent ainsi, la détermination de la formule élémentaire des composés détectés grâce à une résolution très élevée mais également une très forte précision.

3.3.1.3. Injection de l'échantillon

Il est possible de travailler de 2 manières en MS, la première étant par injection directe de l'échantillon dans la source, c'est-à-dire sans séparation préalable des composés par un système chromatographique (liquide ou gazeuse) ou d'électrophorèse capillaire. La seconde est donc de coupler une de ces méthodes séparatives à la MS. Le couplage LC-MS est le plus utilisé dans la littérature ¹¹⁶. L'utilisation de l'UHPLC avec une granulométrie de colonne inférieure à 2,5 μm permet une augmentation de la sensibilité, due à une diminution de la largeur des pics et une augmentation de leur hauteur. De plus, le temps d'analyse est réduit par rapport à des colonnes « classiques » tout en permettant une meilleure résolution et une meilleure stabilité des temps de rétention. En revanche, à cause des capillaires très fins, il est nécessaire de filtrer ou centrifuger les échantillons avant analyse, ce qui peut mener à une perte de métabolites ^{116,117}.

3.4. Traitement de données de spectrométrie de masse

En LC-MS, un chromatogramme est obtenu par échantillon. Celui-ci représente l'intensité du courant ionique total en fonction du temps, avec en troisième dimension le signal m/z détecté à chacun de ces temps. Afin de faciliter le traitement de données et rendre les données compatibles avec différents logiciels d'analyses statistiques, il est nécessaire d'extraire les données de chaque chromatogramme et de créer une matrice globale regroupant tous les échantillons. C'est pourquoi pour chaque échantillon, l'intensité des couples m/z -temps de rétention (m/z -TR) est extraite, puis alignée dans les domaines chromatographique et spectral,

c'est-à-dire en temps de rétention et en m/z . On obtient alors une matrice comprenant les différents échantillons en colonnes, et les couples m/z -TR en lignes (Tableau 1).

Tableau 1 : Exemple de matrice obtenue pour des vins analysés en LC-QToF-MS en mode positif. #Variable représente le numéro donné à chaque couple m/z -TR lors du traitement de données, facilitant celui-ci, m/z correspond au rapport masse sur charge détecté, TR au temps de rétention en minutes. Les valeurs pour chaque échantillon correspondent à l'intensité de l'ion détecté.

# Variable	m/z [M+H] ⁺	TR (MIN)	DNO-18- 001	DNO-18- 002	DNO-18- 005	DNO-18- 006
6	112,0280	0,5	35 021	40 513	36 593	0
14	153,0328	0,5	55 640	0	0	0
19	203,2230	0,5	0	72 305	120 963	103 194
21	269,0545	0,5	0	0	102 236	0
23	129,1021	0,6	0	0	61 721	59 849
26	133,0970	0,6	0	0	36 851	0
32	154,0264	0,6	83 082	215 689	97 973	89 730

3.4.1. Analyses Statistiques

Il est difficile de visualiser et comparer les données obtenues par MS en raison d'un grand nombre de variables et souvent un grand nombre d'échantillons. C'est pourquoi l'utilisation d'analyses statistiques multivariées est requise. Elles permettent de visualiser rapidement les données en projetant les données initiales dans un espace de dimensions réduites. Ces analyses statistiques sont séparées en deux catégories, les analyses statistiques descriptives et explicatives.

3.4.1.1. Analyses statistiques descriptives

Ce type d'analyse statistique a pour unique but la visualisation des données. Ainsi, l'utilisation de l'Analyse en Composante Principale (ACP) permet de représenter les données dans un modèle comprenant moins de dimensions, tout en limitant la perte d'information et en maximisant la variabilité entre les échantillons. Pour cela, un changement de coordonnées est effectué afin de définir de nouveaux axes, appelés composantes principales. Ces composantes principales décrivent la variabilité entre les échantillons. La première composante principale correspond aux plus grandes variabilités, suivie par la deuxième et ainsi de suite. L'ACP est souvent utilisée en premier lors de l'analyse des données en métabolomique, permettant une visualisation rapide des données. Cela permet par exemple de vérifier, la répartition des échantillons, la formation de groupes mais aussi la stabilité analytique de la LC-MS au cours

de la séquence d'analyse. Afin de classer les échantillons par groupes de similarité, un Cluster Ascendant Hiérarchique (CAH) peut être utilisé. La Figure 11 montre un exemple d'utilisation d'ACP et CAH pour l'analyse LC-QToF-MS en mode négatif d'une série de vins en cours d'élevage. Il apparaît ici, que les groupes bleu et vert (1 et 2) sont plus éloignés des autres groupes de vins, car il s'agit de millésimes différents. D'autre part, chaque groupe est représentatif de vins issus d'un même domaine. Cette analyse non supervisée permet donc ici de discriminer les vins issus de millésimes différents mais également de domaines différents.

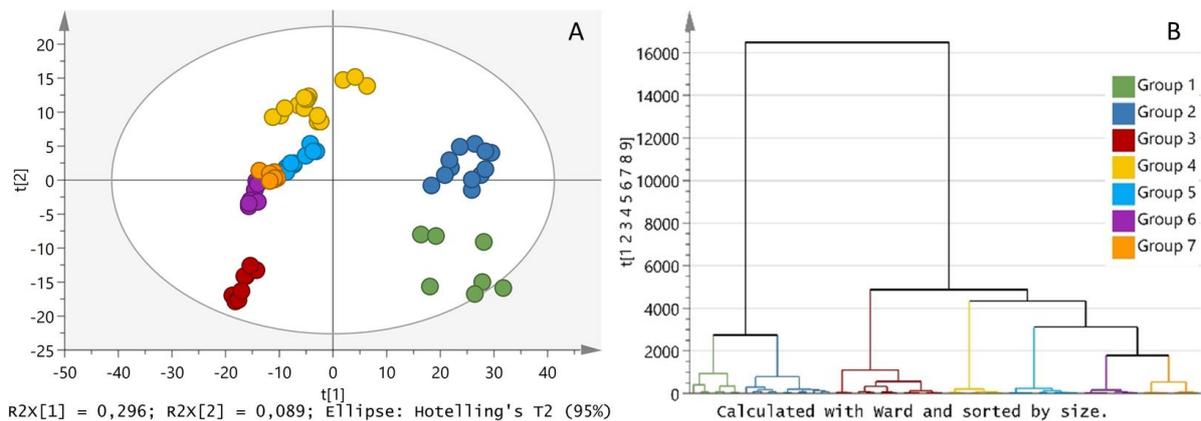


Figure 11 A : ACP obtenue à partir de l'analyse LC-QToF-MS en mode d'ionisation négatif de vins en cours d'élevage. Les groupes ont été déterminés par CAH (B).

3.4.1.2. Analyses statistiques explicatives

Contrairement à l'ACP, ce type d'analyse vise à expliquer les différences entre les échantillons en fonction de variables explicatives, et ainsi déterminer les métabolites responsables de ces différences. Les variables explicatives peuvent être par exemple, un millésime ou un cépage en œnologie, mais également un patient traité avec un médicament ou non en médecine, ou le résultat d'une autre analyse.

La PLS (Partial Least Square) permet tout comme l'ACP de réduire le nombre de dimensions du système, mais dans ce cas les composantes créées doivent être corrélées avec les variables descriptives. Un autre type d'analyse est couramment utilisé, l'analyse discriminante PLS (PLS-DA). Le modèle va alors chercher à maximiser la séparation entre plusieurs groupes d'échantillons (préalablement définis), ce qui permet dans un second temps d'isoler les métabolites qui contribuent à la séparation des différents groupes, et sont donc des marqueurs moléculaires. La Figure 12A présente un exemple de PLS-DA obtenue pour la discrimination de vins analysés par LC-QToF-MS en mode d'ionisation positif avant et après dérivatisation à

l'aide de 4-méthyle-1,2-benzoquinone. La validité du modèle créé doit être vérifiée, pour cela les paramètres R^2 et Q^2 , qui déterminent les performances du modèle sont recalculés en permutant plusieurs échantillons entre les groupes. Afin d'être valide, le modèle original doit obtenir des valeurs Q^2 et R^2 supérieurs aux modèles permutés (Figure 12B).

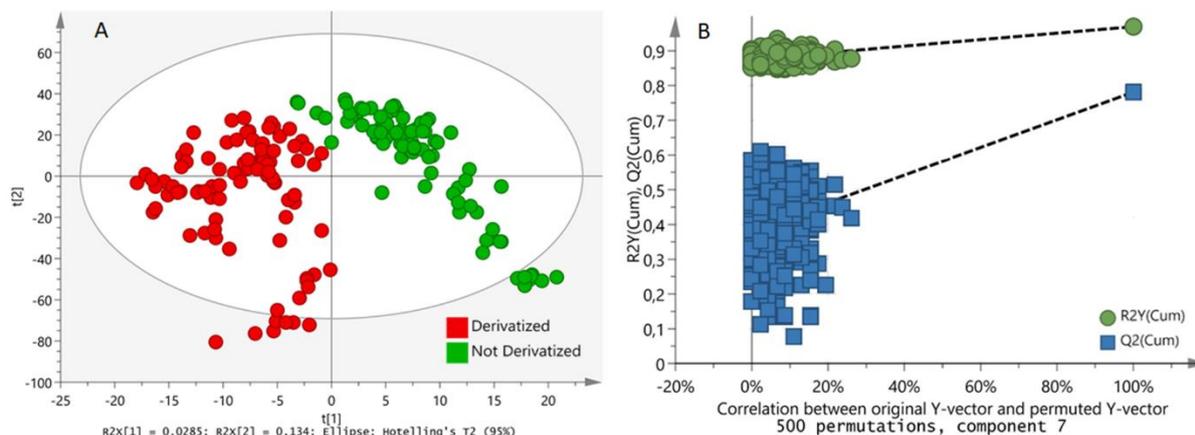


Figure 12 A : PLS-DA obtenue pour la séparation de 92 vins analysés par LC-QToF-MS en mode positif avant et après dérivatisation à l'aide de 4-méthyle-1,2-benzoquinone. B : Validation du modèle correspondant.

3.4.1.3. Test de corrélation

En plus des analyses multivariées, des mesures de corrélation peuvent être utilisées afin de discriminer les métabolites impliqués dans un processus ou mécanisme physiologique ou chimique. Pour cela, un test de corrélation non paramétrique peut être réalisé, tel que le test de Spearman. Ce test permet de calculer la relation entre deux grandeurs x et y . Le test de Spearman est un test de rang qui calcule des forces de liaisons monotones et non linéaires. Il faut toutefois faire attention avec la corrélation obtenue, une corrélation, même forte, entre deux observations n'implique pas nécessairement une relation de cause à effet ! Ces corrélations pouvant être dues à un troisième facteurs qui n'a pas été mesuré ^{120,121}. La Figure 13 présente un exemple de calcul de corrélation entre les résultats LC-QToF-MS en mode d'ionisation positif et les résultats obtenus par analyse DPPH pour une série de vins. Dans ce cas, le calcul de corrélation permet donc de déterminer les couples m/z -TR corrélés avec la variable Ec_{20} . Il est alors possible de conserver uniquement les couples m/z -TR corrélés aux analyses DPPH, en utilisant une valeur de corrélation supérieur à 0,6 (en valeur absolue) correspondant à une corrélation forte.

# Variable	80	262	7597	864	1478	1692		
m/z	231.1341	256.1292	231.1357	432.2453	203.0549	157.0494	Echantillons	EC20
TR (min)	0.6	0.7	4.7	0.9	1.2	1.3		
R.17.056	369 775	69 704	139 584	67 501	131 412	1 712 467	R.17.056	20.21
R.17.057	396 886	94 412	147 803	89 380	170 843	1 346 786	R.17.057	18.63
R.17.058	671 870	50 494	126 797	71 189	148 527	1 879 558	R.17.058	17.93
R.17.059	312 966	76 270	114 834	0	210 742	1 751 873	R.17.059	20.05
R.17.060	430 372	65 640	73 232	52 565	168 916	1 722 265	R.17.060	21.33
R.17.061	706 595	71 181	209 360	83 132	166 651	1 727 416	R.17.061	21.16
R.17.062	874 520	85 789	46 055	77 281	130 079	1 044 777	R.17.062	25.53
R.17.063	701 960	102 123	74 841	96 773	111 498	974 374	R.17.063	24.91
R.17.064	557 425	246 594	0	207 238	42 089	553 556	R.17.064	34.75

# Variable	80	262	7597	864	1478	1692
m/z	231.1341	256.1292	231.1357	432.2453	203.0549	157.0494
TR (min)	0.6	0.7	4.7	0.9	1.2	1.3
p-Value	6.2E-01	8.5E-15	1.4E-10	1.5E-01	1.8E-10	4.1E-13
Corrélation	-0.1	0.7	-0.6	0.2	-0.6	-0.7

Figure 13 : Exemple du calcul de corrélation de Spearman entre les résultats LC-QToF-MS et DPPH permettant d'obtenir pour chaque couple m/z-TR la p-Value et la corrélation avec la valeur Ec_{20} .

3.4.2. Identification des métabolites d'intérêts

L'isolation de métabolites d'intérêts à l'aide des méthodes d'analyses statistiques, ne permet pas dans un premier temps une meilleure compréhension des mécanismes ou voies métaboliques impliquées. En effet, les métabolites sont connus uniquement via le couple m/z-TR, ne donnant aucune information quant aux propriétés du composé associé. C'est pourquoi, il est nécessaire d'identifier ces composés pour comprendre leurs rôles dans les mécanismes étudiés.

Il existe des bases de données en ligne permettant une recherche rapide des métabolites isolés, tel que Metlin, KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) ou YMDB (*Yeast Metabolome Database*). En parallèle de ces recherches, la formule élémentaire du composé peut être déterminée à l'aide de sa masse et de son profil isotopique. La Figure 14A présente un exemple de détermination de la formule élémentaire à l'aide du profil isotopique pour l'analyse du GSH par LC-QToF-MS en mode d'ionisation positif. L'outil SmartFormula de la suite de logiciel Bruker permet de déterminer les formules élémentaires possibles. Il apparaît que plusieurs formules sont possibles dans ce cas. Le logiciel calcule un score en fonction de la

différence entre la masse théorique et la masse détectée (err [ppm]), mais également de l'indice « mSigma » qui compare les intensités relatives obtenues entre les pics isotopiques expérimentaux et calculés. En effet, les isotopes de chaque atome n'ont pas la même abondance relative. Les Figure 14 B et C présentent ainsi la différence entre le profil isotopique théorique de l'atome de soufre et de carbone. La formule avec le score le plus élevé est la formule élémentaire la plus proche du profil isotopique expérimental. En outre, plus le spectromètre de masse a une précision élevée, plus le nombre de formules élémentaires possibles est réduit. Des analyses de fragmentation (MS^2 ou MS^n) permettent d'apporter des informations structurales sur le composé étudié, permettant également d'augmenter la confiance que l'on peut avoir dans l'annotation.

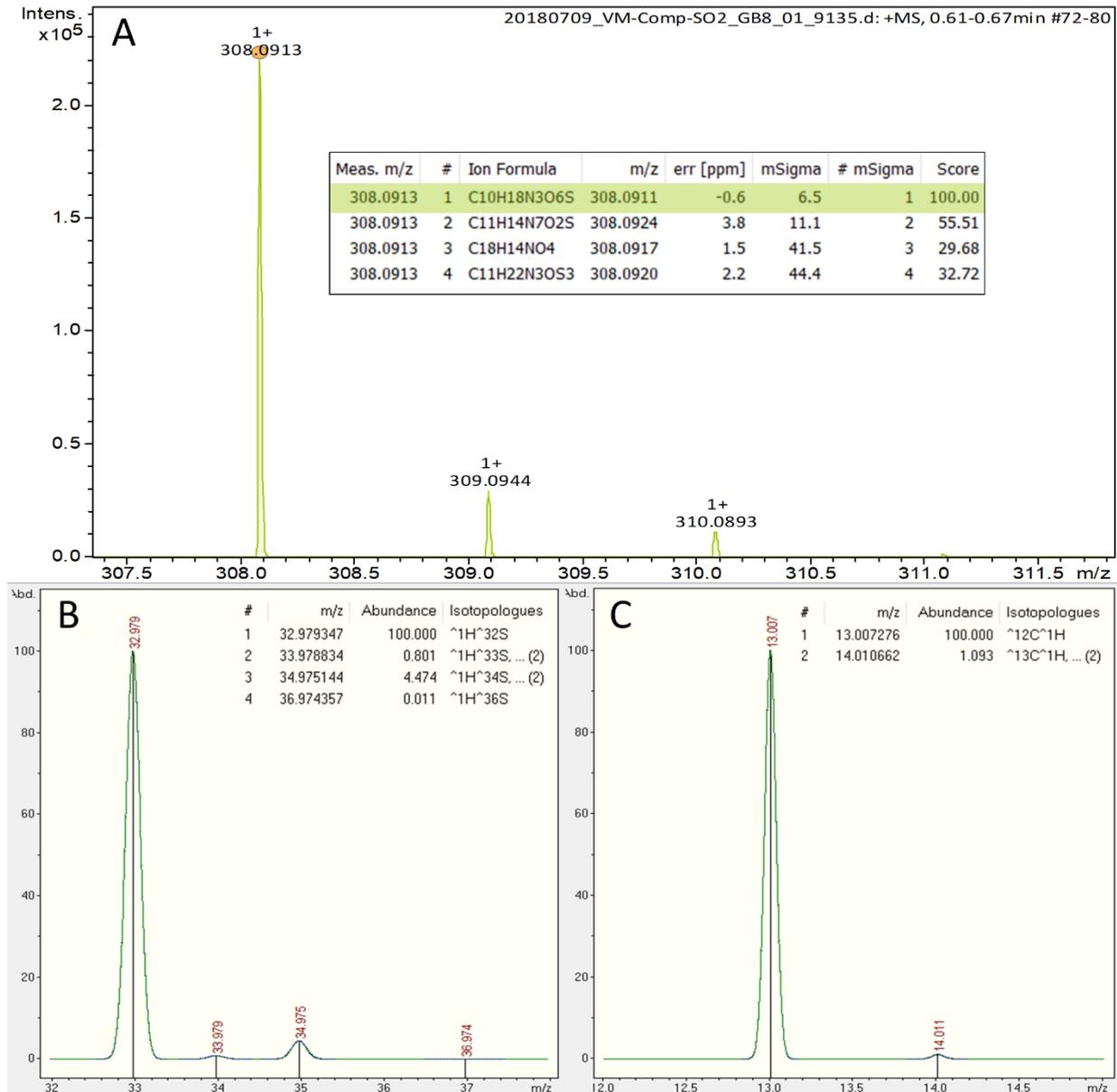


Figure 14 A : Exemple de profil isotopique obtenu par analyse LC-QToF-MS en mode d'ionisation positif, ici pour le GSH, ainsi que les formules élémentaires possibles déterminées par l'outil SmartFormula (Bruker), la formule correspondant au GSH est surlignée en vert. B : profil isotopique théorique de l'atome de Soufre, C : de l'atome de Carbone déterminés avec IsotopePattern (Bruker).

Afin d'évaluer la confiance dans l'identification d'un marqueur moléculaire, des outils de classification ont été mis en place par Sumner *et al.* ainsi que par Schymanski *et al.*^{122,123}. Schymanski *et al.* ont introduit une échelle de confiance pour l'identification de composés d'intérêts par LC-MS (Figure 15). Le niveau 5 correspond au plus bas niveau d'identification, soit uniquement la connaissance du couple m/z -TR. Le niveau 4 indique qu'une formule élémentaire a pu être déterminée à l'aide du profil spectral. Le niveau 3 témoigne du fait qu'une structure est possible mais que les informations obtenues (MS², base de données) sont

insuffisantes pour valider l'identification (isomères par exemple). Le niveau de confiance 2, indique une structure probable du composé, laissant peu de place au doute. Cette catégorie peut être séparée en deux sous-catégorie : a) validation de la structure via des bases de données en ligne ou par comparaison à la littérature et b) aucun composé ne correspond dans les bases de données ou la littérature mais les analyses (fragmentations) et conditions expérimentales ne laissent pas de doute. Enfin le niveau 1 correspond à une structure confirmée par comparaison avec un composé de référence (standard), analyses MS, MS² et temps de rétention ¹²³.

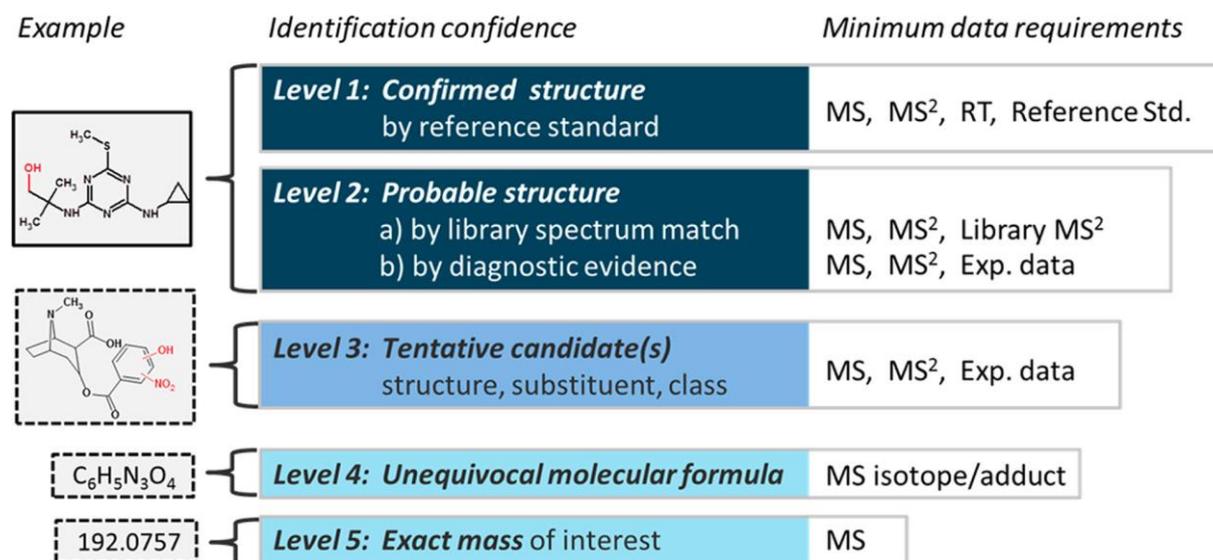


Figure 15 : Schématisation de l'échelle de confiance pour l'identification de composés par LC-MS ¹²³.

Sumner *et al.* ont introduit non pas un niveau de confiance mais un score reflétant les analyses réalisées (Tableau 2). Pour chaque analyse réalisée un score est attribué, il suffit alors de faire la somme des scores obtenus. Ce score est doublé lorsqu'il y a correspondance entre l'annotation et un composé de référence, et multiplié par 1,5 lors de concordance avec la littérature ou une librairie en ligne. Plus ce score est élevé, plus on peut avoir confiance en l'annotation. A titre d'exemple, l'utilisation UHPLC permet d'obtenir 1,5 points, la détermination de la formule élémentaire par le profil spectral 1 point et l'utilisation de MS² de précision 2 points, soit 4,5 points pour une analyse UHPLC-MS avec fragmentation. Ce score peut être augmenté jusqu'à 6,75 s'il y a correspondance avec une base de données et 9 grâce une validation à l'aide d'un standard. Ce score permet de quantifier l'effet de différentes analyses sur l'identification du composé, l'utilisation de RMN en parallèle permettant par exemple d'ajouter 2 points pour la RMN du proton, 3 points pour de la 2D et 4 points pour un couplage proton/carbone ¹²².

Tableau 2 : Scores attribués en fonction de l'analyse réalisée. ¹²²

Analyse	Score
<i>Spectre d'absorbance IR</i>	0,5
<i>Spectre d'absorbance UV</i>	0,5
<i>Temps de rétention (+/- 2,5%)</i>	1,0
<i>Temps de rétention haute résolution (+/- 0,5% $W_{1/2} < 10s$)</i>	1,5
<i>Indice de rétention haute résolution (+/- 0,5%, $RI \pm 25$, $W_{1/2} < 10s$)</i>	2,0
<i>Masse nominale de l'ion parent</i>	0,5
<i>Précision ion parent (<5ppm)</i>	1,0
<i>Formule élémentaire basé sur profil spectral</i>	1,0
<i>Spectre MS correspond à une librairie commerciale</i>	1,0
<i>Fragmentation (MS^2)</i>	1,5
<i>MS^2 précise</i>	2,0
<i>1H 1D RMN</i>	2,0
<i>1H 2D RMN</i>	3,0
<i>$^1H * ^{13}C$ 2D RMN</i>	4,0

Récemment des outils en ligne, tel qu'Oligonet, ont été développés ¹²⁴. Oligonet n'est pas une base de données, mais un outil permettant de déterminer à partir d'une valeur de m/z si le composé étudié peut être un peptide. Cet outil n'indique pas une séquence d'acide aminés mais une ou plusieurs combinaisons linéaires d'acide aminés permettant d'obtenir le m/z recherché.

3.5. Cas spécial des composés soufrés : dérivation

Comme nous l'avons vu précédemment, les composés soufrés jouent un rôle important dans les mécanismes antioxydants du vin. Malheureusement, leur détection est souvent compliquée en raison de la grande réactivité du groupement sulfhydryle, causant une perte par oxydation, mais également à cause d'un faible potentiel d'ionisation par ESI. Une étude a

montré que le fractionnement par électrophorèse capillaire à faible pH (1.7) suivi d'une analyse FT-ICR-MS permet de favoriser la détection des composés soufrés¹²⁵. L'analyse de Pinot Noir de deux millésimes (1977 et 2005) a permis de montrer une part importante de composés soufrés pouvant être des composés phénoliques sulfonés, spécialement dans le vin le plus ancien. En comparaison un fractionnement réalisé à pH 9,5, favorise les composés de formule élémentaire CHO.

Le plus couramment la détection des composés soufrés est réalisée par dérivation. De nombreux agents de dérivation ont été développés pour le dosage des thiols, afin d'augmenter leurs seuils de détection et de les stabiliser^{126,127}. Ces agents peuvent être classés en plusieurs groupes : composés halogénés, aziridines, disulfures, composés mercuré et maléimides N-substitués¹²⁷⁻¹³¹. Cependant, ces agents de dérivation ont été développés pour une utilisation en milieu alcalin. Il est connu que l'état de protonation du groupement sulfhydryle joue un rôle important dans la réactivité des thiols¹³². Le pH du vin étant acide, une modification de celui-ci entraîne une grande modification des équilibres chimiques, tel que l'équilibre phénol/phénolate. Or, en milieu alcalin, la proportion de phénolate, qui est beaucoup plus réactive, va augmenter, impliquant une oxydation des composés phénoliques⁵. Cette oxydation peut entraîner dans le même temps une consommation des composés soufrés. De ce fait, afin de dériver les composés soufrés en impliquant un minimum de modification à la matrice vin, en particulier du pH, il est important d'utiliser un agent de dérivation compatible au pH du vin. Jonbert *et al.* ont montré en vin modèle, à pH acide, que la cystéine peut réagir avec la 4-méthyle-1,2-benzoquinone par addition nucléophile¹³³. Cette réaction a également été étudiée avec des acides aminés et des composés volatiles odorant montrant un taux de réaction proche de 95%¹³⁴.

Dans la majorité des études, l'étude des composés soufrés est réalisée en ciblant un composé, tel que GSH, Cys ou HCys^{128,130-133,135}. A notre connaissance, une seule étude de métabolomique a été réalisée pour l'étude non ciblée des composés soufrés du vin (vin de riz) par dérivation en utilisant une analyse statistique multivariée (OSC-PLS-DA)¹²⁹. Cette étude a permis d'isoler de nouveaux composés, en revanche les conditions de dérivation peuvent être jugées comme « agressives » pour le vin avec un pH à 9,2 et une température de 60°C.

Objectifs

Les mécanismes physico-chimiques agissant au cours de l'oxydation des vins blancs ne sont que partiellement connus, c'est pourquoi afin d'apporter plus de compréhension à ceux-ci il est nécessaire de développer des outils de discriminations des vins en fonction de leur capacité antioxydante.

Le premier objectif de ce travail de thèse sera d'optimiser la mesure de la capacité antioxydante par DPPH pour les vins blancs. Cette méthode sera ensuite comparée avec la méthode de référence du laboratoire (RPE) afin de déterminer la complémentarité des deux méthodes. Cette étude de complémentarité portera non seulement sur la comparaison des capacités antioxydantes déterminées par les deux méthodes mais également sur les composés impliqués dans celles-ci à l'aide d'analyses FT-ICR-MS.

Le deuxième objectif est de caractériser les composés marqueurs de la stabilité oxydative. Pour cela, l'utilisation de l'analyse LC-QToF-MS permettra d'isoler les composés corrélés avec la capacité antioxydante des vins. Une seconde liste de marqueurs moléculaires sera isolée, en s'intéressant plus spécifiquement aux composés nucléophiles du vin, qui peuvent piéger les quinones formées au cours de l'oxydation et ainsi limiter l'oxydation du vin.

Enfin le dernier objectif de ce travail de thèse sera d'étudier l'impact de différentes pratiques œnologiques, sur la capacité antioxydante du vin et les marqueurs moléculaires associés. Pour cela, deux paramètres seront étudiés, le premier est l'effet de l'élevage sur des vins issus de différentes appellations de Bourgogne. Le second est l'impact de l'ajout de sulfites et d'hydroxygénation du moût sur les vins obtenus.

Matériels et Méthodes

1. Solvants et réactifs

Les solvants et réactifs utilisés au cours de cette étude sont présentés dans le Tableau 3, en fonction des analyses dans lesquels ils ont été utilisés.

Tableau 3 : Liste des réactifs et solvants utilisés pour les différentes analyses.

<i>Nom</i>	<i>Origine</i>	<i>Utilisation</i>
<i>DPPH</i>	Sigma Aldrich	DPPH
<i>Acide citrique</i>	Sigma Aldrich	DPPH
<i>Hydrogénophosphate de sodium</i>	Sigma Aldrich	DPPH
<i>Méthanol (99,8%)</i>	ChemLab	DPPH
<i>POBN</i>	Sigma Aldrich	RPE
<i>Peroxyde d'hydrogène</i>	Sigma Aldrich	RPE
<i>Acide tartrique</i>	Sigma Aldrich	RPE
<i>Ethanol</i>	Sigma Aldrich	RPE
<i>Sulfate de fer, 7 H₂O</i>	Sigma Aldrich	RPE
<i>Hydroxyde de sodium</i>	Sigma Aldrich	RPE
<i>Acide formique (LC-MS)</i>	Acros Organique	LC-MS
<i>Tuning Mix</i>	Agilent Technologies	LC-MS
<i>Acétonitrile (LC-MS)</i>	Biosolve	LC-MS
<i>Résine échangeuse d'ions Amberlyst A-26(OH)</i>	Sigma Aldrich	Composés Nucléophiles
<i>Acide périodique</i>	Sigma Aldrich	Composés Nucléophiles
<i>4-méthyle catéchol</i>	Sigma Aldrich	Composés Nucléophiles
<i>Méthanol (LC-MS)</i>	Fluka	FT-ICR-MS

2. Echantillonnage

Au cours de cette étude, divers vins ont été analysés pouvant être séparés en deux catégories, des vins finis et des vins en cours d'élevage. Les vins en cours d'élevage ont été suivis sur 3 millésimes 2016, 2017 et 2018 (Annexe 1).

2.1. Vins analysés en cours d'élevage

2.1.1. Vins utilisés pour l'analyse de l'effet de l'élevage

Pour l'étude de l'impact de l'élevage sur la capacité antioxydante des vins ainsi que leurs marqueurs moléculaires associés, des vins de 14 appellations de Bourgogne ont été sélectionnés. Ces vins proviennent de deux domaines (Lf et P), et de deux millésimes (2016 et 2017).

Afin de limiter l'impact du bois, des fûts de 2 à 3 vins ont été utilisés. Un seul fût par appellation a été analysé, car le but ici n'était pas de comparer les appellations entre elles, mais d'avoir des vins suffisamment différents et représentatifs des vins blancs de Bourgogne, avec des appellations allant de l'appellation Bourgogne jusqu'au Grand Cru. Les appellations sélectionnées sont : Bourgogne, Beaune, Meursault 1^{er} Cru, Meursault Clos de Mazeray, Montrachet, Pulligny Combettes, Corton Charlemagne, Bourgogne, Pulligny Village, Pulligny Pucelle, Meursault dos d'âne, Batard Montrachet, Bienvenue Batard Montrachet et Chevalier Montrachet.

Le millésime 2016 a été analysé après un an d'élevage (16 vins), et 3 prélèvements ont été réalisés au cours du millésime 2017 afin de suivre l'évolution du vin (42 vins). Il est ainsi possible de déterminer l'évolution des vins au cours de l'élevage, mais également de comparer les deux millésimes après un an d'élevage.

2.1.2. Vins utilisés pour l'étude des pratiques pré-fermentaires

Afin de déterminer l'effet de différentes étapes pré-fermentaires sur la capacité antioxydante du vin, une étude a porté sur l'impact de l'hydroxygénation du moût ou de sa protection à l'aide de SO₂ sur le vin qui en résulte. Pour cela, les vins proviennent d'un même domaine (Lf), d'une même parcelle et du même millésime, permettant ainsi que l'unique différence entre les vins soit uniquement due au traitement reçu par le moût. Différentes modalités ont été étudiées : hydroxygénation du moût, sulfitage à 2 g/hL dans la maie, sulfitage à 8 g/hL dans la maie, hydroxygénation puis sulfitage à 4 g/hL au débouillage et pour la dernière modalité : sulfitage du 1^{er} jus et hydroxygénation puis sulfitage à 3 g/hL au débouillage du jus de fin de presse. La Figure 16 présente le protocole expérimental. L'hydroxygénation a été réalisée dans la maie, lors du pressurage, le moût n'ayant pas été protégé de l'oxydation par un ajout de SO₂, ainsi que lors du transfert du moût en cuve pour le débouillage. Le tuyau de sortie de pompe a été placé en haut de la cuve afin de permettre une

oxygénation du moût, alors que celui-ci était placé en fond de cuve pour les autres modalités. La dernière modalité étant la méthode usuelle du domaine. Cette expérimentation a été réalisée selon la même procédure sur deux millésimes, 2017 et 2018, uniquement les résultats du millésime 2017 seront détaillés dans cette étude, l'élevage du millésime 2018 étant toujours en cours. Concernant le millésime 2017, pour chaque modalité, 2 fûts de 2013 ainsi qu'un mélange de 5 fûts (2*2013, 2*2015, 2017) ont été analysés. Ce mélange de fût permet d'avoir un échantillon plus représentatif des vins issus du domaine. Ces fûts ont été analysés au cours de l'élevage, depuis fin FA et pendant un an, constituant ainsi un échantillonnage de 81 vins. En ce qui concerne le millésime 2018, pour chaque modalité, 2 fûts de 2015 ainsi qu'un mélange de 5 fûts (2*2015, 2*2017, 2018) ont été analysés. Les analyses ont été réalisées fin FA sur 15 vins.

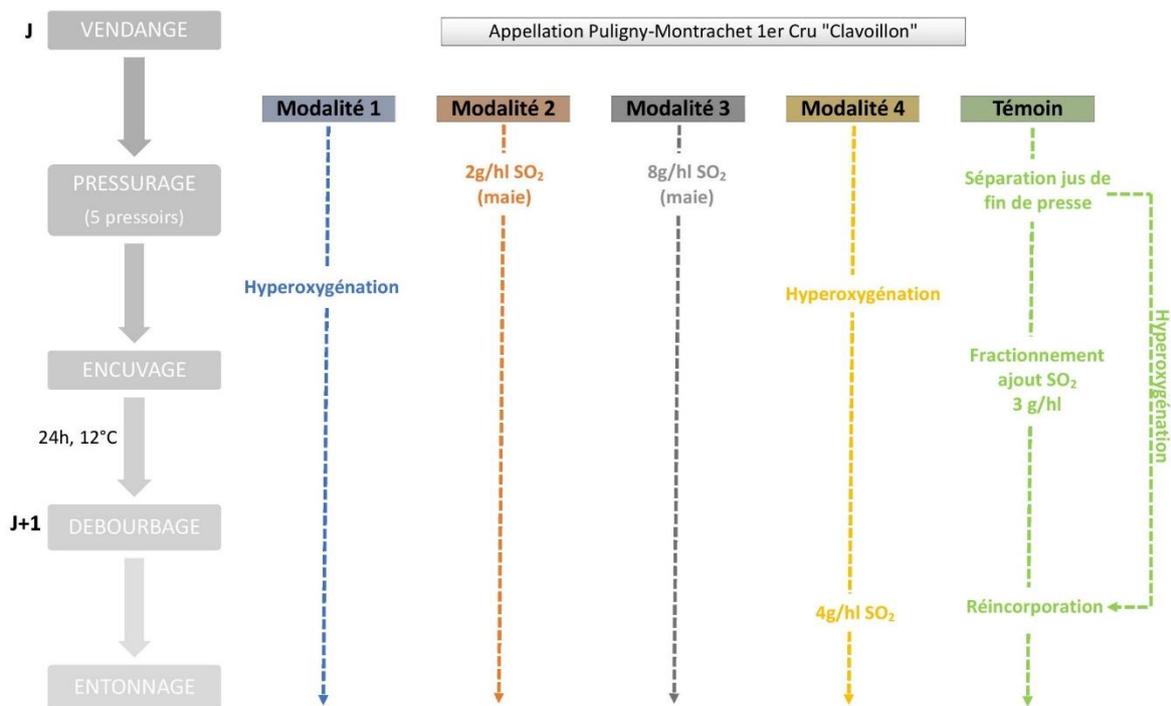


Figure 16 : Schéma représentant le protocole expérimental, d'après le rapport de stage DNO de Julie Caiveau.

2.1.3. Autres vins suivis pendant l'élevage

D'autres vins ont été suivis durant l'élevage sur les millésimes 2017 et 2018, ils ne seront discutés en détails en raison d'un manque de répliques, mais ont été utilisés pour la recherche de marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante.

Plusieurs de ces vins proviennent d'expérimentations du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) qui porte sur l'effet du traitement de la vigne (Ecophyto, raisonnée et biologique) et sur la maturité du raisin (date de vendange à -7 jours, t₀ et +7 jours). Cette dernière modalité est réalisée sur plusieurs parcelles, située dans le Maconnais, en Côte Chalonnaise et dans l'Yonne. Dû à un faible volume par modalité, un seul répliqua a été analysé. Ces 24 vins ont été analysés fin FA et après 4 mois d'élevage en dame-jeanne de 20L.

Plusieurs vins fin FA provenant de plusieurs domaines (J, P, N Ch) ont également été analysés, soit 23 vins. Ces vins proviennent d'expérimentations sur l'impact des fûts de chêne au cours de l'élevage. D'autres vins (domaine J) issus d'une expérimentation sur la maturité du raisin ont également été analysés, avec deux fûts par modalités (vendange à t₀ et t₃). Un prélèvement a été réalisé fin FA, à 1, 2 et 3 mois d'élevage, générant un échantillonnage de 16 vins.

Au cours du millésime 2018, plusieurs vins ont également été analysés fin FA. Il s'agit de vins issus d'une expérimentation sur la maturité du raisin avec un décalage de 5 jours de la date de vendange. Ces vins proviennent de 4 domaines (Olf, C, P, B), sur différentes appellations de Bourgogne : Pulligny-Montrachet 1^{er} cru et village, Savigny les Beaune et Corton-Charlemagne, représentant 34 vins.

Enfin des échantillons de vins issus d'autres cépages ont été analysés afin d'ajouter une diversité supplémentaire à l'échantillonnage. Ainsi, 6 Sémillons issus de deux domaines (Ltm et Lu) ont été analysés fin FA. Des sauvignons blancs provenant de 3 domaines (Y, Shl et M) ont également été analysés (30), dont 24 fin FA et 6 après 4 mois d'élevage. Ces échantillons proviennent d'une expérimentation sur l'impact des fûts de chêne au cours de l'élevage.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif du nombre de vin en cours d'élevage analysés en fonction du cépage et du millésime.

<i>Nombre de vins</i>	<i>2016</i>	<i>2017</i>	<i>2018</i>
<i>Chardonnay</i>	17	185	49
<i>Sauvignon Blanc</i>	0	30	0
<i>Sémillon</i>	0	6	0

2.2. Vins issus d'une verticale

Une série verticale de Cortons Charlemagne provenant d'un même domaine a été analysé par DPPH et RPE. Cette verticale était composée de 17 millésimes répartis entre 1997

et 2014, avec un triplicata de bouteilles par millésime. Ces vins ont permis la validation de la méthode DPPH par comparaison avec la mesure par RPE ainsi qu'une comparaison avec le niveau d'oxydation évalué par analyse sensoriel selon le protocole proposé par Ballester *et al.*¹⁷.

3. Analyse de la capacité antioxydante

3.1. Analyse DPPH

Afin de permettre l'analyse de composés phénoliques mais aussi de composés hydrophiles, tel que les composés soufrés, la solution de DPPH à 25 mg/L est préparée dans un mélange composé de 40% de tampon citrate-phosphate et 60% de méthanol¹³⁶. Le tampon est préparé à partir d'acide citrique à 0,1 M et de phosphate dibasique à 0,2 M, pour un pH final à 3,6. Afin de protéger les propriétés antioxydantes des composés et vins à analyser, la préparation des analyses se déroule sous atmosphère inerte. Ainsi sous boîte à gants purgée à l'azote, 100 μ L de la solution à analyser sont ajoutées à 3,9 mL de solution DPPH tamponnée. Après une incubation de 4 h à l'obscurité, l'absorbance à 525 nm est mesurée⁹⁴.

Chaque échantillon est analysé à plusieurs concentrations afin de réaliser une gamme d'étalonnage et déterminer la concentration permettant de diminuer de 20% l'absorbance initiale du DPPH. Cette concentration est notée Ec_{20} ⁹⁴. Pour cela, des volumes de vin (ou de solutions modèles) variant de 0 μ L à 100 μ L puis compléter à 100 μ L avec de l'eau sont ajoutés à la solution de DPPH. Les résultats sont normalisés par calcul du rapport molaire entre la quantité d'antioxydant ajoutée et de DPPH présent, tel que : $R_n = \frac{n_{Echantillon}}{n_{DPPH}}$ pour des composés standard, et tel que : $V_{norm} = V * \frac{[DPPH]_{th}}{[DPPH]_{exp}}$ pour des vins. R_n représentant le rapport molaire, $n_{Echantillon}$ la quantité de matière (mol) du composé, n_{DPPH} la quantité de matière de DPPH (mol), V_{norm} le volume de vin normalisé, V le volume de vin ajouté (μ L), $[DPPH]_{exp}$ la concentration en DPPH expérimentale et $[DPPH]_{th}$ la concentration de DPPH théorique fixée à 25mg/L. L'absorbance mesurée (Abs) est normée (Abs%) par rapport à l'absorbance d'un blanc (eau) tel que : $Abs_{\%} = \frac{Abs}{Abs_{Blanc}} * 100$, puis tracée en fonction de V_{norm} ou R_n (Figure 17).

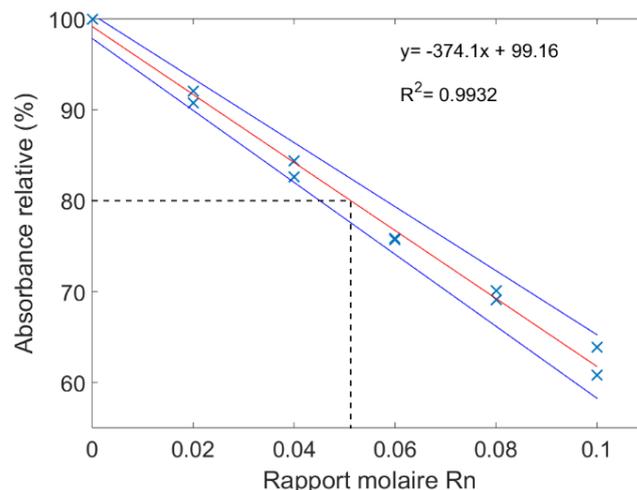


Figure 17 : Résultat obtenu pour l'analyse de la capacité antioxydante du GSH par DPPH. La droite rouge représente la droite de régression, les droites bleues représentent l'intervalle de confiance de 95% autour de celle-ci et les pointés matérialisent E_{c20} .

Le SO_2 étant un composé antioxydant et réagissant avec le DPPH, avant analyse 5 mL de vin sont désulfités par bullage au CO_2 pendant 5 minutes, afin de ne pas considérer la quantité de SO_2 libre dans l'analyse de la capacité antioxydante^{110,136–139}.

3.2. Analyse par RPE

L'analyse a été réalisée sur un spectromètre RPE ER300 (Bruker Biospin GmbH, Germany) avec les paramètres suivants :

- Fréquence de modulation 100 kHz
- Amplitude de modulation 0,9 G
- Temps constant 10,24 ms
- Temps de conversion 2,56 ms
- Puissance micro-onde 10 mW
- Gain du récepteur 10^4

Les échantillons ont été introduits dans un capillaire RPE et l'acquisition a été réalisée à 298 K avec une analyse toutes les 2 minutes. L'amplitude du signal RPE (Figure 18A), a été déterminée à l'aide du logiciel WinESR (Bruker Biospin GmbH, Germany) en mesurant l'amplitude pic à pic du doublet central.

L'oxydation du vin a été initiée par la réaction de Fenton par ajout de Fe^{2+} et H_2O_2 dans le vin à des concentrations initiales de 50 μM et 300 μM , respectivement. La formation du

radical hydroxyle va alors oxyder l'éthanol en radical hydroxy-éthyle (HER). L'ajout de la sonde 4-pyridil-1-oxyde-N-tert-butylnitron (POBN) à une concentration initiale de 30 mM, permet de suivre la cinétique de formation de l'adduit HER-POBN au cours du temps. Tout comme pour l'analyse DPPH, 5mL de vin sont désulfités par bullage au CO₂ pendant 5 min afin d'éliminer le SO₂ libre avant analyse¹¹⁰.

Afin de normaliser les résultats obtenus, l'amplitude déterminée pour chaque échantillon de vin a été normalisée par l'amplitude maximale obtenue pour un vin modèle (6g/L acide tartrique, 12% v/v éthanol, pH 3,2). Un vin modèle a été analysé chaque jour en début d'analyse pour s'assurer des bonnes conditions expérimentales. La Figure 18B représente l'amplitude normée en fonction du temps pour un vin modèle et un vin en cours d'élevage.

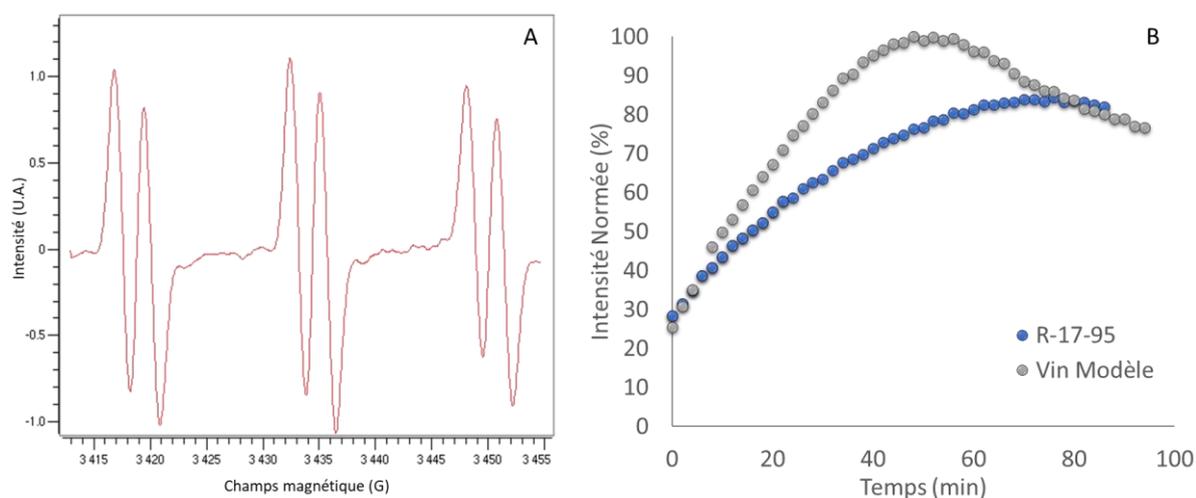


Figure 18 A : Spectre RPE obtenu pour l'adduit POBN-HER après initiation chimique par la voie de Fenton. L'amplitude (A) est calculée pour déterminer la quantité d'adduits détectés. B : Cinétique obtenue pour un vin modèle et un Chardonnay après fermentation alcoolique (R-17-95). L'amplitude normée par l'amplitude maximale du vin modèle est représentée en fonction du temps.

Afin de comparer la capacité antioxydante des vins, 3 paramètres ont été déterminés, l'amplitude normée maximale (Max), le temps d'obtention de cette amplitude (T_{Max}) ainsi que la 1^{ère} Pente (Figure 19).

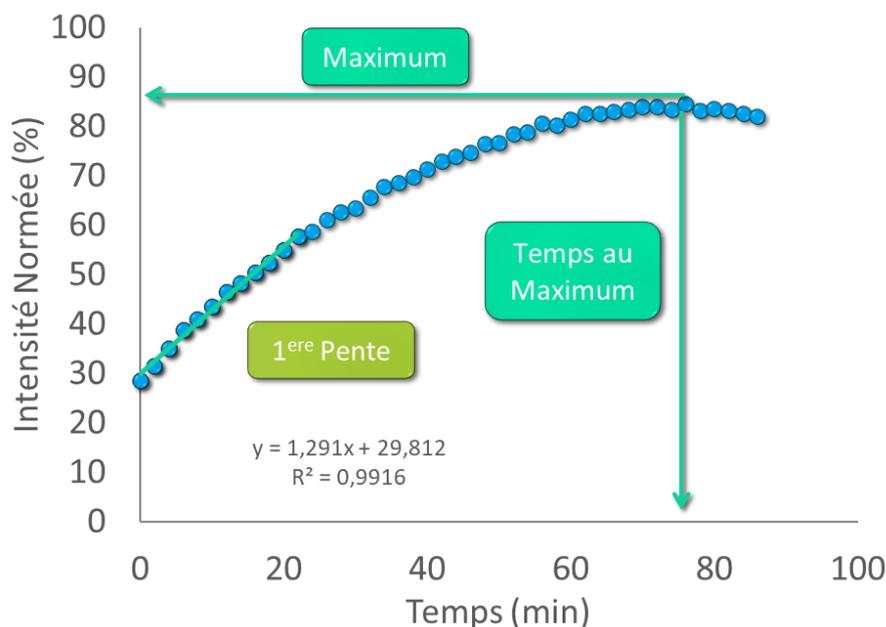


Figure 19 : Visualisation des 3 variables déterminées par RPE pour la comparaison de la capacité antioxydante, l'amplitude normée maximale (Max), le temps au maximum (T_{Max}) et la 1^{ère} Pente. L'analyse a été réalisée sur un Chardonnay issu du millésime 2017, en fin FA (R-17-95).

4. Analyses métabolomiques

4.1. Analyse par LC-MS

4.1.1. Analyse standardisée « SOP »

La principale analyse de métabolomique a été réalisée à l'aide d'un système de chromatographie liquide à ultra haute performance UHPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher) couplé au spectromètre de masse Maxis plus MQ ESI-Q-ToF (BrukerDaltonics GmbH, Brème, Allemagne, Figure 20). La colonne qui a été utilisée est une Acquity BEH C18 1,7 μm , 100 x 2,1 mm de Waters (Guyancourt, France) en phase inverse permettant la séparation des composés non polaires et moyennement polaires. La phase mobile était constituée de (A) 5% d'acétonitrile acidifié (0,1% v/v d'acide formique) et (B) d'acétonitrile acidifié (0,1% v/v d'acide formique). La température d'élution était de 40°C avec le gradient :

- 0 à 1,1 min : 5% (v/v) de B
- 1,1 à 6,4 min : augmentation linéaire jusqu'à 100% de B
- 6,4 à 10 min : 100% de B

Le débit était de 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. La détection a été réalisée avec les paramètres suivant : pression du Nebulizer = 2,0 bar, débit du gaz (azote) = 10 L/min, température du gaz = 200 °C, voltage du capillaire = 4500V, end plate offset = 500 V, masses comprises entre 100 et

1500 m/z , mode d'ionisation positif et négatif. Avant chaque lot d'analyse le spectromètre de masse a été recalibré à l'aide de Tuning Mix (Agilent, Les Ulis, France) en mode « enhanced quadratic » avec une erreur inférieure à 0,5 ppm. Afin de recalibrer les spectres obtenus, du Tuning Mix dilué au ¼ dans de l'acétonitrile a été injecté au début de chaque injection. La préparation des échantillons a consisté en une centrifugation du vin à 10 000 rpm pendant 10 min. Les échantillons ont été analysés dans un ordre aléatoire. Lors de chaque lot d'analyse, un mélange de tous les échantillons (QC : Quality Control) a été réalisé et analysé afin de vérifier la stabilité de la détection LC-MS au cours de la séquence d'analyse.

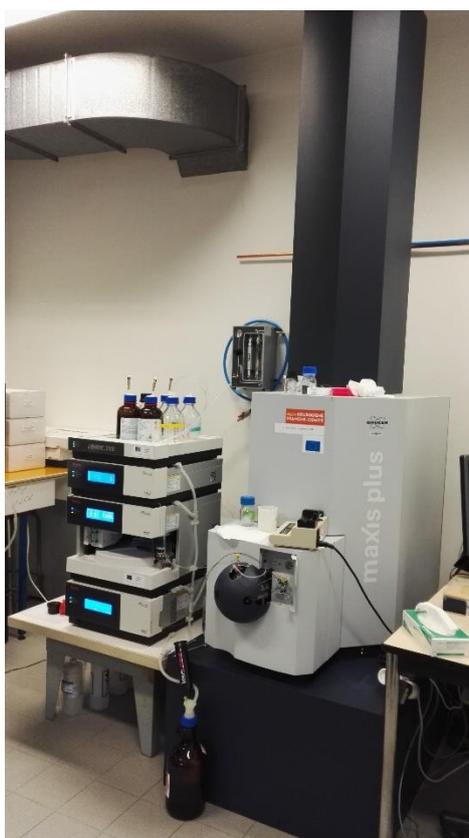


Figure 20 : UHPLC Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher) couplée au spectromètre de masse Maxis plus MS ESI-Q-TOF (Bruker)

4.1.2. Workflow pour le traitement de données LC-MS

Après analyse, les spectres de masses ont été recalibrés à l'aide du logiciel DataAnalysis (Bruker, Bremen, Germany), et les couples m/z -TR ont été extraits. À l'aide d'un script R, les couples m/z -TR présents dans les différents échantillons ont été alignés par rapport à leur temps de rétention (erreur < 0,3min) et en masse (erreur < 10 ppm). Ceci permet d'obtenir une matrice contenant tous les échantillons et tous les couples détectés, facilitant le traitement des données.

La 1^{ère} étape a été de « nettoyer » la matrice en supprimant les couples m/z -TR issus d'un blanc (eau milli-Q), permettant de supprimer les couples m/z -TR provenant de contaminant, ou impuretés des solvants par exemple. La 2^{nde} étape, a été de visualiser les résultats à l'aide d'une ACP, réalisée avec Simca (Umetrics), afin de vérifier la répétabilité analytique de la LC-QToF-MS. Pour cela, il s'est agi de vérifier que les échantillons QC étaient bien groupés et centrés dans l'ACP (Figure 21) afin de s'assurer de la stabilité analytique de l'appareillage LC-QToF-MS durant l'analyse.

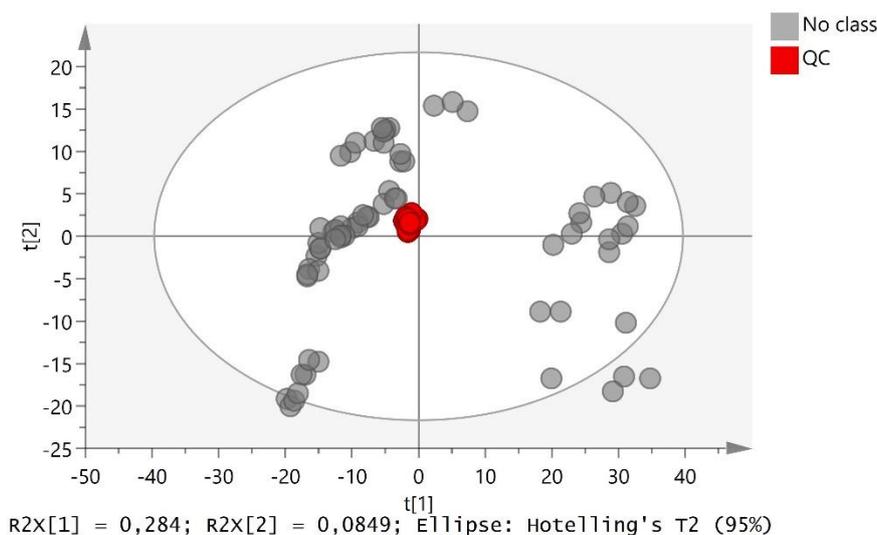


Figure 21 : ACP réalisée à partir de données LC-QToF-MS en mode négatif sur différents vins en cours d'élevage (68 vins) permettant de vérifier la stabilité analytique au cours de l'analyse.

Suite à ces vérifications et à une première visualisation des données, les matrices obtenues ont été utilisées afin de déterminer les marqueurs moléculaires corrélés avec les analyses DPPH et RPE, puis d'étudier comment ces marqueurs sont impactés par différentes pratiques œnologiques.

4.1.3. Analyse des composés nucléophiles

En plus de l'analyse SOP, une analyse plus spécifique des composés nucléophiles a été réalisée. Pour cela, les mêmes paramètres chromatographiques et spectrométriques que la méthode SOP ont été utilisés. L'analyse a été réalisée en mode d'ionisation positif. Pour cette analyse, une dérivatisation des composés nucléophiles a été réalisée par ajout de 4-méthyl-1,2-benzoquinone (Q). La quinone a été préparée par oxydation du 4-méthyl-catéchol (QH₂) via la procédure développée par Nikolantonaki *et al.* ¹³⁴. Un mM de Q a été ajouté à 1 mL de vin à analyser puis la réaction a été stoppée après 30 min d'incubation par ajout d'1 mM

de SO₂. Un échantillon non dérivatisé a été réalisé pour chaque vin en ajoutant de l'acétonitrile en substitution de Q, il sera utilisé pour le traitement statistique des données. Après préparation, les échantillons ont été analysés de façon aléatoire par LC-QToF-MS.

Ainsi, afin d'isoler les composés nucléophiles présents dans les vins, l'utilisation d'analyse statistique est requise. L'utilisation de PLS-DA a permis de déterminer un score VIP pour chaque couple m/z -TR présent, en fonction de sa capacité à discriminer les vins dérivatisés et non dérivatisés. En parallèle, le test de Wilcoxon a été calculé pour chacun des couples m/z -TR afin de calculer la p-Value et déterminer si le couple m/z -TR est statistiquement discriminant des 2 modalités. Les couples m/z -TR sont ensuite filtrés à l'aide de ces deux paramètres, avec $VIP > 1$ et $p\text{-Value} < 0,01$. Les couples isolés des différents jeux de données LC-QToF-MS seront ensuite regroupés afin de créer une liste « Composés Nucléophiles ». Le développement analytique de cette méthode fait l'objet du chapitre 2.

4.2. Analyse par FT-ICR-MS

4.2.1. Acquisition de données

Les analyses FT-ICR-MS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse SOLARIS (Bruker Daltonics GmbH, Brème, Allemagne) équipé d'un aimant supraconducteur de 12 Tesla (MagneX Scientific Inc., Yarnton, GB, UK) et d'une source d'ionisation par électrospray Apollo II (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les échantillons ont été analysés en mode d'ionisation négative à l'aide d'un auto sampler avec un débit de 120 $\mu\text{L}/\text{h}$. Pour chaque spectre, 300 scans ont été accumulés dans un domaine temporel de 4 Méga Words et pour une gamme de masses variant de 100 à 1000 m/z . Avant chaque analyse, l'appareil est calibré à l'aide d'un cluster d'arginine (5 ppm) préparé quotidiennement, avec une tolérance de 0,2 ppm. Les vins ont été dilués au 1/20 dans du méthanol avant analyse, afin de faciliter l'ionisation des composés.

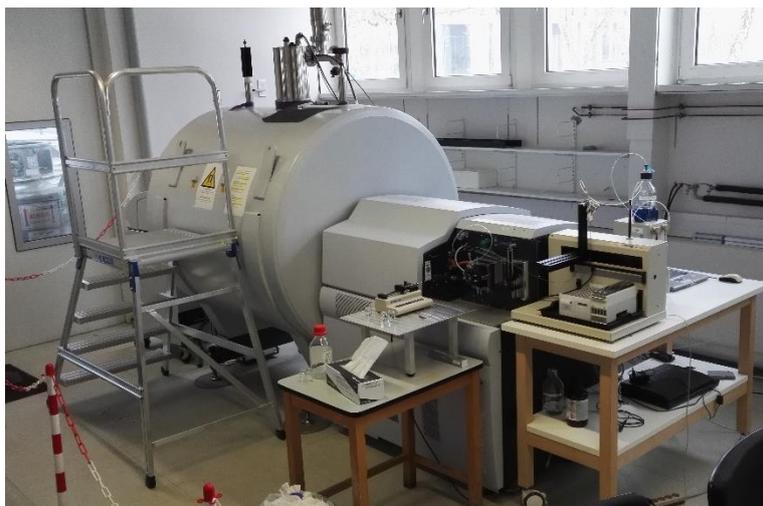


Figure 22 : Spectromètre de masse FTICR-MS Solaris (Bruker)

4.2.2. Traitement de données FT-ICR-MS

Les spectres de masses obtenus ont ensuite été recalibrés à l'aide du logiciel DataAnalysis (Bruker, Bremen, Germany) et d'une liste de 24 composés présent de façon quasi-systématique dans les vins. Les masses ont été extraites, puis filtrés pour ne garder que les pics avec un rapport signal sur bruit (S/N) supérieur à 4 ainsi qu'une intensité absolue supérieure à $2,5 \cdot 10^6$. Le programme NetCalc développé par le laboratoire BioGeoChemistry du centre Helmholtz de Munich permet de déterminer de la formule élémentaire des masses détectées. A partir d'une liste de masses de références (composés dont on connaît la masse exacte ainsi que la formule élémentaire), le logiciel va chercher à construire un réseau par comparaison avec les masses détectées, en cherchant des différences de masses correspondant à des transformations chimiques connues. Par exemple, une différence de masse de 15,0235 Da correspond à un groupement CH_3 . Deux masses avec cette différence de masse auront alors un groupement CH_3 de différence dans leurs formules élémentaires. Les annotations ont été réalisées avec une tolérance de 1 ppm.

4.3. Identifications des masses détectées

Afin de tenter d'identifier les masses détectées via les analyses LC-QToF-MS et FT-ICR-MS, une annotation à l'aide de base de données en ligne a été réalisée. Deux bases de données ont été utilisées, KEGG et Metlin, ainsi que l'outil en ligne Oligonet¹²⁴. Cet outil

permet de calculer une combinaison d'acides aminés correspondant à la masse recherchée. Il est ainsi possible de déterminer si la masse à identifier peut potentiellement être un peptide.

De plus, pour aller plus loin dans l'identification des composés, la formule élémentaire a été déterminée par le profil isotopique, et pour les analyses LC-QToF-MS, une fragmentation des composés a également été réalisée. Ces deux traitements auront été réalisés seulement sur une partie des masses isolées et discutées au cours de cette étude, pour des raisons de temps, ces étapes étant très coûteuse en temps, et le nombre de composés traités relativement important.

5. Détermination des marqueurs moléculaire corrélés à la capacité antioxydante

Pour chaque jeu de données LC-QToF-MS, la corrélation de Spearman a été calculé entre l'intensité détectée des couples m/z -TR et les valeurs des variables déterminées par DPPH et RPE pour les vins analysés. Les couples m/z -TR ont été filtrés pour ne conserver que les couples avec une corrélation supérieur à 0,6 ($|r| > 0,6$ et $p\text{-Value} < 0,01$), considérée comme une corrélation forte.

Afin de regrouper les données issues des analyses en mode d'ionisation négatif et positif, la masse neutre M de chaque couple m/z -TR a été calculée à partir du m/z détecté, $[M-H]^-$ ou $[M+H]^+$, par addition ou soustraction de la masse d'un H^+ (1,0073 Da). Les couple m/z -TR des différents jeux de données LC-QToF-MS ont ensuite été alignés avec une tolérance de 10 ppm sur les masses et 0,3 min sur les temps de rétention.

Une deuxième filtration a été appliquée, afin de ne conserver que les couples m/z -TR présents dans plusieurs jeux de données LC-QToF-MS. Pour cela, les couples m/z -TR présents dans 2 séries d'analyses ont été conservés, sur un total de 4 séries. Une série d'analyse regroupement les jeux de données LC-QToF-MS positif et négatif de l'analyse de la même série de vins. En effet, les vins ayant été analysés à différentes durées d'élevage, plusieurs prélèvements ont eu lieu. Le dernier niveau de filtration a été de supprimer les couples m/z -TR qui sont corrélées positivement et négativement à la même variable en fonction des prélèvements.

Résultats et discussions

Partie 1 : Développement Méthodologique

Dans cette première partie, nous présenterons les méthodes analytiques spécifiquement développées au cours de cette étude. Celles-ci ont fait l'objet d'un article publié (Chapitre 1), portant sur la mesure de la capacité antioxydante par DPPH, qui a été optimisée pour l'analyse des vins blancs, et plus particulièrement pour les composés soufrés. La deuxième partie de ce chapitre 1 présentera une étude comparative de la complémentarité entre la méthode DPPH et la méthode RPE, qui est la méthode de référence au laboratoire, pour l'analyse de la capacité antioxydante des vins. La comparaison des composés impliqués dans les mesures RPE et DPPH sera également étudiée par FT-ICR-MS. Grâce à ces deux analyses ainsi que des analyses de métabolomique par LC-QToF-MS, les marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante d'une large gamme de vins blancs, sont présentés dans le chapitre 2. Enfin, dans le dernier chapitre de cette partie, le développement d'une méthode d'analyse des composés nucléophiles des vins blancs sera présenté. Ces travaux font également l'objet d'un article scientifique (soumis à *Analytical Chemistry*).

Chapitre 1 : Analyse de la capacité antioxydante de vins blancs

1. Analyse de la capacité antioxydante de vins blancs à l'aide de la méthode DPPH

La mesure DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est une méthode simple et efficace couramment utilisée pour déterminer la capacité antioxydante de nombreuses boissons et matrices alimentaires. Contrairement aux vins rouges, les vins blancs sont moins riches en polyphénols antioxydants, et les composés soufrés plus hydrophiles qu'ils contiennent peuvent contribuer d'une manière significative à leur capacité antioxydante. La modification de la méthode classique DPPH, avec un tampon méthanol et la mesure de Ec_{20} (quantité d'échantillon nécessaire à la diminution de 20% de la concentration initiale de DPPH) a montré que des composés soufrés tels que la cystéine ($0,037 \pm 0,003$), le glutathion ($0,054 \pm 0,003$) ou le méthanethiol ($0,104 \pm 0,003$) ont une capacité antioxydante comparable à celle de composés phénoliques bien connus, tels que la catéchine ($0,035 \pm 0,003$), l'acide caféique ($0,057 \pm 0,003$) et l'acide férulique ($0,108 \pm 0,003$), respectivement. Dans le cas des vins blancs, la comparaison avec les scores sensoriels REDOX a montré que les résultats du test DPPH modifié sont fortement corrélés aux résultats sensoriels ($r = 0,73$, $p < 0,1$). Ces résultats fournissent une illustration sans précédent de l'importante contribution de ces composés soufrés dans la capacité de piégeage de radicaux des vins blancs.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié en 2019 dans le journal scientifique *Molecules*.

<https://doi.org/10.3390/molecules24071353>

Article

The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds: An Optimized DPPH Assay

Remy Romanet ¹ , Christian Coelho ¹, Youzhong Liu ² , Florian Bahut ¹ , Jordi Ballester ³ , Maria Nikolantonaki ¹  and Régis D. Gougeon ^{1,*} 

- ¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, Rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078 Dijon CEDEX, France; remy.romanet@u-bourgogne.fr (R.R.); christian.coelho@u-bourgogne.fr (C.C.); Florian.Bahut@u-bourgogne.fr (F.B.); maria.nikolantonaki@u-bourgogne.fr (M.N.)
- ² Current address: Department of Mathematics and Computer Science, Advanced Database Research and Modelling (ADReM), University of Antwerp, 2020 Antwerp, Belgium; Youzhong.Liu@uantwerpen.be
- ³ Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 9 E Boulevard Jeanne d'Arc, F-21000 Dijon, France; jordi.ballester@u-bourgogne.fr
- * Correspondence: regis.gougeon@u-bourgogne.fr

Received: 18 March 2019; Accepted: 4 April 2019; Published: 5 April 2019



Abstract: The DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay is an easy and efficient method commonly used to determine the antioxidant capacity of many food matrices and beverages. In contrast with red wines, white wines are poorer in antioxidant polyphenolics, and the more hydrophilic sulfur-containing compounds in them may contribute significantly to their antioxidant capacity. The modification of the classical DPPH method, with a methanol-buffer and the measure of EC₂₀ (quantity of sample needed to decrease the initial DPPH concentration by 20%) has shown that sulfur-containing compounds such as cysteine (0.037 ± 0.003), glutathione (0.054 ± 0.003) or methanethiol (0.104 ± 0.003) appeared to bear antioxidant capacity comparable to well known phenolic compounds, such as catechin (0.035 ± 0.003), caffeic acid (0.057 ± 0.003) and ferulic acid (0.108 ± 0.003), respectively. In the case of white wines, the comparison with REDOX-sensory scores showed that results from this modified DPPH assay are strongly correlated with sensory attributes ($r = 0.73$, $p < 0.1$). These results provide an unprecedented illustration of the important contribution of these sulfur-containing compounds to the radical quenching ability of white wines.

Keywords: DPPH; antioxidant capacity; Chardonnay; white wine; EC₂₀; sensory oxidation level; sulfur compounds

1. Introduction

The aging of premium wines, and in particular dry white wines, has become an important scientific issue over the last decades, where the phenomenon called “premature aging” has appeared worldwide. In the context of sustainability, new processes based on the reduction of inputs, both at the vineyard and in the cellar (for instance sulfites), are sometimes considered as threats towards expected organoleptic optimums. Therefore, a better understanding of the physico-chemical mechanisms of oxidation is required to predict and control the appearance of premature aging. This is based in particular on the development of innovative predictive tools for determining the oxidative stability of a wine.

Wine oxidative stability can be related to intrinsic and extrinsic factors that prevent aroma deterioration [1]. Up to now, studies dealing with white wine antioxidant capacity were mostly focused on the description of the antioxidant effects of sulfites or glutathione via monitoring the evolution of potent volatile oxidation markers, but without giving any insights into the mechanisms controlling their formation [1]. In such a complex matrix as white wine, the role of each naturally present antioxidant is hard to establish, and as a consequence, the sole targeted analysis of known key antioxidant compounds (polyphenols and sulfur compounds) is poor at predicting the evolution of the wine. In that respect, we have shown clearly that the antioxidant metabolome of Chardonnay white wines is highly dependent on the management of N–S-containing compounds from the very beginning of the winemaking process, through the comparison of glutathione additions at early and late stages [2]. These results highlight the need for a method that can assess the instantaneous antioxidant potential of the global wine metabolome. Up to now, voltammetry and EPR (electron paramagnetic resonance) spectroscopy based methodologies have been proposed to measure wine antioxidant potential [3,4]. The latter gives a fine classification of wines according to their antioxidant potential, but is expensive and demands an expertise in data acquisition and treatment, whereas voltammetry mostly targets polyphenols.

The DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay is a simple, inexpensive and efficient method, one of the most commonly used to determine the antioxidant capacity of a compound, an extract or other biological matrices (polyphenols, plants, fruits, wine . . .) [5–8]. DPPH is a stable free radical that is reduced by antioxidant molecules, by acceptance of an electron or a hydrogen [7,9]. In the initial radical form, DPPH has a deep purple color, which changes to yellow in the reduced form. DPPH has an important absorption band in the range 515–520 nm, which makes spectrophotometry an easy tool to measure the color change and determine the antioxidant activity of the sample. The more this color changes, the more DPPH is reduced and the better the antioxidant activity of the sample is. The antioxidant capacity is commonly expressed as the efficient concentration (EC_{50}), which represents the quantity of the sample needed to decrease the initial concentration of the DPPH free radical by 50%. However, some studies showed the lack of correlation between the DPPH discoloration and the concentration of the substrate [9–12]. In order to achieve a better linearity, a statistical software was developed by Locatelli et al. (2009) by using different regression models. In order to stay in the linear range, determining the EC_{20} , representing the quantity of antioxidant needed to decrease the initial concentration of DPPH by 20%, was proposed [5].

It has been shown that DPPH can be reduced by amino acids containing cysteine and aromatic amines [13]. Because of the hydrophobic character of DPPH, the DPPH assay is generally adapted to methanol solvent [5–7,9]. In contrast with white wines, which bear low concentrations of polyphenols, the antioxidant capacity of polyphenol rich red wines matches the strong lipophilic character of DPPH well [6]. This implies that other compounds, which may play a more important role in the antioxidant capacity of white wines—because of higher concentrations relative to the phenolic concentration—are not taken into account by the conventional methanol measurement of the DPPH assay. It must be noted that some researchers have already used methanol-buffer mixtures to prepare DPPH solution to solve this problem, but using acetate buffer at a pH between 4.5 and 5.5, which is higher than the pH of wine [8,14,15].

In order to estimate the shelf life aging potential of white wines, on the basis of a more genuine antioxidant potential, the present paper reports the development of a predictive tool based on a revisited DPPH assay adapted to white wine matrices. For optimization of the DPPH assay, the antioxidant capacity of selected active compounds present in white wines, especially N–S-containing compounds and polyphenols, was compared in buffers with varying polarities.

2. Results and Discussion

2.1. Buffer Optimization

The solvent optimization for the DPPH assay adapted to white wines was carried out by comparing gallic acid and glutathione as active compounds. To that purpose, methanol and methanol-buffer (0.1 M of citric acid and 0.2 M of phosphate disodium, pH adjusted to 3.6, final proportion 60% of methanol and 40% buffer) were tested as reaction solvents (Figure S1 shows the UV-Vis absorbance of DPPH). Figure 1 shows the antioxidant capacity (EC_{20}) of both gallic acid and glutathione measured in the two tested solvents. EC_{20} is the R_n value corresponding to a 20% decrease of the initial absorbance, where R_n represents the ratio between the molar number of standard compound (n_{compound} mol in 100 μL) added to the initial molar number of DPPH (n_{DPPH} mol in 3.9 mL). Gallic acid gave similar and reproducible results with the two solvents, with an EC_{20} of 0.025 ± 0.004 and 0.020 ± 0.005 for methanol and methanol-buffer, respectively (Figure 1a,b). In contrast, when measured in methanol, the EC_{20} of glutathione appeared to be of the order of 0.4 with a rather large uncertainty (non-linearity), compared to 0.051 ± 0.006 and with good linearity in methanol-buffer solvent (Figure 1c,d). The difference between glutathione solubility in methanol (1.20 ± 0.03 g/L) and in methanol-buffer (12.30 ± 0.06 g/L) could certainly explain the discrepancy between the two latter measurements and the lack of linearity when methanol was used as reaction solvent (Figure 1c).

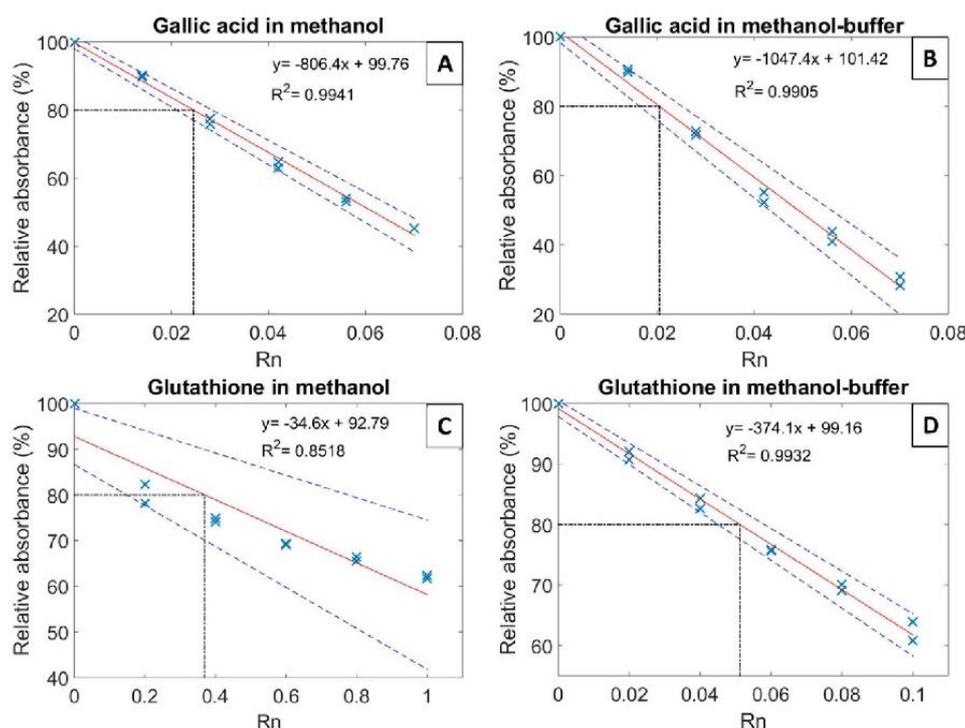


Figure 1. DPPH measurements of gallic acid (A,B) and glutathione (C,D) in methanol and in methanol-buffer (0.1 M of citric acid and 0.2 M of phosphate disodium, pH 3.6, final proportion 60% methanol and 40% buffer). The plain line (red) represents the regression line, and the two dashed lines (blue) the 95% confidence interval. The dot-dashed line guides the eye to EC_{20} , which is the R_n value corresponding to a 20% decrease of the initial absorbance. R_n represents the ratio between the molar number of standard compound (in mol) added to the initial molar number of DPPH (in mol).

In order to confirm methanol-buffer acceptance for estimating white wine antioxidant capacity, EC_{20} values were measured for a large variety of key antioxidant compounds. Figure 2 shows the comparison of EC_{20} values for gallic acid, catechin, caffeic acid, glutathione and cysteine.

As observed previously for gallic acid, all tested phenolic compounds presented good reproducibility and consistency in both methanol and methanol-buffer conditions (except for caffeic acid), while, for sulfur containing compounds (glutathione and cysteine), there was a clear discrepancy between the two solvents, and the EC_{20} results had good repeatability (CV% lower to 5%) only using methanol-buffer. These results clearly highlight the correlation between the solubility and the genuine DPPH measurement, where the actual EC_{20} determined for glutathione and cysteine was much smaller (higher related antioxidant capacity) than the one measured in methanol, due to a better solubility of the compounds in the buffer. In agreement with these results, methanol-buffer was chosen to determine the antioxidant capacity of wine-relevant antioxidants and white wines by our modified DPPH assay.

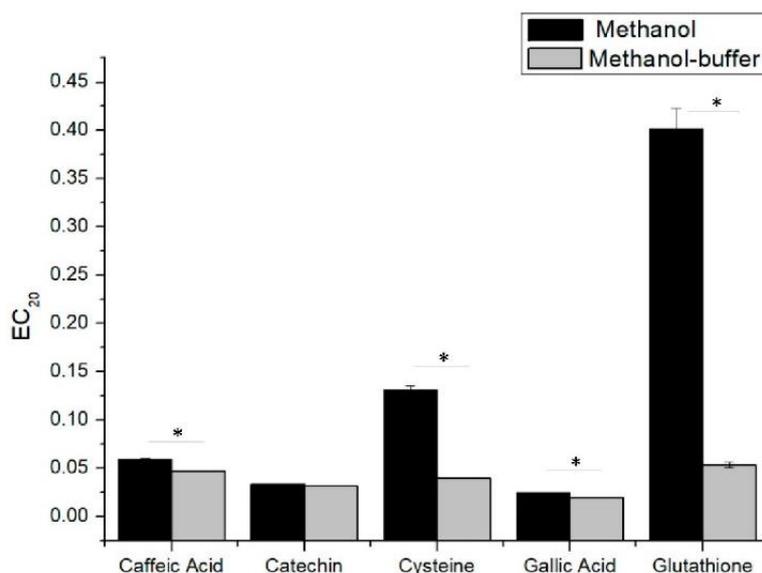


Figure 2. EC_{20} values of gallic acid, catechin, caffeic acid, glutathione and cysteine measured in methanol (■) and in methanol-buffer (▒). Student tests show comparison between methanol and methanol-buffer methods, “*” indicates significant differences ($p < 0.05$).

2.2. Classification of White Wine Relevant Antioxidants Based on Our Modified DPPH Assay

Phenolic compounds and thiols are the two most important antioxidants in white wines. The antioxidant power of polyphenols is assigned to their prompt reaction with reactive oxygen species (ROS) at pH of wine, while their generated quinonic forms are highly electrophilic and responsible for the generation of oxidative aroma notes [16,17]. On the other hand, thiols are preservatives by virtue of their ability to act as quinone reductants and/or scavengers and are considered key factors that govern wine resistance to oxidative aging [2,18,19].

In our study, phenolic compounds from different families (hydroxycinnamic acids, benzoic acids, flavanols and flavonols) and thiols (amino acids, volatile sulfur compounds) were assessed by the proposed DPPH assay to estimate their antioxidant effect in wine like conditions (Figure 3).

Under our experimental conditions, among the tested phenolic compounds, gallic acid presented the highest antioxidant capacity ($EC_{20} = 0.019 \pm 0.001$), followed by quercetin and catechin, presenting EC_{20} values of 0.030 ± 0.001 and 0.035 ± 0.001 , respectively. This classification is in accordance with the literature when the solvent used was ethanol or methanol. However, the value of EC_{20} , or the equivalent EC_{50} , are not similar due to differences in the concentration of DPPH used [5,11,12]. Among the tested thiols, cysteine, H_2S and glutathione exhibited the higher antioxidant capacity, with an EC_{20} of 0.037 ± 0.000 , 0.045 ± 0.001 and 0.054 ± 0.002 , respectively. Cysteine showed no significant difference in antioxidant capacity compared with catechin. Moreover, glutathione and caffeic acid

($EC_{20} = 0.057 \pm 0.000$) also exhibited similar antioxidant capacity. These results show the importance of sulfur compounds in the trapping of free radicals, and therefore as contributors to the antioxidant capacity of wines. Glutathione which is a tripeptide composed of glutamic acid, cysteine and glycine has an important antioxidant capacity, which shows that it plays an important role in antioxidant mechanisms involved in wines. However, it is noteworthy that cysteine, which is the reactive amino acid of glutathione, displays a better antioxidant capacity, which would be due to steric hindrance of glutathione against DPPH.

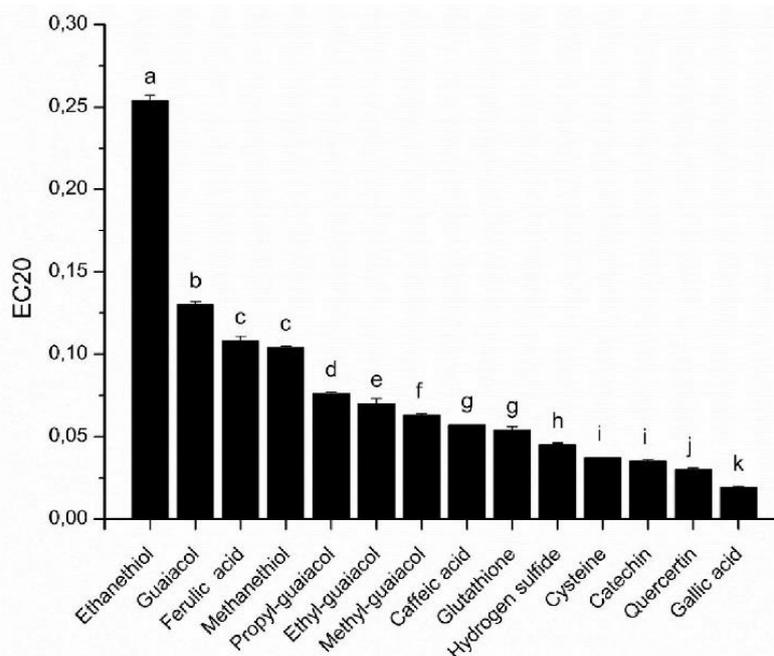


Figure 3. Comparison of the antioxidant capacity (EC_{20}) of selected wine compounds using DPPH in methanol-buffer. Results of ANOVA and Tukey HSD tests: Different letters mark significant differences at $p < 0.05$.

The comparison of the antioxidant capacity of volatile sulfurs, such as hydrogen sulfide (H_2S), methanethiol and ethanethiol, which have an EC_{20} of 0.045 ± 0.001 , 0.104 ± 0.001 and 0.254 ± 0.003 , respectively, shows that their antioxidant capacity could be correlated to the pK_a of the corresponding thiol ($pK_a = 7.04$ for H_2S , 10.4 for methanethiol and 10.6 for ethanethiol). When pK_a increases, the liberation of a hydrogen is more difficult and the quenching of the DPPH radical is more difficult. Interestingly, our modified DPPH assay revealed that volatile thiols, such as methanethiol, could exhibit comparable antioxidant capacity (EC_{20}) to a phenolic, such as ferulic acid.

Moreover, our results also showed that the addition of an alkyl group to the guaiacol moiety increases the antioxidant capacity of the compounds. Indeed, the EC_{20} , which is 0.130 ± 0.002 for guaiacol, decreases to 0.076 ± 0.001 , 0.070 ± 0.003 and 0.063 ± 0.001 for propyl, ethyl and methyl-guaiacol, respectively, which would be due to an increase in the number of limit forms for the reactive intermediate.

2.3. Antioxidant Capacity of White Wines

In order to apply this modified DPPH methodology to the measurement of the antioxidant capacity of white wines, to understand their oxidative stability, nine vintages for a given wine from the same plot and the same winery were analyzed, four of which were also analyzed using the classical methanol solvent for comparison (Figure S2 and Figure 4). In agreement with the expected hierarchy

in terms of antioxidant concentrations, younger wines presented a better antioxidant capacity than older ones.

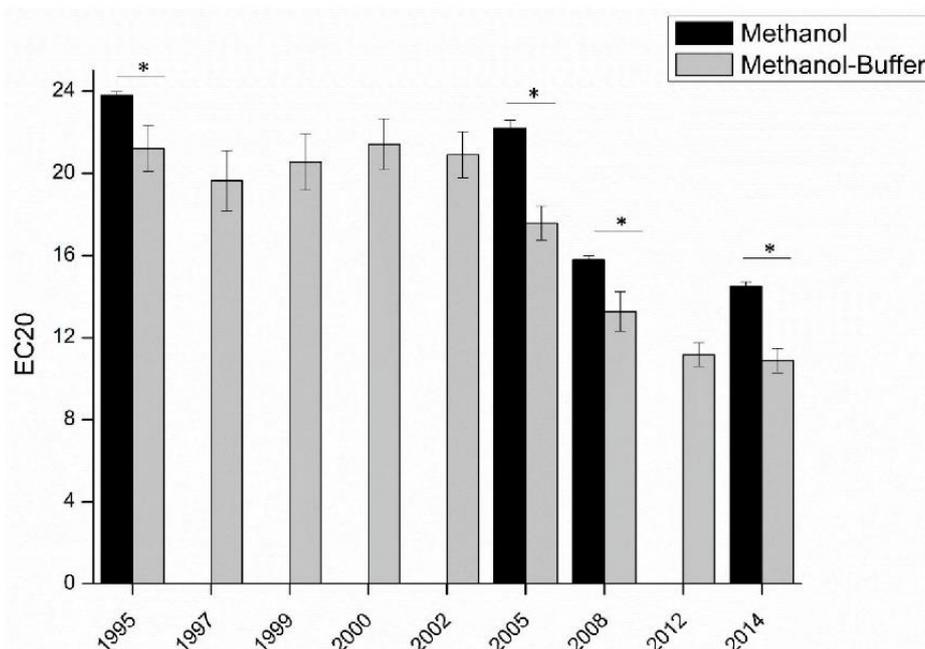


Figure 4. Comparison of the antioxidant capacity of the same appellation from nine vintages from the same winery. Measurements in methanol (■), and in methanol-buffer (▒). Student tests show comparison between methanol and methanol-buffer methods, “*” indicate significant difference ($p < 0.05$).

Secondly, the EC₂₀ obtained with the classical methanol method was always significantly higher than that with the methanol-buffer method. In agreement with measures on standard compounds (Figure 2), this result can be explained by the fact that with methanol, the measured antioxidant capacity of the wine is mostly driven by the reactivity of phenolic compounds. Instead, using the methanol-buffer method, the contribution of other compounds, and in particular thiols, like glutathione, would be allowed. On that basis, the highest difference between EC₂₀ determined using methanol and methanol-buffer for the 2005 vintage (difference of 4.7, compared to 2.5 for 1995, 2.5 for 2008, and 3.6 for 2014) could be evidence of the relatively higher concentrations of sulfur compounds in this vintage.

2.4. Comparison to Sensory Oxidation Levels

REDOX sensory scores, as well as intensity scores of the most cited attributes (at least by 15% of the panel for at least one sample), were submitted to ANOVA with the vintage as a fixed factor, the panelist as a random factor and the interaction vintage*panelist used as an error term. The results are presented in Table 1, with REDOX sensory score, oaky, caramel/vanilla, roasted, vegetables, dust/carboard bruised apple and cork showing significant vintage effects. Oaky, caramel/vanilla, roasted also showed significant interactions, indicating some disagreement among panelists regarding these attributes.

Table 1. Sensory attributes and ANOVA results. Significant P-values (5% level) are highlighted in bold letters.

ATTRIBUTE	VINTAGE		TASTER		VINTAGE * TASTER	
	F	<i>p</i> -Value	F	<i>p</i> -Value	F	<i>p</i> -Value
REDOX SCORE	5.4	<0.0001	2.2	0.010	0.9	0.721
CITRUS	1.1	0.388	3.0	0.001	0.9	0.618
BITTER ALMOND	0.8	0.603	2.7	0.002	1.0	0.516
BUTTER	1.5	0.183	2.7	0.002	1.0	0.486
RANCID BUTTER	0.8	0.584	2.6	0.002	1.3	0.056
OAKY	14.6	<0.0001	1.5	0.113	2.3	<0.0001
CARAMEL/VANILLA	3.3	0.006	1.7	0.073	1.9	0.0001
WAXY/MOTHBALL	1.3	0.256	1.7	0.073	1.4	0.019
GLUE/VERNISH	4.4	0.001	2.3	0.008	1.2	0.115
STAGNANT WATER	1.6	0.146	2.5	0.004	1.2	0.102
ROASTED	11.8	<0.0001	2.2	0.013	4.0	<0.0001
FLORAL	1.9	0.096	2.3	0.008	1.0	0.550
WHITE FRUITS	1.2	0.338	3.8	<0.0001	1.4	0.040
YELLOW FRUITS	1.9	0.082	7.8	<0.0001	0.6	0.992
VEGETABLES	3.5	0.004	1.6	0.079	0.9	0.673
RANCID HONEY	1.3	0.251	0.9	0.581	1.0	0.422
WALNUT/CURRY	2.1	0.058	1.2	0.259	1.0	0.448
DUST/CARDBOARD	3.8	0.002	1.0	0.501	1.0	0.574
BRUISED APPLE	2.9	0.013	5.0	<0.0001	1.2	0.162
CORK	14.6	<0.0001	0.9	0.582	0.4	1.000

In order to explore possible correlations between our measured antioxidant capacity (EC_{20}) and sensory properties of the seven wines, a principal component analysis (PCA) was carried out including EC_{20} mean values and the sensory attributes with a vintage *p*-value lower than 0.1.

The biplot (Figure 5) shows a clear segmentation between the youngest wines (2005 and 2012) characterized by oak ageing notes and the other wines at the opposite side of F1 characterized either by oxidation (2000, 1995) or fruity notes and some presence of cork taint (2002, 1999). The sample from 1997 stands in the middle of the F1–F2 plot and is more associated with yellow fruits in F3 (data not given). These results show that, in agreement with previous literature, the oxidative status of a wine is not always correlated to its age since strong vintage effects can occur [20,21]. Moreover, EC_{20} showed strong Pearson correlations with oxidative attributes like bruised apple ($r = 0.84$, $p < 0.05$), walnut/curry ($r = 0.82$, $p < 0.05$), and the REDOX sensory score ($r = 0.73$, $p < 0.1$).

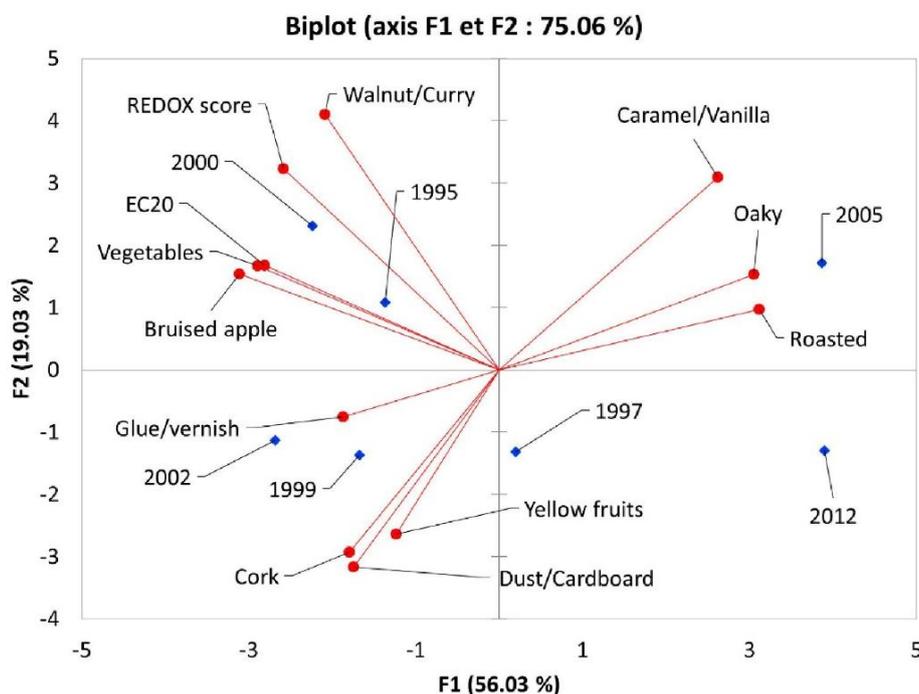


Figure 5. Principal component analysis (PCA) biplot representing the oxidation levels determined by sensory analyses and revisited DPPH measurements.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), citric acid, sodium phosphate dibasic, quercetin, catechin, caffeic acid, guaiacol, methyl-guaiacol, ethyl-guaiacol, propyl-guaiacol, ferulic acid, sodium sulfide, sodium thiomethoxide, ethanethiol, and glutathione were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Gallic acid and cysteine were purchased from Merck. Methanol was purchased from Chemlab. Ethanol was purchased from Honeywell. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system.

3.2. Antioxidant Capacity of Standard Compounds

The phenolic compounds were dissolved in water/ethanol (50/50) solutions. The other compounds were dissolved in water. The solutions were then diluted with water to obtain different concentrations. Ethanol and water were first oxygen degassed with Argon. All dilutions were prepared in a glove box to be in a controlled atmosphere without oxygen. All the solutions were prepared freshly before analysis.

3.3. Wines

Nine chardonnay wines from the Burgundy region and for different vintages (between 3 and 22 years old) were selected for DPPH assays. Before analysis, and since sulfites can react with DPPH and contribute to the antioxidant capacity of white wines [14,22], these nine chardonnay wines were degassed using CO₂ (3 mL/min) to remove free SO₂ as suggested by Pegram et al. (2013) [23].

3.4. Methods

The optimum DPPH solution was prepared at 25 mg/L into a mixture of methanol and citrate-phosphate buffer. The citrate-phosphate buffer was prepared with 0.1 M citric acid

and 0.2 M phosphate disodium, and the pH was adjusted to 3.6 in order to be close to a wine pH. Methanol was then added to obtain a final mixture containing 60% methanol and 40% buffer. This optimum methanol-buffer concentration was adapted from the literature, where either 60–40% [8,15] or 50–50% [14] ratios were reported, for methanol-acetate buffer. We observed that the ratio 60–40% was the most adapted due to better DPPH stability over time. Samples (100 μ L) (standard compounds or wines) were added to 3.9 mL of DPPH solution [6,7]. This preparation was performed in a glove box to be in a controlled atmosphere without oxygen. The reaction time was fixed to 240 min in order to reach a plateau value [5], and the absorbance of the solution was read at 525 nm, considered to be at the maximum of absorption. A molar ratio R_n was defined as the ratio between the molar number of standard compound introduced (n_{Compound} in 100 μ L) and the molar number of DPPH initially present (n_{DPPH} in 3.9 mL), as:

$$R_n = \frac{n_{\text{Compound}}}{n_{\text{DPPH}}} \quad (1)$$

The normalized absorbance ($Abs_{\%}$) was obtained by the difference between the absorbance of the blank (Abs_{blank}) and the absorbance of the sample (Abs_{sample}) divided by the absorbance of the blank:

$$Abs_{\%} = \frac{Abs_{\text{blank}} - Abs_{\text{sample}}}{Abs_{\text{blank}}} * 100 \quad (2)$$

The normalized absorbance was then plotted against the molar ratio to determine the EC_{20} [5], which is the R_n value needed to decrease by 20% the initial absorbance of DPPH (Figure 1).

For the determination of the antioxidant capacity of wines, the molar number (or the concentration) of antioxidant compounds was unknown, therefore the molar ratio R_n could not be calculated. Instead, and in order to account for all the antioxidant contributors, the volume V of wine, needed to reduce the initial absorbance by 20% added to DPPH was used. In order to account for the experimental concentration of the DPPH solution ($[DPPH]_{\text{exp}}$), the added volume was normalized (V_{norm}) for a solution at 25 mg/L of DPPH ($[DPPH]_{\text{th}}$), as follows:

$$V_{\text{norm}} = V * \frac{[DPPH]_{\text{th}}}{[DPPH]_{\text{exp}}} \quad (3)$$

The absorbance was then normalized by the absorbance of a blank (water) and plotted against the corrected volume (V_{norm}) to determine the EC_{20} of the wines.

3.5. Sensory Analysis

Seven out of the nine wines were submitted to sensory analysis. Sixteen oenology students from the University of Burgundy were trained for 2 months specifically on the wine oxidation and reduction aromas. The panel included 4 females and 12 males with an average age of 24.2 ± 1.2 years old. The sessions took place in a sensory room with individual booths. Samples (30 mL) were presented at room temperature in standardized black glasses coded with 3-digits following a Latin-square arrangement. For each sample, the panelists were first asked to rate the intensity of oxidation–reduction (REDOX-sensory score) orthonasally (i.e., by smell only) using the protocol proposed by Ballester et al. (2018) [20]. The scale was structured from -5 (strong reduction), $+5$ (strong oxidation) and zero (neither reduced nor oxidized) in the midpoint. Afterwards they were asked to describe the odor of the sample by choosing a maximum of five attributes from a list of 19 descriptors (see Table 1) and score their intensity in a 4-point discrete scale.

3.6. Statistical Analysis

All measurements were performed in duplicate, and the results were expressed as mean \pm standard deviation. Comparisons between methods (methanol and methanol-buffer) were carried out using

the Student test, and the classification of antioxidant capacity of standard compounds was studied by ANOVA, followed by Tukey (HSD) test. The sensory results were analyzed using an ANOVA and PCA (principal component analysis). These statistical analyses were done with the software XLSTAT. Figures were plotted using Matlab R2015a (MathWorks) and OriginPro 8 softwares (Originlab Corporation, Wellesley Hills, MA, USA).

4. Conclusions

The modification of the classical DPPH method, with a methanol-buffer (0.1 M of citric acid and 0.2 M of phosphate disodium, pH adjusted to 3.6, final proportion 60% methanol and 40% buffer) provided new reference values for the antioxidant capacity of active compounds representative for white wines. In particular, and as a result of a significantly higher solubility in this methanol-buffer, sulfur-containing compounds such as cysteine, glutathione or methanethiol appeared to bear antioxidant capacity comparable to well known phenolic compounds, such as catechin, caffeic acid and ferulic acid, respectively. These results provide an unprecedented illustration of the important contribution of these sulfur-containing compounds to the radical quenching ability of white wines.

The analysis of white wines from different vintages, and at different levels of oxidation, has further permitted validation of the method. Moreover, the comparison with REDOX-sensory scores, showed that results from this modified DPPH assay are strongly correlated with sensory attributes of the same wines. Therefore, such a modified DPPH method not only complies with requirements for the measurement of genuine antioxidant capacity of white wines, but also offers an interesting alternative for developing predictive tools of the ageing ability of white wines.

Supplementary Materials: The following are available online. Figure S1 UV-Vis absorbance spectra of DPPH in methanol and methanol-buffer, Figure S2 DPPH measurements for two vintages (1999 and 2012) in methanol-buffer.

Author Contributions: Conceptualization and Methodology, R.R., C.C., M.N. and R.D.G.; Formal Analysis, R.R. and J.B.; Data Curation, R.R., Y.L., F.B. and J.B.; Writing – Original Draft Preparation, R.R., M.N. and R.D.G.

Funding: This work was supported by the Regional Council of Bourgogne—Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDEP)”.

Acknowledgments: We thank Chloé Lepetz and Charles Brottier for performing the sensory analysis during their internship.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Pons, A.; Nikolantonaki, M.; Lavigne, V.; Shinoda, K.; Dubourdieu, D.; Darriet, P. New Insights into Intrinsic and Extrinsic Factors Triggering Premature Aging in White Wines. In *Advances in Wine Research*; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 2015; Volume 1203, pp. 229–251. ISBN 0-8412-3010-2.
2. Nikolantonaki, M.; Julien, P.; Coelho, C.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Gougeon, R.D. Impact of Glutathione on Wines Oxidative Stability: A Combined Sensory and Metabolomic Study. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nikolantonaki, M.; Coelho, C.; Noret, L.; Zerbib, M.; Vileno, B.; Champion, D.; Gougeon, R.D. Measurement of white wines resistance against oxidation by Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy. *Food Chem.* **2019**, *270*, 156–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rodrigues, A.; Silva Ferreira, A.C.; Guedes de Pinho, P.; Bento, F.; Geraldo, D. Resistance to oxidation of white wines assessed by voltammetric means. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10557–10562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Carmona-Jiménez, Y.; García-Moreno, M.V.; Igartuburu, J.M.; Garcia Barroso, C. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chem.* **2014**, *165*, 198–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Fernández-Pachón, M.S.; Villaño, D.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 113–118. [[CrossRef](#)]
7. Popovici, C.; Saykova, I. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel* **2009**, *4*, 25–39.
8. Comuzzo, P.; Battistutta, F.; Vendrame, M.; Páez, M.S.; Luisi, G.; Zironi, R. Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chem.* **2015**, *168*, 107–114. [[CrossRef](#)]
9. Prior, R.L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Eklund, P.C.; Långvik, O.K.; Wärnå, J.P.; Salmi, T.O.; Willför, S.M.; Sjöholm, R.E. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3336–3347. [[CrossRef](#)]
11. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M.C. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 391–398. [[CrossRef](#)]
12. Locatelli, M.; Gindro, R.; Travaglia, F.; Coisson, J.-D.; Rinaldi, M.; Arlorio, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chem.* **2009**, *114*, 889–897. [[CrossRef](#)]
13. Blois, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [[CrossRef](#)]
14. Abramovič, H.; Košmerl, T.; Poklar Ulrih, N.; Cigič, B. Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chem.* **2015**, *174*, 147–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Gallardo-Chacón, J.J.; Vichi, S.; Urpi, P.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *143*, 48–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nikolantonaki, M.; Waterhouse, A.L. A Method to Quantify Quinone Reaction Rates with Wine Relevant Nucleophiles: A Key to the Understanding of Oxidative Loss of Varietal Thiols. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 8484–8491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pons, A.; Nikolantonaki, M.; Lavigne-Cruege, V.; Dubourdiou, D.; Darriet, P. Analysis of several enological parameters influencing the premature ageing aroma of red and white wines. In Proceedings of the 248th National Meeting of the American-Chemical-Society (ACS), San Francisco, CA, USA, 10–14 August 2014; Volume 248.
18. Nikolantonaki, M.; Magiatis, P.; Waterhouse, A.L. Measuring protection of aromatic wine thiols from oxidation by competitive reactions vs wine preservatives with ortho-quinones. *Food Chem.* **2014**, *163*, 61–67. [[CrossRef](#)]
19. Ugliano, M.; Kwiatkowski, M.; Vidal, S.; Capone, D.; Siebert, T.; Dieval, J.-B.; Aagaard, O.; Waters, E.J. Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2564–2572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ballester, J.; Magne, M.; Julien, P.; Noret, L.; Nikolantonaki, M.; Coelho, C.; Gougeon, R.D. Sensory Impact of Polyphenolic Composition on the Oxidative Notes of Chardonnay Wines. *Beverages* **2018**, *4*, 19. [[CrossRef](#)]
21. Coelho, C.; Julien, P.; Nikolantonaki, M.; Noret, L.; Magne, M.; Ballester, J.; Gougeon, R.D. Molecular and Macromolecular Changes in Bottle-Aged White Wines Reflect Oxidative Evolution—Impact of Must Clarification and Bottle Closure. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 95. [[CrossRef](#)]
22. Danilewicz, J.C. The Folin-Ciocalteu, FRAP, and DPPH• Assays for Measuring Polyphenol Concentration in White Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2015**, *66*, 463–471. [[CrossRef](#)]
23. Pegram, Z.; Kwasniewski, M.T.; Sacks, G.L. Simplified Method for Free SO₂ Measurement Using Gas Detection Tubes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2013**, *64*, 405–410. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Not available.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

2. Complémentarité des méthodes DPPH et RPE

Afin de déterminer la capacité antioxydante des vins blancs, deux méthodes ont été utilisées. La méthode DPPH, qui est une méthode développée récemment au laboratoire, et la méthode RPE, qui en est la méthode de référence. Dans un premier temps, la complémentarité entre les deux méthodes a été étudiée, en s'intéressant à leurs facultés à discriminer les vins en fonction de leur capacité antioxydante, mais également via l'étude des composés impliqués dans la mesure effectuée par ces deux méthodes à l'aide d'analyses FT-ICR-MS. Puis dans un second temps, l'utilisation de la LC-QToF-MS a permis de déterminer les composés marqueurs de la capacité antioxydante.

2.1. Utilisation de la méthode RPE

La deuxième méthode utilisée afin de déterminer la capacité antioxydante des vins est une mesure à l'aide de la RPE. Cette méthode est une méthode de référence au laboratoire ¹¹⁰, auquel il a été apporté quelques modifications concernant l'exploitation des données afin d'améliorer la discrimination entre les échantillons analysés mais également en améliorer la répétabilité.

La première modification apportée vise à limiter la variabilité qui peut exister entre les différents jours d'analyses. Cette variabilité peut être visualisée en Figure 23A, par l'analyse quotidienne d'un vin modèle (12% EtOH, pH 3,2, 6g/L acide tartrique). On constate alors une légère variabilité de l'intensité maximale obtenue, qui peut être due à de légères différences d'initiation radicalaire. Cette variabilité peut être réduite (Figure 23B) en normalisant les intensités par l'intensité maximale obtenue. L'intensité des échantillons analysés sera également normée par l'intensité maximale du vin modèle réalisé le jour de l'analyse.

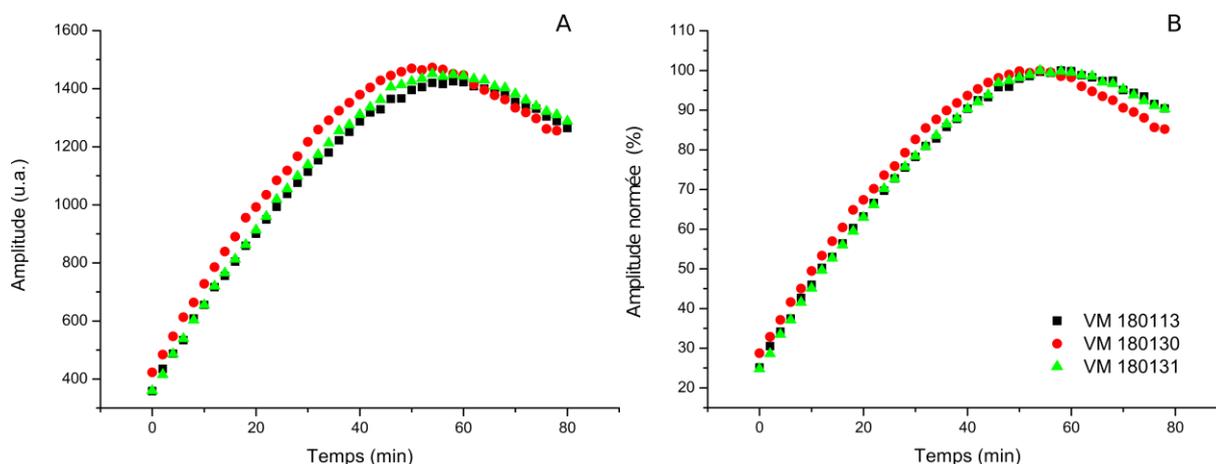


Figure 23 : Représentation de la cinétique de formation du radical POBN-HER après initiation chimique par la voie de Fenton pour plusieurs vins modèles (12% EtOH, pH 3,2, 6g/L Acide Tartrique). A : Amplitude sans correction, B : Amplitude normée par le maximum obtenu par chaque vin modèle.

Comme on peut le constater sur la Figure 24, les profils obtenus pour les vins sont très différents, par exemple en fonction du temps d'élevage : R-17-56, R-17-59 et R-17-61 sont issus du millésime 2016 après un an d'élevage tandis que R-17-65 et R-17-67 sont des vins du millésime 2017 analysés fin FA. L'influence de l'élevage sur la capacité antioxydante sera détaillée dans le Chapitre 4 de cette étude. On note ainsi, des différences importantes quant à l'intensité maximale obtenue, allant de 50% à 95% pour les échantillons R-17-59 et R-17-65, mais également concernant le temps auquel ce maximum est obtenu, avec des valeurs extrêmes variant entre 12 et 96 minutes correspondant aux vins R-17-59 et R-17-67. C'est pourquoi le paramètre de temps au maximum (T_{\max}) a été ajouté afin de discriminer les vins en fonction de leur capacité antioxydante, alors qu'il n'était pas utilisé dans l'étude de Nikolantonaki *et al.*¹¹⁰. Un dernier paramètre a été déterminé, il s'agit de la pente au début de la cinétique, notée 1^{ère} Pente, car nous estimons que les composés réagissant dans cette zone, soit en premier, sont des composés hautement réactifs, et donc fortement antioxydants.

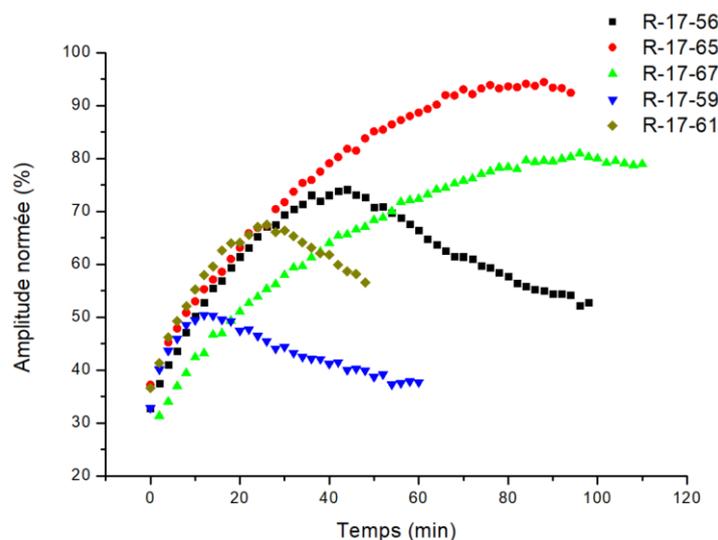


Figure 24 : Cinétique de formation du radical POBN-HER par RPE après initiation chimique de l'oxydation pour différents vins issus du millésime 2016 et 2017 après un an d'élevage et fin FA, respectivement.

2.2. Comparaison des méthodes RPE et DPPH

Les analyses RPE et DPPH ont été réalisées sur 106 vins de Chardonnay en cours d'élevage (Annexe 1), comprenant deux millésimes, le millésime 2016 après un an d'élevage (16 vins), et le millésime 2017 avec des analyses fin FA, et après 1 mois, 2 mois et 4 mois d'élevage (90 vins).

Afin de comparer les deux méthodes d'analyses, la corrélation de Spearman a été calculée pour les différentes variables déterminées par DPPH et RPE (EC_{20} , T_{Max} , Max et 1^{ère} Pente). Il apparaît ainsi une corrélation forte entre les variables déterminées par RPE, T_{Max}/Max et $T_{Max}/1^{ère}$ Pente avec 0,75 et -0,56 respectivement (Tableau 5). De façon plus intéressante, on note une corrélation significative (p -Value <0,01) de la variable EC_{20} avec T_{Max} et 1^{ère} Pente, 0,36 et -0,43 respectivement. Ce qui montre, via le fait que la corrélation soit significative mais ne soit pas une corrélation forte ($|r| < 0,6$), qu'il y a une complémentarité des analyses RPE et DPPH.

Tableau 5 : Tableau de corrélations de Spearman obtenus entre les différentes variables RPE et DPPH sur l'analyse de 106 vins en cours d'élevage. En gras, les variables significativement corrélées (p -Value < 0,01).

	T_{max}	Max	1^{ERE} Pente	Ec_{20}
T_{max}	1	0,75	-0,56	0,36
Max		1	-0,10	0,18
1^{ere} Pente			1	-0,43
Ec_{20}				1

2.3. Caractérisation moléculaire des composés corrélés aux méthodes DPPH et RPE

Pour aller plus loin dans l'étude de la complémentarité des deux méthodes, la capacité antioxydante d'une série de vins a été déterminée par DPPH et RPE et en parallèle, une analyse moléculaire par FT-ICR-MS des mêmes vins a été réalisée. Grâce à la très haute résolution, cette analyse permet de déterminer la composition élémentaire exacte d'une très grande diversité de composés présents, et par conséquent d'identifier les familles de composés potentiellement corrélés aux capacités antioxydantes déterminées par chacune des deux méthodes^{48,140}.

Pour cela une partie des vins analysés précédemment, soit 35 vins du millésime 2017 après 4 mois d'élevage ont été analysés (Annexe 1), permettant de détecter 7601 ions m/z auxquels une formule élémentaire a pu être attribuée de manière univoque. Pour chacun de ces ions m/z , la corrélation de Spearman avec les différentes variables DPPH et RPE a été calculée. Uniquement les ions m/z corrélés fortement avec les variables ont été conservés ($|r| > 0,6$ et p -Value < 0,01). 204 ions m/z sont ainsi corrélés à Ec_{20} , 95 à 1^{ere} Pente, 44 à Max et 174 à T_{Max} .

La Figure 25 représente pour chaque variable le nombre de formules élémentaires corrélées et anti-corrélées. Premièrement, nous constatons que pour chaque variable le plus grand nombre d'ions isolés est corrélé avec une capacité antioxydante plus importante du vin, c'est à dire des ions corrélés négativement à Ec_{20} , T_{Max} et Max et corrélés positivement à 1^{ere} Pente. Ainsi pour la variable Ec_{20} , il y a 187 ions corrélés négativement contre 17 positivement.

Les ions corrélés négativement à Ec_{20} sont majoritairement des composés soufrés, avec 35% de CHONS et 26% de CHOS. On retrouve également une part importante de CHO (30%). Concernant les ions corrélés positivement à Ec_{20} , on constate une part très importante de CHON et CHONS, 47% et 41% respectivement. De façon similaire, les ions majoritairement corrélés

négativement à Max sont des composés soufrés (46% CHONS et 28% CHOS), alors que les ions corrélés positivement sont en grande partie des CHO (60%). On retrouve également, 44% d'ions CHONS corrélés positivement à 1^{ère} Pente, suivie de CHO (25%) et CHON (21%). En revanche, il apparaît que la majorité des composés corrélés négativement à T_{Max} sont des CHO (46%) alors que les ions corrélés positivement à cette variable sont globalement des CHONS (63%). On constate donc une distribution différente quant à la composition élémentaire des ions corrélés positivement ou négativement aux différentes variables. Les ions de composition CHONS étant plus présents avec les variables Ec₂₀, Max et 1^{ère} Pente, alors que les ions CHO sont plus représentés avec la variable T_{Max}. Ces résultats sont en accord avec des résultats antérieurs, montrant une part importante du métabolome antioxydant des vins blancs constitué de composés amino-soufrés^{19,140}.

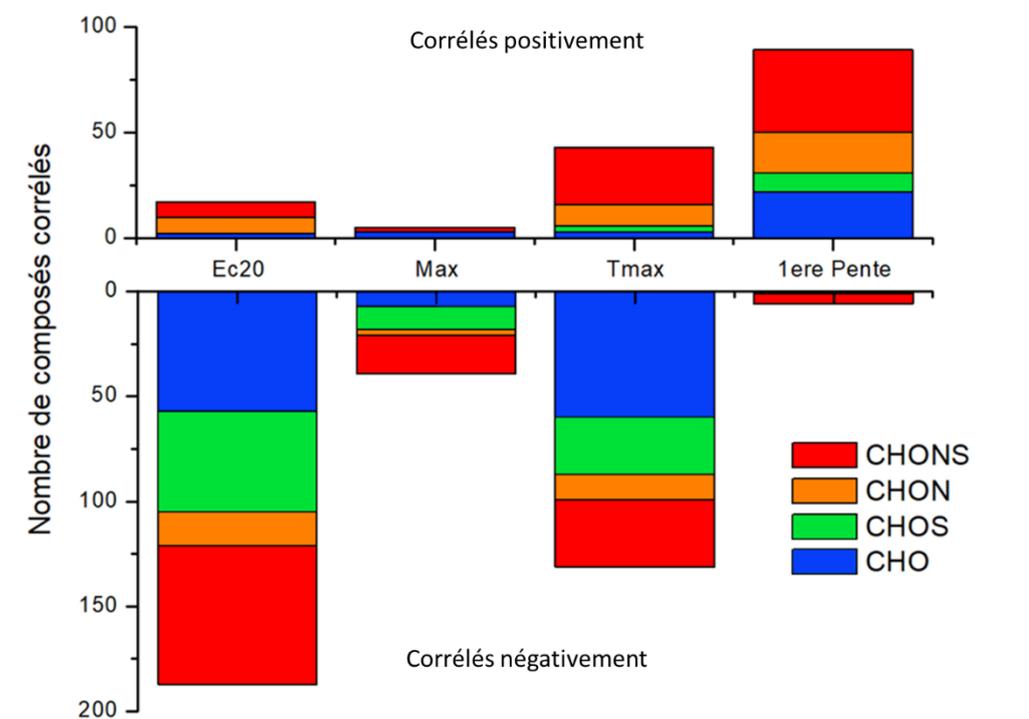


Figure 25 : Représentation du nombre d'ions corrélés (Spearman, $r > |0.6|$) avec les variables DPPH et RPE isolées par FT-ICR-MS en mode négatif par l'analyse de 35 vins du millésime 2017 après 4 mois d'élevage.

Il est possible de visualiser plus en détails la diversité chimique des ions isolés, à l'aide de diagrammes de Van Krevelen (Figure 26). La représentation du rapport H/C en fonction du rapport O/C pour chaque ion isolé, permet ainsi de séparer les ions en fonction de leur famille chimique^{48,141}. Il apparaît une proportion importante d'ions ayant une composition élémentaire CHONS et CHON, et pouvant être des acides aminés et peptides, corrélés négativement à Ec₂₀

et positivement à 1^{ère} Pente (Figure 26 A et F), ainsi que des CHO correspondant à des polyphénols. De plus, malgré un nombre d'ions de formules CHO similaires, 57 et 60, corrélés négativement à EC_{20} et T_{Max} , on peut noter que ces ions ne sont pas répartis de la même manière sur le diagramme de Van Krevelen, impliquant des familles chimiques différentes (Figure 26 A et C). La représentation de rapport H/C en fonction du m/z de l'ion détecté permet une discrimination des ions corrélés positivement et négativement aux variables EC_{20} et T_{Max} (Figure 26 B et D) avec indication de leurs masses. Ainsi, les ions corrélés positivement à ces variables, et donc corrélés à une capacité antioxydante plus faible, sont majoritairement des ions ayant un m/z supérieur à 400, alors que les ions corrélés négativement ont des masses plutôt inférieures à 400 m/z . De plus, ces ions sont majoritairement des CHON et CHONS, pouvant donc être des peptides. Il semblerait alors que les vins ayant une quantité plus importante de peptides inférieure à 400 m/z aient une capacité antioxydante plus forte que les vins contenant des peptides supérieurs à 400 m/z , cela peut être dû à l'hydrolyse de peptides au cours de l'élevage.

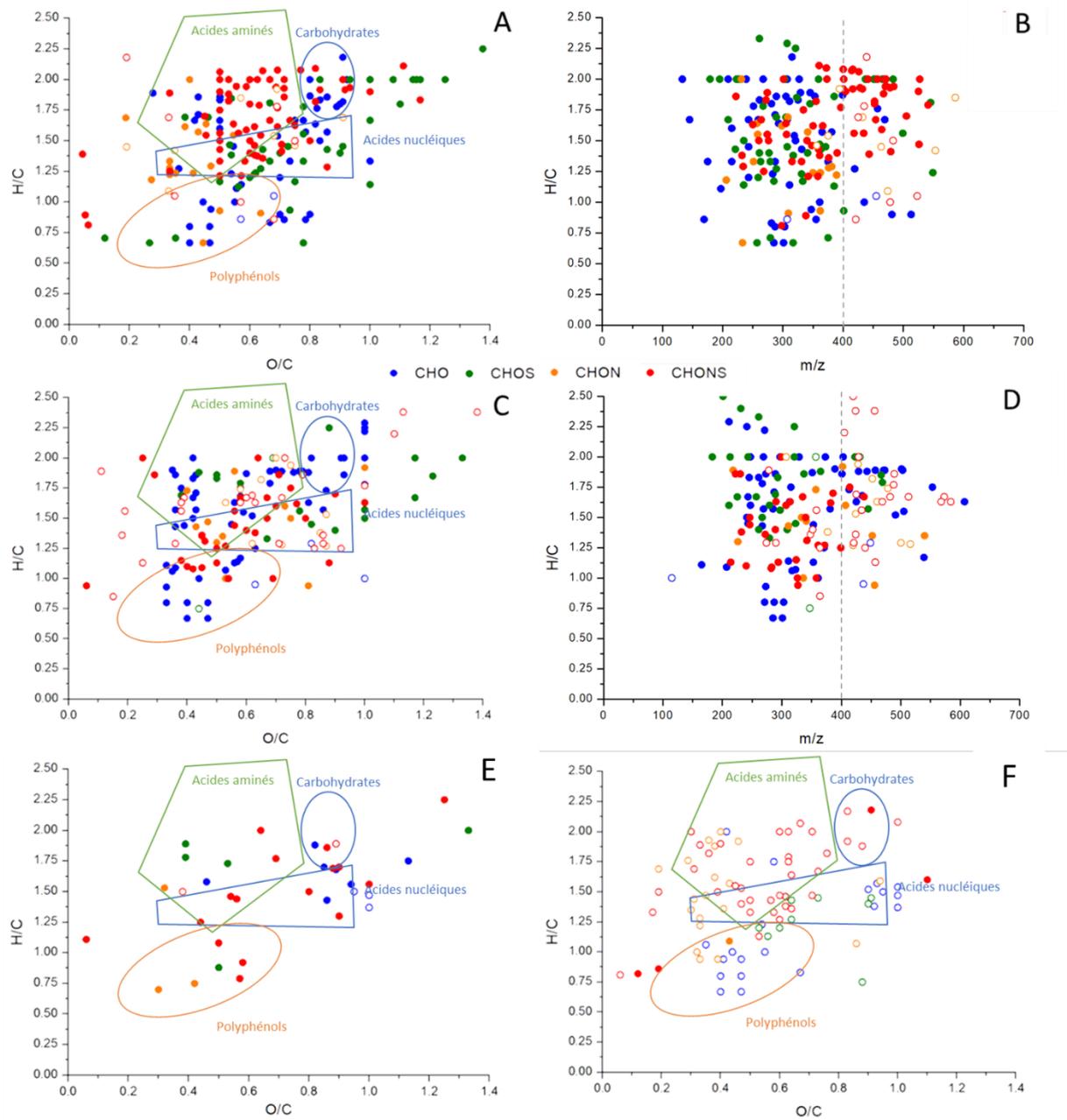


Figure 26 : Digrammes de Van Krevelen représentant le rapport H/C en fonction de O/C pour les ions corrélés à Ec20 (A), à T_{Max} (C) à Max (E), et à 1^{ère} Pente (F). Les figures B et D représentent le rapport H/C en fonction de la masse m/z de l'ion pour Ec20 et T_{Max}, respectivement. Les cercles pleins représentent les masses corrélées négativement, les cercles vides les masses corrélées positivement aux variables. Les analyses ont été réalisées sur 35 vins du millésime 2017 après 4 mois d'élevage.

A l'aide de l'analyse par FT-ICR-MS, il a été possible de montrer la complémentarité des analyses DPPH et RPE pour la détermination de la capacité antioxydante des vins en raison de la diversité des composés ciblés par chacune des deux analyses. Il s'agit alors pour la suite d'utiliser ces deux méthodes afin de discriminer les vins en fonction de leur capacité antioxydante globale.

2.4. Discrimination des vins en fonction de leur capacité antioxydante

La mesure de capacité antioxydante a été réalisée sur 106 vins en cours d'élevage (mêmes échantillons utilisés que dans le Chapitre 1 2.2) par les méthodes DPPH et RPE (Annexe 1). Le Tableau 6 présente la gamme de valeur obtenue pour chaque variable. La gamme de variation du paramètre Ec_{20} est comprise entre 16,0 et 42,6 correspondant à la valeur du vin le plus antioxydant et le moins antioxydant, respectivement. Les paramètres Max et T_{Max} , varient de 47% à 109% et de 8 à 102 min, respectivement. Quant à 1^{ère} Pente il évolue avec un facteur 4. Il apparait ainsi, une large gamme de variation pour les différentes variables, impliquant des différences importantes dans la capacité antioxydante des vins étudiés.

Tableau 6 : Présentation de la gamme de valeurs obtenues pour les 106 vins en cours d'élevage analysés par DPPH et RPE. 16 vins sont issus du millésime 2016 et ont été analysés après un an d'élevage, 90 vins ont été analysés pour le millésime 2017 avec des analyses fin FA, après 1 mois, 2 mois et 4 mois d'élevage.

	Ec_{20}	Max	T_{Max}	1 ^{ère} Pente
<i>Minimum</i>	16,0	47	8	0,9
<i>Moyenne</i>	24,6	78	57	1,9
<i>Maximum</i>	42,6	109	102	4,0

Afin de discriminer les échantillons vis-à-vis de leur capacité antioxydante, une ACP ainsi qu'une CAH ont été réalisées, permettant ainsi une séparation des échantillons en fonction de leur capacité antioxydante mais également la détermination de groupes de similarité. Ces analyses ont permis de déterminer 3 groupes de vins (Figure 27), selon l'intensité de leur capacité antioxydante, allant des vins les moins antioxydants (rouge), passant des capacités intermédiaires (orange) et finissant par les vins les plus antioxydants (vert). Si l'on s'intéresse aux valeurs moyennes des variables à l'intérieur des groupes ainsi déterminés, il apparait une diminution importante de la variable Max passant de 94% à 60% pour les vins les moins antioxydants et les plus antioxydants respectivement. Dans le même temps la variable T_{Max} diminue de 87 min à 22 min, Ec_{20} diminue de 24,8 à 20,4 tandis que la 1^{ère} Pente augmente de 1,5 à 2,3. Ces résultats montrent donc des profils variés pour les vins analysés. En s'intéressant aux vins présents dans les différents groupes, il apparait que les vins ayant la capacité antioxydante la plus élevée (30 vins) sont les vins issus du millésimes 2016, ayant connu un an d'élevage, ainsi qu'une partie des vins du millésime 2017 après 4 mois d'élevage. La grande majorité des vins compris dans le groupe « moins antioxydant » (24 vins) sont des vins issus

du millésime 2017 analysés fin FA ou avec 1 à 2 mois d'élevage. Enfin, les vins présents dans le groupe intermédiaire (52 vins) sont les vins restants, soit fin FA, à 1, 2 et 4 mois d'élevage. Il semble donc apparaître un effet positif de l'élevage sur la capacité antioxydante. Ce point sera discuté plus en détail dans la partie suivante (Chapitre 4).

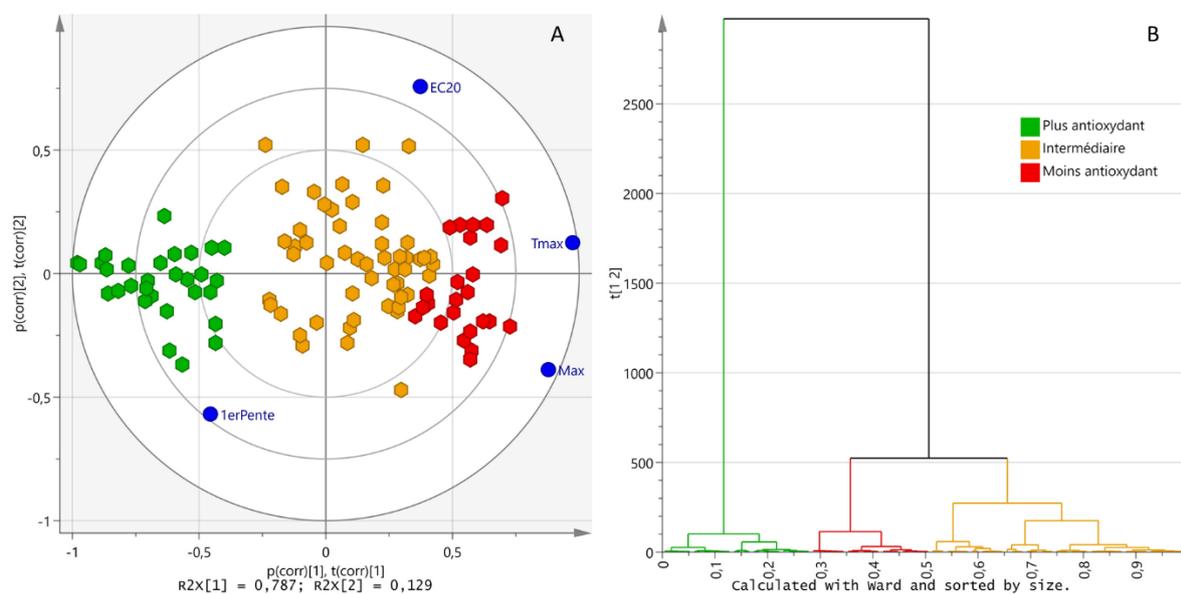


Figure 27 : Discrimination de 106 vins en cours d'élevage en fonction de leur capacité antioxydante globale déterminée par DPPH et RPE, A : biplot réalisé par ACP, B : CAH permettant la discrimination de groupe de similarité.

Grâce aux analyses DPPH et RPE, il a donc été possible de discriminer des vins en fonction de leur capacité antioxydante, grâce à la complémentarité de ces deux méthodes d'analyses. Pour aller plus dans la compréhension de cette discrimination, des analyses LC-QToF-MS ont permis de déterminer les marqueurs moléculaires liés à cette capacité antioxydante.

Chapitre 2 : Marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante des vins blancs

Pour cette étude visant à isoler les marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante des vins blancs, 287 vins ont été analysés par LC-QToF-MS et DPPH, et 106 de ces vins ont également été analysés par RPE. La totalité des vins n'a pas été analysée par RPE pour des raisons techniques. En effet cette analyse est relativement longue, 2 à 3h par échantillons, et ne peut être automatisée, ce qui limite fortement le nombre d'échantillons qu'il est possible d'analyser.

L'avantage de l'analyse LC-QToF-MS par rapport à la FT-ICR-MS réside en l'utilisation d'une méthode séparatrice en amont de l'analyse MS permettant ainsi la séparation d'isomères, on parlera donc de couple m/z -TR pour parler des ions détectés. En contrepartie, l'analyse LC-QToF-MS dispose d'une résolution plus faible, ce qui contrairement à la FT-ICR-MS ne permet pas une détermination de la formule élémentaire exacte des ions détectés.

Les vins analysés pour cette étude sont majoritairement des Chardonnay (251) mais comptent également quelques Sauvignon blanc et Sémillon, 30 et 6 respectivement (Annexe 1). De plus, les vins analysés sont issus de 3 millésimes, 2016, 2017 et 2018, à différents stades d'élevage variant de fin FA à 1 an d'élevage, dans le but d'avoir une diversité de vins et des profils métaboliques les plus larges possibles.

Les analyses LC-QToF-MS ont été réalisées sur les tous les échantillons en mode d'ionisation positif et négatif, le tout en 4 séries d'analyses, ce qui fournit donc 8 jeux de données LC-QToF-MS. Il aurait été intéressant de déterminer les marqueurs moléculaires des groupes de vins discriminés précédemment en fonction de leur capacité antioxydante (Chapitre 1 2.4) ; groupes de vins avec une capacité antioxydante élevée, intermédiaire ou plus faible. Malheureusement, au fur et à mesure de l'avancement des analyses, nous avons constaté une grande variabilité entre les jeux de données LC-QToF-MS. Cette variabilité technique nécessitait une correction des intensités obtenues après comparaison avec un échantillon de référence pour les masses détectées. Au démarrage de la mise en place du plan expérimental, les premiers jeux de données LC-QToF-MS analysés ne comportent pas ce type d'échantillons, rendant impossible la correction des intensités entre les jeux de données, et donc impossible la

comparaison directe des vins entre ces jeux de données. Par contre, un échantillon de référence a tout de même été mis en place afin de permettre cette correction pour les analyses ultérieures.

Afin de déterminer les marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante, les corrélations de Spearman entre chaque couple m/z -TR et les valeurs obtenues par DPPH et RPE (Ec_{20} , Max, T_{Max} , 1^{ère} Pente) ont été calculées pour chacun des jeux de données. Uniquement les couples ayant une corrélation forte ($|r| > 0,6$) ont été conservés, ce qui représente 1444 couples m/z -TR. Après filtration des couples en fonction de leur signe de corrélation (positif ou négatif) et de leur présence dans plusieurs séries d'analyses, 380 couples m/z -TR ont été obtenus. Cette liste de couples m/z -TR corrélés aux analyses DPPH et RPE est appelée « Liste des composés marqueurs de la capacité antioxydante » et le détail des couples obtenus est donné en Annexe 2.

Le fait qu'un couple m/z -TR peut être corrélé positivement ou négativement à une ou plusieurs variables, est donc un élément marqueurs de ces propriétés. Par exemple, un composé corrélé négativement à Ec_{20} sera marqueur d'un effet antioxydant, alors qu'un composé corrélé positivement sera marqueur d'un échantillon moins antioxydant. Il faut toutefois faire attention lors de l'analyse des résultats de corrélation, une corrélation n'impliquant pas nécessairement une relation de cause à effet, un autre paramètre non mesuré peut en être la cause. Il est donc important de ne pas considérer les composés isolés comme étant associés à des composés antioxydants, mais comme des marqueurs de la capacité antioxydante du vin.

Afin de caractériser au mieux les propriétés de ces marqueurs moléculaires, il est possible de les regrouper, en fonction de leur « réactivité ». La Figure 28, présente ce regroupement à l'aide d'un CAH et d'une heatmap en fonction de leurs corrélations positives ou négatives avec les différentes variables. Trois groupes ont ainsi été déterminés. Le groupe 1 (orange) représente globalement des couples m/z -TR marqueurs d'une bonne capacité antioxydante par DPPH, (corrélés négativement à Ec_{20}) mais d'une capacité antioxydante plus faible par RPE, car corrélés positivement à T_{Max} et Max et négativement à 1^{ère} Pente. Le groupe 2 (vert) quant à lui, regroupe des couples m/z -TR marqueurs d'une capacité antioxydante faible par DPPH, T_{Max} et Max, mais indiquant une bonne capacité antioxydante si l'on considère la variable 1^{ère} Pente. Enfin, les couples m/z -TR présents dans le groupe 3 (bleu), qui est le plus important en nombre d'individus, marquent une capacité antioxydante élevée du vin avec toutes les variables considérées. Ces 3 groupes montrent donc que les couples m/z -TR isolés ont des propriétés différentes et qu'ils doivent donc être constitués de composés de familles chimique variées.

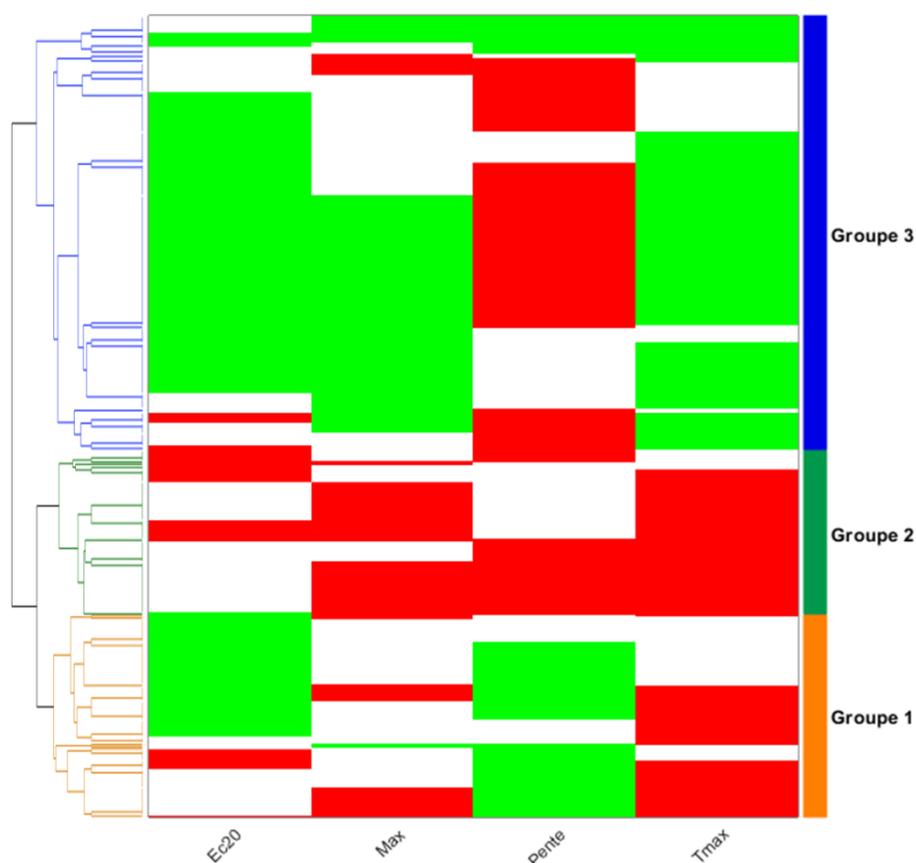


Figure 28 : Heatmap représentant les 380 couples m/z -TR isolés en fonction de leur corrélation avec les variables Ec_{20} , Max , T_{Max} et 1^{ère} Pente, vert : corrélé négativement, rouge : corrélé positivement, blanc : non corrélé. La réalisation d'un dendrogramme permet la discrimination des couples m/z -TR en 3 groupes. Le groupe 1 correspond aux couples m/z -TR globalement marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH mais faible par RPE, le groupe 2 au couples marqueurs d'une capacité antioxydante faible si l'on considère Ec_{20} , Max et T_{Max} mais forte via 1^{ère} Pente et le groupe 3 correspond aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante forte pour les deux méthodes d'analyses DPPH et RPE.

Parmi ces 380 couples m/z -TR, 18 sont communs avec les composés isolés précédemment par FT-ICR-MS, ce qui permet d'obtenir leurs formules élémentaires avec certitude. De plus, l'annotation à l'aide de bases de données en ligne (Metlin et KEGG) mais également de l'outil Oligonet¹²⁴, 10 composés ont une correspondance entre cette annotation et la formule élémentaire FT-ICR-MS (Tableau 7). Ces composés peuvent donc être utiles à la compréhension des groupes moléculaires formés. Ainsi, le 1^{er} composé du tableau est probablement la dihydroquercetine, composé qui a déjà été identifié dans le vin blanc¹⁴²⁻¹⁴⁴. De plus, la dihydroquercetine montre une capacité antioxydante de 1,7 mmol en équivalent Trolox, ce qui est similaire à l'acide férulique¹⁴⁴, ce résultat tend à confirmer l'identification de ce composé étant donné qu'il apparait être corrélé négativement à Ec_{20} , et donc marqueur d'une bonne capacité antioxydante. Deux autres composés du groupe 1 ont également été

annotés, il s'agit d'un terpène ($C_{22}H_{28}O_8$) et d'un lipide ($C_{18}H_{34}O_6$), ces deux familles de composés peuvent également avoir des activités antioxydantes ¹⁴⁵.

Deux composés du groupe 2 ont été annotés. Il s'agit d'un peptide $C_{10}H_{19}O_4N_3S$, ainsi que d'un composé $C_4H_4O_4$ pouvant être l'acide fumarique ou maléique. Plusieurs composés du groupe 3 semblent être des composés phénoliques tel que l'acide gallique ($C_7H_6O_5$). Pour les composés $C_9H_{10}O_5$ et $C_9H_{10}O_3$, plusieurs isomères sont possibles, l'acide dihydroxy-phényl lactique, l'acide vanillylmandelique ou l'acide syringique et l'acide tropique, l'acide phloretique, le veratraldehyde, ou l'homovanilline, respectivement. Plusieurs de ces composés ont été détectés dans le vin et montrent une activité antiradicalaire, tels que l'acide syringique ou l'acide dihydroxyphenyllactic pour le composé $C_9H_{10}O_5$, et l'acide phloretique pour $C_9H_{10}O_3$ ^{98,142}. D'autre part, le composé $C_{14}H_{27}O_5N_3$, semble être un peptide avec des propriétés antioxydantes, Val-Val-Thr ou Ser-Val-Leu. Il a été montré que les peptides ayant des propriétés antioxydantes contiennent le plus souvent un acide aminé hydrophobe en position N-terminal (Val, Leu ou Ile), ainsi que Pro, His, Tyr et Met dans leur séquence ^{56,57}. Ici, la séquence du peptide n'est pas connue, il n'est pas donc possible de connaître les acides aminés en position N-terminale. En revanche, les deux possibilités de peptides contiennent des acides aminés favorisant la capacité antioxydante, Val et Leu. En raison de la correspondance entre les propriétés antioxydantes des composés potentiellement identifiés et les propriétés de marqueurs des groupes auxquelles ils appartiennent, cela favorise donc la probabilité d'identification ¹⁴¹.

Afin d'avoir une vision plus générale de la diversité moléculaire des marqueurs isolés, une annotation à l'aide d'Oligonet a été réalisée ¹²⁴. Montrant ainsi, que les groupes 1 et 2 seraient principalement composés de peptides, à hauteur de 48 et 50% respectivement, alors que le groupe 3 n'en comporte que 22%. Ce pourcentage implique une quantité plus importante de composés autres que des peptides, tel que des composés phénoliques, par exemple l'acide gallique, qui est connu pour ces propriétés antioxydantes, identifié ici par FT-ICR-MS ^{94,95,136,146}

Tableau 7 : Composés isolés dans la liste de marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante annotés à l'aide de FT-ICR-MS. La tableau présente la masse neutre calculée à partir de l'ion détecté en mode positif ou négatif à partir de $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$, le temps de rétention en minutes, le groupe auquel il appartient (1, 2 ou 3), le mode d'ionisation utilisé lors de sa détection positif (+) ou négatif (-), la corrélation positive (rouge) ou négative (vert) avec les variables RPE et DPPH, la formule élémentaire déterminée par FT-ICR-MS, une identification possible de l'ion, enfin Réf présente si une étude de la capacité antioxydante a déjà été réalisé sur le composé annoté.

Masse Neutre M (Da)	RT (min)	Groupe	Détection	Ec ₂₀	Max	T _{Max}	1 ^{ère} Pente	Formule élémentaire	Composé possible	Réf
304,0580	3,1	1	(+)(-)	-		-	+	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	Dihydroquercetine	142-144
420,1782	3,1	1	(-)	-				C ₂₂ H ₂₈ O ₈	Eupacunoxine ; Eupacunoline	
346,2352	4,1	1	(+)(-)	-				C ₁₈ H ₃₄ O ₆	Acide octadecenoïque	145
116,0112	0,7	2	(+)(-)			-	+	C ₄ H ₄ O ₄	Acide fumarique ou Maléique	
277,1094	0,9	2	(+)		+	+	+	C ₁₀ H ₁₉ O ₄ N ₃ S	Gly-Val-Cys; Gly-Ala-Met; Gln-Met	
170,0215	0,9	3	(-)	-		+		C ₇ H ₆ O ₅	Acide gallique	98,136
233,0357	1,3	3	(+)(-)	-	-	+	-	C ₈ H ₁₁ O ₅ NS	Dopamine sulfate	
317,1950	2,6	3	(+)(-)	-	-		-	C ₁₄ H ₂₇ O ₅ N ₃	Val-Val-Thr ; Ser-Val-Leu	
198,0526	3,0	3	(-)	-		+		C ₉ H ₁₀ O ₅	Acide vanillylmandelique ; Acide syringique ; Gallate d'éthyle	98,144
166,0628	3,7	3	(+)	-			-	C ₉ H ₁₀ O ₃	Acide tropique ; Acide phényl-lactique	98
343,0838	0,7	2	(+)	+	+	+		C ₁₃ H ₁₇ O ₆ N ₃ S		
215,0250	1,3	3	(+)	-		-	+	C ₈ H ₉ O ₄ NS		
309,2050	4,0	3	(+)	+			+	C ₁₆ H ₂₇ O ₃ N ₃		
472,2169	1,2	2	(+)	+		+	-	C ₁₉ H ₃₆ O ₁₃		
193,9885	0,7	3	(-)		-	-		C ₅ H ₆ O ₆ S		
436,1947	2,9	3	(+)(-)	-	-	+	-	C ₁₉ H ₃₂ O ₁₁		
302,0061	3,0	3	(+)(-)	-			+	C ₇ H ₁₄ O ₅ N ₂ S ₃		
288,1572	3,3	3	(-)	-	-	+	-	C ₁₄ H ₂₄ O ₆		

Chapitre 3 : Analyse non ciblée des composés nucléophiles du vin par LC-QToF-MS

Une étude plus spécifique des composés nucléophiles du vin a été développée. Il est connu que ces composés peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes antioxydants du vin, en piégeant les quinones formées lors de l'oxydation, limitant ainsi les risques de brunissement du vin. Pouvoir estimer cette composition a donc un intérêt important pour la compréhension de mécanismes de défenses du vin vis-à-vis de l'oxydation. D'autre part, les composés soufrés, tels que le GSH, sont connus pour leurs propriétés antioxydantes dans le vin, mais leurs taux d'ionisations par analyse électro-spray est assez faible rendant difficile leurs détections. Ainsi, la dérivation des vins à l'aide d'une quinone (4-méthyle-1,2-benzoquinone) permet d'une part d'augmenter le seuil de détection des composés soufrés, et d'autre part de mettre en avant un pool de composés nucléophiles mal connus aujourd'hui qui peuvent être impliqués dans les mécanismes antioxydants du vin blanc.

1. Développement de méthode de dérivation

Les connaissances sur la fraction moléculaire associée à la stabilité à oxydative des vins blancs sont partielles. Les composés soufrés, tels que le glutathion et d'autres peptides, ont un rôle aujourd'hui bien établi de réducteur dans de nombreuses réactions d'oxydation, protégeant de la toxicité des métaux lourds, ou l'oxydation des lipides et des polyphénols en tant que piègeur d'ERO^{109,136,147}. Ainsi, cette étude introduit un outil analytique original pour la détermination directe des composés nucléophiles disponibles dans les conditions acides du vin blanc. La dérivation des composés nucléophiles a été réalisée dans des vins sans ajustement du pH en utilisant la 4-méthyle-1,2-benzoquinone (Q) comme sonde électrophile. Les conditions de dérivation ont été optimisées en tenant compte de la polarité MS, du pH, du temps de réaction et de la stabilité des adduits, à l'aide de solutions modèles contenant des composés soufrés et azotés (GSH, Cys, HCys et Ser-Aps-Cys-Asp-Ser, Asp-Met, Met et Glu). L'analyse LC-MS-QToF de 92 vins blancs (Chardonnay, Sauvignon blanc et Sémillon) suivie d'une analyse multivariée (PLS-DA) et du test de Wilcoxon ont permis d'isoler 141 composés

nucléophiles putatifs. Seuls 20 de ces composés, essentiellement des thiols, ont été détectés sans dérivatisation, ce qui montre une augmentation importante de leur limite de détection après le piégeage de la quinone. De plus, des annotations utilisant une base de données en ligne (Oligonet, Metlin et KEGG) ainsi que la détermination de la formule élémentaire grâce au profil isotopique ont fourni la preuve de la présence d'acides aminés (Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Cys et Met) et de peptides ayant des propriétés antioxydantes. Ces résultats montrent que l'ajout de la 4-méthyl-1,2-benzoquinone dans les vins blancs améliore la capacité d'ionisation des thiols et permet un meilleur criblage des composés azotés et soufrés impliqués dans le métabolome antioxydant des vins blancs.

Cette étude a été soumise à Analytical Chemistry en Mai 2019.

Molecular characterization of white wines nucleophilic potential by ultra high performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry

Remy Romanet, Florian Bahut, Maria Nikolantonaki* and Régis D. Gougeon

Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, Rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078 Dijon Cedex, France

*Corresponding author: maria.nikolantonaki@u-bourgogne.fr

Abstract

The knowledge about the molecular fraction associated to white wines oxidative stability is still poorly understood. However, the role of S- N- containing compounds, like glutathione and other peptides, as a source of reductant in many oxidation reactions protecting against heavy metals toxicity, or lipids and polyphenols oxidation as ROS-scavenger is today very well established. In that respect, the present study introduces an original analytical tool for the direct determination of the available nucleophilic compounds in white wine acidic conditions. One step derivatization of nucleophiles has been realized in wines with no pH adjustment by using 4-methyl-1,2-benzoquinone as an electrophilic probe. Derivatization conditions considering: probe concentration, pH, reaction time, MS ionisation conditions and adducts stability, were optimized using model solutions containing standard sulfur and amino compounds (GSH, Cys, HCys and Ser-Aps-Cys-Asp-Ser, Asp-Met, Met and Glu). LC-MS-QToF analysis of 92 white wines (Chardonnay, Sauvignon and Semillon) followed by Multivariate analysis (PLS DA) and Wilcoxon test allowed to isolate up to 141 putative wine relevant nucleophiles. Only 20 of these compounds, essentially thiols, were detected without derivatization, showing an important increase in their limit of detection after quinone trapping. Moreover, annotation using online database (Oligonet, Metlin and KEGG) as well as elementary formula determined by isotopic profile, provided evidence of the presence of amino acids (Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Cys and Met) and peptides with important antioxidant properties. The complimentary set of MS/MS spectral data greatly accelerated identification of nucleophiles and enabled peptides sequencing. These results show that probing wines with 4-methyl-1,2-benzoquinone enhance thiols ionisation capacity and give a better screening of specific S- N- containing functional compounds as part of white wines antioxidant metabolome.

Keywords: UPLC-QToF-MS, untargeted analysis, thiols, Chardonnay wine oxidation, peptide

Introduction

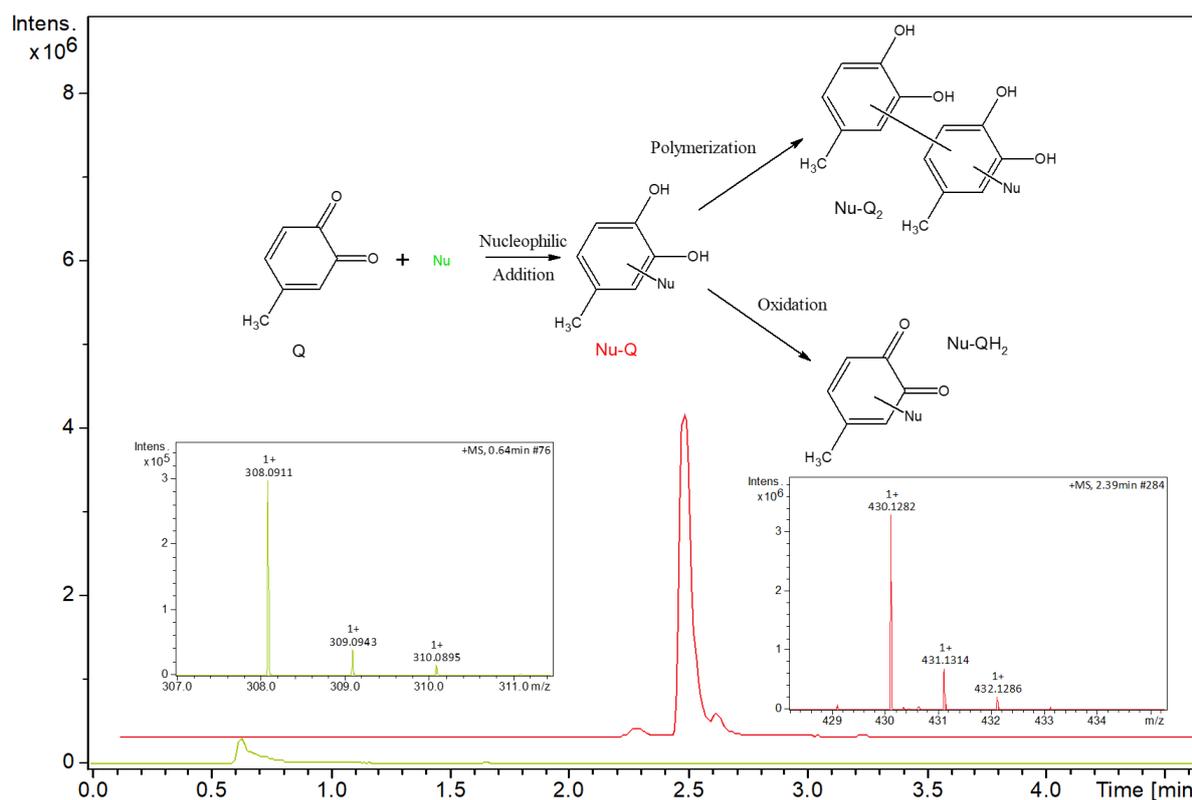
Wines oxidative stability can be related to intrinsic and extrinsic factors preventing aroma deterioration. The majority of the studies dealing with antioxidant capacity of white wines are focused on the effect of targeted compounds, like sulfites, phenolics compounds or glutathione (GSH).¹⁻⁴ For a complex matrix like white wines, to establish the role of antioxidant naturally present is not easy, and to predict wine oxidative evolution using only targeted compounds can be insufficient. According to our recent study, FTICR-MS along with multivariate statistical analyses put in evidence that GSH efficiency against wines sensory oxidative stability during bottle aging is dependant to wines global antioxidant metabolome consisting of N- and S- containing compounds like amino acids, aromatic compounds and peptides⁵. These compounds present a strong nucleophilic character and their reactivity with wines electrophiles such as oxidized polyphenols, suggests the formation of stable adducts presenting lower oxidative potential⁶⁻¹⁰.

The analysis of thiol compounds is often difficult because of the reactivity of the sulfhydryl group, causing autoxidation, and low sensitivity related to their poor ionization level in electrospray ionization mass spectroscopy¹¹⁻¹⁴. Therefore, derivatization reagents are used to stabilize thiols and enhance their limit of detection^{11,15}. The most used thiol derivatization reagents can be classified into five groups: disulfides, active halogen, aziridines, organic mercurial compounds and N-substitued maleimides^{11,16-19}. However, these derivatized agents are intended for use in alkali pH conditions, though the protonation state of the sulfhydryl group plays an important role in nucleophilic reaction efficiency, it is why solution pH is important to derivatization yield.²⁰ Nucleophilic derivatization under alkali conditions may cause side reactions in wine matrix, including the destruction of natural polyphenolic compounds, peptides, proteins and amino acids^{21,22}. Indeed, the pH value in wine matrix controls first, the phenol-phenolate equilibrium, which sets the phenol concentration needed to undergo oxidation reactions in the presence of trace metals and oxygen^{23,24}. Although at acidic pH (3.0-4.0) the phenolate concentration is very low, at the higher pH range (4.0) the concentration is about 10 times higher than at the lower pH range (3.0), and hence the oxidation rate of wines with high pH is much faster than at low pH²⁵. Second, high pH values (≥ 7.0) suggest thiol containing compounds oxidation. Jongberg *et al.* showed, in wine like pH acidic conditions, that amino and thiol containing compounds (like cys) react with 4-methyl-1,2-benzoquinone (Q) forming a thiol-quinone adduct, where Q is reduced to diphenol form (QH₂).

⁶ The reactivity of several wine relevant nucleophiles like, amino acids, volatile odorant thiols and antioxidant compounds against Q showed rapid reaction rates and yields up to 95 % ^{6,8}.

In the majority of studies, known compounds were targeted for quantification especially glutathione, cysteine and homocysteine ^{6,12,16,18–20}. However, the untargeted molecular analysis of sulfur compounds in wine requires either the coupling of chromatography to specific detection ²⁶, or derivatization strategies prior to liquid chromatography – mass spectroscopy, coupled with multivariate statistical analysis ¹⁷. In that case, authors showed that the quality of the identification is directly related to the decrease of native nucleophiles and the increase of their derivatized forms.

Here, our effort was aimed at investigating the performance of high-resolution mass spectrometry with multivariate statistical analysis as a tool for the direct analysis of wine relevant nucleophiles. In order to eliminate pH-related derivatization artifacts of existing protocols, Q was used as a strong electrophilic probe under wine acidic conditions. Derivatization conditions were optimized based on known nucleophilic compounds and in the LC-MS-QToF screening, unknown nucleophilic compounds decreased after Q probing, as compared to no derivatized nucleophiles. The mass difference from the Q reagent used for identification of wines relevant nucleophiles from the 4-methyl-1,2-benzoquinone derivatives retention time and metabolomic databases. MS/MS analysis was provided structural characterization and peptides sequencing. Thanks to our novel analytical approach, unknown nucleophilic compounds have been isolated and characterized in freshly made white wines from different grape varieties, giving a better understanding on wines antioxidant metabolome composition.



Scheme 1: Reaction occurring during derivatization corresponding to nucleophilic reaction between 4-methyl-1,2-benzoquinone (Q) and wines relevant nucleophiles (Nu) at room temperature and wine acidic conditions. This reaction can result to isomers final products. Some reactions of polymerization and oxidation can occur allowing to Nu-Q₂ and Nu-QH₂ formation. Green line represents the extracted ion chromatogram obtained after UPLC-MS analysis of GSH before derivatization and red line after derivatization.

Experimental section

Chemicals. Acetonitrile was obtained from Biosolve, formic acid from Acros Organic, NaOH from ChemLab, ethanol from Fisher Chemical, Tuning Mix from Agilent Technologies, 4-methyl-catechol, Amberlyst A-26(OH) ion-exchange resin, periodic acid, tartaric acid cysteine (Cys), homocysteine (HCys), glutathione (GSH) glutamic acid (Glu) and methionine (Met) were purchased from Sigma Aldrich. Ser-Asp-Cys-Asp-Ser, Asp-Met were obtained from Genedust and ultrapure water comes from a Milli-Q system.

Wine samples. 92 young wines from three grapes varieties, Chardonnay (62 wines), Sauvignon (24 wines) and Semillon (6 wines), were analyzed on two vintages (2016 and 2017). Sixteen chardonnays came from the 2016 vintage and they were analyzed after ageing for one

year on lies in barrel. The remaining 76 wine samples stem from the 2017 vintage and they were analyzed directly after alcoholic fermentation (Table S1).

Derivatization using 4-methyl-1,2-benzoquinone. The sample or standard solution of GSH, HCys and Cys at 0.05 mM, Glu and Met at 0.2 mM, Ser-Aps-Cys-Asp-Ser and Asp-Met at 5 mg/L in model wine (12% (v/v), 6g/L of tartaric acid and at pH 3.2), were adjusted to 1 mL and transferred to amber vials where they were kept under argon. To this solution were then added 1mM of 4-methyl-1,2-benzoquinone (Q) prepared in acetonitrile according the protocol proposed by Nikolantonaki and Waterhouse (2012)⁸ for 30 min under stirring. After incubation, 1mM of sulfites was added to quench the reaction. Blank samples were prepared each time by adding acetonitrile and sulfites in equal concentrations as in the derivatized samples. Samples were analyzed within 24h (sd < 1%).

UPLC-Q-ToF-MS Analysis. Analysis has been realized using an ultra-high-pressure liquid chromatography (Dionex Ultimate 3000, ThermoFischer) coupled to a MaXis plus MQ ESI-Q-ToF mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). The column used was an Acquity BEH C18 1.7 μ m, 100 x 2.1 mm by Waters (Guyancourt, France) in reverse phase to analyzed non-polar compounds. The mobile phase was (A) acidified water (0.1% v/v of formic acid) and (B) 95% (v/v) acidified acetonitrile (0.1% v/v of formic acid). The temperature of elution was 40°C using the gradient: 0-1.10 min 5% (v/v) of B and 95% (v/v) of B at 6.40 min. The flow was set at 400 μ L/min. The ionization takes place in electrospray (2 bars pressure for nebulizer and 10L/min for nitrogen dry gas flow). End plate offset (500V) and capillary voltage (4500V) permit the ions transfer. To recalibrate spectrum, 4 times diluted calibrant (ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent, Les Ulis, France)) is injected at the beginning of each run. Before batch analysis, the mass spectrometer was calibrated using undiluted Tuning Mix in enhanced quadratic mode (errors <0.5ppm). The mass range was between 100 and 1500 m/z in positive ionization mode. Quality controls were analyzed before and throughout each batch, to verify the stability of the UPLC-Q-ToF-MS system. All sample were analyzed randomly. Fragmentation has been realized on targeted compounds using 20 eV as collision energy.

Data mining. Features were filtered by S/N higher than 30 and an absolute intensity above 1,000. The spectral background noise was removed before features extraction. An homemade R software allowed alignment of extracted features with m/z and retention time tolerance lower to 10 ppm and 0.3 min, respectively. Multivariate statistical analysis, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) were realized with Simca (Umetrics) to

determine VIP score for each molecular feature. Using a Matlab script, Spearman correlations of each feature were calculated. Criterion was fixed to $VIP > 1$ and $p\text{-ValueSpearman} < 0.01$ allowing to keep statistical discriminant molecular features, which could be native or derivatized compounds. The elementary formula of the filtered compounds was determined using isotopic profile with DataAnalysis (v. 4.3, Bruker, Germany). Online tools and databases such as Oligonet 27, KEGG and Metlin were used for the putative derivatized compounds (mass detected – mass of Q). These informations were compared with MS2 analysis to validate the elementary formula and the structure of the compound. Annotation confidence level has been calculated for each compound according to Hollender *et al.* and Trengove *et al.*^{28,29}.

Results and Discussion

Screening one-step derivatization conditions for optimizing the detection of wine relevant nucleophiles in acidic pH. Seven model wine relevant nucleophiles including free linear thiols (GSH, Cys, HCys and Ser-Aps-Cys-Asp-Ser), bound thiols (Asp-Met and Met) and amino compounds (Glu) presenting a molecular weight from 121 to 525 Da and different steric hindrance, were used as model compounds to optimize derivatization conditions.

An UPLC-Q-ToF-MS method was developed to separate the reaction products formed after the incubation of Q with, GSH, Cys, HCys, Ser-Aps-Cys-Asp-Ser, Asp-Met, Met and Glu in wine at room temperature. The UPLC–MS-QToF reveals the major addition products and several minor compounds (Table 1). After Q addition, the derivatized compounds were more hydrophobic permitting a better separation using C18 reverse phase chromatography (Figure S2). Although, a complete separation for all known and for the future unknown analytes was no longer necessary based on the high-resolution mass spectrometry detection mode in which analytes can be distinguished by a molecular weight. However, an excellent chromatographic separation would efficiently minimize matrix interference and remarkably enhance detection sensitivity.

The main compounds formed in model solutions were addition products including the single addition of one nucleophilic compound and one 4MeC skeleton according the mechanism proposed by Nikolantonaki *et al.*, (2012) (scheme 1)³⁰. In detail, three mono-adducts of $[Q+GSH-2H)+H]^+$ and $[Q+Ser-Asp-Cys-Asp-Ser-2H)+H]^+$ $[Q+Cys-2H)+H]^+$ and two of $[Q+Hcys-2H)+H]^+$ in a ratio 1:30:2 and 1:2, respectively, were detected based on their MS ionization peak areas. Moreover, due to their low reactivity one monoadduct was detected after the reaction of Q with the tested amino compounds: Asp-Meth, Meth and Glu (Figure S2).

However, method optimization conditions were based only to the major adducts while only these could be afterwards detected in real wine samples. Thus, parameters such as the concentration of the electrophilic probe (Q), the pH value, the reaction time, the UPLC separation conditions and the Q-ToF-MS ionization conditions and the derivatisation products stability were investigated in detail using a chardonnay matrix.

Electrophilic probe (Q) concentration effect. For ensuring completion and reproducibility of this one-step derivatization, an excess amount of Q was necessary. The effect of Q concentration was investigated from 2- to 6-fold molar ratios excess to the total molar of nucleophilic compounds. The results suggested the highest and most stable peak intensity was achieved when the amount of Q was 4-fold molar excess to total molar of nucleophiles. Under this condition, Q was in large excess, and the nucleophiles were completely probed.

Table 1: UPLC-MS-Q-ToF analytical results (experimental m/z , retention time, limit of detection, limit of quantification) and prospective formulas of tested nucleophiles (GSH, Cys, HCys, Ser-Asp-Cys-Asp-Ser, Asp-Meth and Glu) before and after 4-methyl-1,2-benzoquinone (Q) derivatization

Compound	Before derivatization					After derivatization				
	Formula	m/z [M+H] ⁺	RT	LOD	LOQ	Formula	m/z [(Q+M- 2H)+H] ⁺	RT	LOD	LOQ
GSH	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	308.0911	0.6	8.48E-09	2.83E-08	C ₁₇ H ₂₃ N ₃ O ₈ S	430.1279	2.2 (3)* 2.4 (91) 2.5 (6)	3.92E-09	1.31E-08
Cys	C ₃ H ₇ NO ₂ S	122.0270	ND	ND	ND	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄ S	244.0638	1.2 (38) 1.7 (62)	1.96E-07	6.52E-07
Hcys	C ₄ H ₉ NO ₂ S	136.0427	ND	ND	ND	C ₁₁ H ₁₅ NO ₄ S	258.0795	1.9 (66) 2.2 (34)	1.82E-08	6.07E-08
Ser-Asp-Cys-Asp-Ser	C ₁₇ H ₂₇ N ₅ O ₁₂ S	526.1450	0.6	8.83E-08	2.94E-08	C ₂₄ H ₃₃ N ₅ O ₁₄ S	648.1817	1.4 (3) 1.8 (91) 2.2 (6)	1.34E-08	4.45E-08
Asp-Meth	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₅ S	265.0853	0.8	3.68E-09	1.23E-08	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	387.1220	2.9	3.29E-07	1.10E-06
Meth	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	150.0583	0.7	6.18E-08	2.06E-07	C ₁₂ H ₁₇ NO ₄ S	272.0951	ND	1.36E-06	4.52E-06
Glu	C ₅ H ₉ NO ₄	148.0604	0.6	4.33E-07	1.44E-06	C ₁₂ H ₁₅ NO ₆	270.0972	0.9		

ND: non detected; * relative abundance of enantiomers (%); RT: retention time (min); LOD: limit of detection (M); LOQ: limit of quantification (M)

pH effect. The reactivity of sulfhydryl and amino groups is highly dependent of the protonation state, which depends to the solution pH²⁰. In that respect, the pH influence on nucleophilic reaction yields and rates was studied in the range of 3.0 – 8.0 (Figure 1). Among tested nucleophiles, the pH had an important impact on the reactions kinetics. The peak areas of the Q probed thiol-containing (GSH, Cys, HCys and Ser-Aps-Cys-Asp-Ser) derivatives reached a maximum in the pH range 3.0 – 5.0. Interestingly, GSH-Q and Ser-Aps-Cys-Asp-Ser-QH₂ presented a peak area maximum at pH 3.0, while pH 5.0 was optimum for Cys-Q and HCys-Q. Based on the *pKa* values of Cys (*pKa* 8.3) and HCys (*pKa* 8.6) it is reasonable to assume that the reactivity of these thiols would be higher than this of GSH (*pKa* 9.0). In fact, the low *pKa* value of a specific thiol allows for increased levels of the thiolate anion ($-S^-$), which possesses stronger nucleophilicity, and consequently higher affinity for the electrophilic probe (Q). In acidic conditions, the overall picture is far more complex because *pKa* is not the only contributing factor. In fact, the steric hindrance of a specific thiol molecule at a given pH has considerable influence in dictating the higher or lower affinity of electrophiles for thiols.

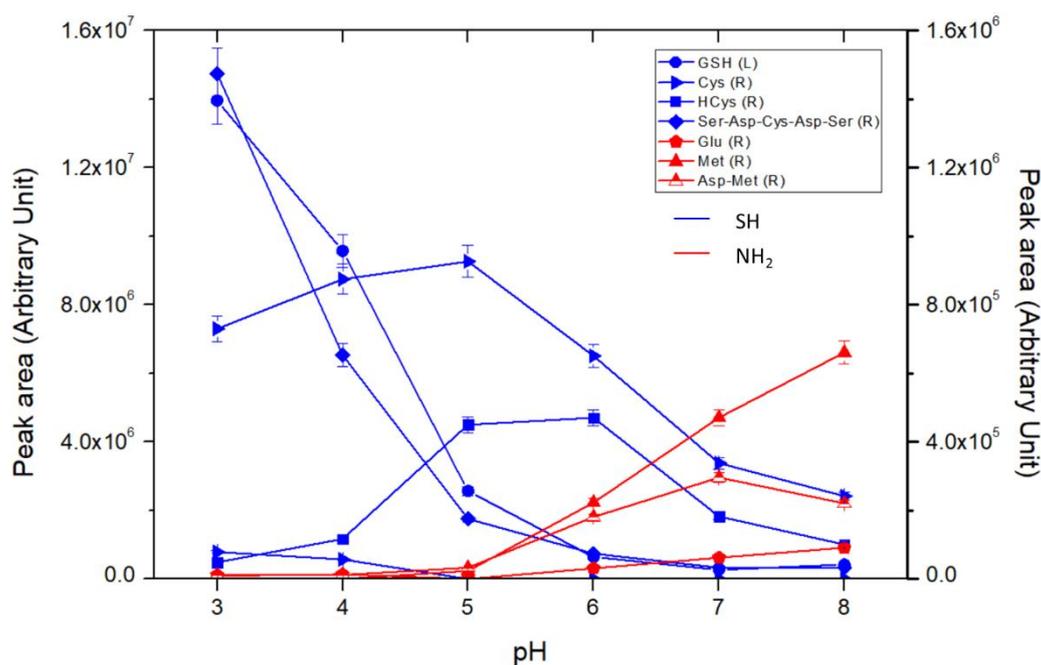


Figure 1: Peak Area of tested derivatized compounds at different pH values. Compounds reacting on sulfur group with Q are plotted in blue (GSH, Cys, HCys and Ser-Aps-Cys-Asp-Ser) while these reacting on amino group are plotted in red (Met, Glu and Asp-Met).

The effect of pH on nucleophilic addition of amino containing compounds (Glu, Meth and Asp-Met), including conjugated thiols, to Q was linear, being minimum at pH 5.0 and maximum at the highest pH (8.0). The rate of reaction of amines with carbonyls is very dependent on pH. As one goes from pH 7.0 to pH 5.0, the reaction rate increases, which reflect the greater reactivity of the carbonyl conjugate acid. Around pH 5.0 is the Goldilocks point: acidic enough to increase the rate of reaction, but not too acidic. Lower than pH 5.0, the reaction rate starts to decrease, which reflects the greater proportion of the conjugate acid of the amine, which is not nucleophilic. Below pH 3.0, the reaction completely shuts down since all the free amine has been converted to the ammonium salt.

These results showed that pH had an important impact on the derivatization reaction yield of wine relevant nucleophiles with Q. Indeed, low pH values (3.0-4.0) promote thiols probing, while higher pH (8.0) promotes amino compounds reactivity. With respect to our initial goal related to the estimation of the nucleophilic properties of wine matrixes under real winemaking conditions, and the avoidance of side reactions under alkali conditions, it was decided to conduct derivatization reactions directly to wine samples without adjusting their pH.

Reaction time effect. The reaction yield of tested nucleophiles with Q was evaluated over time at pH 3.0. Under our experimental conditions with the presence of Q in 4-fold molar excess, reactions of all tested nucleophiles except HCys and Met were accomplished with yields higher than 90% in 30 min (**Figure 2**). In the case of HCys, maximum reaction yield achieved at 200 min. However, under our experimental conditions and in accordance with the literature, Met-QH₂ was not detected^{6, 7}. Consequently, the probing reaction was carried out at room temperature for 30 min. After accomplishment, derivatization reactions were quenched by the addition of sulfites in excess.

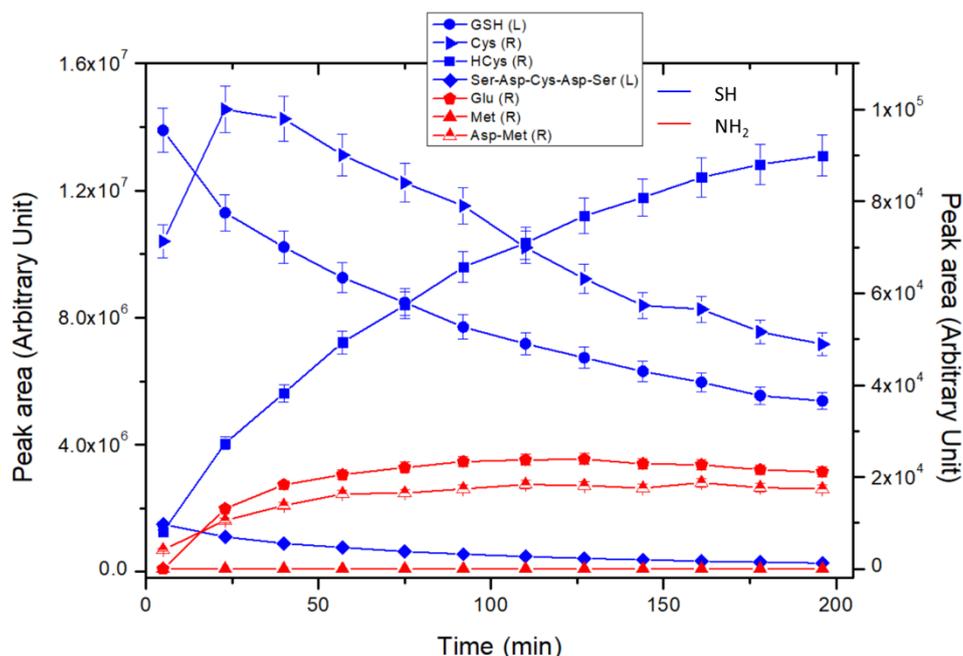


Figure 2: Peak area of tested derivatized compounds at different incubation time. Compounds reacting on sulfur group with Q are plotted in blue (GSH, Cys, HCys and Ser-Asp-Cys-Asp-Ser) while these reacting on amino group are plotted in red (Met, Glu and Asp-Met).

Q-ToF-MS ionization conditions. The last parameter tested for derivatization conditions optimization was the ionization mode for their detection by the mass spectrometer. Thiol and amino containing compounds are poorly ionized in MS with positive ion mode. However, chemical labeling can improve detection sensitivity with introduction of an easily ionizable group into the targeted analytes. In this work, a model quinone was used as a probe to target nucleophilic compounds. After nucleophilic addition, quinone is reduced back to the phenol and, which harbors two hydroxyl groups that can be easily protonated in acidic conditions and improve ionization efficiency of nucleophilic compounds. Here, we used all tested nucleophiles to estimate the enhancement of the detection sensitivity upon chemical probing using Q. As results, the Q- derivatives exhibited higher ionization potential than native nucleophiles in both positive and negative mode. For the same concentration, GSH-QH₂, Cys-QH₂, HCys-QH₂ and Ser-Aps-Cys-Asp-Ser-QH₂ showed five times less abundance in negative than in positive mode, while Asp-Met-QH₂ and Glu-QH₂ were detected only in positive mode. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) of free and derivatized Q nucleophiles, were also calculated in positive mode (Table 1). The results had shown that responses intensities of Q-derivatives improved compared with the free form.

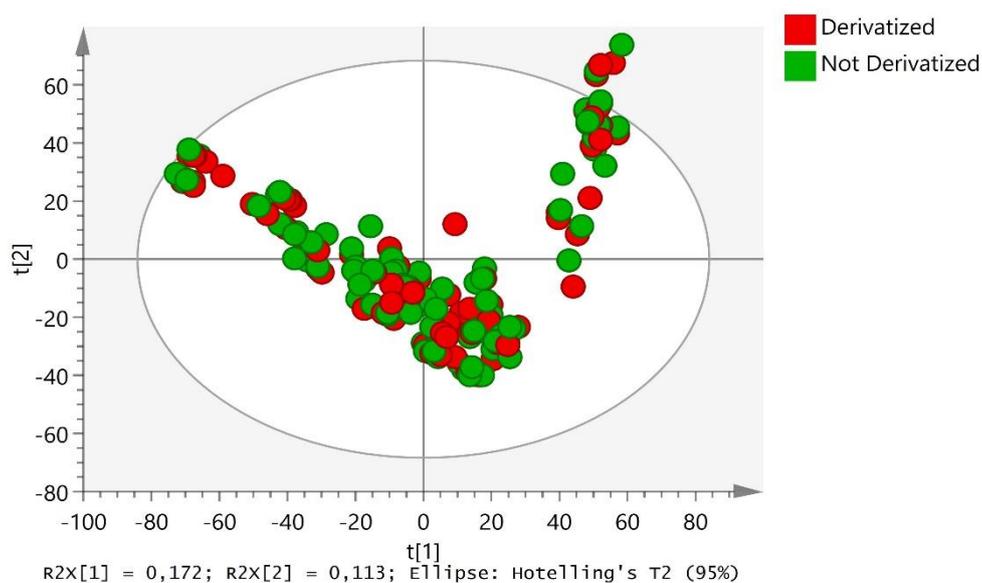


Figure 3: Principal Component Analysis of untargeted UPLC-QToF-MS analysis of 92 wine samples before and after Q derivatization.

Multivariate statistical analysis of UPLC-MS QToF data for isolation of wine relevant nucleophiles

UPLC-MS QToF data were collected after derivatization of 92 freshly made wines from different varieties and vintages. The MS peaks from the scan chromatograms with non- and derivatized samples were extracted using Data Analysis software, and all data were aligned (m/z values and retention times) using an home-made R software. The PCA for the wine samples is shown in **Figure 3**. The PCA of the total molecular features of wines before and after derivatization did not deliver statistical differentiation. This result demonstrates first, that derivatization conditions had minor impact on wine matrix molecular signature, and secondly, that they were optimal for the avoidance of side oxidation reactions resulting under estimation of wines nucleophilic potential. To conserve exclusively the statistically discriminant molecular features between the derivatized and no-derivatized wines related to wine nucleophiles, the p -Values and the VIP scores were calculated for each, by using a Wilcoxon test and a PLS-DA model (**Figure 4-A**). Filtration based on the $VIP > 1$ and $p\text{-Value} < 0.01$ was realized, resulting the decrease of the number of molecular features from the 6723 in total to 468. Among these 468 molecular features, only 141 were specific to the derivatized wine samples, as indicated on the basis of the difference m/z value of 122.0367 for the Q derivatization reaction (**Figure 4-B**). Among the 141 identified nucleophiles only 21 were detected in their free form in wines

before derivatization. In that respect, this screening assay after one step derivatization facilitates the identification of unknown nucleophiles while promising a better characterization of wines antioxidant metabolome.

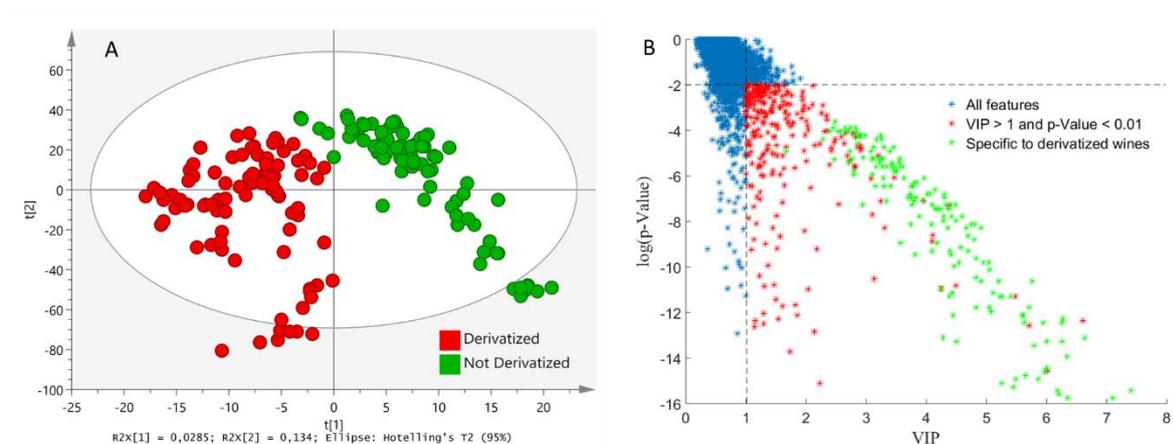


Figure 4: (A) PLS-DA model for 92 wines before and after Q derivatization. (B) Representation of the log of the p -Value obtained by Spearman correlation versus the VIP score obtained by PLS-DA for all the features. Different colours presents different filtration levels (all features in blue (6723), features after the first filtration level (p -Value < 0.01 and $VIP > 1$) in red (468) and in green points are features present exclusively in derivatized wines (141 features).

Annotation of wine relevant nucleophilic compounds

The 141 isolated molecular formula candidates and m/z values were searched in online databases (KEGG and Metlin), and using the online tools Oligonet interface, permitting to annotate 84 molecular features out of 141. Molecular formulae were determined using first, the isotopic ratio pattern and second, the confidence annotation level estimated based on two indexes proposed by Schymanski *et al.* (2014) and Summer *et al.* (2014)^{28,29}.

Table 2 presents the putative identification of the most abundant isolated compounds. Due to isomer formation after nucleophilic addition to three possible electrophilic carbon sites on Q moiety, 2 (or 3) molecular features with the same m/z but different retention time, can represent the same native compound. As example, molecular features detected with m/z 430.1278, 401.1372 and 471.1902 were all presented by two well resolved MS peaks at 2.06 and 2.35 min, 3.15 and 3.25 min and 2.84 and 3.12 min, respectively. However, the ratio of MS peak area of isomers was specific to the compound and, due to low sensitivity MS^2 experiments

were conducted only to the major reaction product. A targeted MS² mode was developed for these compounds with an optimized collision energy and a precursor ion. Moreover, accurate mass data and isotopic distributions for the precursor and product ions were compared with theoretical and experimental spectral data of standard compounds when available.

MS² analysis provided identification of 26 out 141 isolated nucleophilic compounds. Identified compounds based to their fragmentation pattern were essentially sulfur containing amino acids and peptides. For example, the characteristic fragmentation of di-peptide, Cys-Gly, and tri-peptides, GSH and Val-Leu-Cys, obtained during UPLC-MS-Q-ToF analysis is shown in **Figure 5**. The major peaks at m/z 169.0914 and m/z 199.1800 in **Figure 5-A**, (beside that at m/z 301.0852 for the protonated intact Cys-Gly-QH₂ peptide) represent prompt fragments, based on mass, correspond to the proposed peptide, resulting from the loss of 132.0 or 102.0 Da, respectively, from the protonated Cys-Gly-QH₂. Cys-Gly peptide sequence could be confirmed by the presence of the characteristic m/z 227.1712 fragment indicating the cleavage of the amine bond to produce b ion³¹. In addition, **Figure 5-B** represents the MS² spectrum of the precursor ion m/z 430.1278. The MS² spectrum of the parent ion shows the major product ions as having the following masses: 284.0586, 301.0851, 327.1009 and 355.0957. The main fragmentation pathways concern amino cleavages of Cys and Gly residues of the GSH moiety. While MS² spectra comparison with this GSH-QH₂ standard compound confirmed structural identification. In our study, except GSH, Cys, Pro and HCys had been identified after matching of MS² spectra with these of standards.

Table 2: Present putative annotation of some derivatized compounds. Formula mark with “*” designed compounds which is detected in free form. Error is calculated between detected mass and theoretical adduct mass $[M+Q+H]^+$. Putative peptides are amino acids combination and not amino acids sequence. Level of confidence are adapted from Sumner *et al.* (2014) and Schymanski *et al.* (2014)^{28,29}.

Putative Formula	Retention Time (Min)	Detected Mass $[M+Q+H]^+$	Neutral Mass [M]	Error (ppm)	Ms ² (20ev)	Putative Compounds	Confidence Level
C₂H₅NO₂ + Q	1.2	198.0759	75.032	0.79	120.0805 (100%)		5 ¹ - 4.5 ²
C₅H₉NO₂ + Q	1.3	238.1071	115.0633	1.04	192.1029 (100%); 238.1081 (48.8%); 220.0976 (11.9%); 170.0611 (8%); 178.0874 (6.4%)	Pro	1 – 9
C₃H₇NO₂S + Q	1.7	244.0637	121.0197	0.57	155.0175 (100%)	Cys	1 – 9
C₄H₉NO₂S + Q	2.2	258.0792	135.0359	2.74	134.0278 (100%); 169.0325 (49.9%); 210.0587 (16.4%); 195.0484 (16.1%); 135.0305 (6.8%)	HCys	1 – 9
C₅H₁₀N₂O₃S + Q	2.3	301.0852	178.0412	0.31	230.1577 (100%); 199.18 (89.1%); 229.1546 (57.1%); 189.1231 (34.9%); 227.1753 (18.8%)	Gly-Cys	3 - 4.5
C₇H₁₄N₂O₃S* + Q	3.0	329.1162	206.0725	1.06	171.1487 (100%); 185.1641 (79.7%); 199.1435 (37.4%); 213.1589 (31.2%); 231.1697 (20.1%)	Asp-Met	3 - 4.5
C₉H₁₈N₂O₃S* + Q	2.9	357.1475	234.1038	1.16	245.1495 (100%); 144.1016 (70%); 186.1235 (43.5%); 358.2342 (34.1%); 211.1439 (27.8%)	Leu-Cys; Ile-Cys	3 - 4.5
C₈H₁₄N₂O₅S + Q	2.2	373.1063	250.0623	0.23	147.076 (100%); 199.1801 (51.7%); 260.1602 (40.5%); 130.0497 (27.7%); 227.1745 (25.8%)	Cys-Glu	3 - 4.5
C₁₀H₁₈N₂O₅S* + Q	3.2/3.3	401.1372	278.0936	1.25	227.1756 (100%); 199.1804 (77.5%); 175.1076 (36.9%); 213.1596 (35.9%)	Glu-Met	3 - 4.5
C₁₁H₂₂N₂O₄S* + Q	3.3	401.1737	278.13	0.89	271.1111 (100%)	Pantetheine	3 - 4.5
C₉H₁₇N₃O₅S + Q	2.2	402.1329	279.0889	0.04	200.1393 (100%); 228.1342 (86.8%); 327.2028 (34.9%)	Gly-Thr-Cys	3 - 4.5
C₁₇H₁₇NO₃* + Q	4.3	406.1646	283.1208	0.8	406.1648 (100%); 388.1543 (79.5%); 373.1306 (11.8%); 407.1686 (11.2%); 370.144 (9.7%)		5 - 4.5
C₁₁H₂₁N₃O₄S + Q	2.8	414.1693	291.1253	-0.03	229.1543 (100%); 234.1568 (46.3%)	Gly-Cys-Leu	3 - 4.5
C₁₀H₁₇N₃O₆S* + Q	2.4	430.1278	307.0838	0.25	301.0851 (100%); 284.0585 (76.3%); 430.1278 (37.5%); 355.0957 (28.2%); 198.0582 (27.7%)	GSH	1 – 9
C₁₁H₂₁N₃O₅S + Q	3.1	430.1638	307.1202	0.94	299.1715 (100%); 242.1497 (59.7%); 313.1872 (51.3%); 245.1861 (34.3%); 186.0872 (33.8%)	Val-Ser-Cys	3 - 4.5

C₁₁H₁₉N₃O₆S + Q	2.0	444.1434	321.0995	0.17	231.0975 (100%); 232.101 (42.1%); 232.1292 (27.2%); 229.1549 (21.6%)	Ala-Cys-Glu ; Homo-GSH	3 - 4.5
C₁₂H₁₉N₃O₆S + Q	3.0	456.1431	333.0995	0.93	229.1542 (100%); 456.28 (28.6%); 228.1334 (20.6%); 244.0632 (16.7%); 213.1598 (16%)	Pro-Cys-Asp	3 - 4.5
C₁₄H₂₇N₃O₄S* + Q	3.1	456.2156	333.1722	1.41	185.1645 (100%); 213.1596 (93.8%); 244.0634 (86.2%); 231.1337 (84.8%); 229.1548 (69.7%)	Val-Ile-Cys; Val-Leu-Cys	3 - 4.5
C₁₂H₂₁N₃O₆S* + Q	3.0	458.1586	335.1151	1.17	231.1338 (100%); 329.1167 (65.1%); 232.1372 (36.4%); 158.081 (32.7%); 458.1587 (24.4%); 312.0898 (23%)	Val-Cys-Asp	3 - 4.5
C₁₃H₂₄N₄O₅S* + Q	2.8/3.1	471.1902	348.1467	1.37	187.1076 (100%); 244.1294 (74.7%); 258.1435 (44.4%); 245.1312 (28.9%); 355.0955 (21%)	Gly-Gly- Leu-Cys	3 - 4.5
C₁₃H₂₃N₃O₆S* + Q	2.9	472.1743	349.1308	0.99	294.0735 (100%)	Leu-Cys-Asp	3 - 4.5
C₁₂H₂₁N₃O₇S + Q	2.9	474.1535	351.11	1.12	187.1073 (100%); 247.1107 (62.8%); 217.1538 (51.2%)	Thr-Cys-Glu	3 - 4.5
C₁₆H₃₁N₃O₄S* + Q	3.7	484.2469	361.2035	1.37	341.2178 (100%); 228.1338 (92.2%); 144.1014 (38.8%)	Met-Val-Leu ; Met-Val-Ile; Pro-Phe-Val	3 - 4.5
C₁₃H₂₃N₅O₇S + Q	2.3	516.1757	393.1318	0.34	559.3813 (100%); 302.1702 (92.6%); 147.0436 (34.6%)	5 Peptides possible	3 - 4.5
C₁₇H₃₁N₅O₇S* + Q	3.1	572.2376	449.1944	1.49	229.1543 (100%); 273.1444 (37.2%); 230.158 (30.3%)	14 Peptides possible	3 - 4.5
C₂₉H₄₀N₆O₆S* + Q	3.5	723.3154	600.273	2.24	435.2592 (100%)	Gly-Cys-Lys -Phe-Phe; Pro-Pro-Val- Cys-Trp	3 - 4.5

¹ Compound Identification confidence level (5-1) according Schymanski *et al* (2014) ²⁸. Level 5 is the lower confidence level corresponding to mass of interest but without structural information. Level 4 corresponding to annotation with elementary formula determined using spectral profile. Adding fragmentation analysis and/or data base matches allows to obtain level 3 of confidence. Level 2 is when one compounds is possible, but uncertain, and level 1 is the identification confirmed by standard compounds.

² Compound Identification confidence level (5-1) according Sumner *et al.* (2014) ²⁹. For UHPLC-MS with MS² analyses, high resolution retention time is 1.5 points, molecular formula upon accurate *m/z* and isotopic pattern give 1 point and accurate MS² is 2 points. The score is thus 4.5 points and it will be double by matching with a standard. The highest confidence level is for level 1 and the bigger score, corresponding to 9 in this study.

When standards were not available MS² spectra allowed to enhance the confidence into putative identification for certain compounds. Thus, the features at m/z 357.1475, 456.2156 and 456.1431 which can be probably Leu-Cys (or Ile-Cys), Val-Leu-Cys (or Val-Ile-Cys) and Pro-Cys-Asp, have a detected fragment at m/z 244.0637 which correspond to Cys-QH₂ (**Table 2**). Moreover, fragmentation pattern of the precursor ion m/z 456.2170 with major peaks at m/z 355.1324 and m/z 185.1645 allowed peptide sequencing. In detail, m/z 355.1324 fragment with a mass loss of 101.0 Da corresponds to Val (C₅H₁₀NO•) moiety after amine bond cleavage of the non-side chain (C1) carboxylic acid moiety of Val and the non-side chain (N2) amino moiety of Leu, while fragment at m/z 227.0314 corresponds to Cys-QH₂ moiety (**Figure 5-C**).

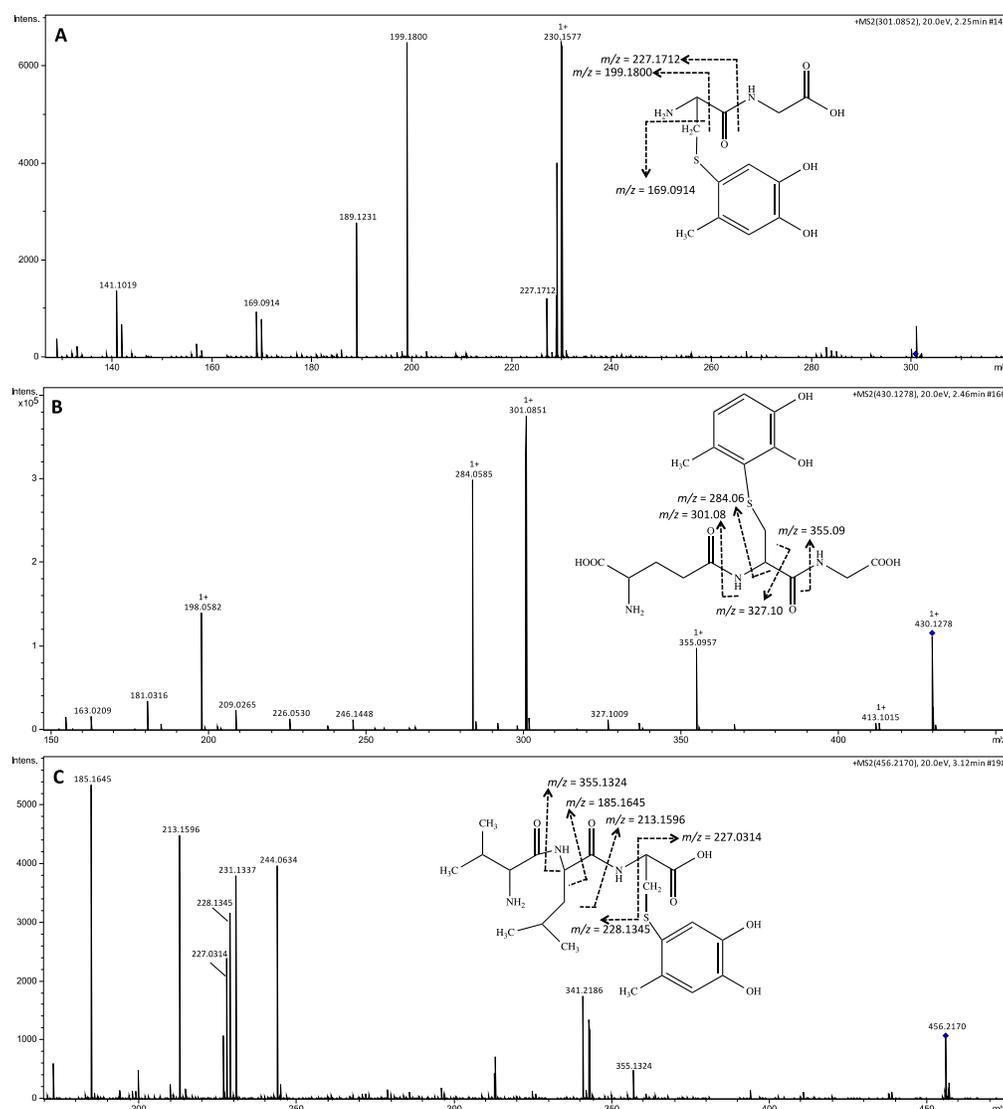


Figure 5: MS² spectra obtained after electrospray ionization of Nu-QH₂ derivatives in white wine samples. Precursors ions of identified nucleophiles (A) Cys-Gly-QH₂, (B) GSH-QH₂ and (C) Val-leu-Cys-QH₂ are indicated with diamonds (◆)

The fragmentation allowed to enhance the probability of annotation of the Gly-Thr-Cys (402.1329 *m/z*) and Gly-Gly-Leu-Cys due to 327.1306 *m/z* and 355.0955 *m/z* fragments detection which correspond to a loss a Gly fragment of the corresponding peptides. By the same mechanism, the presence of Val can be confirmed in Val-Ser-Cys (430.1638 *m/z*) and Val-Leu-Cys (458.1586 *m/z*) by detection fragment corresponding to a loss of Val fragment, respectively 313.1878 and 312.0898 *m/z*. Fragmentation allows to consolidate the annotation confidence in Cys-Glu (373.1063 *m/z*) thanks to 227.1745 *m/z* fragment which is a loss of Glu amino acids.

Moreover, in the annotate compounds it appeared that certain amino acid combination seems to be repeated, as Leu-Cys in Val-Leu-Cys, Leu-Cys-Asp, Gly-Leu-Cys and Gly-Gly-Leu-Cys and Cys-Asp in Leu-Cys-Asp, Val-Cys-Asp, Pro-Cys-Asp which can be due to bigger peptides degradation. These repetitions increase the probability of identification of the peptide. The derivatized compounds at 472.1743 *m/z* have two possible amino acids combination, Leu-Cys-Asp and Val-Cys-Glu. The presence of annotate peptides containing Leu-Cys and Cys-Asp increase the probability that this peptide contain Leu, Cys and Asp³².

The annotation showed an important part of putative peptides in the isolated molecular features. It is known that in fermented food, antioxidant peptides can be form during fermentation³³. These peptides can interact with free radical tanks to their containing amino acids. The most reactive amino acids are sulfur containing amino acids (Cys and Met), the aromatic amino acids (Trp, Tyr and Phe), and the imidazole containing amino acids (His)^{33,34}. In the majority of case, antioxidant peptides contain hydrophobic amino acids in N-terminus chain (Val, Leu and Ile) and Pro, His, Tyr, Trp and Met in their sequence³³. Annotation with Oligonet, allows to determine peptides amino acids combination, with amino acids Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Cys and Met. Theses peptides can contribute to antioxidant mechanism in white wines by quinone trapping and/or free radical scavenging.

Conclusions

In this study, 4-methyl-1,2-benzoquinone (Q) was used as derivatized agent to enhance the detection of thiols by LC-QTOF-MS and determine the nucleophilic pool of white wines. Optimal derivatization parameters were determined using standard in model wines, allowing to fix reaction time at 30 min, pH at 3 (no modification for wines samples) and confirming the adducts stability. This model study shows that at wine pH the most nucleophilic species are thiols, amino compounds will react in very small part at this pH.

Multivariate analysis allows to isolate untargeted nucleophilic compounds in wines sample (92) using PLS-DA and Wilcoxon test. 141 features were isolated, only 20 native compounds were detected without derivatization showing an important increase into nucleophilic compounds detection, especially for sulfur compounds. Annotation by online database and tools (Oligonet, Metlin and KEGG) comparing with elementary formula determined by isotopic profile and MS² analysis allow to determine a big pool of thiols compounds, in particularly peptides. Four compounds were identified by matching with a standard compound, 3 thiols compounds GSH, Cys, HCys and an amino acid Pro. Due to their putative amino acid combinations (Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Cys and Met), isolated nucleophiles peptides can play a role into antioxidant mechanism of white wines by quinones trapping and free radical scavenging.

Associated Content

Supporting information

Author Information

Corresponding author

Telephone: +33 3 80 39 61 95; e-mail: maria.nikolantonaki@u-bourgogne.fr

Acknowledgements

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)”.

References

- (1) Abramovič, H.; Košmerl, T.; Poklar Urih, N.; Cigić, B. Contribution of SO₂ to Antioxidant Potential of White Wine. *Food Chemistry* 2015, 174, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.030>.
- (2) Danilewicz, J. C. The Folin-Ciocalteu, FRAP, and DPPH• Assays for Measuring Polyphenol Concentration in White Wine. *Am J Enol Vitic.* 2015, *ajev.2015.15025*. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15025>.
- (3) Pons, A.; Nikolantonaki, M.; Lavigne, V.; Shinoda, K.; Dubourdieu, D.; Darriet, P. New Insights into Intrinsic and Extrinsic Factors Triggering Premature Aging in White Wines. In *Advances in Wine Research; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 2015; Vol. 1203, pp 229–251*. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1203.ch015>.
- (4) Romanet, R.; Coelho, C.; Liu, Y.; Bahut, F.; Ballester, J.; Nikolantonaki, M.; Gougeon, R. D. The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds: An Optimized DPPH Assay. *Molecules* 2019, 24 (7), 1353. <https://doi.org/10.3390/molecules24071353>.
- (5) Nikolantonaki, M.; Julien, P.; Coelho, C.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Gougeon, R. D. Impact of Glutathione on Wines Oxidative Stability: A Combined Sensory and Metabolomic Study. *Front Chem* 2018, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00182>.
- (6) Jongberg, S.; Gislason, N. E.; Lund, M. N.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A. L. Thiol–Quinone Adduct Formation in Myofibrillar Proteins Detected by LC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59 (13), 6900–6905. <https://doi.org/10.1021/jf200965s>.
- (7) Nikolantonaki, M.; Magiatis, P.; Waterhouse, A. L. Measuring Protection of Aromatic Wine Thiols from Oxidation by Competitive Reactions vs Wine Preservatives with Ortho-Quinones. *Food Chemistry* 2014, 163, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.079>.
- (8) Nikolantonaki, M.; Waterhouse, A. L. A Method To Quantify Quinone Reaction Rates with Wine Relevant Nucleophiles: A Key to the Understanding of Oxidative Loss of Varietal Thiols. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60 (34), 8484–8491. <https://doi.org/10.1021/jf302017j>.
- (9) Fujimoto, A.; Masuda, T. Chemical Interaction between Polyphenols and a Cysteinyll Thiol under Radical Oxidation Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60 (20), 5142–5151. <https://doi.org/10.1021/jf3008822>.
- (10) Fujimoto, A.; Masuda, T. Antioxidation Mechanism of Rosmarinic Acid, Identification of an Unstable Quinone Derivative by the Addition of Odourless Thiol. *Food Chemistry* 2012, 132 (2), 901–906. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.062>.
- (11) Huang, Y.-Q.; Ruan, G.-D.; Liu, J.-Q.; Gao, Q.; Feng, Y.-Q. Use of Isotope Differential Derivatization for Simultaneous Determination of Thiols and Oxidized Thiols by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 2011, 416 (2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.020>.
- (12) Qi, B.-L.; Liu, P.; Wang, Q.-Y.; Cai, W.-J.; Yuan, B.-F.; Feng, Y.-Q. Derivatization for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2014, 59, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.013>.
- (13) Yang, W.-C.; Mirzaei, H.; Liu, X.; Regnier, F. E. Enhancement of Amino Acid Detection and Quantification by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2006, 78 (13), 4702–4708. <https://doi.org/10.1021/ac0600510>.
- (14) He, Y.; Harir, M.; Chen, G.; Gougeon, R. D.; Zhang, L.; Huang, X.; Schmitt-Kopplin, P. Capillary Electrokinetic Fractionation Mass Spectrometry (CEkF/MS): Technology

Setup and Application to Metabolite Fractionation from Complex Samples Coupled at-Line with Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry. *ELECTROPHORESIS* 2014, 35 (14), 1965–1975. <https://doi.org/10.1002/elps.201400041>.

(15) Gao, S.; Zhang, Z.-P.; Karnes, H. T. Sensitivity Enhancement in Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry Using Derivatization and Mobile Phase Additives. *Journal of Chromatography B* 2005, 825 (2), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.021>.

(16) Guo, X.-F.; Wang, H.; Guo, Y.-H.; Zhang, Z.-X.; Zhang, H.-S. Simultaneous Analysis of Plasma Thiols by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Using a New Probe, 1,3,5,7-Tetramethyl-8-Phenyl-(4-Iodoacetamido)Difluoroboradiaza-s-Indacene. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216 (18), 3874–3880. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.083>.

(17) Inoue, K.; Nishimura, M.; Tsutsui, H.; Min, J. Z.; Todoroki, K.; Kauffmann, J.-M.; Toyo'oka, T. Foodomics Platform for the Assay of Thiols in Wines with Fluorescence Derivatization and Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Using Multivariate Statistical Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61 (6), 1228–1234. <https://doi.org/10.1021/jf304822t>.

(18) Kuśmierk, K.; Bald, E. Reversed-Phase Liquid Chromatography Method for the Determination of Total Plasma Thiols after Derivatization with 1-Benzyl-2-Chloropyridinium Bromide. *Biomedical Chromatography* 2009, 23 (7), 770–775. <https://doi.org/10.1002/bmc.1183>.

(19) Seiwert, B.; Karst, U. Simultaneous LC/MS/MS Determination of Thiols and Disulfides in Urine Samples Based on Differential Labeling with Ferrocene-Based Maleimides. *Anal. Chem.* 2007, 79 (18), 7131–7138. <https://doi.org/10.1021/ac071016b>.

(20) Dayon, L.; Roussel, C.; Girault, H. H. Probing Cysteine Reactivity in Proteins by Mass Spectrometric EC-Tagging. *J. Proteome Res.* 2006, 5 (4), 793–800. <https://doi.org/10.1021/pr050365o>.

(21) Friedman, M. Food Browning and Its Prevention: An Overview. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44 (3), 631–653. <https://doi.org/10.1021/jf950394r>.

(22) Friedman, M. Chemistry, Biochemistry, Nutrition, and Microbiology of Lysinoalanine, Lanthionine, and Histidinoalanine in Food and Other Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47 (4), 1295–1319. <https://doi.org/10.1021/jf981000+>.

(23) Danilewicz, J. C. Mechanism of Autoxidation of Polyphenols and Participation of Sulfite in Wine: Key Role of Iron. *AJEV* 2011, [ajev.2011.10105](https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10105). <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10105>.

(24) Danilewicz, J. C.; Secombe, J. T.; Whelan, J. Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfur Dioxide in Model Wine and Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 2008, 59 (2), 128–136.

(25) Jiménez-Atiénzar, M.; Cabanes, J.; Gandía-Herrero, F.; García-Carmona, F. Kinetic Analysis of Catechin Oxidation by Polyphenol Oxidase at Neutral PH. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 319 (3), 902–910. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.077>.

(26) Sarakbi, A.; Kauffmann, J.-M. A New Chemical Criteria for White Wine: The Glutathione Equivalent Capacity. *Food Chemistry* 2014, 153, 321–326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.090>.

(27) Liu, Y.; Forcisi, S.; Lucio, M.; Harir, M.; Bahut, F.; Deleris-Bou, M.; Krieger-Weber, S.; Gougeon, R. D.; Alexandre, H.; Schmitt-Kopplin, P. Digging into the Low Molecular Weight Peptidome with the OligoNet Web Server. *Scientific Reports* 2017, 7 (1), 11692. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11786-w>.

- (28) Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 2014, 48 (4), 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
- (29) Sumner, L. W.; Lei, Z.; Nikolau, B. J.; Saito, K.; Roessner, U.; Trengove, R. Proposed Quantitative and Alphanumeric Metabolite Identification Metrics. *Metabolomics* 2014, 10 (6), 1047–1049. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0739-6>.
- (30) Nikolantonaki, M.; Jourdes, M.; Shinoda, K.; Teissedre, P.-L.; Quideau, S.; Darriet, P. Identification of Adducts between an Odoriferous Volatile Thiol and Oxidized Grape Phenolic Compounds: Kinetic Study of Adduct Formation under Chemical and Enzymatic Oxidation Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60 (10), 2647–2656. <https://doi.org/10.1021/jf204295s>.
- (31) Wysocki, V. H.; Tsaprailis, G.; Smith, L. L.; Breci, L. A. Mobile and Localized Protons: A Framework for Understanding Peptide Dissociation. *Journal of Mass Spectrometry* 2000, 35 (12), 1399–1406. [https://doi.org/10.1002/1096-9888\(200012\)35:12<1399::AID-JMS86>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1096-9888(200012)35:12<1399::AID-JMS86>3.0.CO;2-R).
- (32) Dunn, W. B.; Erban, A.; Weber, R. J. M.; Creek, D. J.; Brown, M.; Breitling, R.; Hankemeier, T.; Goodacre, R.; Neumann, S.; Kopka, J.; *et al.* Mass Appeal: Metabolite Identification in Mass Spectrometry-Focused Untargeted Metabolomics. *Metabolomics* 2013, 9 (1), 44–66. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>.
- (33) Samaranayaka, A. G. P.; Li-Chan, E. C. Y. Food-Derived Peptidic Antioxidants: A Review of Their Production, Assessment, and Potential Applications. *Journal of Functional Foods* 2011, 3 (4), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>.
- (34) Elias, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2008, 48 (5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>.

Supplementary materials

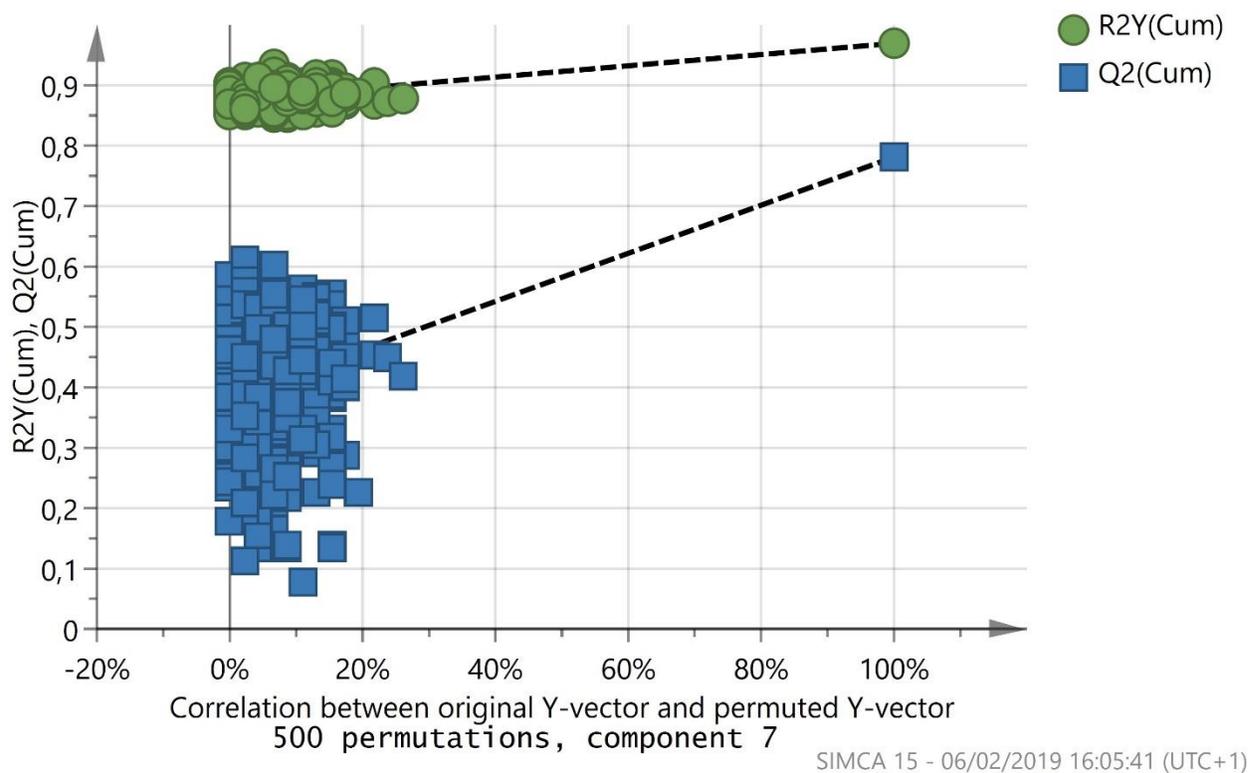
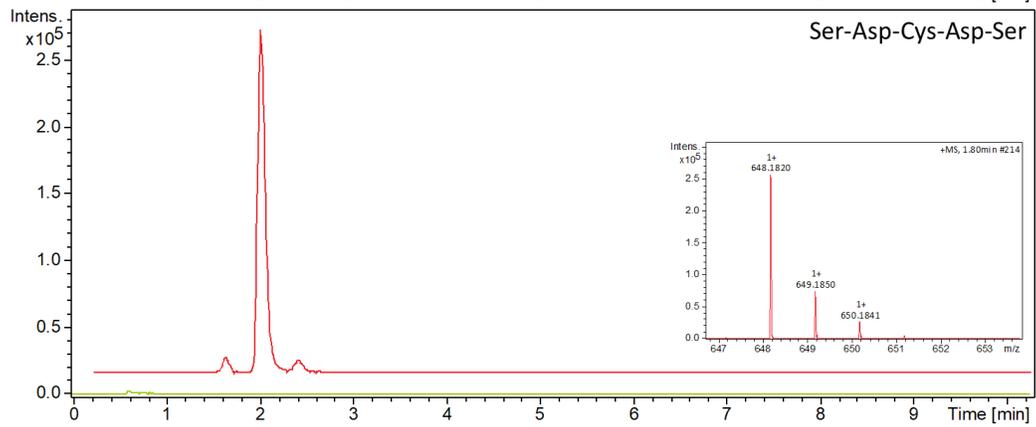
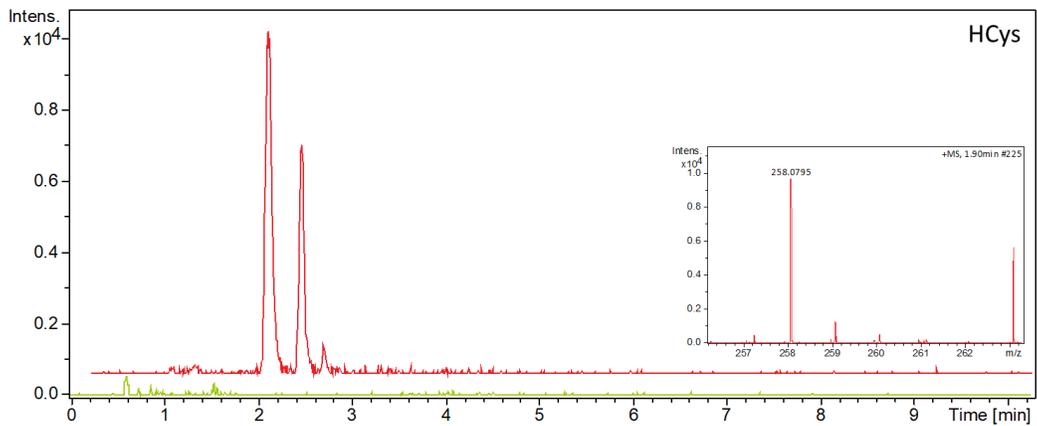
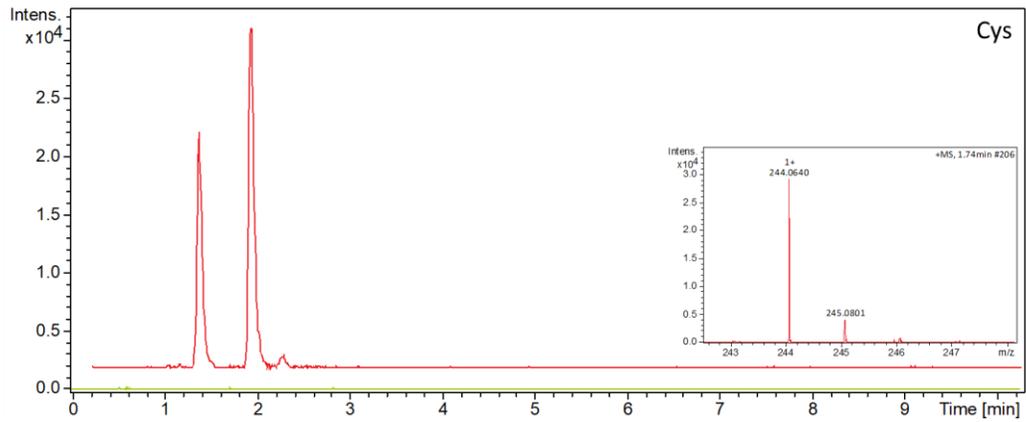
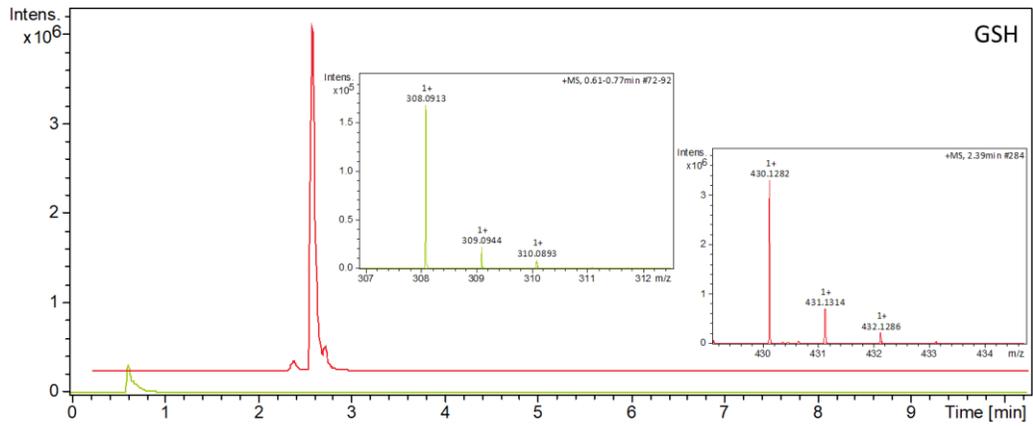


Figure S1: Validation of the PLS-DA model by permutations of derivatized wines showing Q_2 and R_2 calculated for each created model.



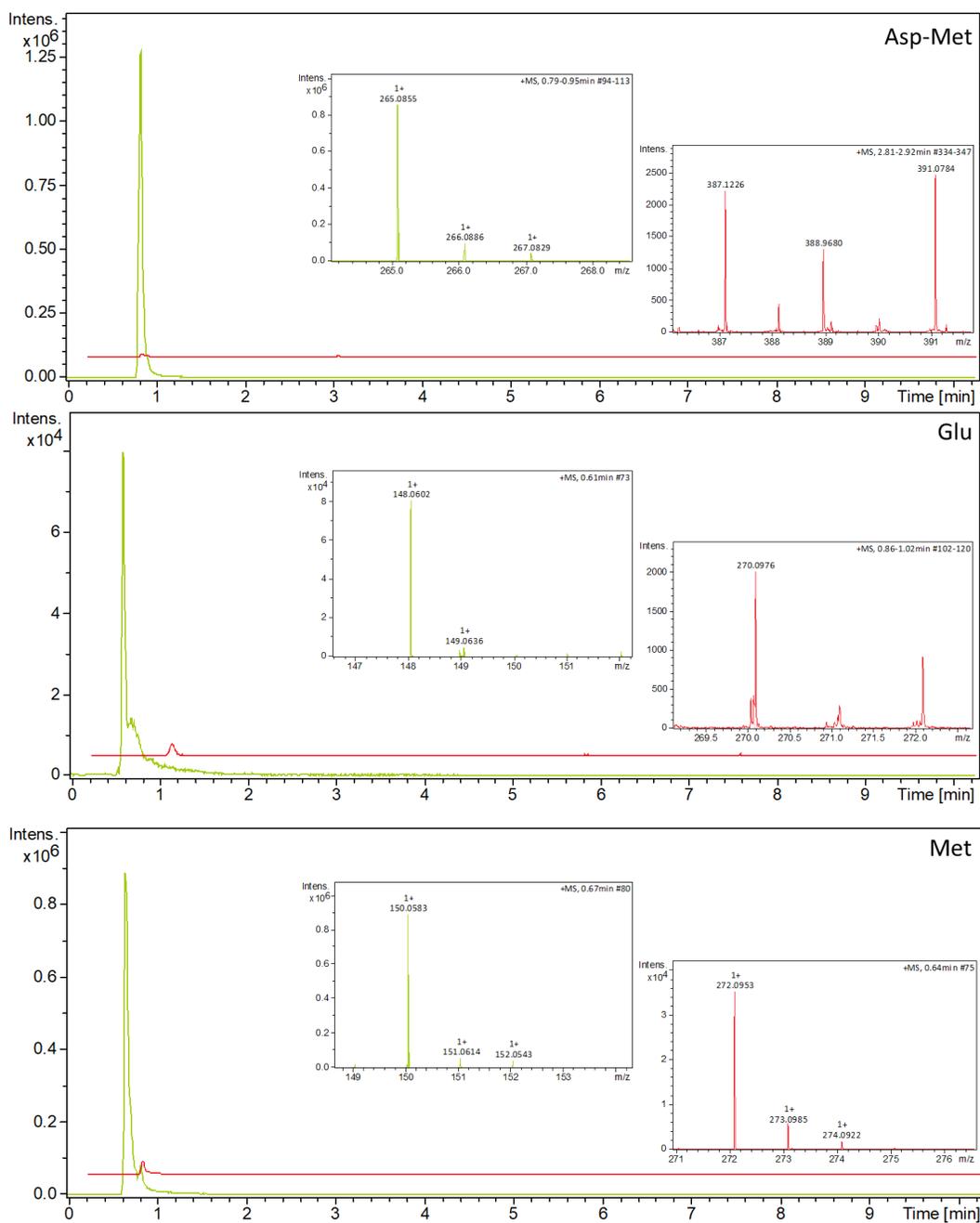


Figure S2: Visualization of the extracted ion chromatograms and mass spectra obtained for test compounds before (green line) et after derivatization (red line) using Q.

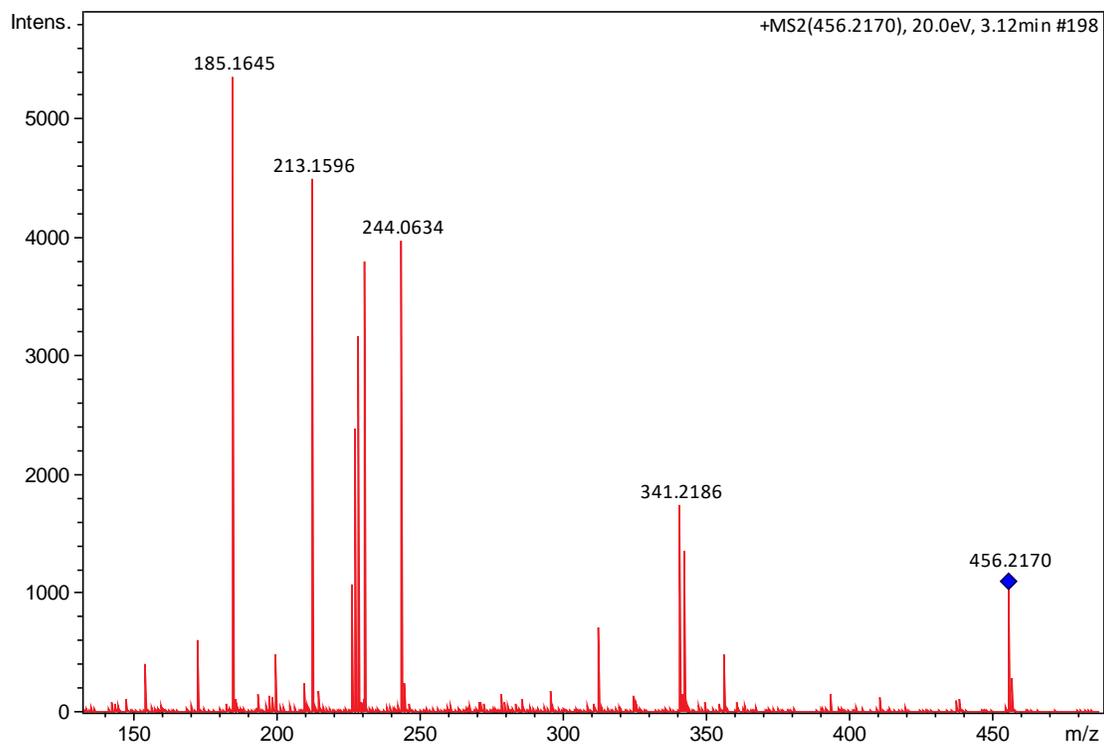


Figure S3 : Mass spectra obtained by fragmentation of unknown adduct $C_{14}H_{27}N_3O_4S + Q$ (456.2156 m/z) at 20 eV. The blue square indicates the molecular ion.

Table S1 : Overview of global wine sample set

<i>Sample</i>	<i>Winery</i>	<i>Grape variety</i>	<i>Vintage</i>	<i>Aging^a</i>
1	CN	Chardonnay	2017	After AF
2	CN	Chardonnay	2017	After AF
3	CN	Chardonnay	2017	After AF
4	CN	Chardonnay	2017	After AF
5	Lf	Chardonnay	2017	After AF
6	Lf	Chardonnay	2017	After AF
7	Lf	Chardonnay	2017	After AF
8	Lf	Chardonnay	2017	After AF
9	Lf	Chardonnay	2017	After AF
10	Lf	Chardonnay	2017	After AF
11	Lf	Chardonnay	2017	After AF
12	Lf	Chardonnay	2017	After AF
13	Lf	Chardonnay	2017	After AF
14	Lf	Chardonnay	2017	After AF
15	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
16	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
17	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
18	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
19	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
20	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
21	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
22	P	Chardonnay	2016	1 years in barrel
23	P	Chardonnay	2017	After AF
24	P	Chardonnay	2017	After AF
25	P	Chardonnay	2017	After AF
26	P	Chardonnay	2017	After AF
27	P	Chardonnay	2017	After AF
28	P	Chardonnay	2017	After AF
29	P	Chardonnay	2017	After AF
30	Lf	Chardonnay	2016	1 years in barrel
31	Lf	Chardonnay	2016	1 years in barrel
32	Lf	Chardonnay	2016	1 years in barrel
33	Lf	Chardonnay	2016	1 years in barrel
34	Lf	Chardonnay	2016	1 years in barrel
35	Lf	Chardonnay	2016	1 years in barrel
36	B	Chardonnay	2017	After AF
37	B	Chardonnay	2017	After AF
38	B	Chardonnay	2017	After AF
39	B	Chardonnay	2017	After AF
40	B	Chardonnay	2017	After AF
41	B	Chardonnay	2017	After AF
42	B	Chardonnay	2017	After AF
43	B	Chardonnay	2017	After AF
44	B	Chardonnay	2017	After AF
45	B	Chardonnay	2017	After AF

46	B	Chardonnay	2017	After AF
47	B	Chardonnay	2017	After AF
48	Lf	Chardonnay	2016	After AF
49	P	Chardonnay	2016	After AF
50	Lf	Chardonnay	2017	After AF
51	Lf	Chardonnay	2017	After AF
52	Lf	Chardonnay	2017	After AF
53	Lf	Chardonnay	2017	After AF
54	Lf	Chardonnay	2017	After AF
55	Lf	Chardonnay	2017	After AF
56	Lf	Chardonnay	2017	After AF
57	P	Chardonnay	2017	After AF
58	P	Chardonnay	2017	After AF
59	P	Chardonnay	2017	After AF
60	P	Chardonnay	2017	After AF
61	P	Chardonnay	2017	After AF
62	P	Chardonnay	2017	After AF
63	Ltm	Sémillon	2017	After AF
64	Ltm	Sémillon	2017	After AF
65	Ltm	Sémillon	2017	After AF
66	Ltm	Sémillon	2017	After AF
67	Y	Sauvignon	2017	After AF
68	Y	Sauvignon	2017	After AF
69	Y	Sauvignon	2017	After AF
70	Y	Sauvignon	2017	After AF
71	Y	Sauvignon	2017	After AF
72	Y	Sauvignon	2017	After AF
73	Y	Sauvignon	2017	After AF
74	Y	Sauvignon	2017	After AF
75	Shl	Sauvignon	2017	After AF
76	Shl	Sauvignon	2017	After AF
77	Shl	Sauvignon	2017	After AF
78	Shl	Sauvignon	2017	After AF
79	Shl	Sauvignon	2017	After AF
80	Shl	Sauvignon	2017	After AF
81	Shl	Sauvignon	2017	After AF
82	Shl	Sauvignon	2017	After AF
83	Shl	Sauvignon	2017	After AF
84	Shl	Sauvignon	2017	After AF
85	L	Sémillon	2017	After AF
86	L	Sémillon	2017	After AF
87	M	Sauvignon	2017	After AF
88	M	Sauvignon	2017	After AF
89	M	Sauvignon	2017	After AF
90	M	Sauvignon	2017	After AF
91	M	Sauvignon	2017	After AF
92	M	Sauvignon	2017	After AF

^a After AF: analysis just after alcoholic fermentation

2. Isolation de composés nucléophiles du vin blanc

A l'aide de cette méthode de détermination des composés nucléophiles du vin et grâce à l'analyse de 287 vins en cours d'élevage (Annexe 1), il a été possible de fournir une liste de composés nucléophiles connus et inconnus permettant de mieux caractériser le métabolome antioxydant des vins.

Ainsi, 318 composés nucléophiles ont été isolés et regroupés à partir des différents jeux de données LC-MS et LC-MS-MS (Annexe 3). A l'aide d'Oligonet¹²⁴, KEGG et Metlin il a été possible d'annoter 138 composés nucléophiles, parmi lesquels 50 peptides et acides aminés, dont 22 ont été annotés avec précision dans le paragraphe précédent (Chapitre 3-1). Outre ces peptides, 88 composés susceptibles à réagir avec la *o*-quinone ont été annotés, on trouve des composés soufrés, dont probablement la pantetheine (278,1293 Da), l'homocystéine (135,0348 Da) ou l'acétyl-cystéine (163,0295 Da), et des composés azotés telle que la sulfono-alanine (153,0090 Da), la cylcohexylamine (99,1041 Da), le benzamide (121,0519 Da) ou encore le pyrazinamide (124,0431 Da). Des composés phénoliques peuvent également s'ajouter sur la *o*-quinone¹⁴⁸, on retrouve ainsi un composé de masse 169,0492 Da pouvant correspondre à l'acide vanillique, homogentisique ou un autre isomère de formule C₈H₈O₄, mais également un composé (577,1332 Da) pouvant correspondre à la proanthocyanidine A2.

3. Comparaison aux marqueurs moléculaires corrélés à la capacité antioxydante

On peut alors se demander si certains composés nucléophiles (Annexe 3) sont présents dans la liste de marqueurs moléculaires corrélés à la capacité antioxydante (Annexe 2). La comparaison de ces deux listes permet de déterminer 19 composés similaires, dont la différence maximale est de 4 ppm entre les deux composés (Tableau 8). Parmi ces composés, 11 ont été annotés dont 4 par FT-ICR-MS. On retrouve ainsi, l'acide gallique (170,0215 Da), la dopamine sulfate (233,0358 Da) et un peptide (277,1095 Da). On retrouve également Tyr-OEt (209,1051 Da) et Phe (165,0789 Da) qui sont issus du métabolisme levurien⁴⁵.

Tableau 8 : Présentation des composés communs entre la liste de composés nucléophiles et la liste de marqueurs moléculaires corrélés à la capacité antioxydante. Pour chaque composé, sont donnés la masse neutre calculé à partir de l'ion détecté ($[M+H+Q]^+$, $[M-H]^-$ ou $[M+H]^+$) le temps de rétention en minutes, l'erreur en ppm sur les masses neutres M , et une annotation possible. Les composés en gras correspondent aux composés qui ont également été détectés par FT-ICR-MS.

Composés nucléophiles		Marqueurs moléculaires		Erreur (ppm)	Composé possible
Masse Neutre M (Da)	TR (min)	Masse Neutre M (Da)	TR (min)		
128,0109	1,5	128,0109	0,7	0,0	
128,0471	3,8	128,0472	4,1	0,7	Acide hydroxy-hexynoïque
165,0790	4,9	165,0789	1,1	0,5	Phénylalanine
170,0215	2,4	170,0215	0,9	0,1	Acide Gallique
184,0368	3,9	184,0366	1,6	0,8	Méthyle-gallate ou acide Dihydroxy-mandélique
198,0522	3,8	198,0526	3,0	2,0	
209,1050	1,8	209,1051	2,0	0,5	Tyr-OEt
215,0247	2,9	215,0251	1,3	1,7	
233,0354	2,9	233,0358	1,3	1,6	Dopamine sulfate
258,0131	3,8	258,0142	1,4	4,0	2-Dehydro-3-deoxy-D-galactonate 6-phosphate
260,1191	3,2	260,1194	3,0	1,3	
262,1347	3,6	262,1352	1,6	1,8	Leu-Met
277,1088	2,8	277,1095	0,9	2,3	Gly-Val-Cys; Gly-Ala-Met; Gln-Met
312,0482	1,3	312,0482	1,4	0,2	
513,1403	3,3	513,1412	2,7	1,7	
588,2931	3,4	588,2939	2,5	1,4	Peptide ; D-Urobilin
615,0999	2,3	615,1007	1,0	1,3	
645,1464	2,7	645,1475	2,4	1,7	
725,2664	2,5	725,2651	2,4	1,8	Peptide

**Partie 2 : Etude de l'impact de différentes
pratiques œnologiques sur la stabilité
oxydative des vins blancs**

Après cette première partie, où un grand nombre de vins en cours d'élevage a été analysé afin de déterminer les marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante, mais également les composés nucléophiles présents, nous allons maintenant restreindre le nombre de vins étudiés afin d'analyser l'impact de différentes pratiques œnologiques sur la capacité antioxydante des vins et sur les deux listes de composés marqueurs isolés précédemment. Dans cette partie, uniquement les résultats de capacité antioxydante déterminés par l'analyse DPPH seront discutés, car tous les vins n'ont pas été analysés par RPE, pour des raisons techniques. Le but de restreindre le nombre d'échantillons est également de valider les différentes listes de marqueurs en montrant leurs applications pour discriminer différents vins, permettant alors de valider la méthodologie mise en place depuis le début de cette étude. Ainsi, dans cette partie nous nous intéresserons tout d'abord à l'impact de l'élevage mais également du millésime sur la capacité antioxydante et les marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante, avec des vins issus de plusieurs appellations de Bourgogne. Puis dans un second temps, nous restreindrons encore l'échantillonnage, en nous intéressant plus particulièrement à l'impact de l'hyperoxygénation et du sulfitage du moût, sur les propriétés antioxydantes et les marqueurs moléculaires associés, des vins qui en sont issus.

Chapitre 4 : Effet de l'élevage

Pour l'étude de l'impact de l'élevage, nous avons choisi de nous concentrer sur des vins issus de différentes appellations de Bourgogne, pour deux millésimes (2016 et 2017), et sans tenir compte de leurs historiques pré-fermentaires (Annexe 1). Ces vins proviennent de 14 appellations de Bourgogne, et sont issus de deux domaines. Les vins de chaque appellation, allant du Bourgogne générique au Grand Cru, ont été analysés après un an d'élevage pour le millésime 2016, et fin FA, après 4 mois et un an d'élevage pour le millésime 2017, afin d'avoir comme unique différence le millésime et la durée d'élevage. Un fût de chaque vin a été suivi au cours de l'élevage, le but n'étant pas ici de comparer les différentes appellations, mais d'avoir des vins différents et représentatifs de la diversité des vins blancs de Bourgogne. Le choix des fûts a été réalisé afin de limiter l'impact direct du bois en ne prenant que des fûts de plusieurs vins (2 à 3). Grâce à cet échantillonnage, il est possible de suivre l'évolution du vin au cours de l'élevage pour le millésime 2017, mais également de comparer l'effet du millésime après un an d'élevage sur la capacité antioxydante et les marqueurs moléculaires isolés.

1. Impact de l'élevage sur la capacité antioxydante des vins blancs

Le premier paramètre qui a été étudié est l'élevage et son impact sur la capacité antioxydante. La Figure 29 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** présente l'évolution du paramètre Ec_{20} moyen calculé à partir des différents vins (14) en fonction de la durée d'élevage. Comme nous avons pu le constater précédemment, nous observons un effet positif de l'élevage sur la capacité antioxydante, avec une diminution significative du paramètre Ec_{20} . Cet effet peut être dû à l'apport de composés antioxydants du bois mais également à l'autolyse de levures présentes dans les lies qui peuvent relarguer, des peptides, des mannoprotéines et des composés phénoliques adsorbés à leurs surfaces ^{56,57,63,68,77-79}.

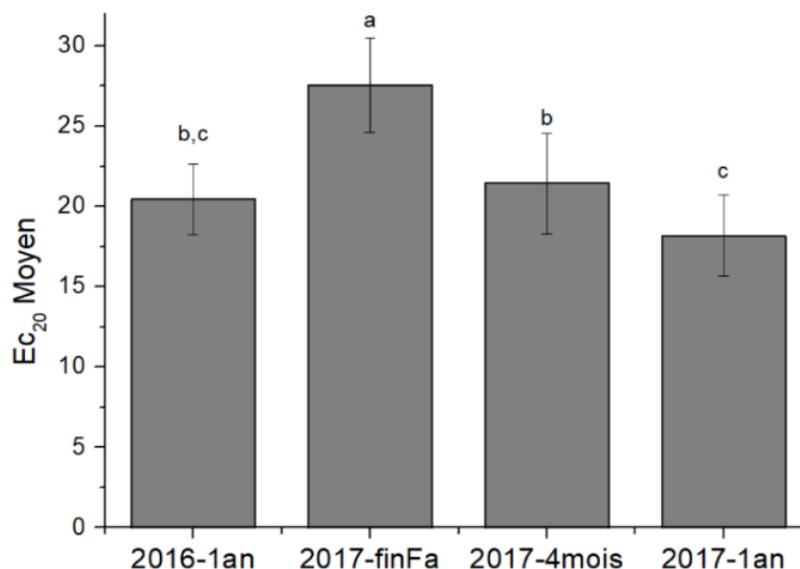


Figure 29 : Evolution du paramètre Ec_{20} moyen, sur les 14 vins issus d'appellations de Bourgogne, à différents stades d'élevage. Les lettres montrent les groupes significatifs déterminés par ANOVA suivi du test de Tukey (HSD) pour les différentes durées d'élevage (p -Value < 0,05).

La Figure 30 présente les cinétiques d'évolution de la capacité antioxydante, obtenues par DPPH pour certains vins du millésime 2017. On peut grâce à ce graphique, constater que différents vins d'un même domaine, ou des vins de même niveau d'appellation, peuvent évoluer de manière différente au cours d'une année d'élevage, montrant ainsi la diversité des situations qu'il est possible de rencontrer pour un même cépage dans une même zone d'appellation. On note ici, qu'au cours de la période d'élevage, la différence de capacité antioxydante entre le Bourgogne foudre et les 3 autres vins a diminuée. Cette différence étant de 6,42 Ec_{20} fin FA et de 2,98 Ec_{20} après un an d'élevage entre le Bourgogne foudre et la Meursault 1^{er} Cru. En revanche, le classement des vins en fonction de leur capacité antioxydante n'a pas évolué. On peut toutefois noter des différences quant aux vitesses d'évolutions de la capacité antioxydante. Ainsi, sur les 4 premiers mois d'élevage, le Bourgogne foudre à la vitesse d'évolution la plus élevée (en valeur absolue) avec -2,2 Ec_{20} /mois, tandis que le Meursault 1^{er} Cru a une vitesse d'évolution de -0,5 Ec_{20} /mois, le Puligny combettes et le Montrachet ayant une vitesse d'évolution similaire, -1,5 et -1,3 Ec_{20} /mois respectivement. En revanche, la vitesse d'évolution de la capacité antioxydante au cours des mois qui suivent, montre une évolution plus rapide pour le Meursault 1^{er} Cru (-1,2 Ec_{20} /mois) alors que les autres vins ont une évolution similaire (-0,7 Ec_{20} /mois). Il est donc intéressant de noter que malgré un effet global de l'élevage sur la capacité antioxydante, qui est similaire sur tous les vins étudiés avec une augmentation de la capacité antioxydante, il existe des vitesses d'évolutions différentes entre ces mêmes vins marquant ainsi la diversité des vins utilisés.

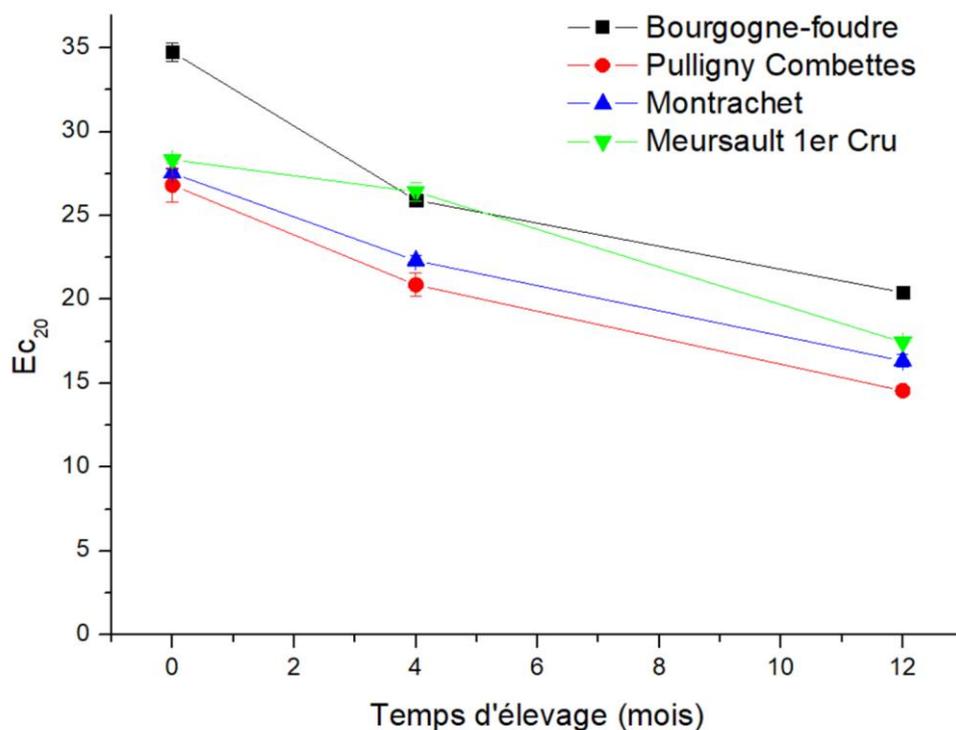


Figure 30 : Cinétique d'évolution de la capacité antioxydante obtenue par DPPH pour plusieurs vins de millésime 2017 au cours de l'élevage.

La comparaison de la capacité antioxydante des vins après un an d'élevage n'est pas significativement différente pour les deux millésimes étudiés (Figure 29).

2. Evolution des marqueurs moléculaires impliqués dans la stabilité oxydative des vins

A partir de la liste de marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante déterminés par DPPH et RPE (Annexe 2), la Figure 31 présente le nombre de marqueurs présents aux différents stades d'élevage. Sur les 380 marqueurs isolés, en moyenne 223 ± 16 composés sont présents pour le millésime 2017 fin FA, 243 ± 15 après 4 mois d'élevage et 273 ± 13 après un an. Nous observons donc une augmentation significative du nombre de composés marqueurs au cours l'élevage (ANOVA, test de Tukey $p < 0,05$). De plus, il existe également une différence significative du nombre de composés entre les millésimes 2016 et 2017 après un an d'élevage, 224 ± 11 composés en 2016 contre 273 ± 13 en 2017, montrant ainsi un effet du millésime sur le nombre de marqueurs moléculaires associés à la capacité antioxydante. Si l'on s'intéresse avec plus de détails aux marqueurs présents, en prenant en compte la répartition de ces marqueurs dans les différents groupes déterminés au Chapitre 2, on constate qu'il n'y a pas de différences significatives sur le nombre composés du groupe 1 (couples m/z -TR globalement

marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH) au cours de l'élevage pour le millésime 2017. En revanche, après un an d'élevage, il existe une différence significative entre les deux millésimes. Concernant les composés du groupe 2, qui sont globalement corrélés négativement à la capacité antioxydante du vin, nous observons une diminution significative de leur nombre au cours de l'élevage pour le millésime 2017, passant de 90 ± 7 fin FA à 57 ± 8 après un an d'élevage. Avec en moyenne 28 ± 4 marqueurs du groupe 2, le millésime 2016 après un an d'élevage est significativement différent du millésime 2017 après le même temps d'élevage. Enfin, le nombre de composés du groupe 3 (couples marqueurs d'une capacité antioxydante forte par analyse DPPH et RPE) augmente significativement, passant de 93 ± 10 à 174 ± 4 au cours de l'élevage. De plus, on constate un nombre similaire de composés après un an d'élevage pour le millésime 2016, 172 ± 6 .

Ces résultats originaux montrent donc un effet important de l'élevage à la fois sur le nombre total de composés marqueurs de capacité antioxydante aux différents stades d'élevage, et entre millésimes, mais également sur leur répartition dans les différents groupes (1, 2, 3). Il semble en effet que pour le millésime 2017, l'augmentation de la capacité antioxydante au cours de l'élevage soit due à un équilibre entre la consommation de composés possiblement impliqués dans des réactions d'oxydoréduction, et la production de nouveaux composés antioxydants. On peut alors se demander quels sont ces composés qui apparaissent ou disparaissent au cours de l'élevage ? Malgré un nombre similaire de composés du groupe 3 après un an d'élevage pour les millésimes 2016 et 2017, retrouve-t-on les mêmes composés ou sont-ils impactés par le millésime ?

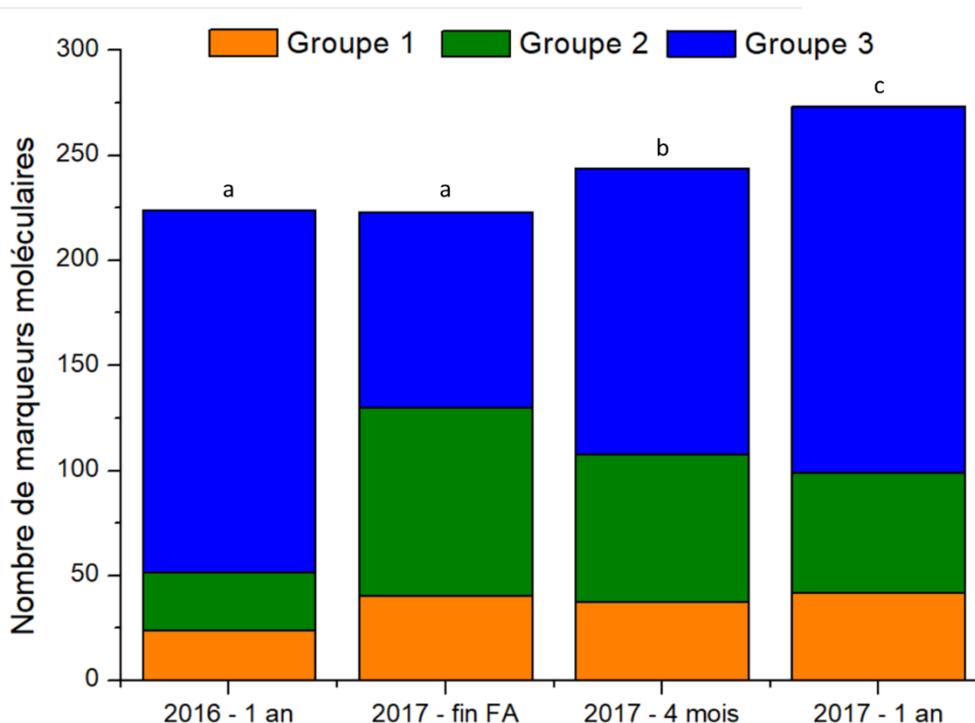


Figure 31 : Nombre de marqueurs moléculaires isolés à différents temps d'élevage pour des vins issus de différentes appellations de Bourgogne (14). Les groupes 1, 2 et 3 représentent les groupes déterminés au chapitre 2 : le groupe 1 correspond aux couples m/z-TR globalement marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH mais faible par RPE, le groupe 2 aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante faible avec les variables Ec_{20} , Max et T_{Max} mais élevée via 1^{ère} Pente et le groupe 3 correspond aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante forte par analyse DPPH et RPE. Les lettres montrent un nombre total de marqueurs significativement différent entre les différentes durées d'élevage, déterminé par ANOVA suivi du test de Tukey (HSD) (p -Value < 0,05).

Pour répondre à ces questions, l'évolution de chaque marqueur moléculaire a été étudiée dans les vins au cours de l'élevage. Du fait de la présence de plusieurs jeux de données LC-QToF-MS, l'intensité des composés n'a pas été utilisée mais uniquement leurs présences ou leurs absences des échantillons. Cela peut donc mener à une perte d'informations, mais permet de ne pas biaiser les résultats par un « effet batch ». La Figure 32 représente l'analyse non supervisée réalisée à partir des résultats LC-QToF-MS en mode positif. Les résultats du mode négatif ne seront pas discutés ici car très peu de composés marqueurs ont été détectés en mode d'ionisation négative. Premièrement, on constate que grâce à cette liste de marqueurs moléculaires, les vins sont discriminés en fonction de leur durée d'élevage. Les vins fin FA et après 4 mois d'élevage étant les plus proches, les vins après un an d'élevage étant également regroupés. Grâce à cette représentation, il est possible de visualiser pour chaque marqueur moléculaire dans quel vin il est présent. Ainsi, on constate que les vins après un an d'élevage sont globalement constitués des mêmes composés issus du groupe 3 (bleu) indépendamment du millésime étudié, et que malgré un nombre différent de composés du groupe 2, un certain

nombre sont communs aux deux millésimes. De plus, on note la présence de plusieurs sous-groupes de marqueurs moléculaires indépendants du millésime, qui ont été notés A et B pour les composés apparaissant au cours de l'élevage et C pour ceux disparaissant (Figure 32). Les composés de ces sous-groupes peuvent donc être intéressants pour l'étude de la capacité antioxydante des vins blancs, car leur présence est indépendante du millésime et de la matrice vin.

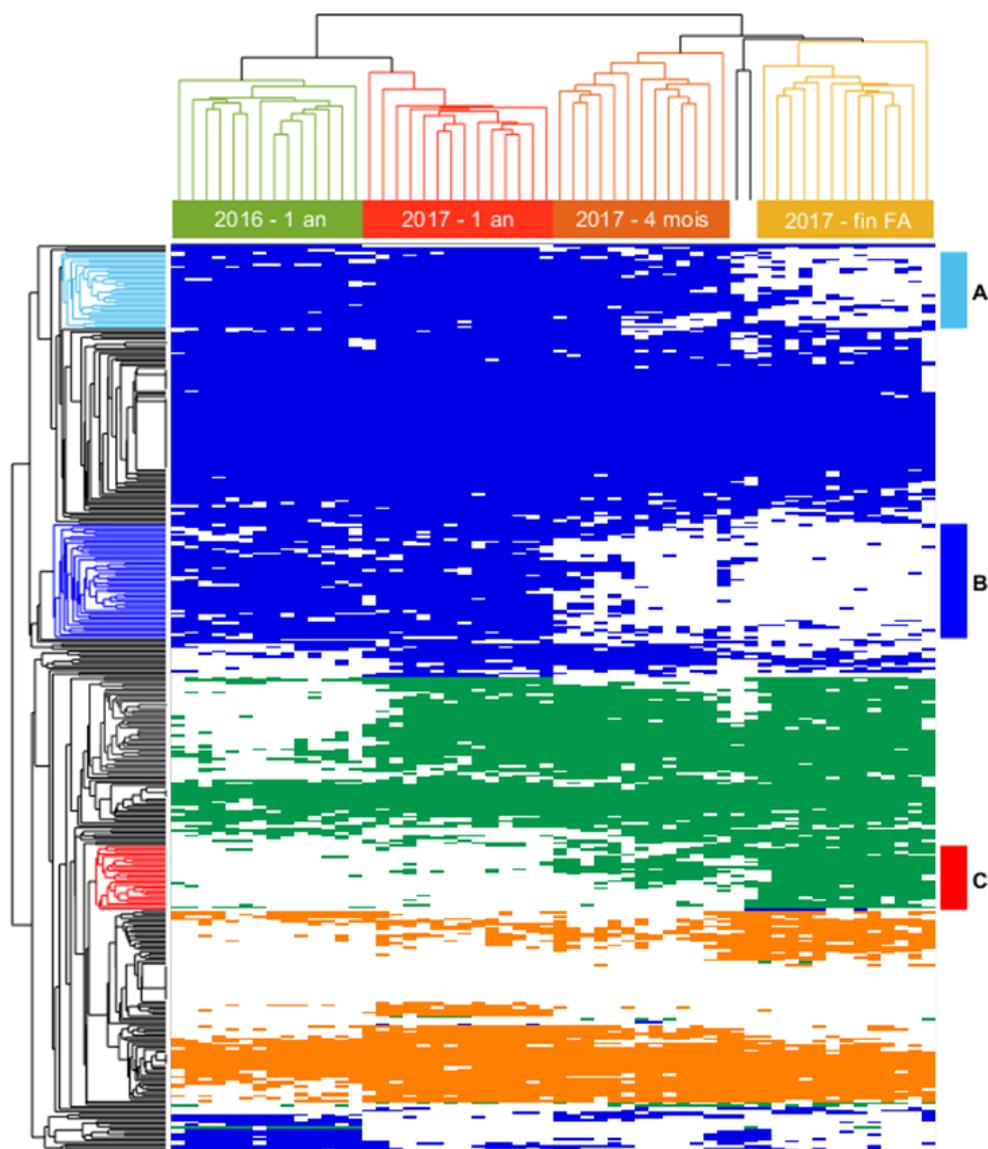


Figure 32 : Discrimination des vins au cours de l'élevage à l'aide des marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante isolés précédemment (380) : en orange les composés du groupe 1, en vert les composés du groupe 2 et en bleu les composés du groupe 3. Le groupe 1 correspond aux couples m/z -TR globalement marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH mais faible par RPE, le groupe 2 au couples marqueurs d'une capacité antioxydante faible avec les variables E_{c20} , Max et T_{Max} mais élevée via 1^{ère} Pente et le groupe 3 correspond aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante forte par analyse DPPH et RPE. Pour réaliser cette heatmap, les composés isolés ont été filtrés par présence ou absence dans l'échantillon. Résultats obtenus à partir des analyses LC-QToF-MS en mode positif.

Les composés des sous-groupes A et B sont des composés qui vont apparaître au cours de l'élevage. Ils sont constitués de composés du groupe 3, qui sont donc des marqueurs corrélés positivement à la capacité antioxydante des vins (d'autant plus présents que la valeur de EC₂₀ est faible). On constate que ces marqueurs sont indépendants du millésime, car présents à la fois dans les millésimes 2016 et 2017 en fin d'élevage. Les composés du groupe C, sont quant à eux majoritairement constitués de composés du groupe 2, globalement corrélés négativement à la capacité antioxydante, et vont être consommés au cours de l'élevage.

Afin d'obtenir plus d'informations quant aux caractéristiques de ces sous-groupes, les marqueurs moléculaires ont été annotés à l'aide d'Oligonet¹²⁴. Ainsi, pour le groupe A qui est constitué de 32 composés, 20 ont été annotés à l'aide des bases de données comprenant potentiellement 5 peptides et 15 autres composés. Le groupe B est formé de 48 composés, dont probablement 8 peptides et 26 autres composés, alors que le groupe C (27 composés) semble composé majoritairement de peptides (15 probables) et 3 autres composés annotés. Toutes ces annotations sont regroupées dans l'Annexe 2. Parmi les composés annotés, on note une majorité de composés autres que des peptides pour le groupe A et B, alors que le groupe C en est majoritairement constitué. Il y aurait alors une consommation de peptides au cours de l'élevage ainsi qu'un relargage de composés, via le bois et/ou les lies. On retrouve par exemple dans le groupe A des composés de nature phénolique, pouvant être de l'hydroxy-coumarine (162,0361 Da) ou le pyrogallol (126,0310 Da), tous deux étant des dérivés de composés du bois⁷⁷. Malheureusement, peu de composés ont été annotés avec précision, ne permettant pas une explication en détails de l'évolution moléculaire des vins blancs au cours de l'élevage. D'autres part, l'utilisation du critère absence/présence des marqueurs moléculaires dans les vins cause une perte d'informations. Ainsi un composé dont la concentration augmente au cours du temps n'est pas visible dans ces conditions, ce qui suggère que beaucoup plus de composés sont sans doute associés aux signatures antioxydantes observées.

3. Evolution des composés nucléophiles au cours de l'élevage

Après avoir discuté de l'effet de l'élevage sur l'évolution des composés marqueurs de la capacité antioxydante des vins, intéressons-nous plus spécifiquement à l'évolution des composés nucléophiles du vin. Pour rappel, 318 composés nucléophiles ont été isolés dans les différents échantillons analysés (Annexe 3). Si l'on s'intéresse aux composés présents aux différents stades de l'élevage (Figure 33), il apparaît une diminution du nombre total de composés nucléophiles au cours de l'élevage, ainsi qu'une différence significative entre les

millésimes (après un an d'élevage). L'annotation à l'aide d'Oligonet permet d'obtenir des informations supplémentaires quant à l'évolution des composés impliqués ¹²⁴. On note alors, une diminution significative (ANOVA, test de Tukey HSD, $p < 0,05$) du nombre de peptides probables au cours de l'élevage, avec en moyenne 27 ± 6 peptides fin FA, 19 ± 5 après 4 mois d'élevage, et finalement 8 ± 2 et 12 ± 4 peptides en fin d'élevage pour le millésime 2017 et 2016, respectivement. Ce résultat confirme ainsi, ce qui a été montré précédemment avec la consommation de composés du sous-groupe C qui seraient principalement des peptides. Dans le même temps, nous constatons une augmentation significative (ANOVA, test de Tukey HSD, $p < 0,05$) du nombre de composés nucléophiles autres que des peptides au cours de l'élevage, avec un effet important du millésime sur leur nombre, 13 ± 4 pour le millésime 2016, 22 ± 2 pour 2017 après un an d'élevage. Cet effet millésime n'est pas visible sur le nombre de peptides, leurs nombres n'étant pas significativement différents après un an d'élevage (ANOVA, test de Tukey HSD, $p < 0,05$).

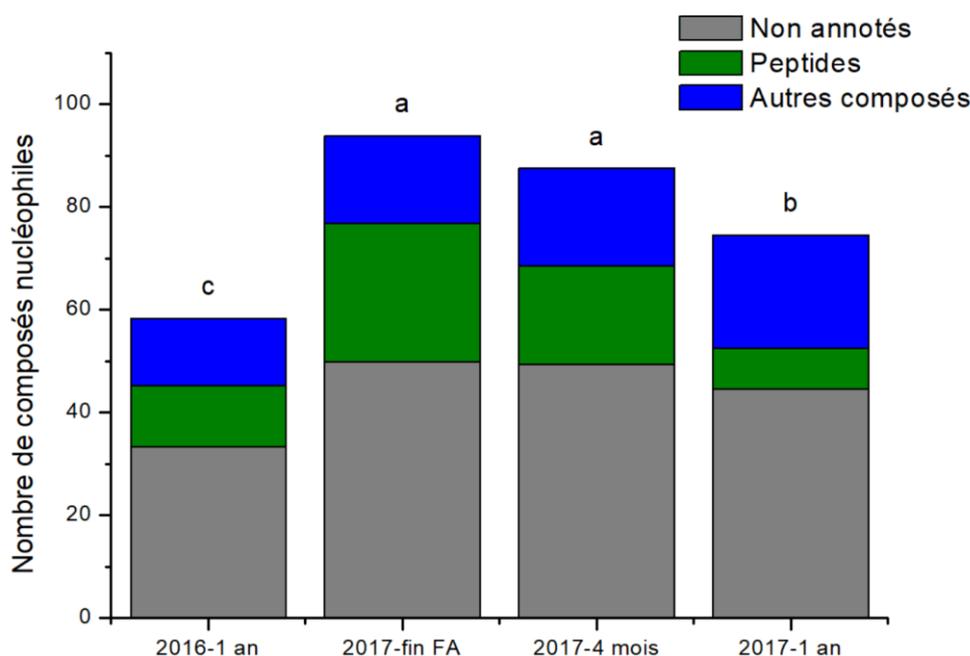


Figure 33 : Evolution du nombre de composés nucléophiles détectés au cours de l'élevage. L'annotation des peptides et d'autres composés a été réalisée à l'aide d'Oligonet ¹²⁴. Les différentes lettres marquent des groupes statistiquement différents par ANOVA et test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Si l'on s'intéresse avec plus de détails à ces composés, pour le millésime 2017 on note ainsi la disparition de la Cystéine (121,0192 Da), des peptides Ala-Cys-Glu (321,0988 Da) et Cys-Leu-Asp (349,1287 Da) ou encore Ser-Val-Cys (307,1192 Da) qui contiennent tous l'acide aminé Cys dans leur séquence, mais également de peptides contenant de la Méthionine, avec Gly-Met (206,0716 Da) et Val-Leu-Met (361,2024 Da). De plus, d'autres peptides ne

disparaissent pas totalement, mais l'on peut noter une forte diminution de leurs intensités, avec par exemple le GSH (307,0832 Da) ou Gly-Cys (178,0406 Da), montrant une consommation de ces peptides au cours de l'élevage. Malgré une augmentation du nombre de composés nucléophiles autres que des peptides au cours de l'élevage, il apparaît une consommation de composés soufrés tels que l'Homocystéine (135,0348 Da). En revanche, la comparaison des millésimes 2016 et 2017 après un an d'élevage montre des consommations peptidiques différentes. En effet, alors qu'ils ne sont plus détectés pour le millésime 2017, la Cys, le GSH, l'HCys ainsi que les peptides Glu-Met et Val-Leu-Met sont toujours détectables après un an d'élevage pour le millésime 2016, montrant ainsi un effet du millésime sur leur consommation qui peut être due à leurs concentrations initiales dans le vin (matière première et mécanisme fermentaire), à une consommation moins importante dans les mécanismes d'oxydation mais également à un apport plus important des lies ^{64,67}.

En résumé, il apparaît clairement qu'au cours de l'élevage, la capacité antioxydante des vins augmente. Cette augmentation est liée à une consommation de composés en début d'élevage, qui s'avèrent être principalement des peptides et des composés soufrés. Dans le même temps, le vin est enrichi en composés antioxydants, via le bois et l'autolyse des levures, avec une augmentation importante de composés n'étant pas des peptides, et pouvant être par exemple des composés phénoliques.

Chapitre 5 : Effet de différentes pratiques pré-fermentaires

Dans les paragraphes précédents, l'effet de l'élevage sur la capacité antioxydante du vin ainsi que sur les marqueurs moléculaires impliqués, a été étudié. Nous avons observé que durant cette période post-fermentaire, des cinétiques d'évolution distinctes de la capacité antioxydante instantanée des vins peuvent être mesurées, ébauchant ainsi une possible modélisation de l'aptitude au vieillissement de ces vins. Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes antioxydants impliqués, l'échantillonnage est une nouvelle fois réduit afin de caractériser plus spécifiquement l'impact de pratiques pré-fermentaires sur la capacité antioxydante des vins. Ainsi, des vins issus de moûts hyperoxygénés ou sulfités ont été analysés au cours de l'élevage. Comme nous l'avons vu précédemment, l'élevage a un impact important sur les propriétés antioxydantes du vin, avec une forte évolution des marqueurs moléculaires impliqués. C'est pourquoi nous avons également choisi de suivre ces différentes modalités au cours de l'élevage afin d'étudier comment elles se comportaient durant cette période. Pour chaque modalité, deux fûts ont été suivis au cours de l'élevage (durant 1 an), mais également un échantillon correspondant au mélange de 5 fûts, permettant d'être plus proche de la globalité des vins du domaine duquel ils sont issus. Dans ce chapitre, uniquement les résultats LC-QToF-MS en mode d'ionisation positif seront discutés car très peu de composés ont été isolés en mode négatif.

1. Evolution de la capacité antioxydante des vins en fonction du sulfitage ou de l'hyperoxygénation du moût

L'analyse de la capacité antioxydante des vins a été réalisée à l'aide de la méthode DPPH. La Figure 34 présente la cinétique d'évolution des mesures instantanées de capacité antioxydante au cours de l'élevage pour les différentes modalités. Il apparaît qu'en début d'élevage et fin FA, les modalités sont réparties en 3 groupes significativement différents (ANOVA, test de Tukey HSD, $p < 0,05$). Le premier qui regroupe les vins ayant la meilleure capacité antioxydante est composé des modalités sulfitées (2 et 8 g/hL), le second est composé de la modalité hyperoxygénée puis sulfitée (4 g/hL) après débourage, ainsi que du témoin (sulfitage du 1^{er} jus, hyperoxygénation du jus de presse). Enfin le dernier groupe correspond à la modalité hyperoxygénée. Tout comme précédemment pour les vins issus des différentes

appellations de Bourgogne, la capacité antioxydante des différentes modalités augmente au cours de l'élevage. Mais toutes les modalités n'évoluent pas à la même vitesse. Ainsi après un an d'élevage, les différences entre les modalités sont beaucoup plus faibles, même s'il existe toujours 3 groupes significativement différents (ANOVA, test de Tukey HSD, $p < 0,05$). Dans le premier groupe on retrouve les 2 modalités sulfitées mais également la modalité témoin, dans le second la modalité hyperoxygénée suivie d'un ajout de SO_2 et dans le 3^{ème} la modalité hyperoxygénée. Grâce à ces premiers résultats, il apparait un effet important de la capacité antioxydante du vin obtenu suite à la protection ou à l'hyperoxygénation du moût. Il a été montré dans la littérature que les vins issus de moûts hyperoxygénés sont moins sensibles à l'oxydation, avec un brunissement plus faible au cours du vieillissement en bouteilles^{26,149}. On constate ici une capacité antioxydante plus faible des vins issus de moûts hyperoxygénés. En revanche, la capacité antioxydante de la modalité hyperoxygénée augmente plus vite que celle des modalités sulfitées, au cours de l'élevage. Si l'on calcule la vitesse d'évolution du paramètre Ec_{20} durant l'élevage on obtient une vitesse plus deux fois plus importante pour la modalité hyperoxygénée (-1,2 $\text{Ec}_{20}/\text{mois}$) comparée aux modalités sulfitées à 2 et 8 g/hL (-0,5 $\text{Ec}_{20}/\text{mois}$). La modalité hyperoxygénée puis sulfitée et le témoin étant intermédiaire avec -0,7 et -0,8 $\text{Ec}_{20}/\text{mois}$. On peut alors se demander si la vitesse d'évolution des vins durant le vieillissement en bouteilles sera également différente. Pour cela, le suivi des vins sera assuré dans les mois et années à venir afin de comprendre comment chacune des modalités évoluent.

Cette analyse de la capacité antioxydante par DPPH, a donc permis de montrer des différences entre les modalités étudiées, il s'agit maintenant d'en étudier les différences d'un point de vue moléculaire en s'intéressant tout d'abord aux marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante puis aux composés nucléophiles.

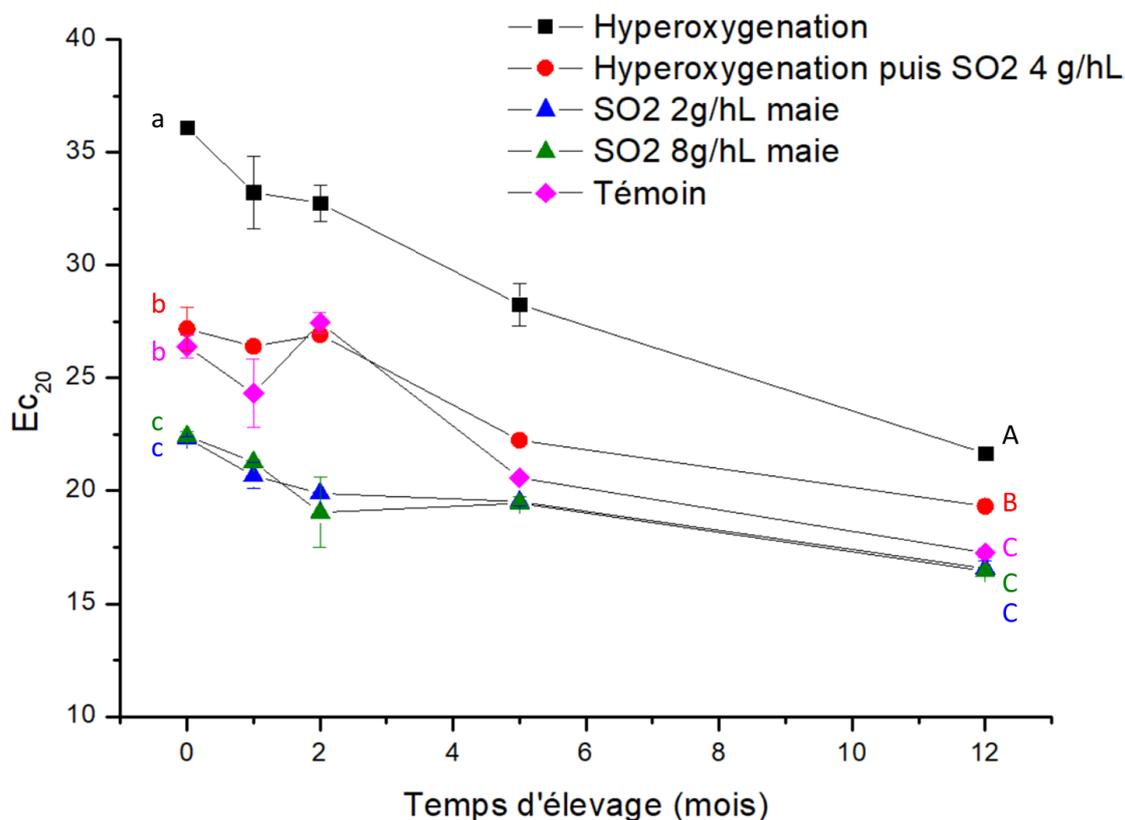


Figure 34 : Evolution pendant un an d'élevage de la capacité antioxydante déterminée par DPPH des vins du millésime 2017 issus des différentes modalités de sulfitage des moûts. Les résultats sont issus de l'échantillon correspondant à un mélange de 5 fûts. Les lettres indiquent une différence significative déterminée par ANOVA et test de Tukey HSD ($p < 0,05$), en minuscule pour les vins fin FA, en majuscule après 1 an d'élevage.

2. Impact du sulfitage et de l'hyperoxygenation du moût sur les marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante

Après avoir discuté de la capacité antioxydante de vins issus de moûts hyperoxygénés ou protégés par l'ajout de sulfites, nous allons caractériser les composés marqueurs associés à ces cinétiques d'évolution de capacité antioxydante. Pour cette étude, les vins après 5 mois d'élevage ont été sélectionnés. En effet, il s'agit du dernier prélèvement où un réplica de 2 fûts était présent. Après un an d'élevage, les différents fûts ont été assemblés en cuve inox afin de finir l'élevage (échantillon similaire au mélange de 5 fûts).

Avant de discuter des marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante, faisons d'abord un point sur les composés phénoliques présents dans les différentes modalités. En effet, différentes études ont montré des corrélations entre les teneurs en composés phénoliques des vins et leur statut redox^{13,150,151}. La quantification de ces composés phénoliques a été réalisée

par HPLC-DAD (Tableau 9). Parmi les composés pour lesquels des différences entre modalités sont observées, l'acide caftarique et le GRP sont directement corrélés au phénomène de protection du moût vis-à-vis de l'oxygène, avec des teneurs significativement plus faibles pour la modalité hyperoxygénée⁶¹. Le tyrosol, composé d'origine fermentaire, présente également des concentrations significativement différentes entre modalités, variant du simple au double entre les modalités hyperoxygénées et les modalités hyperoxygénées/sulfitées (Tableau 9). Avec l'hydroxytyrosol dans une moindre mesure, les teneurs distinctes en tyrosol, qui peuvent participer à la capacité antioxydante des vins blancs¹¹⁰, illustrent la contribution fermentaire au développement de la stabilité oxydante des vins. Enfin, aucune différence significative quant à la quantité d'acide gallique entre les modalités⁵⁹. En résumé, on peut noter une diminution de la quantité de composés phénoliques par hyperoxygénation du moût, mais cette diminution reste modérée.

Tableau 9 : Concentrations (mg/L) en composés phénoliques des vins de chaque modalité après 5 mois d'élevage. Analyse réalisée sur le duplicata de fût par HPLC-DAD. Les lettres marquent les différences significatives entre les modalités pour chaque composé, déterminées par ANOVA suivi du test du Tukey HSD (p -Value<0,5).

	<i>Hyper- oxygénation</i>	<i>SO₂ 2g/hL</i>	<i>SO₂ 8g/hL</i>	<i>Hyper- oxygénation puis 4g/hL SO₂</i>	<i>Témoin</i>
<i>Hydroxytyrosol</i>	2,02 ^a ±0,01	1,75 ^b ± 0,01	0,92 ^c ± 0,12	1,66 ^b ±0,0	0,78 ^c ±0,04
<i>Tyrosol</i>	6,48 ^c ±0,61	11,59 ^b ±0,29	13,3 ^b ± 0,3	16,39 ^a ±0,83	7,01 ^c ±0,15
<i>Acide gallique</i>	0,78 ^a ±0,18	1,03 ^a ± 0,11	1,03 ^a ± 0,06	1,08 ^a ±0,24	1,00 ^a ±0,21
<i>Acide caftarique</i>	7,82 ^d ±0,22	11,03 ^b ±0,13	12,22 ^a ±0,11	9,99 ^c ±0,07	10,78 ^b ±0,03
<i>Acide coutarique</i>	1,45 ^c ±0,12	2,36 ^a ±0,06	1,85 ^b ±0,07	1,76 ^{b,c} ±0,11	1,46 ^c ±0,07
<i>GRP</i>	2,55 ^c ±0,09	7,93 ^a ±0,26	7,45 ^a ±0,11	4,56 ^b ±0,29	4,05 ^b ±0,13
<i>(+) Catéchine</i>	1,01 ^a ±0,04	0,97 ^a ±0,05	0,10 ^b ±0,02	0,32 ^b ±0,14	0,3 ^b ±0,01

Concernant les marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante, le nombre total de composés présents dans chaque modalité n'est pas différent (ANOVA, test Tukey HSD, p -Value<0,05), avec environ 260 composés sur les 380 marqueurs isolés. Une analyse non supervisée ne permet pas une discrimination des composés marqueurs du traitement reçu par le moût. En effet, en raison d'une forte similarité entre les échantillons, le raisin provenant de la même parcelle, du même millésime et du même domaine, l'unique différence est due à la

protection ou à l'hydroxygénation du moût, impliquant un grand nombre de composés présent dans tous les échantillons, c'est pourquoi il est nécessaire de ne conserver que les composés discriminant les différents traitements. Afin de réaliser cette étape de filtration, nous avons choisi de nous intéresser aux composés marqueurs d'une protection à l'aide du SO₂ ou d'une hydroxygénation du moût, en ne prenant pas en compte la modalité témoin par la suite, qui est la modalité usuelle du domaine. Pour chaque composé marqueur présent le test de Wilcoxon a permis de déterminer la significativité vis-à-vis de ces deux groupes, ainsi uniquement les composés ayant une p-Value < 0,05 ont été conservés, soit 110 composés.

La Figure 35 représente la répartition de ces 110 composés dans les différentes modalités permettant une discrimination des vins en fonction de leurs antécédents (moût sulfité ou hydroxygéné). Ces résultats provenant tous d'un même jeu de données LC-QToF-MS, il est donc possible d'utiliser les intensités des ions détectés et non uniquement leur absence ou présence comme précédemment pour le suivi de l'élevage. Sur cette base, nous observons clairement deux groupes de composés. Un groupe D de composés plus présents dans les vins issus de moûts hydroxygénés, et constitué de 25 composés (Annexe 2), et un groupe E de composés plus présents dans les vins issus de moûts protégés, et regroupant 85 composés. 12 composés appartenant au groupe D ont été annotés, comprenant potentiellement 8 peptides et 4 autres composés. Un de ces composés pourrait être l'acide indole lactique (205,0732 Da). Or, il a été montré que sa concentration serait corrélée au vieillissement du vin avec des concentrations augmentant avec l'âge du vin, et notamment au travers de la formation d'adduits sulfonés, ce qui expliquerait une concentration significativement supérieure dans la modalité hydroxygénée⁴⁵. D'autre part, 63 composés du groupe E ont été annotés avec probablement 41 peptides et 22 autres composés (Annexe 2). On retrouve entre autres la dihydroquercétine (304,0574 Da) ou le méthyle-gallate (184,0361 Da), qui sont connus pour leurs propriétés antioxydantes, et qui ont pu être protégé par la présence de sulfites¹⁴⁴. On note également, la présence de l'acide caftarique. Ce résultat est en accord avec le dosage des composés phénoliques réalisé par HPLC-DAD montrant une quantité plus importante d'acide caftarique dans les modalités sulfitées. En l'absence de sulfites et en présence d'oxygène dans les moûts hydroxygénés, ces composés seraient donc consommés lors des mécanismes d'oxydation, en réagissant avec une espèce réactive de l'oxygène, ou en réagissant avec des produits d'oxydation, tels que des quinones par exemple. Ainsi, on peut se demander si l'analyse des composés nucléophiles confirmera ces résultats, montrant un nombre plus faible de peptides, en particulier soufrés, dans les échantillons hydroxygénés.

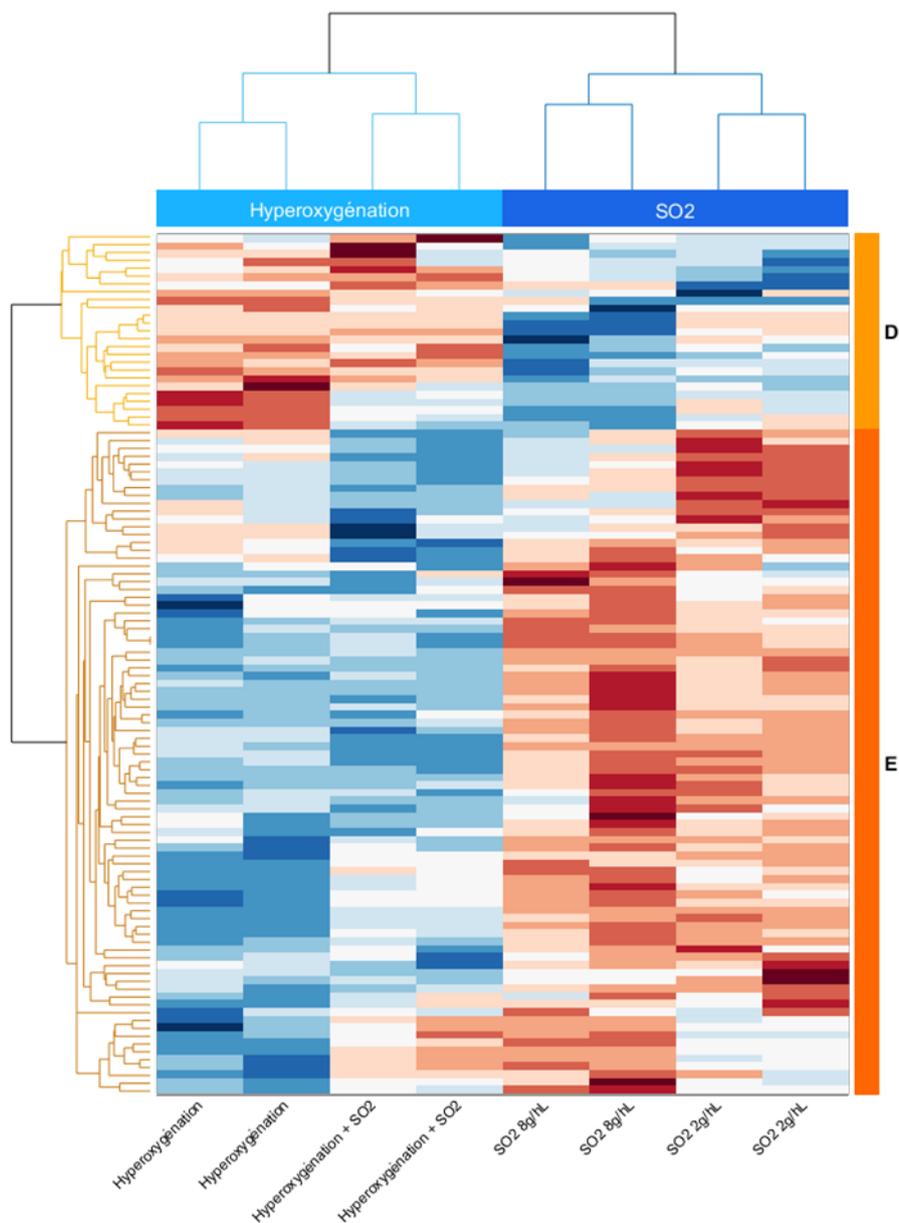


Figure 35 : Discrimination des vins issus de moûts hyperoxygénés ou sulfités à l'aide d'un CAH. Les marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante ont été filtrés par le test de Wilcoxon ($p\text{Value} < 0,05$), significativité entre modalités hyperoxygénées et sulfitées, afin de réduire le nombre de composés isolés (110). En rouge les composés ayant une intensité plus élevée, en bleu plus faible. L'intensité a été normée sur une échelle de -1 à 1, allant du moins intense au plus intense. Résultats à partir des analyses LC-QToF-MS en mode positif sur les échantillons après 5 mois d'élevage en fûts.

3. Modifications de la teneur en composés nucléophiles du vin par la protection ou l'oxydation du moût

Dans cette dernière partie, l'impact du sulfitage ou de l'hyperoxygénation du moût sur les composés nucléophiles du vin après 5 mois d'élevage a été étudié. Ainsi, si l'on s'intéresse au nombre de composés nucléophiles présents dans chaque modalité, on constate que la seule

différence significative (ANOVA, test de Tukey HSD, p -Value<0.05) entre les modalités correspond à la modalité hyperoxygénée (Figure 36), avec un nombre de composé nucléophiles moins important.

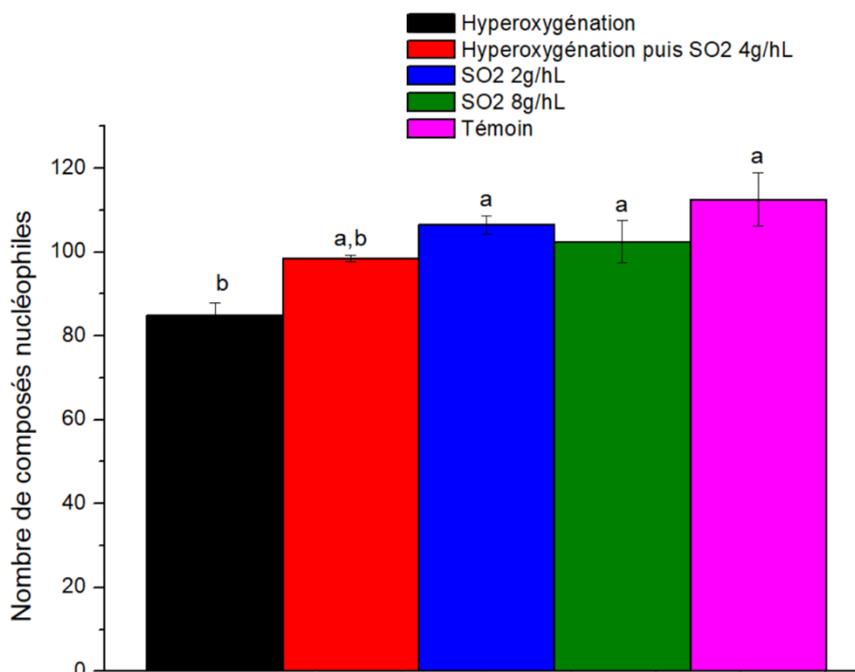


Figure 36 : Nombre de composés nucléophiles isolés (134) pour chaque modalité après 5 mois d'élevage. L'analyse a été réalisée sur le réplica de 2 fûts. Les lettres marquent des groupes déterminés par ANOVA puis du test de Tukey (HSD), p -Value<0,05.

La concentration relative de chacun des composés nucléophiles dans les vins issus des différentes modalités permet de discriminer la modalité hyperoxygénée des autres modalités étudiées via une analyse non-supervisée (Figure 37). Deux groupes de composés nucléophiles peuvent être déterminés. Le premier groupe Nu1 (Annexe 3), qui contient 39 composés, représente les composés les plus présents dans la modalité hyperoxygénée. 18 composés de Nu1 ont pu être annotés, comprenant 2 acides aminés, Pro et Tyr ainsi qu'un peptide. Il y a donc une majorité de composés autres que des peptides. Le groupe Nu2 est constitué de 83 composés qui sont plus présents dans les modalités ayant reçu un ajout de SO₂ (Annexe 3). Ainsi, sur les 83 composés présents, 36 ont été annotés et 3 identifiés, le GSH, la Cys et HCys (Chapitre 3). On retrouve une majorité de peptides probables (19) dont la Cys et le GSH qui font partie des composés identifiés. La majorité des peptides probables contiennent l'acide aminé Cys dans leur séquence. D'autre part, un nombre important de composés annotés semble correspondre à des composés soufrés, tels que la pantetheine ou l'homocystéine. Ces résultats montrent donc une quantité plus importante de composés soufrés dans les modalités dont le moût a été protégé

par du SO₂, ce qui est également vrai pour la modalité sulfitée après hyperoxygénation. Ce résultat est en accord avec de précédentes études, qui ont montré une quantité plus importante de composés soufrés (CHOS et CHONS) dans des vins également issus de moûts ayant reçus différentes dose de SO₂⁴⁸. Il avait alors été montré que la sulfonation de composés phénoliques (acide gallique, caféique et caftarique) et d'acide aminés par exemple pouvait en être la cause. Il apparait clairement ici, que le nombre de composés soufrés est également plus important en raison d'une préservation des peptides et composés soufrés présents dans le moût. Cependant, à ce stade, les analyses par LC-QToF-MS/MS n'ont pas permis de confirmer la présence de composés sulfonés.

La présence en plus grand nombre de peptides et de composés soufrés dans les modalités sulfitées, montre donc un effet de protection du SO₂ sur ces composés. On peut également voir les choses d'une autre manière. En l'absence de SO₂, ces composés soufrés (peptides ou non) vont être consommés par les quinones formées au cours de l'oxydation^{52,55}, mais peuvent également être consommés directement par l'oxygène dissous présent, grâce à leurs propriétés antioxydantes^{56,57,136}, permettant ainsi une protection des autres composés du vins et limitant les effets de l'oxydation sur les propriétés organoleptique de celui-ci.

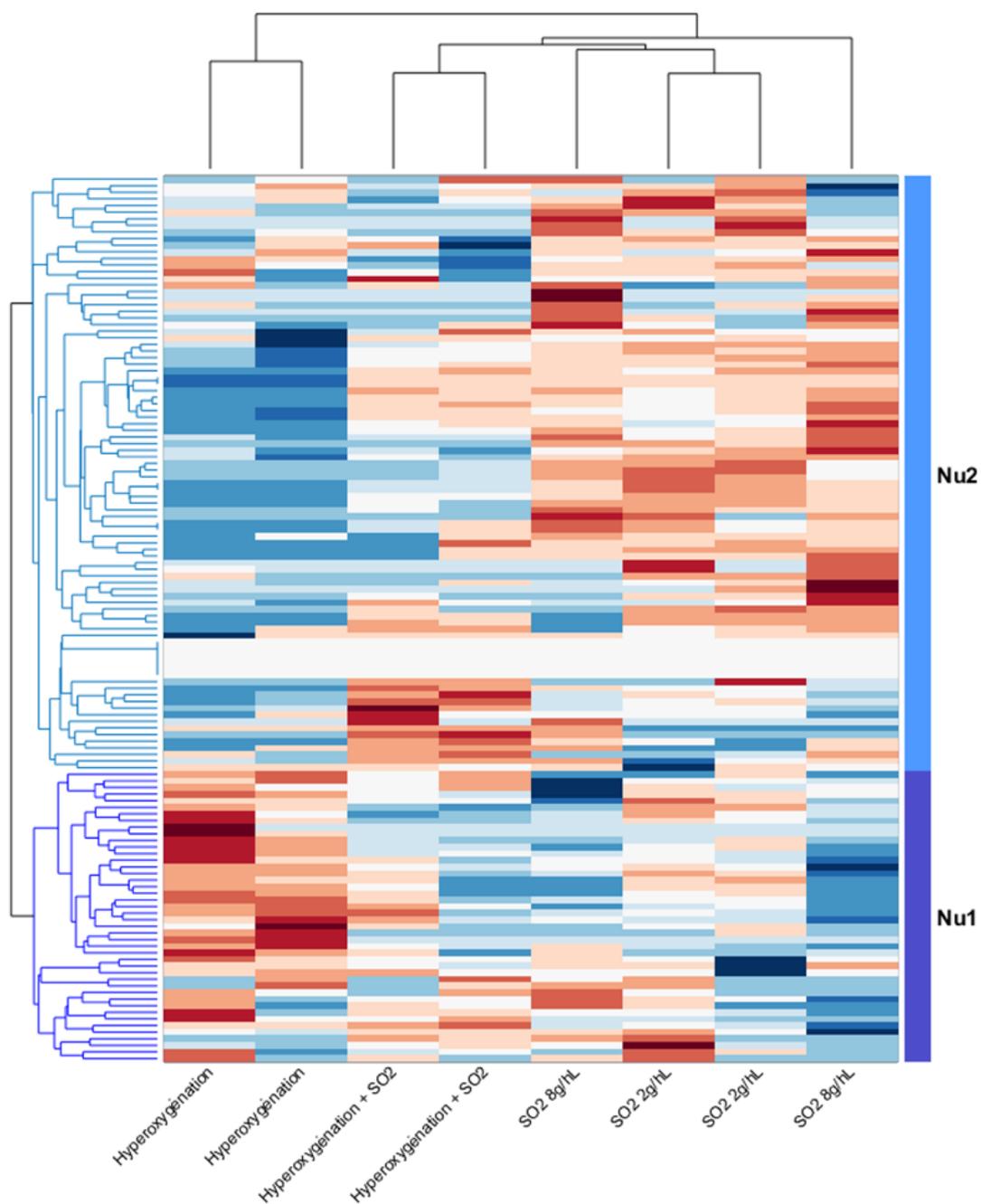


Figure 37 : Discrimination des modalités à l'aide des composés nucléophiles isolés (134). En rouge les composés ayant une intensité plus élevée, en bleu plus faible. L'intensité a été normée sur une échelle de -1 à 1, allant du moins intense au plus intense. Résultats à partir des analyses LC-QToF-MS en mode positif sur les échantillons après 5 mois d'élevage en fûts.

Conclusions et perspectives

Conclusions

Au cours de ce travail de thèse, la méthode DPPH a été optimisée pour la détermination de la capacité antioxydante des vins blancs en s'appuyant dans un 1^{er} temps sur l'analyse de composés standards, puis par l'analyse d'une verticale de vins (millésimes 1995 à 2014). L'utilisation d'un mélange de tampon citrate-phosphate à pH 3,6 et de méthanol en proportion 40/60% a permis l'optimisation de la détermination de la capacité antioxydante des composés soufrés, tels que le GSH ou la Cys par exemple. Cette étude a permis de montrer une capacité antioxydante similaire de la Cys avec la catéchine, du GSH avec l'acide caféique ou encore de l'éthanthiol avec l'acide férulique, démontrant ainsi l'importance de ces composés dans la capacité antioxydante des vins blancs. D'autres part, l'analyse d'une verticale de vins par DPPH et par analyse sensorielle a révélé une corrélation forte entre le degré d'oxydation du vin et sa capacité antioxydante, montrant une diminution de la capacité antioxydante du vin lors de son vieillissement.

L'étude de la complémentarité des méthodes DPPH et RPE à l'aide de 106 vins en cours d'élevage, a permis dans un premier temps de montrer une corrélation de Spearman significative entre les analyses DPPH et RPE impliquant une complémentarité des deux méthodes. Pour aller plus loin dans l'étude de cette complémentarité, des analyses par FT-ICR-MS sur 35 vins ont permis de comparer la composition élémentaire des composés impliqués dans les mesures par chaque méthode. La majorité des composés marqueurs d'une capacité antioxydante élevée sont de formules élémentaires CHO, CHOS et CHONS, pouvant correspondre à des composés phénoliques, tels que la dihydroquercétine, l'acide gallique, l'acide syringique ou l'acide tropique et à des peptides avec Val-Val-Thr ou Ser-Val-Leu, par exemple.

A l'aide des analyses DPPH et RPE, 106 vins en cours d'élevage ont été discriminés en 3 groupes en fonction de leur capacité antioxydante. Le premier correspondant aux vins les plus antioxydants, le deuxième a des vins intermédiaires et le troisième aux vins ayant la capacité antioxydante la plus faible. Il apparaît alors, que les vins ayant la capacité antioxydante la plus élevée sont majoritairement des vins après un an d'élevage, alors que les vins avec la capacité antioxydante la plus faible sont globalement des vins en début d'élevage. Ce résultat montre donc un premier effet de l'élevage sur les vins avec une augmentation de leur capacité antioxydante.

Le second objectif du travail de thèse était de déterminer des marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante des vins blancs. Pour cela, 287 vins en cours d'élevage ont été analysés, sur 3 millésimes, par DPPH, RPE et LC-QToF-MS. Ces analyses ont permis l'isolation de 380 couples m/z -TR qui ont été répartis en 3 groupes en fonction de leurs corrélations avec les variables issues des analyses DPPH et RPE. Le premier groupe correspond aux couples m/z -TR marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH mais faible par RPE. Le groupe 2 correspond aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante faible si l'on considère les variables Ec_{20} , Max et T_{Max} mais élevée avec la variable 1^{ère} Pente. Tandis que le groupe 3 est formé de composés marqueurs d'une capacité antioxydante forte avec les deux analyses. Les composés isolés ne sont pas nécessairement des composés antioxydants, mais du fait de leurs corrélations avec les analyses DPPH et RPE ils sont marqueurs de la capacité antioxydante des vins. L'annotation des composés à l'aide de base de données en ligne et de l'outil Oligonet montre qu'environ 50% des masses des groupes 1 et 2 seraient des peptides, alors que le groupe 3 n'en comporte que 22%, avec par conséquent relativement plus de composés d'autres familles chimiques, tel que des composés phénoliques par exemple.

Une méthode permettant la détection de composés nucléophiles du vin a également été développée au cours de cette étude. Celle-ci utilise la sonde électrophile 4-méthyle-1,2-benzoquinone comme agent de dérivation. L'étude en solution modèle de composés standards soufrés et azotés a permis l'optimisation des paramètres, pH de la solution, temps d'incubation, stabilité des adduits formés. Cette méthode permet de travailler au pH du vin, est donc de limiter les modifications de la matrice. L'étude de 92 vins en cours d'élevage suivie d'une analyse multivariée (PLS-DA) et du test de Wilcoxon a permis d'isoler 141 composés nucléophiles. La dérivation permet une augmentation du nombre de composés détectés en particulier des composés soufrés, étant donné que seuls 20 composés sont détectés sans dérivation. L'identification des composés nucléophiles isolés montre une part importante d'acides aminés et de peptides ayant des propriétés antioxydantes (Val, Leu, Ile, Pro, Trp, Cys et Met).

L'analyse de 287 vins en cours d'élevage a permis l'isolation de 318 composés nucléophiles, dont 138 qui ont été annotés. Parmi ces composés, 50 sont potentiellement des peptides ou des acides aminés. Les autres composés étant des composés soufrés (Hcys, pantetheine), des composés azotés mais également des composés phénoliques.

Enfin la dernière partie de cette étude a permis de déterminer l'impact de l'élevage sur la capacité antioxydante et les marqueurs moléculaires associés grâce à l'analyse de vins de différentes appellations de Bourgogne suivis sur deux millésimes. Cette étude montre un effet positif de l'élevage sur la capacité antioxydante des vins, avec une augmentation significative de celle-ci au cours du temps, en ce quel que soit le millésime ou la matrice. L'étude des composés marqueurs de la stabilité antioxydante, a mis en avant des composés apparaissant au cours de l'élevage et étant marqueurs d'une capacité antioxydante élevée. Ces composés sont indépendants du millésime et de la matrice observée. Parmi ces composés probables on trouve l'hydroxy-coumarine ou le pyrogallol qui peuvent être des dérivés du bois. Dans le même temps, des composés sont consommés au cours de l'élevage. Cette consommation est due principalement à la consommation de composés soufrés, que ce soit de peptides contenant un fragment Cys mais également de composés tels que l'Hcys. La consommation des composés soufrés au cours de l'élevage peut être due à leurs propriétés nucléophiles, en réagissant avec les quinones formées par l'oxydation, à leurs réactions avec l'oxygène dissous ou encore à leurs consommations grâce à leur capacité de piègeur de radicaux, ce qui leur donne un rôle important dans les mécanismes antioxydants des vins blancs.

L'impact de différentes pratiques pré-fermentaires, dose de sulfites ajoutée au moût et hyperoxygénation, ont également été étudiées sur des vins en cours d'élevage. Les vins issus de moûts ayant été sulfités ont une capacité antioxydante significativement plus importante que les vins issus de moûts hyperoxygénés, et quelle que soit la durée d'élevage. En revanche, l'augmentation de la capacité antioxydante des vins hyperoxygénés au cours de l'élevage est plus importante. Le suivi des vins lors du vieillissement en bouteilles sera poursuivi afin d'étudier l'évolution de chacune des modalités. L'analyse des marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante et des composés nucléophiles présents dans les vins après 4 mois d'élevage apportent des informations complémentaires. Une quantité beaucoup plus importante de composés soufrés est présente dans les modalités dont le moût a été protégé par l'ajout de sulfites. On retrouve ainsi des composés tels que la pantetheine, l'HCys, la Cys, le GSH, ... Ce résultat montre que l'ajout de SO₂ protège ces composés de l'oxydation, mais cela signifie également qu'en l'absence de SO₂ ces composés sont consommés par l'oxygène ayant un effet antioxydant en protégeant les autres composés du vin de l'oxydation.

Tous ces résultats confirment donc l'hypothèse sur laquelle repose ce travail, les vins même en cours d'élevage ont une signature moléculaire permettant de les discriminer en fonction de leur capacité antioxydante. Il apparaît clairement que les composés soufrés jouent un rôle important dans les mécanismes antioxydants du vin via leurs propriétés de piègeur de radicaux mais également leurs propriétés nucléophiles. Identifier avec plus de précision cette composante soufrée est donc un élément important pour la compréhension des mécanismes antioxydants des vins blancs. Il est également important d'identifier les produits secondaires de l'oxydation, par la détermination des adduits formés entre les composés soufrés et les quinones naturellement présentes dans le vin, afin de comprendre les interactions entre chaque groupe moléculaire. Suivre l'évolution de ces marqueurs moléculaires au cours du vieillissement en bouteilles sera un élément central à la compréhension des mécanismes en jeu lors de l'oxydation du vin et principalement sur l'effet de la composition du vin en cours d'élevage sur son évolution.

D'autre part, la mesure de cinétique d'évolution de la capacité antioxydante des vins au cours de l'élevage montre des comportements parfois différents entre les vins, avec des vitesses d'évolution différentes mais également des valeurs absolues différentes. Ces cinétiques apportent une première visualisation de l'évolution du vin, et permettront de réaliser une modélisation du vieillissement du vin.

Un indice de stabilité, regroupant les données de capacité antioxydante et les informations relatives à la composition, est nécessaire afin de prédire le vieillissement du vin. Deux vins avec une même capacité antioxydante pouvant avoir des compositions moléculaires différentes, il est important de pouvoir les discriminer. Un point important est encore manquant à ce jour pour la détermination de cet indice de stabilité et de la prédiction de l'aptitude au vieillissement. Il s'agit du suivi du vin lors de son vieillissement en bouteilles. En effet, nous avons au cours de cette étude mesuré les premiers points de la cinétique d'évolution mais la détermination de l'évolution du vin sur un laps de temps plus long est nécessaire. Ce suivi permettra la modélisation de sa stabilité au cours du temps, et permettra par comparaison de prédire la stabilité oxydative de nouveaux vins.

Perspectives

Afin d'avoir une meilleure compréhension des composés impliqués dans les mécanismes antioxydants du vin, l'identification des composés marqueurs isolés au cours de cette étude permettra de valider les tendances observées et de comprendre avec plus de détails les mécanismes impliqués. L'utilisation d'autres colonnes pour la séparation LC-QToF-MS permettra également la détection de nouveaux marqueurs moléculaires. Par exemple avec l'utilisation d'une colonne HILIC favorisant la séparation de composés polaires.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes antioxydants des vins, l'utilisation d'outils supplémentaires pour la détermination de la capacité antioxydante des vins est primordial. Cela permettra d'ajouter de nouvelles « dimensions » avec de nouvelles variables mesurées. De plus, ces nouveaux outils pourront amener à l'isolation de nouveaux composés marqueurs en ciblant d'autres mécanismes antioxydants. Une de ces méthodes pourrait être l'utilisation de voltamétrie linéaire qui est une méthode rapide et efficace d'analyse.

En plus de l'utilisation de méthodes d'analyses supplémentaires, il est nécessaire de continuer à enrichir les listes de marqueurs moléculaires isolés par l'analyse de nouveaux vins, que ce soit des vins en cours d'élevage sur de nouveaux millésimes mais également de millésimes plus anciens. Le suivi des vins analysés dans cette étude au cours des mois et années à venir est également un critère important qui permettra de véritablement décrire l'évolution des vins et de la caractériser. Grâce à ce suivi et au suivi d'un grand nombre de vins, il sera alors possible de déterminer et de modéliser l'évolution du vin en fonction de sa composition chimique et de sa capacité antioxydante.

Le développement d'un outil de vieillissement accéléré du vin, permettra de gagner du temps sur l'analyse de l'évolution du vin, en simulant le vieillissement de vin à différents stades d'élevage. Il sera alors possible de valider l'impact des composés marqueurs sur la stabilité oxydative des vins blancs.

Références bibliographiques

- (1) Communiqué de presse BIVB - Chiffres Clés de la Bourgogne Viticole <https://www.vins-bourgogne.fr/presse/chiffres-cles-de-la-bourgogne-viticole,2309,9200.html> (accessed Apr 20, 2019).
- (2) Lagorce-Tachon, A.; Karbowiak, T.; Simon, J.-M.; Gougeon, R.; Bellat, J.-P. Diffusion of Oxygen through Cork Stopper: Is It a Knudsen or a Fickian Mechanism? *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (37), 9180–9185. <https://doi.org/10.1021/jf501918n>.
- (3) Crouvisier-Urien, K.; Bellat, J.-P.; Gougeon, R. D.; Karbowiak, T. Gas Transfer through Wine Closures: A Critical Review. *Trends in Food Science & Technology* **2018**, *78*, 255–269. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.021>.
- (4) Mattivi, F.; Arapitsas, P.; Perenzoni, D.; Guella, G. Influence of Storage Conditions on the Composition of Red Wines. In *Advances in Wine Research*; ACS Symposium Series; American Chemical Society, 2015; Vol. 1203, pp 29–49. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1203.ch003>.
- (5) Makhotkina, O.; Pineau, B.; Kilmartin, P. A. Effect of Storage Temperature on the Chemical Composition and Sensory Profile of Sauvignon Blanc Wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2012**, *18* (1), 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00175.x>.
- (6) Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A. Hydrolysis and Formation of Volatile Esters in New Zealand Sauvignon Blanc Wine. *Food Chemistry* **2012**, *135* (2), 486–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.034>.
- (7) Carte des arômes du Champagne jeunesse maturité plénitude fruits fleurs saveurs gourmandes <https://www.champagne.fr/fr/deguster-apprecier/degustation/aromes> (accessed May 3, 2019).
- (8) Le Menn, N.; Marchand, S.; de Revel, G.; Demarville, D.; Laborde, D.; Marchal, R. N,S,O-Heterocycles in Aged Champagne Reserve Wines and Correlation with Free Amino Acid Concentrations. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (11), 2345–2356. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04576>.
- (9) Marchand, S.; de Revel, G.; Bertrand, A. Approaches to Wine Aroma: Release of Aroma Compounds from Reactions between Cysteine and Carbonyl Compounds in Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (10), 4890–4895. <https://doi.org/10.1021/jf000149u>.
- (10) Waterhouse, A. L. Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2002**, *957* (1), 21–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>.
- (11) Vinson, J. A.; Hontz, B. A. Phenol Antioxidant Index: Comparative Antioxidant Effectiveness of Red and White Wines. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43* (2), 401–403. <https://doi.org/10.1021/jf00050a027>.
- (12) Paixão, N.; Perestrelo, R.; Marques, J. C.; Câmara, J. S. Relationship between Antioxidant Capacity and Total Phenolic Content of Red, Rosé and White Wines. *Food Chemistry* **2007**, *105* (1), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.017>.
- (13) Fernández-Pachón, M. S.; Villaño, D.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. Antioxidant Activity of Wines and Relation with Their Polyphenolic Composition. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513* (1), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.028>.
- (14) Landrault, N.; Poucheret, P.; Ravel, P.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissedre, P. L. Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (7), 3341–3348.
- (15) Ugliano, M. Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (26), 6125–6136. <https://doi.org/10.1021/jf400810v>.

- (16) Roullier-Gall, C.; Witting, M.; Moritz, F.; Gil, R. B.; Goffette, D.; Valade, M.; Schmitt-Kopplin, P.; Gougeon, R. D. Natural Oxygenation of Champagne Wine during Ageing on Lees: A Metabolomics Picture of Hormesis. *Food Chemistry* **2016**, *203*, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.043>.
- (17) Ballester, J.; Magne, M.; Julien, P.; Noret, L.; Nikolantonaki, M.; Coelho, C.; Gougeon, R. D. Sensory Impact of Polyphenolic Composition on the Oxidative Notes of Chardonnay Wines. *Beverages* **2018**, *4* (1), 19. <https://doi.org/10.3390/beverages4010019>.
- (18) Coelho, C.; Julien, P.; Nikolantonaki, M.; Noret, L.; Magne, M.; Ballester, J.; Gougeon, R. D. Molecular and Macromolecular Changes in Bottle-Aged White Wines Reflect Oxidative Evolution—Impact of Must Clarification and Bottle Closure. *Front. Chem.* **2018**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00095>.
- (19) Nikolantonaki, M.; Julien, P.; Coelho, C.; Roullier-Gall, C.; Ballester, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Gougeon, R. D. Impact of Glutathione on Wines Oxidative Stability: A Combined Sensory and Metabolomic Study. *Front Chem* **2018**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00182>.
- (20) Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Sensory and Chemical Changes of Young White Wines Stored under Oxygen. An Assessment of the Role Played by Aldehydes and Some Other Important Odorants. *Food chemistry* **2002**.
- (21) Silva Ferreira, A. C.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Identification of Key Odorants Related to the Typical Aroma of Oxidation-Spoiled White Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (5), 1377–1381. <https://doi.org/10.1021/jf025847o>.
- (22) Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P.; Rodrigues, P.; Hogg, T. Kinetics of Oxidative Degradation of White Wines and How They Are Affected by Selected Technological Parameters. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (21), 5919–5924. <https://doi.org/10.1021/jf0115847>.
- (23) Singleton, V. L. Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *Am J Enol Vitic.* **1987**, *38* (1), 69–77.
- (24) Waterhouse, A. L.; Laurie, V. F. Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57* (3), 306–313.
- (25) Danilewicz, J. C. Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper. *Am J Enol Vitic.* **2003**, *54* (2), 73–85.
- (26) Li, H.; Guo, A.; Wang, H. Mechanisms of Oxidative Browning of Wine. *Food Chemistry* **2008**, *108* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.065>.
- (27) Whitaker, J. R.; Lee, C. Y. Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning: An Overview. In *Enzymatic Browning and Its Prevention*; Lee, C. Y., Whitaker, J. R., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Vol. 600, pp 2–7. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0600.ch001>.
- (28) Toit, W. J. D.; Marais, J.; Pretorius, I. S.; Toit, M. D. Oxygen in Must and Wine: A Review. *ResearchGate* **2006**, *27* (1), 76–94.
- (29) Robards, K.; Prenzler, P. D.; Tucker, G.; Swatsitang, P.; Glover, W. Phenolic Compounds and Their Role in Oxidative Processes in Fruits. *Food Chemistry* **1999**, *66* (4), 401–436. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00093-X).
- (30) Cheynier, V.; Basire, N.; Rigaud, J. Mechanism of Trans-Caffeoyltartaric Acid and Catechin Oxidation in Model Solutions Containing Grape Polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37* (4), 1069–1071. <https://doi.org/10.1021/jf00088a055>.

- (31) Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J.-M.; Duprat, F.; Moutounet, M. Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *Am J Enol Vitic.* **1990**, *41* (4), 346–349.
- (32) Oszmianski, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Iron-Catalyzed Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44* (7), 1712–1715. <https://doi.org/10.1021/jf9507710>.
- (33) Rigaud, J.; Cheynier, V.; Souquet, J.-M.; Moutounet, M. Influence of Must Composition on Phenolic Oxidation Kinetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1991**, *57* (1), 55–63. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740570107>.
- (34) Kuttyrev, A. A.; Moskva, V. V. Nucleophilic Reactions of Quinones. *Russian Chemical Reviews* **1991**, *60* (1), 72–88. <https://doi.org/10.1070/RC1991v060n01ABEH001032>.
- (35) Singleton, V. L.; Salgues, M.; Zaya, J.; Trousdale, E. Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine. *Am J Enol Vitic.* **1985**, *36* (1), 50–56.
- (36) Singleton, V. L. (University of C.; Cilliers, J. J. L. Phenolic Browning: A Perspective from Grape and Wine Research. **1995**.
- (37) Clark, A. C.; Dias, D. A.; Smith, T. A.; Ghiggino, K. P.; Scollary, G. R. Iron(III) Tartrate as a Potential Precursor of Light-Induced Oxidative Degradation of White Wine: Studies in a Model Wine System - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *51* (8), 3575–3581. <https://doi.org/10.1021/jf104897z>.
- (38) Grant-Preece, P.; Barril, C.; Schmidtke, L. M.; Scollary, G. R.; Clark, A. C. Light-Induced Changes in Bottled White Wine and Underlying Photochemical Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2017**, *57* (4), 743–754. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.919246>.
- (39) Danilewicz, J. C. Chemistry of Manganese and Interaction with Iron and Copper in Wine. *Am J Enol Vitic.* **2016**, ajev.2016.16033. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16033>.
- (40) F-Code-Annexe-Limites-Maximales-Acceptables.Pdf.
- (41) Green, R. W.; Parkins, G. M. COMPLEXES OF IRON WITH D-TARTARIC AND Meso-TARTARIC ACIDS. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65* (9), 1658–1659. <https://doi.org/10.1021/j100905a523>.
- (42) Danilewicz, J. C. Role of Tartaric and Malic Acids in Wine Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (22), 5149–5155. <https://doi.org/10.1021/jf5007402>.
- (43) Podgornik, H.; Stegu, M.; Podgornik, A.; Perdih, A. Isolation and Characterization of Mn(III) Tartrate from Phanerochaete Chrysosporium Culture Broth. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *201* (2), 265–269. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10767.x>.
- (44) Oliveira, C. M.; Ferreira, A. C. S.; De Freitas, V.; Silva, A. M. S. Oxidation Mechanisms Occurring in Wines. *Food Research International* **2011**, *44* (5), 1115–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050>.
- (45) Arapitsas, P.; Guella, G.; Mattivi, F. The Impact of SO₂ on Wine Flavanols and Indoles in Relation to Wine Style and Age. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1), 858. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19185-5>.
- (46) Henick-Kling, T.; Park, Y. H. Considerations for the Use of Yeast and Bacterial Starter Cultures: SO₂ and Timing of Inoculation. *Am J Enol Vitic.* **1994**, *45* (4), 464–469.
- (47) Danilewicz, J. C. Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper. *Am. J. Enol. Vitic.* **2007**, *58* (1), 53–60.
- (48) Roullier-Gall, C.; Hemmler, D.; Gonsior, M.; Li, Y.; Nikolantonaki, M.; Aron, A.; Coelho, C.; Gougeon, R. D.; Schmitt-Kopplin, P. Sulfites and the Wine Metabolome. *Food Chemistry* **2017**, *237*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.039>.

- (49) Arapitsas, P.; Speri, G.; Angeli, A.; Perenzoni, D.; Mattivi, F. The Influence of Storage on the “Chemical Age” of Red Wines. *Metabolomics* **2014**, *10* (5), 816–832. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0638-x>.
- (50) Hayasaka, Y.; Black, C. A.; Hack, J.; Smith, P. Structural Characterization of Reaction Products of Caftaric Acid and Bisulfite Present in a Commercial Wine Using High Resolution Mass Spectrometric and Nuclear Magnetic Resonance Techniques. *Food Chem* **2017**, *230*, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.005>.
- (51) Arapitsas, P.; Ugliano, M.; Perenzoni, D.; Angeli, A.; Pangrazzi, P.; Mattivi, F. Wine Metabolomics Reveals New Sulfonated Products in Bottled White Wines, Promoted by Small Amounts of Oxygen. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1429*, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.010>.
- (52) Ugliano, M.; Kwiatkowski, M.; Vidal, S.; Capone, D.; Siebert, T.; Dieval, J.-B.; Aagaard, O.; Waters, E. J. Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon Blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (6), 2564–2572. <https://doi.org/10.1021/jf1043585>.
- (53) Hoenicke, K.; Borchert, O.; Grüning, K.; Simat, T. J. “Untypical Aging off-Flavor” in Wine: Synthesis of Potential Degradation Compounds of Indole-3-Acetic Acid and Kynurenine and Their Evaluation as Precursors of 2-Aminoacetophenone. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (15), 4303–4309.
- (54) Kritzinger, E. C.; Bauer, F. F.; du Toit, W. J. Role of Glutathione in Winemaking: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (2), 269–277. <https://doi.org/10.1021/jf303665z>.
- (55) Nikolantonaki, M.; Magiatis, P.; Waterhouse, A. L. Measuring Protection of Aromatic Wine Thiols from Oxidation by Competitive Reactions vs Wine Preservatives with Ortho-Quinones. *Food Chemistry* **2014**, *163*, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.079>.
- (56) Samaranyaka, A. G. P.; Li-Chan, E. C. Y. Food-Derived Peptidic Antioxidants: A Review of Their Production, Assessment, and Potential Applications. *Journal of Functional Foods* **2011**, *3* (4), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>.
- (57) Elias, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E. A. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008**, *48* (5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>.
- (58) Roullier-Gall, C.; Witting, M.; Gougeon, R. D.; Schmitt-Kopplin, P. High Precision Mass Measurements for Wine Metabolomics. *Front. Chem.* **2014**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00102>.
- (59) Cejudo-Bastante, M. J.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Castro-Vázquez, L. I.; Pérez-Coello, M. S. Hydroxylation and Bottle Storage of Chardonnay White Wines: Effects on Color-Related Phenolics, Volatile Composition, and Sensory Characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (8), 4171–4182. <https://doi.org/10.1021/jf104744q>.
- (60) Schneider, V. Must Hydroxylation: A Review. *Am J Enol Vitic.* **1998**, *49* (1), 65–73.
- (61) Cheynier, V. Hydroxylation: Influence of Various Oxygen Supply Levels on Oxidation Kinetics of Phenolic Compounds and Wine Quality | VITIS - Journal of Grapevine Research. *Vitis* **1991**, *30* (2), 107–115.
- (62) Coelho, C.; Aron, A.; Roullier-Gall, C.; Gonsior, M.; Schmitt-Kopplin, P.; Gougeon, R. D. Fluorescence Fingerprinting of Bottled White Wines Can Reveal Memories Related to Sulfur Dioxide Treatments of the Must. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (16), 8132–8137. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00388>.
- (63) Pérez-Serradilla, J. A.; de Castro, M. D. L. Role of Lees in Wine Production: A Review. *Food Chemistry* **2008**, *111* (2), 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.019>.

- (64) Martínez, J. M.; Delso, C.; Maza, M. A.; Álvarez, I.; Raso, J. Pulsed Electric Fields Accelerate Release of Mannoproteins from *Saccharomyces Cerevisiae* during Aging on the Lees of Chardonnay Wine. *Food Research International* **2019**, *116*, 795–801. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.013>.
- (65) Jara-Palacios, M. J. Wine Lees as a Source of Antioxidant Compounds. *Antioxidants* **2019**, *8* (2), 45. <https://doi.org/10.3390/antiox8020045>.
- (66) Pérez-Bibbins, B.; Torrado-Agrasar, A.; Salgado, J. M.; Oliveira, R. P. de S.; Domínguez, J. M. Potential of Lees from Wine, Beer and Cider Manufacturing as a Source of Economic Nutrients: An Overview. *Waste Management* **2015**, *40*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.009>.
- (67) Guilloux-Benatier, M.; Chassagne, D. Comparison of Components Released by Fermented or Active Dried Yeasts after Aging on Lees in a Model Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (3), 746–751. <https://doi.org/10.1021/jf020135j>.
- (68) Palacios, S.; Vasserot, Y.; Maujean, A. Evidence For Sulfur Volatile Products Adsorption by Yeast Lees. *Am J Enol Vitic.* **1997**, *48* (4), 525–526.
- (69) Fowles, G. W. A. Sulphur Compounds in Fermented Liquors: A Review. *Journal of Wine Research* **1994**, *5* (2), 103–112. <https://doi.org/10.1080/09571269408717989>.
- (70) Gallardo-Chacón, J. J.; Vichi, S.; Urpí, P.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Antioxidant Activity of Lees Cell Surface during Sparkling Wine Sur Lie Aging. *International Journal of Food Microbiology* **2010**, *143* (1), 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.027>.
- (71) Garde-Cerdán, T.; Ancín-Azpilicueta, C. Review of Quality Factors on Wine Ageing in Oak Barrels. *Trends in Food Science & Technology* **2006**, *17* (8), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.01.008>.
- (72) Cerdán, T. G.; Goñi, D. T.; Azpilicueta, C. A. Accumulation of Volatile Compounds during Ageing of Two Red Wines with Different Composition. *Journal of Food Engineering* **2004**, *65* (3), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.01.032>.
- (73) Coelho, E.; Domingues, L.; Teixeira, J. A.; Oliveira, J. M.; Tavares, T. Understanding Wine Sorption by Oak Wood: Modeling of Wine Uptake and Characterization of Volatile Compounds Retention. *Food Research International* **2019**, *116*, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.025>.
- (74) Barrera-García, V. D.; Gougeon, R. D.; Karbowiak, T.; Voilley, A.; Chassagne, D. Role of Wood Macromolecules on Selective Sorption of Phenolic Compounds by Wood. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (18), 8498–8506. <https://doi.org/10.1021/jf801314n>.
- (75) Barrera-García, V. D.; Chassagne, D.; Paulin, C.; Raya, J.; Hirschinger, J.; Voilley, A.; Bellat, J.-P.; Gougeon, R. D. Interaction Mechanisms between Guaiacols and Lignin: The Conjugated Double Bond Makes the Difference. *Langmuir* **2011**, *27* (3), 1038–1043. <https://doi.org/10.1021/la103810q>.
- (76) Barrera-García, V. D.; Gougeon, R. D.; Voilley, A.; Chassagne, D. Sorption Behavior of Volatile Phenols at the Oak Wood/Wine Interface in a Model System. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (11), 3982–3989. <https://doi.org/10.1021/jf053043d>.
- (77) Zhang, B.; Cai, J.; Duan, C.-Q.; Reeves, M. J.; He, F. A Review of Polyphenolics in Oak Woods. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (4), 6978–7014. <https://doi.org/10.3390/ijms16046978>.
- (78) del Alamo Sanza, M.; Nevares Domínguez, I.; Cárcel Cárcel, L. M.; Navas Gracia, L. Analysis for Low Molecular Weight Phenolic Compounds in a Red Wine Aged in Oak Chips. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513* (1), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.041>.
- (79) Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. A Study of the Antioxidant Capacity of Oak Wood Used in Wine Ageing and the

- Correlation with Polyphenol Composition. *Food Chemistry* **2011**, *128* (4), 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.005>.
- (80) Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Herminos-Gutiérrez, I.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Different Woods Used in Cooperage. *Food Chemistry* **2011**, *129* (4), 1584–1590. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.013>.
- (81) Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.
- (82) Pisoschi, A. M.; Negulescu, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* **2012**, *01* (01). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000106>.
- (83) Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* **2009**, *2* (1), 41–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>.
- (84) Rodier, J.; Legube, B.; Merlet, N. *L'analyse de l'eau - 10e éd.*; Dunod, 2016.
- (85) Arnao, M. B. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, *11* (11), 419–421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9).
- (86) Kilmartin, P. A.; Zou, H.; Waterhouse, A. L. A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (4), 1957–1965. <https://doi.org/10.1021/jf001044u>.
- (87) Ugliano, M. Rapid Fingerprinting of White Wine Oxidizable Fraction and Classification of White Wines Using Disposable Screen Printed Sensors and Derivative Voltammetry. *Food Chemistry* **2016**, *212*, 837–843. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.156>.
- (88) Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A. Uncovering the Influence of Antioxidants on Polyphenol Oxidation in Wines Using an Electrochemical Method: Cyclic Voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2009**, *633* (1), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.05.007>.
- (89) Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A. The Use of Cyclic Voltammetry for Wine Analysis: Determination of Polyphenols and Free Sulfur Dioxide. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *668* (2), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.064>.
- (90) Danilewicz, J. C.; Tunbridge, P.; Kilmartin, P. A. Wine Reduction Potentials: Are These Measured Values Really Reduction Potentials? *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (15), 4145–4153. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00127>.
- (91) Gonzalez, A.; Vidal, S.; Ugliano, M. Untargeted Voltammetric Approaches for Characterization of Oxidation Patterns in White Wines. *Food Chemistry* **2018**, *269*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.104>.
- (92) Martins, R. C.; Oliveira, R.; Bento, F.; Geraldo, D.; Lopes, V. V.; Guedes de Pinho, P.; Oliveira, C. M.; Silva Ferreira, A. C. Oxidation Management of White Wines Using Cyclic Voltammetry and Multivariate Process Monitoring. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (24), 12092–12098. <https://doi.org/10.1021/jf8021628>.
- (93) Parra, V.; Arrieta, Á. A.; Fernández-Escudero, J.-A.; Rodríguez-Méndez, M. L.; De Saja, J. A. Electronic Tongue Based on Chemically Modified Electrodes and Voltammetry for the Detection of Adulterations in Wines. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, *118* (1), 448–453. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.043>.
- (94) Carmona-Jiménez, Y.; García-Moreno, M. V.; Igartuburu, J. M.; Garcia Barroso, C. Simplification of the DPPH Assay for Estimating the Antioxidant Activity of Wine and Wine By-Products. *Food Chemistry* **2014**, *165*, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.106>.

- (95) Popovici, C.; Saykova, I. Evaluation de l'activité Antioxydant Des Composés Phénoliques Par La Réactivité Avec Le Radical Libre DPPH. *Revue de génie industriel* **2009**, *4*, 25–39.
- (96) Comuzzo, P.; Battistutta, F.; Vendrame, M.; Páez, M. S.; Luisi, G.; Zironi, R. Antioxidant Properties of Different Products and Additives in White Wine. *Food Chemistry* **2015**, *168*, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.028>.
- (97) Eklund, P. C.; Långvik, O. K.; Wärnå, J. P.; Salmi, T. O.; Willför, S. M.; Sjöholm, R. E. Chemical Studies on Antioxidant Mechanisms and Free Radical Scavenging Properties of Lignans. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (18), 3336–3347. <https://doi.org/10.1039/B506739A>.
- (98) Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Comparison of Antioxidant Activity of Wine Phenolic Compounds and Metabolites in Vitro. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *538* (1), 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.016>.
- (99) Locatelli, M.; Gindro, R.; Travaglia, F.; Coisson, J.-D.; Rinaldi, M.; Arlorio, M. Study of the DPPH-Scavenging Activity: Development of a Free Software for the Correct Interpretation of Data. *Food Chemistry* **2009**, *114* (3), 889–897. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.035>.
- (100) Dizhbite, T.; Telysheva, G.; Jurkjaane, V.; Viesturs, U. Characterization of the Radical Scavenging Activity of Lignins—Natural Antioxidants. *Bioresource Technology* **2004**, *95* (3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.024>.
- (101) Bortolomeazzi, R.; Sebastianutto, N.; Toniolo, R.; Pizzariello, A. Comparative Evaluation of the Antioxidant Capacity of Smoke Flavouring Phenols by Crocin Bleaching Inhibition, DPPH Radical Scavenging and Oxidation Potential. *Food Chemistry* **2007**, *100* (4), 1481–1489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.039>.
- (102) Kedare, S. B.; Singh, R. P. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *J Food Sci Technol* **2011**, *48* (4), 412–422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>.
- (103) Cheignon, C. Oxidation of the Amyloid-Beta Peptide and Consequences on the Etiology of Alzheimer's Disease. thesis, Toulouse 3, 2016.
- (104) Dutoit, C.-E. Etude par resonance paramagnetique electronique des composés organiques (tm_{ttf})_{2x} (x=asf₆, pf₆ et sbf₆). phdthesis, Aix-Marseille Université (AMU), 2016.
- (105) Brandicourt, S. Utilisation de la résonance paramagnétique électronique pour l'étude de la réactivité des radicaux libres générés lors de l'oxydation enzymatique de l'acide linoléique par la lipoxygénase. 141.
- (106) Staško, A.; Liptáková, M.; Malík, F.; Mišík, V. Free Radical Scavenging Activities of White and Red Wines: An EPR Spin Trapping Study. *Appl Magn Reson* **2002**, *22* (1), 101. <https://doi.org/10.1007/BF03170526>.
- (107) Staško, A.; Polovka, M.; Brezová, V.; Biskupič, S.; Malík, F. Tokay Wines as Scavengers of Free Radicals (an EPR Study). *Food Chemistry* **2006**, *96* (2), 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.022>.
- (108) Elias, R. J.; Andersen, M. L.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A. L. Identification of Free Radical Intermediates in Oxidized Wine Using Electron Paramagnetic Resonance Spin Trapping. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (10), 4359–4365. <https://doi.org/10.1021/jf8035484>.
- (109) Kreitman, G. Y.; Laurie, V. F.; Elias, R. J. Investigation of Ethyl Radical Quenching by Phenolics and Thiols in Model Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (3), 685–692. <https://doi.org/10.1021/jf303880g>.

- (110) Nikolantonaki, M.; Coelho, C.; Noret, L.; Zerbib, M.; Vileno, B.; Champion, D.; Gougeon, R. D. Measurement of White Wines Resistance against Oxidation by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Food Chemistry* **2019**, *270*, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.052>.
- (111) López, R.; Lapeña, A. C.; Cacho, J.; Ferreira, V. Quantitative Determination of Wine Highly Volatile Sulfur Compounds by Using Automated Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Pulsed Flame Photometric Detection: Critical Study and Optimization of a New Procedure. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1143* (1–2), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.053>.
- (112) Kallithraka, S.; Salacha, M. I.; Tzourou, I. Changes in Phenolic Composition and Antioxidant Activity of White Wine during Bottle Storage: Accelerated Browning Test versus Bottle Storage. *Food Chemistry* **2009**, *113* (2), 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.083>.
- (113) Elias, R. J.; Laurie, V. F.; Ebeler, S. E.; Wong, J. W.; Waterhouse, A. L. Analysis of Selected Carbonyl Oxidation Products in Wine by Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626* (1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.07.048>.
- (114) Gabrielli, M.; Fracassetti, D.; Tirelli, A. UHPLC Quantification of Sotolon in White Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (21), 4878–4883. <https://doi.org/10.1021/jf500508m>.
- (115) Favre, L. Caractérisation par analyse métabolomique de biomarqueurs bactériens au sein de biofilms marins. phdthesis, Université de Toulon, 2017.
- (116) Roux, A. Analyse Du Metabolome Urinaire Humain Par Chromatographie Liquide Couplee A La Spectrometrie De Masse A Haute Resolution. phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011.
- (117) Werner, E. Analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse : application à la recherche de biomarqueurs indirects d'induction enzymatique. phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2011.
- (118) Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26* (1), 51–78. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>.
- (119) Lv, H. Mass Spectrometry-Based Metabolomics towards Understanding of Gene Functions with a Diversity of Biological Contexts. *Mass Spectrometry Reviews* **2013**, *32* (2), 118–128. <https://doi.org/10.1002/mas.21354>.
- (120) Corrélacion non paramétrique <http://www.cons-dev.org/elearning/ando/06/61/61.html> (accessed Feb 22, 2019).
- (121) Corrélacions de Pearson et de Spearman http://www.info.univ-angers.fr/~gh/wstat/R15/demor5Biostats_org.html (accessed Feb 22, 2019).
- (122) Sumner, L. W.; Lei, Z.; Nikolau, B. J.; Saito, K.; Roessner, U.; Trengove, R. Proposed Quantitative and Alphanumeric Metabolite Identification Metrics. *Metabolomics* **2014**, *10* (6), 1047–1049. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0739-6>.
- (123) Schymanski, E. L.; Jeon, J.; Gulde, R.; Fenner, K.; Ruff, M.; Singer, H. P.; Hollender, J. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (4), 2097–2098. <https://doi.org/10.1021/es5002105>.
- (124) Liu, Y.; Forcisi, S.; Lucio, M.; Harir, M.; Bahut, F.; Deleris-Bou, M.; Krieger-Weber, S.; Gougeon, R. D.; Alexandre, H.; Schmitt-Kopplin, P. Digging into the Low Molecular Weight Peptidome with the OligoNet Web Server. *Scientific Reports* **2017**, *7* (1), 11692. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11786-w>.
- (125) He, Y.; Harir, M.; Chen, G.; Gougeon, R. D.; Zhang, L.; Huang, X.; Schmitt-Kopplin, P. Capillary Electrokinetic Fractionation Mass Spectrometry (CEkF/MS): Technology

- Setup and Application to Metabolite Fractionation from Complex Samples Coupled at-Line with Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry. *ELECTROPHORESIS* **2014**, *35* (14), 1965–1975. <https://doi.org/10.1002/elps.201400041>.
- (126) Gao, S.; Zhang, Z.-P.; Karnes, H. T. Sensitivity Enhancement in Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry Using Derivatization and Mobile Phase Additives. *Journal of Chromatography B* **2005**, *825* (2), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.04.021>.
- (127) Huang, Y.-Q.; Ruan, G.-D.; Liu, J.-Q.; Gao, Q.; Feng, Y.-Q. Use of Isotope Differential Derivatization for Simultaneous Determination of Thiols and Oxidized Thiols by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2011**, *416* (2), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.020>.
- (128) Guo, X.-F.; Wang, H.; Guo, Y.-H.; Zhang, Z.-X.; Zhang, H.-S. Simultaneous Analysis of Plasma Thiols by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Using a New Probe, 1,3,5,7-Tetramethyl-8-Phenyl-(4-Iodoacetamido)Difluoroboradiaza-s-Indacene. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (18), 3874–3880. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.083>.
- (129) Inoue, K.; Nishimura, M.; Tsutsui, H.; Min, J. Z.; Todoroki, K.; Kauffmann, J.-M.; Toyo'oka, T. Foodomics Platform for the Assay of Thiols in Wines with Fluorescence Derivatization and Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Using Multivariate Statistical Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (6), 1228–1234. <https://doi.org/10.1021/jf304822t>.
- (130) Kuśmierk, K.; Bald, E. Reversed-Phase Liquid Chromatography Method for the Determination of Total Plasma Thiols after Derivatization with 1-Benzyl-2-Chloropyridinium Bromide. *Biomedical Chromatography* **2009**, *23* (7), 770–775. <https://doi.org/10.1002/bmc.1183>.
- (131) Seiwert, B.; Karst, U. Simultaneous LC/MS/MS Determination of Thiols and Disulfides in Urine Samples Based on Differential Labeling with Ferrocene-Based Maleimides. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (18), 7131–7138. <https://doi.org/10.1021/ac071016b>.
- (132) Dayon, L.; Roussel, C.; Girault, H. H. Probing Cysteine Reactivity in Proteins by Mass Spectrometric EC-Tagging. *J. Proteome Res.* **2006**, *5* (4), 793–800. <https://doi.org/10.1021/pr050365o>.
- (133) Jongberg, S.; Gislason, N. E.; Lund, M. N.; Skibsted, L. H.; Waterhouse, A. L. Thiol–Quinone Adduct Formation in Myofibrillar Proteins Detected by LC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (13), 6900–6905. <https://doi.org/10.1021/jf200965s>.
- (134) Nikolantonaki, M.; Waterhouse, A. L. A Method To Quantify Quinone Reaction Rates with Wine Relevant Nucleophiles: A Key to the Understanding of Oxidative Loss of Varietal Thiols. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (34), 8484–8491. <https://doi.org/10.1021/jf302017j>.
- (135) Qi, B.-L.; Liu, P.; Wang, Q.-Y.; Cai, W.-J.; Yuan, B.-F.; Feng, Y.-Q. Derivatization for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *59*, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.013>.
- (136) Romanet, R.; Coelho, C.; Liu, Y.; Bahut, F.; Ballester, J.; Nikolantonaki, M.; Gougeon, R. D. The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds: An Optimized DPPH Assay. *Molecules* **2019**, *24* (7), 1353. <https://doi.org/10.3390/molecules24071353>.
- (137) Danilewicz, J. C. The Folin-Ciocalteu, FRAP, and DPPH• Assays for Measuring Polyphenol Concentration in White Wine. *Am J Enol Vitic.* **2015**, *ajev.2015.15025*. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15025>.

- (138) Abramovič, H.; Košmerl, T.; Poklar Ulrih, N.; Cigić, B. Contribution of SO₂ to Antioxidant Potential of White Wine. *Food Chemistry* **2015**, *174*, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.030>.
- (139) Pegram, Z.; Kwasniewski, M. T.; Sacks, G. L. Simplified Method for Free SO₂ Measurement Using Gas Detection Tubes. *Am J Enol Vitic.* **2013**, *64* (3), 405–410. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13003>.
- (140) Roullier-Gall, C.; Kanawati, B.; Hemmler, D.; Druschel, G. K.; Gougeon, R. D.; Schmitt-Kopplin, P. Electrochemical Triggering of the Chardonnay Wine Metabolome. *Food Chemistry* **2019**, *286*, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.149>.
- (141) Dunn, W. B.; Erban, A.; Weber, R. J. M.; Creek, D. J.; Brown, M.; Breitling, R.; Hankemeier, T.; Goodacre, R.; Neumann, S.; Kopka, J.; et al. Mass Appeal: Metabolite Identification in Mass Spectrometry-Focused Untargeted Metabolomics. *Metabolomics* **2013**, *9* (1), 44–66. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>.
- (142) Monagas, M.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2005**, *45* (2), 85–118. <https://doi.org/10.1080/10408690490911710>.
- (143) Pozo-Bayón, M. Á.; Hernández, M. T.; Martín-Álvarez, P. J.; Polo, M. C. Study of Low Molecular Weight Phenolic Compounds during the Aging of Sparkling Wines Manufactured with Red and White Grape Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (7), 2089–2095. <https://doi.org/10.1021/jf021017z>.
- (144) Baderschneider, B.; Winterhalter, P. Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (6), 2788–2798. <https://doi.org/10.1021/jf010396d>.
- (145) Fagali, N.; Catalá, A. Antioxidant Activity of Conjugated Linoleic Acid Isomers, Linoleic Acid and Its Methyl Ester Determined by Photoemission and DPPH Techniques. *Biophysical Chemistry* **2008**, *137* (1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.07.001>.
- (146) Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Moyá, M. L.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. Radical Scavenging Ability of Polyphenolic Compounds towards DPPH Free Radical. *Talanta* **2007**, *71* (1), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.050>.
- (147) Dimitrova, M.; Turmanova, S.; Vassilev, K. Complexes of Glutathione with Heavy Metals as Catalysts for Oxidation. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* **2009**, *99* (1), 69–78. <https://doi.org/10.1007/s11144-009-0118-x>.
- (148) Ma, L.; Bueschl, C.; Schuhmacher, R.; Waterhouse, A. L. Tracing Oxidation Reaction Pathways in Wine Using ¹³C Isotopolog Patterns and a Putative Compound Database. *Analytica Chimica Acta* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.019>.
- (149) Cejudo-Bastante, M. J.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Castro-Vázquez, L. I.; Pérez-Coello, M. S. Hyperoxygenation and Bottle Storage of Chardonnay White Wines: Effects on Color-Related Phenolics, Volatile Composition, and Sensory Characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (8), 4171–4182. <https://doi.org/10.1021/jf104744q>.
- (150) Psarra, E.; Makris, D. P.; Kallithraka, S.; Kefalas, P. Evaluation of the Antiradical and Reducing Properties of Selected Greek White Wines: Correlation with Polyphenolic Composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2002**, *82* (9), 1014–1020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1124>.
- (151) Sioumis, N.; Kallithraka, S.; Makris, D. P.; Kefalas, P. Kinetics of Browning Onset in White Wines: Influence of Principal Redox-Active Polyphenols and Impact on the Reducing Capacity. *Food Chemistry* **2006**, *1* (94), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.059>.

Table des illustrations

Figures

<i>Figure 1 : Schématisation de l'impact de l'oxydation du vin blanc sur ces propriétés organoleptiques.</i>	8
<i>Figure 2 : Représentation de la réduction de l'oxygène jusqu'à une molécule d'eau avec la formation des ERO et de leurs formes majoritaires au pH du vin (entre 3 et 4) ²⁴.</i>	9
<i>Figure 3 : Mécanismes d'oxydation menant au brunissement dans le moût ²⁶.</i>	10
<i>Figure 4 : Schéma global des réactions d'oxydo-réduction en œuvre dans le vin. Les flèches réactionnelles rouges signifient la création d'espèces radicalaire hautement réactives, les vertes indiquent un effet antioxydant de la réaction. Nu représente un composé nucléophile.</i>	17
<i>Figure 5 A : Voltammogrammes linéaires obtenus pour différents vins blancs issus de plusieurs cépages, B : Dérivée des courant obtenus. D'après les travaux d'Ugliano ⁸⁷.</i>	25
<i>Figure 6 : Changement de couleur de la solution de DPPH dû à la réduction du radical DPPH par différentes concentrations d'acide gallique (concentrations croissantes de gauche à droite, 0 à 0.5 mM).</i>	26
<i>Figure 7 : Schématisation de la dégénérescence des électrons avec l'application d'un champ magnétique et l'apparition des niveaux de Zeeman. ¹⁰⁴</i>	27
<i>Figure 8 : Visualisation du signal d'absorption du champ magnétique en fonction du champ B_0 appliqué, ainsi que sa dérivée $I^{ère}$ ¹⁰³.</i>	28
<i>Figure 9 : Cinétique de formation de l'adduit POBN-HER obtenue après initiation de l'oxydation par la réaction de Fenton pour des Chardonnays de différents millésimes en comparaison à un vin modèle ¹¹⁰.</i>	29
<i>Figure 10 : Schéma d'une source d'ionisation électrospray ¹¹⁵.</i>	33
<i>Figure 11 A : ACP obtenue à partir de l'analyse LC-QToF-MS en mode d'ionisation négatif de vins en cours d'élevage. Les groupes ont été déterminés par CAH (B).</i>	36
<i>Figure 12 A : PLS-DA obtenue pour la séparation de 92 vins analysés par LC-QToF-MS en mode positif avant et après dérivatisation à l'aide de 4-méthyle-1,2-benzoquinone. B : Validation du modèle correspondant.</i>	37
<i>Figure 13 : Exemple du calcul de corrélation de Spearman entre les résultats LC-QToF-MS et DPPH permettant d'obtenir pour chaque couple m/z-TR la p-Value et la corrélation avec la valeur Ec_{20}.</i>	38
<i>Figure 14 A : Exemple de profil isotopique obtenu par analyse LC-QToF-MS en mode d'ionisation positif, ici pour le GSH, ainsi que les formules élémentaires possibles déterminées par l'outil SmartFormula (Bruker), la formule correspondant au GSH est surlignée en vert. B : profil isotopique théorique de l'atome de Soufre, C : de l'atome de Carbone déterminés avec IsotopePattern (Bruker).</i>	40
<i>Figure 15 : Schématisation de l'échelle de confiance pour l'identification de composés par LC-MS ¹²³.</i>	41
<i>Figure 16 : Schéma représentant le protocole expérimental, d'après le rapport de stage DNO de Julie Caiveau.</i>	50
<i>Figure 17 : Résultat obtenu pour l'analyse de la capacité antioxydante du GSH par DPPH. La droite rouge représente la droite de régression, les droites bleus représentent l'intervalle de confiance de 95% autour de celle-ci et les pointés matérialisent Ec_{20}.</i>	53
<i>Figure 18 A : Spectre RPE obtenu pour l'adduit POBN-HER après initiation chimique par la voie de Fenton. L'amplitude (A) est calculée pour déterminer la quantité d'adduits détectés. B : Cinétique obtenue pour un vin modèle et un Chardonnay après fermentation alcoolique (R-17-95). L'amplitude normée par l'amplitude maximale du vin modèle est représentée en fonction du temps.</i>	54

Figure 19 : Visualisation des 3 variables déterminées par RPE pour la comparaison de la capacité antioxydante, l'amplitude normée maximale (Max), le temps au maximum (T_{Max}) et la 1 ^{ère} Pente. L'analyse a été réalisée sur un Chardonnay issu du millésime 2017, en fin FA (R-17-95).	55
Figure 20 : UHPLC Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher) couplée au spectromètre de masse Maxis plus MS ESI-Q-TOF -Bruker).....	56
Figure 21 : ACP réalisée à partir de données LC-QToF-MS en mode négatif sur différents vins en cours d'élevage (68 vins) permettant de vérifier la stabilité analytique au cours de l'analyse.	57
Figure 22 : Spectromètre de masse FTICR-MS Solaris (Bruker)	59
Figure 23 : Représentation de la cinétique de formation du radical POBN-HER après initiation chimique par la voie de Fenton pour plusieurs vins modèles (12% EtOH, pH 3.2, 6g/L Acide Tartrique). A : Amplitude sans correction, B : Amplitude normée par le maximum obtenu par chaque vin modèle.....	78
Figure 24 : Cinétique de formation du radical POBN-HER par RPE après initiation chimique de l'oxydation pour différents vins issus du millésime 2016 et 2017 après un an d'élevage et fin FA, respectivement.....	79
Figure 25 : Représentation du nombre d'ions corrélés (Spearman, $r > 0.6 $) avec les variables DPPH et RPE isolées par FT-ICR-MS en mode négatif par l'analyse de 35 vins du millésime 2017 après 4 mois d'élevage.	81
Figure 26 : Digrammes de Van Krevelen représentant le rapport H/C en fonction de O/C pour les ions corrélés à Ec_{20} (A), à T_{Max} (C) à Max (E), et à 1 ^{ère} Pente (F). Les figures B et D représentent le rapport H/C en fonction de la masse m/z de l'ion pour Ec_{20} et T_{Max} , respectivement. Les cercles pleins représentent les masses corrélées négativement, les cercles vides les masses corrélées positivement aux variables. Les analyses ont été réalisées sur 35 vins du millésime 2017 après 4 mois d'élevage.	83
Figure 27 : Discrimination de 106 vins en cours d'élevage en fonction de leur capacité antioxydante globale déterminée par DPPH et RPE, A : biplot réalisé par ACP, B : CAH permettant la discrimination de groupe de similarité.....	85
Figure 28 : Heatmap représentant les 380 couples m/z-TR isolés en fonction de leur corrélation avec les variables Ec_{20} , Max, T_{Max} et 1 ^{ère} Pente, vert : corrélé négativement, rouge : corrélé positivement, blanc : non corrélé. La réalisation d'un dendrogramme permet la discrimination des couples m/z-TR en 3 groupes. Le groupe 1 correspond aux couples m/z-TR globalement marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH mais faible par RPE, le groupe 2 au couples marqueurs d'une capacité antioxydante faible si l'on considère Ec_{20} , Max et T_{Max} mais forte via 1 ^{ère} Pente et le groupe 3 correspond aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante forte pour les deux méthodes d'analyses DPPH et RPE.	89
Figure 29 : Evolution du paramètre Ec_{20} moyen, sur les 14 vins issus d'appellations de Bourgogne, à différents stades d'élevage. Les lettres montrent les groupes significatifs déterminés par ANOVA suivi du test de Tukey (HSD) pour les différentes durées d'élevage (p -Value<0.05).....	128
Figure 30 : Cinétique d'évolution de la capacité antioxydante obtenue par DPPH pour plusieurs vins de millésime 2017 au cours de l'élevage.....	129
Figure 31 : Nombre de marqueurs moléculaires isolés à différents temps d'élevage pour des vins issus de différentes appellations de Bourgogne (14). Les groupes 1, 2 et 3 représentent les groupes déterminés au chapitre 2 : le groupe 1 correspond aux couples m/z-TR globalement marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH mais faible par RPE, le groupe 2 au couples marqueurs d'une capacité	

- antioxydante faible avec les variables Ec_{20} , Max et T_{Max} mais élevée via 1^{ère} Pente et le groupe 3 correspond aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante forte par analyse DPPH et RPE. Les lettres montrent un nombre total de marqueurs significativement différent entre les différentes durées d'élevage, déterminé par ANOVA suivi du test de Tukey (HSD) (p -Value<0.05). 131*
- Figure 32 : Discrimination des vins au cours de l'élevage à l'aide des marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante isolés précédemment (380) : en orange les composés du groupe 1, en vert les composés du groupe 2 et en bleu les composés du groupe 3. Le groupe 1 correspond aux couples m/z-TR globalement marqueurs d'une capacité antioxydante élevée par DPPH mais faible par RPE, le groupe 2 au couples marqueurs d'une capacité antioxydante faible avec les variables Ec_{20} , Max et T_{Max} mais élevée via 1^{ère} Pente et le groupe 3 correspond aux couples marqueurs d'une capacité antioxydante forte par analyse DPPH et RPE. Pour réaliser cette heatmap, les composés isolés ont été filtrés par présence ou absence dans l'échantillon. Résultats obtenus à partir des analyses LC-QToF-MS en mode positif..... 132*
- Figure 33 : Evolution du nombre de composés nucléophiles détectés au cours de l'élevage. L'annotation des peptides et d'autres composés a été réalisée à l'aide d'Oligonet¹²⁴. Les différentes lettres marquent des groupes statistiquement différents par ANOVA et test de Tukey HSD (p <0.05). 134*
- Figure 34 : Evolution pendant un an d'élevage de la capacité antioxydante déterminée par DPPH des vins du millésime 2017 issus des différentes modalités de sulfitage des moûts. Les résultats sont issus de l'échantillon correspondant à un mélange de 5 fûts. Les lettres indiquent une différence significative déterminée par ANOVA et test de Tukey HSD (p <0.05), en minuscule pour les vins fin FA, en majuscule après 1 an d'élevage. 139*
- Figure 35 : Discrimination des vins issus de moûts hyperoxygénés ou sulfités à l'aide d'un CAH. Les marqueurs moléculaires liés à la capacité antioxydante ont été filtrés par le test de Wilcoxon (p Value < 0.05), significativité entre modalités hyperoxygénées et sulfitées, afin de réduire le nombre de composés isolés (110). En rouge les composés ayant une intensité plus élevée, en bleu plus faible. L'intensité a été normée sur une échelle de -1 à 1, allant du moins intense au plus intense. Résultats à partir des analyses LC-QToF-MS en mode positif sur les échantillons après 5 mois d'élevage en fûts..... 142*
- Figure 36 : Nombre de composés nucléophiles isolés (134) pour chaque modalité après 5 mois d'élevage. L'analyse a été réalisée sur le réplica de 2 fûts. Les lettres marquent des groupes déterminés par ANOVA puis du test de Tukey (HSD), p -Value<0.05. 143*
- Figure 37 : Discrimination des modalités à l'aide des composés nucléophiles isolés (134). En rouge les composés ayant une intensité plus élevée, en bleu plus faible. L'intensité a été normée sur une échelle de -1 à 1, allant du moins intense au plus intense. Résultats à partir des analyses LC-QToF-MS en mode positif sur les échantillons après 5 mois d'élevage en fûts. 145*

Tableaux

Tableau 1 : Exemple de matrice obtenue pour des vins analysés en LC-QToF-MS en mode positif. #Variable représente le numéro donné à chaque couple m/z -TR lors du traitement de données, facilitant celui-ci, m/z correspond au rapport masse sur charge détecté, TR au temps de rétention en minutes. Les valeurs pour chaque échantillon correspondent à l'intensité de l'ion détecté.	35
Tableau 2 : Scores attribués en fonction de l'analyse réalisée. ¹²²	42
Tableau 3 : Liste des réactifs et solvants utilisés pour les différentes analyses.	48
Tableau 4 : Tableau récapitulatif du nombre de vin en cours d'élevage analysés en fonction du cépage et du millésime.....	51
Tableau 5 : Tableau de corrélations de Spearman obtenus entre les différentes variables RPE et DPPH sur l'analyse de 106 vins en cours d'élevage. En gras, les variables significativement corrélées (p -Value < 0.01).....	80
Tableau 6 : Présentation de la gamme de valeurs obtenues pour les 106 vins en cours d'élevage analysés par DPPH et RPE. 16 vins sont issus du millésime 2016 et ont été analysés après un an d'élevage, 90 vins ont été analysés pour le millésime 2017 avec des analyses fin FA, après 1 mois, 2 mois et 4 mois d'élevage.	84
Tableau 7 : Composés isolés dans la liste de marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante annotés à l'aide de FT-ICR-MS. La tableau présente la masse neutre calculée à partir de l'ion détecté en mode positif ou négatif à partir de $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$, le temps de rétention en minutes, le groupe auquel il appartient (1, 2 ou 3), le mode d'ionisation utilisé lors de sa détection positif (+) ou négatif (-), la corrélation positive (rouge) ou négative (vert) avec les variables RPE et DPPH, la formule élémentaire déterminée par FT-ICR-MS, une identification possible de l'ion, enfin Réf présente si une étude de la capacité antioxydante a déjà été réalisé sur le composé annoté.	91
Tableau 8 : Présentation des composés communs entre la liste de composés nucléophiles et la liste de marqueurs moléculaires corrélés à la capacité antioxydante. Pour chaque composé, sont donnés la masse neutre calculé à partir de l'ion détecté ($[M+H+Q]^+$, $[M-H]^-$ ou $[M+H]^+$) le temps de rétention en minutes, l'erreur en ppm sur les masses neutres M, et une annotation possible. Les composés en gras correspondent aux composés qui ont également été détectés par FT-ICR-MS.	124
Tableau 9 : Concentrations (mg/L) en composés phénoliques des vins de chaque modalité après 5 mois d'élevage. Analyse réalisée sur le duplicata de fût par HPLC-DAD. Les lettres marquent les différences significatives entre les modalités pour chaque composé, déterminées par ANOVA suivi du test du Tukey HSD (p -Value<0.5).	140

Annexes

- Annexe 1 : Tableau récapitulatif des vins analysés au cours de cette étude, avec l'infirmité du cépage, du millésime, du temps de l'élevage, des résultats DPPH et RPE obtenues ainsi que l'utilisation des vins pour les différentes parties de l'étude. 170*
- Annexe 2 : Liste des marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante obtenus. Le tableau présente ici la formule élémentaire lorsqu'elle a été déterminée (par FTMS ou via le profil isotopique), la masse neutre du composé [M], le temps de rétention (en min), le mode d'ionisation auquel le composé a été isolé (-) négatif ou (+) positif, l'appartenance aux différents groupes et sous-groupes déterminés au cours de l'étude, ainsi qu'une annotation du composé isolé et le niveau de confiance en l'annotation lorsqu'il a été calculé. Pour les annotations dans un souci de clarté, les codes KEGG ont été utilisés ainsi que les numéros d'ID de Metlin, l'abréviation une lettre pour les acides aminés lorsqu'il peut s'agir de peptides. 180*
- Annexe 3 : Liste des composés nucléophiles isolés des différents vins blancs en cours d'élevage à l'aide de la méthode de dérivatisation avec la 4-méthyle-1,2-benzoquinone. Ce tableau présente la formule élémentaire déterminé à partir du profil isotopique, la masse m/z [M+H+Q]⁺ détectée, la masse neutre théorique du composé natif, le temps de rétention de(s) l'adduit(s), une annotation des composés, les fragments obtenus si une analyse MS² a été réalisée, ainsi que le niveau de confiance dans l'annotation si il a été calculé. Pour les annotations dans un souci de clarté, les codes KEGG ont été utilisés, ainsi que l'abréviation une lettre pour les acides aminés lorsqu'il peut s'agir de peptides. 194*

Annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des vins analysés au cours de cette étude, avec l'infirmité du cépage, du millésime, du temps de l'élevage, des résultats DPPH et RPE obtenues ainsi que l'utilisation des vins pour les différentes parties de l'étude.

Vins	Domaine	Cépage	Durée d'élevage	EC20	T _{Max}	Max	1 ^{ère} Pente	Comparaison RPE/DPPH	FTMS	Développement méthode composés nucléophiles	Effet de l'élevage	Effet des étapes pré-fermentaire
R-17-056	P	Chardonnay	2016-1an	20,21 ± 0,53	44	74,13	1,64	✓		✓	✓	
R-17-057	P	Chardonnay	2016-1an	18,63 ± 0,26	16	57,11	1,81	✓		✓	✓	
R-17-058	P	Chardonnay	2016-1an	17,93 ± 0,01	20	60,08	1,81	✓		✓	✓	
R-17-059	P	Chardonnay	2016-1an	20,05 ± 0,40	12	50,41	2,15	✓		✓	✓	
R-17-060	P	Chardonnay	2016-1an	21,33 ± 0,09	12	51,16	1,61	✓		✓	✓	
R-17-061	P	Chardonnay	2016-1an	21,16 ± 0,30	26	67,52	1,74	✓		✓	✓	
R-17-062	P	Chardonnay	2016-1an	25,53 ± 0,43	18	62,56	2,28	✓		✓	✓	
R-17-063	P	Chardonnay	2016-1an	24,91 ± 0,79	22	68,10	2,41	✓		✓		
R-17-064	P	Chardonnay	2017-fin-FA	34,75 ± 0,56	74	75,21	0,99	✓		✓	✓	
R-17-065	P	Chardonnay	2017-fin-FA	27,27 ± 0,28	88	94,46	1,26	✓		✓	✓	
R-17-066	P	Chardonnay	2017-fin-FA	26,82 ± 1,00	80	85,40	1,49	✓		✓	✓	
R-17-067	P	Chardonnay	2017-fin-FA	27,53 ± 0,25	96	80,96	1,24	✓		✓	✓	
R-17-068	P	Chardonnay	2017-fin-FA	29,54 ± 0,50	100	85,46	1,67	✓		✓	✓	
R-17-069	P	Chardonnay	2017-fin-FA	28,33 ± 0,20	76	92,19	1,80	✓		✓	✓	
R-17-070	P	Chardonnay	2017-fin-FA	27,15 ± 0,84	82	87,71	2,01	✓		✓	✓	
R-17-071	Lf	Chardonnay	2016-1an	18,93 ± 0,08	8	46,73	2,11	✓		✓	✓	
R-17-072	Lf	Chardonnay	2016-1an	20,47 ± 0,14	12	52,36	2,68	✓		✓	✓	
R-17-073	Lf	Chardonnay	2016-1an	19,57 ± 0,16	24	78,37	3,27	✓		✓	✓	
R-17-074	Lf	Chardonnay	2016-1an	19,96 ± 0,01	8	47,91	2,99	✓		✓	✓	
R-17-075	Lf	Chardonnay	2016-1an	18,80 ± 0,04	10	56,12	2,85	✓		✓	✓	
R-17-076	Lf	Chardonnay	2016-1an	19,06 ± 0,45	12	57,02	2,60	✓		✓	✓	
R-17-077	BIVB	Chardonnay	2016-1an	27,82 ± 0,31	66	71,46	1,52	✓		✓		
R-17-078	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	32,22 ± 1,05	54	62,94	1,72	✓		✓		
R-17-079	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	24,97 ± 0,29	60	65,42	1,44	✓		✓		
R-17-080	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	33,42 ± 0,56	68	81,94	1,57	✓		✓		

R-17-081	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	34,62 ± 0,02	56	70,50	1,42	✓		✓		
R-17-082	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	33,08 ± 0,37	70	89,05	1,41	✓		✓		
R-17-083	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	66,35 ± 1,53	72	81,36	1,13			✓		
R-17-084	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	42,55 ± 2,30	66	73,64	1,38	✓		✓		
R-17-085	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	31,34 ± 0,06	62	71,84	1,33	✓		✓		
R-17-086	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	36,57 ± 1,46	62	73,32	1,53	✓		✓		
R-17-087	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	40,67 ± 0,91	80	75,22	1,14	✓		✓		
R-17-088	BIVB	Chardonnay	2017-fin-FA	36,40 ± 0,62	78	93,69	1,09	✓		✓		
R-17-089	Lf	Chardonnay	2016-1an	18,29 ± 0,52	38	58,38	2,65	✓		✓	✓	
R-17-090	P	Chardonnay	2016-1an	22,24 ± 0,22	16	61,58	2,30	✓		✓		
R-17-091	LF	Chardonnay	2017-fin-FA	27,45 ± 0,67	70	86,76	1,36	✓		✓	✓	
R-17-092	LF	Chardonnay	2017-fin-FA	22,03 ± 0,63	70	90,14	1,61	✓		✓	✓	
R-17-093	LF	Chardonnay	2017-fin-FA	28,28 ± 0,43	66	91,80	1,59	✓		✓	✓	
R-17-094	LF	Chardonnay	2017-fin-FA	24,26 ± 2,20	80	98,21	1,56	✓		✓	✓	
R-17-095	LF	Chardonnay	2017-fin-FA	27,26 ± 0,14	76	84,47	1,38	✓		✓	✓	
R-17-096	LF	Chardonnay	2017-fin-FA	24,44 ± 0,43	68	77,17	1,23	✓		✓		
R-17-097	LF	Chardonnay	2017-fin-FA	27,11 ± 0,65	102	88,99	1,19	✓		✓	✓	
DNO-17-052	Ch	Chardonnay	2017-fin-FA	32,23 ± 0,08						✓		
DNO-17-053	Ch	Chardonnay	2017-fin-FA	84,67 ± 5,36						✓		
DNO-17-054	N	Chardonnay	2017-fin-FA	121,09 ± 15,06						✓		
DNO-17-055	N	Chardonnay	2017-fin-FA	112,08 ± 15,24						✓		
DNO-17-098	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	36,10 ± 0,07						✓		✓
DNO-17-099	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	38,10 ± 0,50						✓		✓
DNO-17-100	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	22,33 ± 0,06						✓		✓
DNO-17-101	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	22,78 ± 0,45						✓		✓
DNO-17-102	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	22,44 ± 0,16						✓		✓
DNO-17-103	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	22,24 ± 0,15						✓		✓
DNO-17-104	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	27,18 ± 0,97						✓		✓
DNO-17-105	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	28,37 ± 0,69						✓		✓
DNO-17-106	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	26,39 ± 0,49						✓		✓

DNO-17-107	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	30,86 ± 1,03						✓	✓	✓
DNO-17-108	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	39,09 ± 0,36	94	93,67	1,40	✓				✓
DNO-17-109	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	38,12 ± 0,06								✓
DNO-17-110	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	23,48 ± 0,30	90	88,89	2,07	✓				✓
DNO-17-111	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	22,03 ± 0,36								✓
DNO-17-112	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	22,01 ± 0,06	76	82,46	2,02	✓				✓
DNO-17-113	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	22,68 ± 0,34								✓
DNO-17-114	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	29,24 ± 0,85								✓
DNO-17-115	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	26,14 ± 0,37								✓
DNO-17-116	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	30,03 ± 0,37								✓
DNO-17-117	Lf	Chardonnay	2017-fin-FA	31,25 ± 0,62								✓
DNO-17-118	J	Chardonnay	2017-fin-FA	27,38 ± 0,62								
DNO-17-119	J	Chardonnay	2017-fin-FA	28,65 ± 0,04								
DNO-17-120	J	Chardonnay	2017-fin-FA	32,40 ± 0,91								
DNO-17-121	J	Chardonnay	2017-fin-FA	24,12 ± 0,79								
DNO-17-122	Lf	Chardonnay	2017-1mois	33,21 ± 1,62								✓
DNO-17-123	Lf	Chardonnay	2017-1mois	34,63 ± 0,28	84	94,98	1,40	✓				✓
DNO-17-124	Lf	Chardonnay	2017-1mois	35,52 ± 0,00								✓
DNO-17-125	Lf	Chardonnay	2017-1mois	20,67 ± 0,57								✓
DNO-17-126	Lf	Chardonnay	2017-1mois	21,57 ± 0,11	92	98,99	2,10	✓				✓
DNO-17-127	Lf	Chardonnay	2017-1mois	20,48 ± 0,16								✓
DNO-17-128	Lf	Chardonnay	2017-1mois	21,28 ± 0,07								✓
DNO-17-129	Lf	Chardonnay	2017-1mois	20,33 ± 0,06	80	83,73	2,16	✓				✓
DNO-17-130	Lf	Chardonnay	2017-1mois	20,97 ± 0,14								✓
DNO-17-131	Lf	Chardonnay	2017-1mois	26,40 ± 0,23								✓
DNO-17-132	Lf	Chardonnay	2017-1mois	26,86 ± 0,14	74	78,37	1,53	✓				✓
DNO-17-133	Lf	Chardonnay	2017-1mois	25,13 ± 0,13								✓
DNO-17-134	Lf	Chardonnay	2017-1mois	24,32 ± 1,52								✓
DNO-17-135	Lf	Chardonnay	2017-1mois	28,52 ± 0,20	80	87,86	1,39	✓				✓
DNO-17-136	Lf	Chardonnay	2017-1mois	29,25 ± 0,92								✓

DNO-17-137	Lf	Chardonnay	2017-1mois	25,47 ± 0,77	66	84,26	1,77	✓				✓
DNO-17-138	J	Chardonnay	2017-1mois	23,15 ± 0,31	62	83,02	1,90	✓				
DNO-17-139	J	Chardonnay	2017-1mois	26,99 ± 0,91	62	94,36	2,30	✓				
DNO-17-140	J	Chardonnay	2017-1mois	29,26 ± 0,57	62	85,33	1,99	✓				
DNO-17-141	J	Chardonnay	2017-1mois	21,76 ± 0,18	72	88,56	1,81	✓				
V-17-142	J	Chardonnay	2017-1mois	17,85 ± 0,74	86	100,39	1,57	✓				
V-17-143	J	Chardonnay	2017-1mois	18,98 ± 0,09	82	104,18	1,61	✓				
V-17-144	J	Chardonnay	2017-1mois	19,53 ± 0,60	84	99,40	1,55	✓				
V-17-145	J	Chardonnay	2017-1mois	17,51 ± 0,20	96	93,75	1,21	✓				
V-17-146	J	Chardonnay	2017-1mois	16,85 ± 0,02	92	93,90	1,60	✓				
V-17-147	J	Chardonnay	2017-1mois	18,41 ± 0,21	100	98,36	1,27	✓				
V-17-148	J	Chardonnay	2017-1mois	17,90 ± 0,11	80	86,94	1,46	✓				
V-17-149	J	Chardonnay	2017-1mois	19,08 ± 0,08	84	86,57	1,38	✓				
V-17-150	J	Chardonnay	2017-1mois	17,05 ± 0,21	86	89,96	1,23	✓				
V-17-151	J	Chardonnay	2017-1mois	17,11 ± 0,17								
V-17-152	J	Chardonnay	2017-1mois	17,93 ± 0,10								
V-17-153	J	Chardonnay	2017-1mois	17,18 ± 0,21								
V-17-154	J	Chardonnay	2017-1mois	17,52 ± 0,32								
V-17-155	M	Sauvignon Blanc	2017-1mois	15,56 ± 0,01								
V-17-156	M	Sauvignon Blanc	2017-1mois	13,09 ± 0,12								
V-17-157	M	Sauvignon Blanc	2017-1mois	14,07 ± 0,27								
V-17-158	M	Sauvignon Blanc	2017-1mois	15,00 ± 0,02								
V-17-159	M	Sauvignon Blanc	2017-1mois	15,03 ± 0,23								
V-17-160	M	Sauvignon Blanc	2017-1mois	15,91 ± 0,15								
V-17-016	P	Chardonnay	2017-fin-FA	32,63 ± 0,34						✓		
V-17-017	P	Chardonnay	2017-fin-FA	27,79 ± 0,52						✓		
V-17-018	P	Chardonnay	2017-fin-FA	36,54 ± 1,37						✓		
V-17-019	P	Chardonnay	2017-fin-FA	30,31 ± 0,32						✓		
V-17-020	P	Chardonnay	2017-fin-FA	29,22 ± 1,47						✓		
V-17-021	P	Chardonnay	2017-fin-FA	25,46 ± 0,16						✓		

V-17-022	Ltm	Sémillon	2017-fin-FA	31,46 ± 0,23						✓		
V-17-023	Ltm	Sémillon	2017-fin-FA	30,72 ± 0,16						✓		
V-17-024	Ltm	Sémillon	2017-fin-FA	33,30 ± 0,84						✓		
V-17-025	Ltm	Sémillon	2017-fin-FA	31,11 ± 0,35						✓		
V-17-026	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	24,06 ± 0,90						✓		
V-17-027	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	26,66 ± 0,44						✓		
V-17-028	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	25,68 ± 0,20						✓		
V-17-029	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	26,29 ± 0,58						✓		
V-17-030	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	23,65 ± 0,90						✓		
V-17-031	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	23,46 ± 0,80						✓		
V-17-032	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	25,72 ± 0,52						✓		
V-17-033	Y	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	26,55 ± 0,05						✓		
V-17-034	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	27,15 ± 0,39						✓		
V-17-035	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	27,07 ± 0,54						✓		
V-17-036	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	26,16 ± 0,54						✓		
V-17-037	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	27,54 ± 0,15						✓		
V-17-038	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	26,87 ± 0,94						✓		
V-17-039	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	29,62 ± 0,23						✓		
V-17-040	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	28,76 ± 0,39						✓		
V-17-041	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	28,96 ± 0,73						✓		
V-17-042	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	27,35 ± 0,58						✓		
V-17-043	Shl	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	24,15 ± 0,06						✓		
V-17-044	Lu	Sémillon	2017-fin-FA	24,86 ± 0,37						✓		
V-17-045	Lu	Sémillon	2017-fin-FA	26,24 ± 1,02						✓		
V-17-046	M	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	19,78 ± 0,18						✓		
V-17-047	M	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	21,93 ± 0,45						✓		
V-17-048	M	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	22,77 ± 0,23						✓		
V-17-049	M	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	23,18 ± 0,31						✓		
V-17-050	M	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	19,61 ± 0,05						✓		
V-17-051	M	Sauvignon Blanc	2017-fin-FA	22,51 ± 0,03						✓		

DNO-18-001	Lf	Chardonnay	2017-2mois	32,75 ± 0,80								✓
DNO-18-002	Lf	Chardonnay	2017-2mois	34,55 ± 0,23	68	108,60	2,52	✓				✓
DNO-18-003	Lf	Chardonnay	2017-2mois	34,81 ± 0,58								✓
DNO-18-004	Lf	Chardonnay	2017-2mois	19,89 ± 0,03								✓
DNO-18-005	Lf	Chardonnay	2017-2mois	21,42 ± 0,23	56	108,15	3,38	✓				✓
DNO-18-006	Lf	Chardonnay	2017-2mois	21,45 ± 0,19								✓
DNO-18-007	Lf	Chardonnay	2017-2mois	19,05 ± 1,54								✓
DNO-18-008	Lf	Chardonnay	2017-2mois	22,45 ± 0,30	56	89,44	3,17	✓				✓
DNO-18-009	Lf	Chardonnay	2017-2mois	23,00 ± 0,17								✓
DNO-18-010	Lf	Chardonnay	2017-2mois	26,91 ± 0,11								✓
DNO-18-011	Lf	Chardonnay	2017-2mois	28,46 ± 0,02	72	96,40	2,64	✓				✓
DNO-18-012	Lf	Chardonnay	2017-2mois	26,04 ± 0,23								✓
DNO-18-013	Lf	Chardonnay	2017-2mois	27,44 ± 0,45								✓
DNO-18-014	Lf	Chardonnay	2017-2mois	31,97 ± 0,09	76	104,66	2,04	✓				✓
DNO-18-015	Lf	Chardonnay	2017-2mois	28,10 ± 1,24								✓
DNO-18-016	J	Chardonnay	2017-2mois	21,34 ± 0,11	34	66,33	1,88	✓				
DNO-18-017	J	Chardonnay	2017-2mois	23,75 ± 0,21	22	64,45	2,33	✓				
DNO-18-018	J	Chardonnay	2017-2mois	29,96 ± 0,03	22	57,52	2,00	✓				
DNO-18-019	J	Chardonnay	2017-2mois	19,89 ± 0,01	36	55,42	1,54	✓				
R-18-020	P	Chardonnay	2017-4mois	25,92 ± 0,01	102	79,79	1,03	✓	✓		✓	
R-18-021	P	Chardonnay	2017-4mois	20,68 ± 0,76	80	88,73	1,96	✓	✓		✓	
R-18-022	P	Chardonnay	2017-4mois	20,00 ± 1,93	78	83,55	1,83	✓	✓		✓	
R-18-023	P	Chardonnay	2017-4mois	22,31 ± 0,30	82	79,64	2,19	✓	✓		✓	
R-18-024	P	Chardonnay	2017-4mois	22,84 ± 0,01	88	79,45	1,65	✓	✓		✓	
R-18-025	P	Chardonnay	2017-4mois	26,42 ± 0,56	72	81,57	1,40	✓	✓		✓	
R-18-026	P	Chardonnay	2017-4mois	24,25 ± 0,45	80	79,22	1,56	✓	✓		✓	
R-18-33	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	23,56 ± 0,61	26	59,38	1,79	✓	✓			
R-18-34	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	23,15 ± 0,08	40	61,45	1,31	✓	✓			
R-18-35	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	18,82 ± 0,28	34	65,15	1,82	✓	✓			
R-18-36	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	26,88 ± 0,46	52	71,90	1,64	✓	✓			

R-18-37	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	26,99 ± 0,03	50	70,01	1,55	✓	✓			
R-18-38	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	25,13 ± 0,16	58	69,68	1,33	✓	✓			
R-18-39	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	40,91 ± 1,83	46	55,26	1,39		✓			
R-18-40	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	31,27 ± 0,26	60	50,08	0,93	✓	✓			
R-18-41	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	24,46 ± 0,03	54	70,05	1,88	✓	✓			
R-18-42	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	31,88 ± 0,43	68	72,27	1,45	✓	✓			
R-18-43	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	30,62 ± 0,87	62	69,28	1,18	✓	✓			
R-18-44	BIVB	Chardonnay	2017-4mois	27,42 ± 0,03	62	78,32	1,67	✓	✓			
R-18-51	Lf	Chardonnay	2017-4mois	16,81 ± 0,49	16	76,93	3,71	✓	✓		✓	
R-18-52	Lf	Chardonnay	2017-4mois	16,79 ± 0,10	24	62,51	3,02	✓	✓		✓	
R-18-53	Lf	Chardonnay	2017-4mois	17,17 ± 0,08	16	72,55	4,00	✓	✓			
R-18-54	Lf	Chardonnay	2017-4mois	22,85 ± 0,07	38	59,45	1,95	✓	✓		✓	
R-18-55	Lf	Chardonnay	2017-4mois	23,30 ± 0,76	38	92,04	2,74	✓	✓		✓	
R-18-56	Lf	Chardonnay	2017-4mois	19,03 ± 0,05	28	73,84	2,08	✓	✓		✓	
R-18-57	Lf	Chardonnay	2017-4mois	19,01 ± 0,48	16	62,11	2,21	✓	✓		✓	
DNO-18-58	Lf	Chardonnay	2017-4mois	29,16 ± 0,54								✓
DNO-18-59	Lf	Chardonnay	2017-4mois	30,45 ± 0,76	50	83,71	1,78	✓	✓			✓
DNO-18-60	Lf	Chardonnay	2017-4mois	20,93 ± 0,07	44	78,76	2,55	✓	✓			✓
DNO-18-61	Lf	Chardonnay	2017-4mois	20,65 ± 0,08	44	85,42	2,57	✓	✓			✓
DNO-18-62	Lf	Chardonnay	2017-4mois	20,38 ± 0,14	44	75,00	2,38	✓	✓			✓
DNO-18-63	Lf	Chardonnay	2017-4mois	19,97 ± 0,01	52	82,67	2,53	✓	✓			✓
DNO-18-64	Lf	Chardonnay	2017-4mois	22,94 ± 0,32	56	90,02	1,80	✓	✓			✓
DNO-18-65	Lf	Chardonnay	2017-4mois	21,56 ± 0,29								✓
DNO-18-66	Lf	Chardonnay	2017-4mois	22,73 ± 0,29	50	94,84	2,20	✓	✓		✓	✓
DNO-18-67	Lf	Chardonnay	2017-4mois	22,45 ± 0,60								✓
DNO-18-68	J	Chardonnay	2017-4mois	16,00 ± 0,29	24	54,95	1,95	✓	✓			✓
DNO-18-69	J	Chardonnay	2017-4mois	18,46 ± 0,10	20	51,44	1,60	✓	✓			✓
DNO-18-70	J	Chardonnay	2017-4mois	20,65 ± 0,08								✓
DNO-18-71	J	Chardonnay	2017-4mois	14,31 ± 0,24								✓
DNO-18-76	Lf	Chardonnay	2017-5mois	28,26 ± 0,94								✓

DNO-18-77	Lf	Chardonnay	2017-5mois	32,42 ± 0,04								✓
DNO-18-78	Lf	Chardonnay	2017-5mois	30,55 ± 0,72								✓
DNO-18-79	Lf	Chardonnay	2017-5mois	19,52 ± 0,20								✓
DNO-18-80	Lf	Chardonnay	2017-5mois	20,78 ± 0,19								✓
DNO-18-81	Lf	Chardonnay	2017-5mois	19,77 ± 0,43								✓
DNO-18-82	Lf	Chardonnay	2017-5mois	19,45 ± 0,27								✓
DNO-18-83	Lf	Chardonnay	2017-5mois	19,79 ± 0,28								✓
DNO-18-84	Lf	Chardonnay	2017-5mois	20,93 ± 0,56								✓
DNO-18-85	Lf	Chardonnay	2017-5mois	22,25 ± 0,12								✓
DNO-18-86	Lf	Chardonnay	2017-5mois	23,31 ± 0,36								✓
DNO-18-87	Lf	Chardonnay	2017-5mois	22,54 ± 0,39								✓
DNO-18-88	Lf	Chardonnay	2017-5mois	20,58 ± 0,01								✓
DNO-18-89	Lf	Chardonnay	2017-5mois	24,87 ± 0,08								✓
DNO-18-90	Lf	Chardonnay	2017-5mois	23,61 ± 0,12								✓
R-18-185	Lf	Chardonnay	2017-1an	18,40 ± 0,63							✓	
R-18-186	Lf	Chardonnay	2017-1an	19,47 ± 0,75							✓	
R-18-187	Lf	Chardonnay	2017-1an	20,70 ± 0,30							✓	
R-18-188	Lf	Chardonnay	2017-1an	21,76 ± 0,49							✓	
R-18-189	Lf	Chardonnay	2017-1an	21,75 ± 0,61								
R-18-190	Lf	Chardonnay	2017-1an	19,54 ± 0,91							✓	
R-18-191	Lf	Chardonnay	2017-1an	19,12 ± 0,46							✓	
R-18-192	P	Chardonnay	2017-1an	20,43 ± 0,17							✓	
R-18-193	P	Chardonnay	2017-1an	13,96 ± 0,37							✓	
R-18-194	P	Chardonnay	2017-1an	14,56 ± 0,23							✓	
R-18-195	P	Chardonnay	2017-1an	16,34 ± 0,39							✓	
R-18-196	P	Chardonnay	2017-1an	16,57 ± 0,42							✓	
R-18-197	P	Chardonnay	2017-1an	17,45 ± 0,04							✓	
R-18-198	P	Chardonnay	2017-1an	15,23 ± 0,50							✓	
DNO-18-199	Lf	Chardonnay	2017-1an	21,66 ± 0,13								✓
DNO-18-200	Lf	Chardonnay	2017-1an	16,56 ± 0,32								✓

DNO-18-201	Lf	Chardonnay	2017-1an	16,45 ± 0,19								✓
DNO-18-202	Lf	Chardonnay	2017-1an	19,32 ± 0,12								✓
DNO-18-203	Lf	Chardonnay	2017-1an	17,26 ± 0,21							✓	✓
DNO-18-136	P	Chardonnay	2018-finFA	30,08 ± 0,08								
DNO-18-137	P	Chardonnay	2018-finFA	31,02 ± 0,49								
DNO-18-138	P	Chardonnay	2018-finFA	30,87 ± 0,38								
DNO-18-139	P	Chardonnay	2018-finFA	31,44 ± 0,62								
DNO-18-140	P	Chardonnay	2018-finFA	25,87 ± 0,39								
DNO-18-141	P	Chardonnay	2018-finFA	24,05 ± 1,21								
DNO-18-142	P	Chardonnay	2018-finFA	25,43 ± 0,66								
DNO-18-143	P	Chardonnay	2018-finFA	26,78 ± 0,27								
DNO-18-144	Olf	Chardonnay	2018-finFA	30,45 ± 0,66								
DNO-18-145	Olf	Chardonnay	2018-finFA	29,67 ± 1,47								
DNO-18-146	Olf	Chardonnay	2018-finFA	28,69 ± 0,10								
DNO-18-147	Olf	Chardonnay	2018-finFA	28,50 ± 1,30								
DNO-18-148	Olf	Chardonnay	2018-finFA	29,38 ± 0,66								
DNO-18-149	C	Chardonnay	2018-finFA	25,28 ± 0,06								
DNO-18-150	C	Chardonnay	2018-finFA	26,69 ± 2,56								
DNO-18-151	C	Chardonnay	2018-finFA	25,95 ± 0,43								
DNO-18-152	C	Chardonnay	2018-finFA	24,25 ± 0,20								
DNO-18-153	Olf	Chardonnay	2018-finFA	23,61 ± 0,52								
DNO-18-154	Olf	Chardonnay	2018-finFA	24,80 ± 0,35								
DNO-18-155	Olf	Chardonnay	2018-finFA	22,08 ± 0,95								
DNO-18-156	Olf	Chardonnay	2018-finFA	29,51 ± 2,07								
DNO-18-157	Olf	Chardonnay	2018-finFA	28,09 ± 0,53								
DNO-18-158	B	Chardonnay	2018-finFA	22,88 ± 0,26								
DNO-18-159	B	Chardonnay	2018-finFA	25,62 ± 1,30								
DNO-18-160	B	Chardonnay	2018-finFA	20,55 ± 0,20								
DNO-18-161	Lf	Chardonnay	2018-finFA	38,00 ± 1,03								
DNO-18-162	Lf	Chardonnay	2018-finFA	38,77 ± 0,58								

DNO-18-163	Lf	Chardonnay	2018-finFA	34,61 ± 0,87								
DNO-18-164	Lf	Chardonnay	2018-finFA	28,84 ± 0,75								
DNO-18-165	Lf	Chardonnay	2018-finFA	27,76 ± 0,68								
DNO-18-166	Lf	Chardonnay	2018-finFA	24,67 ± 0,48								
DNO-18-167	Lf	Chardonnay	2018-finFA	16,50 ± 0,75								
DNO-18-168	Lf	Chardonnay	2018-finFA	16,94 ± 0,02								
DNO-18-169	Lf	Chardonnay	2018-finFA	15,79 ± 0,30								
DNO-18-170	Lf	Chardonnay	2018-finFA	23,95 ± 0,04								
DNO-18-171	Lf	Chardonnay	2018-finFA	22,96 ± 0,81								
DNO-18-172	Lf	Chardonnay	2018-finFA	22,75 ± 0,08								
DNO-18-173	Lf	Chardonnay	2018-finFA	22,61 ± 0,34								
DNO-18-174	Lf	Chardonnay	2018-finFA	22,09 ± 0,42								
DNO-18-175	Lf	Chardonnay	2018-finFA	19,91 ± 0,19								
DNO-18-176	C	Chardonnay	2018-finFA	20,89 ± 0,64								
DNO-18-177	C	Chardonnay	2018-finFA	20,03 ± 0,44								
DNO-18-178	C	Chardonnay	2018-finFA	19,51 ± 0,36								
DNO-18-179	C	Chardonnay	2018-finFA	19,32 ± 0,18								
DNO-18-180	B	Chardonnay	2018-finFA	25,82 ± 0,32								
DNO-18-181	B	Chardonnay	2018-finFA	26,27 ± 0,96								
DNO-18-182	B	Chardonnay	2018-finFA	26,93 ± 0,60								
DNO-18-183	B	Chardonnay	2018-finFA	22,92 ± 0,01								
DNO-18-184	B	Chardonnay	2018-finFA	26,32 ± 0,71								

Annexe 2 : Liste des marqueurs moléculaires de la capacité antioxydante obtenus. Le tableau présente ici la formule élémentaire lorsqu'elle a été déterminée (par FTMS ou via le profil isotopique), la masse neutre du composé [M], le temps de rétention (en min), le mode d'ionisation auquel le composé a été isolé (-) négatif ou (+) positif, l'appartenance aux différents groupes et sous-groupes déterminés au cours de l'étude, ainsi qu'une annotation du composé isolé et le niveau de confiance en l'annotation lorsqu'il a été calculé. Pour les annotations dans un souci de clarté, les codes KEGG ont été utilisés ainsi que les numéros d'ID de Metlin, l'abréviation une lettre pour les acides aminés lorsqu'il peut s'agir de peptides.

Formule élémentaire FTMS	Masse neutre [M]	TR (min)	Détection	Groupe marqueurs	Annotation	Niveau de confiance
	130.0259	2.7	(+)	3-A	C00433 . C00490 . C01732 . C02132 . C02214 . C02226 . C02800	
	136.0517	3.7	(+)	3-A	C00548 . C01454 . C03765 . C05613 . C06224 . C07085 . C07086 . C07189 . C07211 . C07215 . C10700 . C10761 . C14087 . C15583 . C20645 . C21166	
	142.11	1.3	(+)	3-A		
	145.1095	3.1	(+)	3-A	57; 966; 3541;34501; 35932; 35934	
	146.0362	0.7	(+)	3-A	C05851	
	157.1096	1	(+)	3-A	C08283 . C10155 . C12535	
	158.057	3.5	(+)	3-A	C02631 . C04670 . C04815 . C05126	
	162.031	3.2	(+)	3-A	C09315 . C20414	
C ₉ H ₁₀ O ₃	166.0622	3.7	(+)	3-A	C01198 . C01456 . C01744 . C02201 . C02363 . C03080 . C05581 . C05607 . C10712 . C11380 . C11457 . C12206	
	172.0841	2.3	(+)	3-A	G1P1	
	210.0861	4.3	(+)	3-A	65821	
C ₈ H ₉ O ₄ NS	215.0246	1.3	(+)	3-AE		
	218.0783	1.3	(+)	3-A	44144	
	222.0862	4	(+)	3-A		
	228.0602	2.8	(+)	3-AE		
	238.1174	5.4	(+)	3-A		
	258.1361	3.4	(+)	3-A	C20521	
	269.1737	2.5	(+)	3-A		
	270.0708	3.2	(+)	3-A	63423	
	303.1691	1.3	(+)	3-AE		

	306.1573	2.8	(+)	3-AE	985324	
	338.1698	4	(+)	3-A		
	353.2307	3.3	(+)	3-AD		
	388.1954	1.9	(+)	3-A	peptide	
	400.1506	3.8	(+)	3-A	C10557 . C17845	
	426.1647	4.1	(+)	3-A		
C ₁₉ H ₃₂ O ₁₁	436.1942	2.9	(-)(+)	3-A	M2R1; A2E1F1; A1P1S1Y1; P1G1V1A1; Y1T1G1P1	
	462.0962	1.5	(+)	3-A	C03115	
	489.2431	1.4	(+)	3-A	peptide	
	509.2195	1.5	(+)	3-A	Peptide	
	749.4067	3.1	(+)	3-A	peptide	
	894.4414	2.6	(-)(+)	3-A	peptide	
	126.031	3.2	(+)	3-B	C01108 . C02183 . C02752 . C02814 . C11101 . C11918 . C20718	
	129.0784	2	(+)	3-B	C00408 . C03969 . C05936 . C07500 . C13696	
	130.026	3.5	(+)	3-B	C00433 . C00490 . C01732 . C02132 . C02214 . C02226 . C02800	
	140.0446	2	(+)	3-BD		
	146.0361	3.5	(+)	3-B	C05851	
	184.0342	3.2	(+)	3-B	C20125	
	185.014	1.2	(+)	3-B		
	199.1315	1.2	(+)	3-B	62972	
	203.1151	1.8	(+)	3-B	956; 2522; 3544; 6612; 66973	
	204.0624	0.8	(+)	3-B	C18342	
	204.0892	1.2	(+)	3-B	W1	
	225.1471	0.7	(+)	3-BE		
	230.1278	4.7	(+)	3-B	85782; 86020	
	232.1452	3.9	(+)	3-BE	C09289 . C09382 . C09383 . C09384 . C09408 . C09454 . C09466 . C09484 . C09692 . C09710 . C17488 . C17884 . C17886	
	236.1386	4.2	(+)	3-B		
	240.0966	3.5	(+)	3-B		
	240.0968	3.9	(+)	3-B		
	244.0705	4.2	(+)	3-B	90; 5734	

	263.0213	2	(+)	3-B		
	276.1104	2.4	(+)	3-BE		
	286.116	2	(+)	3-B	2143; 2148; 45537; 64854	
	289.0369	2	(+)	3-B	64818	
	294.1022	2.2	(+)	3-B	45246; 85436	
	304.1279	3.8	(+)	3-BE	70941; 90282; 93351	
	304.1415	3.7	(+)	3-B	85030	
	304.2009	5.4	(+)	3-B	2790; 2791; 2793; 5341; 41851; 57821; 57822	
	306.1244	1.8	(+)	3-B	C19559	
	308.1727	3	(+)	3-B	C00732	
	314.1143	3.7	(+)	3-B	3444; 43628; 47466; 47467; 48152	
	316.199	3.4	(+)	3-B		
	320.1364	3.1	(+)	3-B	S1N1T1; S2Q1; S1G2T1; S2A1G1	
	320.1593	4.7	(+)	3-B	70304; 70305; 70308; 88635	
	324.1317	1.3	(+)	3-B	V2-OH	
	324.1906	4.2	(+)	3-B		
	326.1261	2.1	(+)	3-B	C20516	
	347.2051	2.1	(+)	3-B		
	349.127	2.6	(+)	3-B	C1D1L1	
	389.1775	3.8	(+)	3-B	L1E2	
	402.1495	3.2	(+)	3-B	47723; 48384; 48387; 95612	
	414.2467	2.8	(+)	3-B	P1V2T1;S1P1V1L1	
	428.18	4	(+)	3-BE	S1H1W1	
	449.0374	1.6	(+)	3-B		
	460.2675	3.7	(+)	3-B	P1V2F1	
	499.2635	2.9	(+)	3-B	peptide	
	513.1407	2.7	(+)	3-BE	95234	
	516.3074	3.5	(+)	3-B	C08796 . C08802 . C08845	
	673.1772	3.1	(+)	3-BD		
	753.8553	2.4	(+)	3-BD		

	132.078	2.5	(+)	2-C	C03264 . C03499 . C06103 . C07834	
	228.6498	2.4	(+)	2-CE		
	260.1188	3	(+)	2-C		
	277.6499	1.4	(+)	2-C		
	298.105	1.1	(+)	2-C	C10720	
	315.1789	1.4	(+)	2-C	PIV1T1;S1P1L1	
	334.083	2.2	(+)	2-C	C12400	
	377.7079	2.6	(+)	2-C		
	416.237	1.9	(+)	2-C	G1A3K1;G3V1K1;A2Q1K1;G1V1N1K1;L1E1R1	
C₁₉H₃₆O₁₃	472.2165	1.2	(+)	2-C		
	478.2091	1.5	(+)	2-C	T1L1D1M1;V1T1E1M1;S1L1E1M1	
	512.2624	3.4	(+)	2-C	A1L1F1Y1;S1L1F2;V1T1F2	
	545.2796	1.4	(+)	2-C	peptide	
	567.253	2.9	(+)	2-CD	peptide	
	589.2379	1.4	(+)	2-C	P2D2F1;S3F1Y1;G1S1T1Y2;A1S2Y2	
	621.162	1.7	(+)	2-C		
	635.2797	2.5	(+)	2-C	P1L1D1E1Y1;P1V1E2Y1;S1C1D1R2	
	644.3268	2.5	(+)	2-C	peptide	
	686.399	3.4	(+)	2-C	P2T1L2F1;P2V2L1Y1	
	718.3996	3.4	(+)	2-CE		
	725.2645	2.4	(+)	2-C	peptide	
	726.3328	2.8	(+)	2-C	peptide	
	790.3843	3	(+)	2-C		
	833.378	1.7	(+)	2-C	peptide	
	927.1471	1.3	(+)	2-C		
	935.1343	0.9	(+)	2-C		
	1082.5235	3.1	(+)	3-C	peptide	
	357.1908	5.1	(+)	1-D	E1L1P1;	
	547.2239	3.9	(+)	1-D	peptide	
	588.2934	2.5	(-)(+)	1-D	peptide; D-Urobilin	

	389.215	3.1	(+)	2-D	96642	
	394.185	1.1	(+)	2-D	peptide	
	455.2739	1.5	(+)	2-D	P1L2N1;P1V1L1Q1;G2P1L2;G1A1P1V1L1;A2P1V2	
	471.2475	3.1	(-)(+)	2-D	G1P1L1W1;A1P1V1W1	
	515.3302	3	(+)	2-D	peptide	
	633.3475	3.2	(+)	2-D	peptide	
	687.2623	3.1	(+)	2-D		
	205.0732	3.2	(-)(+)	3-D	C02043 . C05660 . C09961 . C10741	
	266.1146	3.1	(+)	3-D	44960; 64661; 69188; 95344; 95962	
	276.1696	4.3	(+)	3-D		
	281.1731	3.3	(-)(+)	3-D		
$C_{16}H_{27}O_3N_3$	309.2045	4	(-)(+)	3-D		
	315.1574	3.3	(+)	3-D		
	315.1788	1.7	(-)(+)	3-D	PIV1T1;S1P1L1	
	437.074	2.5	(+)	3-D		
	645.147	2.4	(-)(+)	3-D		
	659.2821	3.3	(+)	3-D		
	184.0361	1.6	(+)	1-E	C05580 . C05616	
	214.1312	1.5	(+)	1-E	P1V1	
	259.189	1.8	(+)	1-E	L1K1	
	289.1631	1.8	(+)	1-E	G1T1L1;A1V1T1;A1S1L1	
$C_{15}H_{12}O_7$	304.0575	3.1	(-)(+)	1-E	C01617 . C05911 . C12316	
	347.1687	0.9	(-)	1-E	T1L1D1;V1T1E1;S1L1E1	
	385.2201	3.3	(+)	1-E		
	415.2425	1.4	(+)	1-E	peptide	
	438.2585	1.7	(+)	1-E	G1L2H1;A1V1L1H1	
	461.0914	0.8	(+)	1-E		
	486.2797	2.4	(-)(+)	1-E	peptide	
	572.3162	2.7	(-)(+)	1-E	peptide	
	615.1	1.3	(+)	1-E		

	615.1002	1	(-)(+)	1-E		
	753.3791	3.2	(-)(+)	1-E		
	147.0349	0.7	(+)	2-E	C03901	
C ₁₀ H ₁₉ O ₄ N ₃ S	277.1089	0.9	(+)	2-E	G1V1C1;G1A1M1;Q1M1	
	306.1914	2.8	(+)	2-E	64710	
	329.2308	2.8	(-)(+)	2-E	V2L1	
	458.248	1.7	(+)	2-E	peptide	
	481.2643	1.2	(+)	2-E	peptide	
	482.2373	1.3	(+)	2-E	V1T2Y1;S1T1L1Y1	
	488.2478	1.8	(+)	2-E	L2D1E1;V1L1E2	
	496.2164	1.6	(-)(+)	2-E	V1T1D1Y1;S1L1D1Y1;T2E1F1;S1V1E1Y1	
	508.2525	3.6	(+)	2-E	V1L1D1Y1;T1L1E1F1;V2E1Y1	
	513.2941	3.7	(+)	2-E	P1V1L1W1	
	529.3105	2.8	(-)(+)	2-E	peptide	
	532.2488	0.9	(+)	2-E	peptide	
	536.2226	2	(+)	2-E	peptide	
	549.7396	1.5	(+)	2-E		
	567.2685	3.2	(-)(+)	2-E	A2P1F1Y1;G1P1T1F2;S1L1Y1W1;A1S1P1F2;V1T1Y1W1	
	587.3271	2.7	(+)	2-E	peptide	
	587.3273	0.9	(+)	2-E	peptide	
	599.3673	4	(+)	2-E	V1P1E1K2	
	605.3416	3.2	(+)	2-E	P1T1L2Y1;V1L2D1F1;V2L1E1F1	
	613.3426	2.8	(+)	2-E	peptide	
	763.3526	3.2	(+)	2-E	peptide	
	905.1782	2.1	(+)	2-E		
	135.0678	1.8	(+)	3-E	C02505 . C07565 . C15561 . C16075 . C19714	
	143.094	3.3	(+)	3-E	C04114 . C10172	
	161.0682	1.6	(+)	3-E	C00956 . C01046 . C01077 . C02207 . C03210 . C05016 . C06234 . C17581 . C19694	
	172.0729	2.2	(+)	3-E	5330; 5451; 45920; 63035; 74790	

	174.0523	0.8	(-)(+)	3-E	C00493 . C04236 . C16588 . C17696 . C18307 . C18312 . C21281	
	176.0465	3.1	(+)	3-E	C01173 . C03081 . C09268	
	209.1046	2	(+)	3-E	C01458 . C12231 . C14262 . C14334	
	212.0652	3.2	(+)	3-E		
	216.1466	3	(+)	3-E	V2	
	216.1468	2.1	(+)	3-E	V2	
	230.1624	1.9	(-)(+)	3-E	V1L1	
	231.0196	1.1	(-)(+)	3-E	96346	
	244.1053	0.7	(+)	3-E	P1E1	
	248.1039	3.1	(+)	3-E	C10487 . C12456 . C16788 . C20426	
	252.1347	3.8	(+)	3-E	87503; 89070; 89702; 91225; 96257	
	263.0826	1.2	(+)	3-E	69484	
	285.1684	2.2	(+)	3-E	G1P1L1;A1P1V1	
	287.2204	1.4	(+)	3-E		
	288.041	1	(-)(+)	3-E		
	292.1054	1.5	(-)(+)	3-E	95722	
	312.0476	1.4	(-)(+)	3-E	85252; 86148	
	324.1317	1.9	(+)	3-E	V2-OH	
	329.158	1.9	(-)(+)	3-E	P1V1D1	
	330.062	2.5	(+)	3-E		
	339.1891	0.9	(+)	3-E	A1L1H1	
	345.2258	1.7	(-)(+)	3-E	T1L2	
	379.1852	2.3	(+)	3-E		
	406.1317	2.5	(+)	3-E	A1D2S1; C1G1M1P1; G1T1D2	
	414.2833	2.9	(-)(+)	3-E	G1L3;A1V1L2;V4	
	436.2675	2.6	(+)	3-E	88720	
	443.2741	1.2	(+)	3-E	peptide	
	444.2728	3.9	(+)	3-E	36234; 36235	
	458.2152	3.4	(-)(+)	3-E	Peptide	
	501.3146	3	(+)	3-E	Peptide	

	522.2319	2.5	(+)	3-E	L1D1E1F1;V1E2F1	
	165.3867	1.1	(+)	1		
	174.0158	0.7	(-)	1	C00417 . C02341 . C05422	
	174.1109	0.6	(+)	1	R1	
	179.1282	1.8	(+)	1		
	228.0777	3.8	(-)(+)	1	C03582 . C09312 . C09314 . C09317 . C09925 . C14285 . C14393 . C15196 . C19538	
	286.6448	1.4	(+)	1		
	287.22	3	(+)	1		
	312.1795	1.3	(+)	1		
	315.1425	1.2	(+)	1	A1P1E1; C17364	
	332.2555	4.1	(-)	1	C19621	
	342.1899	1.9	(-)(+)	1	P1L1N1;P1V1Q1;G2P1L1;G1A1P1V1	
C₁₈H₃₄O₆	346.2346	4.1	(-)(+)	1	74455; 74513; 74916; 86564	
	347.2047	1.9	(+)	1		
	358.2574	1.8	(-)	1	V1L1K1	
	380.2532	5.1	(+)	1		
	392.7189	2.5	(+)	1		
	413.227	1.7	(+)	1	G1P1L1Q1;A1P1L1N1;A1P1V1Q1;G1A2P1V1;G2A1P1L1	
	419.241	3.5	(+)	1		
C₂₂H₂₈O₈	420.1777	3.1	(-)	1	C09428 . C09429 . C09432 . C09439 . C09475	
	424.2791	5.9	(+)	1		
	435.7553	2.5	(+)	1		
	437.191	1	(+)	1	peptide	
	461.247	0.9	(+)	1	peptide	
	466.183	3.1	(-)	1	Peptide	
	466.2422	2	(+)	1	S1V2Y1;V1T2F1;S1T1L1F1;A1T1L1Y1	
	472.2641	1.5	(+)	1	peptide	
	473.2481	1.8	(+)	1	peptide	
	487.2632	1.3	(-)(+)	1	peptide	

	502.2745	1.7	(-)(+)	1	peptide	
	509.2476	1.6	(+)	1	peptide	
	509.2478	2.8	(-)(+)	1	peptide	
	511.229	2.3	(+)	1		
	517.2741	2.2	(-)(+)	1	peptide	
	519.2531	1.1	(+)	1	peptide	
	543.3002	2.5	(+)	1	peptide	
	570.3727	3.4	(+)	1	peptide	
	576.2746	0.9	(+)	1	peptide	
	577.7571	1.4	(+)	1		
	594.2641	1.7	(-)(+)	1	peptide	
	719.3482	3	(+)	1	peptide	
	761.4067	3.6	(+)	1	peptide	
	781.4101	3.5	(+)	1		
	902.4685	2.8	(-)(+)	1	peptide	
C ₄ H ₄ O ₄	116.0107	0.7	(-)	2	C00122 . C01384 . C02150	
	128.0103	0.7	(+)	2		
	134.021	0.9	(-)	2	C00149 . C00497 . C00711 . C03064	
	145.0733	0.8	(+)	2	C02946 . C03239 . C03656 . C04076 . C05825	
	149.0472	1.2	(+)	2	C00650 . C02775 . C03574 . C03742 . C05578 . C09957 . C11130	
	175.9629	0.6	(-)	2		
	187.1564	3.5	(+)	2	C12889	
	196.107	4.3	(+)	2		
	197.9322	0.6	(+)	2		
	212.0679	1.1	(+)	2	C10674 . C11155	
	223.0838	1.6	(-)(+)	2	C14433 . C18953	
	255.1214	0.7	(+)	2	C19247	
	276.0286	0.7	(-)	2	63072; 66192; 96082	
	276.1331	4.1	(+)	2	383	
	288.1674	3.1	(+)	2		

	291.1425	0.9	(+)	2	A1T2;S2V1; C20915	
	297.0891	1.4	(+)	2	C00170	
	310.1497	3.5	(+)	2		
	317.6686	1	(+)	2		
C ₁₃ H ₁₇ O ₆ N ₃ S	343.0833	0.7	(+)	2	63904; 96354	
	354.6814	2.5	(+)	2		
	358.2574	2.6	(+)	2	V1L1K1	
	400.2677	3.2	(+)	2	G1V1L2;A1V2L1	
	412.1952	0.9	(+)	2	A1P2E1	
	419.0516	0.9	(+)	2		
	422.1718	2.6	(-)(+)	2	47696; 47697; 47699; 47710; 47721; 47726	
	424.1589	0.9	(+)	2	G1S1D1F1;D1Q1Y1;N1E1Y1;G1A1D1Y1;G2E1Y1	
	428.2038	3	(-)	2	90883; A1H1T2; A1D1P1Q1	
	429.2592	2.9	(+)	2	peptide	
	430.2199	2.7	(-)	2	Peptides	
	431.2017	0.9	(+)	2	peptide	
	439.1951	2.3	(+)	2	H2F1	
	443.0993	1.3	(+)	2		
	449.227	2.8	(+)	2	G1L1N1F1;G1V1Q1F1;A1V1N1F1;G3L1F1;G2A1V1F1	
	452.2251	2.3	(-)	2	Peptide	
	479.1024	2.6	(+)	2		
	480.3051	2.7	(+)	2	V1L2H1	
	481.1951	2.8	(+)	2	G2Y1W1;H1Y2;N1Y1W1	
	513.2932	3.3	(-)(+)	2	Peptide	
	524.2475	2.4	(+)	2	T1L1E1Y1	
	534.2794	3.1	(+)	2	peptide	
	536.2099	2.6	(-)	2	88253	
	539.3098	3.6	(+)	2	V1K1F2	
	558.3007	2.6	(+)	2	peptide	
	565.2365	0.7	(+)	2	Peptide	

	568.1421	3.1	(-)	2	51768	
	585.2898	3.2	(+)	2	peptide	
	600.311	3	(+)	2	peptide	
	602.2595	3.1	(+)	2	peptide	
	631.3164	2.2	(+)	2	peptide	
	633.2743	1.1	(+)	2	peptide	
	670.4039	3.6	(+)	2	P2V2L1F1	
	690.3728	3.6	(+)	2	peptide	
	128.0466	4.1	(+)	3	C01125 . C06719 . C06761 . C11354 . C20240 . C20443 . C20717	
	130.026	1.7	(+)	3	C00433 . C00490 . C01732 . C02132 . C02214 . C02226 . C02800	
	130.026	0.7	(+)	3	C00433 . C00490 . C01732 . C02132 . C02214 . C02226 . C02800	
	135.0539	0.7	(+)	3	C00147	
	135.0678	1.1	(+)	3	C02505 . C07565 . C15561 . C16075 . C19714	
	137.9947	1.5	(+)	3		
	143.0398	0.9	(+)	3	C04294	
	143.094	0.8	(+)	3	C04114 . C10172	
	147.089	2.2	(+)	3	C10144 . C20310 . C20802	
	151.0484	0.7	(+)	3	C00242	
	156.0052	1.5	(+)	3	C20450	
	156.0415	1.5	(+)	3	C04112 . C04171 . C04558 . C04559 . C04634 . C06210 . C06321 . C06760 . C18311 . C20710	
	156.0416	1.3	(+)	3	C04112 . C04171 . C04558 . C04559 . C04634 . C06210 . C06321 . C06760 . C18311 . C20710	
	160.0365	1	(-)	3	C00322 . C00846 . C04287 . C06891 . C16159 . C20781	
	165.0783	1.1	(-)(+)	3	F1	
C ₇ H ₆ O ₅	170.0209	0.9	(-)	3	C01424	
	172.0728	3	(+)	3	5330; 5451; 45920; 63035; 74790	
	174.0522	1.5	(-)(+)	3	C00493 . C04236 . C16588 . C17696 . C18307 . C18312 . C21281	
	177.0789	2.7	(+)	3	89303; 92517; 94586; 96729	
	178.047	0.7	(+)	3	C00198 . C00204 . C00273 . C00691 . C01040 . C01115 . C01216 . C02669 . C02692 . C02779 . C03107 . C03269 . C03383 . C03926 .	

					C05394 . C05410 . C06892 . C16737 . C17577 . C19679 . C20251 . C20680 . C20903	
	182.0563	3.1	(+)	3	C03672 . C03964 . C04044 . C05582 . C05583 . C10447 . C10680 . C12622 . C20953 . C21085	
C ₅ H ₆ O ₆ S	193.9881	0.7	(-)	3		
	194.0421	0.6	(-)	3	C00191 . C00333 . C00558 . C00618 . C00905 . C01062 . C02024 . C03342 . C06472 . C06473 . C06477 . C08348 . C08350 . C15673 . C16245 . C21034 . C21037 . C21047 . C21059	
	196.0704	4.1	(+)	3		
	196.0706	2.8	(+)	3		
	196.1205	2.3	(+)	3	C13311	
	198.0511	3	(+)	3	697; 2256; 44618; 63515; 86061; 89560	
C ₉ H ₁₀ O ₅	198.0521	3	(-)	3	C01207 . C05584 . C10833 . C21086	
	202.047	1.4	(+)	3	C20581	
	210.0873	3.8	(+)	3	C02726	
	226.081	3.5	(+)	3	88241	
	228.1468	1.5	(+)	3	PIL1	
	230.1622	3.1	(+)	3	VIL1	
C ₈ H ₁₁ O ₅ NS	233.0352	1.3	(-)(+)	3	C07770 . C13690 . C13691	
	248.1034	4	(+)	3	C10487 . C12456 . C16788 . C20426	
	252.0841	0.9	(-)	3	3383; 65639; 70974	
	258.0136	1.4	(+)	3	C01236 . C01286 . C04442 . C06893 . C20668	
	262.1346	1.6	(-)(+)	3	L1M1	
	264.1466	3.1	(+)	3	V1F1	
	270.1571	3.1	(+)	3		
	271.1529	1	(+)	3	G1P1V1	
	272.1017	5.3	(+)	3		
	276.1014	0.9	(-)	3	44030; 67743; 67822; 67824; 68016; 71726; 85098	
	280.1644	4.3	(+)	3		
	287.1476	1	(+)	3	A1P1T1	
C ₁₄ H ₂₄ O ₆	288.1567	3.3	(-)	3	G2R1; N1R1	

	290.1648	3.4	(+)	3	44346	
	294.1097	4	(-)	3	C09570	
C ₇ H ₁₄ O ₅ N ₂ S ₃	302.0056	3	(-)(+)	3	C10788	
	304.1415	3.2	(+)	3	85030	
	308.1703	4.3	(+)	3		
C ₁₄ H ₂₇ O ₅ N ₃	317.1945	2.6	(-)(+)	3	V2T1;S1V1L1	
	322.1885	3.3	(+)	3	1800	
	326.1511	3.4	(+)	3	C09002 . C09031 . C09976 . C10550 . C10650	
	340.0789	3.2	(-)	3	C01421 . C02887 . C09206 . C09264	
	353.1585	1	(+)	3	S1T1F1;A1T1Y1	
	353.2057	0.9	(+)	3	V2H1	
	365.1944	2.7	(-)(+)	3	A1L1Y1;S1L1F1;V1T1F1	
	383.121	1.9	(-)	3		
	386.216	2.3	(+)	3	G1P1T1L1;A1P1V1T1;A1S1P1L1	
	398.2521	3	(+)	3	G1P1L2;A1P1V1L1	
	400.2318	2.2	(-)(+)	3	S1P1V2;A1P1T1L1	
	426.2835	3.7	(+)	3	P1V2L1	
	450.2219	1.8	(+)	3	E1F1R1;P2T1H1	
	450.2826	2.9	(+)	3		
	454.1592	4.3	(+)	3		
	466.1036	1.6	(+)	3		
	466.2059	1.2	(+)	3	peptide	
	478.2054	2.8	(-)(+)	3	A1P1E1Y1;P1T1D1F1;S1P1E1F1; C17429	
	481.2894	2.7	(+)	3	G1P2V1L1;A1P2V2	
	485.2107	0.7	(+)	3	G1P2T1D1;A1S1P2D1;G1S1P2E1	
	494.2367	2.8	(+)	3	A1L1E1Y1;T1L1D1F1;V1T1E1F1;S1L1E1F1;V2D1Y1	
	497.3204	3.5	(+)	3	G1P1V1L2;A1P1V2L1	
	537.2789	2.4	(+)	3	peptide	
	538.3105	3.2	(+)	3	peptide	
	540.3255	3.2	(+)	3		

	556.2994	3.8	(+)	3	81203; A1R1N1P1V1	
	612.3468	3.1	(+)	3	peptide	
	634.2316	1	(+)	3	58473	
	635.2904	2.7	(+)	3	peptide	
	644.279	3.1	(+)	3	peptide	
	825.3374	2.7	(-)(+)	3	peptide	
	867.3749	2.8	(+)	3	peptide	
	960.4545	2.7	(+)	3	peptide	

Annexe 3 : Liste des composés nucléophiles isolés des différents vins blancs en cours d'élevage à l'aide de la méthode de dérivation avec la 4-méthyle-1,2-benzoquinone. Ce tableau présente la formule élémentaire déterminé à partir du profil isotopique, la masse m/z $[M+H+Q]^+$ détectée, la masse neutre théorique du composé natif, le temps de rétention de(s) l'adduit(s), une annotation des composés, les fragments obtenues si une analyse MS^2 a été réalisée, ainsi que le niveau de confiance dans l'annotation si il a été calculé. Pour les annotations dans un soucis de clarté, les codes KEGG ont été utilisé, ainsi que l'abréviation une lettre pour les acides aminés lorsqu'il peut s'agir de peptides.

Formule Brut du composé natif	Masse détectée $[M+H+Q]^+$	Masse composé natif [M]	TR (min)	Groupe marqueurs	Annotation possible	Fragmentation MS^2 (20eV)	Niveau de confiance
	166.0319	42.9873	3.9	Nu1			
	176.1069	53.0623	1.8	Nu1			
	192.102	69.0574	0.8	Nu1	C02420 . C15668		
	217.0493	94.0047	3.4	Nu1			
	217.0856	94.041	3.6	Nu1	C00146 . C01782 . C15584		
	224.0738	101.0292	4.3	Nu1			
	233.0441	109.9995	2.7/3.5	Nu1			
$C_5H_9NO_2$	238.1071	115.0625	1.4	Nu1	P	192.1029 (100%); 238.1081 (48.8%); 220.0976 (11.9%); 170.0611 (8%); 178.0874 (6.4%)	1 – 9
	244.0965	121.0519	3.0/4.0	Nu1	C09815		
	245.0787	122.0341	3	Nu1			
	245.0806	122.036	3.4/3.8	Nu1	C00180 . C00539 . C00633 . C03067 . C06202 . C15474		
	246.0877	123.0431	4.2	Nu1	C01956		
	251.0911	128.0465	3.8	Nu1	C01125 . C06719 . C06761 . C11354 . C20240 . C20443 . C20717		
	274.0744	151.0298	1	Nu1			
	304.1177	181.0731	2.9	Nu1	Y1		
	308.0142	184.9696	1	Nu1			
	313.1046	190.06	3.8	Nu1			
	313.1179	190.0733	3.2	Nu1	C17204		
	317.0953	194.0507	4.5	Nu1			
	324.0533	201.0087	3.0/3.3	Nu1			
	324.1438	201.0992	3.2	Nu1	C20940		
	343.1308	220.0862	2.7	Nu1			

	348.0749	225.0303	1	Nu1			
	356.0794	233.0348	2.9/3.3	Nu1	C07770 . C13690 . C13691		
	358.1283	235.0837	3.1	Nu1			
	405.096	282.0514	1.5	Nu1	C08722 . C10522		
	419.1695	296.1249	3.3	Nu1	C09747 . C14537		
	419.9808	296.9362	1.3	Nu1			
	422.1595	299.1149	4.1	Nu1	C12330		
	424.0913	301.0467	0.9	Nu1	C03953 . C04132 . C04255 . C16265		
	444.1066	321.062	1.4	Nu1			
	452.0796	329.035	4.4	Nu1			
	461.1604	338.1158	3	Nu1	C01701 . C10049 . C10360 . C10422 . C10542 . C11576 . C11581 . C15511 . C17742		
	469.0544	346.0098	2.8	Nu1			
	528.201	405.1564	4.1	Nu1	C12200		
	531.1981	408.1535	3.8	Nu1			
	556.1742	433.1296	2.8	Nu1			
	556.2065	433.1619	2.7	Nu1	G2PITIC1;G1A1S1PIC1;PITIC1N1;S 1PIC1Q1		
	560.1543	437.1097	2.2/2.7	Nu1			
	139.0386	15.994	3.8/4.3	Nu2			
	164.0701	41.0255	3.4	Nu2			
	189.0521	66.0075	3.8	Nu2			
	196.0423	72.9977	3.7/4.3	Nu2	C18587		
C ₂ H ₅ NO ₂	198.0759	75.0313	1.2	Nu2	C00037 . C01837 . C06808 . C19445	120.0805 (100%)	5 - 4.5
	227.0372	103.9926	1.7	Nu2			
	227.0702	104.0256	3.8	Nu2			
	229.0893	106.0447	0.8	Nu2			
	235.0598	112.0152	3.0/3.5	Nu2	C01546		
C ₃ H ₇ NO ₂ S	244.0638	121.0192	1.2/1.7	Nu2	C1	155.0175 (100%)	1 - 9
C ₄ H ₉ NO ₂ S	258.0794	135.0348	2.2	Nu2	C00155 . C05330	134.0278 (100%); 169.0325 (49.9%); 210.0587 (16.4%); 195.0484 (16.1%); 135.0305 (6.8%)	1 - 9

	263.0547	140.0101	3.7	Nu2	C04431 . C12838 . C20449		
	263.0907	140.0461	4.1/4.5	Nu2	C03338 . C10792 . C14110 . C16401 . C18317 . C20362		
	271.1109	148.0663	3.2	Nu2			
	272.059	149.0144	0.7	Nu2			
	275.0547	152.0101	3.6	Nu2			
	276.0536	153.009	0.9	Nu2	C00606		
	281.0589	158.0143	4.1	Nu2			
	282.1123	159.0677	3.6	Nu2	C00637 . C06345 . C10663 . C14789		
	291.085	168.0404	3.8	Nu2			
	293.0656	170.021	2.4	Nu2	C01424		
	316.0637	193.0191	4.8	Nu2			
	316.0852	193.0406	1.3/1.7/ 3	Nu2			
	318.0792	195.0346	4.4	Nu2			
	330.1334	207.0888	4.5	Nu2	C03519 . C05620 . C09933 . C09986 . C20126		
	332.0949	209.0503	4.3	Nu2			
	336.2532	213.2086	4.2	Nu2			
	344.1154	221.0708	3.2/3.7	Nu2			
	346.095	223.0504	1.4/2.9/ 3.4	Nu2			
	346.111	223.0663	5.3	Nu2			
C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅ S	373.1063	250.0617	2.4	Nu2	C1E1	147.076 (100%); 199.1801 (51.7%); 260.1602 (40.5%); 130.0497 (27.7%); 227.1745 (25.8%)	3 - 4.5
	375.0772	252.0326	5.4	Nu2			
	383.1631	260.1185	3.2	Nu2			
	385.1788	262.1342	3.6	Nu2	L1M1		
	389.0384	265.9938	1.3	Nu2			
	399.1183	276.0737	3.1	Nu2			
	400.1529	277.1083	2.8	Nu2	G1VIC1;G1A1M1;Q1M1		

C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	401.1373	278.0927	3.2/3.5	Nu2	E1M1	227.1756 (100%); 199.1804 (77.5%); 175.1076 (36.9%); 213.1596 (35.9%)	3 - 4.5
C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₄ S	401.174	278.1293	3.2	Nu2	C00831	271.1111 (100%)	3 - 4.5
C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₅ S	402.1329	279.0883	2.3	Nu2	G1T1C1	200.1393 (100%); 228.1342 (86.8%); 327.2028 (34.9%)	3 - 4.5
C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	406.1647	283.1201	4.3	Nu2	C01735 . C10634	406.1648 (100%); 388.1543 (79.5%); 373.1306 (11.8%); 407.1686 (11.2%); 370.144 (9.7%), 252.1020 (2%)	3 - 4.5
	411.1072	288.0626	3.4	Nu2	Peptide		
	412.1172	289.0726	2.4	Nu2			
C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₄ S	414.1692	291.1246	2.9	Nu2	G1C1L1	229.1543 (100%); 234.1568 (46.3%)	3 - 4.5
	418.1646	295.12	3.7	Nu2	C09588 . C09589 . C09613 . C09670 . C10699		
	420.1801	297.1355	4.7	Nu2	C06171 . C06172 . C06175 . C09340 . C09457 . C15087 . C17077		
	420.1801	297.1355	5.2	Nu2			
	421.1214	298.0768	6.2	Nu2	C14525		
	422.1053	299.0607	4.2/4.5	Nu2	C11326		
	428.1121	305.0675	2.1/2.4	Nu2	C09347		
C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	430.1278	307.0832	2.3	Nu2	G1C1E1	301.0851 (100%); 284.0585 (76.3%); 430.1278 (37.5%); 355.0957 (28.2%); 198.0582 (27.7%)	1 - 9
	430.6393	307.5947	2.4	Nu2			
	434.1959	311.1513	3.9	Nu2	C06173 . C09550 . C09611 . C11787		
	435.0919	312.0473	2.8	Nu2			
	435.0923	312.0477	1.3	Nu2			
	438.1001	315.0555	4.3	Nu2			
	442.2005	319.1559	2.9	Nu2	G1L1M1;A1V1M1;V2C1		
C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	444.1434	321.0988	2.1	Nu2	A1C1E1	231.0975 (100%); 232.101 (42.1%); 232.1292 (27.2%); 229.1549 (21.6%)	3 - 4.5
C ₁₂ H ₁₉ N ₃ O ₆ S	456.1431	333.0985	3	Nu2	P1C1D1	229.1542 (100%); 456.28 (28.6%); 228.1334 (20.6%); 244.0632 (16.7%); 213.1598 (16%)	3 - 4.5
	459.1543	336.1097	2.3	Nu2	G2T1C1;G1A1S1C1;S1C1Q1;T1C1N1		

	464.0792	341.0346	3.5/4.1	Nu2			
C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₅ S	471.1902	348.1456	2.8/3.2	Nu2	G2C1L1;G1A2M1;G1A1VIC1;A1Q1M1;C1L1N1;V1C1Q1	187.1076 (100%); 244.1294 (74.7%); 258.1435 (44.4%); 245.1312 (28.9%); 355.0955 (21%)	3 - 4.5
C ₁₆ H ₃₁ N ₃ O ₄ S	484.247	361.2024	3.7	Nu2	V1L1M1	341.2178 (100%); 228.1338 (92.2%); 144.1014 (38.8%)	3 - 4.5
	490.1999	367.1553	3.3	Nu2	A1M1F1;V1C1F1		
	499.2235	376.1789	3.7	Nu2			
	504.1789	381.1343	3	Nu2			
	504.2174	381.1728	3.4	Nu2			
	512.2062	389.1616	4.2	Nu2			
	515.167	392.1224	4.2	Nu2			
	523.1175	400.0729	1.3	Nu2			
	537.1325	414.0879	2.5	Nu2			
	549.1642	426.1196	3.3	Nu2			
	567.0691	444.0245	1.3	Nu2			
	568.1951	445.1505	2.8	Nu2			
C ₂₉ H ₄₀ N ₆ O ₆ S	723.3158	600.2712	3.5	Nu2	G1C1L1F2; P2V1C1W1	435.2592 (100%)	3 - 4.5
	738.1435	615.0989	1.8/2.3	Nu2			
	740.1592	617.1146	2.2/2.7	Nu2			
	740.1602	617.1156	1.9	Nu2			
	752.1418	629.0972	3.4	Nu2			
	758.1705	635.1259	1	Nu2			
	768.1905	645.1459	2.7	Nu2			
	786.2015	663.1569	2.2	Nu2			
	823.3649	700.3203	2.7	Nu2	Peptides		
	141.0544	18.0098	2.4		C00001		
	150.4294	27.3848	1.2				
	155.016	31.9714	1.6		C00087		
	169.0855	46.0409	3.5		C00469 . C11144		
	194.4599	71.4153	0.7				
	205.0493	82.0047	4.3				
	209.0572	86.0126	4.3				

	210.0521	87.0075	3.5			
	215.0315	91.9869	1.8			
	218.0812	95.0366	1.1		C02502	
	218.9972	95.9526	3.2		C06791 . C06792 . C14039	
	222.1487	99.1041	2.9		C00571	
	231.0287	107.9841	2.1			
	233.0447	110.0001	1.5			
	234.0756	111.031	3.6		C01059 . C02932 . C03056 . C03927 . C05942	
	236.0916	113.047	1.6		C03564 . C03912 . C04322 . C07275	
	242.0842	119.0396	3.3		C03537	
	243.0648	120.0202	4.4			
	243.1014	120.0568	3.2		C00601 . C02083 . C05627 . C06758 . C07113 . C07209 . C07214 . C20782	
	243.1046	120.06	1.1			
	245.0439	121.9993	3.6			
	245.0918	122.0472	0.8		C00153 . C01950 . C02421	
	247.0952	124.0505	4.3			
	249.0393	125.9947	2.1			
	251.0549	128.0103	1.5			
	255.0261	131.9815	3.4			
	257.0418	133.9972	4.4			
	260.0586	137.014	1			
	262.1071	139.0625	4.3		C12110	
	263.0852	140.0406	1.7		C11764	
	265.0504	142.0058	4.1			
	268.064	145.0194	3.7		C04445	
	272.0588	149.0142	1.4			
	273.0737	150.0291	3.9			
	273.1119	150.0673	4.2		C01963 . C02646 . C05629 . C13342 . C15513 . C16706 . C17883 . C19291 . C20697	

	274.1081	151.0635	2.6		C02709 . C03005 . C03522 . C04350 . C04353 . C06804 . C07301 . C16571 . C17755 . C17756 . C18623 . C20634		
	275.0549	152.0103	2.4				
	276.0903	153.0457	1.2				
	281.0657	158.0211	1		C02222 . C02501 . C03453 . C03676 . C06035 . C20901		
	281.0782	158.0336	3.9				
	283.0361	159.9915	4.2		C06328 . C07102		
	283.0573	160.0127	4.8		C07587		
	286.0197	162.9751	3.1		C14764		
	286.0741	163.0295	3		C06809 . C12876		
	287.091	164.0464	2.9		C00166 . C00811 . C01772 . C02763 . C05838 . C06738 . C07114 . C10945 . C12621		
	288.0686	165.024	3.8/4.7				
	288.123	165.0784	4.9		F		
	289.0704	166.0258	3.9		C01606 . C03590 . C06337 . C14096 . C14100		
	291.0495	168.0049	3.3		C20366		
	291.086	168.0414	5		C00544 . C01161 . C01839 . C03198 . C03235 . C05343 . C05577 . C06207 . C06672 . C07087 . C10331 . C11527 . C14109 . C16215		
	298.1435	175.0989	2.9				
	299.0601	176.0155	3.8				
	301.0754	178.0307	3.1		C15415		
C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	301.0852	178.0406	1.3/1.7/ 2.4		G1C1	230.1577 (100%); 199.18 (89.1%); 229.1546 (57.1%); 189.1231 (34.9%); 227.1753 (18.8%)	3 - 4.5
	302.0842	179.0396	4.7				
	307.0806	184.036	3.3/3.9		C05580 . C05616		
	309.1631	186.1185	3.7				
	317.0805	194.0359	1				
	319.0335	195.9889	1.2				

	319.1172	196.0726	4.9		C06580 . C07351 . C10664 . C10684 . C10726 . C12205 . C16778 . C17455		
	321.0963	198.0517	3.8		C01207 . C05584 . C10833 . C21086		
	323.0756	200.031	3.6		C01036 . C01061 . C04642 . C04783 . C05592 . C06318 . C18314		
	326.069	203.0244	2.8/3.3				
	327.0861	204.0415	3.9		C03657 . C06986 . C10335 . C14093 . C17018		
	328.0674	205.0228	2.8				
	328.0845	205.0399	3.2				
	329.1016	206.057	4.3		C09012 . C09311 . C14085 . C14086 . C14092 . C20210		
C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	329.1162	206.0716	3		G1M1	171.1487 (100%); 185.1641 (79.7%); 199.1435 (37.4%); 213.1589 (31.2%); 231.1697 (20.1%)	3 - 4.5
	332.1491	209.1045	1.8		C01458 . C12231 . C14262 . C14334		
	333.0964	210.0518	3.7		C05619		
	335.0755	212.0309	3.6		C04366 . C12624 . C18338		
	337.0487	214.0041	3.3				
	338.0688	215.0242	2.9				
	339.0837	216.039	4.9		C11434		
	340.0611	217.0165	4.2				
	340.1174	217.0728	4.5		C03914 . C05644 . C21289		
	343.0482	220.0036	1.3				
	344.0802	221.0356	1.3		C18570		
	350.1704	227.1258	3.3				
	350.9485	227.9039	5.2				
	353.1495	230.1049	3.7				
	355.0565	232.0119	6.6				
	355.0958	232.0512	2.3		C18251 . C18257 . C18258		
	357.0969	234.0523	3.6		C07731 . C21001		
C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	357.1475	234.1029	2.9		C1L1	245.1495 (100%); 144.1016 (70%); 186.1235 (43.5%); 358.2342 (34.1%); 211.1439 (27.8%)	3 - 4.5
	358.1646	235.12	5.4		C09573		
	361.0889	238.0443	4.3				

	365.0651	242.0205	4.0/4.8			
	365.0797	242.0351	4.4			
	368.0924	245.0478	4.9			
	369.1327	246.0881	3.8		C09210 . C09259 . C09276 . C09278 . C17672 . C19707	
	370.0593	247.0147	2			
	371.0906	248.046	2.5			
	372.0747	249.0301	1.9/2.8			
	372.144	249.0994	3.7			
	373.1278	250.0832	4.2		C16765	
	375.1058	252.0612	4.1			
	375.1071	252.0625	3.6			
	376.1506	253.106	2.5		C12842	
	378.1219	255.0773	2			
	378.2998	255.2552	4.8			
	379.1534	256.1088	0.9		C08731 . C09505 . C09650 . C10267 . C10272 . C10287	
	381.0572	258.0126	3.8		C01236 . C01286 . C04442 . C06893 . C20668	
	383.0756	260.031	4		C10056 . C10086 . C10088 . C18984	
	388.0696	265.025	2.3			
	390.0849	267.0403	2.8			
	390.0853	267.0407	1.3			
	392.1008	269.0562	2.6			
	392.101	269.0564	1.3			
	396.1111	273.0665	2.6			
	405.0161	281.9715	1.3			
	410.7166	287.672	3.3			
	420.1319	297.0873	3.3			
	420.3467	297.3021	5.4		C11285	
	426.0592	303.0146	3.2			
	426.1215	303.0769	3.5			

C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₅ S	430.1638	307.1192	3.1		S1V1C1	299.1715 (100%); 242.1497 (59.7%); 313.1872 (51.3%); 245.1861 (34.3%); 186.0872 (33.8%)	3 - 4.5
	432.1435	309.0989	2.1		S1T1C1		
	433.1295	310.0849	2.4				
	435.0922	312.0476	1				
	440.1482	317.1036	3				
	446.1228	323.0782	1.1/2.3		S1C1D1		
	456.0297	332.9851	3.6				
C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	456.2156	333.171	3.1		A1L1M1;V1C1L1	185.1645 (100%); 213.1596 (93.8%); 244.0634 (86.2%); 231.1337 (84.8%); 229.1548 (69.7%)	3 - 4.5
C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₆ S	458.1588	335.1142	3		A1D1M1;G1E1M1;V1C1D1	231.1338 (100%); 329.1167 (65.1%); 232.1372 (36.4%); 158.081 (32.7%); 458.1587 (24.4%); 312.0898 (23%)	3 - 4.5
	462.1178	339.0732	1.3				
	463.0651	340.0205	3.7				
C ₁₃ H ₂₃ N ₃ O ₆ S	472.1743	349.1297	2.9		C1L1D1	294.0735 (100%)	3 - 4.5
	474.1392	351.0946	3.4				
C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₇ S	474.1536	351.109	2.9		T1C1E1	187.1073 (100%); 247.1107 (62.8%); 217.1538 (51.2%)	3 - 4.5
	476.2066	353.162	4.8		C09221		
	480.2006	357.156	4.8		C16712		
	481.0682	358.0236	2.8				
	481.1961	358.1515	3.5				
	482.09	359.0454	3.9				
	487.1853	364.1407	3		A2T1C1;G2T1M1;G1A1S1M1;G1S1V1C1;T1N1M1;S1Q1M1;C1D1K1		
	488.1549	365.1103	2.5				
	488.1846	365.14	3.1		P1C1F1		
	493.0136	369.969	5.4				
	493.1961	370.1515	2.7				
	494.1586	371.114	2.5		S1C1Y1		
	497.0641	374.0195	1.3				
	500.1696	377.125	2.6		C12198		
	502.1483	379.1037	2.5		C1E2;D2M1		

	503.1326	380.088	2.4				
	503.1803	380.1357	2.3		G1T2C1;A1S1T1C1;G1S2M1		
	504.1646	381.12	2.4		C20629		
	510.0848	387.0402	1.1				
	510.1966	387.152	2.9				
	515.238	392.1934	3.7				
C ₁₃ H ₂₃ N ₅ O ₇ S	516.1757	393.1311	2.3		G3T1C1;G2A1S1C1;G1T1C1N1;G1S1C1Q1;A1S1C1N1	559.3813 (100%); 302.1702 (92.6%); 147.0436 (34.6%)	3 - 4.5
	527.2497	404.2051	3.2		A2P1F1;S1L1W1;V1T1W1		
	533.1437	410.099	3.7		C12422 . C12423		
	542.1431	419.0985	2.9				
	543.1827	420.1381	4.2				
	544.1741	421.1295	2.8				
	546.1385	423.0939	2.5				
	549.2222	426.1776	3.7				
	551.0914	428.0468	1.3				
	555.2833	432.2387	3.3				
	557.1649	434.1203	3.4		C09099 . C16406 . C16407 . C16492 . C18376		
	560.2017	437.1571	2.3		G2T2C1;G1A1S1T1C1;A2S2C1;S1T1C1Q1;G2S2M1;T2C1N1;S2N1M1		
	569.2709	446.2263	4.3		G2K1W1;K1H1Y1;N1K1W1;P3H1		
C ₁₇ H ₃₁ N ₅ O ₇ S	572.2375	449.1929	3.2		Peptide	229.1543 (100%); 273.1444 (37.2%); 230.158 (30.3%)	3 - 4.5
	579.1594	456.1148	3.3				
	580.195	457.1504	3.7				
	592.1258	469.0812	2.8				
	597.1738	474.1292	2.9				
	597.302	474.2574	4.3				
	602.2156	479.171	2.8				
	612.313	489.2684	4.1		A1P1F1R1		
	614.2367	491.1921	2.8				

	625.0741	502.0295	1.3			
	636.1844	513.1398	3.3			
	654.1949	531.1503	3			
	688.2627	565.2181	1.7			
	688.2988	565.2542	3.2			
	691.2627	568.2181	2.8			
	693.3032	570.2586	1.8		Peptides	
	699.17	576.1254	2.8		C10237	
	711.3371	588.2925	3.4			
	722.3168	599.2722	2.8			
	729.1214	606.0768	1.3			
	729.2751	606.2305	2.4		Peptides	
	731.1597	608.1151	2.5			
	736.1283	613.0837	2.2			
	736.1283	613.0837	1.8			
	749.3885	626.3439	3.3			
	775.227	652.1824	2.7		P1T1C2D2;S1P1C2D1E1;S2D4	
	820.4256	697.381	3.3		V1M1H1R2	
	848.3104	725.2658	2.5		Peptides	
	848.457	725.4124	3.7			
	919.3949	796.3503	1.9		Peptides	
	980.3884	857.3438	2.3		Peptides	
	1070.2173	947.1727	1			
	1078.2429	955.1983	1			