



HAL
open science

Déterminants du comportement des pigments au cours de la fermentation alcoolique des vins rosés

Cécile Leborgne

► **To cite this version:**

Cécile Leborgne. Déterminants du comportement des pigments au cours de la fermentation alcoolique des vins rosés. Alimentation et Nutrition. Montpellier SupAgro, 2022. Français. NNT : 2022NSAM0016 . tel-03832277v2

HAL Id: tel-03832277

<https://hal.science/tel-03832277v2>

Submitted on 28 Sep 2023

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

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

**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'INSTITUT AGRO MONTPELLIER
ET DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

En Sciences des Aliments et Nutrition

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

**Portée par
Unité de recherche UMR Sciences Pour l'œnologie INRAE**

**Déterminants du comportement des pigments au cours
de la fermentation alcoolique des vins rosés**

**Présentée par Cécile LEBORGNE
Le 12 juillet 2022**

Sous la direction de Véronique CHEYNIER et Jean-Roch MOURET

Devant le jury composé de

**Olivier DANGLES, Professeur, Université d'Avignon
Victor DE FREITAS, Professeur, Université de Porto
Antonio MORATA, Professeur, Université de Madrid
Véronique CHEYNIER, Directrice de recherche, INRAE Montpellier
Jean-Roch MOURET, Directeur de recherche, INRAE Montpellier
Gilles MASSON, Directeur, Centre du Rosé**

**Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Directrice de thèse
Directeur de thèse
Invité**



**UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER**



À Sylvie et Paulette,

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide et l'expertise de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'UMR Sciences Pour l'Œnologie (UMR SPO) de Montpellier dans le cadre d'un contrat CIFRE avec l'Institut Français de la Vigne et du Vin au Centre du Rosé (Vidauban). Je tiens à remercier mes directeurs de thèse Véronique Cheynier et Jean-Roch Mouret de m'avoir accueilli à l'UMR SPO et permis de réaliser cette thèse sur ce sujet passionnant. Je vous remercie pour votre encadrement et toutes les connaissances et compétences que vous m'avez permis d'acquérir. Merci de m'avoir aidée, soutenue, encouragée... bref d'avoir été là à chaque instant.

Je remercie les membres du jury Victor De Freitas, Antonio Morata et Olivier Dangles d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je souhaite aussi remercier chaleureusement Gilles Masson du Centre du Rosé pour son encadrement et son expertise.

Merci à toute l'équipe du Centre du Rosé, Stéphane, Nathalie, Aurélie, Clémence, Matthias, Vincent pour votre aide pendant les vendanges mais aussi votre soutien tout au long de ma thèse. Merci Aurélie pour ton aide au laboratoire et bien plus encore ! Merci aussi à Marie-Agnès Ducasse pour toutes les analyses couleur et sa bonne humeur.

Je remercie aussi l'intégralité des personnes de l'UMR SPO et plus particulièrement mes trois équipes la PFP, FLAM et BIO. Arnaud, Manue, Nicolas, Jean-Claude et Christine merci pour votre aide dans le boulot et en dehors. Merci aussi à Christian Picou pour son aide en fermentation. Merci à Stéphanie Carrillo et Aude Vernhet pour leur soutien et leur expertise de la SEC !

Merci aussi à la bande de fumeur de l'UMR SPO pour les discussions pas toujours très scientifiques mais très instructives ! Merci Teddy, Olivier, Gab pour votre aide au labo et en dehors ! Hélène, merci d'avoir été là pour moi à chaque instant !!

Merci aux habitants du bureau 001, et oui, c'est presque notre maison, Coline, Eléonore, Saul et Luca parfois ! Merci pour ces discussions interminables et ces fous rires ! Saul mon binôme de toujours et qui lui aussi est supaer grows ;)

Merci Clément, mon coach sportif toujours présent !

Et enfin les derniers mais non des moindres, je remercie mes soutiens de toujours, mes amis et ma famille, qui ont permis que je réalise cet immense projet. Je remercie plus spécialement mon papa et ma maman pour avoir toujours cru en moi. Merci Polo, t'es le meilleur. Merci Théo de m'avoir supportée ! Merci aussi à Jojo pour nos longues discussions autour d'un verre de vin ou devrais-je dire nos longues sessions boulot ;) Merci Alice et Stan d'être là pour moi depuis 10 ans déjà ! Merci Marguerite et Myriam, on a vu la thèse de gueu, je vous attends à la mienne et nous iront à celle de Mymy !! Merci Stacia, mon petit ananas ! et j'en oublie sûrement, il est 23h et le compte à rebours est lancé !

Valorisation des travaux de recherche

Publications :

Leborgne, C., Lambert, M., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Masson, G., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (2022). Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics. *Molecules*, 27(4), 1359.

<https://doi.org/10.3390/molecules27041359>

Leborgne, C., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Carrillo, S., Bougreau, M., Sommerer, N., Vernhet, A., Masson, G., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (2022). Impact of fermentation on the polyphenol composition and color of Grenache, Cinsault, and Syrah rosé wines. *Soumis FoodChem*

Communications :

Leborgne, C., Lambert, M., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Masson, G., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (2022). International Conference on Polyphenols (ICP 2020), Turku, Finland ; Topic: Metabolomics, targeted analysis & big data ; Title: Polyphenol targeted metabolomics to predict rosé wine color

Leborgne, C., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Carrillo, S., Boulet, J.-C., Bougreau, M., Sommerer, N., Masson, G., Vernhet, A., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (2022). 13^e Journée Scientifique de la Vigne et du Vin (JSVV 2022), Montpellier, France ; Session : Maîtrise des défauts olfactifs et de la couleur ; Titre : Facteurs déterminants de la couleur des vins rosés

Poster :

Leborgne, C., Carty, A., Chevallier, A., Verbaere, A., Bougreau, M., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Masson, G., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (2021). Macrowine 2021, Montpellier, France ; Topic : Chemical diversity of “special” wine styles ; Title : Polyphenol targeted and untargeted metabolomics on rosé wines: impact of protein fining on polyphenolic composition and colors

Liste des abréviations

IPT : Indice de Polyphénols Totaux

IC : Intensité Colorante

N : Nuance

H : Angle de teinte

A/A- : base quinonique

AH+ : cation flavylum

AOH : forme hémiacétal

HCDC : hydroxycinnamate decarboxylase

UHPLC-QqQ-MS : Chromatographie ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle

MRM : Monitoring Reaction Mode

HPSEC : Chromatographie haute performance d'exclusion stérique

UHPLC-OrbiTrap : Chromatographie ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à trappe orbitale

HRMS : Spectrométrie de Masse à Haute Résolution

Liste des figures

FIGURE 1: FONCTION PHENOL.....	23
FIGURE 2: CLASSIFICATION DES PRINCIPALES FAMILLES DE COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN.....	23
FIGURE 3: LES STRUCTURES CHIMIQUES DES ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES DU RAISIN ET DU VIN	24
FIGURE 4: LES STRUCTURES CHIMIQUES DES PRINCIPAUX ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES DU RAISIN ET DU VIN	24
FIGURE 5: LES STRUCTURES CHIMIQUES DES PRINCIPAUX ESTERS TARTRIQUES DES ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES DU RAISIN ET DU VIN	25
FIGURE 6: LES STRUCTURES CHIMIQUES DES PRINCIPAUX FLAVAN-3-OLS DU RAISIN ET DU VIN	25
FIGURE 7: ILLUSTRATION DES DEUX TYPES DE LIAISONS A ET B DES PROANTHOCYANIDINES AVEC LES STRUCTURES DES DIMERES A2 ET B2.....	26
FIGURE 8 : STRUCTURES DES PROCYANIDINES DIMERES DE TYPE B DU RAISIN	27
FIGURE 9: STRUCTURES DES ANTHOCYANIDINES MAJORITAIRES DU RAISIN	28
FIGURE 10: EQUILIBRE DES FORMES DE LA MALVIDINE-3-O-GLUCOSIDE EN SOLUTION AQUEUSE : AH ⁺ : FORME FLAVYLIUM, AOH : FORME HEMIACETAL, A/A ⁻ : FORME QUINONIQUE, C : FORME CHALCONE (BROUILLARD & DUBOIS,1977)	29
FIGURE 11 : EQUILIBRE DES FORMES DE LA MALVIDINE-3-O-GLUCOSIDE EN SOLUTION AQUEUSE (BROUILLARD & DUBOIS, 1977): AH ⁺ : FORME FLAVYLIUM, AOH : FORME HEMIACETAL, A/A ⁻ : FORME QUINONIQUE, C : FORME CHALCONE.	30
FIGURE 12: : REPRESENTATION HYPOTHETIQUE DE LA COPIGMENTATION INTRERMOLECULAIRE (TROUILLAS ET AL., 2016)	31
FIGURE 13: REPRESENTATION HYPOTHETIQUE DE LA COPIGMENTATION INTRAMOLECULAIRE DES DERIVES ACYLES (ICI COUMARIQUE) DES ANTHOCYANES (TROUILLAS ET AL., 2016)	32
FIGURE 14: SCHEMA DES ETAPES PRINCIPALES DE LA VINIFICATION DES VINS ROSES	33
FIGURE 15: CINETIQUE DE CROISSANCE DES POPULATIONS DE LEVURES PENDANT LA FERMENTATIO ALCOOLIQUE.....	37
FIGURE 16: VOIE DE LA GLYCOLYSE ET DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DE S. CEREVISIAE (FARIA-OLIVEIRA, 2013)	37
FIGURE 17: EQUILIBRE REACTIONNEL DU DIOXYDE DE SOUFRE EN SOLUTION AQUEUSE	39
FIGURE 18: DIFFERENTS ETATS DU SO ₂ DANS LES MOUTS ET LES VINS.....	39
FIGURE 19: FORMATION DE LA LIAISON BISULFITIQUE.....	39
FIGURE 20: ADDITION DE L'HYDROGENOSULFITE DE SODIUM SUR LE CATION FLAVYLIUM (BERKE ET AL., 1998)	40
FIGURE 21: MECANISME DE FORMATION DES ORTHO-QUINONES	41
FIGURE 22: MECANISMES POSSIBLES DE LA DEGRADATION DES ANTHOCYANES PAR LE PEROXYDE D'HYDROGENE PREFORME (DANGLES & FENGER, 2018).....	43
FIGURE 23: SCHEMA DE LA REACTIVITE DES FLAVONOÏDES	43
FIGURE 24: MECANISME DE DEPOLYMERISATION DES PROANTHOCYANIDINES ET FORMATION D'UN SITE ELECTROPHILE	44
FIGURE 25: STRUCTURES DES PRODUITS DE TYPE A-T (R = (FLAVANOL) _N) (SOMERS, 1971).....	44
FIGURE 26: STRUCTURE D'UN TRIMERE D'ANTHOCYANE AVEC LIAISON DE TYPE A (OLIVEIRA ET AL., 2013).....	45
FIGURE 27: MECANISME DE FORMATION DES ADDUITS T-A+ (JURD, 1969; RIBEREAU-GAYON, 1982).....	46
FIGURE 28: MECANISME DE FORMATION DES ADDUITS FLAVANOL-ETHYL-FLAVANOL ET FLAVANOL-ETHYL-ANTHOCYANE PAR REACTION DE CONDENSATION AVEC L'ALDEHYDE (TIMBERLAKE & BRIDLE, 1976).....	47
FIGURE 29: MECANISME DE FORMATION DES DERIVES PYRANOANTHOCYANIQUES DE LA MALVIDINE-3-O-GLUCOSIDE (BENABDELJALIL ET AL., 2000; FULCRAND, SANTOS, ET AL., 1996).....	48
FIGURE 30: MECHANISME DE FORMATION DE PORTISINES PROPOSE PAR MATEUS ET AL., 2003.....	50
FIGURE 31: DIFFERENTES STRUCTURES DE PIGMENTS DERIVES D'ANTHOCYANES ISOLES DANS LES VINS DE PORTO (DE FREITAS ET AL., 2017).....	50
FIGURE 32: REPRESENTATION DES DIFFERENTES CONDITIONS D'ANALYSE DE LA COULEUR ROUGE ET DES DIFFERENTES FORMES CORRESPONDANTES	52
FIGURE 33: REPRESENTATION DE L'ESPACE CHROMATIQUE CIELAB.....	53
FIGURE 34: REPRESENTATION COLORIMETRIQUE DU TON H*	53
FIGURE 35: LOI DE BEER-LAMBERT.....	55
FIGURE 36: REPRESENTATION DE VAN KREVELEN ILLUSTRANT LE POSITIONNEMENT DE PLUSIEURS CLASSES DE MOLECULES (GOUGEON ET AL., 2009).....	60
FIGURE 37: PHOTO DE FERMENTEURS DE 300ML.....	70

Liste des tableaux

TABLEAU 1: QUANTITES (MG/L) DE CERTAINS COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES VINS ROSES ET ROUGES ISSUS DE GRENACHE (WIRTH ET AL., 2010, 2012)	34
TABLEAU 2: TENEURS MOYENNES ET LOCALISATION DES TROIS PRINCIPALES FAMILLES DE COMPOSES PHENOLIQUES POUR LES CEPAGES PINOT NOIR, PINOT MEUNIER ET CHARDONNAY (EN MG/KG DE BAIE) (MANE ET AL., 2007).	34
TABLEAU 3: COMBINAISON DU SO ₂ AVEC DES COMPOSES CARBONYLES (BLOUIN, 2014)	40
TABLEAU 4: PROPRIETES SPECTRALES DE DIFFERENTS COMPOSES PHENOLIQUES DU VIN	57
TABLEAU 5: COMPOSITION DU MILIEU SYNTHETIQUE UTILISE POUR LES FERMENTATIONS.	67
TABLEAU 6: COMPOSITION DE LA SOLUTION MERE D'OLIGO-ELEMENTS	67
TABLEAU 7: COMPOSITION DE LA SOLUTION MERE DE VITAMINES	68
TABLEAU 8: COMPOSITION DE LA SOLUTION MERE DE FACTEURS ANAEROBIES	68
TABLEAU 9: COMPOSITION DE LA SOLUTION MERE D'ACIDES AMINES	68
TABLEAU 10: COMPOSITION DE LA SOLUTION MERE DE CHLORURE DE FER	68

Table des matières

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN	23
1.1. GENERALITES.....	23
1.2. LES ACIDES PHENOLS.....	24
1.2.1. Les acides hydroxybenzoïques	24
1.2.2. Les acides hydroxycinnamiques	24
1.3. LES FLAVAN-3-OLS	25
1.4. LES ANTHOCYANES	27
1.4.1. Structure et localisation	27
1.4.2. Equilibre des anthocyanes en solution aqueuse	28
1.4.3. Copigmentation.....	31
2. VINIFICATION : DU RAISIN AU VIN ROSE	32
2.1. LA VINIFICATION PARTICULIERE DES VINS ROSES.....	32
2.2. LES ETAPES PRE-FERMENTAIRES	34
2.2.1. Macération	34
2.2.2. Interactions lors de la macération.....	35
2.2.3. Procédés physiques d'extraction	36
2.3. LA FERMENTATION ALCOOLIQUE	36
2.3.1. Généralités	36
2.3.2. Impact de la fermentation sur la couleur.....	38
2.4. LE DIOXYDE DE SOUFRE	39
2.5. REACTIVITE DES COMPOSES PHENOLIQUES AU COURS DE LA VINIFICATION.....	40
2.5.1. Oxydation	40
2.5.1.1. Oxydation chimique et enzymatique	40
2.5.1.2. Oxydation enzymatique : phénomène de brunissement des moûts.....	41
2.5.1.3. Dégradation oxydative des anthocyanes	42
2.5.2. Réactivité des flavonoïdes.....	43
2.5.3. Les mécanismes d'addition nucléophile.....	44
2.5.3.1. Additions de type A-T.....	44
2.5.3.2. Additions de type T-A.....	45
2.5.3.3. Condensation indirecte via un pont éthylidène	46
2.5.3.4. Réactions de cycloaddition.....	48
2.5.4. Pigments des vins rosés.....	50
3. METHODES D'ANALYSE DES COMPOSES PHENOLIQUES ET DE LA COULEUR.....	51
3.1. ANALYSE DE LA COULEUR.....	51
3.1.1. Caractérisation chromatique des vins.....	51
3.1.2. Le système CIELab	52
3.2. ANALYSE DES COMPOSES PHENOLIQUES	54
3.2.1. Techniques de séparations : la chromatographie liquide haute performance (CLHP)	54
3.2.1.1. La chromatographie d'affinité.....	54
3.2.1.2. La chromatographie haute performance d'exclusion stérique (HPSEC).....	54
3.2.2. Techniques de détection des polyphénols.....	55
3.2.2.1. La spectrophotométrie UV-Visible	55

3.2.2.2.	Caractéristiques spectrales des composés phénoliques.....	55
3.2.2.3.	La spectrométrie de masse	57
3.2.2.4.	Analyse des polymères de proanthocyanidines.....	60
3.2.3.	Traitements statistiques.....	61
3.2.3.1.	Plans d'expérience.....	61
3.2.3.2.	Chimométrie.....	61
3.3.	ANALYSE DES VINS ROSES	62
4.	CONCLUSION	62

MATÉRIELS & MÉTHODES65

1.	MATERIELS.....	67
1.1.	MOUT SYNTHETIQUE	67
1.2.	MOUITS NATURELS.....	69
1.2.1.	Vendange 2018.....	69
1.2.2.	Vendange 2019.....	69
2.	METHODES.....	69
2.1.	MISE EN ŒUVRE DES FERMENTATIONS.....	69
2.1.1.	Fermentations vendange 2019	70
2.1.2.	Fermentations vendange 2018	70
2.2.	DESORPTION DES POLYPHENOLS DES PAROIS DE LEVURES	71
2.3.	HPSEC	71
2.4.	PHLOROGLUCINOLYSE	72
2.5.	ANALYSES HPLC-MS CIBLEE	72
2.6.	ANALYSES HPLC-MS NON CIBLEE.....	72
2.6.1.	Analyse HPLC-HRMS	72
2.6.2.	Analyse des données	73

ELUCIDATING THE COLOR OF ROSÉ WINES USING POLYPHENOL-TARGETED METABOLOMICS.....75

IMPACT DU PH, DE LA TEMPERATURE ET DE LA CONCENTRATION EN SULFITE LORS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE SUR LA COULEUR ET LA COMPOSITION PHENOLIQUE DES VINS ROSES97

MULTI-METHOD STUDY OF THE IMPACT OF FERMENTATION ON THE POLYPHENOL COMPOSITION AND COLOR OF GRENACHE, CINSULT, AND SYRAH ROSÉ WINES111

UNTARGETED METABOLOMICS APPROACH TO UNRAVEL THE IMPACT OF FERMENTATION ON COLOR AND PHENOLIC COMPOSITION OF ROSÉ WINES125

DISCUSSION GENERALE.....145

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES151

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....153

ANNEXE 1 : « SUPPLEMENTARY DATA » CHAPITRE 3.....185

ANNEXE 2 : « SUPPLEMENTARY DATA » CHAPITRE 5.....191

Introduction générale

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet PigRosé, porté par l'Institut Français de la Vigne et du Vin – Centre du Rosé (Vidauban, France) et financé par le Compte d'affection Spécial au Développement Agricole et Rural (CasDAR). Ce projet vise à mieux comprendre la structure et la réactivité des pigments qui contribuent à la couleur des vins rosés pour optimiser en fonction les procédés de vinification.

La consommation de vin rosé a fortement augmenté au cours des 20 dernières années, atteignant plus de 10% du marché mondial des vins tranquilles. La couleur est l'un des éléments clés de la commercialisation de ces vins du fait qu'ils sont généralement conditionnés en bouteilles de verre transparent. Il s'agit donc d'un facteur prédominant dans l'acte d'achat des consommateurs, bien qu'il n'y ait pas de consensus sur la couleur idéale. La couleur des vins rosés varie considérablement, allant d'une couleur très pâle "sable" ou "nacre" à très vive de type "grenat", en passant par des nuances orange "abricot" ou rouge "framboise", en fonction du cépage ainsi que de divers facteurs liés à l'environnement, aux pratiques viticoles et aux processus de vinification.

La couleur des vins rosés, comme celle des vins rouges, est due à la présence de composés phénoliques tels que les anthocyanes extraits de la pellicule des raisins rouges et de pigments dérivés formés lors des différentes étapes de la vinification. La vinification particulière des vins rosés implique une macération contrôlée des pellicules dans le jus avant une étape de fermentation alcoolique en phase liquide contrairement aux vins rouges fermentés en phase hétérogène. Cette particularité limite l'extraction et entraîne des proportions différentes de composés phénoliques dans les vins rosés par rapport aux vins rouges, ce qui peut impacter les réactions qui se produisent pendant la vinification.

L'essor actuel des vins rosés ainsi que l'importance que revêt la couleur pour leur commercialisation et le manque de données dans la littérature ont engendré cette étude sur la couleur et donc l'identification des pigments mis en jeu. La thèse, financée par l'ANRt dans le cadre d'un contrat Cifre, se focalise sur l'étape de fermentation alcoolique connue pour impacter massivement la couleur. En effet, les œnologues de Provence rapportent une grande variabilité de pertes de couleur lors de cette étape. Les objectifs de ce travail mené à l'Institut National de la Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE, Montpellier) dans l'Unité Mixte de Recherche « Sciences pour l'Œnologie » sont d'approfondir les connaissances fondamentales sur les pigments des vins rosés et leur relation avec la couleur ainsi que de comprendre l'impact de la fermentation alcoolique sur la couleur perçue et la composition en pigments. Cette thèse est constituée de trois articles précédés d'une étude bibliographique et d'une partie méthodologique.

Le chapitre 1 d'étude bibliographique permet d'introduire les concepts nécessaires à la compréhension de ce travail. Une première partie référence les différents composés du raisin susceptibles d'impacter la couleur des vins. Une deuxième partie s'intéresse à la vinification particulière des vins rosés et plus précisément à l'étape de fermentation alcoolique en lien avec la couleur et la formation de pigments dérivés. Une dernière partie s'intéresse à l'analyse de la couleur perçue et des composés phénoliques responsables.

Le chapitre 2 décrit les méthodes et le matériel utilisé lors de ce travail.

Le chapitre 3 regroupe les résultats d'une première étude menée sur 268 vins commerciaux issus de la collection des rosés du monde, constituée par l'Union des Oenologues de France pour le concours "Mondial du Rosé®", sélectionnés de manière à couvrir une large palette de couleurs et de styles. Sur ces échantillons, la concentration de 125 composés phénoliques a été analysée par une approche

métabolomique ciblée utilisant la chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle (UHPLC-QqQ-MS) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) et la couleur caractérisée par la spectrophotométrie et les paramètres CieLab. L'analyse chimométrique des données de composition et de couleur a montré que, bien que l'intensité de la couleur soit principalement déterminée par l'extraction des polyphénols (en particulier les anthocyanes et les flavanols) à partir des raisins, les différents styles de couleur correspondent à différentes compositions pigmentaires. Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics », parue dans la Revue *Molecules* en 2022.

Le chapitre 4 est une première approche de l'étude de la couleur et de la composition phénolique lors de la fermentation alcoolique. Cette étude s'est intéressée à l'impact de la température (12°C ; 16°C ; 20°C), du pH (3.1 ; 3.5 ; 3.9) et des sulfites (20 mg/L ; 50mg/L ; 80mg/L) pendant la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition phénoliques des vins rosés. Les modalités de cette première étude ont été optimisées à l'aide de plan d'expérience servant à la modélisation de surfaces de réponses (Box-Behnken et plan complet). Ces plans ont été appliqués à trois cépages différents (Grenache, Syrah et Cinsault) largement utilisés pour l'élaboration de vins rosés, notamment en Provence, à deux niveaux de macération différents pour chaque cépage. Ces premiers travaux n'ont pas permis d'observer d'impact des paramètres étudiés (pH, SO₂, température) sur la composition en polyphénol des vins formés. Cependant, ils ont permis d'illustrer l'influence des équilibres chimiques des anthocyanes avec le pH et les sulfites sur la couleur.

Le chapitre 5 reprend les résultats des points centraux des six plans d'expériences réalisés précédemment en y ajoutant l'analyse des pigments adsorbés sur les parois des levures. Les six modalités ont été comparées afin de mettre en lumière l'impact de la matière première sur les phénomènes chimiques et physico-chimiques impliqués lors de la fermentation alcoolique. Afin d'évaluer les changements de couleur et de composition, cette étude a combiné la spectrophotométrie, la chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse triple quadripolaire en mode MRM et la chromatographie d'exclusion stérique à haute performance. Les couleurs des moûts et des vins ont été influencées par différentes compositions phénoliques. Les moûts de Grenache et de Cinsault ont montré de fortes quantités de pigments oligomériques dérivés d'acides hydroxycinnamiques et de flavanols qui ont été perdus en grande partie pendant la fermentation en raison de leur adsorption sur les lies. À l'inverse, la couleur des moûts de Syrah était principalement due aux anthocyanes natives qui ont été convertis en pigments dérivés par réaction avec les métabolites de la levure, avec une perte de couleur limitée pendant la fermentation. La couleur du vin rosé dépend du niveau d'extraction et de l'état d'oxydation au stade du moût, qui déterminent tous deux la composition du moût et, par conséquent, les réactions et interactions des polyphénols qui se produisent pendant la fermentation. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée « Impact of fermentation on the polyphenol composition and color of Grenache, Cinsault, and Syrah rosé wines », soumise dans la revue *Food Chemistry* en mars 2022.

Le chapitre 6 reprend les travaux sur la fermentation des trois cépages emblématiques de la Provence : Grenache, Cinsault et Syrah. Les moûts obtenus dans des conditions expérimentales standardisées et les vins issus de leur fermentation à l'échelle pilote (100L) et à l'échelle laboratoire (250mL) ont été analysés par une approche de métabolomique non ciblée mettant en œuvre la chromatographie liquide ultra-haute performance couplée spectrométrie de masse haute résolution. Les résultats obtenus ont confirmé ceux de l'approche ciblée et mis en évidence des nouveaux marqueurs des cépages et de la vinification. Nous avons ainsi établi des comportements particuliers de ces trois

cépages au cours de la vinification en rosé et validé l'échelle laboratoire utilisée pour ce travail. Un article reprenant les résultats de ces travaux est en cours de rédaction.

Chapitre 1 :
Etude Bibliographique

1. Les composés phénoliques du raisin

1.1. Généralités

Les composés phénoliques sont issus du métabolisme secondaire des végétaux et interviennent dans le développement et la défense des plantes face aux stress environnementaux. Ils sont formés à partir de sucres simples par la voie de biosynthèse de l'acide shikimique conduisant à la formation de deux acides aminés aromatiques, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques sous l'action de la phénylalanine ammonialyase (PAL) et de la tyrosine ammonialyase (TAL) précédant la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Macheix, 1996). Les composés phénoliques biosynthétisés sont caractérisés par la présence d'une ou plusieurs fonctions phénols (Figure 1) constituées d'un noyau benzénique portant un groupement hydroxyle. *Stricto sensus*, le terme « polyphénol » s'applique aux molécules possédant plusieurs noyaux phénoliques (Quideau et al., 2011) même si, dans la littérature, le terme est souvent utilisé pour désigner l'ensemble des composés phénoliques (Sarni-Manchado & Cheyrier, 2006).

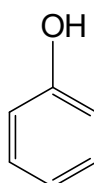


Figure 1: Fonction phénol

Les composés phénoliques présentent une énorme variabilité de structures chimiques, depuis des composés de faible poids moléculaire comme les acides phénols, jusqu'à des oligomères et polymères, comme les proanthocyanidines. Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés et répartis en deux grandes classes : les non-flavonoïdes et les flavonoïdes (Figure 2).

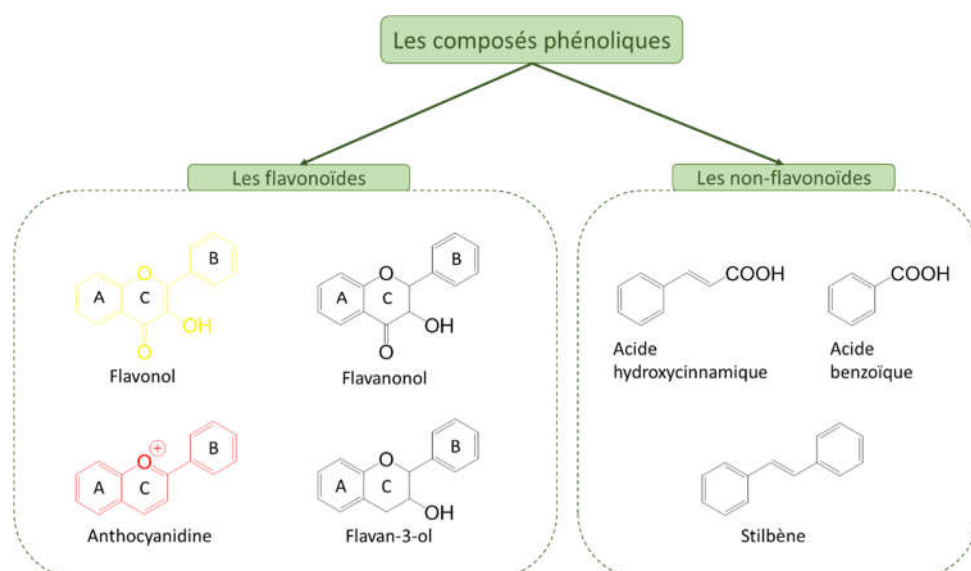


Figure 2: Classification des principales familles de composés phénoliques du raisin

Les composés dits flavonoïdes sont caractérisés par une structure complexe en C6-C3-C6 constituée de deux noyaux benzéniques A et B réunis par un hétérocycle oxygéné C et substitués par des fonctions hydroxyles. Ils se divisent, selon la nature du noyau C, en plusieurs sous-familles dont les principales sont : les flavonols, les flavanols, les flavan-3-ols et les anthocyanidines (Figure 2). Les familles des anthocyanidines et des flavan-3-ols sont présentées en détail en Parties 1.4 et 1.3.

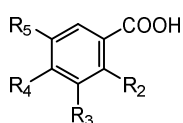
Les composés dits non-flavonoïdes comprennent les composés dépourvus de structure « flavone » tels que les stilbènes (C6-C2-C6), les acides benzoïques (C6-C1) et hydroxycinnamiques (C6-C3) (Figure 2). Les acides phénols, hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, sont présentés en détail en Partie 1.2.1 et Partie 1.2.2.

A l'échelle cellulaire, les composés phénoliques s'accumulent principalement en solution dans les vacuoles des cellules végétales (Moskowitz & Hrazdina, 1981) mais également au niveau des parois cellulaires et vacuolaires pour certains composés comme les flavanols (Joutei et al., 1994).

1.2. Les acides phénols

1.2.1. Les acides hydroxybenzoïques

Il existe sept acides hydroxybenzoïques décrits dans le raisin avec une structure générale en C6 – C1 et différentes substitutions du noyau aromatique : hydroxylation ou méthylation (Figure 3). Ils sont présents sous forme libre, glycosylée ou estérifiée par les flavanols (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006). L'acide gallique est majoritaire (entre 100 et 230 mg/kg) alors que les acides salicylique et gentisique sont retrouvés à l'état de trace (Chira et al., 2008). L'acide gallique est principalement localisé dans les cellules de la pellicule et des pépins (Chen et al., 2006; Yilmaz & Toledo, 2004).

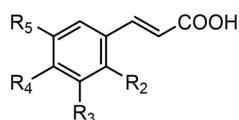


Acides hydroxybenzoïques	R2	R3	R4	R5
Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
Acide vanilique	H	OCH3	OH	H
Acide gallique	H	OH	OH	OH
Acide syringique	H	OCH3	OH	OCH3
Acide salicylique	OH	H	H	H
Acide gentisique	OH	H	H	OH

Figure 3: Les structures chimiques des acides hydroxybenzoïques du raisin et du vin

1.2.2. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques ont une structure de base en C6-C3 dérivant de l'acide cinnamique, avec différentes substitutions du noyau aromatique : hydroxylation et méthylation (Figure 4).



Acides hydroxycinnamiques	R2	R3	R4	R5
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H	OH	H
Acide caféique	H	OH	OH	H
Acide férulique	H	OCH3	OH	H
Acide sinapique	H	OCH3	OH	OCH3

Figure 4: Les structures chimiques des principaux acides hydroxycinnamiques du raisin et du vin

Dans le raisin, ils sont majoritairement présents sous forme estérifiée avec l'acide tartrique (Figure 5) et sont aussi largement impliqués dans l'acylation des substituants glucosides des anthocyanes.

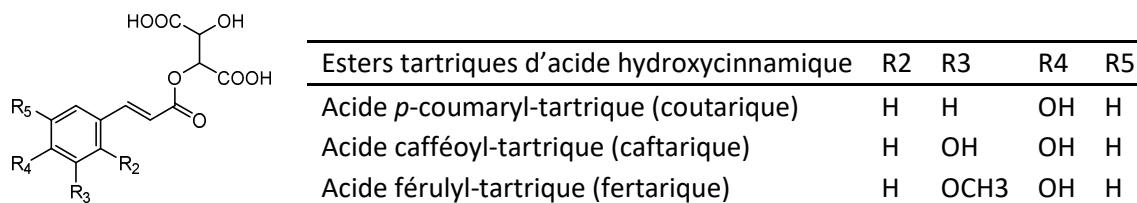


Figure 5: Les structures chimiques des principaux esters tartriques des acides hydroxycinnamiques du raisin et du vin

Les esters hydroxycinnamoyltartriques majeurs sont l'acide caftarique (environ 200mg/kg (Chira et al., 2008)) et l'acide coutarique, l'acide fertarique étant en plus faible concentration. Ils sont principalement sous la forme *trans* mais existent aussi sous forme *cis* en faible quantité (Singleton et al., 1978). Les isomères *cis* ont longtemps été confondus avec les dérivés glucosylés (Biau, 1996; Somers et al., 1987). Une hydrolyse naturelle des esters d'acides hydroxycinnamiques, amplifiée sous l'action d'estérases, peut engendrer la formation d'acides hydroxycinnamiques libres minoritaires (Ribéreau-Gayon, 1965; Somers et al., 1987).

Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés sont présents dans les vacuoles des cellules de la pellicule et de la pulpe des baies de raisin (Ribéreau-Gayon, 1965). Les teneurs d'esters hydroxycinnamoyltartriques dans la matière fraîche sont plus élevées dans la pellicule que dans la pulpe et varient selon le cépage dans le genre *Vitis* (20 - 200 mg/kg) (Cheynier, Souquet, et al., 1989; Chira et al., 2008; Okamura & Watanabe, 1981; Romeyer, 1985). Les différentes proportions de chaque composé peuvent servir de critère taxonomique (Boursiquot et al., 1986a).

1.3. Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols (ou flavanols) sont les composés phénoliques majeurs des raisins. Ils sont présents sous forme monomérique mais aussi sous forme plus ou moins polymérisée. Deux dénominations sont largement utilisées pour faire référence aux oligomères et polymères de flavan-3-ols : les tanins condensés ou proanthocyanidines. Le terme de tanins condensés fait référence à la capacité de ces composés à interagir avec les protéines des peaux d'animaux fraîches pour les rendre imputrescibles (tannage, production du cuir). Le terme proanthocyanidine fait lui référence aux unités d'anthocyanidines libérées après hydrolyse acide à chaud (Bate-Smith, 1954). Deux types de proanthocyanidines, dénommés d'après l'anthocyanidine qui est libérée, sont connus dans le raisin : les procyanidines et les prodéphinidines (Czochanska et al., 1980). Ces oligomères et polymères sont constitués de quatre unités monomériques de flavan-3-ols : la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la (+)-gallocatéchine et la (-)-épigallocatéchine (Figure 6).

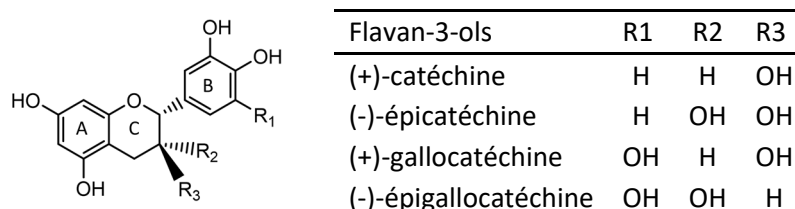


Figure 6: Les structures chimiques des principaux flavan-3-ols du raisin et du vin

Les procyanidines se rapportent aux oligomères et polymères de catéchine et d'épicatéchine alors que les prodéphinidines sont constituées d'unités de gallocatéchine et d'épigallocatéchine (Porter et al., 1985). Cependant ces différents types d'unités coexistent souvent dans un même polymère. La (+)-

catéchine et la (-)-épicatéchine se distinguent par l'orientation du carbone 3 asymétrique du cycle C. La (+)-catéchine et la (+)-gallocatéchine ainsi que la (-)-épicatéchine et la (-)-épigallocatéchine se différencient selon le degré d'hydroxylation du cycle B. Ces unités monomériques peuvent également être trouvées sous forme estérifiée en position 3 du cycle C par l'acide gallique. L'épicatéchine-3-O-gallate est l'ester majoritairement identifié dans les raisins même si la catéchine-3-O-gallate, la gallocatéchine-3-O-gallate ainsi que l'épigallocatéchine-3-O-gallate ont été décelés en très faible quantité (Gagné et al., 2006; Lee & Jaworski, 1990). Par ailleurs, des flavanols glucosylés ont également été détectés dans le pépin du raisin en faible concentration (Delcambre & Saucier, 2012; Zerbib et al., 2018). Les monomères principaux identifiés dans le raisin sont (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la (-)-épigallocatéchine et la (-)-épicatéchine-3-O-gallate (Tsai Su & Singleton, 1969).

Il existe une grande diversité de proanthocyanidines qui se distinguent par la nature et la séquence de leurs unités constitutives. De manière générale, la catéchine est majoritairement une unité terminale alors que l'épicatéchine, galloylée ou non, prédomine comme unité supérieure. Les proanthocyanidines se différencient aussi par leur degré de polymérisation (DP) ainsi que par le type de liaison interflavaniques : les liaisons de type B (Fletcher et al., 1977) et les liaisons de type A (Jacques et al., 1973) (Figure 7). Les liaisons interflavaniques de type B se font entre le carbone C4 de l'unité supérieure et les carbones C8 ou C6 de l'unité inférieure. Les liaisons interflavaniques de type A ont une liaison éther en plus par rapport au type B qui peut se faire entre le carbone C2 du cycle C de l'unité supérieure et la fonction hydroxyle portée par le carbone C7 ou C5 du cycle A de l'unité inférieure. Chimiquement, il est possible de convertir des liaisons de type B en liaisons de type A par oxydation radicalaire (Kondo et al., 2000).

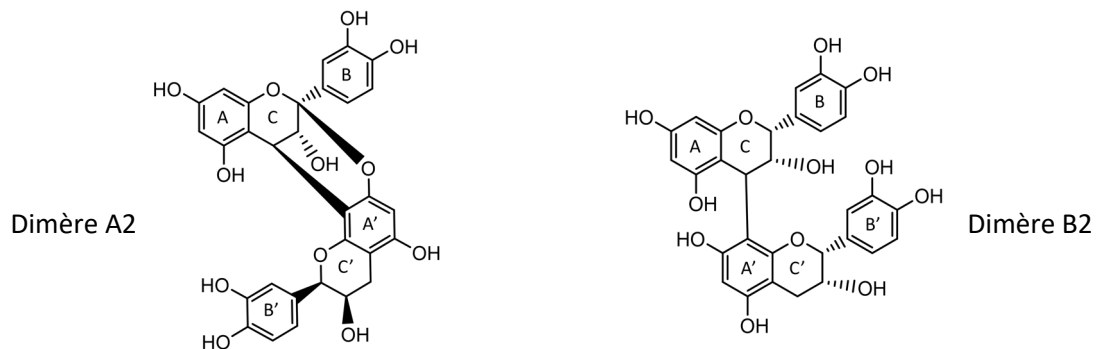
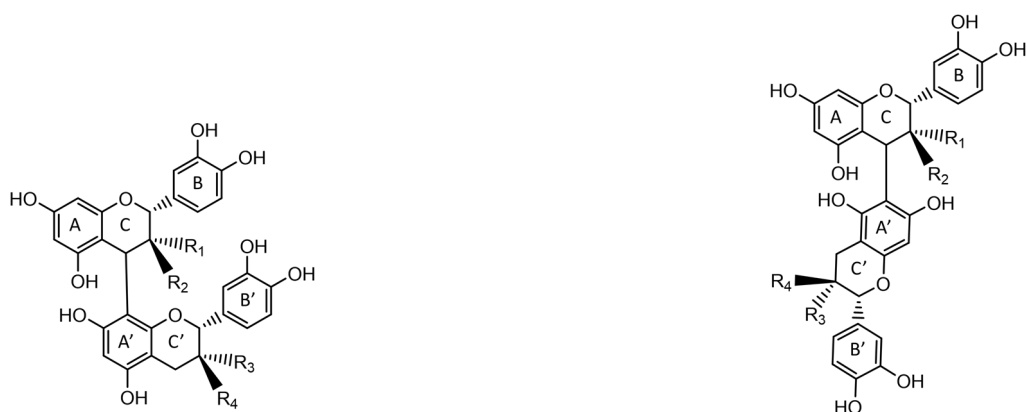


Figure 7: Illustration des deux types de liaisons A et B des proanthocyanidines avec les structures des dimères A2 et B2

En prenant en compte les cinq unités monomériques du raisin, il existe 50 possibilités de structures de dimères et 500 de trimères mais seulement une trentaine ont été détectés dans les raisins issus de *Vitis vinifera*, majoritairement des procyanidines de type B (De Freitas, 1995) dont les structures sont présentées dans la Figure 8 ainsi que des trimères (Ricardo da Silva et al., 1991). La présence de proanthocyanidines de type A est anecdotique avec la détection d'un seul dimère dans les pellicules et pépins de Merlot et Cabernet Sauvignon (Vivas de Gaulejac et al., 2001). En outre, de nouvelles formes de procyanidines appelées tanins couronnes ont été décelées en très faible quantité dans les pellicules de Chardonnay, Cabernet-Sauvignon et Sauvignon blanc (Longo et al., 2019; Zeng et al., 2019).



Dimères de procyanidines	R1	R2	R3	R4
B ₁	OH	H	H	OH
B ₂	OH	H	OH	H
B ₃	H	OH	H	OH
B ₄	H	OH	OH	H

Dimères de procyanidines	R1	R2	R3	R4
B ₅	OH	H	OH	H
B ₆	H	OH	H	OH
B ₇	OH	H	H	OH
B ₈	H	OH	OH	H

Figure 8 : Structures des procyanidines dimères de type B du raisin

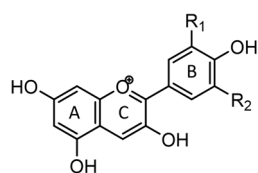
Dans la baie de raisin, les flavanols sont majoritairement sous forme de polymères. Leur taille est représentée par le degré de polymérisation (DP) défini comme le nombre d'unités monomériques constitutives.

Les flavanols sont localisés principalement dans la pellicule (100 – 500 mg/kg) et les pépins (1000-6000 mg/kg) bien que de faibles quantités aient été détectées dans la pulpe (Bourzeix et al., 1986; Mané et al., 2007; Ricardo da Silva et al., 1992). Dans les pépins, les proanthocyanidines sont des procyanidines partiellement galloylées (Prieur et al., 1994) possédant un DPm pouvant aller jusqu'à 17 (Prieur et al., 1994). Elles sont localisées dans les cellules à parois minces des couches superficielles des pépins (Geny et al., 2003; Thorngate & Singleton, 1994). Dans les pellicules, des procyanidines mais également des prodelfinidines ont été détectées avec un DPm dépassant les 30 (Souquet et al., 1996). Les flavanols sont présents sous forme libre dans le suc vacuolaire des cellules de la pellicule mais aussi liés avec les protéines constitutives de la face interne des membranes vacuolaires ou aux polysaccharides des parois cellulaires (Joutei & Glories, 1994). Il a été montré l'existence d'un gradient de condensation croissant de la pulpe vers l'épiderme à travers les cellules de la pellicule (Joutei et al., 1994).

1.4. Les anthocyanes

1.4.1. Structure et localisation

Les anthocyanes sont les pigments responsables de la couleur rouge des raisins et des vins. Elles se différencient par leurs niveaux d'hydroxylation et de méthylation, par la nature et la position des oses liés à la molécule mais aussi par la nature et le nombre des acides estérifiant les sucres. La variabilité de ces structures permet de discriminer genre et espèce (Mazza & Miniati, 1993). La variation du degré d'hydroxylation ou de méthylation du cycle B conduit aux cinq anthocyanidines présentes dans le genre *Vitis* : delphinidine, cyanidine, pétunidine, péonidine et malvidine (Figure 9). La pelargonidine a aussi été détectée à l'état de traces dans certains cépages (He et al., 2010)



Anthocyanidines	R1	R2
pelargonidine	H	H
cyanidine	OH	H
péonidine	OCH ₃	H
delphinidine	OH	OH
pétunidine	OCH ₃	OH
malvidine	OCH ₃	OCH ₃

Figure 9: Structures des anthocyanidines majoritaires du raisin

Chez *Vitis vinifera*, les anthocyanidines sont substituées par le glucose majoritairement en position 3 qui peut lui-même être acylé en position 6 par l'acide acétique, l'acide caféique ou l'acide *p*-coumarique. Vingt anthocyanes principales ont été décrites : 5 glucosylées, 5 acétylées, 5 cafféoylées, 5 *p*-coumaroylées et 5 cafféoylées (Anderson, 1970; Baldi et al., 1995; Gueffroy et al., 1971; Vidal, Hayasaka, et al., 2004). De nouvelles anthocyanes acylées par des acides organiques inhabituels, tels que l'acide lactique et l'acide férulique, ont également été identifiées à l'état de traces dans certains vins rouges (Alcalde-Eon et al., 2006) ainsi que des dimères et trimères d'anthocyanes (Oliveira et al., 2013; Vidal, Meudec, et al., 2004). L'espèce *Vitis vinifera* a la particularité de présenter des teneurs importantes en anthocyanes monoglucosides et seulement des traces de 3,5 diglucosides alors que d'autres espèces tel que *Vitis riparia* ou *Vitis rupestris* ont révélé de grandes quantités de 3,5 diglucosides (Baldi et al., 1995; Mazza & Miniati, 1993; Ribéreau-Gayon, 1959). De plus, des variabilités sont notables au sein même de l'espèce *Vitis vinifera* et les teneurs et proportions des différentes anthocyanes peuvent être impactées par les pratiques viticoles et les conditions environnementales (climat, terroir, ensoleillement) (Cortell et al., 2007; Larice, 1989; Rigaud et al., 1996). Les dérivés de la malvidine 3-glucoside sont les plus abondants dans la majorité des cépages ; ils varient de 90% dans le Grenache à un peu moins de 50% dans le Sangiovese (Ribéreau-Gayon et al., 2012). La variété Pinot noir est quant à elle dépourvue de dérivés acétylés d'anthocyanes (Boss et al., 1996; Mazza et al., 1999). Les nombreuses études sur la concentration (de 500 à 3 000 mg/kg) et les proportions anthocyaniques de plusieurs variétés *Vitis vinifera* ont révélé une grande variabilité permettant d'envisager des classifications des cépages en fonction de ces paramètres (Larice, 1989; Revilla et al., 2001; Roggero et al., 1986, 1988).

Les anthocyanes sont localisées dans la pellicule des raisins rouges au niveau des vacuoles des cellules de l'épiderme et des premières assises cellulaires de l'hypoderme (Amrani Joutei, 1993; Joutei & Glories, 1994). Dans le cas anecdotique des cépages teinturiers tel que l'Alicante Bouschet ou le Gamay Fréaux, des anthocyanes sont aussi présentes dans les vacuoles des cellules de la pulpe (Cheynier & Fulcrand, 1998).

1.4.2. Equilibre des anthocyanes en solution aqueuse

En solution, les anthocyanes existent sous différentes formes en fonction du pH (Figure 10 & Figure 11). Les formes flavylium (AH⁺), de couleur rouge, ne sont prédominantes qu'en milieu très acide (pH<2) et sont soumises à des réactions de déprotonation et d'hydratation lorsque le pH augmente (Brouillard & Dubois, 1977). La cinétique d'échange de proton AH⁺/A est très rapide et conduit à des formes quinoniques (A/A⁻) de couleur bleu-violet. L'hydratation, accompagnée de la perte d'un proton, conduit à la forme hémiacétale incolore (AOH) qui prédomine aux pHs faiblement acides. L'ouverture du cycle C des formes hémiacétales amène à la formation des formes chalcones légèrement jaunes (E-chalcone et Z-chalcone). Au pH du vin (pH=3-4), les formes flavylium ne représentent qu'entre 10 et 30% (Ribéreau-Gayon, 1982; Trouillas et al., 2016), alors que les formes incolores représentent entre 60 et 80% des formes en équilibre. Cependant ces équilibres peuvent être déplacés par des

phénomènes d'interaction moléculaire, copigmentation et auto-association, décrits ci-dessous, avec pour conséquence une intensification de la couleur (Dangles & Fenger, 2018; Trouillas et al., 2016).

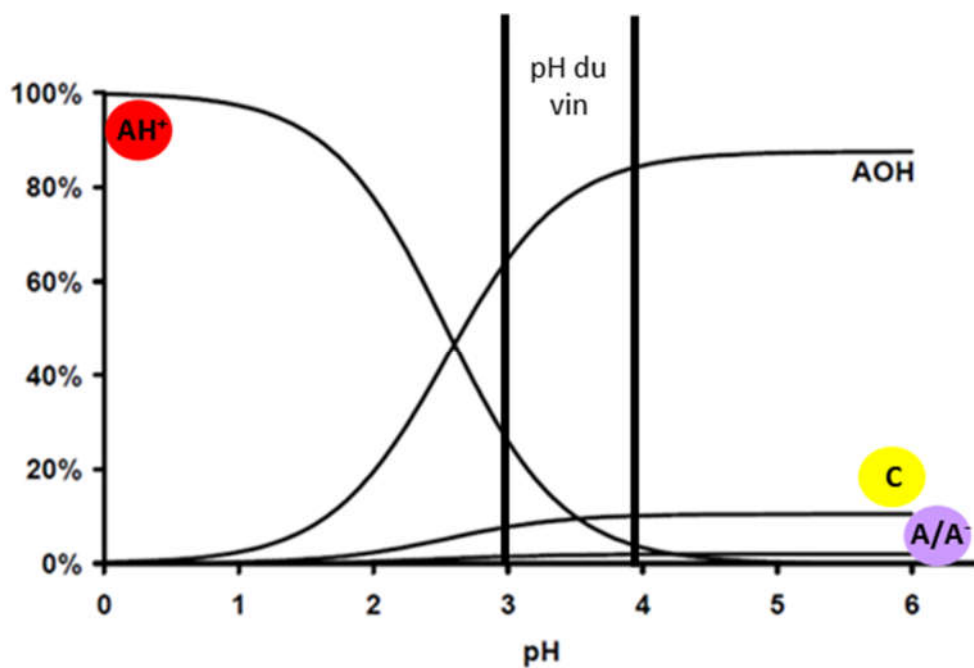


Figure 10: Equilibre des formes de la malvidine-3-O-glucoside en solution aqueuse : AH⁺ : forme flavylium, AOH : forme hémicétal, A/A⁻ : forme quinonique, C : forme chalcone (Brouillard & Dubois, 1977)

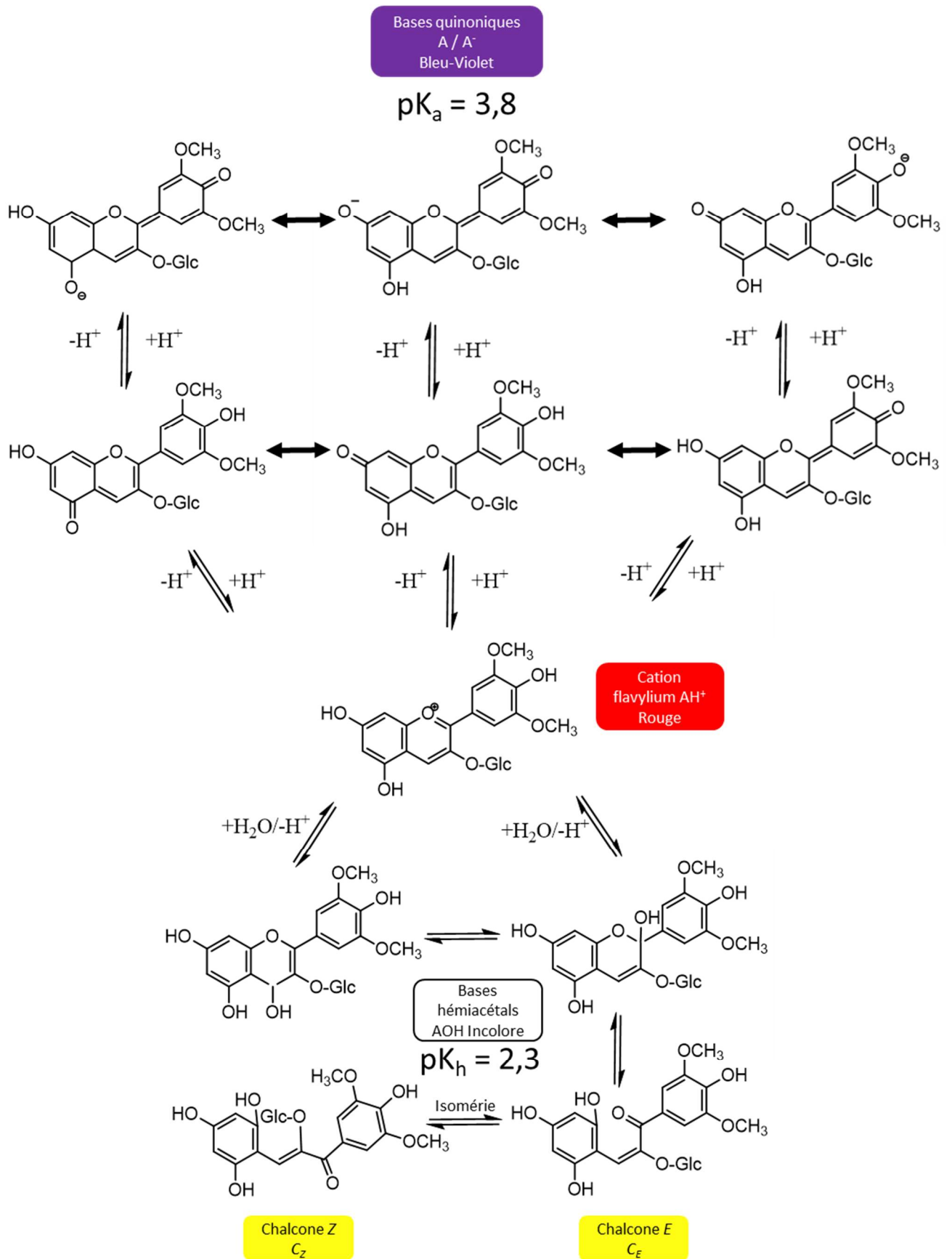


Figure 11 : Equilibre des formes de la malvidine-3-O-glucoside en solution aqueuse (Brouillard & Dubois, 1977): AH⁺ : forme flavylium, AOH : forme hémiacétal, A/A⁻ : forme quinonique, C : forme chalcone.

1.4.3. Copigmentation

La copigmentation peut être définie comme (i) la formation de complexes non covalents impliquant un pigment anthocyanique ou dérivé d'anthocyane d'une part et un copigment d'autre part et (ii) les modifications subséquentes des propriétés optiques du pigment (Trouillas et al., 2016). Certains auteurs estiment que ce phénomène peut représenter entre 30 et 50 % de la couleur des vins rouges jeunes (Boulton, 2001).

A la différence des formes incolores, les formes colorées des anthocyanes (AH^+ et AO) ont des chromophores plans possédant une forte délocalisation des électrons π qui permet la formation d'un complexe d'empilement vertical avec la partie plane riche en électrons π d'un copigment. Il en résulte généralement une augmentation de l'absorbance (effet hyperchrome) et, dans certains cas, un déplacement de la longueur d'onde de l'absorbance maximale du pigment (effet bathochrome) (Asen et al., 1970, 1975). La formation du complexe entre le chromophore et le copigment déplace l'équilibre d'hydratation vers la forme cationique flavylum induisant une intensification de la couleur (effet hyperchrome) (Brouillard & Dangles, 1993). L'effet bathochrome peut-être expliqué par des interactions électrostatiques pouvant stabiliser le complexe formé et impacter la couleur (Alluis et al., 2000).

Il existe plusieurs types de phénomènes de copigmentation :

➤ Copigmentation intermoléculaire

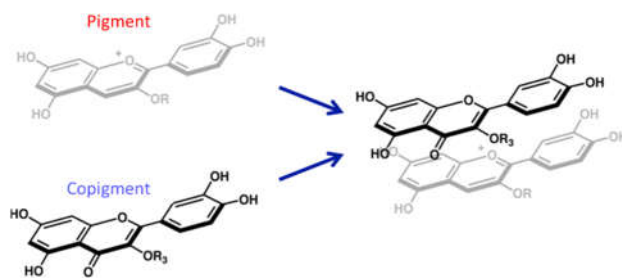


Figure 12: : Représentation hypothétique de la copigmentation intramoléculaire (Trouillas et al., 2016)

Ce phénomène implique la mise en jeu de copigments qui interagissent avec un pigment anthocyanique induisant une modification de sa couleur comme illustré par la Figure 12. En général, les copigments doivent avoir des systèmes π -conjugués, qui sont supposés favoriser les interactions d'empilement π - π et des groupes donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène tels que les groupes OH et CO. Les principaux copigments qui ont été identifiés et présents dans les rosés sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (Cai et al., 1990; Dangles & Brouillard, 1992a, 1992b). Du fait de leur structure, les composés flavonoïdes sont les copigments les plus efficaces (c.-à-d. ceux qui produisent les effets bathochromes et hyperchromes les plus élevés) (Trouillas et al., 2016). Les copigments les plus étudiés sont les acides phénols (acide caféique et férulique) (Marković et al., 2000; B. Zhang et al., 2015). Les acides benzoïques sont généralement des copigments moins efficaces que les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés (S. G. Lambert et al., 2011; Malaj et al., 2013). Pour les tanins condensés, c'est la conformation du copigment qui influence la copigmentation plutôt que le degré de polymérisation (Berké & Freitas, 2005). Ce phénomène d'association constituerait la première étape dans la formation de liaisons covalentes entre anthocyanes et tanins (Brouillard & Dangles, 1994; Liao et al., 1992; Rein & Heinonen, 2004).

➤ Copigmentation intramoléculaire

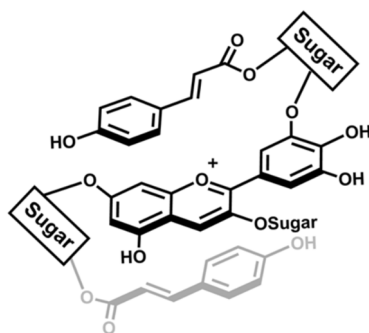


Figure 13: Représentation hypothétique de la copigmentation intramoléculaire des dérivés acylés (ici coumarique) des anthocyanes (Trouillas et al., 2016)

Elle met en jeu deux parties de la même molécule, dont l'une joue le rôle de copigment et l'autre étant le chromophore tel que présenté dans la Figure 13. Par exemple, dans les anthocyanes coumaroylés et caféoylés, le noyau aromatique de la partie acylée substituant le glucose peut entraîner une stabilisation de la partie anthocyane sous forme flavylium (Dangles et al., 1993; Figueiredo et al., 1996; Goto & Kondo, 1991).

➤ Auto-association

A concentration élevée, les formes colorées des anthocyanes s'agrègent pour former des dimères non covalents stabilisés par interaction hydrophobe. Ce phénomène entraîne une intensification de la couleur et une modification de la loi de Beer-Lambert (Asen et al., 1972; Goto & Kondo, 1991; Hoshino, 1991). Par exemple, Asen et al. ont observé une augmentation d'un facteur 300 de l'absorbance de la cyanidine pour une concentration seulement 100 fois supérieure.

2. Vinification : Du raisin au vin rosé

Dans la partie précédente, nous avons détaillé la composition en polyphénols de la baie de raisin et leur localisation. Dans la partie 2, nous allons aborder le processus de vinification et les paramètres qui peuvent avoir un impact sur la couleur des vins rosés.

2.1. La vinification particulière des vins rosés

D'après l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) (CE n°1493/1999), le vin est la boisson résultant exclusivement de la fermentation alcoolique partielle ou complète de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisins. La vinification représente la succession des transformations spontanées ou provoquées du moût de raisin en vin. Ces transformations combinent simultanément des phénomènes fermentaires (biologiques) et non fermentaires (enzymatiques, physico-chimiques et chimiques). Les principales étapes de la vinification des vins rosés sont illustrées dans la Figure 14. Les raisins sont d'abord vendangés. Le SO₂ est généralement ajouté lors des étapes pré-fermentaires, après vendange, pour éviter l'oxydation (oxydation chimique et inhibition des enzymes) et le développement de micro-organismes indésirables. Pour une récolte saine, les doses utilisées sont de l'ordre de 30-50 mg/L (OIV, 2021). Puis, les grappes sont éraflées pour séparer les baies des rafles. L'étape suivante est le foulage, un procédé mécanique qui consiste à faire éclater les baies pour favoriser l'extraction du jus de la vacuole des cellules charnues. Les cellules charnues sont relativement faciles à fragmenter en raison de leurs parois cellulaires relativement fines et la libération du jus commence pendant le foulage et le remplissage de la cuve. En revanche, les pellicules sont beaucoup plus résistantes aux perturbations mécaniques. L'étape de macération plus ou moins longue est

primordiale en terme de couleur pour les vins rosés. C'est l'étape durant laquelle les pigments sont extraits de la pellicule solide vers le jus. Après un pressurage, les moûts sont fermentés en phase liquide. Les vins obtenus peuvent ensuite être filtrés ou collés avant la mise en bouteille et la commercialisation.

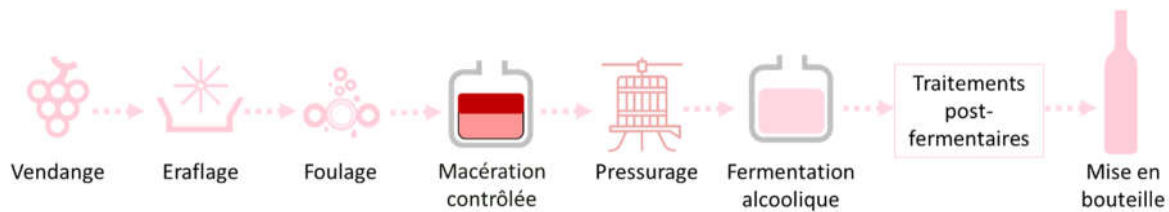


Figure 14: Schéma des étapes principales de la vinification des vins rosés

Le vin rosé ne possède pas de définition spécifique de sa couleur. Cependant, quatre types de modes d'élaboration spécifiques des vins rosés sont reconnus par l'OIV et les différents cahiers des charges français (Flanzy et al., 2009) :

- Vin rosé obtenu par pressurage direct ou macération très courte (<2h) : Cette technique consiste à presser directement les grappes entières ou éraflées, juste après la vendange et avant fermentation alcoolique.
- Vin rosé obtenu par macération pelliculaire d'une durée >2h : Cette méthode consiste à réaliser une macération plus ou moins longue avant la fermentation alcoolique, afin d'extraire les molécules de la pellicule de raisin.
- Vin rosé dit de saignée : Ce procédé consiste à prélever le moût d'une cuve destinée à une fermentation alcoolique en phase solide, typique des vins rouges, puis à le vinifier à part et obtenir un vin rosé.
- Vin rosé dit d'assemblage (coupage) : Cette méthode consiste à mélanger des vins blancs et rouges pour obtenir une teinte rosée. Cette pratique n'est pas autorisée dans les cahiers des charges français hormis exception (ex : Champagne).

Hormis pour les vins rosés issus d'assemblage, l'étape de macération pré-fermentaire est primordiale pour la couleur puisque c'est l'étape durant laquelle les pigments sont extraits des parties solides de la pellicule vers le jus de raisin. En comparaison, la vinification en rouge consiste la plupart du temps en une fermentation en phase hétérogène suivie d'un pressurage, ce qui permet l'extraction des composés phénoliques pendant toute la durée de la macération et de la fermentation alcoolique. La comparaison de la composition phénolique de vins rouges (Wirth et al., 2010) et rosés (Wirth et al., 2012) issus de la même variété (Grenache rouge) confirme que ces derniers contiennent des teneurs en composés phénoliques beaucoup plus faibles. Par exemple, 10-15 mg/L d'anthocyanes sont retrouvés dans les vins rosés contre 100 mg/L dans les rouges. Cette étude révèle également de grandes différences dans les proportions des différentes classes de composés phénoliques entre les vins rouges et rosés, avec une prédominance écrasante des esters tartriques d'acide hydroxycinnamiques et des concentrations beaucoup plus faibles de flavanols et d'anthocyanes dans les rosés (Tableau 1). De plus, la nature des flavanols dans ces vins rosés était différente de celle des rouges avec principalement des monomères et des dimères et un degré moyen de polymérisation (mDP) faible (1,5) (Wirth et al., 2012). Ce résultat indique un taux d'extraction très faible des flavanols de poids moléculaire plus élevé, contrairement au vin rouge où des DPM plus élevés ont été relevés.

	Vins rosés	Vins rouges
Acides hydroxycinnamiques (libres et estérifiés)	90-120	145-290
Anthocyanes	10-15	90-100
Flavanols (monomères, oligomères, polymères)	15-16	350-900

Tableau 1: Quantités (mg/L) de certains composés phénoliques dans les vins rosés et rouges issus de Grenache (Wirth et al., 2010, 2012)

Au-delà de l'effet notable des techniques de vinification employées mis en évidence par la comparaison des compositions phénoliques des vins rouges et rosés issus de Grenache, plusieurs auteurs rapportent un manque de corrélation entre les compositions des baies et celles des vins obtenus par un même procédé de vinification (Bautista-Ortín et al., 2016; Gonzalez-San Jose et al., 1990). Ces différences ont été reliées à des phénomènes d'interaction physico-chimiques des polyphénols avec d'autres composés solubles et insolubles dans le milieu, impactées par les caractéristiques de la matière première (composition phénolique, mais aussi structures pariétales) mais aussi à la réactivité des composés phénoliques qui sont rapidement transformés en un grand nombre de dérivés par des réactions enzymatiques ou chimiques au cours de la vinification. Tous ces facteurs potentiels seront discutés ci-dessous.

2.2. Les étapes pré-fermentaires

2.2.1. Macération

La macération des pellicules et des pépins est une étape clé dans l'élaboration des vins rosés car c'est l'étape durant laquelle les composés phénoliques et notamment les pigments sont extraits du raisin vers le moût. L'extraction des composés phénoliques dans le moût est déterminée principalement par leur localisation dans la baie (Tableau 2), leur solubilité et le processus de vinification.

	Pulpe	Pellicules	Pépins
Flavanols	Traces	Traces	250-1800
Anthocyanes	-	600	-
Acides phénols	100-300	200	-

Tableau 2: Teneurs moyennes et localisation des trois principales familles de composés phénoliques pour les cépages Pinot noir, Pinot meunier et Chardonnay (en mg/kg de baie) (Mané et al., 2007).

En effet, les pigments rouges et jaunes ne se trouvent que dans la pellicule de la baie, tandis que les acides hydroxycinnamiques sont présents à la fois dans la pulpe et dans la pellicule (Ribéreau-Gayon, 1965, 1959) et les flavanols sont distribués dans les pépins, la pellicule, et en quantité beaucoup plus faible dans la pulpe (Bourzeix et al., 1986). Par conséquent, les acides hydroxycinnamiques sont facilement extraits dans le jus et sont ainsi les principaux composés phénoliques des vins blancs obtenus par pressage direct (Singleton et al., 1978). En revanche, l'extraction des anthocyanes nécessite un certain contact de la pellicule avec le moût, ce qui induit également l'extraction d'autres composés tels que les flavanols aussi extraits des pépins (Kelebek et al., 2007; Suriano et al., 2015). Une augmentation de la durée de macération de 3 à 24 h s'est traduite, dans le cas de raisin de la variété Ôküzgözû, par une augmentation des teneurs en anthocyanes mais aussi de la proportion de malvidine 3-coumaroylglucoside (Kelebek et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus sur le cépage Mourvèdre (Monastrell) après une étape de macération préfermentaire à froid (15°C pendant 12h), conduisant à une intensification de la couleur après fermentation (Salinas et al., 2003). Des

teneurs extrêmement faibles ont été rapportées pour les autres composés analysés dans cette étude mais il est important de souligner que les composés majeurs attendus, tels que l'acide caftarique ou les proanthocyanidines n'y ont pas été dosés.

2.2.2. Interactions lors de la macération

De manière générale, les anthocyanes diffusent plus rapidement que les tanins de la peau, qui eux-mêmes diffusent plus rapidement que ceux provenant des pépins (Abi-Habib, Poncet-Legrand, et al., 2021). Il existe deux classes de macromolécules susceptibles d'interagir de manière non covalente avec les composés phénoliques : les polysaccharides et les protéines. Ces interactions conduisent à une extraction réduite des composés phénoliques (Fournand et al., 2006; Joutei & Glories, 1994).

En effet, les tanins et anthocyanes sont des molécules amphiphiles possédant à la fois des cycles aromatiques hydrophobes et des groupes hydroxyles hydrophiles leur permettant de se lier simultanément à plusieurs sites à la surface d'autres molécules (Baxter et al., 1997; Haslam, 1998).

Pendant la macération, les anthocyanes interagissent moins que les tanins, que ce soit avec les parois purifiées ou avec les mésocarpes frais (Bindon et al., 2010, 2014). Le taux d'extraction des anthocyanes et proanthocyanidines dépend non seulement de leur concentration mais aussi de la composition polysaccharidique et protéique des parois cellulaires de la pellicule du raisin (Abi-Habib, 2017; Bindon et al., 2017; Ortega-Regules, Romero-Cascales, Ros-García, et al., 2006) ainsi que de l'épaisseur de la pellicule (Abbal et al., 2020; Adams, 2006). En effet, au cours du processus de macération, les polyphénols et les fragments polysaccharidiques solubles et insolubles des parois cellulaires résultant de l'activité enzymatique pectolytique entrent en contact et une proportion importante des anthocyanes et proanthocyanidines peut être adsorbée par les parois des cellules des pellicules, des pépins et des pulpes en suspension dans le moût (Abi-Habib, 2017). L'adsorption sur les parois cellulaires dépend du cépage (Ortega-Regules, Romero-Cascales, López-Roca, et al., 2006) et de la composition polysaccharidique des parois cellulaires (Adams, 2006; Ortega-Regules, Romero-Cascales, Ros-García, et al., 2006).

Les interactions dépendent également de la structure chimique des anthocyanes et des tanins condensés. En effet, l'interaction des tanins condensés avec les parois cellulaires augmente avec le degré de polymérisation moyen et le taux de galloylation (Bindon et al., 2010; Fournand et al., 2006). Récemment, l'impact du motif de substitution du cycle B des anthocyanes a été mis en évidence ; les anthocyanes méthoxylés seraient moins extractibles mais plus stables dans les vins (Favre et al., 2019). Lors de la vinification, les anthocyanes p-coumaroylés présentent la plus faible extractibilité de la peau vers le vin pour les différentes variétés qui ont été étudiées (Favre et al., 2019; Fournand et al., 2006). Les anthocyanes p-coumaroylés montrent également une affinité pour les parois cellulaires de raisin supérieure à celle des anthocyanes non acylées (Abi-Habib, Poncet-Legrand, et al., 2021; Gonçalves et al., 2012). De plus, une compétition entre anthocyanes et tanins condensés a été montrée dans ces interactions avec les parois cellulaires (Bautista-Ortín et al., 2016). Une étude plus récente n'a pas permis de confirmer cette observation mais a montré que les différences d'adsorption des tanins sur les parois des cellules de la pulpe sont liées à la composition de ces parois (Abi-Habib, Vernhet, et al., 2021).

Le collage par différentes colles protéiques ou par la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) est souvent pratiqué pour éliminer les composés phénoliques et ainsi diminuer l'intensité colorante et réduire les risques de brunissement ou de pertes d'arôme variétaux tels que les thiols (Singleton, 1987) liés à l'oxydation de ces composés au cours de la conservation des vins. Une adsorption sélective des flavanols (notamment procyanidines dimères et trimères), des flavonols et des anthocyanes coumaroylés a été mise en évidence après collage à la PVPP lorsque ce traitement a été appliqué en

cours de fermentation (Gil et al., 2019; Seabrook & van der Westhuizen, 2018), confirmant les résultats obtenus antérieurement lors de l'application de ce même traitement sur vin fini (Gil et al., 2017).

2.2.3. Procédés physiques d'extraction

En complément de la macération, des procédés physiques pré-fermentaires ont été développés. L'objectif de ces opérations est de minimiser le temps de macération et de maximiser le taux d'extraction des polyphénols. De nombreuses technologies (flash-détente, champs électriques pulsés...) sont proposées pour les vins rouges mais seules certaines opérations ont été testées sur les rosés.

Des températures plus élevées pendant la macération (15°C) peuvent augmenter l'extraction des pigments comme la malvidine-3-glucoside mais affectent aussi négativement les arômes et le contenu en précurseurs d'arômes (Salinas et al., 2005). Afin de préserver la qualité aromatique des vins liée au chauffage, des procédés physiques peuvent être utilisés tels que le champ électrique pulsé (PEF). Ce procédé augmente le rendement d'extraction des anthocyanes pendant la macération permettant de protéger le potentiel aromatique (Puértolas et al., 2011). Une alternative à ces procédés coûteux peut être l'ajout de préparations enzymatiques capables de dégrader la structure des parois cellulaires de la peau et d'augmenter l'extraction des polyphénols à une température relativement basse pour protéger les arômes (Salinas et al., 2003) avant la fermentation. Cette pratique impacte peu la couleur pendant la fermentation. En revanche, une stabilisation de la couleur a été observée après embouteillage. Elle a été attribuée à la présence de plus fortes concentrations de tanins et pigments dérivés, liée à l'extraction accrue des tanins.

L'oxydation est un autre phénomène impactant considérablement la couleur des vins blancs et sûrement des vins rosés lors des étapes préfermentaires. Cette oxydation génère des composés bruns responsables du brunissement des moûts qui sont décrits en partie 2.5.1. L'ajout de produits antioxydants tels que les sulfites ou la levure sèche enrichie en glutathion peut permettre la protection des composés oxydables et donc de la couleur. En effet, l'ajout de levure sèche enrichie en glutathion a montré une amélioration de la stabilité de la couleur du vin rosé (Andújar-Ortiz et al., 2012).

2.3. La fermentation alcoolique

2.3.1. Généralités

La fermentation alcoolique est l'étape centrale du processus de vinification. Il s'agit du processus biochimique durant lequel les sucres du moût sont transformés en alcool et gaz carbonique dans un milieu liquide et en l'absence d'oxygène. La production d'alcool durant la fermentation s'accompagne de l'apparition de produits secondaires tels que le glycérol, l'acide acétique, l'acide succinique, les alcools supérieurs, les aldéhydes et cétones... Le moût de raisin contient des concentrations importantes en sucres (fructose et glucose) et des nutriments (azote, stérols, vitamines, oligo-éléments) nécessaires à la croissance des micro-organismes ; il constitue donc un milieu idéal pour la croissance et la multiplication de différents microorganismes. La fermentation peut être effectuée par des levures indigènes, mais le plus souvent, les viticulteurs utilisent des souches commerciales sélectionnées, issues de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, naturellement présente sur la baie de raisin (Mortimer & Polsinelli, 1999). La durée totale d'une fermentation varie de 4 à 20 jours.

En fonction des conditions du milieu (anaérobiose ou aérobiose), deux voies de dégradation des sucres peuvent intervenir : la respiration et la fermentation alcoolique. En vinification, à cause de l'absence d'oxygène, la levure *S. cerevisiae* ne métabolise les sucres que par voie fermentaire.

Lors de la fermentation alcoolique, la cinétique de croissance des levures se divise en quatre phases distinctes Figure 15 :

- La phase de latence : phase d'adaptation aux conditions du milieu avec très peu d'activité fermentaire (Pérez-Torrado et al., 2002), début de l'activité fermentaire en-dessous de 5mg/L de SO₂ libre (Ochando et al., 2020)
- La phase de croissance : phase de multiplication cellulaire qui dure jusqu'à atteindre la population maximale qui peut varier de 50 à 250x10⁶ cellules/mL (Bely et al., 1990)
- La phase stationnaire : phase durant laquelle la majorité des sucres est consommée (60-70%) et la population levurienne reste constante.
- La phase de mortalité : l'activité fermentaire diminue progressivement jusqu'à épuisement des sucres et altération de la viabilité cellulaire par les conditions du milieu (éthanol).

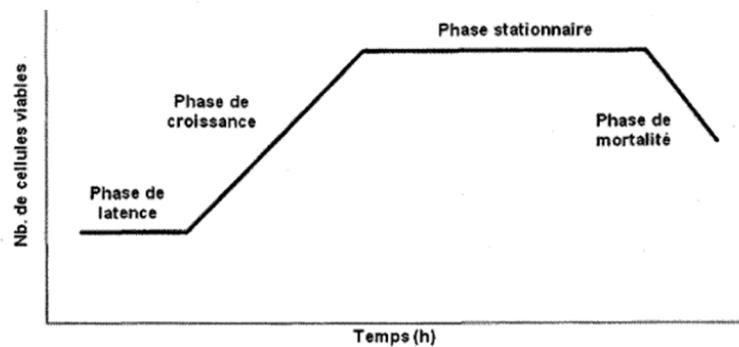


Figure 15: Cinétique de croissance des populations de levures pendant la fermentation alcoolique

Le métabolisme de la fermentation alcoolique commence par la voie de la glycolyse pour donner le pyruvate à partir du sucre ; cette voie métabolique permet la synthèse d'ATP nécessaire à la croissance cellulaire. Le pyruvate est ensuite décarboxylé pour donner l'acétaldéhyde, qui est réduit en éthanol pour maintenir la balance d'oxydoréduction et régénérer le NAD⁺ réduit lors de l'oxydation du glycéraldéhyde-3-phosphate par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Figure 16).

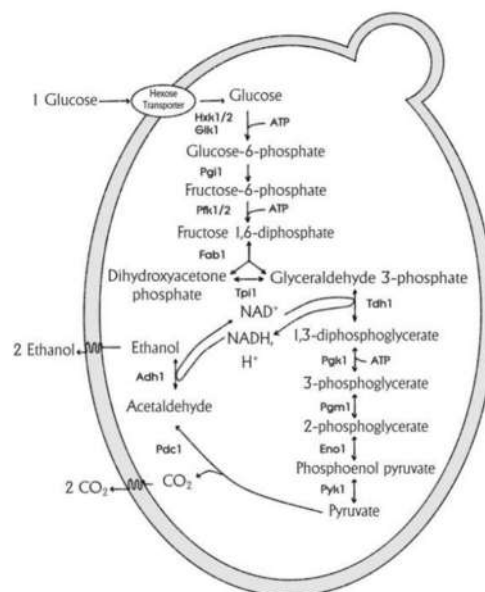


Figure 16: Voie de la glycolyse et de la fermentation alcoolique de *S. cerevisiae* (Faria-Oliveira, 2013)

Certains intermédiaires métaboliques, principalement l'acide pyruvique et l'éthanal, sont extrêmement réactifs et peuvent former des pigments dérivés au contact d'anthocyanes natives (Bakker & Timberlake, 1997a), dont les structures et mécanismes de formation seront décrits dans la partie 2.5 ci-dessous. L'éthanal est produit au cours de la phase de croissance (Ochando et al., 2020) et peut atteindre des valeurs dans les vins de l'ordre de 100 mg/L. Au contraire, l'acide pyruvique s'accumule dans le milieu pendant la fermentation avant d'être consommé par la levure en fin de fermentation, lorsque les nutriments se raréfient dans le milieu, pour former de l'acétyl CoA (Morata, Gómez-Cordovés, Colomo, et al., 2003a). Les teneurs rapportées dans la littérature varient de 0-500mg/L en fonction des levures étudiées mais est en moyenne de 150 mg/L dans les vins (Blouin, 2014).

2.3.2. Impact de la fermentation sur la couleur

Somers & Evans (1979) ont suivi l'évolution des anthocyanes et de l'intensité de la couleur pendant la fermentation alcoolique en vinification traditionnelle (phase hétérogène) et en thermovinification (phase homogène). Après la fermentation en phase homogène, l'intensité de la couleur s'est effondrée, passant d'une absorbance de 1,6 à 0,45, alors que les anthocyanes et les composés phénoliques n'ont diminué que de 20%. Les mêmes pertes ont été observées lors de la vinification traditionnelle et ont été expliquées en partie par une modification de l'équilibre d'hydratation des anthocyanes induite par l'augmentation d'éthanol dans le milieu.

Ces phénomènes de perte de couleur sont attribuables à des modifications chimiques (réactions des anthocyanes avec les métabolites des levures, dégradation sous l'effet du pH ou de l'élévation de température, etc.), biochimiques (transformations et dégradations enzymatiques) mais aussi physicochimiques (adsorption sur les levures, co-précipitation avec les protéines et les tanins,...) encore imparfaitement décrites. Les phénomènes chimiques et biochimiques seront développés en partie 2.5. Dans cette partie, nous nous intéresserons aux phénomènes physicochimiques.

L'adsorption des composés phénoliques et en particulier des pigments anthocyaniques sur les levures est un phénomène connu (Medina et al., 2005; Vasserot et al., 1997).

Les molécules de la paroi cellulaire de la levure, telles que les mannoprotéines ou les glucanes, peuvent interagir avec les composés phénoliques. Ces interactions dépendent de la structure des tanins et anthocyanes. En effet, il a été montré une affinité plus grande avec les parois de levures des anthocyanes acylées par rapport aux non acylées (Morata, Gómez-Cordovés, Suberviola, et al., 2003) ainsi qu'une adsorption sélective des espèces oligomériques et polymériques (Vernhet et al, 2020)

Une étude portant sur la modélisation de la vitesse de décoloration (Vasserot et al., 1997) a montré que la majorité de l'adsorption des anthocyanes a lieu dans les cinq premières minutes de contact et également qu'il existe de fortes corrélations linéaires entre les quantités d'anthocyanes absorbées et leur concentration initiale à des niveaux de levure allant de 3 à 30 g/L. L'étude a également révélé que la température et la concentration en éthanol affectent fortement l'adsorption des anthocyanes par les lies de levure, les températures plus élevées augmentant l'adsorption des anthocyanes et les concentrations en éthanol plus élevées ayant l'effet inverse.

De nombreuses études se sont aussi intéressées à l'impact de la souche de levure sur le devenir des anthocyanes ou des tanins au cours de la fermentation des vins rouges (Mekoue Nguela et al., 2015; Morata, Gómez-Cordovés, Suberviola, et al., 2003; Morata et al., 2005; Razmkhab et al., 2002; Vernhet et al., 2020). *Metschnikowia reukafii* ZIM2019 a présenté une plus grande capacité d'adsorption (9,1%) des anthocyanes et des pyranoanthocyanes que les 95 souches *Saccharomyces* et *non-Saccharomyces* étudiées (Božič et al., 2020). Le fait que l'impact de la souche utilisée en

fermentation sur la composition pigmentaire des vins soit variable peut être dû à des différences en termes d'adsorption mais aussi à des différences en termes de synthèse de métabolites par les levures dans des conditions environnementales identiques (pH, SO₂, température, nutriments, etc.)(Morata et al., 2006a). Ces métabolites levuriens (acide pyruvique, éthanal, sulfites, vinylphénols résultant de l'activité cinnamate décarboxylase) peuvent réagir avec les anthocyanes pour former de nouveaux pigments, qui seront présentés dans la partie 2.5.

2.4. Le dioxyde de soufre

Une des pratiques viticoles impactant massivement la couleur est l'ajout de bisulfite pour des raisons sanitaires ou pour ses propriétés antioxydantes. Le dioxyde de soufre peut être ajouté à différentes étapes de la vinification (vendange, foulage, fin de fermentation, mise en bouteille) et sous différentes formes (gazeux, solution sulfureuse, solution de métabisulfite). La législation fixe des concentrations dans les vins rosés allant de 210mg/L pour la vinification conventionnelle à 40mg/L pour les vins rosés naturels. Les vins naturels sont définis par l'absence d'intrant au cours de la vinification ; les sulfites présents proviennent du métabolisme de la levure. En effet, le dioxyde de soufre peut aussi être produit par les levures lors de la fermentation alcoolique. Les quantités sont généralement faibles (entre 10-30 mg/L) (Dott & Trüper, 1976) mais peuvent atteindre 100mg/L pour certaines souches (Eschenbruch, 1974). D'autres facteurs peuvent augmenter la production de sulfites par les levures tel que de fortes concentrations en sucres (Gyllang et al., 1989).

En solution aqueuse et à pH acide (<2), la forme moléculaire du dioxyde de soufre SO₂ est l'acide sulfureux H₂SO₃, un acide faible. Lorsque le pH augmente, l'acide sulfureux peut se dissocier en ion hydrogènesulfite HSO₃⁻ puis en ion sulfite SO₃²⁻ selon les équations suivantes (Figure 17) :

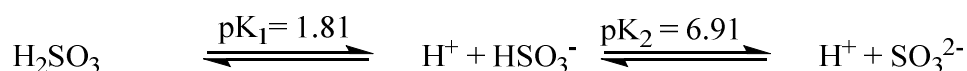


Figure 17: Equilibre réactionnel du dioxyde de soufre en solution aqueuse

Au pH du vin (3-4), l'ion hydrogènesulfite, aussi appelé l'ion bisulfite, est majoritaire à plus de 95%. Il peut être sous forme libre (SO₂ libre) ou combinée (SO₂ combiné) (Figure 18).

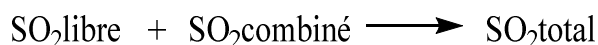


Figure 18: Différents états du SO₂ dans les moûts et les vins

En effet, cette forme nucléophile est capable de se combiner à diverses molécules présentant un site électrophile (Figure 19). Il peut par exemple se combiner aux nombreux dérivés carbonylés naturellement présents dans le vin pour donner une combinaison bisulfitique (hydroxysulfonate) selon la réaction réversible suivante (Ough & Were, 2005) :

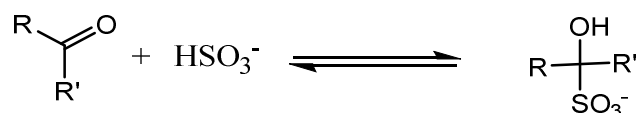


Figure 19: Formation de la liaison bisulfitique

R' peut être un atome d'hydrogène (aldéhyde) ou un groupement carboné (cétone). La position de l'équilibre est définie par la constante de dissociation K_d. Une valeur de K_d faible correspond à une forte combinaison et une valeur de K_d élevée à une faible combinaison. La participation de chaque composé

à la combinaison du SO₂ va dépendre de la constante de dissociation K_d de chaque composé et de leur teneur dans les vins (Blouin, 2014) (Tableau3).

	Nom	Masse molaire (g/mol)	K _d (mmol/L)	Teneurs moyennes dans les vins (mg/L)
Aldéhydes et cétones neutres	Ethanal	44	0,0024	100
	Glycéraldéhyde	90	0,4	20
	Glyoxal	58	0,15	5
Acides carbonyliques	Acide pyruvique	88	0,3	150
	Acide 2-oxoglutarique	144	0,5	150
	Acide glyoxilique	74	0,008	5
Sucres et dérivés	Glucose	180	900	1000
	Fructose	180	15000	1000
	Acide galacturonique	212	17	200

Tableau 3: Combinaison du SO₂ avec des composés carbonylés (Blouin, 2014)

L'ion hydrogénosulfite peut impacter la couleur en se combinant à la forme flavylium colorée de l'anthocyane (K_d=0.05 mmol/L pour la cyanidine-3-glucoside (Brouillard & El Hage Chahine, 1980)). En effet, l'addition sur le carbone C4 génère un sulfonate (ou adduit bisulfite) incolore (Figure 20) (Berké et al., 1998; Timberlake & Bridle, 1967).

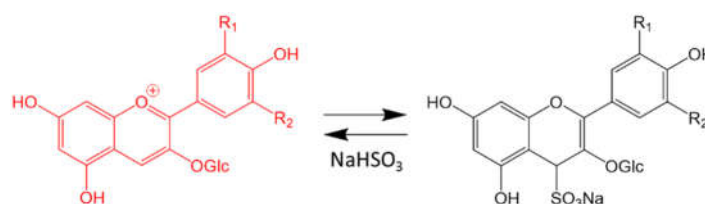


Figure 20: Addition de l'hydrogénosulfite de sodium sur le cation flavylium (Berké et al., 1998)

D'après les valeurs de K_d, l'ion bisulfite se combine préférentiellement à l'éthanal plutôt qu'aux anthocyanes. En réponse à une trop grande quantité de sulfites dans le milieu, les levures produisent de l'éthanal pour combiner les sulfites et assainir le milieu via plusieurs mécanismes (Ochando et al., 2020; Zara & Nardi, 2021).

2.5. Réactivité des composés phénoliques au cours de la vinification

2.5.1. Oxydation

2.5.1.1. Oxydation chimique et enzymatique

Les composés phénoliques et notamment ceux qui possèdent une fonction o-diphénol, sont les principaux constituants des vins impliqués dans les phénomènes d'oxydation qui se traduisent à la fois par des modifications de couleur (brunissement) et par une évolution du goût (perte ou augmentation de l'astringence) (Singleton, 1987). L'oxydation des composés phénoliques s'effectue en présence d'oxygène moléculaire soit par un processus biochimique, sous l'action de polyphénoloxydases (PPO), soit par un processus chimique catalysé par la présence d'ions métalliques (fer et cuivre principalement). Il existe plusieurs types de PPO, la tyrosinase ou catecholoxydase présente dans le raisin mais aussi les laccases d'origine fongique (*Botrytis cinerea*). Durant le processus de vinification, l'oxydation enzymatique sous l'action de la PPO s'effectue principalement avant fermentation alcoolique, plus précisément pendant le foulage et le pressurage des vins blancs, alors

que les phénomènes d'oxydation chimiques ou l'action des laccases ont plutôt été observés pendant la phase de maturation/vieillessement des vins (Ribéreau-Gayon et al., 2012). De plus, les cinétiques de ces deux processus sont radicalement différentes. Dans le cas de la catéchine, les produits d'oxydation ont été obtenus après seulement 1h par voie enzymatique alors que 3 mois ont été nécessaires par voie chimique (Oszmianski & Lee, 1990). L'oxydation des *ortho*-diphénols conduit à la formation d'*ortho*-quinones (Figure 21) qui sont généralement de couleur jaune et peuvent parfois tendre vers le brun et le rouge brique. Ce sont des composés très réactifs possédant des forts pouvoirs oxydants et électrophiles.

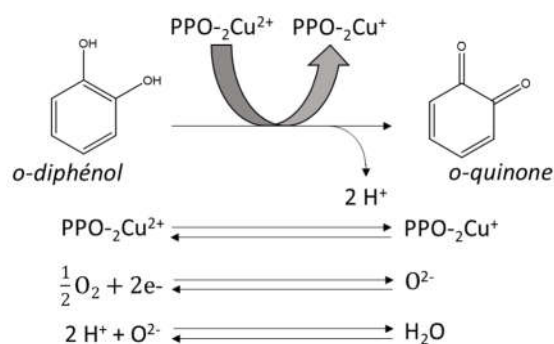


Figure 21: Mécanisme de formation des *ortho*-quinones

2.5.1.2. Oxydation enzymatique : phénomène de brunissement des moûts

Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés sont incolores. Néanmoins, ils jouent un rôle prépondérant dans les phénomènes d'oxydation enzymatique responsables du brunissement des moûts blancs (Singleton et al., 1985). Ces phénomènes peuvent également se produire lors des étapes préfermentaires de la vinification en rosé, si une exposition à l'air a lieu alors que la polyphénol oxydase est encore active. Parmi les composés phénoliques du raisin, l'acide caftarique et dans une moindre mesure l'acide coutarique sont les substrats préférentiels de la PPO (Gunata et al., 1987). L'oxydation enzymatique de ces substrats conduit à la formation d'*ortho*-quinone qui joue un rôle majeur dans les mécanismes de dégradation oxydative des moûts. En effet, cette quinone est à la fois un puissant oxydant, du fait du ptoentiel redox élevé du couple acide caftarique /quinone d'acide caftarique, et un électrophile.

La première réaction d'addition nucléophile décrite dans les mouts est celle du glutathion sur la quinone d'acide caftarique pour former le Grape Reaction Product (GRP), c'est-à-dire l'acide 2-S-glutathionyl caftarique (Cheynier et al., 1986). Lorsque le glutathion est présent en excès, cette réaction permet de bloquer les phénomènes d'oxydation. En effet, le GRP est un composé incolore et qui n'est pas substrat de la PPO. Ainsi, la sensibilité des moûts face au brunissement peut s'évaluer d'après le rapport des concentrations en acides hydroxycinnamiques (AH) par rapport au glutathion (GSH) permettant de classer les moûts en trois catégories (Cheynier, Rigaud, Souquet, et al., 1990) :

- les moûts peu sensibles au brunissement ($AH/GSH < 1$) : consommation rapide de l'acide caftarique, accumulation du GRP et peu d'impact sur la couleur.
- les moûts sensibles au brunissement ($1 < AH/GSH < 3$)
- les moûts très sensibles au brunissement ($AH/GSH > 3$)

Dans les moûts sensibles et très sensibles au brunissement, l'acide caftarique est consommé pour former du GRP qui diminue lui-même après quelques minutes. Ce phénomène est expliqué par les réactions d'oxydation couplée dans lesquelles le GRP est oxydé en quinone de GRP, tandis que l'acide caftarique est régénéré à partir de son *o*-quinone (Cheynier et Van Hulst, 1988). Cependant, la

comparaison des cinétiques d'oxydation dans les moûts et en solution modèles contenant les mêmes proportions de glutathion et d'acide caftarique a montré que d'autres composés réagissent avec l'acide caftarique, créant une concurrence avec le glutathion (Cheynier, Rigaud, & Moutounet, 1990).

D'autres réducteurs forts comme les sulfites ou l'acide ascorbique peuvent régénérer l'acide caftarique à partir des *ortho*-quinones, retardant la formation initiale de GRP. Par ailleurs, d'autres *o*-diphénols tels que les flavanols monomères, les procyanidines et les anthocyanes dérivées de la cyanidine peuvent également être impliqués dans les phénomènes d'oxydation couplée. Des expériences en solution modèles illustrent les différences de réactivité des composés phénoliques et de leurs *ortho*-quinones avec différents potentiels d'oxydo-réduction : acide caftarique > catéchine, épicatechine > GRP > dimères de procyanidines > épicatechine gallate (Cheynier et al., 1988).

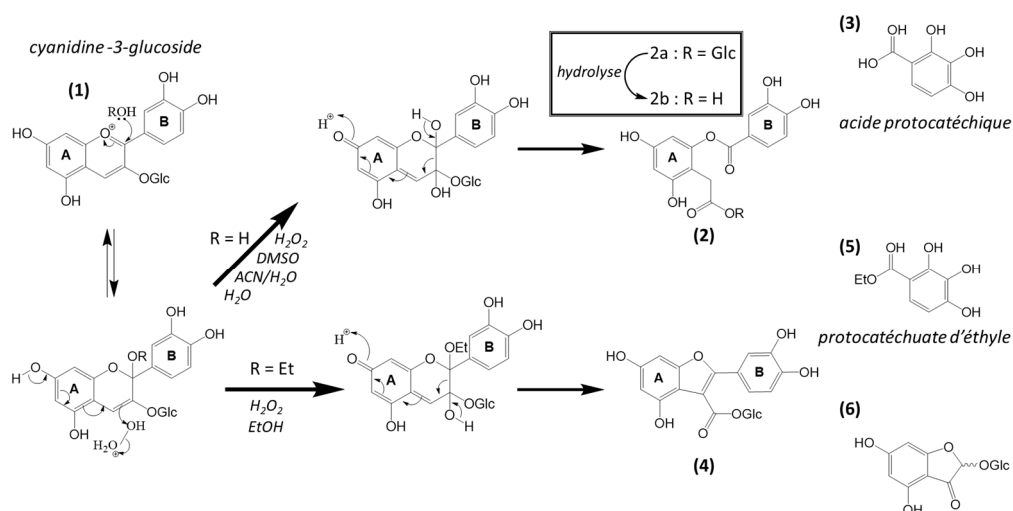
Les réactions d'auto-oxydation des flavanols ont été particulièrement étudiées dans le cas des monomères et des dimères et l'existence de réactions intra et intermoléculaires a été révélée (Guyot et al., 1996; Kusano et al., 2007; Tanaka et al., 2005). Dans le cas des oligomères et des polymères, les réactions intra- et intermoléculaires peuvent également se produire (Poncet-Legrand et al., 2010). Ces réactions mènent à la formation de composés incolores mais aussi de composés jaunes impliqués dans le brunissement des vins. En effet, un lien entre la sensibilité des vins au brunissement oxydatif et leur teneur en flavanols a été établi (Cheynier, Souquet, et al., 1989; Simpson, 1982).

La dégradation oxydative d'anthocyanes *o*-diphénoliques (par exemple cyanidine-3-glucoside) et non *o*-diphénoliques (par exemple malvidine-3-glucoside) en présence d'acide caftarique et de polyphénoloxydase de raisin a été étudiée en solutions modèles (Sarni et al., 1995; Sarni-Manchado et al., 1997). Les deux anthocyanes ont réagi avec l'*o*-quinone de l'acide caftarique générée par l'enzyme pour former des adduits caftarique-anthocyanes. Les études cinétiques ont indiqué que la cyanidine-3-glucoside était dégradée principalement par oxydation couplée tandis que la malvidine-3-glucoside formait des adduits avec la quinone de l'acide caftarique. Dans des solutions contenant des quantités équimolaires d'anthocyanes, les deux réactions ont eu lieu mais l'oxydation couplée de la cyanidine-3-glucoside s'est produite à une vitesse plus rapide, protégeant partiellement la malvidine-3-glucoside. L'oxydation couplée a aussi permis d'épargner l'acide caftarique. Les adduits caftarique-anthocyanes ont conservé les propriétés colorimétriques des anthocyanes natives. Cependant, les spectres UV-Vis des produits de condensation colorés sont caractéristiques de structures contenant à la fois des unités d'acide caftarique (A320) et d'anthocyanes (A520). Tous ces pigments ont été progressivement dégradés en composés incolores, soit par oxydation enzymatique, soit par réaction avec d'autres quinones (Sarni et al., 1995; Sarni-Manchado et al., 1997).

2.5.1.3. Dégradation oxydative des anthocyanes

Les pertes de couleur sont souvent liées à la dégradation des anthocyanes. Ces pigments sont des molécules instables, thermosensibles, photosensibles et oxydables. La dégradation oxydative engendre le clivage des liaisons covalentes (Patras et al., 2010) et conduit à la formation majoritairement de l'acide 2,4,6-trihydroxyphénylacétique et d'un acide phénol correspondant au cycle B de l'anthocyanidine dégradée, l'acide syringique dans le cas de la malvidine-3-O-glucoside (Piffaut et al., 1994). La dégradation oxydative peut aussi conduire à l'apparition de forme coumarine (Hrazdina & Franzese, 1974). Les acylations et méthoxylations améliorent généralement la stabilité des anthocyanes (Oancea, 2021). La malvidine supporte mieux la dégradation oxydative que la cyanidine grâce à sa substitution du cycle B (Laborde, 1987). Le mécanisme exact de dégradation est encore en cours d'étude mais les premiers travaux de Markakis (Markaris et al., 1957) sur les pigments des fraises envisagent comme première étape du mécanisme un déplacement de l'équilibre vers la chalcone, la réversion chalcone-flavylium étant très lente. La forme chalcone est également l'intermédiaire proposé pour la dégradation oxydative des anthocyanes en milieu acide (Dueñas et al., 2006).

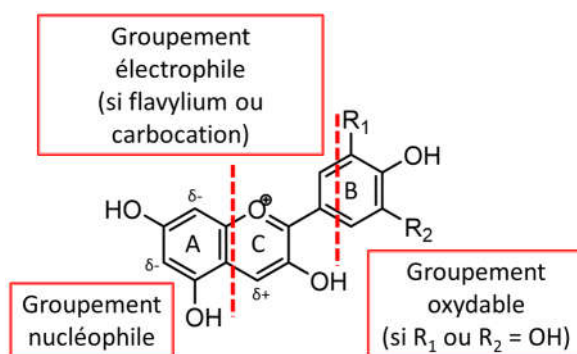
Un mécanisme impliquant du peroxyde d'hydrogène préformé est proposé dans une synthèse récente sur le sujet qui explique la formation de certains produits de clivage (Dangles & Fenger, 2018).



Cependant, le mécanisme d'oxydation des anthocyanes par H_2O_2 en milieu acide a été récemment revisité et un nouveau produit de réaction résultant d'un réarrangement de l'hétérocycle a été décrit dans le cas de la cyanidine 3-glucoside (Figure 22) (Satake & Yanase, 2018). En milieu hydro-alcoolique, les deux mécanismes oxydatifs sont observés menant à la formation des composés (2) et (4) majoritairement (Figure 22). Notons qu'un mécanisme de réarrangement semblable mais une structure différente ont été proposés pour la molécule équivalente formée à partir de la mavidine 3-glucoside (Es-Safi et al., 2008).

2.5.2. Réactivité des flavonoïdes

Les anthocyanes sont à la fois électrophiles (C4) sous leur forme flavylium, nucléophiles (C8 et C6) sous leur forme hydratée, et, pour certaines, oxydables (fonction o-diphénol sur le noyau B) (Figure 23).



Il en est de même pour les flavanols qui possèdent des groupements nucléophiles (C6 et C8) et peuvent, au pH du vin, donner naissance à un carbocation électrophile sur le C4 du cycle C, par clivage acido-catalysé des liaisons interflavoniques des proanthocyanidines (Beart et al., 1985), (Figure 24).

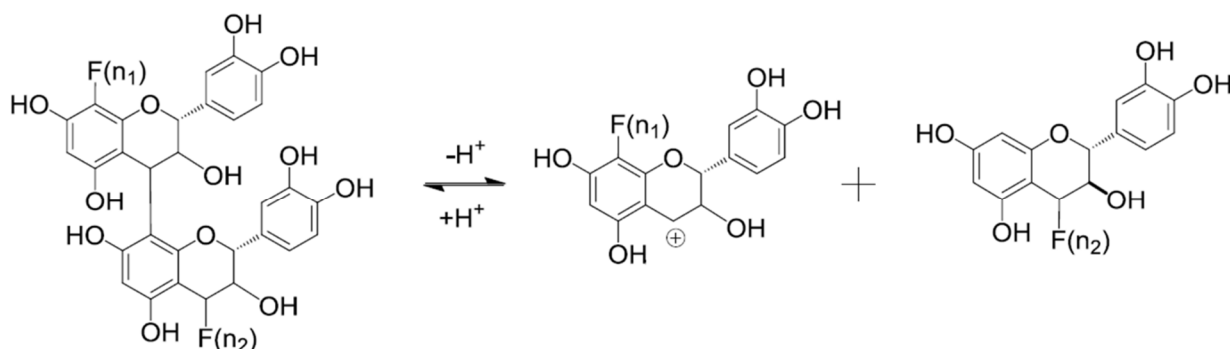


Figure 24: Mécanisme de dépolymérisation des proanthocyanidines et formation d'un site électrophile

2.5.3. Les mécanismes d'addition nucléophile

2.5.3.1. Additions de type A-T

Au cours de la vinification, la forme flavylium des anthocyanes peut subir l'attaque nucléophile d'un flavanol (Figure 25). Cette réaction conduit à la formation de composés incolores de type flavène [A(flavène)-T] et participe à la perte de couleur mesurée pendant la fermentation alcoolique (Remy et al., 2000). Ces composés peuvent être oxydés et donner des pigments polymérisés de type [A⁺-T] ou former des polymères incolores ayant une liaison de type A : [A-T (type A)] (Remy et al., 2000; Remy-Tanneau et al., 2003). Les pigments de type [A⁺-T] peuvent ensuite subir des réarrangements oxydatifs conduisant à la formation de composés jaunes-orangés, des sels de xanthylum (Jurd, 1969; Liao et al., 1992; Somers, 1971) mais ces composés, à notre connaissance, n'ont jamais été détectés dans les vins (Bührle et al., 2017).

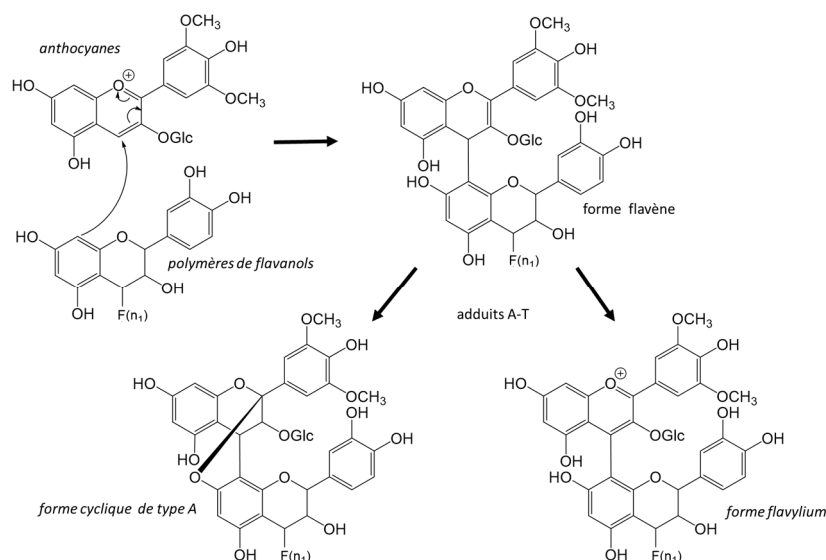


Figure 25: Structures des produits de type A-T (R = (flavanol)n) (Somers, 1971).

L'anthocyanane sous sa forme hémiacétale, comme les flavanols, peut réaliser une attaque nucléophile sur une autre anthocyanane sous forme flavylium pour donner un dimère d'anthocyanane. Des séries de dimères et trimères dans lesquels l'unité terminale est sous forme flavylium et les autres unités sous forme de flavène ou de flavane lié à l'unité suivante par une liaison de type A ont été détectées dans le raisin (Vidal et al., 2004). Leur structure a été établie plus récemment avec l'identification d'un trimère comportant deux liaisons de type A dans un vin de Porto (Oliveira et al., 2013) (Figure 26). Il a été démontré que ce produit est beaucoup plus résistant à l'hydratation que les

anthocyanes natives, du fait de leur capacité à former des complexes d'auto-association, de sorte que la formation de tels oligomères contribue à la stabilisation de la couleur des vins (Oliveira et al., 2014).

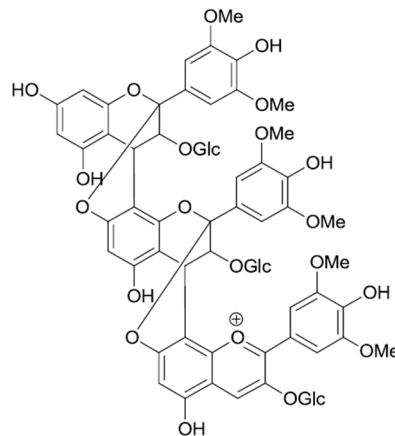


Figure 26: Structure d'un trimère d'anthocyanane avec liaison de type A (Oliveira et al., 2013)

2.5.3.2. Additions de type T-A

L'anthocyanane sous sa forme hémiacétale peut également réaliser une attaque nucléophile par l'intermédiaire de ses carbones C8 ou C6 sur le carbocation en position 4 résultant de la dépolymérisation des proanthocyanidines en milieu acide (Figure 27). Les dimères et polymères incolores résultants peuvent subir une réaction de déshydratation comme l'anthocyanane native et donner un dimère [T-A⁺] coloré (Remy et al., 2000; Salas, Atanasova, et al., 2004; Salas et al., 2005). L'étude des caractéristiques physico-chimiques de ces composés a révélé très peu de différences avec les anthocyanes natives principalement incolores au pH du vin, ce qui suggère que leur formation n'a que peu d'impact sur la couleur (Salas, Guernevé, et al., 2004).

Le même mécanisme peut intervenir entre le carbone 4 électrophile du carbocation issu du clivage acido-catalysé d'une proanthocyanidine et un carbone nucléophile (C8 ou C6) d'une autre proanthocyanidine ou d'un monomère de flavanol, créant une nouvelle liaison de type B. Cette réactivité impacte le degré de polymérisation moyen. En effet, si la partie inférieure libérée a une taille inférieure au flavanol qui vient s'ajouter (composé nucléophile) au carbocation et ainsi la remplacer, le degré de polymérisation du composé augmente. Inversement, si cette réaction a lieu dans des milieux contenant un large excès de monomères (ou d'anthocyanes), le DPM diminue, du fait du remplacement de chaînes plus ou moins longues par des unités monomères (Haslam, 1980; Vidal et al., 2002).

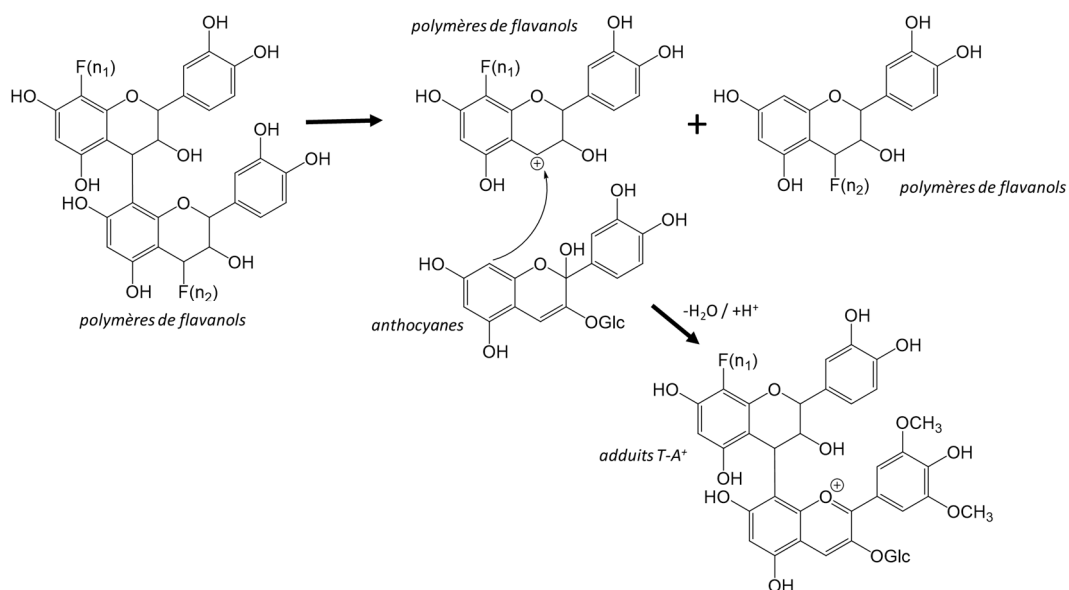


Figure 27: Mécanisme de formation des adduits T-A+ (Jurd, 1969; Ribéreau-Gayon, 1982)

2.5.3.3. Condensation indirecte via un pont éthyldène

En présence d'aldéhyde, les réactions entre les proanthocyanidines et les anthocyanes sont plus rapides et produisent de nouveaux pigments polymériques (Bakker et al., 1993; Baranowski & Nagel, 1983; Timberlake & Bridle, 1967). Dans ce mécanisme de condensation, l'aldéhyde protoné joue le rôle d'électrophile. L'éthanal est l'aldéhyde majoritairement impliqué dans ces réactions même si d'autres aldéhydes tel que l'acide glyoxalique qui découle de l'oxydation de l'acide tartrique (Es-Safi, Le Guernevé, et al., 2000; Fulcrand et al., 1997), le furfural et le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) (Es-Safi, Cheyner, et al., 2000) ont montré la même réactivité en solution modèle. L'éthanal ou acétaldéhyde est un composé impliqué dans le métabolisme de fermentation alcoolique des levures qui est produit lors de la fermentation alcoolique mais qui peut aussi résulter d'une oxydation de l'éthanol par oxydation, notamment en présence de composés phénoliques (Wildenradt & Singleton, 1974).

Dans un premier temps, la forme protonée de l'éthanal en milieu acide subit l'attaque nucléophile des carbones 6 ou 8 d'une unité de flavanol ou d'une anthocyane sous sa forme hémiacétale pour donner un adduit intermédiaire flavanol-éthanal ou anthocyane-éthanal (Atanasova, Fulcrand, Le Guernevé, et al., 2002; Fulcrand, Doco, et al., 1996). Dans un second temps, cet adduit se protone en milieu acide et devient électrophile en perdant une molécule d'eau selon le mécanisme décrit dans la Figure 28. Le carbocation électrophile ainsi formé peut subir une nouvelle attaque nucléophile des carbones 6 ou 8 d'un flavanol ou d'une anthocyane, pour donner un adduit flavanol-méthyl-méthine-flavanol, flavanol-méthyl-méthine-anthocyane ou anthocyane-méthyl-méthine-anthocyane. Les ponts éthyldène ou méthyl-méthine (dans le cas de l'éthanal) sont souvent désignés dans la littérature par le terme de ponts éthyl.

Des dimères et trimères de type catéchine-méthyl-méthine-catéchine ont été détectés d'abord en solution modèle puis dans les vins (Cheyner, Fulcrand, et al., 1997; Saucier et al., 1997). Les oligomères issus de la condensation des aldéhydes avec les flavanols peuvent subir un réarrangement oxydatif pour générer des structures de type xanthylum de couleur jaune orangée (Drinkine et al., 2007; Es-Safi et al., 2003). Ces structures ont été tout d'abord mises en évidence en solutions modèles dans des milieux réactionnels contenant des flavanols et l'acide glyoxalique, le furfural et le HMF (Es-Safi et al., 2002). Plus récemment, elles ont été détectées parmi les produits issus de la condensation de

l'acétaldéhyde avec la catéchine (Vallverdú-Queralt et al., 2017a) et/ou la malvidine 3-glucoside (Vallverdú-Queralt et al., 2017b).

Dans le cas des condensations indirectes entre anthocyanes et flavanols, des dimères comme le malvidine-3-O-glucoside-méthyle-méthine-(-)-épicatechine ont été détectés dans le vin (Cheynier, Doco, et al., 1997). Des trimères et tétramères contenant une anthocyane et une, deux ou trois unités de flavanols ont aussi été détectés en solution modèle (Es-Safi et al., 1999). Aucun composé contenant plus de deux anthocyanes n'a été détecté, ce qui suggère qu'un seul sommet du cycle A de l'anthocyane peut être inclus dans le processus de polymérisation, qui s'arrêterait donc lorsque les deux extrémités sont occupées par un fragment d'anthocyane. Cependant, un trimère (epi)catechin-malvidin-3-glucoside(epi)catechin dans lequel l'anthocyane se trouve en position centrale a récemment été décrit (Durner et al., 2015). La constante d'hydratation du catéchine-éthyl-malvidine 3-glucoside est de 4,17, beaucoup plus élevée que sa constante d'acidité (3,44) indique que cette molécule est surtout présente dans le vin sous la forme de la base quinonique bleue (Dueñas et al., 2006). Ces pigments ont une plus grande stabilité vis-à-vis de la réaction d'hydratation du fait de leur auto-association. Ils restent colorés dans la gamme de pH des vins en étant présents sous deux formes, cations flavylum et bases quinoniques. Par conséquent, la formation de ce type de pigments pourrait apporter une intensification de la couleur des vins dans la mesure où cette réaction s'opère à partir de la forme incolore de l'anthocyane.

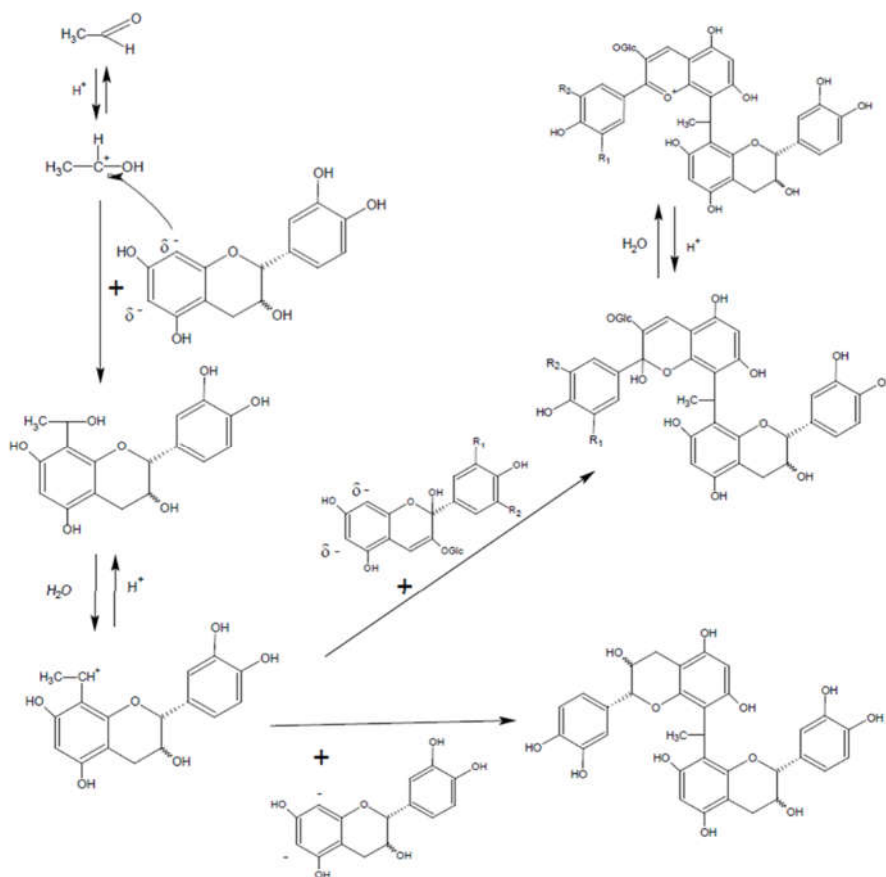


Figure 28: Mécanisme de formation des adduits flavanol-éthyl-flavanol et flavanol-éthyl-anthocyane par réaction de condensation avec l'aldéhyde (Timberlake & Bridle, 1976)

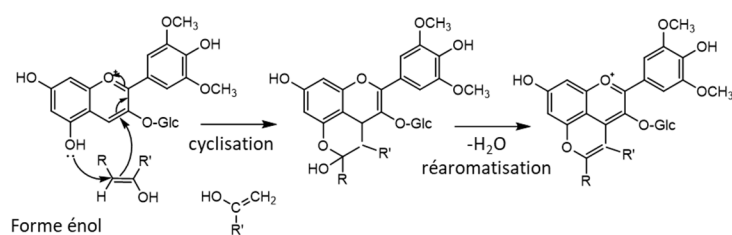
Le composé malvidine-3-O-glucoside-méthyle-méthine-malvidine-3-O-glucoside a été synthétisé et caractérisé et trois formes en fonction du pH ont été détectées pour ce composé : l'ion bichargé composé de deux anthocyanes sous forme flavylum et deux ions monochargés, le premier constitué

d'une anthocyane sous forme flavylium et d'une autre sous forme quinonique et le deuxième formé d'une anthocyane sous forme hydratée et d'une autre sous forme flavylium (Atanasova, Fulcrand, Le Guernevé, et al., 2002). Les constantes pour la première et la deuxième hydratation de la malvidine 3-glucoside-éthyl-malvidine 3-glucoside, 1,81 et 4,63, respectivement (Atanasova, Fulcrand, Le Guernevé, et al., 2002), indiquent qu'au pH du vin, l'une des parties de l'anthocyanine est sous forme flavylium rouge et l'autre est hydratée. La détection d'oligomères de malvidine 3-O-glucoside liés par des ponts méthyle-méthine a prouvé que la position C6 des anthocyanes peut être aussi impliquée dans la liaison, quoiqu'elle soit moins réactive que la position C8 (Atanasova, Fulcrand, Le Guernevé, et al., 2002).

Plus récemment, il a été démontré que l'évolution de systèmes simples composés d'un aldéhyde et d'un ou deux composés phénoliques conduit rapidement à une multitude de produits par une cascade aléatoire de réactions impliquant les substrats initiaux et les produits intermédiaires formés (Vallverdú-Queralt et al., 2017a, 2017b).

2.5.3.4. Réactions de cycloaddition

Les anthocyanes peuvent subir une cycloaddition de composés polarisables entre la fonction hydroxyle du carbone 5 et le carbone 4 selon le mécanisme présenté dans la Figure 29 pour former des pigments pyranoanthocyaniques (Benabdeljalil et al., 2000; de Freitas & Mateus, 2011; Fulcrand et al., 1998). Cette cycloaddition a un effet hypsochrome sur l'absorbance, décalant la couleur perçue du rouge pour l'anthocyane native au orange pour les dérivés pyranoanthocyaniques. Ces pigments orangés présentent des propriétés particulières de résistance face à la décoloration par les sulfites et aux variations de pH (Bakker & Timberlake, 1985a, 1985b; Sarni-Manchado et al., 1996).



Composés avec une fonction énolesable	R	R'
4-vinylphénol / acide <i>p</i> -coumarique		H
4-vinylcatechol / acide caféique		H
4-vinylguaïacol / acide férulique		H
Acide pyruvique	COOH	H
Ethanal	H	H
3-hydroxybutan-2-one	CH ₃ -CH-OH	H
Acétone	CH ₃	H
Acide α-cétoglutarique	COOH	CH ₂ COOH

Figure 29: Mécanisme de formation des dérivés pyranoanthocyaniques de la malvidine-3-O-glucoside (Benabdeljalil et al., 2000; Fulcrand, Santos, et al., 1996)

Les premières pyranoanthocyanes détectées dans les vins sont les phenylpyranoanthocyanes résultant de la cycloaddition d'une molécule de vinylphénol sur une anthocyane (Fulcrand et al., 1998). Les vinylphénols sont produits par les levures sous l'action d'une enzyme, l'hydroxycinnamate

decarboxylase (HCDC), à partir des acides hydroxycinnamiques. De nombreuses études s'intéressent à l'activité de la HCDC variable en fonction des souches étudiées dans le but de produire de grandes quantités de ces pigments stables pour l'industrie agroalimentaire (Božič et al., 2020) mais aussi pour éliminer les éthyl-phénols du vin, également dérivés de ces molécules, qui sont considérés comme des défauts du vin (Morata et al., 2013). Plus tard, il a été établi que les phénylpyranoanthocyanes peuvent se former par réaction directe des acides hydroxycinnamiques avec l'anthocyane (Schwarz et al., 2003). C'est ainsi que l'ajout d'acide hydroxycinnamique (acide caféique, p-coumarique et férulique) dans les moûts a révélé une augmentation de la production des phénylpyranoanthocyanes correspondantes ainsi qu'une évolution de la nuance vers des teintes plus rouges (Morata, González, et al., 2007).

D'autres pyranoanthocyanes présentes dans le vin rouge ont été désignées par les termes de vitisines A et B (Bakker & Timberlake, 1997a). La structure de la vitisine A fut d'abord décrite comme une structure dérivée de la malvidine-3-O-glucoside possédant un deuxième cycle pyrane (Bakker & Timberlake, 1997a). Plus tard, les substituants de la structure pyrane ont été révisés et le mécanisme de formation élucidé et décrit comme une cycloaddition de l'acide pyruvique sur le carbone 4 de la malvidine-3-O-glucoside (Fulcrand, Santos, et al., 1996) tandis que la vitisine B, ou pyranomalvidine 3-glucoside, résulte de la cycloaddition de l'éthanal et de la malvidine-3-O-glucoside. Lors de la vinification, ces composés sont majoritairement formés pendant l'étape de fermentation alcoolique (Asenstorfer et al., 2003). L'ajout d'éthanal et d'acide pyruvique pendant la fermentation alcoolique ou lors de la phase de maturation des vins augmente les quantités de Vitisine B et A respectivement (Morata, Calderón, et al., 2007; Romero & Bakker, 2001). Ces ajouts peuvent être utilisés comme outil pour moduler la couleur des vins (Sheridan & Elias, 2015).

Le mécanisme de formation des pyranoanthocyanes implique toutes les anthocyanes et divers composés polarisables conduisant à une grande diversité de structures. Ainsi, l'acide alpha-cétoglutarique, l'acétone et la 3-hydroxybutan-2-one sont d'autres métabolites produits par la levure qui peuvent réagir avec les anthocyanes pour former d'autres types de pyranoanthocyanes (Benabdeljalil et al., 2000) Figure 29.

D'autres structures de pigments pyranoanthocyaniques ont été détectés dans les vins, les flavanylpyranoanthocyanes (rouge orangé). Les flavanylpyranoanthocyanes ont d'abord été mis en évidence en solution modèle en présence de la malvidine-3-O-glucoside, l'acétaldéhyde et de la procyanidine dimère B2 (Francia-Aricha et al., 1997) avant d'être détectés dans les vins (Vivar-Quintana et al., 1999). Cette famille de pigments polymérisés est formée par réaction de cycloaddition entre les vinylflavanols et les anthocyanes conduisant à la formation d'un nouveau hétérocycle oxygéné (Cruz et al., 2008; Mateus et al., 2002). En effet, le carbone C4 du cation flavylum va subir l'attaque nucléophile du vinyl en position 8 des vinylflavanols avant une cyclisation intra-moléculaire. Les vinylflavanols proviendraient de la dépolymérisation en milieu acide des ponts méthyl-méthine entre flavanols. Ces composés sont formés préférentiellement en milieu acide et en présence d'oxygène pendant l'élevage de vins (Pechamat et al., 2014). Des structures analogues comprenant des dimères trimères et tétramères de flavanols ont été isolées à partir de vins et de marcs (Asenstorfer et al., 2001).

D'autres pigments découlant de réactions avec des dérivés d'anthocyanes ont aussi été mis en évidence dans les vins de Porto, les portisines. Ces composés ont été remarqués pour leur couleur bleue inhabituelle. Ces pigments se caractérisent par une structure composée d'une pyranoanthocyane liée à un flavanol par l'intermédiaire d'un pont vinyl. Les pigments caractérisés sont composés de la vitisine A et de son dérivé coumaroylé reliés à un dimère de flavanol par un pont vinyl. Leur structure et leur mécanisme de formation proposés sont présentés sur la Figure 30 (Mateus et al., 2003).

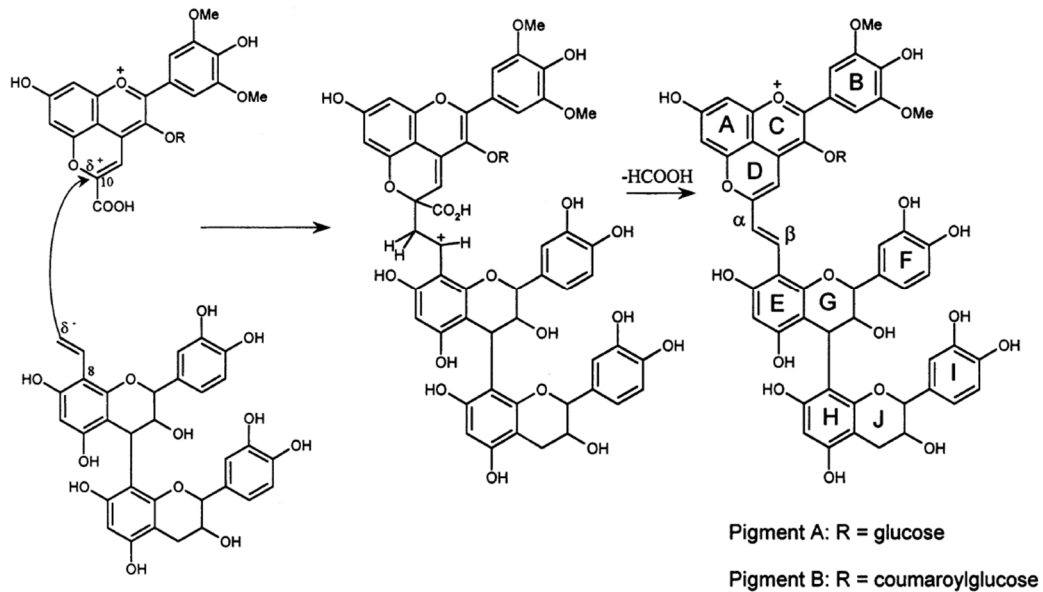


Figure 30: Mécanisme de formation de portisines proposé par Mateus et al., 2003

Des composés similaires ont été identifiés dans des vins de Porto résultant de la réaction de vitisines de type A avec des acides hydroxycinnamiques tels que les acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Oliveira et al., 2007). De plus, des pigments dimériques bleu turquoise composés de deux pyranoanthocyanes ont été détectés dans un vin de Porto de 9 ans d'âge et dans les lies correspondantes, résultant de la réaction de la vitisine A avec une méthylpyranoanthocyanine (Oliveira et al., 2010).

Les différentes structures décrites pour ces familles de pigments sont regroupées dans la Figure 31.

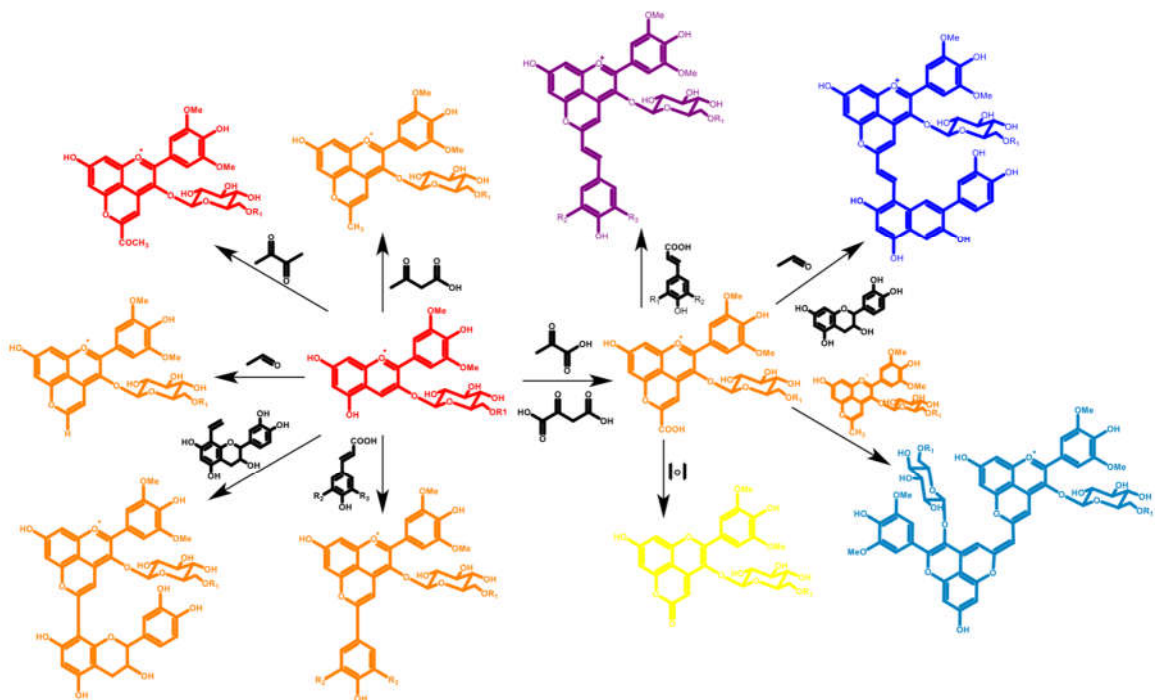


Figure 31: Différentes structures de pigments dérivés d'anthocyanes isolés dans les vins de Porto (De Freitas et al., 2017)

2.5.4. Pigments des vins rosés

Les pigments des vins décrits dans la partie 2.5 ont été majoritairement isolés en solution modèle vin et/ou détectés dans les vins rouges, blancs ou les Porto pour certains mais très peu d'études se sont intéressées aux vins rosés. La vinification particulière de ces vins pourrait induire des différences de proportion des pigments natifs extraits mais aussi favoriser l'oxydation lors des étapes pré-fermentaires, ce qui pourrait impacter les réactions se produisant lors de la fermentation et des étapes post-fermentaires.

Des études quantifiant les anthocyanes natives ont montré leur présence dans les vins rosés, majoritairement des anthocyanes monoglucosides ainsi que leur dérivés acylés par l'acide acétique et l'acide p-coumarique (Puértolas et al., 2011; Salinas et al., 2005) mais aussi l'acide caféique (M. Lambert et al., 2015) en plus petite quantité comme pour les vins rouges. Plus tard, des études ont montré la présence de pyranoanthocyanes, carboxypyrananthocyanes et phénylpyrananthocyanes, principalement les dérivés de la malvidine-3-O-glucoside mais aussi de son dérivé coumaroylé (Andújar-Ortiz et al., 2012; Wirth et al., 2012). Les adduits T-A, A-T et ponts éthyles ont aussi été observés dans les vins rosés en petite quantité (Andújar-Ortiz et al., 2012; Gil et al., 2019; M. Lambert et al., 2015; Wirth et al., 2012). Les principaux pigments des vins rouges ont été quantifiés dans les vins rosés. Cependant, les pigments isolés de Porto tel que les flavanylpyrananthocyanes, les portisines mais aussi les dimères ou trimères d'anthocyanes n'ont jamais été détectés dans les vins rosés. Tout comme les xanthiliiums, leurs concentrations sont sûrement en dessous des seuils de détection actuels (Bührle et al., 2017).

De plus, les étapes pré-fermentaires similaires à la vinification en blanc pourraient favoriser l'apparition de pigments spécifiques de l'oxydation et du brunissement des moûts. En effet, la comparaison des vins rouges et rosés issus de Grenache a montré la présence d'adduits caftarique-anthocyane dans les vins rosés, non décrits dans le vin rouge issu du même cépage (Wirth et al., 2010, 2012). Ces pigments résultent de la réactivité des quinones d'acide caftarique majoritairement formées lors de l'oxydation enzymatique sur moût, limitée en vinification en rouge.

3. Méthodes d'analyse des composés phénoliques et de la couleur

Différentes méthodes sont classiquement utilisées pour l'analyse des composés phénoliques et pour la caractérisation de la couleur. Elles seront détaillées dans les paragraphes ci-dessous, où leurs apports et leurs limites seront également discutés. Cette section abordera également les méthodes d'analyse des données.

3.1. Analyse de la couleur

3.1.1. Caractérisation chromatique des vins

La caractérisation chromatique des vins et des moûts est définie par l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) et les différentes méthodes sont présentées dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (OIV, 2019).

Conventionnellement et pour des raisons de commodité, les caractéristiques chromatiques des vins rouges et rosés sont définies par l'intensité colorante et la nuance, suivant un procédé adopté comme méthode usuelle (OIV, 2006). La méthode usuelle recommande la présentation des résultats pour un trajet optique de 1cm permettant la comparaison des données acquises à l'international.

L'Intensité Colorante représente l'importance de la couleur. Elle fut définie comme la somme des absorbances à 420nm (jaune) et 520nm (rouge) (Sudraud, 1958). Cette définition a été revisitée depuis par Glories qui a proposé la prise en compte de l'absorbance à 620nm (bleu) afin de pouvoir mieux rendre compte de la couleur des vins rouges jeunes (Glories, 1984).

$$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

La Nuance est exprimée par le rapport de l'absorbance à 420 nm sur l'absorbance à 520 nm. L'augmentation de la nuance représente l'évolution de la couleur du vin du rouge vers l'orange.

$$N = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

D'autres analyses de la couleur rouge (A_{520}) basées sur les caractéristiques physico-chimiques des pigments permettent d'obtenir plus d'informations sur les pigments impliqués dans cette couleur. L' A_{520} est mesurée sous différentes conditions en plus de la mesure directe (Atanasova, Fulcrand, Cheynier, et al., 2002):

- Condition 1 : en présence de SO_2 (A_{SO_2})
- Condition 2 : en présence d'éthanal ($A_{\text{éthanal}}$), permettant de décomposer les adduits anthocyane-sulfites.
- Condition 3 : en milieu acide pH=1, décalant donc l'équilibre des anthocyanes vers le cation flavylum rouge détectable à 520 nm (Pigment Total (PT)).

La mesure en condition 1 permet d'obtenir la proportion de pigments rouges non décolorables par les sulfites comme les pyranoanthocyanes ainsi que la proportion de formes flavylum des pigments décolorables par les sulfites (Forme flavylum = $A_{520} - A_{SO_2}$). La condition 2 permet d'obtenir la proportion d'anthocyanes décolorés par les sulfites (Forme combinée au $SO_2 = A_{\text{éthanal}} - A_{520}$). La condition 3 permet d'obtenir la quantité de pigments totaux, sous forme flavylum en milieu acide, mais permet aussi de calculer la proportion de formes hydratées (principalement hémiacétale) incolores (Forme hémiacétale = $PT - A_{520}$). Ces différentes formes de pigments et mesures sont illustrées dans la Figure 32.

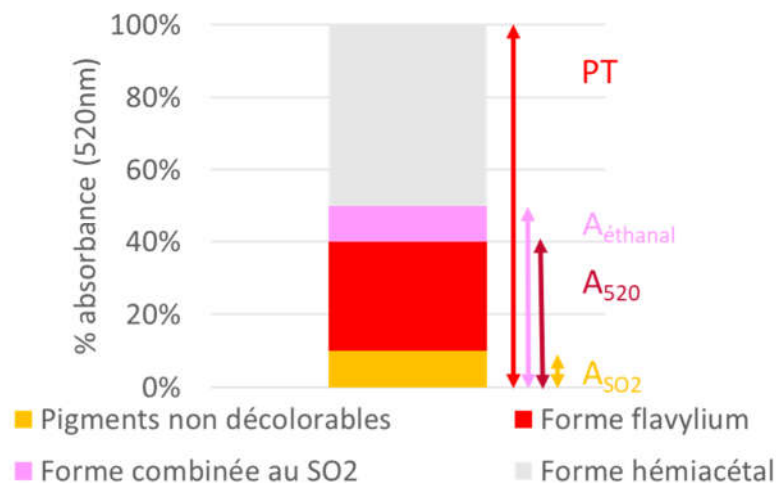


Figure 32: Représentation des différentes conditions d'analyse de la couleur rouge et des différentes formes correspondantes

3.1.2. Le système CIELab

L'espace de couleur CIELab permet d'exprimer mathématiquement la couleur d'un objet perçue par l'œil humain. Le système CIELab s'appuie sur les composantes trichromatiques X, Y, Z définis par la Commission Internationale de l'Éclairage (CIE, 1976) permettant une normalisation de cette mesure à l'échelle mondiale. Ces composantes trichromatiques X, Y, Z d'un vin résultent de l'intégration de tout le spectre (380nm-780nm) en fonction des paramètres colorimétriques de

référence définie par l'OIV. La méthode d'analyse et de calcul (Méthode OIV-MA-AS2-11) est décrite par l'OIV dans son Recueil des méthodes d'analyses des vins et des moûts (OIV, 2019).

Les caractéristiques chromatiques d'un vin sont représentées selon trois axes orthogonaux définies par trois coordonnées colorimétriques correspondant à la clarté (L^*) allant du noir ($L^*=0$) au blanc ($L^*=100$), à la composante de couleur a^* , allant du vert ($a^*<0$) au rouge ($a^*>0$), et à la composante de couleur b^* , allant du bleu ($b^*<0$) au jaune ($b^*>0$) (Figure 33). La clarté est liée à la sensation visuelle de luminosité. Ces caractéristiques chromatiques sont calculées à partir des valeurs des composantes trichromatiques mesurées XYZ par rapport aux valeurs de l'observateur de référence ($X_n = 94,825$; $Y_n = 100$; $Z_n = 107,381$).

$$L^* = 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16$$

$$a^* = 500[(X/X_n) - (Y/Y_n)]$$

$$b^* = 200 - [(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}]$$

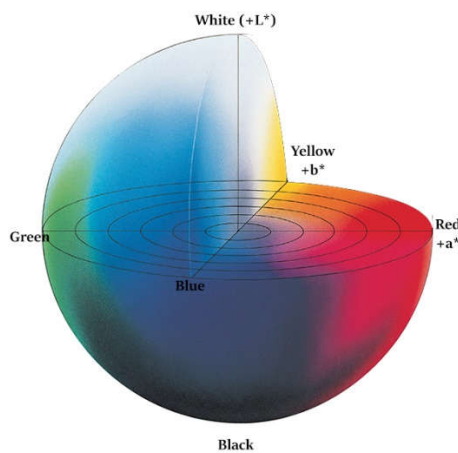


Figure 33: Représentation de l'espace chromatique CIE Lab

Le ton (H^*) ou angle de teinte est un paramètre qui découle de ces coordonnées colorimétriques défini par l'arctangente du rapport de la valeur de la composante b^* sur celle de la composante a^* :

$$H^* = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*}$$

Dans les vins, le ton varie de 0° (rouge) à 90° (jaune) en passant par des nuances orangées (Figure 34). Ces valeurs sont souvent exprimées en radian de 0 à 1.57.

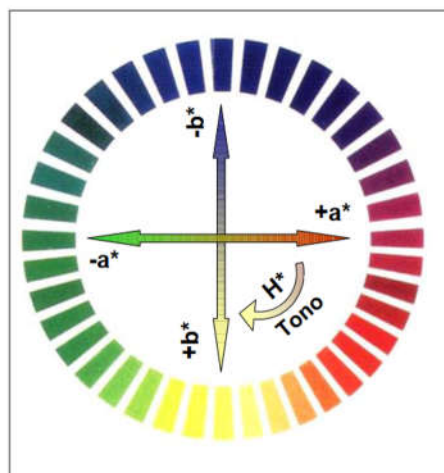


Figure 34: Représentation colorimétrique du ton H^*

3.2. Analyse des composés phénoliques

Il existe de nombreuses techniques d'analyses des composés phénoliques. Dans cette partie sont décrites les techniques qui ont été nécessaires à la réalisation de ce travail.

3.2.1. Techniques de séparations : la chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est un outil analytique permettant la séparation des molécules d'un mélange complexe en fonction de divers paramètres structurels. Plusieurs paramètres physiques et chimiques peuvent influencer cette séparation comme la température, la composition ou l'acidité de la phase mobile ainsi que la composition de la phase stationnaire. Elle est très utilisée en couplage avec un détecteur à barrette diode (DAD) et / ou un spectromètre de masse pour l'analyse de la composition phénolique des vins et des moûts.

Cette technique consiste en la séparation d'un mélange (vin) entraîné par une phase mobile liquide à travers une phase stationnaire solide. Il existe plusieurs types de chromatographie liquide en fonction de la phase stationnaire, dont deux utilisées lors de ce travail.

3.2.1.1. La chromatographie d'affinité

La phase stationnaire généralement utilisée pour les composés phénoliques est constituée de silice greffée en C18, appelée phase inverse car les composés les plus polaires ont un temps de rétention plus court. La séparation s'effectue en général via des gradients d'élution comportant des proportions croissantes d'acétonitrile ou de méthanol dans de l'eau. Les phases mobiles sont acidifiées afin d'améliorer la résolution mais aussi de déplacer l'équilibre des anthocyanes vers le cation flavylum, facilitant donc sa détection et quantification.

Pour les anthocyanes, l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles du cycle B diminue le temps de rétention alors que la présence de groupements méthoxyles augmente ce temps de rétention tout comme l'acylation des sucres. Ces différences de structures permettent de les séparer avant détection par un détecteur à barrettes diode (DAD) (cf partie 3.1.3), un spectromètre de masse (SM) (cf partie 3.2.3) ou bien un fluorimètre (Andreu-Navarro et al., 2012; Rashtbari et al., 2022; Y. Zhang et al., 2014).

Les composés phénoliques de faible masse sont ainsi aisément séparés par CLHP sur colonne de phase inverse (C18). Cependant, la séparation n'est pas liée à la masse moléculaire et devient difficile lorsque celle-ci augmente, du fait du nombre croissant de structures qui conduit à l'apparition de massifs non résolus.

Des méthodes de séparation en phase normale, sur colonne de silice (Rigaud et al., 1991) ou HILIC (Kelm et al., 2006) ont été proposées pour séparer les procyanidines par ordre de DP croissant. Cependant, leur efficacité est difficile à évaluer pour les très hautes masses qui sont mal détectées par spectrométrie de masse (Fulcrand et al., 2008), et elles ne peuvent être appliquées aux milieux plus complexes tels que les vins puisque les anthocyanes sont éluées par ordre de polarité croissante, indépendamment de leur masse.

L'analyse des polymères nécessite donc d'autres stratégies, parmi lesquelles figurent la chromatographie d'exclusion stérique et l'analyse par HPLC-UV-MS des unités libérées par des réactions de dépolymérisation, décrites dans la partie 1.3.

3.2.1.2. La chromatographie haute performance d'exclusion stérique (HPSEC)

Cette technique de séparation, également appelée perméation de gel ou tamisage moléculaire, se base sur le rayon hydrodynamique des molécules, c'est-à-dire le volume qu'elles occupent en solution. Les molécules les plus petites pénètrent plus profondément dans les pores de la phase stationnaire et ont donc un temps de rétention plus long que les plus volumineuses qui en sont exclues.

Couplée à un DAD, cette chromatographie permet de visualiser et quantifier (en équivalent) la fraction d'oligomères et polymères difficile à apprécier avec d'autres méthodes analytiques (Shoji et al., 1999; Vernhet et al., 2020; Weber et al., 2013). Notons que la séparation par exclusion stérique ne peut être réalisée qu'en l'absence d'interaction des molécules avec la phase stationnaire. L'utilisation du N,N-diméthylformamide comme phase mobile permet de prévenir l'adsorption des composés phénoliques sur les phases stationnaires développées pour l'HPSEC, pour lesquels ils présentent une forte affinité (Bae et al., 1994; Weber et al., 2013). Cependant cette technique est difficile à mettre en place car ce solvant est classé Cancérigène, Mutagène et Reprotoxique (CMR) et nécessite donc des précautions supplémentaires.

3.2.2. Techniques de détection des polyphénols

3.2.2.1. La spectrophotométrie UV-Visible

Parmi les méthodes permettant de caractériser et de quantifier les composés phénoliques, la spectrophotométrie UV-visible, utilisée seule ou en couplage avec une séparation chromatographique grâce à un détecteur à barrettes de diodes (diode array detector ou DAD), occupe une place de choix. En effet, cette technique d'analyse est basée sur les propriétés d'absorbance de certains composés dans le spectre UV-Visible qui constituent des propriétés caractéristiques des composés phénoliques. Elle permet de quantifier les composés grâce à la relation linéaire entre l'absorbance et la concentration définie par la loi de Beer-Lambert (Figure 35).

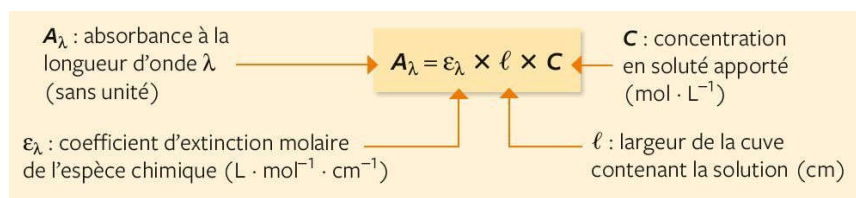


Figure 35: Loi de Beer-Lambert

Par ailleurs, les spectres UV-Visible des composés phénoliques sont en lien avec leur structure et permettent de distinguer les différentes familles mais aussi les composés au sein de chaque famille. La spectrophotométrie UV-visible est également utilisée pour caractériser la couleur des vins.

3.2.2.2. Caractéristiques spectrales des composés phénoliques

Les composés phénoliques se caractérisent par une absorbance à une longueur d'onde de 280nm du fait de la présence de liaisons conjuguées dans les cycles aromatiques des structures de ces molécules. Cette caractéristique permet de définir l'indice de polyphénols totaux (IPT) qui correspond à la mesure de l'absorbance à 280nm (Flanzy & Poux, 1958), classiquement utilisée pour l'analyse des vins ou des moûts. Il est important de noter que certains acides aminés (tryptophane, phénylalanine et tyrosine) (Mach & Middaugh, 1994) présents à l'état libre et dans la structure des peptides et des protéines absorbent aussi à cette longueur d'onde, ce qui peut biaiser la mesure pour certains types d'échantillons mais ce biais est négligeable dans l'analyse des vins (Waterhouse, 2002). Par ailleurs, les différents types de composés phénoliques présentent des coefficients d'extinction différents à cette longueur d'onde, de sorte que la nature des polyphénols présents affecte fortement la mesure (Boulet et al., 2017).

Parmi les composés phénoliques de la baie de raisin, les acides benzoïques et les flavanols absorbent uniquement aux alentours de 280nm. Les acides hydroxycinnamiques ainsi que les stilbènes sont eux caractérisés par une longueur d'onde maximale à 320nm. Cette mesure est donc souvent utilisée pour rendre compte de la quantité d'acide hydroxycinnamiques et de leurs dérivés, les stilbènes étant généralement présents à l'état de traces dans les vins (Bavaresco et al., 1999). Le ratio I_{PT}/A_{320} permet de rendre compte de la proportion de ces composés dans le milieu étudié. En effet, un ratio inférieur à 1 indique une forte proportion d'acide hydroxycinnamiques et dérivés dans le milieu. Ces familles de composés ne montrent aucune absorbance dans le spectre visible et sont donc incolores.

Les flavonols, pigments jaunes présents dans la pellicule des raisins, présentent une première bande d'absorbance aux alentours de 250-260 nm ainsi qu'une deuxième bande à la limite du spectre visible (370-380nm) leur attribuant une couleur jaune pâle (Mabry et al., 1970).

Les anthocyanes natives sous forme flavylium présentent une absorbance maximale autour de 520 nm d'où leur couleur rouge-pourpre. L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le noyau B se traduit par un effet bathochrome. En effet, le maximum d'absorption passe de 515 nm pour la cyanidine-3-O-glucoside à 530 nm pour la malvidine-3-O-glucoside (Ribéreau-Gayon, 1982) De plus, l'acylation portée sur le glucose en position 6 peut modifier le spectre d'absorbance de l'anthocyane native correspondante. L'acylation avec l'acide acétique n'a pas d'effet sur le spectre d'absorbance de l'anthocyane tandis qu'un effet bathochrome est observé après acylation par l'acide *p*-coumarique ou l'acide caféique ainsi que l'apparition d'une bande d'absorbance à 310-330 nm (Wulf & Nagel, 1978).

La transformation des composés phénoliques et notamment des anthocyanes par les différentes réactions décrites dans le paragraphe 2, se traduit par des modifications du spectre d'absorbance, les nouveaux composés formés présentant des spectres UV-visibles différents de ceux de leurs précurseurs.

Les différentes longueurs d'ondes maximales dans le visible ainsi que les couleurs correspondantes des différents dérivés décrits dans les vins sont regroupés dans le tableau 5.

Composés phénoliques	$\lambda_{\max}(\text{nm})$ UV	$\lambda_{\max}(\text{nm})$ Visible	Couleur
Flavanols et acides benzoïques	280	-	incolore
Acides hydroxycinnamiques	320, 280	-	incolore
Flavanols	250-260	360-380	Jaune pâle
Anthocyane	270-280	515-530	Rouge-pourpre
Anthocyane acétylée	270-280	514-530	Rouge-pourpre
Anthocyane <i>p</i> -coumaroylée	280, 320	521-531	Rouge-pourpre
Anthocyane <i>cafféoylée</i>	280, 320	525-538	Pourpre
Anthocyane trimère	345, 295	542-547	Pourpre-bleu
Adduit caftarique-malvidine-3-O-Glc	290, 328	540	Pourpre
A ⁺ -T	280	540	Pourpre
A(flavène)-T	ND	-	Incolore
A-T(type A)	275	-	Incolore
T-A ⁺	280	535	Rouge-pourpre
A ⁺ -pont éthylidène-T(n)	280	545	Pourpre-bleu
A-pont éthylidène-A ⁺	280	528	Rouge-pourpre
Carboxypyrananthocyanes (vitisine A)	274, 370	503-516	Orangé-rouge
Pyrananthocyanes (vitisine B)	270, 355	490-497	Orangé
Phénylpyrananthocyanes	275, 300	499-516	Orangé-rouge
Flavanylpyrananthocyanes	280-290	501, 512	Orangé-rouge
Portisines	-	575	Bleu
Dimères pyrananthocyanes	320, 290	680-730	Bleu turquoise
Xanthylum	265-270	440-460	Jaune-Orangé

Tableau 4: Propriétés spectrales de différents composés phénoliques du vin

3.2.2.3. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection permettant de déterminer les masses moléculaires des composés mais aussi d'obtenir des informations précieuses sur leur structure via les voies de fragmentation. L'analyse des vins par injection directe en spectrométrie de masse a été appliquée pour obtenir des empreintes polyphénoliques et discriminer les vins en fonction de leurs cépages, de leurs procédés de vinification et de leur âge (Mazerolles et al., 2010). Cependant, pour

l'analyse de mélanges complexes comme le vin, cet outil de détection est généralement couplé à une chromatographie liquide permettant la séparation préalable des composés, ce qui améliore la qualité du signal de masse et donne accès à des informations plus complètes (discrimination d'isomères par exemple).

Un spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation permettant d'ioniser les composés, généralement par perte ou ajout d'un proton. Les ions moléculaires ainsi formés sont ensuite séparés par un analyseur en masse en fonction de leurs rapports masse / charge (m/z) puis envoyés vers un détecteur. L'ion moléculaire permet d'obtenir la masse molaire du composé de départ.

Les spectromètres de masses utilisés dans cette étude ont une source d'ionisation par électrobulbion (electrospray ionisation ou ESI), connue pour être une méthode d'ionisation douce comparée aux autres (impact électronique, ionisation chimique, thermospray...). Il existe deux modes d'ionisation en fonction de la charge de l'ion moléculaire : le mode positif et le mode négatif. Du fait de leurs structures, les anthocyanes (déjà chargés positivement dans les conditions d'analyse) répondent mieux en mode positif alors que la majorité des autres composés phénoliques et notamment ceux qui possèdent une fonction acide carboxylique répondent mieux en mode négatif.

Deux types d'analyseur ont été utilisés dans ces travaux : le triple quadripôle (en mode MRM) et la trappe orbitale (OrbiTrap). Ces analyseurs permettent de fragmenter les ions moléculaires (MS/MS) ou les ions fils issus de cette première fragmentation (MS_n), formant des ions fragments caractéristiques aidant à l'identification des molécules.

Le triple quadripôle est un analyseur composé de deux quadripôles reliés par une cellule de collision contenant un quadripôle plus court. Cet appareil a été utilisé en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), un mode dédié à la quantification. L'ion parent à étudier est sélectionné par le premier quadripôle et fragmenté dans la cellule de collision. Le second quadripôle est focalisé sur l'ion produit pour le fragmenter (MS₂). Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion parent et de l'ion produit. Cet analyseur a été utilisé pour développer des méthodes de quantification en mode MRM de composés phénoliques dans les raisins, moûts et vins rouges ou blancs (Ferreira-Lima et al., 2018; Pinasseau et al., 2016) mais aussi dans les vins rosés (M. Lambert et al., 2015). Ces méthodes de quantifications robustes et répétables génèrent des données de métabolomique ciblée mais ne permettent pas d'acquérir des informations non ciblées préalablement dans la méthode. Par ailleurs, nombre de composés pour lesquels les standards analytiques ne sont pas disponibles ne peuvent faire l'objet d'une quantification absolue mais seulement d'une estimation de leur concentration en équivalent d'un standard choisi pour sa proximité structurale avec la molécule dosée (approche semi-quantitative). Une méthode d'analyse des polyphénols et plus particulièrement des pigments a été développée pour les vins rosés. Cent cinquante composés phénoliques, comprenant plus de 80 dérivés d'anthocyanes, allant des anthocyanes natives aux dérivés découlant de réactions d'addition et de cycloaddition (pyranoanthocyanes, T-A, A-T, A-pont éthyl-T, adduits caftarique-anthocyanes) ont ainsi été quantifiés dans les vins rosés (M. Lambert et al., 2015).

La spectrométrie de masse à trappe orbitale (OrbiTrap) permet le piégeage des ions par un champ électrostatique en fonction de leur ratio m/z , induisant leur séparation. L'image du courant induit des ions piégés est traduit, en utilisant la transformée de Fourier, en spectre de masse. Cette technique permet une grande précision des mesures de m/z (1-2 ppm) et une très haute résolution des signaux obtenus, ce qui donne accès au calcul des formules brutes. Avec la spectrométrie de masse basse résolution, la fragmentation MS_n ($n > 2$) est exigée pour l'identification de certains composés

alors que cette étape peut être simplifiée à MS2 avec la HRMS. Cette méthode d'analyse présente également une grande sensibilité qui a permis de détecter des composés présents en très petite quantité dans un milieu, tels que les xanthyliums issus de la condensation des flavonoïdes avec l'éthanal (Vallverdú-Queralt et al., 2017a) ou des polluants dans les vins (Jia et al., 2014; Kosma et al., 2021). L'analyse par HRMS repose sur la comparaison des intensités des signaux, identifiés par leur valeur de m/z ou, lorsque la spectrométrie de masse haute résolution est utilisée en couplage avec la chromatographie, par le couple m/z et temps de rétention, dans les différents échantillons analysés. Notons que ces intensités ne reflètent pas nécessairement les concentrations relatives des composés puisqu'elles dépendent de leur capacité à s'ioniser et que plusieurs signaux (pics isotopiques, adduits, fragments) peuvent correspondre à un même composé, de sorte que certaines familles ou composés peuvent se trouver sur- ou sous-évalués. Cependant, l'analyse par couplage UHPLC-HRMS permet d'acquérir sans a priori un maximum de données afin de comparer des échantillons entre eux et constitue aujourd'hui un des piliers des approches de métabolomique.

Depuis le premier exemple d'application au domaine du vin pour authentifier l'origine du bois utilisé pour produire les fûts (Gougeon et al., 2009) la métabolomique sans a priori basée sur le couplage UHPLC-HRMS a été adoptée par de nombreux chercheurs en œnologie comme outil de formulation d'hypothèses, de manière impartiale et non ciblée, pour répondre à diverses questions, notamment la caractérisation de l'origine géographique (terroir) (Arapitsas et al., 2020; López-Rituerto et al., 2012; Roullier-Gall et al., 2014), l'identification des caractéristiques variétales (Arapitsas et al., 2020), des modifications induites par les conditions oxydantes ou réductrices (Ontañón et al., 2020a; Roullier-Gall et al., 2017) et des traits métaboliques des levures de vin (Casu et al., 2016; Tumanov et al., 2018), ou la détermination de biomarqueurs pour les composés aromatiques (Pinu, 2018; Pinu et al., 2014). Ces travaux reposent pour la plupart sur un nombre très important de signaux, sélectionnés sur leur rapport signal sur bruit et /ou leur capacité à discriminer les échantillons. Ce très grand nombre de données à traiter et la difficulté de les attribuer a nécessité le développement de stratégies spécifiques de métabolomique sans a priori, impliquant, outre l'acquisition d'empreintes pertinentes et robustes, une étape de traitement, de sélection et d'annotation des signaux et une analyse chimiométrique. L'attribution de formules brutes est généralement effectuée par les logiciels de traitement des spectres qui proposent également des structures pour ces composés à partir de recherche dans les bases de données. La haute résolution apporte un gain substantiel de précision sur l'attribution de ces formules, comme illustré dans le cas du resvératrol ($C_{14}H_{11}O_3$, détecté en mode positif à un m/z de 227,07139) qui, à une résolution inférieure pourrait être confondu avec 11 autres molécules présentes dans les vins (Gougeon et al., 2009). La prise en compte du temps de rétention s'avère également très utile pour les discriminer puisque ces molécules sont séparées par chromatographie. Cependant, le travail réalisé sur cet exemple particulier n'est pas envisageable sur l'ensemble des signaux détectés dans les vins. Ainsi, dans les travaux récents cités plus haut, une grande majorité de signaux n'ont pu être attribués, bien qu'une formule brute ait été proposée. Grâce à la projection des rapports H/C et O/C calculés à partir des formules brutes sur le diagramme de Van Krevelen (Figure 36) (Gougeon et al., 2009), ces composés peuvent être affectés à certaines familles moléculaires. Cette même approche, complétée par l'ajout de la masse moléculaire des composés détectés sur une troisième dimension, a été utilisée pour suivre l'évolution de la réaction de condensation de l'épicatéchine avec l'éthanal (Vallverdú-Queralt et al., 2017b).

Une stratégie consistant à calculer les m/z de toutes les molécules résultant de réactions attendues dans les vins pour constituer une base de données et pouvoir l'utiliser pour attribuer les structures détectées a été proposée (Cave et al., 2019). Un grand nombre de signaux présents dans les vins correspondent à des m/z prédits dans cette base. Cependant, comme pour l'interrogation des bases de données commerciales, l'annotation automatique doit être considérée avec prudence et faire

l'objet d'une expertise prenant en compte, outre les valeurs de m/z, les temps de rétention et les intensités relatives attendues au sein d'une famille de composés.

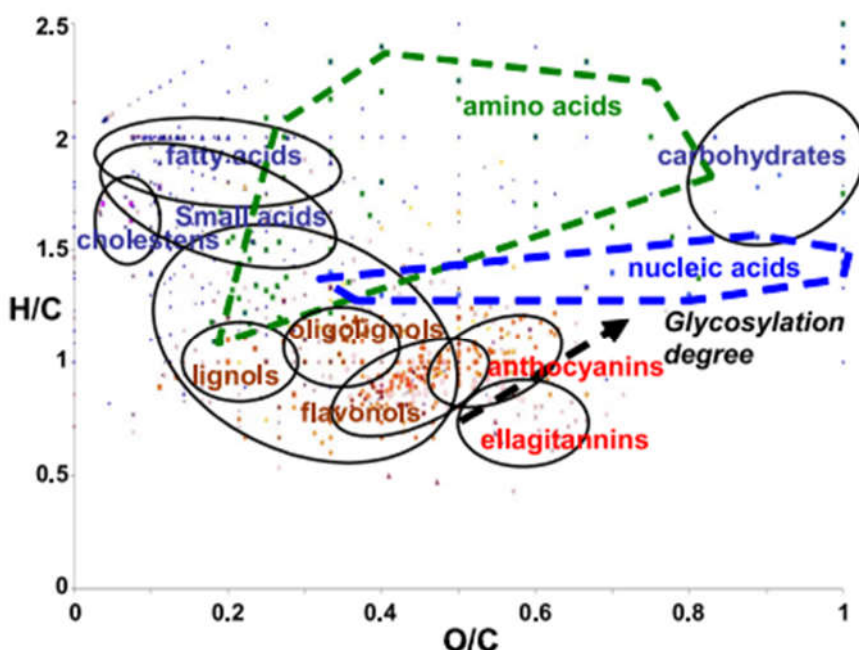


Figure 36: Représentation de van Krevelen illustrant le positionnement de plusieurs classes de molécules (Gougeon et al., 2009)

3.2.2.4. Analyse des polymères de proanthocyanidines

L'analyse des proanthocyanidines et de leurs dérivés peut être réalisée par HPLC après dépolymérisation en présence d'un agent nucléophile. Cette méthode repose sur la capacité de clivage en milieu acide des liaisons interflavoniques pour générer un carbocation électrophile sur l'unité supérieure (ou unité d'extension) libérée. Ce carbocation peut réagir avec un agent nucléophile pour former un adduit stable permettant de différencier les unités d'extensions substituées des unités terminales, libérées telles quelles. De nombreux agents nucléophiles ont été utilisés tels que le mercaptoéthanol (Nonaka et al., 1983), l'acide thioglycolique (Mouls & Fulcrand, 2012) et le toluène- α -thiol, la réaction étant alors appelée thiolysé (Czochanska et al., 1980; Guyot et al., 2001). Ces différents composés sont soit très odorants soit dangereux et un autre nucléophile inodore et inoffensif est donc généralement privilégié aujourd'hui, le phloroglucinol. La technique de phloroglucinolyse permet d'obtenir une première caractérisation des oligomères et polymères des moûts et des vins et d'en calculer les teneurs (somme des concentrations de toutes les unités libérées) et le degré de polymérisation moyen (DPm). Ce dernier est égal au nombre d'unités totales divisé par le nombre d'unités terminales et correspond donc à une moyenne des longueurs des polymères.

$$DPm = \frac{\sum U.T. + U.E.}{\sum U.T.}$$

U.T. = Unité Terminale ; U.E. = Unité d'Extension (ou supérieur)

Cependant, il est largement reconnu que cette technique est adaptée à l'analyse des tanins condensés natifs des plantes mais ne convient pas à l'analyse des formes évoluées ou oxydées. En

effet, il a été noté la résistance des certaines liaisons comme les liaisons interflavoniques de type A aux conditions de dépolymérisation de cette méthode (Foo et al., 2000; Roux et al., 1998).

3.2.3. Traitements statistiques

3.2.3.1. Plans d'expérience

Les plans d'expériences sont des modèles mathématiques développés permettant d'obtenir le maximum d'informations spécifiques en réalisant un minimum d'expérimentation. Il existe une multitude de plans d'expérience à adapter en fonction du nombre de paramètres étudiés et des différents niveaux de ces paramètres (Bondar, 1983; Kiefer, 1959). L'impact des paramètres étudiés peut ensuite être modélisé en surface de réponse pour chacune des variables mesurées. Cette méthodologie est particulièrement utile à l'étude de système pouvant être impactés par plusieurs paramètres individuellement ou en synergie.

De nombreuses études utilisent des plans d'expériences pour étudier le métabolisme de la levure lors de la fermentation alcoolique. En particulier, l'impact des sources lipidiques (Guittin et al., 2021), des nutriments azotés ou de la température (Rollero et al., 2015) sur la production d'arômes par la levure lors de la fermentation alcoolique ont été étudiés via des plans d'expériences.

Cette méthodologie a aussi été appliquée à l'étude des phénomènes d'extraction des composés phénoliques des différentes parties de la baie de raisin (Mané et al., 2007). En effet, l'utilisation d'un plan d'expérience de Doehlert a permis de faire varier trois paramètres simultanément (composition en méthanol du solvant d'extraction, ratio solide/liquide et temps d'extraction) à 3, 5 et 7 niveaux différents tout en réalisant seulement 15 expérimentations. Une autre étude, utilisant cette fois un plan composite centré, s'est intéressée à l'impact de différents paramètres de la macération sur la concentration en anthocyanes lors de la vinification des vins rosés (Puértolas et al., 2011).

Les plans d'expériences sont aussi largement appliqués pour l'optimisation de protocoles de préparation d'échantillons pour des analyses de composés volatils tel que les 2,4,6-trichloroanisole (TCA) et 2,4,6-tribromoanisole (TBA) (Martendal et al., 2007) ou les arômes variétaux (Saha et al., 2018) mais aussi pour des analyses de composés phénoliques (del Álamo et al., 2004).

Ces approches nécessitent une bonne connaissance des outils de modélisation des données. Les expérimentations n'étant pas répétées, les traitements statistiques classiques (ANoVa) ne sont pas applicables.

3.2.3.2. Chimiométrie

La chimiométrie est l'analyse statistique appliquée aux techniques de chimie analytique. De nombreux outils existent et ont été utilisés pour l'analyse de la composition phénolique, des composés volatils mais aussi de la couleur des moûts et des vins. Les progrès récents des instruments analytiques permettent de générer d'énormes jeux de données qui nécessitent plus que jamais l'utilisation de ces outils de chimiométrie pour le retraitement (Pinu, 2018).

Les données générées peuvent être traitées en utilisant une grande variété d'outils chimiométriques. L'analyse de la variance (ANoVa) est l'analyse statistique la plus répandue. Elle permet d'évaluer la significativité des différences par la réplication des analyses, en d'autres termes elle permet d'évaluer si l'effet observé est dû à une variabilité intrinsèque de l'échantillon (biologique, analytique...) ou au paramètre étudié. Cette méthode peut être appliquée à n'importe quelle variable quantitative, de la concentration en polyphénols à l'analyse sensorielle (Carlucci & Monteleone, 2001).

Les analyses en composantes principales (ACP) permettent de visualiser la variabilité d'un ensemble d'échantillon et de connaître les variables impliqués dans ces différences. Ces traitements statistiques appliqués aux dosages des composés phénoliques permettent d'isoler des marqueurs spécifiques de terroir (Kallithraka et al., 2001), de vinification particulière (Gonzalez-San Jose et al., 1990) mais aussi de combiner plusieurs jeux de données comme le dosage des composés phénoliques, l'analyse sensorielle, les données œnologiques et la couleur (Noble & Shannon, 1987; Wirth et al., 2012).

Les matrices de corrélations et les classifications hiérarchisées sont beaucoup utilisées pour le traitement des grands jeux de données. En effet, ces techniques permettent de réaliser des clusters ou d'évaluer la corrélation entre plusieurs variables ou observations permettant ensuite le regroupement et donc la simplification des discussions. Ces techniques ont été utilisée pour révéler les caractéristiques variétales des cépages (Pinasseau et al., 2017) mais aussi les terroirs (Arapitsas et al., 2020).

3.3. Analyse des vins rosés

L'application de la HPLC couplée à la spectrophotométrie UV-visible et, depuis les années 90, à la spectrométrie de masse à l'analyse des vins a permis de grands progrès dans la caractérisation de leur composition phénolique. En effet, la plupart des produits décrits dans la partie 2 ont été détectés par ces approches, dans les vins ou dans des solutions modèles reproduisant les conditions rencontrées dans les vins, avant d'être, pour les plus abondants, isolés et identifiés par RMN. Ces analyses ont notamment permis d'analyser la composition phénolique des vins rosés et de suivre son évolution dans différentes conditions. Ainsi, l'analyse de vins rosés de Grenache par HPLC-DAD-MS a montré que les concentrations d'acides hydroxycinnamiques γ sont supérieures à celles des anthocyanes et des flavanols (M. Lambert et al., 2015; Wirth et al., 2012). Des degrés de polymérisation très faibles (1,5) ont été estimés pour ces derniers par phloroglucinyse. Cette étude a également permis de mettre en évidence dans ces vins divers types de pigments dérivés et notamment des adduits caftarique – anthocyanes et flavanol-anthocyanes ainsi que divers types de pyranoanthocyanes (carboxypyrananthocyanes, phenylpyrananthocyanes, catéchylpyrananthocyanes) et de montrer que ces derniers s'accumulent au cours du vieillissement, notamment en conditions oxydatives.

4. Conclusion

La maîtrise de la couleur est primordiale pour les vins rosés. Les études réalisées sur ces vins rosés rapportent des teneurs en anthocyanes variant de moins de 1 mg/l à 50 mg/l (Gil et al., 2017, 2019; M. Lambert et al., 2015; Salinas et al., 2003; Wirth et al., 2012). Plus rares encore sont les données sur les autres composés phénoliques présents dans ces vins.

Des teneurs très élevées en dérivés d'acides hydroxycinnamiques par rapport aux autres types de composés phénoliques ont été signalées dans certains vins rosés (M. Lambert et al., 2015; Wirth et al., 2012) mais on ignore s'il s'agit d'une caractéristique générale. De plus, différents groupes de pigments dérivés ont également été détectés dans ces travaux. Certains de ces pigments, tels que les adduits catariques anthocyanes, découlent d'un phénomène d'oxydation enzymatique généralement observé lors de la vinification en blanc (brunissement des moûts) alors que d'autres composés, tel que les adduits tanins-anthocyanes sont spécifiques de la vinification en rouge.

Ainsi, l'étude bibliographique fait ressortir le manque de données disponibles sur ces vins particuliers, à l'interface de la vinification en blanc et en rouge. Nous sommes partis de l'hypothèse selon laquelle leur vinification atypique, influençant grandement les proportions des composés phénoliques retrouvés dans les moûts, influence aussi les types de réactions qui se produisent au cours de la vinification et plus précisément au cours de la fermentation alcoolique et en particulier la nature des pigments formés et par conséquent la couleur. Nous avons donc orienté les travaux de recherche de cette thèse en vue d'éclairer cette voie en réalisant une première analyse à grande échelle de la couleur et de la composition phénolique des vins rosés commerciaux. Suite à cela, nous avons focalisé nos travaux sur l'étape de fermentation alcoolique pour approfondir son impact sur la couleur et la composition.

Chapitre 2 :
Matériels & Méthodes

1. Matériels

1.1. Moût synthétique

Le milieu synthétique (MS) utilisé dans cette étude comme témoin de fermentation présente les caractéristiques moyennes d'un moût de raisin (Bely et al., 1990). Ce milieu est caractérisé par une forte concentration en sucres (glucose et fructose en proportions identiques), une forte teneur en azote assimilable (425mg/L), un pH acide (pH= 3.5) et une absence de composés phénoliques.

Composés	Quantité par litre
Glucose	100 g
Fructose	100 g
Acide malique	6 g
Acide citrique	6 g
Phosphate de potassium	0,75 g
Sulfate de potassium	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Chlorure de calcium	0,155 g
Chlorure de sodium	0,2 g
Chlorure d'ammonium	0,46 g
Solution mère d'oligo-éléments	1 mL
Solution mère de vitamines	10 mL
Solution mère de facteurs anaérobies	0,33 mL
Solution mère d'acides aminés	13,06 mL
Solution mère de chlorure de fer	1 mL

Le pH du milieu est ajusté à 3,5 avec une solution de NaOH 10M

Tableau 5:Composition du milieu synthétique utilisé pour les fermentations.

Composés	Quantité par litre
Sulfate de manganèse monohydraté	4 g
Sulfate de zinc heptahydraté	4 g
Sulfate de cuivre pentahydraté	1g
Iodure de potassium	1g
Chlorure de cobalt hexahydraté	0,4g
Acide borique	1g
Ammonium heptamolybdate	1g

La solution mère d'oligo-éléments est stérilée par filtration 0,22µm et conservée à 4°C

Tableau 6:Composition de la solution mère d'oligo-éléments

Composés	Quantité par litre
Myo-inositol	2 g
Pantothénate de calcium	0,15 g
Thiamine, hydrochloride	0,025 g
Acide nicotinique	0,2 g
Pyridoxine	0,025 g
Biotine	3 mL
La solution mère de vitamines est conservée à -20°C	

Tableau 7: Composition de la solution mère de vitamines

Composés	Quantité par litre
Phytostérols	1,5 mg
Tween 80	50 mL
Ethanol pur	qsl 100 mL
La solution mère de facteurs anaérobies est conservée à 4°C	

Tableau 8: Composition de la solution mère de facteurs anaérobies

Composés	Quantité par litre
Acide aspartique	3,4 g
Acide glutamique	9,4 g
Alanine	11,1 g
Arginine	28,6 g
Cystéine	1 g
Glutamine	38,6 g
Glycine	1,4 g
Histidine	2,5 g
Isoleucine	2,5 g
Leucine	3,7 g
Lysine	1,3 g
Méthionine	2,4 g
Phénylalanine	2,9 g
Proline	46,8 g
Sérine	6 g
Thréonine	5,8 g
Tryptophane	13,7 g
Tyrosine	1,4 g
Valine	3,4 g
La solution mère d'acides aminés est conservée à -20°C	

Tableau 9: Composition de la solution mère d'acides aminés

Composés	Quantité par litre
Chlorure de fer (III) hexahydraté	20g
La solution mère de chlorure de fer est conervée à 4°C	

Tableau 10: Composition de la solution mère de chlorure de fer

1.2. Moûts naturels

1.2.1. Vendange 2018

Les trois différents cépages *Vitis vinifera* Cinsault, Grenache et Syrah ont été récoltés au Centre du Rosé (IFV, Vidauban, France) en septembre 2018. Quatre-vingt-dix à 100 kg de raisins ont été vendangés à la main dans des bacs contenant 20 kg de raisins afin d'éviter l'écrasement des raisins et une macération incontrôlée.

A l'arrivée à la cave, les raisins ont été conservés 12h à 12° puis égrappés et foulés avec ajout d'enzyme pectolytique (Kzym 4g/100kg, Laffort, France). 3g/100kg d'hydrogénosulfite de potassium ont été ajoutés pour la protection contre l'oxydation et la contamination microbienne (4g/100kg de plus d'hydrogénosulfite de potassium ont été ajoutés au moût de Syrah car la récolte contenait une contamination microbienne visuelle sur les raisins).

Les moûts ont ensuite été soumis à une macération contrôlée à 18°C pendant 2 heures pour la Syrah, 4 heures pour le Grenache et 12 heures pour le Cinsault, selon le processus de vinification développé par le Centre du Rosé. Après macération, les raisins ont été pressés et 1,5g/100kg d'hydrogénosulfite de potassium ont été ajoutés pour les protéger de l'oxydation pendant le cycle de pressurage. Le jus de goutte et le jus de presse ont été récupérés séparément. Vingt litres de jus de goutte et de jus de première presse ont été mélangés pour constituer des moûts à "faible" niveau d'extraction appelés Syrah1, Grenache1, et Cinsault1. Ensuite, 10 litres de ce jus ont été mélangés à 10 litres de jus de dernière presse pour élaborer des moûts à niveau d'extraction "élevé" appelés Syrah2, Grenache2 et Cinsault2. Ensuite, les moûts ont été clarifiés par débouillage à froid à 12°C avant soutirage. Les analyses des moûts ont été réalisées au Centre du Rosé. Les moûts clarifiés et les particules solides ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation à l'UMR SPO.

1.2.2. Vendange 2019

Les trois mêmes cépages *Vitis vinifera* qu'en 2018 (Cinsault, Grenache et Syrah) ont été récoltés à la main à un degré d'alcool potentiel de 12° par le Centre du Rosé (IFV, Vidauban, France) en 2019. 300 kg de chaque cépage ont été récoltés dans des bacs de 20 kg afin d'éviter l'écrasement des raisins et la macération incontrôlée.

Avant le processus pré-fermentaire, les raisins ont été conservés à 12°C pendant 12 heures pour être traités à la même température. Les raisins ont été égrappés, foulés et de l'hydrogénosulfite de potassium (2,5 g/100 kg) a été ajouté pour les protéger contre l'oxydation et la contamination microbienne. Les moûts ont ensuite été mis dans des cuves de 3hL et soumis à une macération contrôlée à 17°C pendant 4 heures. Après la macération, les moûts ont été sulfités (2,5 g/100 kg d'hydrogénosulfite de potassium) pour les protéger de l'oxydation et du pressage. Ensuite, les moûts ont été clarifiés par débouillage à froid à 12°C pendant 12 heures avant soutirage et ajustés à une turbidité de 135 NTU par ajout de particules solides recueillies lors du soutirage. La teneur en azote assimilable a été ajustée à 110 mg/L pour tous les moûts en utilisant un apport de phosphate diammonium.

2. Méthodes

2.1. Mise en œuvre des fermentations

Les fermentations sont réalisées dans des fermenteurs à deux échelles différentes : 300 mL, et 100 L de volume utile. Les fermenteurs de 300mL contiennent 250mL de moûts et les fermenteurs de 100L contiennent entre 60-70L de moûts. Toutes les fermentations ont été menée dans des enceintes

thermorégulées. Les fermentations à l'échelle pilote (100L) ainsi que certaines fermentations à l'échelle laboratoire (300mL) ont été menées dans la cave expérimentale de l'IFV-Centre du Rosé (Vidauban, France). La majorité des fermentations à l'échelle laboratoire (300mL) ont été menées à l'UMR SPO (Montpellier, France).

2.1.1. Fermentations vendange 2019

Avant la fermentation, chaque moût a été homogénéisé à l'aide de glace carbonique et réparti dans trois cuves de fermentation de 100L (échelle pilote), permettant de conduire chaque modalité de fermentation en triplicata. L'homogénéisation a été validée par une analyse colorimétrique et une analyse de variance effectuées directement au Centre du Rosé. Un volume de 250mL de moût a été prélevé dans chacune des neuf cuves de fermentation pour remplir neuf fermenteurs de 300mL (échelle laboratoire). Les fermenteurs et les cuves de fermentation ont été purgés avec des pellets de gaz carbonique avant le remplissage et équipés d'un système de cloche pour maintenir les conditions d'anaérobiose. Tous les fermenteurs ont été placés dans une pièce thermorégulée à 16°C et les fermenteurs ont été agités à 150 rpm pour imiter la synergie des cuves à l'échelle pilote. Les levures sèches actives (souche K1, ICV, France) ont été réhydratées pendant 20min à 37°C à l'aide d'une solution de glucose dans l'eau (50g/L) avant d'être inoculées à 0.4g/L. La cinétique de fermentation a été suivie manuellement pour les fermenteurs de 300mL par les pertes de poids induites par la libération de CO₂. Tous les vins ont fermenté jusqu'à la fin (moins de 2g/L de sucre résiduel) sans interruption en 15 jours environ. La couleur a été suivie pendant les fermentations à l'échelle pilote et des échantillons de 10 ml ont été prélevés pour analyse au stade du moût et du vin. L'analyse de la couleur a été effectuée directement tandis que les échantillons pour l'analyse de la composition ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.1.2. Fermentations vendange 2018

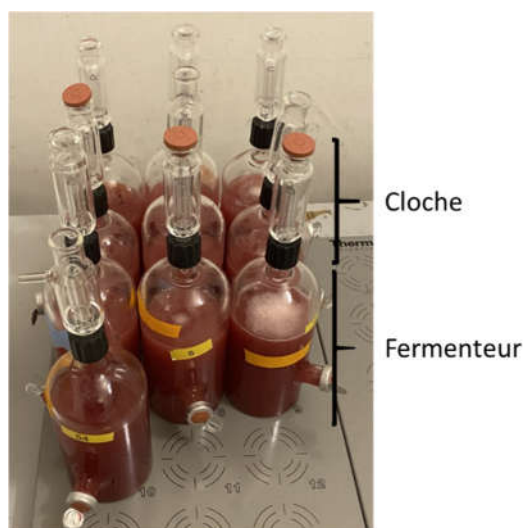


Figure 37: Photo de fermenteurs de 300mL

Les fermentations de Grenache et de Cinsault ont été réalisées en quadruplicat dans des fermenteurs de 300mL remplis de 250mL de moût (contrôlé par pesée). Les fermentations de Syrah ont été réalisées en duplicat dans les mêmes récipients. Tous les fermenteurs et les flacons ont été protégés de l'oxydation par bullage d'un gaz inerte, l'argon. Les fermenteurs ont été équipés de systèmes de cloches de fermentation permettant de maintenir l'anaérobiose. Tous les fermenteurs ont été placés dans une pièce thermorégulée réglée à 16°C et agitée à 150 rpm. Des sulfites ont été ajoutés aux moûts

de Cinsault et de Grenache en utilisant une solution d'hydrogénosulfite de potassium (222g/L) pour atteindre 20, 50, 80mg/L de teneur en sulfites totaux, notre valeur cible. Les Syrah1 et Syrah2 étaient déjà respectivement à 101mg/L et 89mg/L de sulfites totaux avant la fermentation et non donc pas été sulfité. Tous les fermenteurs ont été maintenus à 12, 16, 20°C pendant 24h avant l'inoculation.

Les levures sèches actives (souche K1, ICV, France) ont été réhydratées pendant 20min à 37°C à l'aide d'une solution de glucose dans l'eau (50g/L) avant d'être inoculées à 0,4g/L. La cinétique de fermentation a été suivie manuellement par les pertes de poids induites par la libération de CO₂. Les fermentations ont été considérées comme achevées lorsqu'aucune perte de poids supérieure à 0,1 g par 24 heures n'a été observée. Tous les vins ont fermenté jusqu'à la fin (moins de 2g/L de sucre résiduel) sans interruption en 20 jours environ (10 à 20°C jusqu'à 27 jours à 20°C). Les levures ont été collectées par centrifugation (4000g, 10°C, 15 min), congelées et stockées à -20°C jusqu'à leur analyse. Pour chaque fermenteur, 50mL de vin ont été prélevés pour l'analyse de la couleur et 5 échantillons de 1mL pour l'analyse des polyphénols et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Pour fournir des échantillons de levure témoins, des fermentations dans du moût de raisin synthétique ont été réalisées dans les mêmes conditions en trois exemplaires.

2.2. Désorption des polyphénols des parois de levures

La méthode utilisée pour la désorption des polyphénols des lies a été adaptée de Vernhet et al. (Vernhet et al., 2020). Les levures récupérées de chaque fermentation de 250mL ont été rincées avec 10mL d'eau distillée, lyophilisées et pesées pour déterminer la masse sèche par mL. Trois extractions successives ont été réalisées sur 80mg de levure sèche. Chaque extraction a été réalisée par l'ajout de 0,25mL de solvant A (méthanol, acide formique à 1%) suivi de 5 minutes de sonication. Ensuite, un volume de 1,75mL de solvant B (acétone/eau (60/40), acide formique 1%) a été ajouté et l'extraction a été réalisée pendant 30 minutes en alternant 5 minutes de sonication et 10 minutes d'agitation avant centrifugation (10000g, 10°C, 10 min). Les trois extraits (3x2mL) ont été regroupés et séparés en trois aliquotes de 2mL, évaporés à sec sous vide à l'aide d'un Genevac (SP Scientific, Warminster, PA, USA) et stockés à -80°C.

2.3. HPSEC

Les vins (1mL) et les extraits de levure (2mL, correspondant à 27mg de levure sèche) ont été portés à sec et dissous dans 500µL de la phase mobile composée de diméthylformamide (DMF), 1% v/v d'acide acétique glacial, 5% v/v d'eau et 0,15M de chlorure de lithium. Pour éliminer les sucres, 1mL d'échantillons de moût ont été préalablement purifiés par extraction en phase solide sur des cartouches tC18 (Strata, tC18, 55 µm, 140 Å). L'élution des sucres a été réalisée avec 3mL d'eau contenant 1% d'acide formique et suivie par indice de réfractométrie. Les composés phénoliques ont ensuite été désorbés à l'aide de 3mL d'acétone/eau (60/40, v/v) acidifié avec 1% d'acide formique et porté à sec sous vide avant dissolution dans 500µL de phase mobile. La perte de polyphénols a été évaluée en comparant les valeurs d'absorbance obtenues sur les fractions avec celles des moûts initiaux.

La séparation a été réalisée sur un système HPLC Agilent 1260 (Agilent, France) constitué d'un dégazeur sous vide, d'une chambre d'échantillonnage automatique réglée à 15 °C, d'une pompe isocratique, d'un réchauffeur de colonne réglé à 60°C, d'un détecteur à barrettes de diodes et équipé d'une colonne de garde contenant du polystyrène-divinylbenzène hautement réticulé (50 x 7. 8mm, 5µm) et de 3 colonnes PLgel (Phenomenex) composées du même matériau (300 x 7,8 mm, 5µm et 50, 1000 et 1000000 Å de pores) connectées en série. Le débit a été réglé à 1mL/min et le temps d'élution des polyphénols a été calibré à l'aide de standards commerciaux (acide caféique, acide p-coumarique, ,

catéchine, chlorure de malvidine 3-O-glucoside, dimère B2 et A2 de procyanidine) et de fractions de tanins avec différents degrés de polymérisation préalablement purifiés au laboratoire (Vernhet et al., 2014). Les données ont été extraites et analysées à l'aide du logiciel Excel.

2.4. Phloroglucinolyse

Les unités constitutives des dérivés de flavanol libérés après une dépolymérisation catalysée par un acide en présence de phloroglucinol (Kennedy & Jones, 2001) ont été analysées par UHPLC-QqQ-MS en mode MRM comme décrit par Pinasseau et al (Pinasseau et al., 2016). La réaction de phloroglucinolyse a été réalisée en triplicat sur le solide obtenu après évaporation de 2 mL de vin, en utilisant soit 2 mL soit 3 mL d'une solution de phloroglucinol (50 g/L) et d'acide ascorbique (10 g/L) dans MeOH/HCl 0,2 M. La réaction a été réalisée pendant 20 min à 50 °C et arrêtée en plaçant l'échantillon dans de la glace et en ajoutant un volume identique de tampon formiate d'ammonium à 200 mM (Kennedy & Jones, 2001). La solution obtenue a été centrifugée (HettichLab Technology, Tuttlingen, Allemagne) (15 000 rpm, 10 min, 4 °C) avant d'être injectée dans le système HPLC-QqQ-MS. Cette méthode permet la détection et la quantification de l'épigallocatechine, la catéchine, l'épicatéchine, l'épicatéchine-3-O-gallate (unités terminales) et de leurs adduits phloroglucinol (unités d'extension). Les unités flavanol totales libérées par la phloroglucinolyse (FlaT) ont été calculées et le degré moyen de polymérisation (mDP) a été évalué comme le rapport molaire de la somme de toutes les unités flavanol sur la somme des unités terminales.

2.5. Analyses HPLC-MS ciblée

La composition des polyphénols a été déterminée par UHPLC-MS/MS en mode MRM, à l'aide d'un système UHPLC Acquity couplé à un spectromètre de masse à triple quadripôle (QqQ) (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) avec une source d'ionisation par électrospray (ESI) fonctionnant en mode positif et négatif. Le logiciel MassLynx (Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour contrôler les instruments et acquérir les données. Les données ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel TargetLynx (Waters, USA).

La méthode décrite par Lambert et al. (M. Lambert et al., 2015) a été appliquée pour détecter et quantifier 135 composés phénoliques, dont 99 anthocyanes et dérivés (anthocyanes natifs, dimères d'anthocyanes, pyranoanthocyanes, carboxypyrananthocyanes, phénylpyrananthocyanes (c'est-à-dire catéchyl, hydroxyphényl), anthocyanes natifs et dérivés d'anthocyanes), catéchyl, hydroxyphényl et guaiacylpyrananthocyanines), flavanyl-pyranoanthocyanines, adduits dimères de flavanol-anthocyanine (F-A) et d'anthocyanine-flavanol (A-F) et adduits flavanol d'anthocyanine liés à la méthylméthine (dimères F-éthyl-A) ; 15 acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques et leurs esters méthyliques), six stilbènes, cinq flavonols, deux dihydroflavonols, neuf monomères, dimères et trimères de flavanol et deux dimères F-éthyl-F. D'autres composés ont été quantifiés dans la méthode, comme les acides aminés (tyrosine et tryptophane) et les alcools correspondants (tyrosol, hydroxytyrosol, tryptophol), le glutathion réduit et oxydé et le GRP (produit de la réaction du raisin, c'est-à-dire l'acide 2-S-glutathionylcaffeoyltartrique). Les préparations standard et d'échantillons, les conditions UHPLC-MS/MS, les paramètres MRM et les gammes d'étalonnage étaient les mêmes que dans la méthode validée par Lambert et al, (M. Lambert et al., 2015). La liste des variables et les codes utilisés sont présentés dans le tableau S1.

2.6. Analyses HPLC-MS non ciblée

2.6.1. Analyse HPLC-HRMS

Les analyses ont été effectuées sur un système UPLC-DAD-MS. Les séparations ont été réalisées à l'aide d'un Vanquish UHPLC-DAD (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, USA), sur une colonne (10 × 1 mm

i.d.) Acquity HSST3 (Waters, Milford, MA ; 1,7 μ m), opérée à 35 °C. La phase mobile était constituée d'eau/acide formique (99/1, v/v) (éluant A) et d'acétonitrile/eau/acide formique (80,5/19,5/1, v/v) (éluant B). Le débit était de 0,22 mL/min. Le programme d'élution était le suivant : isocratique pendant 1,5 min avec 2% de B, 2-12% de B (1,5-4,5 min), isocratique avec 12% de B (4,5-7 min), 12-24% de B (7-12 min), 24-48% de B (12-15 min), 48-60% de B (15-16 min), 60-100% de B (16-17 min).

Les analyses ESI-MS/MS ont été réalisées avec un Orbitrap Exploris 480 de Thermo Fisher Scientific (San Jos'e, CA, USA) équipé d'une source d'électrospray et d'un calibrant de masse interne post-source au fluoranthène (ion radicalaire à m/z 202,0777 en mode ion positif et m/z 202,0788 en mode ion négatif). Le spectromètre a fonctionné en mode ions positifs et négatifs (tube de transfert d'ions : 280°C ; température du vaporisateur : 300°C ; gaz de gaine, gaz auxiliaire et gaz de balayage : 40, 10 et 2 (unités arbitraires) respectivement ; tension réglée, 3.5kV en mode positif, 2.5kV en mode négatif). La gamme de masse était de [150-1500].

La séquence d'échantillons a été adaptée d'après Arapitsas et Mattivi (Arapitsas & Mattivi, 2018). Elle comprend des échantillons de vin et de moût, un échantillon de contrôle de qualité (QC) et un blanc.

Les échantillons ont été injectés en triplicat biologique selon un ordre randomisé. Après l'équilibrage, la séquence commence par 3 injections de blanc, suivies de 3 injections d'échantillon QC. Ensuite, l'échantillon QC et le blanc ont été injectés tous les 6 échantillons réels. La séquence se termine avec 1 injection d'échantillon QC et 1 injection de blanc.

2.6.2. Analyse des données

Les données des échantillons réels, des QC et des blancs ont été traitées par le logiciel Compound Discoverer (v. 3.2.2.421, Thermo, Waltham, USA) avec un Workflow constitué de plusieurs étapes. Les nœuds de traitement du spectre qui extraient les données spectrales de masse du fichier d'ensemble d'entrée et alignent la rétention des composés dans la séquence ; Les nœuds de détection des composés qui détectent les composés par extraction des masses, les valeurs manquantes, les pics d'adduits et d'isotopes groupés ; Les nœuds d'affinement de la zone de pic qui appliquent la correction QC, suppriment les composés de fond trouvés dans les échantillons blancs. Les paramètres de Compound Discoverer sont disponibles sur demande.

L'annotation a été effectuée manuellement en comparant les temps de rétention et l'exactitude des spectres de masse avec une tolérance de masse de 5 ppm basée sur l'expérience antérieure du groupe avec la résolution de masse de l'instrumentation spécifique et conformément aux quatre niveaux d'annotation décrits par Sumner (Sumner et al., 2007).

Chapitre 3 :

Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics

Ce chapitre est une première approche qui permet d'illustrer la grande diversité des vins rosés et vise à établir les liens existants entre leur composition phénolique et leur couleur en utilisant des outils de chimométrie. Une approche métabolomique ciblée utilisant la chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle (UHPLC-QqQ-MS) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) a été utilisée pour quantifier 125 composés phénoliques dans 268 vins rosés commerciaux issus de la collection « Rosés du monde » constituée par l'Union des Oenologues de France pour le concours "Mondial du Rosé®". En parallèle, les caractéristiques colorimétriques ont été obtenues par spectrophotométrie et calcul des paramètres CieLab.

L'analyse chimométrique des données de composition et de couleur a montré que, bien que l'intensité de la couleur soit principalement déterminée par l'extraction des polyphénols (notamment les anthocyanes et les flavanols) du raisin, les différents styles de couleur correspondent à des compositions pigmentaires différentes. La teinte saumonée des vins rosés clairs est principalement due aux pyranoanthocyanes, qui résultent de la réaction des anthocyanes avec les acides phénoliques et l'acide pyruvique. La couleur rouge des vins de couleur intermédiaire est liée aux anthocyanes et aux carboxypyranoanthocyanes et celle des vins rosés foncés aux produits des réactions des anthocyanes avec les flavanols. La couleur jaune des vins foncés et intermédiaires est associée à des pigments résultants de l'oxydation (ponts éthyles, pyranoanthocyanes).

Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics », parue dans la Revue *Molecules* en 2022.

Article

Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics

Cécile Leborgne^{1,2}, Marine Lambert^{1,3}, Marie-Agnès Ducasse⁴, Emmanuelle Meudec^{1,3}, Arnaud Verbaere^{1,3}, Nicolas Sommerer^{1,3}, Jean-Claude Boulet^{1,3}, Gilles Masson², Jean-Roch Mouret¹ and Véronique Cheynier^{1,3,*}

¹ SPO, INRAE, Univ. Montpellier, Institut Agro, 34060 Montpellier, France; cecile.leborgne@vignevin.com (C.L.); marine.lambert@gmail.com (M.L.); emmanuelle.meudec@inrae.fr (E.M.); arnaud.verbaere@inrae.fr (A.V.); nicolas.sommerer@inrae.fr (N.S.); jean-claude.boulet@inrae.fr (J.-C.B.); jean-roch.mouret@inrae.fr (J.-R.M.)

² Institut Français de la Vigne et du Vin, Centre du Rosé, 83550 Vidauban, France; gilles.masson@vignevin.com

³ INRAE, PROBE Research Infrastructure, Polyphenol Analytical Facility, 34060 Montpellier, France

⁴ Institut Français de la Vigne et du Vin, UMT OENOTYPAGE, Domaine de Pech Rouge, 11430 Gruissan, France; marie-agnes.ducasse@vignevin.com

* Correspondence: veronique.cheynier@inrae.fr

Abstract: The color of rosé wines is extremely diverse and a key element in their marketing. It is due to the presence of anthocyanins and of additional pigments derived from them and from other wine constituents. To explore the pigment composition and determine its links with color, 268 commercial rosé wines were analysed. The concentration of 125 polyphenolic compounds was determined by a targeted metabolomics approach using ultra high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ-MS) analysis in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode and the color characterised by spectrophotometry and CieLab parameters. Chemometrics analysis of the composition and color data showed that although color intensity is primarily determined by polyphenol extraction (especially anthocyanins and flavanols) from the grapes, different color styles correspond to different pigment compositions. The salmon shade of light rosé wines is mostly due to pyranoanthocyanin pigments, resulting from reactions of anthocyanins with phenolic acids and pyruvic acid, a yeast metabolite. Redness of intermediate color wines is related to anthocyanins and carboxypyranoanthocyanins and that of dark rosé wines to products of anthocyanin reactions with flavanols while yellowness of these wines is associated to oxidation.

Keywords: wine; rosé wine; color; polyphenols; anthocyanins; metabolomics; UHPLC; mass spectrometry; Multiple Reaction Monitoring—MRM; chemometrics



Citation: Leborgne, C.; Lambert, M.; Ducasse, M.-A.; Meudec, E.; Verbaere, A.; Sommerer, N.; Boulet, J.-C.; Masson, G.; Mouret, J.-R.; Cheynier, V. Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics. *Molecules* **2022**, *27*, 1359. <https://doi.org/10.3390/molecules27041359>

Academic Editors: Encarna Gómez-Plaza and Rocio Gil-Muñoz

Received: 1 February 2022

Accepted: 15 February 2022

Published: 17 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rosé wine consumption has increased greatly in the last 20 years, reaching over 10% of the global market of still wines [1]. Color is an essential element in the perception of rosé wine quality. As these wines are usually sold in clear glass bottles, it is also a major driver of consumer purchases, although there is no consensus on the ideal color [1]. Rosé wine color varies widely from very pale “sand” or “nacre” to vivid “garnet” nuances, through orange “apricot” or red “raspberry” shades, depending on the grape cultivar and on various factors linked to environment, vine growing practices and wine-making process.

The color of rosé wine, like that of red wines, is due to the presence of anthocyanins extracted from red grape skins and of additional pigments formed from them or through reactions of other must and wine components during wine making and ageing. Genuine anthocyanins are usually described as red flavylium cations but this form is predominant only at very low pH values and anthocyanins are present mostly in their colorless hydrated hemiketal form [2,3] under the pH conditions encountered in wine. Moreover, flavylium cations react with sulfite to form colorless bisulfite adducts [4], a reaction referred to as sulfite bleaching [5]. Both of these reactions are reversible, so the red flavylium cation can

be released from colorless water or sulfite adducts. In particular, the hydration equilibrium can be shifted to the red flavylum forms in the presence of copigments such as flavonols, flavanols and hydroxycinnamic acids [3]. This phenomenon is responsible for 30–50% of the color in young red wines, but may be limited in rosé wines by the low pigment concentration. Other reactions of anthocyanins described in red wines include formation of red flavanol-anthocyanin adducts [6,7] and colorless anthocyanin–flavanol adducts [8], condensation with acetaldehyde yielding purple methylnmethine linked (ethyl-linked) adducts, and reactions with hydroxycinnamic acids or vinylphenols and with carbonyl compounds such as acetaldehyde and pyruvic acid, yielding different groups of orange pyranoanthocyanins [9–11].

Limited data is available on the composition of rosé wines. A study performed on Grenache rosé wines [11] provided quantitative analysis of 28 polyphenols, showing that their proportions were very different from those encountered in red wines made from the same grape variety [12]. In these rosé wines, the major phenolic compounds were hydroxycinnamic acids, while anthocyanins and flavanols were present in lower amounts. Higher color intensity and pinker shade were related to higher concentrations of anthocyanins and phenolic acids and lower pH values [11]. Particular pigment profiles were pointed out, with a lower proportion of coumaroylated derivatives, likely reflecting poor extraction rates of these hydrophobic pigments compared to other anthocyanins, and higher proportions of derived pigments, including several groups of pyranoanthocyanins. This study also provided the first report of anthocyanin–caftaric acid adducts in wines. Detection of these pigments, resulting from nucleophilic addition of anthocyanins onto caftaric acid quinones formed by enzymatic oxidation of caftaric acid [13], may reflect the fact that rosé wine-making technology enables enzymatic oxidation at pressing and/or the high levels of hydroxycinnamic acids in the Grenache variety. More recently, a method based on ULPC-MS/MS analysis in the multiple reaction monitoring mode was developed for quantitative determination of 152 phenolic compounds in rosé wines [14]. Application of this method to twelve rosé wines showed differences in phenolic composition, and especially in the concentrations of hydroxycinnamic acids and of anthocyanins, flavanols, and gallic acid, suggesting an impact of both varietal characteristics and wine-making process (enzymatic oxidation, extraction).

Changes in color [15] and/or phenolic composition [11,16] of rosé wines induced by wine processing and storage have also been described but the relationships between phenolic composition and color are only partly understood. The objective of the present work was to explore the phenolic composition of rosé wines and explain differences in color styles. This was achieved on a large collection of commercial wines reflecting the diversity of rosé wine styles worldwide, using semi-quantitative phenolic composition data obtained by targeted HPLC-MS/MS in the MRM mode, along with classical oenological data (e.g., pH, sulfite concentration), and color intensity, hue values, and $L^*a^*b^*$ CIELAB data determined by spectrophotometry.

2. Results

2.1. Rosé Wine Diversity

Two hundred and sixty-eight commercial rosé wines were selected from the Rosé du Monde collection 2011, so as to obtain a diverse set of color styles and origins. These wines were analyzed by targeted UHPLC-QqQ-MS in the MRM mode targeting phenolic composition. Enological and color data were also collected.

The variable list and codes used and the data presented in this study are provided as Supplementary Materials (Table S1 and Table S2, respectively).

2.1.1. Enological Parameters and Color

Enological data showed large diversity within the Rosé du Monde Collection, with pH values ranging from 2.92 to 3.98, percent alcohol from 9.75 to 18.77, total sulfite content from $18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $237 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and free sulfite content from $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $132 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Wine color analysis also revealed large diversity, with a broad range of color intensities from light ($CI_{min} = 0.15$) to dark ($CI_{max} = 2.07$) and hues from reddish ($H_{min} = 0.63$) to orange ($H_{max} = 2.87$) due to different wine-making techniques or grape varieties (Figure 1). Even if Hue and CI were not correlated, the highest values of Hue were observed for the lowest CI. CI was strongly correlated with both A420 ($R^2 = 0.98$) and A520 ($R^2 = 0.99$) which were also correlated together ($R^2 = 0.94$). Accordingly, L^* values ranged from 57.6 to 97.3, a^* values from -0.88 to 50.9, and b^* values from 5.02 to 31.59. L^* showed strong negative correlation with CI ($R^2 = -0.99$) and a^* ($R^2 = -0.98$), which were positively correlated together ($R^2 = 0.96$). The yellow component b^* was also negatively correlated with L^* ($R^2 = -0.75$) and positively correlated with a^* (0.64) and CI ($R^2 = 0.78$), the latter correlation being mostly driven by A420 ($R^2 = 0.88$).

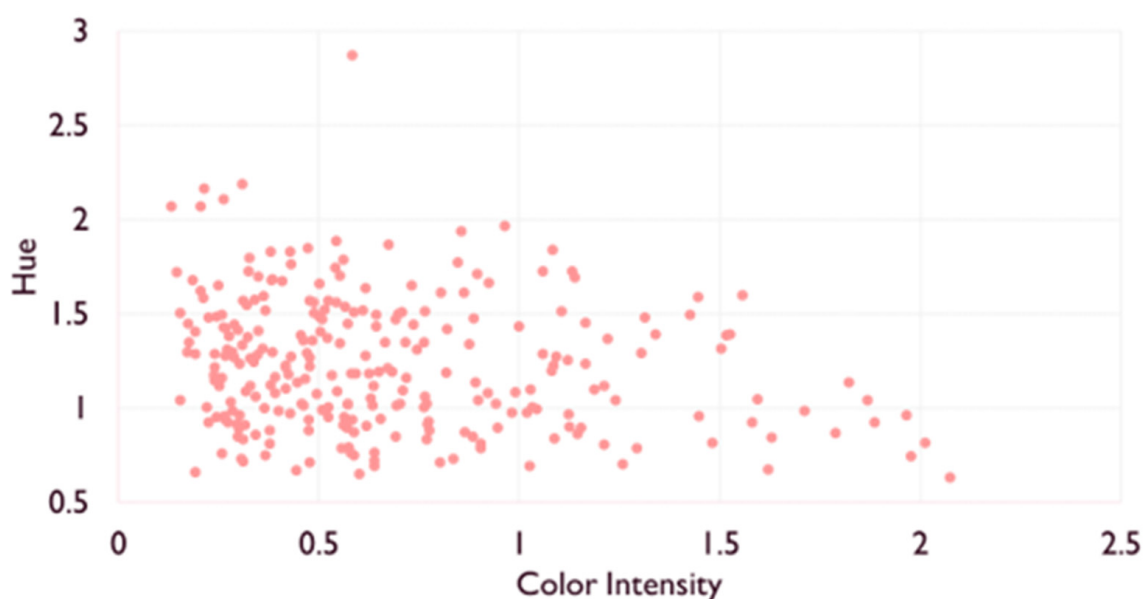


Figure 1. Scatterplot of color intensity and hue values of the 268 wines.

2.1.2. Phenolic Composition

Targeted MS analysis showed large composition differences between the rosé wine samples. The most abundant classes of phenolic compounds in rosé wines were flavanols, hydroxycinnamic acids, benzoic acids, and anthocyanins, aromatic amino acids (tyrosine and tryptophan), alcohols derived from these amino acids (i.e., tyrosol, hydroxytyrosol, and tryptophol), while stilbenes, flavonols, and dihydroflavonols were present in lower amounts but large variations were observed in all families.

Major hydroxycinnamic acid derivatives in the rosé wines were hydroxycinnamoyl tartaric acids, namely caftaric acid ($0.8\text{--}83.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), coutaric acid ($1.1\text{--}36.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and GRP ($0.1\text{--}82.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Rather large amounts of free hydroxycinnamic acids (up to $28.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, for caffeic acid and *p*-coumaric acid, respectively) were detected in some wines, suggesting some hydrolysis.

Flavanols were represented mainly by monomers, i.e., catechin ($0.3\text{--}36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and epicatechin ($0.1\text{--}100.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), along with lower amounts of dimers, and especially B1 (up to $48.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and B2 (up to $11.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and small amounts of trimers. Concentrations of flavanol units measured after phloroglucinolysis ranged between 1 and $258.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Their total concentration exceeded the sum of monomers and oligomers in most samples, indicating the presence of larger oligomers and /or tannin derivatives. Mean degree of polymerisation (mDP) values ranging from 1.2 to 7 were calculated from the phloroglucinolysis data.

Major anthocyanins were malvidin-3-O-glucoside ($0.04\text{--}42.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and malvidin-3-O-acetylglucoside ($0\text{--}20.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), followed by peonidin 3-O-glucoside ($0.04\text{--}11.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and malvidin-3-O-coumaroylglucoside ($0\text{--}8.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Gallic acid was the most abundant

benzoic acid with values ranging from 0.5 to 41.3 mg·L⁻¹. Stilbenes were mostly represented by *cis*- and *trans*-piceid (maximum values at 21.8 and 12.6 mg·L⁻¹, respectively). Major flavonols (0–15 mg·L⁻¹) were quercetin derivatives along with lower amounts of myricetin glycosides while astilbin and taxifolin were the only dihydroflavonols detected.

Anthocyanin derivatives were detected in lower amounts but also showed large variations. The most abundant derived pigments were those formed by reactions involving acetaldehyde, i.e., pyranoanthocyanins (Py) flavanol-methylmethine-anthocyanins (flavanol-ethyl-anthocyanins, FEA), and flavanyl-pyranoanthocyanins (FPy), present in lower amounts. Other important families included carboxypyrananthocyanins (CP, phenylpyrananthocyanins (catechyl-, hydroxyphenyl-, guaiacyl-, and syringyl-pyranoanthocyanins, PP) and flavanol-anthocyanin adducts (F-A). Trace amounts of caftaric-anthocyanin adducts (CAF) and of A-type anthocyanin-flavanol adducts (A-F) were also detected in some wines. The malvidin 3-O-glucoside derivative was the major representative of each group which contained a large series of compounds derived from all major anthocyanins and reflecting their proportions in the wines. Thus, the major derived pigments detected were pyranomalvidin-3-O-glucoside (vitisin B: 0–3.6 mg·L⁻¹), (epi)catechin-ethyl-malvidin-3-O-glucoside (total concentration of the four isomers = 0–2.2 mg·L⁻¹), *p*-hydroxyphenylpyranomalvidin-3-O-glucoside (0–1.8 mg·L⁻¹), catechylpyranomalvidin 3-O-glucoside (pinotin A: 0–0.9 mg·L⁻¹), carboxypyranomalvidin-3-O-glucoside (vitisin A: 0–0.8 mg·L⁻¹), and (epi)catechin-malvidin-3-O-glucoside (0–0.7 mg·L⁻¹).

The correlation network established from the phenolic composition data (Figure 2) showed close correlations within each group, and especially native anthocyanins, pyranoanthocyanins, carboxypyrananthocyanins, phenylpyrananthocyanins, hydroxycinnamic acids, flavonols, flavanols, methylmethine bridged anthocyanin—flavanol adducts, A-F and F-A adducts. Moreover, the concentrations of anthocyanins, flavonols, and flavanols were correlated, reflecting the extent of extraction in the wine-making process. Flavanol-anthocyanin adducts were correlated with anthocyanins and with flavanol dimers and trimers and tannins determined after phloroglucinolysis, which is consistent with their formation pathway involving cleavage of flavanol oligomers and polymers [6,7,17]. A noticeable exception is (epi)catechin-malvidin 3-O-acetylglucoside (FA7), correlated with malvidin 3-acetylglucoside (AC9) and its carboxypyran derivative (CP9) meaning that formation of this pigment is limited by the availability of malvidin 3-O-acetylglucoside. Similarly, correlations between peonidin 3-O-glucoside (AC4) and carboxypyranopeonidin 3-O-glucoside (CP4) and between petunidin 3-glucoside (AC3) and carboxypyranopetunidin 3-O-glucoside (CP3) may be linked to particular grape anthocyanin profiles. Anthocyanin-flavanol adducts were correlated with flavanol monomers, which are their precursors [8]. Pyranoanthocyanins (PY) and carboxypyrananthocyanins (CP) were only weakly correlated with native anthocyanins suggesting that their formation rates are ruled by the amount of acetaldehyde and pyruvic acid, respectively. Ethyl-linked flavanol anthocyanin adducts and flavanyl-pyranoanthocyanins were strongly correlated with pyranoanthocyanins, indicating that their concentration is driven by that of their common precursor, i.e., acetaldehyde. Phenylpyrananthocyanins were not correlated with native anthocyanins but with hydroxycinnamic acids, revealing the limiting role of the hydroxycinnamic acids in their formation. Other strong correlations were observed between dihydroflavonols (astilbin and taxifolin), between stilbenes (*cis*- and *trans*-resveratrol, *cis*- and *trans*-piceid), between hydroxycinnamoyltartarates (caftaric and coutaric acid), indicating that all members of each group are similarly impacted by grape variety, vine growing conditions, and wine making process, and between each phenolic acid ethyl ester and its phenolic acid precursor.

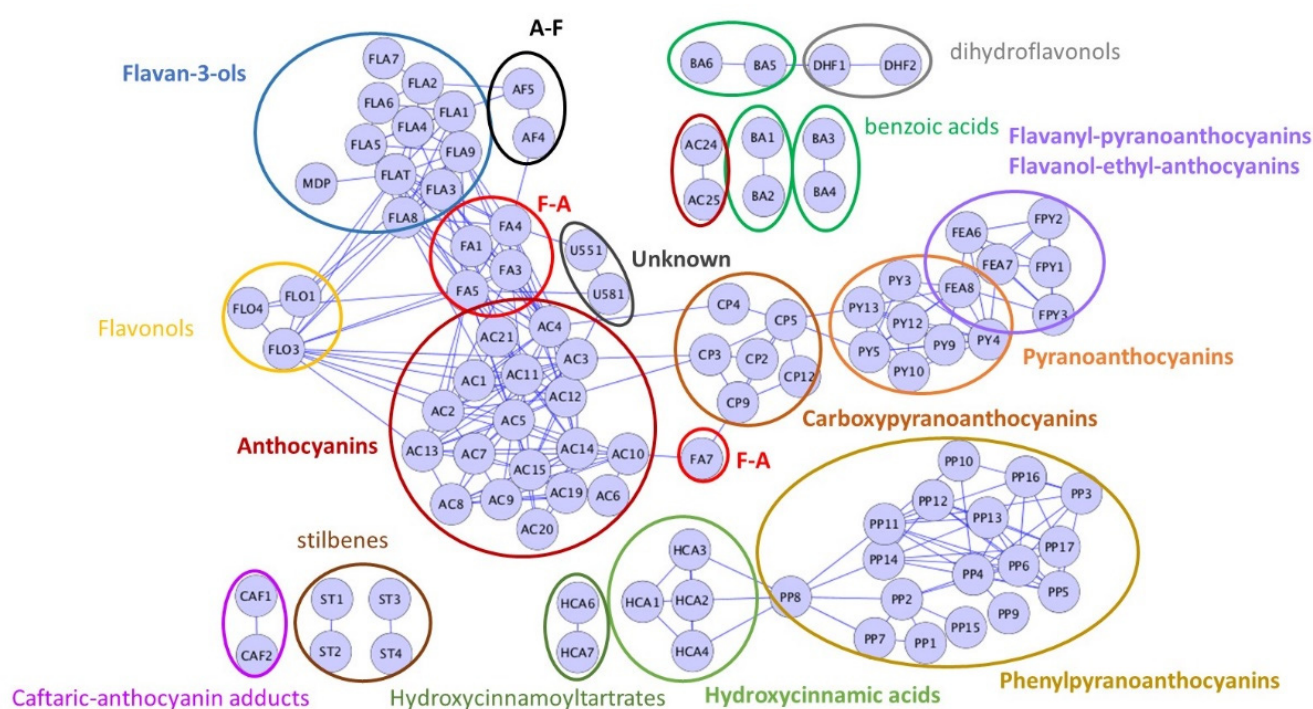


Figure 2. Correlation network (correlation values > 0.6) established from the polyphenol composition variables (coded as in Table S1) of the 268 wines.

2.2. Links between Color and Phenolic Composition

2.2.1. Multivariate Analysis of the $L^*a^*b^*$, Enological Analysis, and Phenolic Composition Data

Principal component analysis (PCA) was performed on the centered MRM, oenological analysis, and $L^*a^*b^*$ data. Projection of the wines on the first two principal components showed large distribution along the first axis accounting for 48% of the variance (Figure 3). Loadings associated to the first PC are shown in Figure 3B. Color parameters a^* and b^* were associated positively and L^* associated negatively with PC1, indicating that this axis was related to color. Most other variables were associated positively with PC1, with highest loadings corresponding to flavanols (monomers, dimers, trimers, total units and mDP determined by phloroglucinolysis), flavanol-anthocyanin adducts, flavonols, and anthocyanins, indicating that higher a^* and b^* values are related to higher flavonoid contents.

Loadings associated to the second PC, representing 15% of the variance, are shown in Figure 3C. This axis is positively associated mostly with the levels of combined and free SO_2 and L^* values and negatively with oxidized glutathione, acetaldehyde reaction products (flavanil-pyranoanthocyanins, flavanol-ethyl-anthocyanin adducts, pyranoanthocyanins), GRP, a^* , and b^* .

2.2.2. Composition of the Light, Intermediate, and Dark Wine Groups

In order to determine whether the links between color and composition are the same for light and dark rosé wines, three groups of wine were established based on their color intensities: light group ($IC < 0.5$); intermediate group ($0.5 < IC < 1$); dark group ($IC > 1$). Moreover, as all compounds of a given phenolic group share common color characteristics and the high correlations between them (Figure 2) reflect common origins (grape composition, formation process), they were considered together for further analyzing the relationships between composition and color.

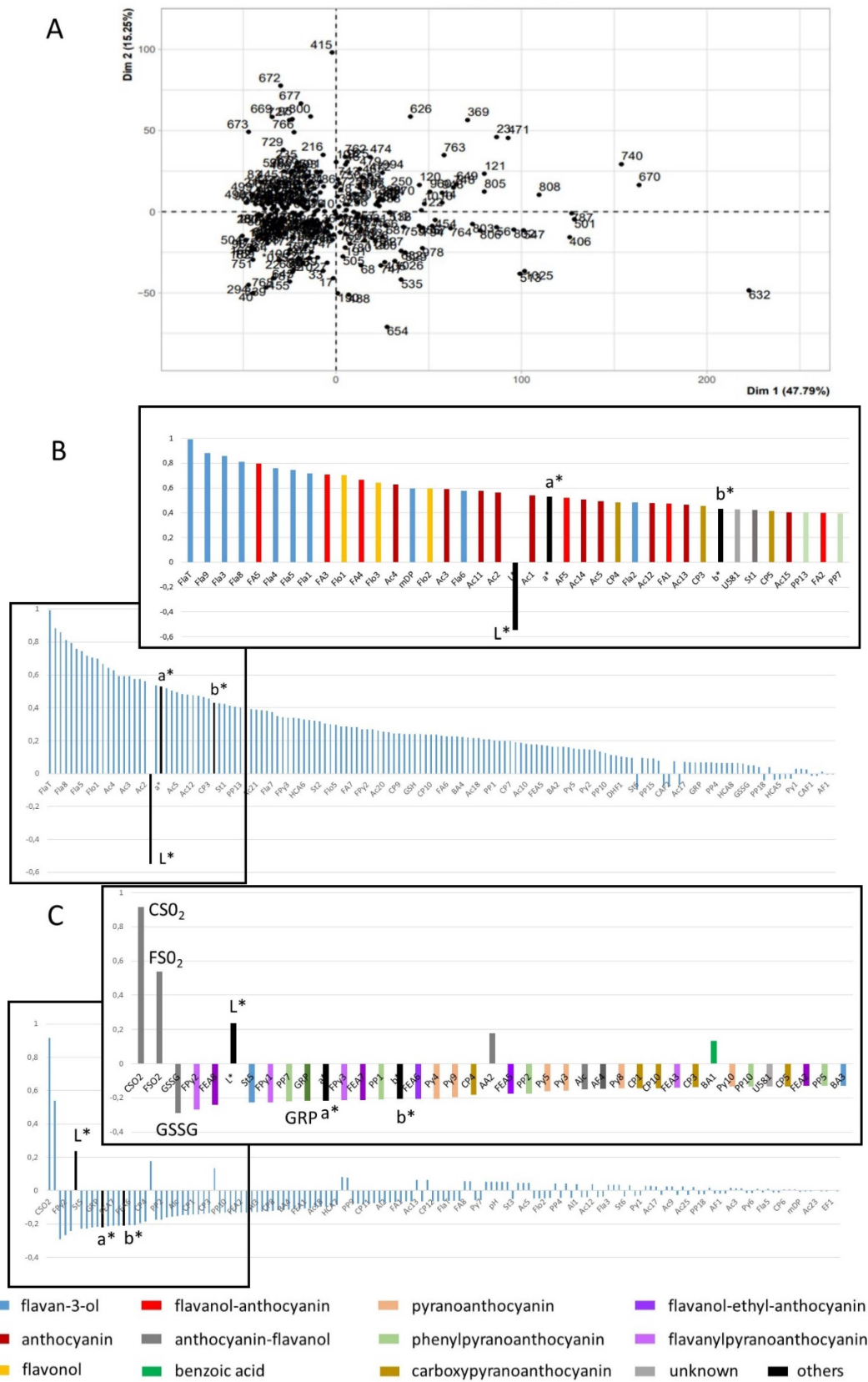


Figure 3. Principal component analysis of phenolic composition, enological analysis, and L*a*b* data: (A) Projection of the wines on the first two principal components; (B) loadings of variables on PC1; (C) loadings of variables on PC2; for (B,C), all variables in decreasing loading order and zoom presenting the first 30 variables. Variable codes provided in Table S1.

Variance analysis confirmed that the three groups (Table 1) were significantly different for all measured color parameters, with CI, a*, and b* increasing, and Hue and L* decreasing from the light to dark wines. Examination of the phenolic composition of each group showed significant increases in the concentrations of anthocyanins, hydroxybenzoic acids, stilbenes, flavonols, and total flavanol units measured after phloroglucinolysis from the light to the dark group, confirming that color is primarily related to polyphenol extraction from skins. The concentrations of flavanol monomers, dimers, and trimers were significantly lower in the light group than in the other two. No significant difference was observed in the levels of hydroxycinnamic acids and hydroxycinnamoyltartrates which are more affected by the grape variety and the extent of oxidation at must stage than by maceration.

Table 1. Comparison of the phenolic composition, enological analysis, spectrophotometry and color data of the 3 color groups.

Variable	Light	Intermediate	Dark
Phenolic Compounds (mg·L ⁻¹)	Mean ± SD (n = 114)	Mean ± SD (n = 101)	Mean ± SD (n = 53)
Benzoic acids and ethyl esters (BA 1–6)	6.2 ± 6.0 ^a	9.9 ± 7.1 ^b	13.2 ± 7.5 ^c
Hydroxycinnamic acids and ethyl esters (HCA 1–5)	3.6 ± 2.8 ^a	4.2 ± 5.5 ^a	3.9 ± 3.6 ^a
Hydroxycinnamoyl tartaric acids (HCA 6–8)	53.4 ± 27.2 ^a	47.3 ± 21.0 ^a	50.0 ± 26.3 ^a
2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid (GRP)	19.8 ± 12.5 ^a	16.8 ± 10.7 ^a	24.6 ± 18.6 ^b
Stilbenoids (St 1–6)	3.2 ± 2.4 ^a	4.6 ± 3.4 ^b	5.9 ± 6.4 ^c
Flavonols (Flo 1–5)	0.7 ± 1.5 ^a	1.4 ± 1.7 ^b	2.1 ± 1.6 ^c
Dihydroflavonols (DHF 1–2)	0.9 ± 0.8 ^a	1.6 ± 1.8 ^b	0.9 ± 0.7 ^a
Flavanols monomers and oligomers (Fla 1–9)	19.2 ± 19.6 ^a	32.3 ± 26.7 ^b	33.6 ± 22.7 ^b
Total flavanol units after phloroglucinolysis (FlaT)	25.3 ± 27.6 ^a	45.3 ± 31.8 ^b	73.5 ± 45.5 ^c
Mean degree of polymerisation (mDP)	2.4 ± 0.6 ^a	2.7 ± 0.9 ^a	3.5 ± 1.3 ^b
Anthocyanins (Ac 1–25)	10.6 ± 6.2 ^a	19.2 ± 12.7 ^b	32.2 ± 19.1 ^c
Pyrananthocyanins (Py 1–13)	0.02 ± 0.05 ^a	0.17 ± 0.30 ^b	0.82 ± 0.95 ^c
Carboxypyrananthocyanins (CP 1–12)	0.05 ± 0.04 ^a	0.17 ± 0.15 ^b	0.39 ± 0.25 ^c
Flavanol-anthocyanin adducts (FA 1–8)	0.05 ± 0.07 ^a	0.13 ± 0.11 ^b	0.30 ± 0.26 ^c
Anthocyanin-flavanol adducts (A-type) (AF 1–5)	0.001 ± 0.005 ^a	0.005 ± 0.011 ^b	0.010 ± 0.015 ^c
Caftaric-anthocyanin adducts (CAF 1–2)	0.02 ± 0.04 ^a	0.03 ± 0.04 ^a	0.02 ± 0.03 ^a
Ethyl-flavanol dimers (EF 1–2)	0.001 ± 0.003 ^a	0.006 ± 0.024 ^{ab}	0.008 ± 0.011 ^b
Flavanol-ethyl-anthocyanins (FEA 1–8)	0.003 ± 0.023 ^a	0.064 ± 0.319 ^a	0.205 ± 0.351 ^b
Phenylpyrananthocyanins (PP 1–18)	0.35 ± 0.41 ^a	0.53 ± 0.48 ^b	0.68 ± 0.59 ^c
Flavanyl-pyrananthocyanins (FPy 1–3)	0.002 ± 0.007 ^a	0.010 ± 0.037 ^{ab}	0.016 ± 0.044 ^b
Unknown 551 & 581 (U 551 & 581)	0.016 ± 0.020 ^a	0.038 ± 0.037 ^b	0.092 ± 0.066 ^c
Alcohols (Al 1–3)	13.6 ± 6.3 ^a	11.5 ± 6.1 ^a	15.8 ± 9.3 ^b
Amino acids (AA 1–2)	7.9 ± 3.5 ^a	8.6 ± 4.1 ^a	6.4 ± 3.3 ^b
Glutathione (GSH)	0.06 ± 0.05 ^a	0.06 ± 0.07 ^a	0.09 ± 0.09 ^b
Oxidized glutathione (GSSG)	0.06 ± 0.13 ^a	0.18 ± 0.55 ^a	0.91 ± 3.21 ^b

Table 1. Cont.

Variable	Light	Intermediate	Dark
Phenolic Compounds (mg·L ⁻¹)	Mean ± SD (n = 114)	Mean ± SD (n = 101)	Mean ± SD (n = 53)
Enological analysis			
pH	3.4 ± 0.1 ^a	3.4 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.2 ^a
Free sulfites content (FSO ₂)	25 ± 20 ^a	21 ± 13 ^a	16 ± 9 ^b
Combined sulfites content (CSO ₂)	75 ± 21 ^a	78 ± 23 ^a	74 ± 23 ^a
% alcohol (ALC)	12.7 ± 0.9 ^a	12.7 ± 1.2 ^a	13.1 ± 0.8 ^b
Color analysis			
L*	93.2 ± 2.2 ^a	84.6 ± 3.5 ^b	70.6 ± 5.5 ^c
a*	7.0 ± 3.2 ^a	17.3 ± 5.71 ^b	34.7 ± 7.6 ^c
b*	10.30 ± 2.68 ^a	15.62 ± 3.32 ^b	20.0 ± 4.2 ^c
Color intensity (CI)	0.33 ± 0.10 ^a	0.69 ± 0.14 ^b	1.36 ± 0.31 ^c
Hue (H)	1.50 ± 0.47 ^a	1.16 ± 0.26 ^b	0.88 ± 0.16 ^c

Different superscript letters indicate significant differences between color groups for a given parameter (ANoVA with SNK test for $p < 0.05$).

The concentrations of most derived pigments, except caftaric anthocyanin adducts, formed by enzymatic oxidation [13], also showed significant increase from the light to the dark group. A few variables showed significantly higher values in dark wines compared to the other two groups, namely ethyl-linked flavanol dimers (EF) and flavanol anthocyanin adducts (FEA), flavanopyranoanthocyanins (FPy), and glutathione especially under its oxidized form. This might be related to higher oxidation rate, in agreement with the significantly lower free SO₂ content of these wines.

2.2.3. Links between Color and Phenolic Composition for Light, Dark and Intermediate Wines

In order to visualize the links between phenolic composition and the different color styles, PCAs were performed on the standardized MRM, enological analysis and L*a*b* data, separately for each group.

Projection of the variables on the first two principal components are shown for each group (Figure 4), evidencing major differences in the links of color with composition between the groups.

For group 1 (light wines), PC1 is associated positively with a* and b*, and negatively with L* and is thus a color intensity axis. Other variables positively associated to PC1 include anthocyanin derivatives, namely carboxypyrananthocyanins and phenylpyrananthocyanins and caftaric-anthocyanin adducts, but also unknown anthocyanin derivatives and colorless dihydroflavonols and benzoic acids. Variables reflecting the extent of extraction, such as anthocyanins, flavanols, tannin-anthocyanin and anthocyanin-tannin adducts, flavonols and stilbenes, positively contribute to both PC1 and PC2 while hydroxycinnamoyltartrates, reduced glutathione, GRP, and flavanol mDP contribute positively to PC2 and, to a lesser extent, negatively to PC1. PC2 is also negatively associated to pyrananthocyanins, flavanol-ethyl-anthocyanin adducts and oxidized glutathione, suggesting that it is associated to oxidation.

For group 3 (dark wines), PC1 is associated negatively to L* and positively to a* while b* contributes positively to PC2. Most phenolic variables and especially anthocyanins, flavanols, hydroxycinnamic acids and all anthocyanin derivatives are also positively associated with PC1, and thus red color, except for Py, FE and FPy. These molecules, that result from reactions involving acetaldehyde, are associated positively with PC2 which is also negatively associated with sulfite concentrations and can be interpreted as an oxidation axis.

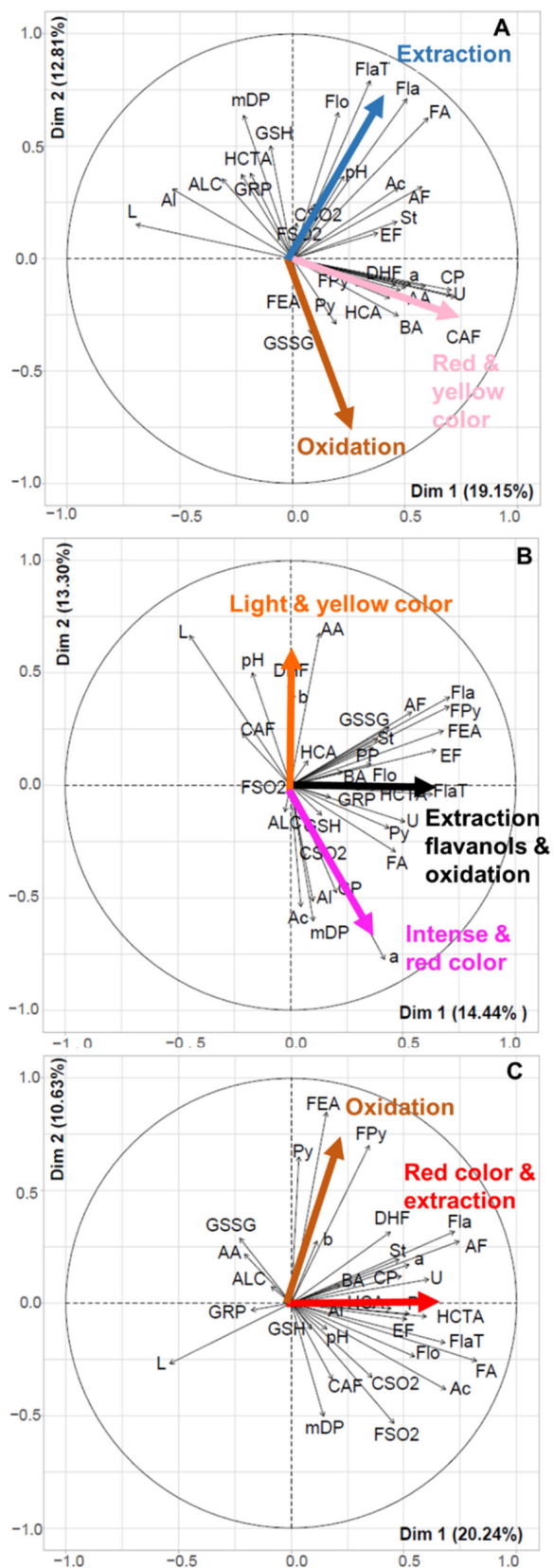


Figure 4. Principal component analysis of phenolic composition, enological analysis, and L*a*b* data performed on group 1 (A), group 2 (B) and group 3 (C); correlation circles of variables (codes provided in Table S1) on PC1 and PC2.

In the intermediate group, PC1, positively associated with flavanols, flavanol-anthocyanin adducts, and oxidation markers such as pyranoanthocyanins, ethyl-linked flavanols, and flavanol-ethyl-anthocyanins, reflects both extraction and oxidation. PC2, contrasting a^* with L^* and b^* , is a red color axis, lighter wines in this group being also more orange. The red color is associated with higher concentrations of anthocyanins, carboxypyrananthocyanins, and alcohols derived from tyrosine and tryptophan and with flavanol mDP while lighter and more yellow wines show higher values of pH, and higher concentrations of aromatic amino acids, dihydroflavonols, flavanol monomers and oligomers, anthocyanin-flavanol adducts, flavanylpyranoanthocyanins and oxidized glutathione.

3. Discussion

3.1. Rosé Wine(s) Versus Red Wine

The rosé wine collection exhibited large color differences from almost white to light red, covering the entire range of shades described in the Color Chart from the Centre du Rose® (Centre Du Rosé.fr, available online: <https://centredurose.fr/nuanciers-vins-roses>, accessed 30 January 2022). It should be emphasized that there is no definition of rosé wine based on color and examination of color values reported in the literature for red and rosé wines show large variations and overlapping (e.g., L^* : 28–70, a^* : 28–52, b^* : 8–36 in reds [18]; L^* : 38–45; a^* : 48–52; b^* : 24–28 in rosés [15]). However, much lighter colors have been reported in other studies (L^* : 79–86, a^* : 17–25, b^* : 8–9 [16]; L^* : 92–95, a^* : 2–5, b^* : 7–11 [11]) and the light “salmon” shade, which is characteristic of Provence wines, is generally the leader on the global market although consumer preferences may vary between regions [1]. The maximum color intensity value was at 2.2 and thus much lower than those reported in reds (e.g., 11–23 [19], 6–7 [20]).

MS analysis targeting phenolic compounds also showed large composition differences. Hydroxycinnamoyltartaric acids, flavanols, and anthocyanins were the most abundant compounds detected, as shown earlier [11,14]. However, their proportions varied greatly within the collection and were significantly different in the three wine color groups (Figure 5).

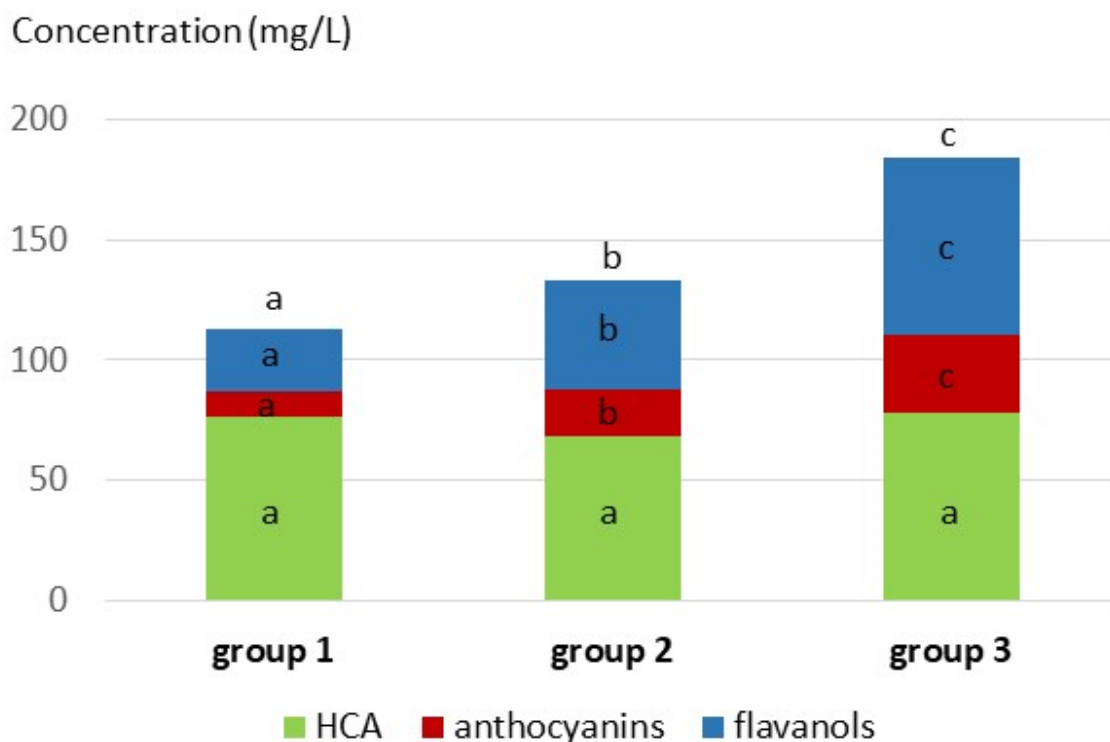


Figure 5. Distribution of the major families of grape phenolic compounds (i.e., anthocyanins, flavanols and hydroxycinnamic acids) in the three color groups. Different superscript letters indicate significant differences between color groups for a given parameter (ANoVA with SNK test for $p < 0.05$).

Hydroxycinnamoyltartaric acids (i.e., caftaric and coutaric acids) which are abundant in the grape berry flesh and thus easily released into the must were the predominant phenolic compounds in the light rosé wines, as classically observed in white wines [21,22]. The concentrations of hydroxycinnamic acids, of GRP, and of caftaric-anthocyanin adducts showed large variations but were similar in the three color groups. Indeed, these variables depend on the grape composition in hydroxycinnamic acids and glutathione which are varietal characteristics [23] and on the extent of enzymatic oxidation during must preparation [24] but are little affected by maceration and extraction.

The concentrations of phenolic compounds localized in skins, such as anthocyanins, flavonols, flavanols and stilbenes, were lower than those generally reported in red wines and significantly increased from light to dark wines, primarily reflecting the extent of extraction from the grape berry skins although this can also be modulated by adsorption on yeast or fining treatments. For example, the low levels of coumaroylated anthocyanins ($0 - 11.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) in the rosé wines are related to their low extraction rate pointed out in earlier studies [11] and recently confirmed in extraction experiments [25] but they can also result from their selective adsorption on fining agents used in rosé wine-making such as PVPP [16]. The correlation network presented in Figure 2 showed strong correlations within each group of phenolic compounds, meaning that the concentrations of all compounds of a given group are affected in the same way during the vine-growing and wine-making process. Correlations between anthocyanin, flavanol, and flavonol concentrations also indicate that extraction and possibly fining have similar impacts on these three groups. Additional correlations of derived pigments with anthocyanins and /or flavanols are related to their formation process and in a few cases, to specific anthocyanin profiles likely related to the wine variety, as explained in Section 2.1.2. In particular, formation of acetaldehyde reaction products, carboxypyrananthocyanins and phenylpyrananthocyanins depend on the concentrations of acetaldehyde, pyruvic acid, and hydroxycinnamates, respectively rather than on that of anthocyanins. The impact of yeast strain and fermentation conditions on the production of yeast metabolites such as acetaldehyde and pyruvic acid, sulfite consumption or production, and enzymatic activities, including cinnamate decarboxylase activity, and subsequently on phenolic and especially pigment composition is well documented [20,26]. In addition, interplay between sulfite and acetaldehyde metabolism during alcoholic fermentation has been recently demonstrated [27]. However, the impact of yeast metabolism and of chemical oxidation after fermentation on formation of acetaldehyde and pyruvic acid cannot be distinguished.

Other colorless compounds are also involved in wine discrimination along PC1 and PC2. In particular, tryptophol, hydroxytyrosol, and tyrosol are opposite to tryptophan and tyrosine, reflecting conversion of the aromatic amino acids to alcohols by yeast metabolism [28]. Aromatic alcohols are associated with lower color intensity and lower oxidation in groups 1 and 3, which may be related to the fact that fermentation forms more tyrosol and hydroxytyrosol without oxygen than with oxygen [29]. However, this was not observed in group 2, suggesting that parameters related to yeast or other microorganisms may be prevalent.

3.2. Pigment Composition and Color

After this general description, rosé wines were separated into three color intensity groups: light, intermediate and dark. The colors of the three wine groups are related to very different pigment composition both quantitatively and qualitatively.

The concentrations of flavanol-anthocyanin, anthocyanin-flavanol, ethyl-flavanols, anthocyanin-ethyl-flavanols, and flavanypyranoanthocyanins adducts increased with color and were significantly higher in the dark wine group. The concentrations measured for these compounds are rather low compared to those of genuine flavanols and anthocyanins. However, the lower molecular weight (dimeric) compounds assayed in this study represent groups of related compounds formed by the same reaction and showing longer flavanol

chains that are not quantified by the MRM method but contribute to the total units measured by phloroglucinolysis [17,30,31].

The concentrations of pyranoanthocyanins, carboxypyrananthocyanins, and phenylpyrananthocyanins also increased significantly from the light to the dark wine group. The increase was much higher for pyranoanthocyanins and carboxypyrananthocyanins, derived respectively from acetaldehyde and pyruvic acid, than for phenylpyrananthocyanins, derived from hydroxycinnamates and correlated with them. Consequently, phenylpyrananthocyanins were the major pyrananthocyanins in wines from the light and intermediate groups whereas pyrananthocyanins were predominant in the darker wines (Figure 6).

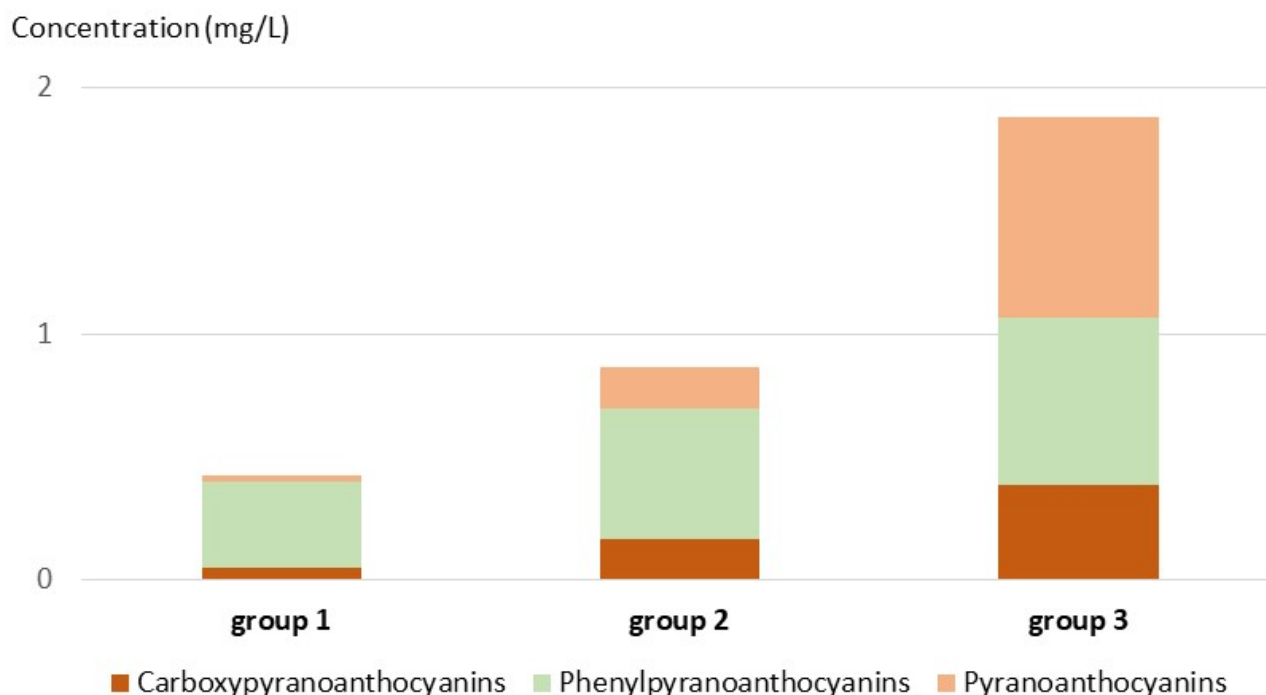


Figure 6. Distribution of pyranoanthocyanin, carboxypyrananthocyanins and phenylpyrananthocyanins in the three color groups.

In light rosé wines, carboxypyrananthocyanins and phenylpyrananthocyanins are major contributors to the first PC, positively associated to both the red and yellow color components, along with anthocyanins and flavanol-anthocyanin dimer adducts. The first two groups of molecules show a salmon shade compared to the pink color of diluted anthocyanin solutions and have a high extinction coefficient in the visible range, compared to anthocyanins [32]. Moreover, they are resistant to sulfite bleaching [33] and hydration [10,32] reactions and thus remain under their pigmented flavylium form regardless of the pH value or the presence of sulfites whereas genuine anthocyanins and FA adducts [7] are mostly colorless in wine. This may explain their large contribution to the salmon color of the pale rosé wines, in spite of their rather low concentrations.

PCAs performed on the darker rosé wines (groups 2 and 3) show a color axis related to the red color component, contrasting L^* and a^* . In group 3, the red color axis (PC1) is related to anthocyanins and all derived pigments except those resulting from reactions with acetaldehyde which are associated with the yellow component on PC2, suggesting a role of oxidation in the development of browning as discussed below. Moreover, the poor representation of b^* suggests that yellow hues are largely due to compounds that are not quantified by the MRM method. In group 2, the red color axis (PC2) contrasts a^* with both L^* and b^* , meaning that the lightest wines in this group are also the most orange. Redness is associated with anthocyanins and carboxypyrananthocyanins while lighter and more orange color is associated with higher pH values, shifting anthocyanin equilibria from red

flavylium cations to colorless forms and possibly promoting oxidation. Identification of the unknown anthocyanin derivatives determined by the targeted MRM method used and of other molecules which are not analyzed by this method, is needed to characterize the yellow pigments.

3.3. Drivers of Rosé Wine Color

3.3.1. Extraction

When considering the entire wine collection, color appears related mostly to the extent of extraction, reflected by the concentrations of flavanols and especially FlaT, anthocyanins, derived tannins and pigments, flavonols, dihydroflavonol, and stilbenes. Flavanol mDP determined by phloroglucinolysis also increases with tannin concentration, consistent with the fact that lower molecular weight flavanols are more readily extracted.

PCAs performed for each group suggest different links between extraction and color. The color of light rosé wines depends primarily on pyranoanthocyanins and is little impacted by extraction which is quite limited in these wines. In contrast, the color of dark rosé wines is determined primarily by the extent of extraction, the darkest wines of group 3 showing higher levels of all phenolic compounds and compositions closer to those of red wines.

In group 1 (light wines), mDP values contribute positively to PC2 and are thus associated with higher levels of flavanols and lower oxidation, like in the entire collection. This is not so clear in the darker wines, possibly indicating higher proportions of flavanol units arising from derived tannins in these wines. Indeed, it is well established that conversion of tannins to derived tannins through oxidation, formation of flavanol-anthocyanin adducts or condensation with acetaldehyde leads to over- or under-estimation of mDP values as some of the new bonds are resistant to phloroglucinolysis and the resulting derived units are not taken into account in the calculations [34].

3.3.2. Oxidation

Oxidation appears like another important factor affecting rosé wine color. Indeed, the second axis of the PCA performed on the whole wine collection contrasts the concentration of sulfites and L* values with those of compounds resulting from reactions of anthocyanins and flavanols with acetaldehyde and oxidized glutathione, and a* and b* values and is thus associated to oxidation, enhancing color.

Higher level of pyranoanthocyanins and of other molecules arising from reactions of phenolic compounds with acetaldehyde (i.e., ethyl-flavanols, anthocyanin-ethyl-flavanols, and flavanylpyranoanthocyanins) in dark wines reflect a higher extent of oxidation in these wines, as also indicated by other variables such as the increased concentration of oxidized glutathione and lower concentration of free SO₂. Indeed, oxidation of red [12,35] and rosé [11] wines has been reported to result first in consumption of SO₂, followed by release of flavylium ions from anthocyanin bisulfite adducts and thus enhancement of the red color. Consumption of sulfite can result from their reaction with quinones generated by chemical oxidation of o-diphenols in the presence of metal ion catalysts [36] or with flavanols [37] and indoles [38]. Moreover, it can involve sulfite combination with carbonyl compounds such as acetaldehyde [11] and pyruvic acid [39] that are produced as fermentation byproducts but also by chemical oxidation of ethanol and malic acid, respectively [40].

Acetaldehyde is released from its sulfonates as SO₂ is consumed and accumulates in wines submitted to oxidation once SO₂ is depleted [35,41]. Accordingly, increased levels of acetaldehyde reaction products, including pyranoanthocyanins, flavanylpyranoanthocyanins, and ethyl-linked compounds, have been reported in wines submitted to microoxidation [31]. The last two groups of compounds also included larger oligomers which are not analyzed by the MRM method used in the present study but may contribute flavanol units after phloroglucinolysis and bias mDP calculation as explained above.

The PCAs performed on each color group confirm an impact of oxidation but suggest that different compounds and mechanisms may be involved.

In the light rosé wines, the oxidation axis (PC2) contrasts the concentrations of flavanols, flavanol-anthocyanin adducts and flavonols, flavanol mDP and, to a lesser extent, the contents of hydroxycinnamoyltartrates, glutathione, and GRP, with those of oxidized glutathione and acetaldehyde derivatives, namely pyranoanthocyanins and flavanol-ethyl-anthocyanins. Hydroxycinnamoyltartrates are known to be the major substrates of enzymatic oxidation taking place in the musts before fermentation. Their oxidation generates o-quinones which can react with glutathione to form GRP [42] or, after glutathione depletion, oxidize other o-diphenols, including GRP [43] and flavanols [44–46]. Enzymatic oxidation taking place before fermentation results in lower levels of all these compounds and intense browning of the must. However, the brown products formed at this stage are removed by racking and filtration steps so that they have limited impact on the final wine color [47]. Browning susceptibility of white wines has been related to their flavanol content [47,48] and several reaction mechanisms involving flavanols and resulting in browning have been described. In particular, oxidation of catechin yields yellow pigments called dehydrodiccatechins A [49] and oligomers resulting from condensation with aldehydes such as glyoxylic acid [50], furfural [51] or acetaldehyde [52] proceed to intensely yellow xanthylium salts. Thus, high values of b^* may be related to the presence of both orange pyranoanthocyanins and of flavanol oxidation products which are not analyzed in the targeted MRM method used but are expected to increase with both extraction and oxidation.

In the dark rosé wines, oxidation (PC2) is associated with the concentrations of FEA, Fpy, and Py and negatively with the levels of free and combined SO_2 , confirming the relevance of acetaldehyde and its reaction products as wine oxidation markers [31,53]. The yellow color component b^* is also positively associated to PC2, again suggesting a role of oxidation in the development of browning.

Dihydroflavonols are not associated with extraction like other flavonoids, except in group 3, meaning that their concentration is driven by different mechanisms. In contrast, they are associated with b^* in light and intermediate wines, suggesting that they may participate in oxidative browning, owing to their o-diphenolic B-ring.

4. Materials and Methods

4.1. Chemicals

Formic acid and HPLC grade methanol were purchased from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Deionized water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France). Standard of trans-piceid was purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA). Standards of caffeic acid, vanillic acid, gallic acid and ferulic acid were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Standards of syringic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid, ethyl protocatechuate, tyrosol, tryptophol, tryptophan, trans-resveratrol, quercetin, catechin, epicatechin, epicatechin 3-gallate, taxifolin, oxidized and reduced glutathione were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), as well as hydrochloric acid, phloroglucinol, L-ascorbic acid, and ammonium formate. Standards of ethyl gallate, ethyl caffeate, tyrosine, hydroxytyrosol, epigallocatechin, malvidin 3-O-glucoside chloride, and malvidin 3,5-diglucoside chloride were purchased from Extrasynthese (Geney, France). Standards of trans-caftaric acid, quercetin glucoside and procyanidin dimers B1, B2, B3, B4, and trimer C1 were purchased from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany).

4.2. Samples and Sampling

A set of 268 commercial rosé wines selected from the Rosé du Monde Collection of 2011 was provided by the Centre du Rosé (IFV, Vidauban, France). All of them have been sampled at the “Mondial du Rosé[®]” Contest organized in 2011 by Union de Oenologues de France, among a collection of 869 commercial rosé wines, selected so as to ensure good representation of all producing countries and regions. The wines were from 21 different countries and covered a wide range of colors. All analyses were performed in spring 2012.

Samples (250 mL) were taken immediately after opening the bottles, filtered through 0.45 μm filters (Hydrophobic Durapore, Millipore) under vacuum and degassed during

5 min under stirring. This filtered and degassed wine was then dispatched in different volume aliquots for analysis. A volume of 125 mL was inerted (N_2) and stored at 4 °C until color and enological analyses (pH, alcoholic degree, free and total sulfites content), that were performed on the same day. A 1 mL sample was filtered on a 0.2 μ m regenerated cellulose membrane filter (Phenex, Phenomenex, Le Pecq, France) and directly injected in triplicate using Ultra High Performance Liquid Chromatography, coupled to triple-quadrupole Mass Spectrometry (UHPLC-QqQ-MS) in the Multiple Reaction Monitored (MRM) mode for determination of polyphenol composition. Six aliquots of 2 mL were taken to dryness under reduced pressure using Genevac (SP Scientific, Warminster, PA, USA) to perform phloroglucinolysis and stored at -80 °C until analysis.

4.3. Enological Analysis

Oenology parameters, namely pH, total sulfite content and free sulfite content were determined by traditional methods (Method OIV-MA-AS323-04B, OIV-MA-AS313-01). Combined sulfite content was calculated by subtracting free sulfite content from total sulfite content. Percent alcohol was determined by NIR selective absorption method using an AlcoLyzer (Anton Paar, Les Ulis, France).

4.4. Color Analysis

The absorbance measurements were performed with an Evolution 300 UV–visible spectrophotometer (ThermoFisher, Dardilly, France) directly on the wine, using a 10 mm optical path cell. The method is described in the Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis by the International Organisation of Vine and Wine (OIV-MA-AS2-07B). The color intensity (CI) is defined as the sum of absorbance values at 620, 520 and 420 nm corresponding respectively to blue, red and yellow wavelengths [54]. The hue value (H) is the ratio between absorbance at 420 and 520 nm.

In order to describe the color perceived by the observer, trichromatic components defined by the Commission Internationale de l'Éclairage were used ($CieL^*a^*b^*$, 1976). The calculation method of the different chromatic parameters, namely, lightness L^* , a^* expressing the red/green component and b^* expressing the yellow/blue component, is defined by OIV (OIV-MA-AS2-11).

4.5. Analysis of Phenolic Composition

Polyphenol composition was determined by UHPLC-MS/MS in the MRM mode, using an Acquity UHPLC system coupled to a triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) with an electrospray ionization (ESI) source operated in both positive and negative modes. MassLynx software (Waters, Milford, MA, USA) was used to control the instruments and to acquire the data. Then, data were processed using TargetLynx software (Waters, Milford, MA, USA).

The method described by Lambert et al. [14] was applied to detect and quantify 135 phenolics, including 99 anthocyanins and derivatives (native anthocyanins, anthocyanin dimers, pyranoanthocyanins, carboxypyrananthocyanins, phenylpyrananthocyanins (i.e., catechyl, hydroxyphenyl, and guaiacylpyrananthocyanins), flavanyl-pyranoanthocyanins, flavanol-anthocyanin (F–A) and anthocyanin-flavanol (A-F) dimer adducts and methylmethine-linked anthocyanin flavanol adducts (F-ethyl-A dimers); 15 phenolic acids (hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids and their methyl esters), six stilbenes, five flavonols, two dihydroflavonols, nine flavanol monomers, dimers and trimers and two F-ethyl-F dimers. Other compounds were quantified in the method such as amino acids (tyrosine and tryptophan) and the corresponding alcohols (tyrosol, hydroxytyrosol, tryptophol), reduced and oxidized glutathione and GRP (Grape reaction product, i.e., 2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid). Standard and sample preparations, UHPLC-MS/MS conditions, MRM parameters and calibration ranges were the same as in the method validated by Lambert et al. [14]. The variable list and codes used are presented in Table S1.

Constitutive units of flavanol derivatives released after acid-catalyzed depolymerization in the presence of phloroglucinol [55] were analysed by UHPLC-QqQ-MS in the MRM mode as described by Pinasseau et al. [56]. The phloroglucinolysis reaction was performed in triplicate on the solid obtained after evaporation of 2 mL of wine, using either 2 mL or 3 mL of a phloroglucinol (50 g/L) and ascorbic acid (10 g/L) solution in MeOH/HCl 0.2 M. The reaction was carried out for 20 min at 50 °C and stopped by placing the sample in ice and adding an identical volume of ammonium formate buffer at 200 mM [55]. The solution obtained was centrifuged (HettichLab Technology, Tuttlingen, Germany) (15,000 rpm, 10 min, 4 °C). The supernatant was filtered through a 0.2 µm RC Membrane filter (Phenomenex, Le Pecq, France) before injection into the HPLC-QqQ-MS system. This method allows the detection and quantification of epigallocatechin, catechin, epicatechin, epicatechin-3-O-gallate (terminal units) and of their phloroglucinol adducts (extension units). Total flavanol units released by phloroglucinolysis (FlaT) were calculated and average degree of polymerisation (mDP) was evaluated as the molar ratio of the sum of all flavanol units to the sum of terminal units.

4.6. Chemometrics

Principal Component Analysis and ANalysis Of VAriance with a Student-Newman-Keuls post-hoc test were performed with RStudio software (www.rstudio.com, Boston, MA, USA, accessed on 30 January 2022) using Factoextra, Agricolae and Stats package. ANOVA results were considered significant at p -value < 0.05. The correlation network was performed using Cytoscape 3.9.0 (<https://cytoscape.org/> accessed on 30 January 2022).

5. Conclusions

The results of the present study, performed on a large worldwide collection of commercial rosé wines, shed light on the diversity of color styles of these wines. They demonstrate large differences in phenolic and especially pigment composition between light rosé wines and wines showing more intense color, meaning that the color differences do not simply reflect dilution, and establish particular phenolic profiles related to the different color styles. Thus, the composition of light Provence style wines is reminiscent of that of white wines, with phenolic compounds represented mostly by hydroxycinnamoyltartrates while wines showing higher color intensity contain larger proportions of flavanols and anthocyanins, extracted from the grape skins.

Consequently, the color and salmon-orange hue of wines from the lighter group are primarily due to phenylpyranoanthocyanins derived from hydroxycinnamates and carboxypyrananthocyanins formed from pyruvic acid, a yeast metabolite. Indeed, these compounds are orange pigments and, unlike their anthocyanin precursors, hundred percent colored in mildly acidic and dilute media such as light rosé wine. The more intense and redder color of wines from the intermediate group is associated to higher levels of anthocyanins and carboxypyrananthocyanins and lower pH values, while that of the darkest wines is impacted by pigments derived from anthocyanins and flavanols, including derived phenolic compounds that are not among the targets of the MRM method used in the present study. Interpretation of the yellow component of color, b^* , is more complex. For the intermediate group, it is associated with low color intensity, high pH values, and high levels of compounds such as dihydroflavonols, aromatic amino acids, flavanols and anthocyanin-flavanol adducts, which are not themselves colored but, in particular under oxidative conditions, may be the precursors of yellow pigments that require further investigation. For the darker wines, yellowness appears associated to oxidation, and especially products derived from reactions of acetaldehyde with anthocyanins and flavanols which can be considered as markers of larger families of related compounds. Untargeted metabolomics approaches may help identify these pigments.

Beyond their implications for color and thus quality of rosés wines, the phenolic composition profiles obtained in the present study may be of use for authentication of the varietal or geographical origins of these wines.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded online. Table S1: List of variables and codes.docx, Table S2: RoseDataset.xls.

Author Contributions: Conceptualization: G.M. and V.C.; methodology: M.L., A.V., C.L., J.-C.B. and N.S.; formal analysis: M.L., A.V. and M.-A.D.; investigation: C.L., J.-C.B. and V.C.; resources: G.M.; data curation: M.L., A.V., E.M., M.-A.D. and C.L.; writing—original draft preparation, C.L.; writing—review and editing: M.-A.D., J.-C.B., J.-R.M. and V.C.; visualization: C.L.; supervision: N.S., J.-C.B., J.-R.M. and V.C.; project administration and funding acquisition, G.M., N.S., J.-R.M. and V.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was initially funded by IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) and Conseil Interprofessionnel des vins de Provence. It was also supported by CASDAR under the grant agreement N°18ART1807, by ANRT under the grant agreement CIFRE 2018/1412, and by Actia (French Ministry of Food) through funding of UMT Qualinnov (2006–2015) that performed oenological analysis and spectrophotometric analysis.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the Supplementary Information Section.

Acknowledgments: Conseil Interprofessionnel des vins de Provence and Centre du Rosé are acknowledged for material support and Union des œnologues de France for provision of the wine collection.

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

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Peres, S.; Giraud-Heraud, E.; Masure, A.-S.; Tempere, S. Rose Wine Market: Anything but Colour? *Foods* **2020**, *9*, 1850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Brouillard, R.; Dubois, J.-E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1359–1364. [[CrossRef](#)]
3. Trouillas, P.; Sancho-García, J.; De Freitas, V.; Gierschner, J.; Otyepka, M.; Dangles, O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 4937–4982. [[CrossRef](#)]
4. Timberlake, C.; Bridle, P. Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. II. Reactions with sulphur dioxide. *J. Sci. Food Agric.* **1967**, *18*, 473–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Somers, T.C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2175–2186. [[CrossRef](#)]
6. Salas, E.; Fulcrand, H.; Meudec, E.; Cheynier, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7951–7961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Salas, E.; Le Guernevé, C.; Fulcrand, H.; Poncet-Legrand, C.; Cheynier, V. Structure determination and color properties of a newly synthesized direct-linked flavanol-anthocyanin dimer. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8725–8729. [[CrossRef](#)]
8. Remy-Tanneau, S.; Le Guerneve, C.; Meudec, E.; Cheynier, V. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3592–3597. [[CrossRef](#)]
9. Cheynier, V.; Dueñas-Paton, M.; Salas, E.; Maury, C.; Souquet, J.M.; Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 298–305.
10. De Freitas, V.; Mateus, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: A new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 1463–1473. [[CrossRef](#)]
11. Wirth, J.; Caillé, S.; Souquet, J.M.; Samson, A.; Dieval, J.; Vidal, S.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1861–1871. [[CrossRef](#)]
12. Wirth, J.; Morel-Salmi, C.; Souquet, J.; Dieval, J.; Aagaard, O.; Vidal, S.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chem.* **2010**, *123*, 107–116. [[CrossRef](#)]
13. Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Reaction of enzymically generated quinones with malvidin-3-glucoside. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1365–1369. [[CrossRef](#)]
14. Lambert, M.; Meudec, E.; Verbaere, A.; Mazerolles, G.; Wirth, J.; Masson, G.; Cheynier, V.; Sommerer, N. A High-Throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rose Wines. *Molecules* **2015**, *20*, 7890–7914. [[CrossRef](#)]
15. Hernández, B.; Sáenz, C.; Alberdi, C.; Alfonso, S.; Diñeiro, J.M. Colour Evolution of Rosé Wines after Bottling. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2011**, *32*, 42–50. [[CrossRef](#)]
16. Gil, M.; Avila-Salas, F.; Santos, L.S.; Iturmendi, N.; Moine, V.; Cheynier, V.; Saucier, C. Rose Wine Fining Using Polyvinylpyrrolidone: Colorimetry, Targeted Polyphenomics, and Molecular Dynamics Simulations. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10591–10597. [[CrossRef](#)]

17. Salas, E.; Atanasova, V.; Poncet-Legrand, C.; Meudec, E.; Mazauric, J.; Cheynier, V. Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 325–332. [[CrossRef](#)]
18. Sáenz-Navajas, M.; Echavarri, F.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Pigment composition and color parameters of commercial Spanish red wine samples: Linkage to quality perception. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, *237*, 877–887. [[CrossRef](#)]
19. Morel-Salmi, C.; Souquet, J.M.; Bes, M.; Cheynier, V. The effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4270–4276. [[CrossRef](#)]
20. Vernhet, A.; Carillo, S.; Rattier, A.; Verbaere, A.; Cheynier, V.; Mekoue Nguela, J. Fate of Anthocyanins and Proanthocyanidins during the Alcoholic Fermentation of Thermovinified Red Musts by Different *Saccharomyces Cerevisiae* Strains. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 3615–3625. [[CrossRef](#)]
21. Singleton, V.L.; Timberlake, C.F.; Lea, A.G.H. The Phenolic Cinnamates of White Grapes and Wine. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29*, 403–410. [[CrossRef](#)]
22. Chamkha, M.; Cathala, B.; Cheynier, V.; Douillard, R. Phenolic Composition of Champagnes from Chardonnay and Pinot Noir Vintages. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3179–3184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cheynier, V.; Souquet, J.-M.; Moutounet, M. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 320–324.
24. Cheynier, V.; Rigaud, J.; Moutounet, M. Oxidation kinetics of trans-caffeoyltartrate and its glutathione derivatives in grape musts. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1751–1753. [[CrossRef](#)]
25. Abi-Habib, E.; Poncet-Legrand, C.; Roi, S.; Carrillo, S.; Doco, T.; Vernhet, A. Impact of grape variety, berry maturity and size on the extractability of skin polyphenols during model wine-like maceration experiments. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 3257–3269. [[CrossRef](#)]
26. Morata, A.; Loira, I.; Heras, J.; Callejo, M.; Tesfaye, W.; González, C.; Suárez-Lepe, J. Yeast influence on the formation of stable pigments in red winemaking. *Food Chem.* **2016**, *197*, 686–691. [[CrossRef](#)]
27. Ochando, T.; Mouret, J.; Humbert-Goffard, A.; Aguera, E.; Sablayrolles, J.; Farines, V. Comprehensive study of the dynamic interaction between SO₂ and acetaldehyde during alcoholic fermentation. *Food Res. Int.* **2020**, *136*, 109607. [[CrossRef](#)]
28. Hazelwood, L.; Daran, J.; van Maris, A.; Pronk, J.; Dickinson, J. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2259–2266. [[CrossRef](#)]
29. Romboli, Y.; Mangani, S.; Buscioni, G.; Granchi, L.; Vincenzini, M. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* on quercetin, vitisin A and hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *31*, 1137–1145. [[CrossRef](#)]
30. Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 745–751. [[CrossRef](#)]
31. Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 15–27. [[CrossRef](#)]
32. Vallverdu-Queralt, A.; Biler, M.; Meudec, E.; Le Guerneve, C.; Vernhet, A.; Mazauric, J.P.; Legras, J.L.; Loonis, M.; Trouillas, P.; Cheynier, V.; et al. p-Hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins: An Experimental and Theoretical Investigation of Their Acid-Base Properties and Molecular Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1842. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H.; Souquet, J.-M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 938–941. [[CrossRef](#)]
34. Poncet-Legrand, C.; Cabane, B.; Bautista-Ortin, A.B.; Carrillo, S.; Fulcrand, H.; Perez, J.; Vernhet, A. Tannin Oxidation: Intra- versus Intermolecular Reactions. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2376–2386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gambuti, A.; Han, G.; Peterson, A.; Waterhouse, A. Sulfur Dioxide and Glutathione Alter the Outcome of Microoxygenation. *Am. J. Enol. Vitic.* **2015**, *66*, 411–423. [[CrossRef](#)]
36. Hayasaka, Y.; Black, C.; 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. [[CrossRef](#)]
37. 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. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1429*, 155–165. [[CrossRef](#)]
38. Arapitsas, P.; Guella, G.; Mattivi, F. The impact of SO₂ on wine flavanols and indoles in relation to wine style and age. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 858. [[CrossRef](#)]
39. Nikolantonaki, M.; Magiatis, P.; Waterhouse, A. Direct Analysis of Free and Sulfite-Bound Carbonyl Compounds in Wine by Two-Dimensional Quantitative Proton and Carbon Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 10799–10806. [[CrossRef](#)]
40. Danilewicz, J. 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*, 73–85.
41. Bueno, M.; Marrufo-Curtido, A.; Carrascón, V.; Fernández-Zurbano, P.; Escudero, A.; Ferreira, V. Formation and Accumulation of Acetaldehyde and Strecker Aldehydes during Red Wine Oxidation. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cheynier, V.; Trousdale, E.; Singleton, V.L.; Salgues, M.; Wylde, R. Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 217–221. [[CrossRef](#)]

43. Cheynier, V.; Van Hulst, M.W. Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionyl caftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 10–15. [[CrossRef](#)]
44. Cheynier, V.; Osse, C.; Rigaud, J. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 1729–1732. [[CrossRef](#)]
45. Cheynier, V.; Basire, N.; Rigaud, J. Mechanism of *trans*-caffeoyl tartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1069–1071. [[CrossRef](#)]
46. Cheynier, V.; Ricardo Da Silva, J.M. Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing *trans*-caffeoyl tartaric acid and grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1047–1049. [[CrossRef](#)]
47. Cheynier, V.; Rigaud, J.; Souquet, J.M.; Barillère, J.M.; Moutounet, M. Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 36–42.
48. Simpson, R.F. Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis* **1982**, *21*, 233–239.
49. Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V. Colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin oxidative coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1279–1288. [[CrossRef](#)]
50. Es-Safi, N.E.; Guerneve, C.L.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. New polyphenolic compounds with xanthylum skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5211–5217. [[CrossRef](#)]
51. Es-Safi, N.E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of the reactions between (+)-catechin and furfural derivatives in the presence or absence of anthocyanins and their implication in food color change. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5946–5954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Vallverdú-Queralt, A.; Meudec, M.; Eder, M.; Lamuela-Raventos, R.; Sommerer, N.; Cheynier, V. Targeted filtering reduces the complexity of routine UHPLC-HRMS data to decipher polyphenol polymerization. *Food Chem.* **2017**, *227*, 255–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ontañón, I.; Sánchez, D.; Sáez, V.; Mattivi, F.; Ferreira, V.; Arapitsas, P. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Metabolomics for Understanding the Compositional Changes Induced by Oxidative or Anoxic Storage of Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 13367–13379. [[CrossRef](#)]
54. Glories, Y. La couleur des vins rouges. 1ere partie. Les équilibres des anthocyanes et des tanins. *OENO One* **1984**, *18*, 195–217. [[CrossRef](#)]
55. Kennedy, J.; Jones, G.P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1740–1746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pinasseau, L.; Verbaere, A.; Roques, M.; Meudec, E.; Vallverdu-Queralt, A.; Terrier, N.; Boulet, J.C.; Cheynier, V.; Sommerer, N. A fast and robust UHPLC-MRM-MS method to characterize and quantify grape skin tannins after chemical depolymerization. *Molecules* **2016**, *21*, 1409. [[CrossRef](#)]

Chapitre 4 :

Impact du pH, de la température et de la concentration en sulfite lors de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition phénolique des vins rosés

Ce chapitre s'intéresse à l'impact du pH (3,1 ; 3,5 ; 3,9), de la température (12°C ; 16°C ; 20°C) et de la concentration en sulfites (20mg/L ; 50mg/L ; 80mg/L) lors de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition phénoliques des vins rosés. Afin d'optimiser le nombre d'expérimentations, des plans d'expérience ont été mis en place et appliqués à trois cépages différents (Syrah, Grenache et Cinsault), et deux niveaux de macérations. Les trois cépages ont été choisis par le partenaire industriel pour leurs différences de couleur. Ces premiers travaux n'ont pas permis d'observer d'impact des paramètres étudiés (pH, SO₂, température) sur la composition en polyphénols des vins. Cependant, ils ont permis d'illustrer les équilibres chimiques des anthocyanes avec le pH et les sulfites et de montrer qu'ils sont à l'origine des effets de ces deux paramètres sur la couleur. De plus, les résultats obtenus pour les points centraux de chaque plan d'expérience ont été utilisés pour le chapitre suivant.

Les résultats sont présentés dans ce chapitre sous forme d'une publication en français destinée à la Revue Française des Œnologues.

Titre : Impact du pH, de la température et de la concentration en sulfite lors de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition phénolique des vins rosés

1. Introduction

La couleur est l'un des facteurs clé de la commercialisation des vins rosés (Peres et al., 2020). Leur grand éventail de nuance et de couleur est dû à la présence de composés phénoliques colorés extraits des raisins ou formés lors de la vinification. Les principaux pigments des raisins et des vins de *Vitis vinifera* sont les anthocyanes, majoritairement la malvidine-3-O-glucoside, qui sont des pigments rouges. Au pH du vin, les anthocyanes sont principalement incolores en raison des réactions d'hydratation et d'addition de sulfites. Ces deux réactions sont réversibles à pH 1, libérant les cations flavylium colorés à partir des adduits formés (Jurd, 1964). La vinification particulière des vins rosés implique une macération contrôlée des pellicules dans le jus avant une fermentation alcoolique en phase liquide. Ce processus limite l'extraction entraînant des proportions différentes de composés phénoliques dans les vins rosés par rapport aux vins rouges. En effet, des études sur des vins rouges et rosés de Grenache ont montré que les acides hydroxycinnamiques sont les principaux composés phénoliques des vins rosés alors que les flavanols sont prédominants dans les vins rouges (Wirth et al., 2010, 2012). Cette différence dans les profils phénoliques affecte les réactions qui se produisent pendant la vinification.

L'éthanal peut être produit par oxydation mais aussi par le métabolisme des levures. Il a une plus grande affinité pour les sulfites par rapport aux anthocyanes, régénérant les cations flavylium libres rouges à partir des adduits bisulfites (Ribéreau-Gayon, 1959). Au cours de la fermentation alcoolique, les réactions des anthocyanes avec les métabolites de la levure, tels que l'éthanal ou l'acide pyruvique, génèrent de nouveaux pigments résistants face à la décoloration par les sulfites, les pyranoanthocyanes (ex. vitisine B, c'est-à-dire pyranomalvidine 3-glucoside) et les carboxypyrananthocyanes (vitisine A, c'est-à-dire carboxypyranomalvidine 3-glucoside) respectivement (Bakker & Timberlake, 1997a; Benabdeljalil et al., 2000; Fulcrand et al., 1998). Les anthocyanes peuvent également réagir avec les vinylphénols (Fulcrand et al), produits par décarboxylation des acides hydroxycinnamiques, ou directement avec ces derniers (Schwartz et al) pour former des phenylpyranoanthocyanes. Le taux le plus élevé de formation de vitisine A se produit pendant la fermentation alcoolique (Asenstorfer et al., 2003). De plus, lors d'une étude sur l'impact de la souche de levure, du pH (3.2-4.2), de la teneur en sulfite (0-30mg/L) et de la température de fermentation (20 & 30°C) sur la formation de pigments dérivés, dont les vitisines A et B une production plus élevée de vitisines A et B a été obtenue lorsqu'aucun sulfite n'était ajouté, tandis que les phénylpyranoanthocyanes n'étaient pas affectées (Morata et al., 2006b). Les meilleurs résultats pour les trois types de pigments ont été obtenus à 3.7 de pH et 20°C.

Toutes les réactions ci-dessus ont été décrites dans des solutions modèles et/ou des vins rouges. Il n'existe pas de donnée disponible dans la littérature concernant l'impact de la fermentation alcoolique sur la couleur des vins rosés. L'objectif de ce travail est donc d'étudier les effets simples et d'interaction du pH (3,1 ; 3,5 ; 3,9), de la température (12°C, 16°C, 20°C) et de la concentration en sulfites (20mg/L ; 50mg/L ; 80mg/L) lors de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition finale en polyphénols des vins rosés. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en place des plans d'expérience optimisés de Box-Behnken permettant de construire un modèle mathématique statistique. Au cours de ce projet, nous avons évalué trois cépages différents de *Vitis vinifera* utilisés couramment pour l'élaboration des vins rosés dans la région de la Provence française et sélectionnés pour leur potentiel de coloration différent : Grenache, Syrah et Cinsault (Cayla et al., 2011).

2. Matériels et méthodes

2.1. Préparation des moûts

Trois cépages (Cinsault, Grenache, Syrah) ont été récoltés et traités par le Centre du Rosé (IFV, Vidauban, France) en septembre 2018. Les raisins ont été sulfités par ajout d'hydrogénosulfite de potassium (3 g/ 100 kg de sulfite pour le Grenache et le Cinsault, 7g/100kg pour la Syrah), éraflés, foulés, et soumis à une macération contrôlée à 17°C pendant 2 heures pour la Syrah, 4 heures pour le Grenache et 12 heures pour le Cinsault, en accord avec les pratiques locales.

Après macération, les raisins ont été pressés et deux moûts différents ont été préparés pour chaque cépage. Les 20 premiers litres de jus de goutte constituent les moûts du premier niveau d'extraction (Syrah1, Grenache1 et Cinsault1). Ensuite, 10L de ce jus de goutte ont été mélangés avec 10L de jus de fin de presse pour élaborer des moûts mimant un second niveau d'extraction (Syrah2, Grenache2, et Cinsault2). Les moûts ont ensuite été clarifiés par débouillage à froid à 12°C avant soutirage. Les moûts clarifiés et les particules solides ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Après décongélation et centrifugation (4000g, 5 °C, 10 min) de chaque moût, le pH a été ajusté (3,2 ; 3,5 ; 3,9) à l'aide d'acide chlorhydrique (50%, v/v) et d'hydroxyde de sodium (32%, m/m) dans l'eau. Les particules solides recueillies après le soutirage ont été ajoutées aux moûts pour atteindre une turbidité de 135NTU et la concentration en sucre a été normalisée à 250g/L par ajout d'un mélange équimolaire fructose/glucose. La teneur en azote assimilable était de 163 mg/L pour les deux moûts de Grenache, 148 mg/L pour les deux moûts de Syrah et 185 mg/L pour les deux moûts de Cinsault. Les moûts ont ensuite été distribués dans les fermenteurs.

2.2. Fermentations

Les fermentations ont été réalisées dans des fermenteurs de 300mL remplis de 250mL de moût. Le volume de remplissage a été contrôlé par pesée en utilisant la densité de chaque moût afin de conserver le même espace de tête pour chaque modalité. En parallèle, des échantillons de 40mL et 5mL ont été préparés pour l'analyse des moûts avant fermentation alcoolique. Les fermenteurs et les flacons ont été inertés à l'aide d'Argon avant et après remplissage. Les fermenteurs ont été équipés d'une cloche de fermentation permettant de maintenir l'anaérobiose. Tous les fermenteurs ont été installés dans une pièce thermorégulée (12°C ; 16°C ; 20°C) et agités à 150 rpm.

Les sulfites ont ensuite été ajoutés aux moûts de Cinsault et de Grenache en utilisant une solution d'hydrogénosulfite de potassium (222g/L) pour atteindre les valeurs ciblées de sulfites totaux (20mg/L ; 50mg/L ; 80mg/L). Les Syrah1 et Syrah2 étaient respectivement à 101mg/L et 89mg/L de sulfites totaux avant la fermentation empêchant donc la prise en compte de ce paramètre pendant la fermentation alcoolique. Tous les fermenteurs ont été maintenus à 16°C pendant 24h avant l'inoculation.

Les levures sèches actives (souche K1, ICV, France) ont été réhydratées pendant 20min à 37°C à l'aide d'une solution de glucose dans l'eau (50g/L) avant d'être inoculées à 0,4g/L. La cinétique de fermentation a été suivie manuellement par pesée journalière. Les fermentations ont été considérées comme achevées lorsqu'aucune perte de poids supérieure à 0,1 g par 24 heures n'a été observée. Tous les vins ont fermenté jusqu'à atteindre moins de 2g/L de sucre résiduel, sans interruption. Pour chaque fermenteur, 50 mL de vin ont été prélevés pour l'analyse de la couleur et 5 x 1 mL pour l'analyse des polyphénols et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

2.3. Plan d'expériences

Un plan expérimental de type Box-Behnken a été appliqué à chacun des quatre moûts de Grenache et Cinsault afin d'étudier les effets de trois paramètres indépendants de la fermentation alcoolique (pH, température et concentration en SO₂) sur la couleur et la composition phénolique des vins. Un plan expérimental complet à deux facteurs (pH et température) a été appliqué aux deux moûts de Syrah. Chaque plan d'expérience considère trois niveaux codés : -1, 0, +1 où -1 correspond au niveau le plus bas de chaque facteur, 1 au niveau le plus élevé et 0 au niveau intermédiaire.

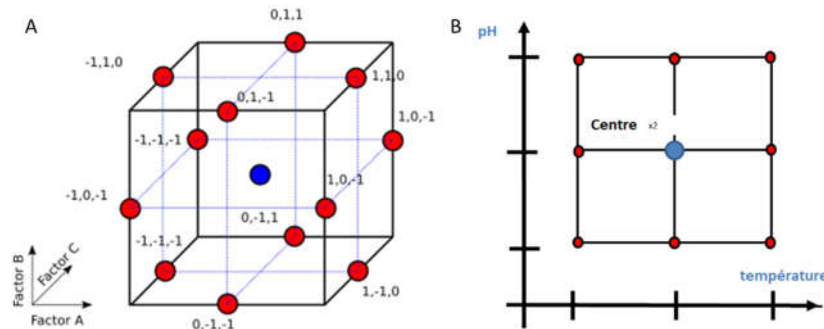


Figure 38: Visualisation des plans expérimentaux (A) Plan expérimental de Box Behnken (B) Plan expérimental complet

Pour le plan de Box-Behnken, l'effet des trois paramètres étudiés sur chaque variable mesurée (couleur et composition phénolique) a été modélisé par une surface de réponse polynomiale :

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_1x_1^2 + \beta_2x_2^2 + \beta_3x_3^2 + \beta_{1/2}x_1x_2 + \beta_{1/3}x_1x_3 + \beta_{2/3}x_2x_3 + \varepsilon$$

où x_1 , x_2 et x_3 représentent les valeurs codées du pH (3,2 ; 3,5 ; 3,9), de la température de fermentation (12°C ; 16°C, 20°C) et de la concentration totale en SO₂ (20 mg/L ; 50 mg/L ; 80 mg/L).

Dans le cas du plan complet, les paramètres étudiés (pH et température) ont été modélisés pour chaque variable de couleur et de composition phénolique par une surface de réponse polynomiale selon l'équation :

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{1/2}x_1x_2 + \varepsilon$$

où x_1 et x_2 représentent les valeurs codées du pH (3,2 ; 3,5 ; 3,9), de la température de fermentation (12°C ; 16°C, 20°C).

Y représente la surface de réponse prédite, β_0 la moyenne générale, β_i les coefficients linéaires, β_{ij} les coefficients quadratiques et β_{ij} les coefficients d'interaction et ε l'erreur.

1				2		
N° de manip	pH	Température, °C	SO2 total, mg/L	N° de manip	pH	Température, °C
1	3.9	20	50	1	3.9	20
2	3.9	16	80	2	3.9	16
3	3.9	16	20	3	3.9	12
4	3.9	12	50	4	3.5	20
5	3.5	20	80	5	3.5	16
6	3.5	20	20	6	3.5	16
7	3.5	16	50	7	3.5	12
8	3.5	16	50	8	3.1	20
9	3.5	16	50	9	3.1	16
10	3.5	16	50	10	3.1	12
11	3.5	12	80			
12	3.5	12	20			
13	3.1	16	80			
14	3.1	12	50			
15	3.1	20	50			
16	3.1	16	20			

Figure 39: Combinaisons des paramètres étudiés pour chaque fermenteur (1) les modalités Grenache et Cinsault (2) les modalités Syrah

2.4. Analyse de la couleur

Les mesures d'absorbances ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-1900 de Shimadzu selon les protocoles décrits par Atanasova (Atanasova, Fulcrand, Cheynier, et al., 2002) en utilisant une cellule de 1cm de trajet et en adaptant la dilution pour obtenir des valeurs d'absorbance entre 0,1 et 1.

L'indice de polyphénols totaux (IPT) à 280nm, les pigments rouges totaux (PRT) à 520nm ont été mesurés 20 minutes après la dilution des vins et des moûts dans une solution de HCl 1M ($IPT = A_{280} \times F_D$ (facteur de dilution) ; $PT = A_{520-HCl\ 1M} \times F_D$).

L'absorbance à 520nm a été mesurée 5 minutes après l'ajout de 60µL de solution d'hydrogénosulfite de sodium (200g/L) à 4mL de vin ou de moût pour déterminer la fraction des pigments résistante à la décoloration par les sulfites ($NBP = A_{520-SO_2}$). L' A_{520} a également été déterminée sur les moûts et les vins 40 minutes après l'ajout de 40µL d'une solution aqueuse d'éthanal (12,6 % (v/v)) à 4mL d'échantillon pour piéger les sulfites et convertir les adduits bisulfite en ions flavylum.

Cela a permis de calculer les quantités de pigments sous forme d'adduits bisulfites ($BA = A_{520-éthanal} - A_{520}$), de flavylum ($AH^+ = A_{520} - A_{520-SO_2}$) et sous forme hydratée ($HF = TRP - A_{520-éthanal}$).

2.5. Analyse de la composition phénolique des vins

Les polyphénols présents dans les moûts et les vins ont été analysés par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse triple-quadripôle (UHPLC-QqQ-MS) en mode MRM (multiple reaction monitoring, MRM), selon la méthode décrite par (M. Lambert et al., 2015) en utilisant les mêmes standards. Les analyses UHPLC-QqQ-MS réalisées directement sur les moûts/vins ont permis la détection et la quantification de 106 composés phénoliques dont des acides hydroxybenzoïques, des acides hydroxycinnamiques, des stilbènes, des flavonols, des flavan-3-ols monomères, dimères et trimères, des anthocyanes et dérivés, d'anthocyanes, à savoir pyranoanthocyanes, carboxypyrananthocyanes, phénylpyrananthocyanes (catéchyl, hydroxyphényl et guaiacylpyrananthocyanes), des adduits flavanol-anthocyanes (T-A) et anthocyanes-flavanol (A-T) et des produits de condensation de flavanols et d'anthocyanes avec l'éthanal (T-éthyl-A et T-éthyl-T).

2.6. Analyses statistiques

Les modélisations des surfaces de réponse ont été effectuées en utilisant le logiciel RStudio version 2.14.2 (R Development Core Team 2012) et la bibliothèque rsm (Lenth, 2009).

3. Résultats

Les fermentations ont été réalisées sans interruptions en 7 jours pour celle menée à 20°C et 27 jours pour celles réalisées à 12°C. Aucune variable de composition phénolique n'a été impactée significativement par les paramètres dans les gammes étudiées pour l'ensemble des modélisations effectuées. De ce fait, seules les variables issues des analyses de la couleur sont décrites dans cette partie résultat.

3.1. Etude du cépage Syrah

Pour toutes les variables couleur étudiées, aucun impact de la température n'a été observé. Cependant, un effet significatif négatif du pH est observé sur certains paramètres de couleur pour les 2 moûts et les deux vins de Syrah (tableau 1). Les résultats étant similaires pour les deux moûts fermentés, seuls les résultats du moût de Syrah2 sont présentés dans la figure 3.

Variabiles	Température	pH
A ₅₂₀ moûts Syrah2	gris	rouge
BA moûts Syrah2	gris	rouge
A ₅₂₀ vins Syrah2	gris	orange
A ₅₂₀ moûts Syrah1	gris	jaune
BA moûts Syrah1	gris	orange

Tableau 11: Effets simples des paramètres de la fermentation alcoolique (pH, température) sur la couleur (Rouge : $p < 0,001$; orange : $p < 0,01$; jaune : $p < 0,05$ gris : non significatif) [A₅₂₀ : mesure directe de l'absorbance à 520nm ; BA : adduits bisulfites]

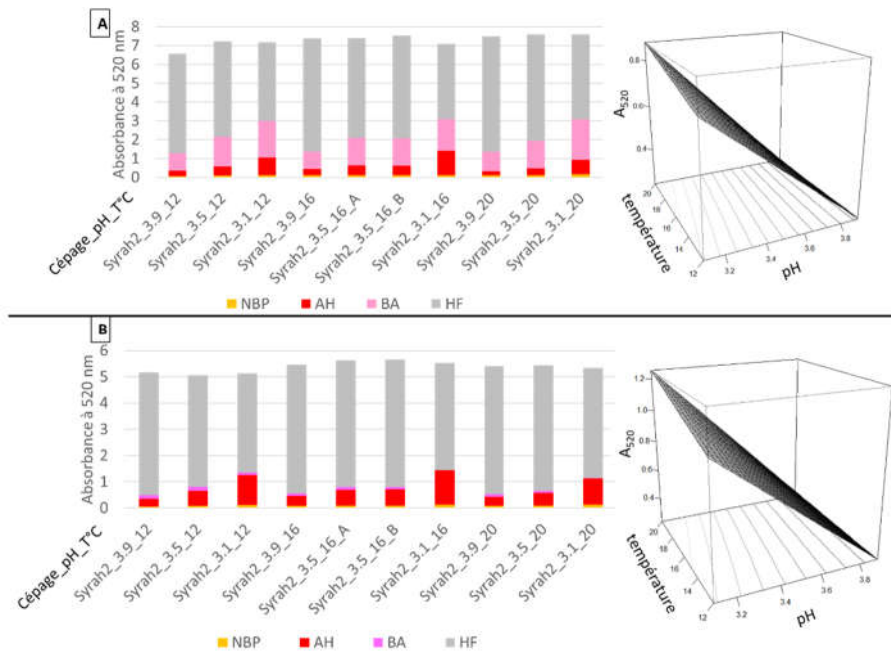


Figure 40: Différentes formes des pigments à 520nm et surfaces de réponse de la mesure directe pour (A) les moûts et (B) les vins de Syrah 2

Les résultats présentés dans la figure 3A montrent, pour les moûts de Syrah2, d'une part les quantités des différentes formes de pigments et d'autre part la modélisation de l'absorbance à 520nm en fonction du pH et de la température. La figure 3B illustre ces mêmes données pour le vin de Syrah 2 obtenu après fermentation alcoolique.

Pour les moûts et les vins, les histogrammes montrent des quantités similaires de pigments totaux mais une plus grande proportion de cation flavylum (AH^+) à pH 3,1 comparé à pH 3,9. Cette différence est illustrée par la modélisation de l'absorbance à 520nm en surface de réponse quasiment linéaire ($A_{520} = AH^+ + NBP$) montrant un signal plus important à pH 3,1 qu'à pH 3,9. Le même constat est fait pour les adduits anthocyanes-sulfites (BA) présents en plus grande quantité dans les modalités à pH plus acide. De plus, on remarque une disparition quasi totale des adduits anthocyanes-sulfite (BA) après fermentation alcoolique. Les valeurs d'IPT, de PT et de NBP n'ont révélé aucun effet significatif des paramètres étudiés.

3.2. Etude des cépages Cinsault et Grenache

Les variables montrant un impact significatif des paramètres étudiés pour les quatre modélisations de type Box-Behnken sont regroupés dans le tableau 2. Les résultats sont similaires pour les quatre modalités étudiées (Grenache1, Grenache2, Cinsault1 et Cinsault2). De ce fait, seuls les résultats obtenus pour le Box-Behnken appliqué au moût et au vin de Cinsault2 sur les variables de couleur sont présentés dans la figure 4.

Variables	Effets simples			Effets quadratiques			Intéractions		
	Température	pH	SO ₂	Température	pH	SO ₂	T:P	T:S	P:S
AH ⁺ moûts Cinsault2		-	-	-	-	+	-	-	+
A ₅₂₀ vins Cinsault2		-	-	-			-	-	
BA vins Cinsault2			+		-				
AH ⁺ vins Cinsault1		-							
BA vins Cinsault1		-							
A ₅₂₀ vins Grenache2		-		-			-		
AH ⁺ vins Grenache2		-	-	-					
BA vins Grenache2	+	-	+	-		-		+	+
A ₅₂₀ moûts Grenache1		-		-		+			
BA moûts Grenache1		-	+	+					+
A ₅₂₀ vins Grenache1		-							

Tableau 12: Effets simples, quadratiques et interactions des paramètres de la fermentation alcoolique (pH, température) sur la couleur des moûts et vins de Cinsault et Grenache (Rouge : $p < 0,001$; orange : $p < 0,01$; jaune : $p < 0,05$ gris : non significatif) [A_{520} : mesure directe de l'absorbance à 520nm ; BA : adduits bisulfites ; AH^+ : forme flavylum]

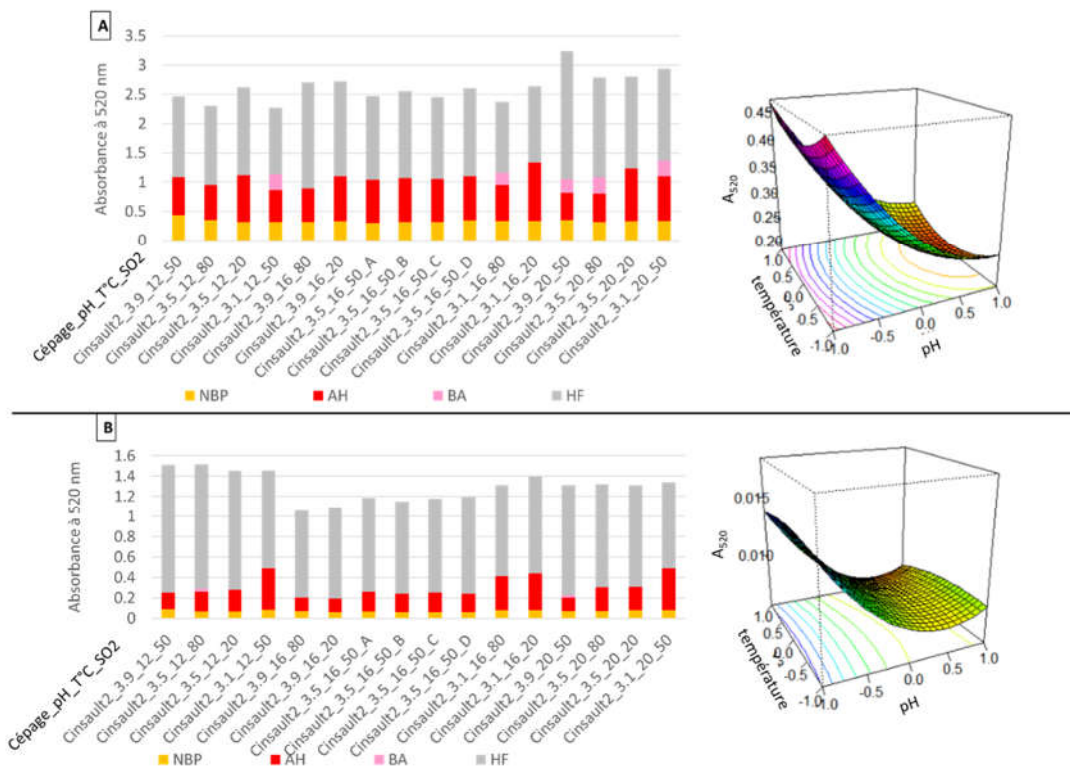


Figure 41: Différentes formes des pigments à 520nm et surfaces de réponse de la mesure directe pour (A) les mouts et (B) les vins de Cinsault 2

La figure 4 illustre d'une part les quantités des différentes formes de pigments et d'autre part la modélisation de l'absorbance à 520nm en fonction du pH et de la température pour les moûts (Figure 4A) et les vins (Figure 4B) de Cinsault2.

Comme observé pour la Syrah2, la quantité de forme flavylum (AH^+) augmente lorsque le pH diminue. Cette observation est particulièrement visible sur les vins (Figure 4B) mais seule une légère tendance est visible sur les moûts. De plus, les BA semblent être détectés dans les modalités les plus acides des moûts mais sont absents des vins. La modélisation en surface de réponse pour le moût n'est pas significative mais permet de visualiser l'augmentation de l'absorbance à 520 nm à pH plus acide comme sur les vins. Ce résultat montre que malgré la présence de sulfite décolorant les anthocyanes, la quantité de flavylum colorés augmente lorsque le pH diminue. Les valeurs d'IPT, de PT et de NBP n'ont révélé aucun effet significatif des paramètres étudiés.

4. Discussion

4.1. Impact de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition phénolique

Des pertes de couleur et de composés phénoliques ont été observées pendant la fermentation alcoolique. Cependant, ces pertes n'ont pas été affectées de manière significative par les paramètres étudiés, c'est-à-dire le pH, la température et la quantité de SO₂ pour les cépages Grenache et Cinsault. Afin de pouvoir mettre en lumière l'impact de cette étape importante de la vinification sur la couleur et la composition phénolique, les points centraux de cette étude qui ont été répliqués seront étudiés plus en détail dans le chapitre suivant.

4.1.1. Impact de la température de fermentation

L'éthanal, comme d'autres métabolites de levures, peut réagir avec les anthocyanes pour former des pigments dérivés appelés pyranoanthocyanes. Il a été montré qu'à faible température (20°C vs 30°C) ces pigments dérivés sont produits en plus grande quantité (Morata et al., 2006b) du fait de la présence en concentration plus élevée de leurs précurseurs volatils. Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de la température de fermentation sur le métabolisme de la levure et plus précisément sur la production d'éthanal. Ces études ont révélé une plus grande quantité d'éthanal à température de fermentation faible (12°C vs 20°C) (Jackowetz et al., 2011). Cette augmentation de la concentration en éthanal à faible température a été expliquée par sa faible température d'ébullition (20,2°C).

Lors des fermentations effectuées dans ce travail, la température de fermentation a eu un impact notable sur la cinétique fermentaire passant de 7 jours de fermentation à 20°C à plus de 25 jours à 12°C. Cependant, aucun impact significatif que ce soit sur la couleur ou sur la composition phénolique n'a été noté. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est la gamme de température choisie (12-20°C), inférieure à la température d'ébullition de l'éthanal. En effet, dans la gamme de température que nous avons utilisée, il est vraisemblable que les pertes d'éthanal restent faibles et que donc son accumulation en phase liquide varie trop peu ce qui ne modifie pas la synthèse des pyranoanthocyanes et donc la couleur correspondante. Une seconde hypothèse est la souche de levure utilisée. En effet, une précédente étude a montré l'effet décisif de la souche de levure dans la production de métabolite et donc de la production de pigments dérivés (Morata et al., 2006b). Dans nos conditions de fermentation, il est possible que la production d'éthanal par la souche de levure K1 soit peu impactée par la température.

4.1.2. Impact du pH et du SO₂

Il est important de noter que les anthocyanes mais aussi les sulfites sont en équilibre en fonction du pH. Au pH du vin, l'anthocyane est majoritairement sous sa forme hydratée incolore et le SO₂ sous la forme d'ion hydrogénosulfite. L'ion hydrogénosulfite peut impacter la couleur en se combinant à la forme flavylum colorée de l'anthocyane (Brouillard & El Hage Chahine, 1980). En effet, l'addition sur le carbone C4 provoque un réarrangement du cycle C chromophore rendant l'adduit bisulfite formé incolore (Berké et al., 1998; Timberlake & Bridle, 1967). L'ion hydrogénosulfite peut aussi se combiner aux métabolites de levures tel que l'acide pyruvique ($pK_a = 0.52$) ou l'éthanal ($pK_a = 2.62$). En réponse à une trop grande quantité de sulfites dans le milieu, les levures produisent de l'éthanal pour combiner les sulfites et assainir le milieu via plusieurs mécanismes (Zara & Nardi, 2021). L'impact du SO₂ est donc double : d'une part il se combine aux anthocyanes les rendant incolores, d'autre part il se combine à l'éthanal, le rendant de ce fait indisponible pour former des pigments dérivés. De plus, cet impact est soumis aux équilibres chimiques et donc au pH (Figure 42). Au-delà des équilibres chimiques, le pH influence aussi la réactivité des anthocyanes puisque la formation de certains pigments dérivés avec l'éthanal mais aussi les flavanols s'effectue préférentiellement à pH plus acide ([T-A] ; [A-T] ; [T-éthyl-A]) (Fulcrand et al., 2006).

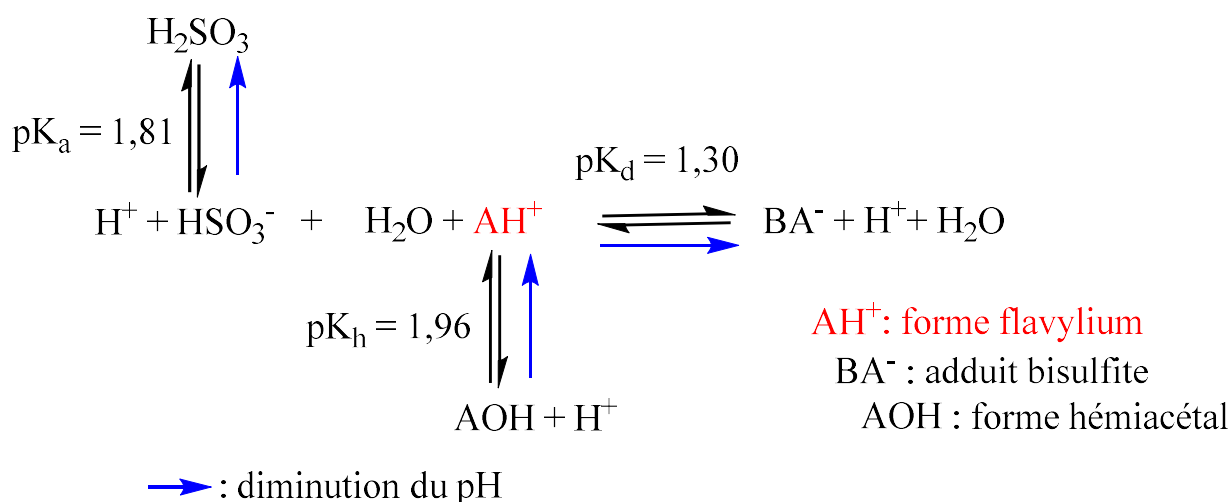


Figure 42: Illustration des équilibres chimiques entre la cyanidine-3-O-glucoside et l'ion hydrogénosulfite en solution aqueuse à 25°C [AH⁺ : cation flavylum ; AOH : forme hémiacétale ; BA : Adduit bisulfite] (Brouillard & El Hage Chahine, 1980)

Dans notre travail, nous constatons, dans un premier temps, qu'il y a, sur les moûts, une augmentation de BA formé lorsque l'ajout de SO₂ est plus important et donc une perte de couleur. De plus, les teneurs en BA sont aussi impactées négativement par le pH. En effet, plus le pH diminue plus la proportion de BA augmente indépendamment de la quantité de SO₂ ajoutée. Ces résultats illustrent la modification des équilibres chimiques en fonction du pH entre le cation flavylum, l'ion hydrogénosulfite et la forme BA (Figure 42). L'équilibre chimique entre le cation flavylum coloré et sa forme hémiacétale incolore est aussi visible sur les moûts et les vins et illustré par la mesure à 520 nm (A₅₂₀) et par la quantité de forme flavylum (AH⁺) plus importante à pH 3,1 qu'à pH 3,9. L'absence de différence relevée pour les valeurs d'IPT et de PT confirme bien que l'impact observé est lié à des phénomènes d'équilibre chimique et non de réactivité à proprement parlé.

Dans un second temps, on peut remarquer la disparition des BA après fermentation alcoolique. Ce phénomène peut être expliqué par la production d'éthanal par les levures au cours ou au début de la fermentation alcoolique dans les cas d'ajout extrême de SO₂ (Morata, Gómez-Cordovés, Colomo, et al., 2003a; Zara & Nardi, 2021). Cet éthanal produit va se combiner préférentiellement au SO₂ par rapport aux anthocyanes ($\text{pK}_d^{\text{cyanidine}} < \text{pK}_d^{\text{éthanal}}$) ; le SO₂ n'est donc plus disponible pour former les BA.

Hormis l'impact du pH et du SO₂ sur la couleur en lien avec les équilibres chimiques, aucun impact n'a été décelé sur les composés phénoliques dosés. Aucune variation des quantités de pyranoanthocyanes, [T-A], [A-T] ou [T-éthyl-A] en lien avec les variations de pH ou de SO₂ n'a été significative.

Des données précédemment obtenues en vins rouges sur l'impact de ces deux paramètres sur la formation de pyranoanthocyanes (vitisine A, vitisine B et une vinylpyranoanthocyane) lors de la fermentation en phase homogène a montré le rôle prédominant de la souche utilisée. En effet, un impact du pH et du SO₂ sur la formation de pyranoanthocyanes a été observé pour une des souches (7VA) mais aucune variation significative de la formation de ces pigments n'a été engendrée par la souche S6U malgré les différentes conditions de pH (3,2 ; 3,7 ; 4,2) et de SO₂ (0 ; 10 ; 30 mg/L) (Morata et al., 2006b). Ces résultats suggèrent qu'aucun impact n'est engendré par la souche que nous avons utilisée lors de notre étude, la souche K1.

Au-delà du point de vue microbiologique, des études de réactivité chimique des tanins et anthocyanes ont montré une formation accrue d'adduits à pH 2 plutôt qu'à pH 3,8 en solution modèle vin (Salas et al., 2003). En effet, la formation de carbocation par dépolymérisation des tanins mais aussi

la proportion de cation flavylum est favorisée à pH plus acide. Ces composés chargés sont impliqués dans les mécanismes de formation des adduits tanin-anthocyanes et anthocyane-tanins. Malgré une gamme de pH plus restreinte (3,1 à 3,9) dans notre étude, des différences dans les quantités de ces adduits formés étaient attendues. L'absence totale d'impact de ces deux paramètres (pH et SO₂) sur les teneurs en polyphénols est donc surprenante.

5. Conclusion

Les résultats de cette première approche sur l'impact du pH, de la température et de la concentration en SO₂ pendant la fermentation alcoolique n'ont montré aucun impact sur la composition phénolique et un impact limité sur la couleur en lien avec les équilibres chimiques des anthocyanes en solution et des sulfites pour les moûts. Il est important de noter que ces résultats sont valables pour la souche de levure utilisée (K1) et dans les gammes de variation de pH, température et concentration en SO₂ étudiées.

Une précédente étude a révélé l'impact du SO₂ sur la couleur des vins rosés en lien avec des phénomènes d'oxydation (Leborgne et al., 2022). Nos résultats suggèrent que cet impact n'intervient pas au cours de la fermentation alcoolique mais plutôt lors des étapes post-fermentaires ou pré-fermentaires (brunissement des moûts).

Toutefois, nous avons noté une baisse importante de la couleur et de la teneur en polyphénols entre le moût et le vin. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur l'impact de la fermentation alcoolique sur ces deux variables, pour les 3 cépages clés des vins rosés de Provence : Syrah, Grenache, Cinsault. Par conséquent, dans le chapitre suivant, nous allons détailler et discuter les résultats obtenus sur les points centraux de chacun des 6 plans d'expériences réalisés dans cette étude.

6. Références

- Asenstorfer, R. E., Markides, A. J., Iland, P. G., & Jones, G. P. (2003). Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 40–46. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00230.x>
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01617-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01617-8)
- Bakker, J., & Timberlake, C. (1997). Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM*, 45. <https://doi.org/10.1021/jf960252c>
- Benabdeljalil, C., Cheynier, V., Fulcrand, H., Hafiki, A., Mosaddak, M., & Moutounet, M. (2000). Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levure. *Sciences des Aliments*, 20(2), 203–220. <https://doi.org/10.3166/sda.20.203-220>
- Berké, B., Chèze, C., Vercauteren, J., & Deffieux, G. (1998). Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters*, 39(32), 5771–5774. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01205-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01205-2)

- Brouillard, R., & El Hage Chahine, J. M. (1980). Chemistry of anthocyanin pigments. 6. Kinetic and thermodynamic study of hydrogen sulfite addition to cyanin. Formation of a highly stable Meisenheimer-type adduct derived from a 2-phenylbenzopyrylium salt. *Journal of the American Chemical Society*, 102(16), 5375–5378. <https://doi.org/10.1021/ja00536a043>
- Cayla, L., Pouzalgues, N., & Masson, G. (2011). *Connaissance et maîtrise de la couleur des vins Rosés*. 8.
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47(7), 1401–1407. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00772-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00772-3)
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289–297.
- Jackowetz, J. N., Dierschke, S., & Mira de Orduña, R. (2011). Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 44(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.014>
- Jurd, L. (1964). Reactions Involved in Sulfite Bleaching of Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 29(1), 16–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1964.tb01685.x>
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2015). A High-Throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. *Molecules*, 20(5), 7890–7914. <https://doi.org/10.3390/molecules20057890>
- Leborgne, C., Lambert, M., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Masson, G., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (2022). Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics. *Molecules*, 27(4), 1359. <https://doi.org/10.3390/molecules27041359>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., & Suárez, J. A. (2006). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.019>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7402–7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>

- Peres, S., Giraud-Heraud, E., Masure, A.-S., & Tempere, S. (2020). Rose Wine Market: Anything but Colour? *Foods*, 9(12), 1850. <https://doi.org/10.3390/foods9121850>
- Ribéreau-Gayon, P. (1959). *Recherches sur les anthocyanes des végétaux: Application au genre Vitis*. Librairie générale de l'enseignement.
- Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E., & Cheynier, V. (2003). Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7951–7961. <https://doi.org/10.1021/jf0345402>
- Timberlake, C. F., & Bridle, P. (1967). Flavylum salts, anthocyanidins and anthocyanins. II. Reactions with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(10), 479–485. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740181009>
- Wirth, J., Caillé, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chemistry*, 132(4), 1861–1871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.019>
- Wirth, J., Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123(1), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.008>
- Zara, G., & Nardi, T. (2021). Yeast Metabolism and Its Exploitation in Emerging Winemaking Trends: From Sulfite Tolerance to Sulfite Reduction. *Fermentation*, 7(2), 57. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020057>

Chapitre 5 :

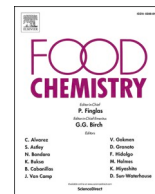
Multi-method study of the impact of fermentation on the polyphenol composition and color of Grenache, Cinsault, and Syrah rosé wines

Ce chapitre s'intéresse aux changements de couleur et de composition phénolique survenant au cours de la fermentation alcoolique des vins rosés issus de Grenache, Cinsault et Syrah. Cette étude a combiné la caractérisation globale des composés phénoliques et de la couleur par spectrophotométrie UV-visible, l'analyse de la composition phénolique par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse triple quadripolaire, ciblée sur 106 composés incluant les produits de dépolymérisation des proanthocyanidines et de leurs dérivés par phloroglucinyse, et l'étude des profils de distribution des tailles moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique à haute performance. Ces techniques ont été utilisées pour l'analyse des moûts et des vins correspondants aux points centraux des plans d'expérience décrits dans le chapitre précédent et des extraits désorbés des parois de levures à l'issue de la fermentation.

Les couleurs très différentes observées pour les moûts des 3 cépages s'expliquent par des compositions phénoliques très différentes, de même que les caractéristiques observées sur les vins. Ainsi, les moûts de Grenache et de Cinsault contenaient des pigments oligomères dérivés d'acides hydroxycinnamiques et de flavanols, non dosés par la méthode MRM ciblée mais détectés par spectrophotométrie directement et en couplage avec la chromatographie d'exclusion stérique, qui ont été perdus en grande partie pendant la fermentation en raison de leur adsorption sur les lies. La couleur des moûts de Syrah, nettement plus intense, était principalement due aux anthocyanes qui ont été converties en pigments dérivés, notamment par réaction avec les métabolites produits par la levure, lors de la fermentation alcoolique. De ce fait, la perte de couleur engendrée pendant la fermentation alcoolique a été limitée.

La couleur du vin rosé dépend du niveau d'extraction et de l'état d'oxydation au stade du moût, qui déterminent tous deux la composition du moût et, par conséquent, les réactions et interactions des polyphénols qui se produisent pendant la fermentation. Les résultats obtenus pour la Syrah suggère une extraction plus facile des pigments à partir de ce cépage, malgré un temps de macération inférieur et un sulfitage ayant pu impacter les phénomènes d'extraction.

Ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « Multi-method study of the impact of fermentation on the polyphenol composition and color of Grenache, Cinsault, and Syrah rosé wines » et publiée dans le journal FoodChemistry en mars 2023.



Multi-method study of the impact of fermentation on the polyphenol composition and color of Grenache, Cinsault, and Syrah rosé wines

Cécile Leborgne^{a,b}, Marie-Agnès Ducasse^d, Emmanuelle Meudec^{a,c}, Stéphanie Carrillo^a, Arnaud Verbaere^{a,c}, Nicolas Sommerer^{a,c}, Matthias Bougreau^b, Gilles Masson^b, Aude Vernhet^a, Jean-Roch Mouret^a, Véronique Cheynier^{a,c,*}

^a SPO, INRAE, Univ Montpellier, Institut Agro, Montpellier, France

^b Institut Français de la Vigne et du Vin, Centre du rosé, Vidauban, France

^c INRAE, PROBE Research Infrastructure, Polyphenol Analytical Facility, Montpellier, France

^d Institut Français de la Vigne et du Vin, UMT Oenotypage, Domaine de Pech Rouge, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Wine
Polyphenols
Fermentation
Rosé wine color
HPSEC
UPLC-QqQ-MS

ABSTRACT

Rosé wines show large color diversity, due to different phenolic pigment compositions. However, the mechanisms responsible for such diversity are poorly understood. The present work aimed at investigating the impact of fermentation on the color and composition of rosé wines made from Grenache, Cinsault, and Syrah grapes. Targeted MS analysis showed large varietal differences in must and wine compositions, with higher concentrations of anthocyanins and flavanols in Syrah. UV-visible spectrophotometry and size exclusion chromatography data indicated that Grenache and Cinsault musts contained oligomeric pigments derived from hydroxycinnamic acids and flavanols which were mostly lost during fermentation due to adsorption on lees. Syrah must color was mainly due to anthocyanins which were partly converted to derived pigments through reactions with yeast metabolites with limited color drop during fermentation. This work highlighted the impact of must composition, reflecting varietal characteristics, on changes occurring during fermentation and consequently wine color.

1. Introduction

Color is one of the key elements for the marketing of rosé wines (Peres, Giraud-Heraud, Masure, & Tempere, 2020). Their broad range of color is due to the presence of pigments belonging to phenolic compounds extracted from grapes or formed during wine-making. The major pigments in *Vitis vinifera* grapes and wines are red anthocyanins, represented mainly by malvidin-3-O-glucoside. The specific rosé wine-making process, involving controlled maceration of skins in the juice before a liquid phase alcoholic fermentation, limits extraction, resulting in different proportions of phenolic compounds in rosé wines compared to red wines. Indeed, studies on red and rosé wines made from Grenache showed that hydroxycinnamic acids are the main phenolic compounds of rosé wines whereas flavanols are predominant in red wines (Wirth et al., 2012). Moreover, a recent study performed on 268 commercial rosé wines showed that, although color intensity depends on extraction of phenolic compounds from grape skins, the different nuances of light

and more intense rosé wines are due to different pigment compositions (Leborgne et al., 2022).

Hydroxycinnamic acids and their derivatives are colorless. Nevertheless, enzymatic oxidation of hydroxycinnamoyltartrates, especially caftaric acid, is known to be involved in the browning of white musts and may also occur in rosé wine-making, as pressing takes place before fermentation when polyphenoloxidase is still active. This process involves oxidation of hydroxycinnamoyltartrates to caftaric acid o-quinone, followed by addition of glutathione to form Grape Reaction Product (GRP), i.e. 2-S-glutathionyl caftaric acid (Cheynier, Trousdale, Singleton, Salgues, & Wylde, 1986). After glutathione depletion, o-quinones can proceed to brown oxidation products (Sarni-Manchado, Cheynier, & Moutounet, 1997). Caftaric acid o-quinones can also add to anthocyanins, generating anthocyanin-caftaric adducts (Sarni-Manchado et al., 1997). Free hydroxycinnamic acids or vinylphenols resulting from their decarboxylation react with anthocyanins to form phenylpyranoanthocyanin pigments (Fulcrand, dos Santos, Sarni-

* Corresponding author at: SPO, INRAE, Univ Montpellier, Institut Agro, Montpellier, France.

E-mail address: veronique.cheynier@inrae.fr (V. Cheynier).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134396>

Received 21 March 2022; Received in revised form 29 August 2022; Accepted 21 September 2022

Available online 24 September 2022

0308-8146/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Manchado, Cheynier, & Favre-Bonvin, 1996; Schwarz, Wabnitz, & Winterhalter, 2003).

Flavanols found in grapes and wines include monomers (catechins) and oligomers and polymers, i.e. proanthocyanidins (PA). They are colorless but can be involved in oxidative browning (Es-Safi, Le Guernevé, Fulcrand, Cheynier, & Moutounet, 1999; Guyot, Vercauteren, & Cheynier, 1996) and react with anthocyanins to form derived pigments (Cheynier et al., 2006; Leborgne et al., 2022).

In particular, flavanol and anthocyanin condensation with acetaldehyde, which can be produced by yeast metabolism and but also by oxidation, leads to purple ethyl linked anthocyanin-flavanol adducts (Somers, 1971). These molecules are unstable and yield flavanypyranoanthocyanin (Mateus, Silva, Santos-Buelga, Rivas-Gonzalo, & de Freitas, 2002) and other products through random reaction cascades (Vallverdú-Queralt et al., 2017).

During alcoholic fermentation, the reactions of anthocyanins with yeast aldehyde metabolites such as acetaldehyde or pyruvic acid generate orange pigments, pyranoanthocyanins (e.g. vitisin B, i.e. pyranomalvidin 3-glucoside) and carboxy-pyranoanthocyanins (e.g. vitisin A, i.e. carboxypyranomalvidin 3-glucoside) respectively (Bakker & Timberlake, 1997; Benabdeljalil et al., 2000; Fulcrand, Benabdeljalil, Rigaud, Cheynier, & Moutounet, 1998).

Adsorption of phenolic compounds and in particular of flavanols and anthocyanin pigments on yeasts is also known to impact wine color, depending on the strain (Morata et al., 2003). Preferential interactions of acylated anthocyanins (Morata, Gómez-Cordovés, Colomo, & Suárez, 2005) along with oligomeric proanthocyanidins (Vernhet et al., 2020) with yeast cells have been demonstrated, accounting for 2 to 8 % of the color loss observed during liquid phase fermentation of red must (Morata et al., 2003, 2005; Vernhet et al., 2020).

All above mentioned studies have been performed in red wine or model solutions mimicking red wines while very limited data is available on rosé wines. The few investigations performed on rosé wines showed that their phenolic composition is highly variable, close to that of red wines for the darker rosés but very different for the light ones (Lambert et al., 2015; Leborgne et al., 2022; Wirth et al., 2012). Moreover, large variations in the extent of color loss taking place during fermentation have been reported to be highly variable but the mechanisms responsible for the observed color loss and causes of such variability are unknown.

The hypothesis of the present work was that the color and composition of light and darker rosé wines are driven by different mechanisms occurring during alcoholic fermentation, depending on the must composition. To test this hypothesis, the reactions and adsorption on yeast lees of phenolic compounds and their role in color and composition changes during alcoholic fermentation of rosé musts were investigated. To this aim, three different *Vitis vinifera* grape varieties commonly used for the elaboration of rosé wines in French Provence area were selected for their different color potential: Grenache, Syrah, and Cinsault (Cayla, Pouzalgues, & Masson, 2011).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

HPLC grade formic acid, methanol and *N,N*-dimethylformamide were purchased from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Acetaldehyde, acetic acid, acetone, hydrochloric acid, lithium chloride, phloroglucinol, L-ascorbic acid, sodium hydrogen sulfite and ammonium formate were purchased from Sigma Aldrich. Deionized water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France).

Standards of caffeic acid (>99 %), vanillic acid (>99 %) and ferulic acid (>99 %) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Standards of syringic acid (>99 %), *p*-coumaric acid (>98 %), quercetin (>95 %), (+)-catechin (>99 %), (-)-epicatechin (>98 %), (-)-epicatechin

3-*O*-gallate (>97.5 %), protocatechuic acid (>95 %), reduced and oxidized glutathione (>98 %) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standards of malvidin 3-*O*-glucoside chloride (>95 %) and malvidin 3,5-diglucoside chloride (>97 %) were purchased from Extrasynthese (Geney, France). Standards of *trans*-caftaric acid (>94 %), quercetin 3-*O*-glucoside (>90 %) and procyanidin dimer B2 (>90 %) were purchased from Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany).

2.2. Oenological analysis

Free sulfites, total sulfites, sugar and assimilable nitrogen contents were measured with a Fourier-transform infrared (FTIR) spectrometer (Foss, Nanterre, France) following the OIV method (OIV, 2019). A pHmeter (Mettler Toledo®, Viroflay, France) was used to measure pH in samples. A turbidimeter (Mettler Toledo®, Viroflay, France) was used to measure turbidity.

2.3. Must preparation

The three different *Vitis vinifera* grape varieties Cinsault, Grenache and Syrah were harvested and processed by the Centre du Rosé (IFV, Vidauban, France) in September 2018. A hundred kg of grapes were hand harvested in 20 kg grape containing bins in order to avoid grape crushing and uncontrolled maceration. At the arrival to the cellar, grapes were kept at 12 °C and processed the day after for all grapes to be treated at the same temperature. Grapes were destemmed and crushed with addition of pectolytic enzyme (Kzym 4 g/100 kg, 26,800 polygalacturonase units/100 kg, Laffort, France) and added with 3 g/100 kg potassium hydrogen sulfite for protection against oxidation and microbial contamination (4 g/100 kg more potassium hydrogen sulfite was added to the Syrah must as harvest contained visual microbial contamination on grapes). Musts were then submitted to controlled maceration at 18 °C during 2 h for Syrah, 4 h for Grenache and 12 h for Cinsault, according to standardized wine-making process developed by the Centre du Rosé. After maceration, grapes were pressed with addition of 1.5 g/100 kg potassium hydrogen sulfite to protect from oxidation during the press cycle. The free run juice and the press juice were recovered separately. Twenty liters of free-run and first press juice were sampled to constitute musts with “low” extraction level (Syrah1, Grenache1, and Cinsault1). Then, 10 L of that juice was pooled with 10 L of end press juice to elaborate musts with “high” extraction level (Syrah2, Grenache2, and Cinsault2). Musts were clarified by cold settling at 12 °C before racking. Analysis of the musts were performed at the Centre du Rosé. Clarified musts and solid particles were stored at -20 °C until use.

After thawing and centrifugation (4000 g, 5 °C, 10 min) (Jouan, Nantes, France) of each must, pH was adjusted to 3.5 using hydrochloric acid (50 %, v/v) or sodium hydroxide (32 %, w/w). Solid particles collected after racking were added to the musts to reach a turbidity of 135 NTU (Nephelometric Turbidity Unit) and sugar concentration was normalized at 250 g/L by the addition of a fructose and glucose mixture (50:50, v/v). Assimilable nitrogen content was at 163 mg/L for both Grenache musts, 148 mg/L for both Syrah musts and 185 mg/L for both Cinsault musts. Musts were conditioned in 2L buckets before distributing into fermenters (Legallais, Montferrier-sur-Lez, France). For each must, three aliquots of 50 mL were taken for color analysis that was performed on the same day at the experimental unit of Pech Rouge (IFV, Gruissan, France). Twenty 1 mL aliquots were sampled for polyphenol analysis and stored at -80 °C until analysis.

2.4. Fermentation

Grenache and Cinsault fermentations were conducted in quadruplicate in 300 mL fermenters filled with 250 mL of must (controlled by weighing). Syrah fermentations were performed in duplicate in the same containers. All fermenters and vials were protected from oxidation using inert gas Argon. Fermenters were equipped with fermentation airlock

systems allowing to maintain anaerobiosis. All fermenters were placed in a thermoregulated room set at 16 °C and stirred at 150 rpm. Sulfites were added to Cinsault and Grenache musts using a potassium hydrogen sulfite solution (222 g/L) to reach 50 mg/L of total sulfite content, our target value. Syrah1 and Syrah2 were respectively at 101 mg/L and 89 mg/L of total sulfite content before fermentation. All fermenters were maintained at 16 °C for 24 h before inoculation.

Active dry yeasts (K1 strain, ICV, France) were rehydrated for 20 min at 37 °C using a glucose solution in water (50 g/L) before inoculation at 0.4 g/L. Fermentation kinetics were manually monitored by weight losses induced by CO₂ release. Fermentations were considered achieved when no weight loss higher than 0.1 g per 24 h was observed. All wines were fermented to dryness (less than 2 g/L residual sugar) with no interruption in around 20 days. Yeasts were collected by centrifugation (4000 g, 10 °C, 15 min), frozen and stored at -20 °C until analysis. For each fermenter, 50 mL of wine were taken for color analysis and 5 samples of 1 mL sampled for polyphenol analysis and stored at -20 °C until analysis.

To provide control yeast samples, fermentations in synthetic grape must were carried out under the same conditions in triplicate. The synthetic must contained 425 mg/L of assimilable nitrogen, 200 g/L of sugar (glucose:fructose), salts, vitamins and weak acids as described by Bely, Sablayrolles, and Barre (1990).

2.5. Desorption from lees

The method used for polyphenol desorption from lees was adapted from Vernhet et al. (2020). Yeasts recovered from each 250 mL fermentation were rinsed with 10 mL of distilled water, freeze-dried and weighed to determine the dry mass per mL. Three successive extractions were performed on 80 mg of dry yeast. Each extraction was performed by addition of 0.25 mL volume of solvent A (methanol, 1 % formic acid) followed by 5 min of sonication. Then, 1.75 mL volume of solvent B (acetone/water (60/40), 1 % formic acid) was added and the extraction carried out during 30 min alternating 5 min of sonication and 10 min of stirring before centrifugation (10000 g, 10 °C, 10 min). The three extracts (3 × 2 mL) were pooled and separated in three 2 mL aliquots, evaporated to dryness under vacuum using a Genevac (SP Scientific, Warminster, PA, USA) and stored at -80 °C.

2.6. UV-visible spectrophotometry

A Shimadzu UV-1900 UV-visible spectrophotometer was used to perform UV-Visible absorbance measurements following the protocols described by Atanasova, Fulcrand, Cheynier, & Moutounet (2002), using a 1 cm path length cell and adapting dilution to obtain absorbance values between 0.01 and 1.

Direct absorbance measurements were achieved on wines and musts from 230 nm to 800 nm. The three CIELab color space parameters were calculated from the spectrum according to OIV method OIV-MA-AS2-11 (OIV, 2019) along with the hue angle ($H = \arctg \frac{b^*}{a^*}$). Absorbance values at 520 nm (A_{520}), 420 nm (A_{420}), and 620 nm (A_{620}) were extracted from each spectrum and used to calculate color intensity ($CI = A_{420} + A_{520} + A_{620}$).

Total polyphenol index (TPI) at 280 nm, total red pigments (TRP) at 520 nm, total yellow pigments at 420 nm (TYP) and absorbance at 320 nm (A_{320}) were measured 20 min after dilution of wines, musts and lees extracts in 1 M HCl solution ($TPI = A_{280} \times F_D$ (dilution factor); $TRP = A_{520-HCl\ 1M} \times F_D$; $TYP = A_{420-HCl\ 1M} \times F_D$ and $A_{320} = A_{320-HCl\ 1M} \times F_D$). Dry lees extracts, were dissolved in 1 mL of MeOH:H₂O (1:1, v/v), 1 % formic acid prior to dilution in 1 M HCl solution and absorbance values of control were subtracted from those of samples.

Absorbance at 520 nm was measured 5 min after addition of 60 µL of sodium hydrogen sulfite solution (200 g/L) to 4 mL of wine or must, to determine the sulfite bleaching resistant fraction of pigments ($NBP =$

A_{520-SO_2}). A_{520} was also determined on musts and wines 40 min after addition of 40 µL of a 12.6 % (v/v) acetaldehyde aqueous solution to 4 mL of samples to trap sulfites and convert bisulfite adducts to flavylum ions. This enabled calculation of the concentrations of bisulfite adducts ($BA = A_{520-acetaldehyde} - A_{520}$), flavylum forms ($AH = A_{520-A_{520-SO_2}}$) and hydrated forms ($HF = TRP - A_{520-acetaldehyde}$) of pigments susceptible to sulfite bleaching.

2.7. High performance size-exclusion chromatography (HPSEC)

Wines (1 mL) and yeast extracts (2 mL, corresponding to 27 mg dry yeast) were evaporated to dryness under vacuum using a Genevac (SP Scientific, Warminster, PA, USA) and the residue dissolved in 500 µL of the HPSEC mobile phase composed of N,N-dimethylformamide (DMF), 1 % (v/v) glacial acetic acid, 5 % (v/v) water, and 0.15 M lithium chloride. To eliminate sugar, must samples were previously purified by solid phase extraction on 500 mg/3 mL tC18 cartridges (Strata®, 55 µm, 140 Å, Phenomenex, Le Pecq, France), according to the method described by (Oszmianski, Ramos, & Bourzeix, 1988). After loading the sample (1 mL), elution of sugars was achieved using 3 mL of water containing 1 % (v/v) formic acid and monitored by refractometry until no longer detectable (less than 0.5 % Brix). Phenolic compounds were then desorbed using 3 mL of acetone/water (60/40, v/v) acidified with 1 % (v/v) formic acid and taken to dryness under vacuum using a Genevac (SP Scientific, Warminster, PA, USA). The dry residue was dissolved in 500 µL of the HPSEC mobile phase. Polyphenol loss was evaluated by comparing absorbance values obtained on the fractions with those of the initial musts.

Separation was achieved on an Agilent 1260 HPLC system (Agilent, France) constituted of a vacuum degasser, an autosampler chamber set at 15 °C, an isocratic pump, a column heater set at 60 °C, and a diode array detector and equipped with a guard column containing highly cross-linked polystyrene-divinylbenzene (50 × 7.8 mm, 5 µm) and 3 PLgel columns (Phenomenex, Le Pecq, France) composed of the same material (300 × 7.8 mm, 5 µm and 50, 1000 and 1000000 Å pore size) connected in series (Kennedy & Taylor, 2003). The flow rate was set at 1 mL/min and the polyphenol elution time was calibrated using commercial standards (caffeic acid (>99 %), p-coumaric acid (>98 %), catechin (>99 %), malvidin 3-O-glucoside chloride (>95 %), procyanidin dimer B2 (>97.5 %) and A2 (>99 %) and tannin fractions with different polymerization degrees previously purified in the laboratory (Vernhet, Carrillo, & Poncet-Legrand, 2014). Data were extracted and analyzed using the Excel software.

2.8. Polyphenol targeted analysis

Polyphenols in musts and wines were analyzed by ultra high-performance liquid chromatography coupled to triple-quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ-MS) in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, according to the method described by (Lambert et al., 2015). UHPLC-QqQ-MS analyses directly performed on the musts/wines allowed detection and quantification of 106 phenolic compounds belonging to the following groups: hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavonols, flavanol monomers, dimers, and trimers, anthocyanins and their derivatives, namely pyranoanthocyanins, carboxypyrananthocyanins, phenylpyrananthocyanins (catechyl, hydroxyphenyl, and guaiacylpyrananthocyanins), flavanol-anthocyanin (F-A) and anthocyanin-flavanol (A-F) dimers, and anthocyanin-flavanol dimer adducts (F-ethyl-A), and ethyl linked flavanol dimers (F-ethyl-F). The list of phenolic groups, variables, and MRM transitions used are provided in supporting information S1. Results are expressed as the sums of concentrations of all variables in each group.

Constitutive units of proanthocyanidins were analyzed by UHPLC-DAD after acid-catalyzed depolymerization in the presence of phloroglucinol. The residue obtained after taking to dryness 1 mL of must or

wine using a Genevac (SP Scientific, Warminster, PA, USA) was dissolved in 250 μL of a solution containing phloroglucinol (50 g/L) and ascorbic acid (1 g/L) in methanol at 0.2 N HCl. The phloroglucinolysis reaction was carried out for 20 min at 50 $^{\circ}\text{C}$, and stopped by addition of 200 mM ammonium formate buffer (250 μL), according to the method described by (Kennedy & Jones, 2001). An internal standard, 50 μL of *p*-hydroxybenzoic methyl ester in methanol was added in both wines and musts samples (0.3 g/L) after the reaction was completed. For yeasts, the depolymerisation reaction was performed directly on dry yeasts (27 mg) using 500 μL of phloroglucinolysis reagent and the same volume of ammonium formate buffer at 200 mM. Constitutive units of flavanol derivatives released after acid-catalyzed depolymerization in the presence of phloroglucinol were analyzed by UHPLC using a Vanquish UHPLC equipped with an Ethylene Bridged Hybrid C18 (1.0 \times 150 mm, 1.7 μm) and a diode array detector (DAD) used for quantification. Standards of catechin and epicatechin were used for the quantification of flavanols and their phloroglucinol adducts. Total flavan-3-ol units released by phloroglucinolysis were calculated. The average degree of polymerisation (mDP) was also evaluated as the ratio of all flavan-3-ol units after phloroglucinolysis to the sum of terminal units.

2.9. Statistical analysis

Analysis Of VAriance were performed with RStudio version 4.0.3 software (www.rstudio.com (2020-10-10)) using Student-Newman-Keuls post-hoc test in Agricolae package. ANOVA results were considered significant at p -value < 0.05.

3. Results and discussions

3.1. Musts

3.1.1. Spectrophotometry analysis

Total polyphenol index (TPI) presented in Table 1 showed differences between all six musts with significantly higher values for Syrah compared to Grenache musts. Cinsault1 was intermediate while Cinsault2 had higher absorbance values than Syrah musts. For all varieties, musts containing press juice showed higher TPI values than free-run juice, confirming higher polyphenol extraction rates. The total red pigment (TRP) levels were much higher in Syrah musts with values of 6.51 and 7.47, respectively, for Syrah1 and Syrah2, followed by Cinsault2 (2.41) and Cinsault1 (1.25) while values were very low in Grenache musts (0.42 and 0.57, respectively for Grenache1 and Grenache2). The same trend was observed for Total Yellow Pigment (TYP) values, ranging from 0.61 for Grenache1 to 2.06 for Syrah2. All TRP and TYP values were also significantly higher in musts containing press juice, again indicating higher pigment extraction rates. This was also observed on the A_{520} values measured directly on musts but these values were significantly higher in Cinsault than in Syrah. When A_{520} values were measured after addition of acetaldehyde ($A_{520\text{-acetaldehyde}}$), the impact of grape variety was very similar to that observed on TRP values. The concentration of bisulfite adducts was high in Syrah musts, representing about 20 % of TRP, while it was very low in Grenache and Cinsault musts. Thus, Syrah musts contained larger concentrations of anthocyanin pigments than Cinsault but appeared less colored at wine pH because of the presence of higher concentrations of sulfites, causing sulfite bleaching. Values measured after addition of sulfite were significantly higher in Cinsault2 than in Cinsault1 and in both Cinsault musts compared to Grenache and Syrah musts. However, non-bleachable pigments represented a higher proportion of red pigments contributing to rosé must color (A_{520}) in Grenache (60 %) than in Cinsault (47 % and 30 %, respectively in Cinsault1 and Cinsault2), and in Syrah (12 % and 16 %, respectively in Syrah1 and Syrah2). NBP represented 13 to 26 % of total red pigments in Grenache and Cinsault musts but only 1 % in Syrah musts.

Values of the L^* parameter ranged from 50 to 90 and were negatively

correlated with A_{520} measured directly on wine ($R^2 = -0.98$) and with color intensity ($R^2 = -0.93$). Must color also showed qualitative differences. Syrah musts were red with high values of a^* , low values of b^* and a reddish hue while Grenache musts appeared as light salmon rosé with high values of b^* compared to a^* and a higher hue value. Cinsault musts showed high values of both a^* and b^* giving an orange hue.

3.1.2. Polyphenol targeted analysis

Targeted MS analysis (Fig. 1 and supporting information S2) showed large composition variations between the musts, with much lower amounts of polyphenols in Cinsault and Grenache musts than in Syrah musts.

Concentrations were also significantly higher in Cinsault and Syrah musts containing press juice than in free run juice while those of Grenache1 and Grenache2 were not significantly different.

Hydroxycinnamic acid derivatives, represented mostly by caftaric acid and GRP, were the most abundant phenolic compounds in Grenache and Cinsault musts, with significantly lower amounts in Cinsault1. These molecules were also found in large amount in Syrah musts which however contained much higher concentrations of anthocyanins and flavanols monomers and dimers. Anthocyanins were the major polyphenolic compounds of Syrah musts while almost absent in Grenache musts. Significant differences were also observed between the two levels of extraction for Cinsault and Syrah musts, with higher levels of all groups of phenolic compounds in musts containing press juice.

The musts also contained different concentrations and proportions of anthocyanin derived pigments. These pigments were particularly abundant in Cinsault2, which contained significantly higher amounts of caftaric-anthocyanin adducts, resulting from enzymatic oxidation. These compounds were the predominant derived pigments in Cinsault and Grenache musts while Syrah musts contained significantly higher amounts of phenylpyranoanthocyanins, flavanylpyranoanthocyanins and flavanol-anthocyanin adducts. The concentrations of carboxypyrananthocyanins and pyrananthocyanins were also significantly higher in Cinsault2, Syrah1 and Syrah2 than in the three other musts. These molecules resulting from reactions of anthocyanins with pyruvic acid (Fulcrand et al., 1998) and acetaldehyde (Benabdeljalil et al., 2000) have been reported in grape, as well as flavanol-anthocyanin adducts (Pinasseau et al., 2017).

Comparison of the total concentrations of phenolic compounds measured by the MRM method with TPI and TYP values suggests that a large proportion of compounds contributing to absorbance at 280 nm and 420 nm in Cinsault and Grenache musts are missing in the targeted MRM method. These compounds likely correspond to larger proanthocyanidin oligomers and polymers (DP > 3) or derived polyphenols formed in the early stages of must preparation, in particular by enzymatic oxidation. Indeed, enzymatic oxidation of flavanol monomers yields yellow pigments (Guyot et al., 1996). Moreover, although proanthocyanidin oligomers are not substrates for grape PPO, they are readily oxidized by caftaric acid quinone through coupled oxidation mechanisms (Cheynier, Osse, & Rigaud, 1988). The higher concentrations of caftaric-anthocyanin adducts found in Cinsault and Grenache musts also reflect enzymatic oxidation of these musts.

Flavanol concentrations determined by phloroglucinolysis (supporting information S2) were much higher than the concentrations of monomers and dimers measured by MRM, indicating the presence of larger flavanol oligomers or derived tannins. In addition, the excess of flavanol units released from these oligomeric compounds compared to monomers and oligomers measured by MRM were significantly different in the three types of musts. Indeed, flavanol concentration after phloroglucinolysis was 1.5 times higher than before in Syrah musts, whereas it was increased by about 10-fold in Grenache musts and more than 20-fold in Cinsault musts.

Mean degree of polymerisation (mDP) values calculated from the phloroglucinolysis data were low (1.2–1.7) for Grenache and Cinsault musts, suggesting that a large proportion of polymer extension units are

Table 1
UV-visible spectrophotometry analysis performed on musts, wines and lees under various conditions. All values are given in absorbance units except for L*, a*, b* and hue. Absorbance values of lees were reported to the initial dry mass of lees and wine volume. Different superscript letters indicate significant differences between all samples (wines, musts and lees) for a given parameter (ANOVA with SNK test for *p*-value < 0.05).

	Must																																																																							
	Cinsault1			Cinsault2			Grenache1			Grenache2			Syrah1			Syrah2																																																								
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD																																																						
L*	69.95	±	2.90	g	52.43	±	1.07	h	89.75	±	1.66	c	85.18	±	3.45	d	78.80	±	0.99	e	73.15	±	0.92	fg																																																
a*	20.50	±	1.25	e	39.70	±	0.23	b	2.59	±	0.33	i	5.84	±	0.95	g	31.60	±	0.98	d	36.49	±	0.47	c																																																
b*	38.97	±	0.91	a	34.84	±	0.37	b	26.84	±	0.66	c	35.49	±	2.85	c	1.55	±	0.13	g	3.47	±	0.57	f																																																
Hue angle (H)	1.09	±	0.03	e	0.72	±	0.01	f	1.47	±	0.01	a	1.41	±	0.01	b	0.05	±	0.00	i	0.09	±	0.02	h																																																
Color Intensity (CI)	1.73	±	0.16	b	2.65	±	0.08	a	0.69	±	0.07	de	1.00	±	0.20	c	0.79	±	0.05	d	1.06	±	0.05	c																																																
Total Polyphenol Index (TPI)	11.58	±	1.11	de	16.18	±	0.28	a	8.62	±	0.11	g	10.03	±	0.22	f	13.62	±	0.15	c	15.31	±	0.13	b																																																
Total Red Pigments (TRP)	1.25	±	0.19	f	2.42	±	0.05	e	0.42	±	0.02	h	0.57	±	0.07	g	6.50	±	0.08	b	7.47	±	0.09	a																																																
Total Yellow Pigments (TYP)	1.41	±	0.17	cd	1.83	±	0.06	b	0.61	±	0.02	f	0.83	±	0.13	e	1.77	±	0.00	b	2.06	±	0.02	a																																																
A ₃₂₀	7.33	±	0.77	bc	11.37	±	0.18	a	6.28	±	0.06	d	6.81	±	0.11	cd	7.34	±	0.06	bc	7.90	±	0.10	b																																																
A ₅₂₀	0.55	±	0.05	d	1.07	±	0.02	a	0.16	±	0.02	g	0.24	±	0.05	f	0.48	±	0.03	e	0.63	±	0.01	c																																																
A ₅₂₀ -ethanol	0.49	±	0.04	f	0.96	±	0.01	c	0.18	±	0.00	i	0.28	±	0.02	g	1.88	±	0.01	b	2.08	±	0.01	a																																																
Flavylum cations (AH)	0.29	±	0.12	e	0.75	±	0.01	a	0.07	±	0.02	g	0.09	±	0.04	g	0.42	±	0.03	d	0.52	±	0.01	c																																																
Bisulfite Adducts (BA)	-0.06	±	0.06	f	-0.10	±	0.02	g	0.02	±	0.02	e	0.04	±	0.05	de	1.39	±	0.04	b	1.46	±	0.01	a																																																
Hemiketal Forms (HF)	0.76	±	0.15	g	1.46	±	0.05	e	0.23	±	0.02	hi	0.29	±	0.06	h	4.63	±	0.07	c	5.38	±	0.09	a																																																
Non Bleachable Pigments (NBP)	0.26	±	0.10	b	0.32	±	0.02	a	0.09	±	0.00	cde	0.15	±	0.02	c	0.06	±	0.00	de	0.10	±	0.00	cd																																																
Wine																																																																								
	Cinsault1												Cinsault2												Grenache1												Grenache2												Syrah1												Syrah2											
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD																																				
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD																																				
L*	93.48	±	0.33	b	86.28	±	0.40	d	97.93	±	0.10	a	97.93	±	0.10	a	75.35	±	0.21	f	72.30	±	0.28	fg																																																
a*	4.19	±	0.37	h	15.77	±	0.54	f	0.81	±	0.15	j	1.14	±	0.12	j	39.82	±	0.04	b	42.41	±	0.29	a																																																
b*	9.69	±	0.63	d	7.77	±	0.21	e	4.85	±	0.24	f	4.39	±	0.10	f	4.24	±	0.29	f	5.50	±	0.16	f																																																
Hue angle (H)	1.16	±	0.05	d	0.46	±	0.02	g	1.40	±	0.03	b	1.32	±	0.02	c	0.11	±	0.01	h	0.13	±	0.00	h																																																
Color Intensity (CI)	0.32	±	0.02	f	0.54	±	0.02	e	0.11	±	0.00	g	0.11	±	0.00	g	0.98	±	0.01	h	1.13	±	0.02	c																																																
Total Polyphenol Index (TPI)	6.63	±	0.09	h	10.11	±	0.09	f	5.01	±	0.10	i	5.11	±	0.14	i	11.03	±	0.10	e	11.89	±	0.01	d																																																
Total Red Pigments (TRP)	0.44	±	0.04	h	1.17	±	0.02	f	0.15	±	0.01	i	0.16	±	0.01	i	5.03	±	0.03	d	5.65	±	0.03	c																																																
Total Yellow Pigments (TYP)	0.25	±	0.02	h	0.45	±	0.02	g	0.09	±	0.01	i	0.09	±	0.01	i	1.35	±	0.00	d	1.53	±	0.03	c																																																
A ₃₂₀	3.98	±	0.09	d	7.57	±	0.05	a	4.09	±	0.13	d	4.00	±	0.08	d	6.59	±	0.11	c	6.84	±	0.02	b																																																
A ₅₂₀	0.10	±	0.01	j	0.25	±	0.01	f	0.03	±	0.00	k	0.03	±	0.00	k	0.63	±	0.00	c	0.71	±	0.01	b																																																
A ₅₂₀ -ethanol	0.10	±	0.01	j	0.24	±	0.01	h	0.03	±	0.00	k	0.03	±	0.00	k	0.74	±	0.00	e	0.79	±	0.00	d																																																
Flavylum cations (AH)	0.06	±	0.00	g	0.19	±	0.01	f	0.02	±	0.00	g	0.03	±	0.00	g	0.56	±	0.00	bc	0.62	±	0.01	b																																																
Bisulfite Adducts (BA)	0.00	±	0.00	ef	-0.01	±	0.01	ef	0.00	±	0.00	ef	0.00	±	0.00	ef	0.11	±	0.01	c	0.08	±	0.01	cd																																																
Hemiketal Forms (HF)	0.34	±	0.03	h	0.93	±	0.02	f	0.12	±	0.01	e	0.13	±	0.01	e	4.28	±	0.03	d	4.86	±	0.03	b																																																
Non Bleachable Pigments (NBP)	0.04	±	0.00	de	0.06	±	0.00	de	0.01	±	0.00	e	0.01	±	0.00	e	0.07	±	0.00	de	0.09	±	0.00	cde																																																
Lees																																																																								
	Cinsault1												Cinsault2												Grenache1												Grenache2												Syrah1												Syrah2											
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD																																				
	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD	Mean	±	SD																																				
Total Polyphenol Index (TPI)	0.62	±	0.07	bc	1.41	±	0.16	a	0.48	±	0.13	c	0.67	±	0.05	bc	0.85	±	0.04	b	0.69	±	0.06	bc																																																
Total Red Pigments (TRP)	0.13	±	0.01	b	0.28	±	0.06	a	0.11	±	0.05	b	0.15	±	0.02	b	0.18	±	0.00	b	0.18	±	0.01	b																																																
Total Yellow Pigments (TYP)	0.20	±	0.02	ab	0.30	±	0.07	a	0.19	±	0.07	ab	0.24	±	0.02	a	0.10	±	0.00	bc	0.07	±	0.01	c																																																
A ₃₂₀	0.64	±	0.07	bc	1.44	±	0.09	a	0.59	±	0.12	bc	0.74	±	0.05	b	0.48	±	0.01	c	0.46	±	0.01	c																																																

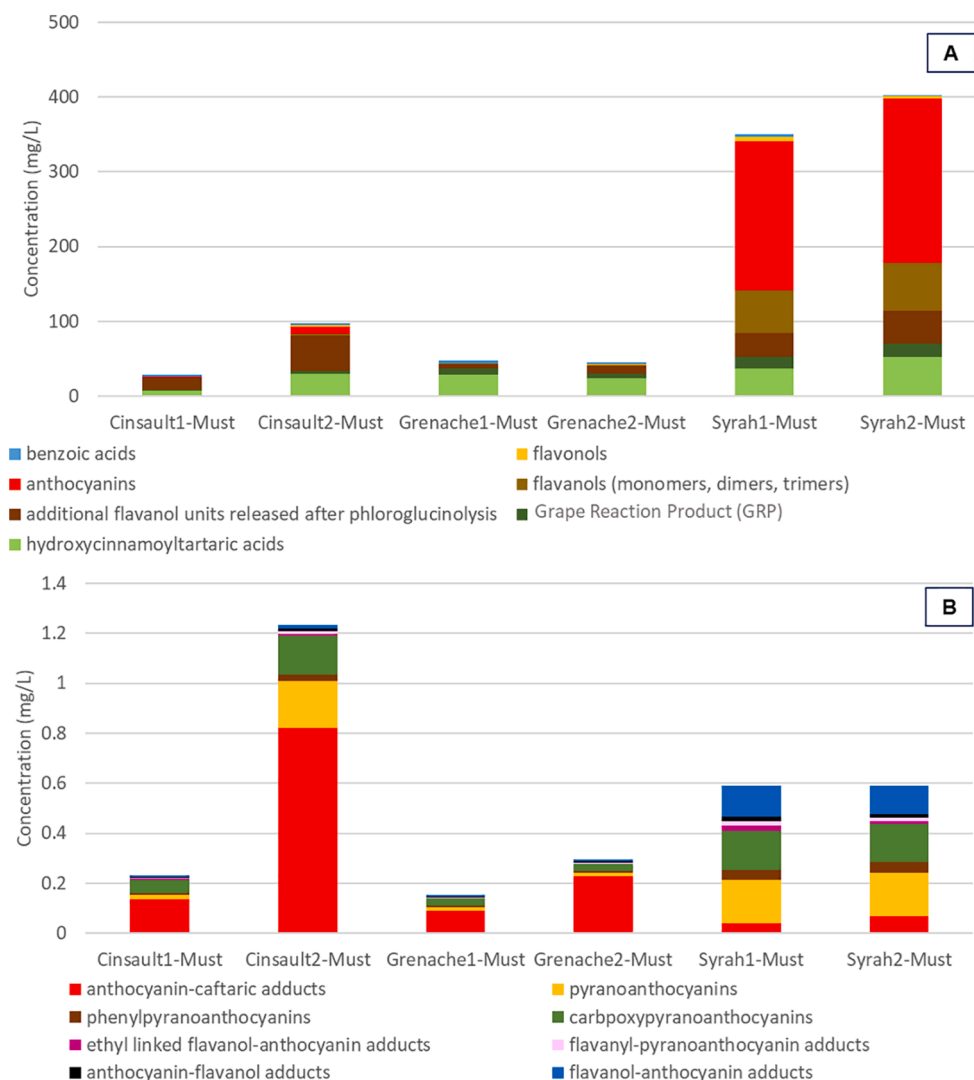


Fig. 1. Concentration of native (A) and derived (B) polyphenolic compounds in the six musts.

derived units which are not taken into account in the calculation. These values were significantly higher for Syrah musts (about 4), illustrating the structural differences between oligomers of Syrah musts compared to those of Grenache and Cinsault. However, the flavanol units released by phloroglucinolysis accounted for only part of the high TPI values measured in these musts and especially in Cinsault2, meaning that they also reflect the presence of unknown compounds, covalently linked or not to flavanols.

Flavonols and benzoic acids were found in low quantities for all musts. No significant difference was observed for benzoic acids while flavanol concentrations were significantly higher in Syrah musts and in Cinsault2 musts than in the other three.

3.1.3. High performance size-exclusion chromatography

Polyphenol losses on the SPE column used to eliminate sugars prior to SEC analysis were evaluated by UV-visible spectrophotometry. Losses measured at 280 nm, 320 nm, 420 nm and 520 nm were below 10 %, except for Cinsault must pigments for which higher losses (up to 30 % at 420 nm and 40 % at 520 nm) were recorded, indicating the specific composition of these musts compared to Syrah and Grenache musts.

HPSEC profiles of the musts are displayed in Fig. 2. Elution times of different phenolic compounds/fractions are also provided (supporting information S3). The profiles showed the presence of different populations in size, eluted between 22 and 31 min. Those recorded for both

Syrah musts were similar, showing a major peak eluted around 27–28 min and a smaller one eluted around 26 min, and completely different from those of Cinsault and Grenache musts, with three distinct peaks.

In Syrah musts, the major peak eluted at 27.3 min absorbing at all wavelengths and close to the retention time of A2 dimer and malvidin 3-glucoside can be attributed to red pigments such as anthocyanin monoglucosides found in large quantities in Syrah musts. Similarly, the peak eluted at 26.5 min, visible at A₅₂₀, A₂₈₀ and A₄₂₀, corresponds to pigments with slightly larger hydrodynamic diameters, such as acylated anthocyanins. It is worth emphasizing that under the elution conditions used in SEC, i.e. low acidity of the mobile phase, most anthocyanin pigments are not under their flavylium cation form and thus do not absorb in the visible range (Vernhet et al., 2020). Two peaks eluted at 27.7 min and 28 min and detected only at A₂₈₀ and A₃₂₀, were visible in all musts. Their retention time and their particular ratio of A₃₂₀ to A₂₈₀ superior to 1, along with their concentrations higher in Syrah than in Cinsault2 and lower in the other three must samples, allowed to attribute them to caftaric and coutaric acids. Compounds with the highest hydrodynamic diameter are eluted at 25 min, corresponding to the elution time of higher molecular weight species present in a fraction of apple procyanidins with an average polymerization degree of 6. The profiles recorded at 280 nm show that these polymeric compounds are much more abundant in Cinsault than in the other musts and in Cinsault2 than in Cinsault1, in agreement with the results of

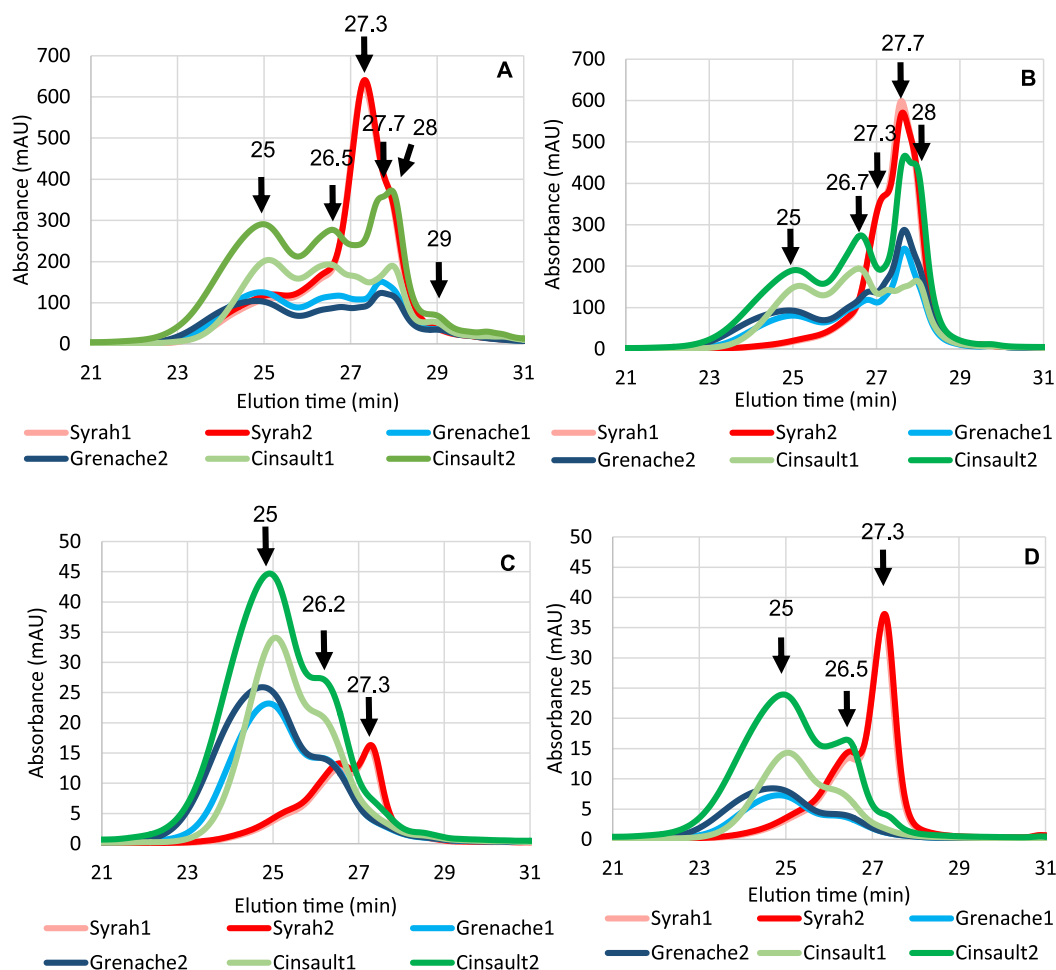


Fig. 2. Analysis of polyphenols from musts by HPSEC. (A) at 280 nm (B) at 320 nm (C) at 420 nm (D) at 520 nm. Values and arrows indicate the elution time of different polyphenolic compounds. The elution time of different polyphenols were determined first (supporting information S3) and were as follows: *p*-coumaric acid, 29.6 ± 0.13 min; caffeic acid, 29 ± 0.13 min; catechin, 28 ± 0.13 min; oenin chloride, 27.5 ± 0.13 min; aDP6 apple tannins, 25 ± 0.13 min; aDP 40 apple tannins, 23.7 ± 0.13 min).

spectrophotometry and phloroglucinolysis analysis. Moreover, the profiles recorded at the other wavelengths indicate that they have different structures in the different musts. Indeed, the polymers detected in Syrah absorb mostly at 280 nm and much less in the visible range, suggesting that they consist of flavan-3-ol oligomers and derivatives absorbing only at 280 nm, along with some derived pigments. Among these pigments, flavanol–anthocyanin adducts, like their anthocyanin precursors, are mostly under hydrated colorless form in mildly acidic media such as the SEC elution phase (Salas, Guernevé, Fulcrand, Poncet-Legrand, & Cheyrier, 2004) while ethyl-linked flavanol–anthocyanin adducts and pyranoanthocyanins are colored (Bakker & Timberlake, 1997; Somers, 1971). In the Cinsault and Grenache musts, compounds eluted between 23 and 27 min showed higher absorbance values than the Syrah musts at 420 and 520 nm indicating that they also contain yellow and red chromophores.

The width of the peak eluted at 26.5 min (Fig. 2A) suggests a coelution of several compounds corresponding to larger hydrodynamic diameters than B2 dimer. The high absorbance values at 320 nm (A280/A320 below 1) at 26.7 min, suggest the presence of molecules containing hydroxycinnamic acids moieties that are not matching GRP quantification results. The caftaric-anthocyanin adducts detected by LC-MS in higher amounts in the Cinsault and Grenache musts may contribute to the peak eluted at 26.2 min. These compounds show absorbance at 280 and 320 nm but are mostly colorless under the SEC elution conditions (Sarni-Manchado et al., 1997).

Taken together, these results indicate very different compositions for the six musts. Syrah musts exhibited higher TPI and TRP values and contained larger concentrations of anthocyanins, flavanols and hydroxycinnamic acids, and of pigments derived from these molecules,

namely flavanol–anthocyanin adducts, flavanlypyranoanthocyanins and phenylpyranoanthocyanins, than the other musts. In contrast, Cinsault musts (especially Cinsault2) and, to a lesser extent, Grenache musts contained large amounts of hydroxycinnamic acids and of phenolic compounds derived from enzymatic oxidation, including caftaric-anthocyanin adducts but also a much larger proportion of unknown products involving hydroxycinnamic acid units (as shown by comparison of the SEC profiles at 280 and 320 nm), flavanol units (released after phloroglucinolysis), along with some yellow and red chromophores. These compounds are not present in the targeted method for polyphenol composition, which explains the discrepancy between TPI values and targeted polyphenol content, especially in Cinsault2. The major derived pigments detected by MRM, namely caftaric-anthocyanin adducts in Grenache and Cinsault versus pyranoanthocyanins, carboxypyrananthocyanins, and flavanol–anthocyanin derived pigments in Syrah can be considered as markers of the different families of polyphenol derivatives evidenced by HPSEC analysis. These composition differences are related to the extent of extraction, increasing with pressing intensity. The concentrations of anthocyanins and flavanols could not be explained by maceration duration which was shorter for Syrah compared to Grenache and Cinsault. This may be due to varietal differences as high concentrations of anthocyanins as well as high extractability of both anthocyanins (Romero-Cascales, Ortega-Regules, López-Roca, Fernández-Fernández, & Gómez-Plaza, 2005) and proanthocyanidins (Bautista-Ortín, Martínez-Hernández, Ruiz-García, Gil-Muñoz, & Gómez-Plaza, 2016) have been reported for Syrah grapes compared to other varieties. The observed differences in pigment composition (i.e. pigments derived from hydroxycinnamic acids versus anthocyanins) can also reflect the higher extent of enzymatic oxidation

in Grenache and Cinsault compared to Syrah musts which contained higher concentration of sulfur dioxide.

3.2. Wines

3.2.1. Spectrophotometry analysis

After fermentation, Syrah wines showed significantly higher total polyphenol index values than Cinsault wines while those of Grenache wines were lower (Table 1). TPI values of Syrah and Cinsault wines made from free run juice were significantly lower compared to wines made with free run and press juice, while those of Grenache1 and Grenache2 wines were not significantly different. The same pattern was observed for TYP, TRP, CI, and A_{520} values measured directly on wine or after addition of acetaldehyde, with Syrah wines showing significantly higher absorbance values, followed by Cinsault2, then Cinsault1, and both Grenache wines (Table 1). No significant difference was observed on the content of sulfite bleaching resistant pigments. However, they represented a higher proportion of red pigments contributing to wine color (A_{520}) in Cinsault1 (NBP/ A_{520} = 42 %) than in Cinsault2 (NBP/ A_{520} = 25 %) and Grenache (NBP/ A_{520} = 29 % and 24 %, respectively in Grenache1 and Grenache2), and in Syrah (NBP/ A_{520} = 11 % and 13 %, respectively in Syrah1 and Syrah2). Bisulfite adduct concentrations were very low, but significantly higher in Syrah wines, reflecting the higher levels of sulfur dioxide. Most absorbance values were significantly lower in wine than in the corresponding must, indicating losses of

phenolic compounds (TPI) and pigments in the course of fermentation. The only exceptions were higher A_{520} values in Syrah wines than in musts, reflecting the release of anthocyanins from bisulfite adducts during fermentation, due to acetaldehyde production by yeast. Color intensity values were also reduced by 80–90 % after fermentation of Grenache and Cinsault while they were increased in Syrah, owing to the increase in A_{520} values.

TPI values were reduced by 20 % and TRP and TYP values by about 25 % during fermentation of Syrah. Losses were much more important for the other wines, representing 40–50 % of the must value for TPI, 50–70 % for TRP and 75–90 % for TYP, the lowest losses being observed for Cinsault2. Losses in absorbance values at 320 nm were also lower (10 %) for Syrah than for the other four musts (about 40 %). These differences are probably related to differences in the initial must composition although the presence of higher levels of sulfites may also have contributed.

Values of the CIEL*a*b* system parameters for wines also showed significant differences as their corresponding musts. Cinsault wines were significantly darker than Grenache wines and lighter than Syrah wines; Cinsault2 was darker than Cinsault1. Syrah wines appeared red with high values of a^* parameter and a reddish hue angle while Grenache wines and Cinsault1 appeared as light salmon rosé with higher values of b^* compared to a^* and a light orange yellowish hue (OIV, 2019). Cinsault2 showed an a^* value intermediate between those of Syrah and other wines but higher than b^* parameter giving a dark orange hue. There is

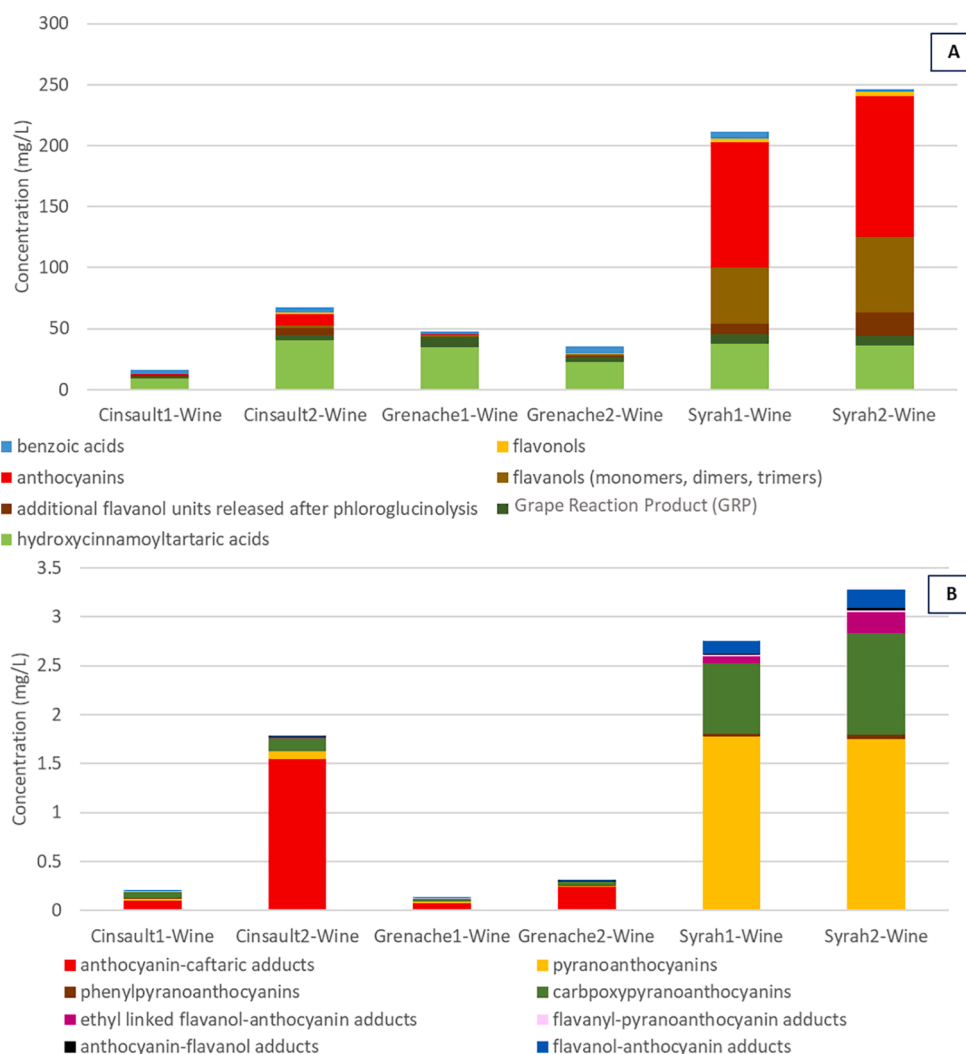


Fig. 3. Concentration of native (A) and derived (B) polyphenolic compounds in the six wines.

no definition of rosé wine color. However, colorwise, Grenache and Cinsault1 wines were similar to the light group described by Leborgne et al. (2022) whereas Syrah and Cinsault2 were qualified as dark rosé wines.

L^* values increased while a^* and b^* values much decreased during fermentation of Grenache and Cinsault. These changes were not observed on Syrah, which contained high levels of both anthocyanin pigments and sulfur dioxide. In such media, the loss of polyphenols was compensated by the conversion of colorless bisulfite adducts to anthocyanin flavylium cations, due to accumulation of acetaldehyde released by yeasts during fermentation, as above mentioned.

3.2.2. Polyphenol targeted analysis

Targeted MS analysis of the wines (supporting information S2) showed that the differences observed at must stage were maintained in the wines (Fig. 3A). Indeed, Syrah wines contained significantly higher levels of all grape phenolic compounds than Cinsault and Grenache wines. The major compounds in the latter group were hydroxycinnamic acids, showing significantly lower concentrations in Cinsault1 than in all other wines, while Syrah wines contained significantly higher concentrations of anthocyanins, flavanols, and flavanol monomers and dimers. Cinsault2 was also significantly enriched in anthocyanins and flavanol monomers and dimers compared to Cinsault1 and Grenache wines. The concentrations of hydroxycinnamic acids and flavanol monomers and dimers were similar in wines and musts while anthocyanins and GRP suffered significant losses of about 50 % during fermentation in Syrah.

Derived pigments (Fig. 3B) were also detected in wines. Caftaric-anthocyanin adducts were the predominant derived pigments in Grenache and Cinsault wines and particularly abundant in Cinsault2 while they were present only in trace amounts in Syrah wines. Pyranoanthocyanins and carboxypyrananthocyanins were the major derived pigments in Syrah wines along with lower amounts of

flavanol-anthocyanin and ethyl-linked flavanol-anthocyanin adducts. Pyranoanthocyanins and carboxypyrananthocyanins were significantly accumulated during fermentation in Syrah but not in the other wines, suggesting that their formation is determined by the concentration of anthocyanins rather than that of pyruvic acid and acetaldehyde. Flavanol-anthocyanin and ethyl-linked flavanol-anthocyanin dimer adducts were also present in significantly higher amounts in Syrah2 wine than in Syrah2 must, consistent with the high concentration of flavanols in this must. An accumulation of syringic acid and protocatechuic acid, resulting from degradation of malvidin based anthocyanins and of (*epi*)catechin and procyanidins, respectively, was observed during fermentation. Syringic acid formation represented less than 10 % of the malvidin 3-*O*-glucoside losses during fermentations.

Flavanol units measured by phloroglucinolysis were significantly higher in Syrah wines than in the other wines. They were also generally higher than the total concentrations of monomers, dimers, and trimers, especially in Cinsault wines, indicating that these wines contained large proportions of higher molecular weight proanthocyanidins or flavanol derivatives. The concentration of flavanol units measured by phloroglucinolysis was much lower in wines than in musts, losses from must to wine representing 80 to 90 % in Cinsault and Grenache, 40 % in Syrah1 and 25 % in Syrah2.

3.2.3. High performance size-exclusion chromatography

As illustrated in Fig. 4, the phenolic profiles of Syrah, Grenache and Cinsault wines were more similar than those of the musts. Comparison of the size exclusion chromatographic profiles obtained for musts and wines shows that the population eluted at 25 min, corresponding to compounds with higher hydrodynamic diameter, disappeared after fermentation. The loss of these compounds may be related to the loss of color and TPI measured by spectrophotometric analysis which could not be explained with the targeted mass spectrometry analyses used in this

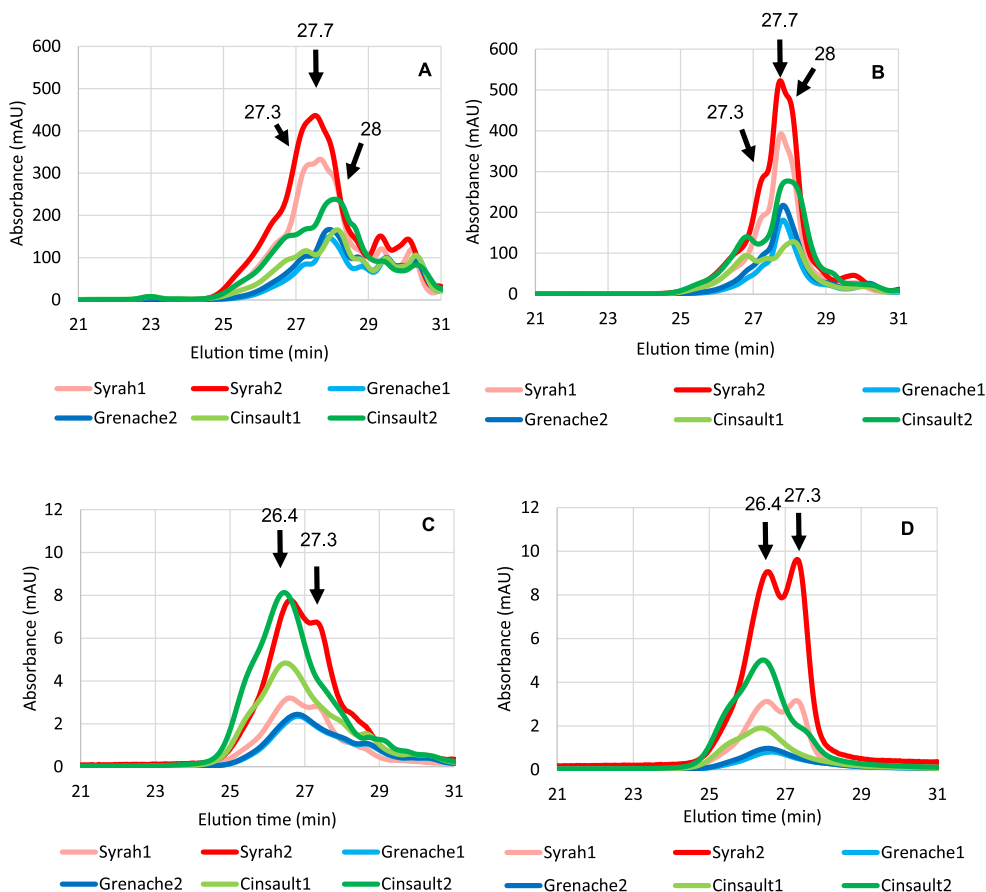


Fig. 4. Analysis of polyphenols from wines by HPSEC. (A) at 280 nm (B) at 320 nm (C) at 420 nm (D) at 520 nm. Values and arrows indicate the elution time of different polyphenolic compounds. The elution time of different polyphenols were determined first (supporting information S3) and were as follows: *p*-coumaric acid, 29.6 ± 0.13 min; caffeic acid, 29 ± 0.13 min; catechin, 28 ± 0.13 min; oenin chloride, 27.5 ± 0.13 min; aDP6 apple tannins, 25 ± 0.13 min; aDP 40 apple tannins, 23.7 ± 0.13 min).

study. All wines contained equivalent amounts of compounds with smaller hydrodynamic diameter than *p*-coumaric acid (eluted at 29 min), detected at 280 nm. These peaks which were not present in musts likely correspond to lower molecular weight yeast metabolites such as tyrosol or peptides (Fig. 4A). Syrah wines presented large quantities of native anthocyanins (27.3 min and 26.4 min) and hydroxycinnamoyl tartaric acids (i.e. caftaric acid and coutaric acid eluted at 27.7 min and 28 min) which were the major compounds in Grenache and Cinsault wines. A small shoulder between 25 min and 26 min is noticeable at 280 nm but also at 420 and 520 nm, corresponding to procyanidin oligomers and derived pigments. The profiles of Cinsault and Grenache wines showed higher proportions of hydroxycinnamoyltartaric acids and of oligomeric compounds eluted between 25 and 27 min that contain structural motifs absorbing at 320 nm such as hydroxycinnamic acid units, especially in Cinsault, and contribute to wine color.

During Syrah must fermentations, absorbance values and anthocyanin contents dropped by 10 % and 50 % respectively, indicating the conversion of native anthocyanins to new derived pigments. These include pyranoanthocyanins, carboxypyrananthocyanins and flavanol-anthocyanins adducts that are detected by our MRM method. In contrast, the important drops in absorbance values observed after alcoholic fermentation of Grenache and Cinsault were not related to the concentrations of phenolic compounds measured by targeted analysis, which remained stable during fermentation. Losses of flavanol units measured after phloroglucinolysis were observed in all wines and much higher for Grenache and Cinsault, confirming that absorbance of these musts was due to flavanol derivatives not targeted by the MRM method. In addition, HPLC analysis revealed that the oligomeric compounds detected in musts were missing in the wine profiles, suggesting their precipitation or adsorption on lees during alcoholic fermentation.

3.3. Adsorption on lees

3.3.1. Spectrophotometry analysis

Absorbance values at 280, 420 and 520 nm corresponding to polyphenols desorbed from lees were similar for all modalities. However, extracts from Cinsault2 lees which showed significantly higher TPI and TRP values than all other modalities while extracts from Syrah lees exhibited lower TYP values.

The TPI values obtained after desorption from lees represented less than 10 % of those measured in musts in all modalities and accounted for 10 % (in Grenache and Cinsault1) to 30 % (in Syrah1) of the losses measured after fermentation. Absorbance recovered from Syrah lees at 320, 420 and 520 nm also represented less than 10 % of the must values but large proportions of the losses from must to wine (43–64 %, 12–25 %, 10–12 % respectively for A_{320} , TYP, and TRP, with higher percentages for Syrah1). Absorbance values at 320 nm measured on the lees extracts from Grenache and Cinsault represented about 10 % of the must values and 19 to 38 % of the losses after fermentation. TYP and TRP desorbed from lees represented 15 % and 10 %, respectively, in Cinsault, and 30 % and 25 %, respectively, in Grenache, of the initial must values. Thus, they explained about 20 % of the losses in Cinsault and 40 % in Grenache.

Except for TRP in Grenache and TYP in Grenache and Cinsault, the absorbance values recovered from lees were much lower than those of wine, as observed for TRP values in earlier studies performed on red wines (Morata et al., 2003; Vernhet et al., 2020). They did not explain the losses measured after fermentation which can be due either to irreversible adsorption or to chemical changes impacting UV-visible spectra. The presence of residual color on the lees after extraction indicates incomplete desorption of phenolic compounds so that these values are likely underestimated, as observed by other authors (Mazauric & Salmon, 2006; Vernhet et al., 2020).

3.3.2. Phloroglucinolysis analysis

Phloroglucinolysis performed directly on the lees (supporting

information S2) allowed to recover all flavanol derivatives lost after fermentation of Grenache and Syrah, meaning that the losses were due to precipitation and /or adsorption on yeast cells. In the case of Cinsault, the recovery was only about 40 %, indicating incomplete desorption of the derived flavanols present in these wines, likely due to structural differences, as observed on SPE.

The proportions of flavanol units recovered from lees represented about 85 % of the total amount present after fermentation in Grenache, 76 % in Cinsault1, 64 % in Cinsault2, 43 % in Syrah 1 and 27 % in Syrah2. These variations can be attributed to saturation of the lees or to various affinities of different oligomeric flavanol derivatives toward yeast cell wall.

3.3.3. High performance size-exclusion chromatography

As illustrated in Fig. 5, lees seemed to preferentially adsorb higher molecular weight compounds lost during alcoholic fermentation. Control sample revealed absorbance only at 280 nm and at retention times corresponding to low molecular weight yeast metabolites (Fig. 5A). Much higher concentrations of phenolic compounds were desorbed from Cinsault lees than from those of other modalities. The oligomeric compounds eluted at 26.4 min and 25 min in Grenache and Cinsault lees showed high absorbance values at 280 nm and 320 nm and also absorbed at 520 nm, suggesting the presence of hydroxycinnamoyltartaric acid and anthocyanins moieties in their structures.

Hydroxycinnamoyltartrates, i.e. caftaric acid and coutaric acid eluted at 27.7 and 28 min, respectively, were desorbed from all lees (Fig. 5A&B) but in higher amount in Cinsault2 and lower amount in Cinsault1. The profiles recorded at 520 nm shows three peaks eluted at 27.3 min, 26.4 min, and 25 min. The first one coelutes with malvidin 3-glucoside found in larger amount in Syrah wines. However, its much higher absorbance at 420 nm suggests that it also contains other pigments. The other two peaks are present in higher concentrations in the extracts from Cinsault2 lees. The populations present in lee extracts from Syrah wines also show much higher ratios of A_{420} to A_{520} and of A_{280} to A_{320} than those eluted at the same retention times in the extracts from Cinsault lees, again suggesting different compositions. Moreover, additional peaks eluted at 28.3 and 28.7 min in the Syrah profiles at 420 nm also indicate the presence of lower molecular weight yellow pigments.

Desorption from the lees allowed partial recovery of the oligomeric fraction observed by HPLC on musts profiles. Absorbance values were similar for all modalities even though significantly higher levels of phenolic compounds were desorbed from Cinsault2 lees. Adsorption of phenolic compounds on lees has been previously reported for red fermentation but their impact on color was negligible, corresponding to less than 10 % of the final wine color (Morata et al., 2003; Vernhet et al., 2020). Similar results were obtained in the present study for Syrah: the proportion of red and yellow pigments adsorbed on lees representing less than 10 % of those of rosé wines and musts. On the opposite, these proportions were much higher for the light rosé wines: TRP and TYP recovered from lees accounting for about 30 % of Grenache musts values and representing 72–92 % of the wine values for TRP and exceeding them (200–280 %) for TYP.

4. Conclusion

In order to understand the drivers of rosé wine color, six rosé musts exhibiting large color differences were fermented and their pigment composition was analyzed before and after fermentation, using a combination of complementary analytical methods. Our results showed that major phenolic compounds in Grenache and Cinsault musts were hydroxycinnamic acid derivatives, including GRP and caftaric-anthocyanin adducts that result from enzymatic oxidation, but also higher molecular weight compounds whereas Syrah musts contained larger amounts of anthocyanins and flavanols.

Must composition impacts changes that take place during

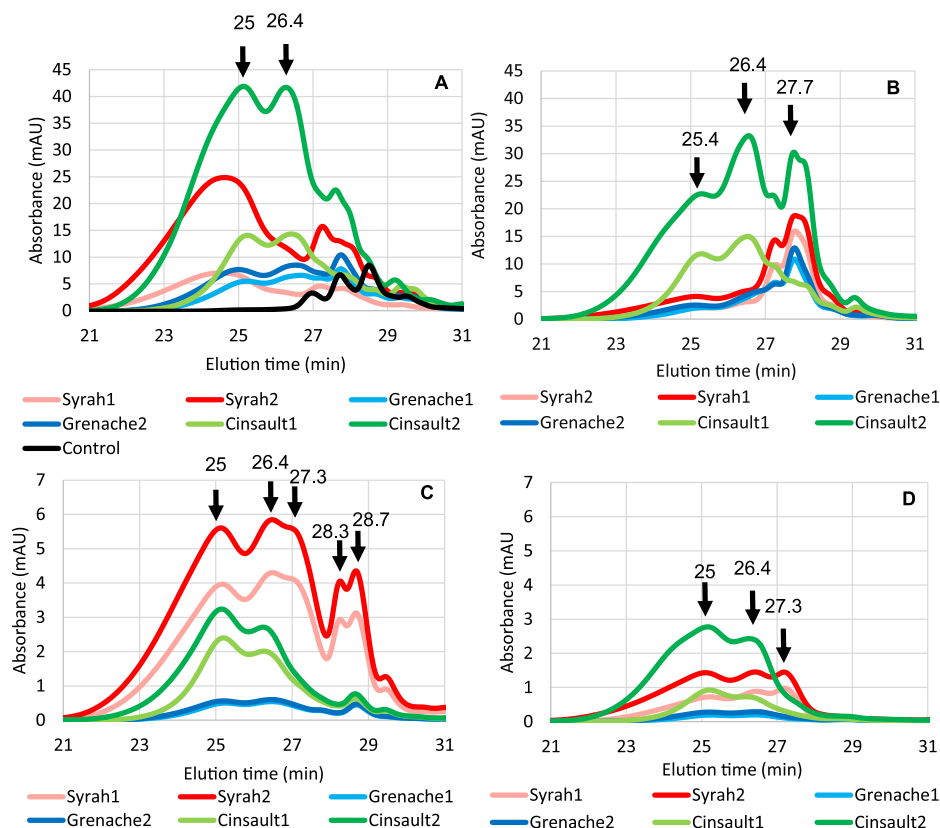


Fig. 5. Analysis of polyphenols from lees by HPLC (A) at 280 nm (B) at 320 nm (C) at 420 nm (D) at 520 nm. Values and arrows indicate the elution time of different polyphenolic compounds. The elution time of different polyphenols were determined first (supporting information S3) and were as follows: *p*-coumaric acid, 29.6 ± 0.13 min; caffeic acid, 29 ± 0.13 min; catechin, 28 ± 0.13 min; oenin chloride, 27.5 ± 0.13 min; aDP6 apple tannins, 25 ± 0.13 min; aDP 40 apple tannins, 23.7 ± 0.13 min).

fermentation and final wine color. Syrah must anthocyanins were partly converted to derived pigments through reactions with yeast metabolites and flavanols, with limited drop in color and total polyphenol content (about 20 %) during fermentation. Losses were much more important for Cinsault and Grenache wines, representing 50 % of the must total phenol content and 50–90 % of pigments. HPLC analysis indicated that they were mostly due to adsorption of higher molecular weight compounds on lees.

In summary, this study analyzed for the first time the phenolic composition of rosé musts and wines and of lees collected after fermentation. Taking advantage of the complementary information provided by HPLC-MS targeting specific phenolic compounds, UV-visible spectrophotometry, and HPLC-DAD analysis, which have seldom been combined for wine analysis and never applied to rosé wine fermentation, it demonstrated that the color of light and dark rosé wines and especially color changes taking place during fermentation are driven by different phenolic reactions and interactions, depending on the initial must composition. It also confirmed that the pigments of light and dark rosé wines are structurally different and provided evidence of the presence of higher molecular weight pigments and hydroxycinnamic derivatives in light rosé musts and wines. Further work is needed to determine the nature of these pigments and the role of grape varietal characteristics and pre-fermentative and fermentation conditions on their formation.

Funding

This work was supported by CASDAR (Grant agreement n°18ART1807) and ANRT CIFRE (n°2018/1412), by Actia (French Ministry of Food) through funding of UMT Minicave that performed spectrophotometric analysis and co funded by Fond Européen de Développement Régional (FEDER) and Région Occitanie (PRRI-Phénoval - LR0021058) through funding of analytical equipment.

CRediT authorship contribution statement

Cécile Leborgne: Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization. **Marie-Agnès Ducasse:** Formal analysis, Data curation, Writing – review & editing. **Emmanuelle Meudec:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Stéphanie Carrillo:** Methodology, Formal analysis. **Arnaud Verbaere:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Nicolas Sommerer:** Methodology, Supervision. **Matthias Bougreau:** Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Gilles Masson:** Conceptualization, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Aude Vernhet:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Jean-Roch Mouret:** Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Véronique Cheynier:** Conceptualization, Investigation, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgement

The authors would like to thank Aurélie Chevallier and Stéphane Miroufe for having taken part in the experimentations.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134396>.

References

- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01617-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01617-8)
- Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1997). Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 35–43. <https://doi.org/10.1021/jf960252c>
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Hernández, A., Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2016). Anthocyanins influence tannin-cell wall interactions. *Food Chemistry*, 206, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.045>
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990). Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 319–324.
- Benabdeljalil, C., Cheynier, V., Fulcrand, H., Hafiki, A., Mosaddak, M., & Moutounet, M. (2000). Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levure. *Sciences des Aliments*, 20(2), 203–220. <https://doi.org/10.3166/sda.20.203-220>
- Cayla, L., Pouzalgues, N., & Masson, G. (2011). Connaissance et maîtrise de la couleur des vins Rosés. 8.
- Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298–305.
- Cheynier, V., Osse, C., & Rigaud, J. (1988). Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions. *Journal of Food Science*, 53(6), 1729–1732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07828.x>
- Cheynier, V., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J., & Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathionyl caffeic acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(2), 217–221. <https://doi.org/10.1021/jf00068a016>
- Es-Safi, N.-E., Le Guernevé, C., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). New Polyphenolic Compounds with Xanthylum Skeletons Formed through Reaction between (+)-Catechin and Glyoxylic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5211–5217. <https://doi.org/10.1021/jf990424g>
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47(7), 1401–1407. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00772-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00772-3)
- Fulcrand, H., dos Santos, P. J. C., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Favre-Bonvin, J. (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1(1), 735.
- Guyot, S., Vercauteren, J., & Cheynier, V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, 96, 1279.
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1740–1746. <https://doi.org/10.1021/jf001030o>
- Kennedy, J. A., & Taylor, A. W. (2003). Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 995(1), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00420-5)
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., ... Sommerer, N. (2015). A High-Throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. *Molecules*, 20(5), 7890–7914. <https://doi.org/10.3390/molecules20057890>
- Leborgne, C., Lambert, M., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Sommerer, N., ... Cheynier, V. (2022). Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics. *Molecules*, 27(4), 1359. <https://doi.org/10.3390/molecules27041359>
- Mateus, N., Silva, A. M. S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Freitas, V. (2002). Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2110–2116. <https://doi.org/10.1021/jf0111561>
- Mazauric, J.-P., & Salmon, J.-M. (2006). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging. II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3876–3881. <https://doi.org/10.1021/jf060037o>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different Saccharomyces strains during the fermentation of Vitis vinifera L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 341–346. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1053-8>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4084–4088. <https://doi.org/10.1021/jf021134u>
- OIV. (2019). RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV Caractéristiques Chromatiques.
- Oszmianski, J., Ramos, T., & Bourzeix, M. (1988). Fractionation of Phenolic Compounds in Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(3), 259–262.
- Peres, S., Giraud-Heraud, E., Masure, A.-S., & Tempere, S. (2020). Rose Wine Market: Anything but Colour? *Foods*, 9(12), 1850. <https://doi.org/10.3390/foods9121850>
- Pinasseau, L., Vallverdú-Queralt, A., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Le Cunff, L., ... Cheynier, V. (2017). Cultivar Diversity of Grape Skin Polyphenol Composition and Changes in Response to Drought Investigated by LC-MS Based Metabolomics. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1826. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01826>
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in Anthocyanin Extractability from Grapes to Wines According to Variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 212–219.
- Salas, E., Guernevé, C., Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V. (2004). Structure determination and color properties of a new directly linked flavanol-anthocyanin dimer. *Tetrahedron Letters*, 45, 8725–8729. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.09.127>
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1997). Reactions of polyphenoloxidase generated caffeic acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry*, 45(7), 1365–1369. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00190-8)
- Schwarz, M., Wabnitz, T. C., & Winterhalter, P. (2003). Pathway Leading to the Formation of Anthocyanin–Vinylphenol Adducts and Related Pigments in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3682–3687. <https://doi.org/10.1021/jf0340963>
- Somers, T. C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, 10(9), 2175–2186. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97215-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97215-7)
- Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Eder, M., Lamuela-Raventos, R. M., Sommerer, N., & Cheynier, V. (2017). Targeted filtering reduces the complexity of UHPLC-Orbitrap-HRMS data to decipher polyphenol polymerization. *Food Chemistry*, 227, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.106>
- Vernhet, A., Carrillo, S., & Poncet-Legrand, C. (2014). Condensed Tannin Changes Induced by Autoxidation: Effect of the Initial Degree of Polymerization and Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7833–7842. <https://doi.org/10.1021/jf501441j>
- Vernhet, A., Carrillo, S., Rattier, A., Verbaere, A., Cheynier, V., & Nguela, J. M. (2020). Fate of Anthocyanins and Proanthocyanidins during the Alcoholic Fermentation of Thermovinified Red Musts by Different Saccharomyces cerevisiae Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3615–3625. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00413>
- Wirth, J., Caillé, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., ... Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chemistry*, 132(4), 1861–1871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.019>

Chapitre 6 :

Untargeted metabolomics approach to unravel the impact of fermentation on color and phenolic composition of Rosé wines

Cette étude se concentre sur les changements survenant au cours de la fermentation alcoolique des moûts de Syrah, Grenache et Cinsault, menée à l'échelle laboratoire (250 mL) et à l'échelle pilote (100 L). Les étapes pré-fermentaires ont été normalisées afin d'observer l'effet cépage indépendamment de la vinification. La couleur et la composition phénolique des moûts et des vins ont été analysées par spectrophotométrie UV-visible et les empreintes métabolomiques ont été acquises par chromatographie liquide à ultra-haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (CLHP-HRMS). Les données métabolomiques non ciblées ont mis en évidence des marqueurs liés au cépage comme les anthocyanes dans la Syrah, les acides hydroxycinnamiques et des dérivés du tryptophane dans le Grenache et des norisoprénoides libérés pendant la fermentation dans le Cinsault. Les vins de Cinsault contenaient des composés de poids moléculaire plus élevé résultant probablement de l'oxydation des composés phénoliques.

Les résultats de l'analyse métabolomique nécessitent un traitement additionnel afin de révéler d'autres marqueurs impactant la couleur lors de la fermentation alcoolique des vins rosés. Ce chapitre est donc une ébauche d'un futur article qui sera soumis au Journal of Agriculture and Food Chemistry (JAFC).

Title : Untargeted metabolomics approach to unravel the impact of fermentation on color and phenolic composition of Rosé wines

Cécile Leborgne^{a,b}, Emmanuelle Meudec^{a,c}, Nicolas Sommerer^{a,c}, Gilles Masson^b, Jean-Roch Mouret^a, and Véronique Cheynier^{a,c,*}

^a SPO, INRAE, Univ Montpellier, Institut Agro, Montpellier, France; emmanuelle.meudec@inrae.fr (E.M.); nicolas.sommerer@inrae.fr (N.S.); jean-roch.mouret@inrae.fr (J.-R.M.); veronique.cheynier@inrae.fr (V.C.)

^b Institut Français de la Vigne et du Vin, Centre du rosé, Vidauban, France; cecile.leborgne@vignevin.com (C.L.); gilles.masson@vignevin.com (G.M.)

^c INRAE, PROBE research infrastructure, Polyphenol Analytical Facility, Montpellier, France;

Corresponding author : Véronique Cheynier (veronique.cheynier@inrae.fr)

Abstract

Color is a major quality trait of rosé wines due to their packaging in transparent bottles. This color is due to the presence of phenolic pigments extracted from grapes to wines and reaction taking place during the wine-making process. This study focuses on changes occurring during alcoholic fermentation of Syrah, Grenache and Cinsault musts, conducted at laboratory (250 mL) and pilot (100 L) scales. Color and phenolic composition of the musts and wines were analyzed using UV-visible spectrophotometry and metabolomic fingerprints were acquired by ultra-high resolution liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. Untargeted metabolomics data highlighted markers related to the grape variety (e.g. anthocyanins in Syrah, hydroxycinnamates and tryptophan derivatives in Grenache, norisoprenoids released during fermentation in Cinsault). Cinsault wines contained higher molecular weight compounds possibly resulting from oxidation of phenolics which may contribute to their high absorbance values.

Keywords: rosé wine; polyphenols; fermentation; color; untargeted analysis

4. Introduction

Rosé wine is much appreciated and its worldwide production and consumption have increased by 20% in the last 20 years. Color is essential for the quality of rosé wines and a major driver of consumers' purchase as they are usually sold in clear glass bottles (Peres et al., 2020). Rosé wines are extremely diverse, covering a wide range of intensities and nuances, reflecting large differences in pigment compositions (Leborgne et al., 2022). Indeed, rosé wines pigments comprise phenolic compounds, including red anthocyanins extracted from grapes and derived pigments formed during wine making through their reactions with other phenolic compounds and with wine metabolites such as acetaldehyde and pyruvic acid. In addition, the rosé wine-making process, involving pressing before fermentation, i.e. when grape polyphenoloxidase is highly active, promotes enzymatic oxidation potentially leading to browning.

An investigation carried out on a large set of commercial rosé wines using UV-visible spectrophotometry, CIELab colorimetry and ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QqQ-MS) in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode for targeted metabolomics analysis of 125 phenolic compounds (M. Lambert et al., 2015) has shown that the different color styles are due to different phenolic compositions (Leborgne et al., 2022). Thus, the composition of light rosé wines was closer to that of white wines, with high proportions of hydroxycinnamic acids compared to anthocyanins, and consequently high levels of derived pigments resulting from reactions of anthocyanins with hydroxycinnamates (i.e. phenylpyranoanthocyanins) and with pyruvic acid (i.e. carboxypyrananthocyanins), explaining the red component of color a^* . In contrast, darker rosé wines contained higher levels of anthocyanins and flavanols and pigments derived from these two families. The yellow component of color, b^* appeared mainly associated with compounds such as dihydroflavonols, aromatic amino acids, flavanols and anthocyanin-flavanol adducts which are not brown pigments but might be involved in oxidative browning. Condensation products of flavonoids with acetaldehyde, which reflect higher levels of oxidation, were also associated with browner hues in wines from the darker group. These lower molecular weight compounds can be considered as markers of more complex molecules which were not among the targets of the MRM method used. Indeed, random cascade reactions of simple wine polyphenols have been shown to generate a large number of derivatives (Vallverdú-Queralt et al., 2017a, 2017b).

A more recent study aiming at evaluating color and phenolic composition changes occurring during alcoholic fermentation of rosé wines using the same methodology in combination with high performance size-exclusion chromatography coupled to UV-visible spectrophotometry (Leborgne et al., submitted). This was performed on Grenache, Cinsault, and Syrah grapes, commonly used for production of Provence rosé wine and selected for their different color potential (Cayla et al., 2011). Comparison of the data obtained using the three methods showed that a large part of the phenolic compounds measured by spectrophotometry in the Grenache and Cinsault musts were not detected by the MRM method and actually corresponded to larger oligomers and polymers likely derived from hydroxycinnamic acids and flavanols. The more intense red color of Syrah must was mostly due to anthocyanins which appeared more easily extracted from this variety despite the shorter maceration time (2h, 8h and 12h, respectively for Syrah, Grenache and Cinsault). Comparison of the must and wine compositions indicated losses of the oligomeric pigments during fermentation of Cinsault and Grenache musts, mostly due to adsorption on lees. During fermentation of Syrah musts, anthocyanins were partly converted to derived pigments and only limited color drop was observed. Thus, must composition, resulting from grape composition, but also from extraction and oxidation of phenolic compounds during must preparation, impacted the fate of phenolic compounds during fermentation and consequently wine composition and color. This may be due to varietal differences as higher content and extractibility of anthocyanins have been reported for Syrah grapes (Romero-Cascales et al., 2005). However, differences in the duration of maceration and the higher levels of sulfur dioxide in the Syrah musts make it difficult to assess varietal specificities. Nevertheless, SEC analysis confirmed the presence in the samples, and especially in Grenache and Cinsault musts, of higher molecular weight phenolic compounds that were missing in the targeted MRM method used.

The purpose of the present study was to compare the compositions of Grenache, Syrah and Cinsault musts and wines made under identical wine-making conditions to determine whether the differences observed earlier were attributable to varietal characteristics or to process. This was performed using untargeted metabolomics based on ultra-high performance liquid chromatography coupled to high

resolution mass spectrometry in combination with UV-visible spectrophotometry. Laboratory scale (250 mL) and pilot scale (100L) fermentation were also compared in this study.

5. Material and methods

5.1. Chemicals

HPLC grade methanol was purchased from VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Ethanol, hydrochloric acid and potassium metabisulfite were purchased from Sigma Aldrich. Deionized water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France).

5.2. Must preparation

Three different *Vitis vinifera* grape varieties, Cinsault, Grenache, and Syrah, were hand harvested at a potential degree of alcohol of 12° by the Centre du Rosé (IFV, Vidauban, France) in 2019. 300 kg of each grape variety were harvested in 20 kg bins in order to avoid uncontrolled grape crushing and maceration. Before pre-fermentative process, grapes were kept at 12°C for 12 hours to be treated at the same temperature. Grapes were destemmed, crushed and potassium hydrogen sulfite (2.5 g/100 kg) was added for protection against oxidation and microbial contamination. Musts were then put into 3hL tanks and submitted to controlled maceration at 17°C during 4 hours. After maceration, musts were added with potassium hydrogen sulfite (2.5 g/100 kg) to protect from oxidation and pressed. Then, musts were clarified by cold settling at 12°C during 12 hours before racking and adjusted at a turbidity of 135 NTU by adding solid particles collected during racking. Assimilable nitrogen content was adjusted at 110 mg/L for all musts using diammonium phosphate supplementation.

5.3. Fermentation

Prior to fermentation, each must was homogenized using dry ice and distributed into three 100L fermentation tanks (pilot scale), to conduct each fermentation modality in triplicate. Homogenization was validated by colorimetric analysis and analysis of variance performed directly at the Centre du Rosé. A volume of 250mL of must was collected from each of the nine fermentation tanks to fill nine 300mL fermenters (laboratory scale). Fermenters and fermentation tanks were purged with CO₂ pellets before filling and equipped with an airlock system to maintain anaerobiosis conditions. All fermenters were placed in a thermoregulated room set at 16°C; they were placed on magnetic stirring (260 rpm) plates (Duc et al., 2020). Active dry yeasts (K1 strain, ICV, France) were rehydrated for 20min at 37°C using a glucose solution in water (50g/L) before inoculation at 0.4g/L. Fermentation kinetics were manually monitored for 300mL fermenters by weight losses induced by CO₂ release. All wines were fermented to dryness (less than 2g/L residual sugar) with no interruption in around 15 days. Color was monitored during pilot scale fermentations and 10mL samples were collected for analysis at must and wine stage. Color analysis was performed immediately while samples for composition analysis were stored at -20°C until use.

5.4. Spectrophotometric analysis

A Shimadzu UV-1900 UV-visible spectrophotometer was used to perform UV-Visible absorbance measurements following the protocols described by Atanasova et al., 2002, using a 1cm path length cell and adapting dilution to obtain absorbance values between 0.01 and 1.

Absorbance was measured directly on wines and musts from 230 nm to 800nm. The three CIELAB color space parameters were calculated from the spectrum according to OIV method OIV-MA-AS2-11 (OIV,

2019) along with the hue angle ($H = \arctg \frac{b^*}{a^*}$). Absorbance values at 520nm (A_{520}), 420nm (A_{420}), and 620nm (A_{620}) were extracted from each spectrum and used to calculate color intensity ($CI = A_{420} + A_{520} + A_{620}$).

Total polyphenol index (TPI) at 280nm, total red pigments (TRP) at 520nm and absorbance at 320nm (A_{320}) were measured 20 minutes after dilution of wines and musts in 1M HCl solution ($TPI = A_{280} \times F_D$ (dilution factor); $TRP = A_{520-HCl\ 1M} \times F_D$ and $A_{320} = A_{320-HCl\ 1M} \times F_D$).

Absorbance at 520nm was measured 5 minutes after addition of 60 μ L of a sodium hydrogen sulfite solution (200g/L) to 4mL of wine or must, to determine the sulfite bleaching resistant fraction of pigments ($NBP = A_{520-SO_2}$). A_{520} was also determined on musts and wines 40 minutes after addition of 40 μ L of a 12.6% (v/v) ethanal aqueous solution to 4mL of samples to trap sulfites and convert bisulfite adducts to flavylum ions. This enabled calculation of the concentrations of bisulfite adducts ($BA = A_{520-ethanal} - A_{520}$), flavylum forms ($AH^+ = A_{520} - A_{520-SO_2}$) and hydrated forms ($HF = TRP - A_{520-ethanal}$) of pigments susceptible to sulfite beaching.

5.5. Polyphenol untargeted analysis

5.5.1. UHPLC-HRMS analysis

Separations were performed using a Vanquish UHPLC-DAD (Thermo Fischer Scientific, San Jos'e, CA, USA), on a (10 \times 1 mm i.d.) Acquity HSST3 column (Waters, Milford, MA; 1.7 μ m), operated at 35°C. Mobile phase consisted of water/formic acid (99/1, v/v) (eluant A) and acetonitrile/water/formic acid (80.5/19.5/1, v/v) (eluant B). Flow rate was 0.22 mL/min. The elution program was as follows: isocratic for 1.5 min with 2% B, 2-12% B (1.5-4.5 min), isocratic with 12% B (4.5-7 min), 12-24% B (7-12 min), 24-48% B (12-15 min), 48-60% B (15-16 min), 60-100% B (16-17 min).

ESI-MS/MS analyses were performed with a Orbitrap Exploris 480 from Thermo Fisher Scientific (San Jos'e, CA, USA) equipped with an electrospray source and an internal post-source fluoranthen mass calibrant (radical ion at m/z 202.0777 in positive ion mode and m/z 202.0788 in negative ion mode). The spectrometer was operated in the positive and negative ion modes (Ion transfert tube : 280°C ; vaporizer temperature : 300°C ; sheath gaz, auxiliary gas and sweep gas : 40, 10 and 2 (arbitrary units) respectively; voltage set, 3.5kV in positive mode, 2.5kV in negative mode). The masse range was [150-1500].

Samples of must and wine were centrifuged at 15000 RMP during 15 min, then supernatants were transferred in 2 mL vials. Quality control (QC) samples were prepared by pooling 500 μ L of each sample, One mL of this mixture was transferred in 2 mL vial and stored at -80°C. A blank was prepared with 1mL of water in a vial.

The sample sequence, including wine and must samples, a Quality Control (QC) sample and a blank sample, was adapted from Arapitsas and Mattivi (Arapitsas & Mattivi, 2018). Samples were injected in biological triplicates following a randomized order. After equilibration, the sequence started with 3 injections of blank, followed by 3 injections of QC sample. Then QC sample and blank were injected after each series of 6 real samples. The sequence finished with 1 injection of QC sample and 1 injection of blank.

5.5.2. Data analysis

Real samples, QC and blank data were processed by Compound Discoverer software (v. 3.2.2.421, Thermo, Waltham, USA) with a WorkFlow constituted by several steps : Spectrum processing nodes which extract the mass spectral data from the input set file and align retention of the compounds in the sequence ; Compound detection nodes which detect compound by extraction of masses, manage missing values, group adduct and isotopic peaks ; Peak area refinement nodes which apply QC correction, remove background compounds found in the blank samples. Compound Discoverer parameters are available in supplementary data.

Annotation was performed manually by comparing retention times and mass spectra accuracy with a mass tolerance of 5 ppm based on the previous experience of the group with the specific instrumentation mass resolution and in accordance with the four levels of annotation described by Sumner (Sumner et al., 2007).

5.6. Statistical analysis

ANalysis Of VAriance were performed with RStudio version 4.0.3 software (www.rstudio.com (2020-10-10)) using Student-Newman-Keuls post-hoc test in Agricolae package. ANOVA results were considered significant at p-value < 0.05. Compound Discoverer software (v. 3.2.2.421, Thermo, Waltham, USA) was used to perform Principal Component Analysis (PCA) and the clustering.

6. Results and discussions

6.1. Spectrophotometric analysis

6.1.1. Color parameters

Grape variety	Stage	L		a		b		Nuance	
		Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD
Cinsault	must	75.10	± 0.64 ^d	16.29	± 0.92 ^c	17.49	± 1.06 ^a	0.82	± 0.06 ^c
Cinsault	lab scale wine	88.82	± 0.59 ^b	6.05	± 0.51 ^f	13.20	± 0.64 ^b	1.14	± 0.05 ^a
Cinsault	pilot scale wine	89.29	± 0.53 ^b	8.18	± 1.14 ^e	15.72	± 1.22 ^{ab}	1.09	± 0.07 ^a
Grenache	must	87.43	± 0.90 ^b	11.25	± 0.52 ^d	14.01	± 0.50 ^b	0.89	± 0.01 ^c
Grenache	lab scale wine	89.83	± 2.90 ^b	4.87	± 0.24 ^f	10.40	± 2.89 ^c	1.12	± 0.10 ^b
Grenache	pilot scale wine	93.57	± 0.19 ^a	4.94	± 0.26 ^f	6.69	± 0.48 ^{de}	0.97	± 0.02 ^c
Syrah	must	53.48	± 2.83 ^e	47.65	± 1.16 ^a	8.52	± 0.56 ^{cd}	0.18	± 0.01 ^e
Syrah	lab scale wine	75.87	± 1.81 ^d	28.55	± 0.47 ^b	7.06	± 1.46 ^{de}	0.24	± 0.05 ^d
Syrah	pilot scale wine	78.98	± 0.74 ^c	28.71	± 0.58 ^b	4.97	± 0.40 ^e	0.17	± 0.01 ^d

CIELab parameters reported in Table 1 showed qualitative and quantitative differences between all modalities. The three musts studied exhibited color differences linked to the grape characteristics since all pre-fermentation treatments were common. The Syrah must was the most colored with the highest value of a*, the lowest value of b* resulting in a reddish hue. Grenache and Cinsault musts were lighter, with b* values slightly higher than a*, giving an orange hue to the musts, more intense in Cinsault than in Grenache. Wine CIELab parameters showed qualitative and quantitative differences similar to those observed at must stage between the three grape varieties. Nevertheless, wines were lighter (higher L*, lower a* and b*) and slightly more orange compared to

the corresponding must. An impact of fermentation scale was also observed for some parameters. Grenache and Syrah wines fermented at laboratory scale (LSW) exhibited lower L* compared to wines fermented at pilot scale (PSW). Moreover, Cinsault LSW exhibited lower a* and Grenache LSW higher b* than the corresponding PSW. These data suggest a higher extent of oxidation in LSW, resulting in increased degradation of red pigments combined to formation of yellow pigments.

A previous study (Leborgne et al., 2022) exhibited the same color differences between musts and wines from Grenache, Cinsault and Syrah, although maceration times and sulfite levels were different, suggesting that these differences reflect varietal differences in terms of phenolic composition and extractability.

6.1.2. UV-Visible absorbance characteristics

Total polyphenol index (TPI), total red pigments (TRP) and absorbance at 320nm (A_{320}) presented in figure 1 showed different intensities and ratios, indicating different phenolic profiles between the three grape varieties along with changes induced by alcoholic fermentation.

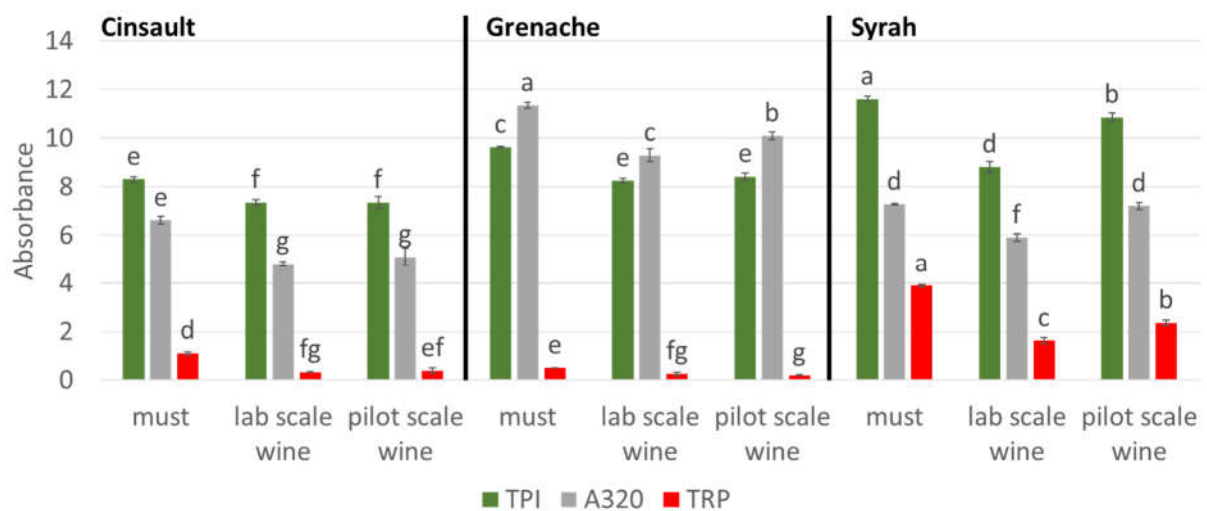


Figure 1: Total polyphenol index (TPI), absorbance values at 320 nm (A_{320}) and total red pigments (TRP) in Grenache, Cinsault, and Syrah musts and wines fermented at laboratory and pilot scales; different superscripts indicate significant differences between samples (ANOVA $p < 0.05$)

Must TRP values were significantly different, Syrah must showing the highest value and Grenache the lowest, consistent with color parameters. Syrah must also exhibited significantly higher TPI value than the other musts but an intermediate value of A_{320} . Grenache must showed significantly higher value of A_{320} compared to other musts and an intermediate value of TPI while Cinsault must had the lowest TPI and A_{320} values. TRP represented 30% of TPI in Syrah must, 13% in Cinsault and only 5% in Grenache. This comparison indicates the higher proportion of red anthocyanin pigments compared to other grape polyphenols in the Syrah must. A_{320} values represented 120% of TPI in Grenache must, suggesting the presence of large quantities of hydroxycinnamic acid derivatives which show characteristic absorbance at this wavelength, as observed in white wines (Somers et al., 1987). The contribution of hydroxycinnamic acid moieties to total polyphenol content in the Cinsault must (80%) was lower than in the Grenache must, but higher than in the Syrah must (60%).

Differences in the relative intensities and ratios of TPI, A_{320} and TRP between wines made from the three grape varieties were similar to those described for the three corresponding musts, although all intensities were lower. Indeed, Syrah wines demonstrated the highest TPI and TRP values along with

an intermediate absorbance value at 320nm compared to the other wines. Grenache wines showed higher absorbance at 320 nm, intermediate TPI and the lowest TRP values, as observed on the musts. Cinsault wines showed the lowest TPI and A_{320} values and their TRP values were similar to those of Grenache wines. No significant difference was observed between the two fermentation scales, except for Syrah TPI, A_{320} , and TRP values and Grenache A_{320} value which were lower in the wines fermented at laboratory scale, again suggesting higher oxidation rate. In addition, the ratio of A_{320} to TPI remained stable from must to wines.

Losses during pilot scale alcoholic fermentations were similar for Grenache and Cinsault (10-15% for TPI, 60-70% for TRP and 10-20% for A_{320}) and lower for Syrah (6% for TPI, 20% for TRP and less than 1% for A_{320}). For Grenache and Cinsault, the losses were similar at both fermentation scales. Much higher losses were observed for Syrah laboratory scale wines (LSW), reaching 20-25% for TPI and A_{320} , and 60% for TRP. Thus, for all three varieties TRP losses represented 20 to 70% of the initial must values while TPI dropped by only about 10-25%, indicating the high impact of fermentation on red pigments especially.

These data indicate that the different TPI values reflect different total polyphenol contents but also different proportions of the three major classes of phenolic compounds which have different extinction coefficients at 280 nm (Boulet et al., 2016). Thus, the Syrah must and wines contained a higher proportion of anthocyanins and a lower proportion of hydroxycinnamic acids compared to the other grape varieties while the reverse is true for the Grenache.

Similar differences in phenolic profiles have been observed between Syrah, Cinsault, and Grenache musts and wines obtained respectively after 2h, 8h, and 12h of maceration in an earlier study (Leborgne et al., submitted), suggesting that these differences are related to varietal characteristics. Indeed, Grenache has been reported to contain higher levels of hydroxycinnamic acids than the other two varieties, especially when considering must composition (Cheynier, Rigaud, et al., 1989). Moreover, compared to other common varieties, Syrah grapes have been reported to contain high levels of anthocyanins which are also highly extractible (Romero-Cascales et al., 2005). Extraction also impacts polyphenol composition and color as shown by the increase of absorbance values with the extent of pressing (Leborgne et al., submitted). Accordingly, the TPI values of Cinsault musts higher than those of Grenache musts (Leborgne et al., submitted) reflected higher extraction rates due to longer maceration (12h vsus 2h for Syrah and 8 h for Grenache, 4h for all three musts in the present study). However, in spite of the shorter maceration (2h) used in this study, Syrah musts contained higher levels of total phenols and total red pigments than that described in the present work, likely due to differences in the grape composition or to the higher SO_2 level, protecting polyphenols against oxidation during must preparation.

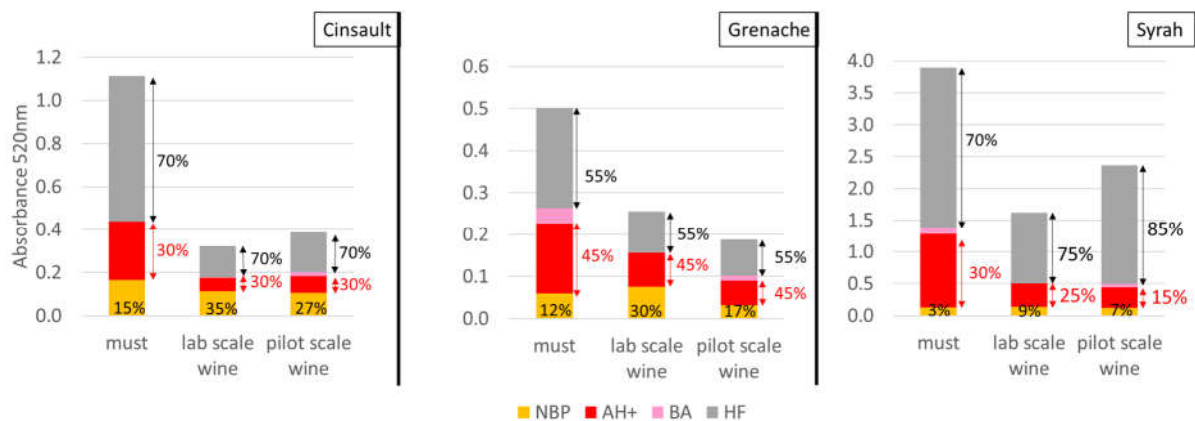


Figure 2: Absorbance at 520 nm under different conditions and contributions of the different forms of pigments in Syrah, Cinsault and Grenache musts and wines (percentage values on the barplot correspond to % of NBP compared to total pigments)

The four different forms of red pigments in musts and wines of Grenache, Cinsault, and Syrah are presented in Figure 2. Like TRP, A_{520} values measured directly on musts and wines (A_{520}) and after addition of ethanal ($A_{520\text{-ethanal}}$) along with hydrated forms (HF) and flavylium forms (AH^+) of pigments calculated from the absorbance values, were significantly higher in Syrah than in Cinsault, itself higher than Grenache. In addition, musts were significantly higher compared to corresponding wines.

Non-bleachable pigments (NBP) were significantly higher in Cinsault (0.17) than in Grenache (0.06) musts while Syrah (0.13) NBP quantity was intermediate. NBP accounted for 10-15% of TRP in Grenache and Cinsault musts whereas it represented less than 5% of TRP in Syrah must. NBP quantity remained stable after fermentation for Grenache and Syrah while a loss of 35% was measured for Cinsault. However, the proportion of NBP was higher in wines than in the musts, accounting for 15-35% of TRP in Grenache and Cinsault wines and only 5-9% in Syrah wines, and also higher in LSW than in PSW. Bisulfite adducts (BA) were detected in very low amounts only in Grenache (0.04) and Syrah musts (0.06), representing respectively 7% and 2% of TRP. After fermentation, BA were detected in very low amounts mainly in wines fermented at pilot scale, suggesting a higher extent of oxidation in wines fermented at laboratory scale.

The decrease of TRP values and color drop during fermentation are due to losses of AH^+ and HF forms of sulfite bleachable pigments. The proportions of AH^+ and HF remained stable during fermentation of Grenache (30/70) and Cinsault (45/55) at both fermentation scales while the ratio of AH^+ to HF decreased during fermentation of the Syrah must, from 30/70 to 25/75 (pilot scale) and 15/85 (laboratory scale). Except for Syrah wine fermented at laboratory scale, the proportions of flavylium cations exceed those calculated (12-15%) using the hydration constant of malvidin-3-O-glucoside ($K_h=10^{-2.6}$), pH values of musts and wines and pH formula calculation ($pH = pK_h + \log\left(\frac{HF}{AH^+}\right)$) (Brouillard & El Hage Chahine, 1980). This can be due to the presence of pigments such as coumaroylated anthocyanins or ethyl-linked anthocyanin-flavanols (Cheynier et al., 2006), in which the flavylium moiety is protected from hydration by intramolecular or intermolecular copigmentation or self-association (Trouillas et al., 2016).

To conclude, differences related to the characteristics of the three studied varieties observed at must stage were conserved in the wines, confirming the results of an earlier study (Leborgne et al). Small

differences between the two fermentation scales were also observed and attributed to enhanced oxidation at the laboratory scale.

6.2. Untargeted metabolomics by high resolution mass spectrometry

Differences between must and wine samples were further investigated by untargeted analysis using UHPLC-HRMS. Therefore, all samples were randomly injected, in a single batch, along with QC and control samples, as described in metabolomics studies (Arapitsas et al., 2020). Both positive and negative ionization modes were tested but only the positive ion mode was selected because it provided better discrimination of the samples. Moreover, the positive ion mode is better suited for detection of anthocyanin pigments.

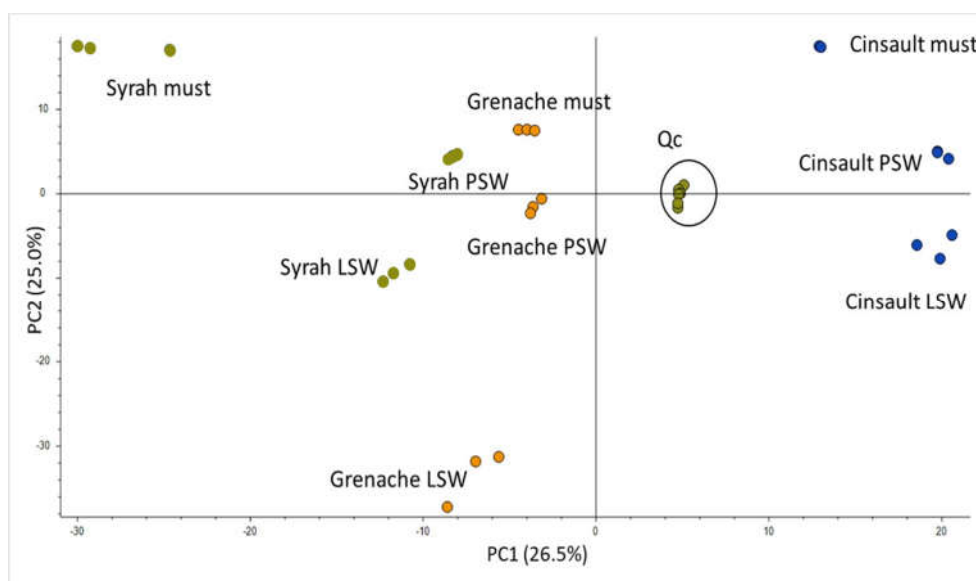


Figure 2: PCA plot of must and wine samples in the positive ion mode

The quality of the data set is illustrated by the PCA plot of the distribution of sample injections in the positive ion mode. This PCA plot was performed using 750 features selected according to the parameters of intensity and of signal to noise ratio (S/N) of Compound Discoverer workflow, each corresponding to a retention time associated with a m/z value.

The projections of QC samples, consisting in a mixture of all analyzed samples and regularly injected throughout the sequence, were very close together in central position, indicating the reliability of the data set. This unsupervised analysis also showed that the Cinsault must and wine samples, on the one hand, and the Syrah must, on the other hand, are separated from all other samples along the first principal component, while musts, pilot scale wines, and laboratory scale wines are distinguished on the second axis.

Molecular formula tentatively attributed from LC-HRMS signals by the Compound Discoverer software suggested that many of the metabolites belong to phenolic compounds but also to compounds containing nitrogen atoms such as amino-acids, peptides, and indoles, as reported by earlier wine metabolomics studies (Arapitsas et al., 2020; Ontañón et al., 2020b) Annotation was performed manually by comparing retention times, mass spectra and, when available, UV-visible spectra with an internal data base and with data published in the literature (Arapitsas et al., 2020; Cave et al., 2019; Roullier-Gall et al., 2017; Willemse et al., 2015). A given molecule could be represented by several features with the same retention time but different m/z values, corresponding to molecular or pseudo-

molecular ion, adduct and fragment ions, and some isotopic clusters. The heatmap obtained by unsupervised hierarchical cluster analysis (Fig 3) confirmed that injections of triplicate biological samples are grouped together and showed separations between musts and wines and between varieties. However, the Grenache wine made at laboratory scale was the most different sample while the pilot scale Grenache wine clustered with the Grenache must. This analysis also highlighted clusters of features that were over- or under-expressed in some modalities. In addition, ANOVA was performed ($p < 0.05$) for each feature to determine whether differences between two modalities were significant.

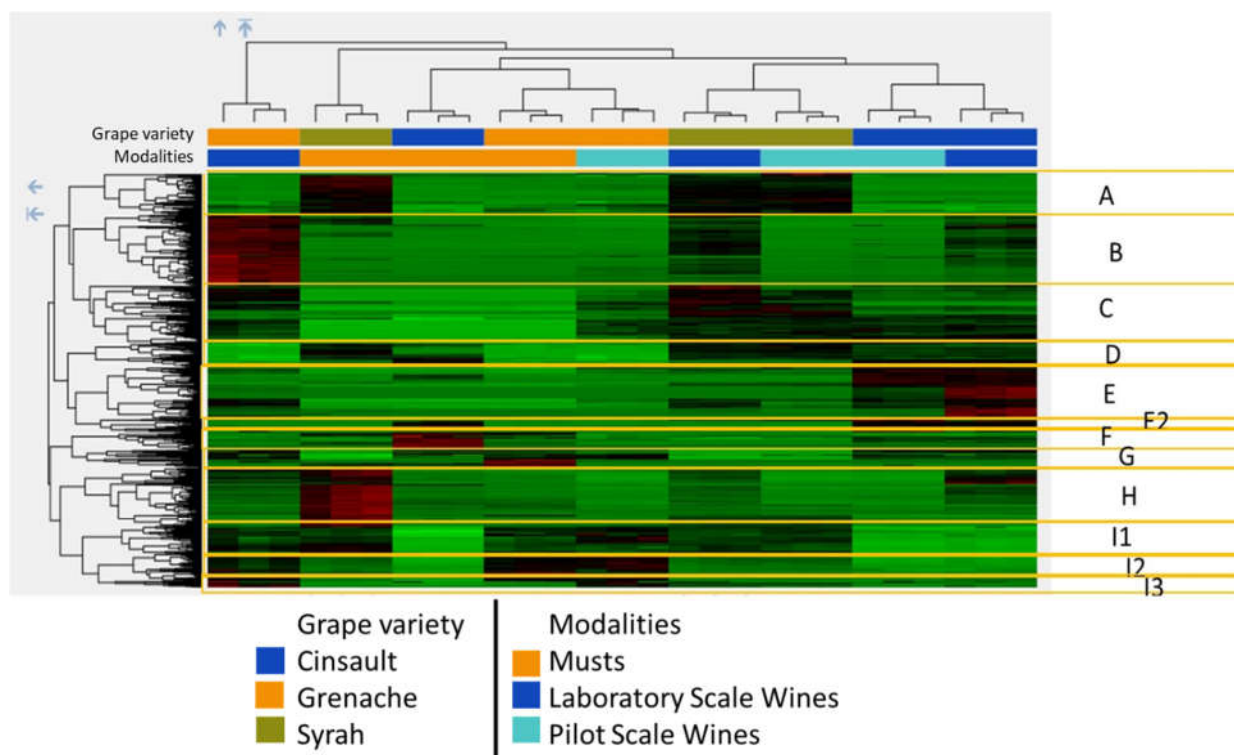


Figure 3: Unsupervised hierarchical clustering of metabolites and samples, showing the letter codes for metabolite clusters.

Thus, the first group (A – 75 features), overexpressed in Syrah musts and wine samples, contains features corresponding to anthocyanins, flavonols, flavanol monomers and stilbenes. This is in agreement with the results obtained in an earlier study comparing the three varieties (Leborgne et al., 2022) and reflects the higher concentration of these phenolic compounds in Syrah musts and wines, due to the higher grape content and/or higher extraction rate from Syrah grape berries.

A second cluster (B – 126 features) contains compounds that appear specific of the Grenache wine made at laboratory scale, although they are also present in low amounts in the other two laboratory scale wines and, for some of them, in the Syrah must. All of them were attributed molecular formula containing nitrogen atoms, suggesting that they are amino acid derivatives. Except for the subgroup detected in Syrah must, originating from Syrah grapes, these compounds were thus formed during fermentation, when conducted at laboratory scale.

The next cluster (C – 106 features), specific of wines, contains both nitrogen compounds and compounds that likely correspond to phenolic compounds. However very few of these compounds could be identified: carboxypyranomalvidin 3-glucoside (i.e. vitisin A) formed by reaction of malvidin 3-glucoside with pyruvic acid, a yeast metabolite released during fermentation, resveratrol, dihydroquercetin, and kampferol, likely arising from hydrolysis of their glycosylated derivatives during

fermentation), *S. cerevisiae* metabolites such as pantothenic acid (White et al., 2001), tryptophan ethylester (Iriti & Vigentini, 2015) and purine derivatives (guanine, methylguanoside) and a number of unknown compounds, potentially coumarin derivatives that may be degradation products of phenolic acids and/or anthocyanins.

Cluster D (42 features) gathered compounds that were less abundant in Grenache than in Syrah and Cinsault but little affected by fermentation. Among them, a series of signals could be attributed to two resveratrol dimers. These molecules are stilbenes that are synthesized by grapes, in particular as a defense mechanism against fungal attack (Jeandet et al., 1995). Other unknown compounds in this group might also correspond to phenolic derivatives.

Cluster E1 (94 features) corresponded to molecules that were more abundant in Cinsault than in the other two varieties but also more abundant in wines than in musts. This group contained in particular very apolar compounds that were tentatively identified to norisoprenoid derivatives, that may be varietal markers, revealed during fermentation, as well as quercetin aglycone.

Compounds of cluster E2 (ex A-B) (24 features) were more abundant in Cinsault musts and wines than in samples from the other varieties, and, for some of them, significantly more abundant in wines than in musts. This group contains mostly higher molecular weight compounds detected as doubly charged ions. This particularity of Cinsault has already been observed in a previous study which revealed higher molecular weight compounds containing anthocyanin and hydroxycinnamic acids moieties as well as flavanols by size exclusion chromatography coupled to UV-visible detection (Leborgne et al., submitted).

Cluster F (ex A-C) (32 features) contained compounds that were significantly more abundant in Cinsault than in Grenache and in Grenache than in Syrah and, regardless of the variety, more abundant in musts than in wines. Most of these compounds were attributed molecular formula containing nitrogen atoms, suggesting that they are peptides from grapes, depending on the grape variety, and degraded during fermentation.

Compounds gathered in cluster G (ex A-D) (16 features) were also more abundant in musts but particularly in Grenache musts. Major signals identified correspond to tryptophan, whose content in grape depends on vine growing conditions, especially nitrogen fertilisation, and on ripening (Ruiz-Rodríguez et al., 2017).

Compounds from cluster H (ex B-C) (108 features) were overrepresented in Syrah must. They comprised mostly nitrogen compounds, among which phenylalanine was identified. This cluster also included peonidin 3-glucoside and flavonol glycosides, again indicating higher berry contents and/or higher extraction rates for these compounds in Syrah grapes. A GRP isomer as well as GRP2, (2,5 di-S-glutathionyl caftaric acid) also belonged to this cluster. GRP and its isomer result from reaction of glutathione with the quinone generated by enzymatic oxidation of caftaric acid while GRP2 is formed by addition of glutathione on GRP quinone resulting from coupled oxidation of GRP by caftaric acid quinone (Cheynier & Van Hulst, 1988a). The concentrations of these compounds depend on the proportion of glutathione to caftaric acid in the must which is a varietal characteristic (Cheynier et al., 1989) and on the extent of enzymatic oxidation due to oxygen exposure during must preparation. However higher concentrations in must than in wine suggest that these compounds undergo some degradation, possibly involving hydrolysis of the peptide bonds or further oxidation (Cheynier et al., 1986). Whether yeasts can metabolise GRP and GR2P is unknown but they have been shown to use

glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-glutathione which is a precursor of varietal thiols as nitrogen sources (Becerra-Rodríguez et al., 2021; Cordente et al., 2015).

Compounds of cluster I (BD + BE + CD) were characterised by their extremely low levels in Cinsault must and wines compared to other samples. This cluster was divided into three subclusters. Cluster I1 (ex B-D) (51 features) contained phenolic compounds such as GRP, coumaric acid, catechin and procyanidin dimers which were present in similar amounts in all Grenache and Syrah samples. Cluster I2 (B;E) – (49 features), overexpressed in Grenache musts and wines, contained the signals corresponding to caffeic and ferulic acid and some compounds containing nitrogen atoms that may be varietal markers, as proposed earlier (Arapitsas et al., 2020).

Like those of cluster I2 (B-E), compounds of cluster I3 (C-D) (11 features) showed significantly higher concentrations in Grenache than in Syrah and were almost absent in Cinsault. However, all of them were more abundant in wines than in musts, meaning that they were formed in the course of fermentation. This was confirmed by attribution of major signals to tryptophol, formed from tryptophan by yeast metabolism, and to coumarin and caffeic acid derivatives (e.g. caffeic ethyl ester) resulting from degradation of grape phenolics.

Thus, the untargeted HRMS data highlighted markers related to the grape, which can either reflect varietal characteristics or be emphasised by vine growing conditions and markers related to wine-making. Among the former, anthocyanins appeared characteristic of Syrah, while hydroxycinnamic acids were particularly abundant in Grenache, as expected from earlier studies. Specific groups of nitrogen containing compounds, including tryptophan in Grenache, and phenylalanine (i.e. the major precursor of phenolic compounds in plant biosynthesis) in Syrah were also detected as potential varietal markers, in agreement with earlier work (Arapitsas et al., 2020). These compounds were present in higher amounts in musts, indicating that they are metabolised or modified during fermentation. Consequently, tryptophan (i.e. tryptophol) and caffeic acid (e.g. ethyl caffeate) derivatives were more abundant in Grenache wines and can be considered as varietal markers revealed by fermentation. Similarly, norisoprenoid derivatives were identified as Cinsault markers formed during fermentation. Stilbenes appeared particularly low in Grenache samples whereas flavonoid aglycones were more abundant in Cinsault samples. However, this might reflect an impact of vine growing conditions rather than varietal characteristics.

Caffeic acid, which is the major substrate of the grape polyphenoloxidase and its glutathione derivatives formed after enzymatic oxidation (GRP, GRP2) were among the major compounds detected in Syrah and Grenache samples but their concentration was extremely low in Cinsault samples. The hydroxycinnamic composition (Boursiquot et al., 1986b) as well as the hydroxycinnamic acid to glutathione ratio which determines must sensitivity to enzymatic browning (Cheynier, Souquet, et al., 1989) are varietal characteristics. Similar amounts of hydroxycinnamic acids and glutathione have been reported for Syrah and Cinsault musts, whereas Grenache contained a higher level of caffeic and coumaric acids (Cheynier, Souquet, et al., 1989). Nevertheless, the data obtained in the present study suggest that the Cinsault must was particularly oxidized compared to the other two. Comparison of the relative intensities of major hydroxycinnamic acid derivatives detected by HRMS with absorbance values determined by spectrophotometry indicates that most of the absorbance at 320 nm measured in the Cinsault samples is actually due to other compounds. These unknown compounds may be enzymatic oxidation products formed from hydroxycinnamic acids during must preparation. They might also correspond to the higher molecular weight compounds identified as markers of Cinsault

musts and wines (cluster E2). Cinsault musts and wines also contained much lower amounts of all anthocyanins, although their pigment levels measured by spectrophotometry (A520) were intermediate between those of Syrah and Grenache samples. This indicates that most of the anthocyanins extracted from grape were converted to derived pigments in the early stages of the wine making process. However, none of the expected derivatives (e.g. anthocyanin-caftaric acid adducts, pyranoanthocyanins) were detected in these samples, suggesting that if formed, they were rapidly involved into further reactions which may also lead to higher molecular weight compounds.

The main characteristics of each cluster are summarised in Table 1.

Cluster (number of features)	compounds	variety	Process stage	Marker of / origin
A (75)	Anthocyanins	Syrah		variety
B (126)	Unknown N compounds	Grenache		variety
C (106)	Yeast metabolites		wines	fermentation
D (42)	Stilbenes Rearrangement product of mv3glc ?	Lower in Grenache		Fungal pressure in the vineyard ?
E1 (94)	Norisoprenoids flavonoids	Higher in Cinsault	Higher in wine	Variety, Environmental conditions ? revealed by fermentation
E2 (24)	Higher molecular weight polyphenols	Higher in Cinsault	Higher in wine	Reactions in wine
F (32)	N compounds	Cin > Gre > Syr	Higher in musts	Grape
G (16)	TRY	Higher in Grenache	Higher in musts	Grape variety / vine growing
H (108)	N compounds (Phe) Peonidin and flavonol derivatives GRP (isomer?), GRP2	Syrah	Higher in musts	Variety, Antho profile GSH/AH ratio PPO oxidation Degradation in wine
I1 (51)	GRP, coumaric acid, flavan-3-ols	Lower in Cinsault		variety
I2 (49)	Caftaric, fertaric N compounds	lower in Cinsault Higher in grenache		variety
I3 (11)	Tryptophol Ethyl caffeic coumarin	lower in Cinsault Higher in grenache	Higher in wine	fermentation

Tableau 13: Main characteristics of each cluster

A list of features for the ESI- analysis, including information regarding the annotation, feature intensities in each sample, and cluster attribution, is provided in Supplementary data (Table SX)

Some differences were also observed between the two fermentation scales. A few features (15 in Syrah, 67 in Grenache, 18 in Cinsault) were significantly more abundant in the pilot scale wine than in the corresponding laboratory scale wine. Most of them were attributed to anthocyanins, flavonols and protocatechuic acid, along with caftaric acid in Grenache, suggesting more important polyphenol degradation at laboratory scale, possibly due to increased oxidation. Accordingly, GRP showed higher concentration in the Cinsault and Grenache LSW than in the PSW. However, flavan-3-ols which are known to be susceptible to oxidation were not affected, except for a procyanidin dimer which was significantly lower in the Grenache LSW than in the PSW. Moreover, a number of N derivatives including tryptophane, phenylalanine and riboflavin, were more abundant in the laboratory scale wines, suggesting some differences in yeast metabolism.

7. Conclusions

In conclusion, comparison of wines and musts made from Syrah, Grenache and Cinsault grapes using the same wine-making process highlighted important differences due to berry characteristics. Thus, musts and wines made from Syrah grapes showed higher absorbance values at 280 and 520 nm and higher concentrations of phenolic compounds and in particular of pigments such as anthocyanins and flavonols, reflecting the higher content of these molecules in Syrah grapes (Mattivi et al., 2006; Romero-Cascales et al., 2005) and/or their high extraction rate. Grenache musts and wines were intermediate in terms of total phenol content but showed the highest values of A_{320} and higher levels of caftaric acid derivatives, consistent with the high concentrations of hydroxycinnamic acids reported earlier in Grenache grapes. Cinsault musts and wines showed intermediate absorbance values at 280 and 520 nm but much lower levels of phenolic compounds than the Syrah and Grenache samples. This discrepancy indicates that absorbance in Cinsault samples is due to the presence of other compounds, which may be higher molecular weight compounds formed by enzymatic oxidation of grape phenolics detected as Cinsault markers, and present in higher concentration in wines. Future studies will aim at identifying these compounds as well as other markers of the grape variety and/or of the stage (before or after fermentation) detected by non-targeted HRMS analysis.

8. References

- Arapitsas, P., and Mattivi, F. (2018). LC-MS Untargeted Protocol for the Analysis of Wine. In *Metabolic Profiling: Methods and Protocols*, G.A. Theodoridis, H.G. Gika, and I.D. Wilson, eds. (New York, NY: Springer), pp. 225–235.
- Arapitsas, P., Ugliano, M., Marangon, M., Piombino, P., Rolle, L., Gerbi, V., Versari, A., and Mattivi, F. (2020). Use of Untargeted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Metabolome To Discriminate Italian Monovarietal Red Wines, Produced in Their Different Terroirs. *J. Agric. Food Chem.* 68, 13353–13366. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00879>.
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., and Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Anal. Chim. Acta* 458, 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01617-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01617-8).
- Becerra-Rodríguez, C., Taghouti, G., Portier, P., Dequin, S., Casal, M., Paiva, S., and Galeote, V. (2021). Yeast Plasma Membrane Fungal Oligopeptide Transporters Display Distinct Substrate Preferences despite Their High Sequence Identity. *J. Fungi* 7, 963. <https://doi.org/10.3390/jof7110963>.

- Boulet, J.-C., Trarieux, C., Souquet, J.-M., Ducasse, M.-A., Caillé, S., Samson, A., Williams, P., Doco, T., and Cheynier, V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food Chem.* 190, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.062>.
- Boursiquot, J.M., Sapis, J.C., and Macheix, J.J. (1986). Les esters hydroxycinnamiques chez le genre *Vitis*. Essai d'application taxonomique. Premiers resultats. Note presentee par Roger Buvat. *Comptes Rendus L'Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* 302, 177. .
- Brouillard, R., and El Hage Chahine, J.M. (1980). Chemistry of anthocyanin pigments. 6. Kinetic and thermodynamic study of hydrogen sulfite addition to cyanin. Formation of a highly stable Meisenheimer-type adduct derived from a 2-phenylbenzopyrylium salt. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5375–5378. <https://doi.org/10.1021/ja00536a043>.
- Cayla, L., Pouzalgues, N., and Masson, G. (2011). *Connaissance et maîtrise de la couleur des vins Rosés*. 8. .
- Cheynier, and Van Hulst, M.W.J. (1988). Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* 36, 10–15. <https://doi.org/10.1021/jf00079a003>.
- Cheynier, Trousdale, E.K., Singleton, V.L., Salgues, M.J., and Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.* 34, 217–221. <https://doi.org/10.1021/jf00068a016>.
- Cheynier, Rigaud, J., Souquet, J.M., Barillere, J.M., and Moutonnet, M. (1989a). Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of grenache and chardonnay wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 36–42. .
- Cheynier, V., Souquet, J.M., and Moutonnet, M. (1989b). Glutathione Content and Glutathione to Hydroxycinnamic Acid Ratio in *Vitis vinifera* Grapes and Musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 320–324. .
- Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., and Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 298–305. .
- Cordente, A.G., Capone, D.L., and Curtin, C.D. (2015). Unravelling glutathione conjugate catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 9709–9722. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6833-5>.
- Duc, C., Maçna, F., Sanchez, I., Galeote, V., Delpech, S., Silvano, A., and Mouret, J.-R. (2020). Large-Scale Screening of Thiol and Fermentative Aroma Production during Wine Alcoholic Fermentation: Exploring the Effects of Assimilable Nitrogen and Peptides. *Fermentation* 6, 98. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040098>.
- Iriti, M., and Vigentini, I. (2015). Tryptophan-Ethylester, the False (Unveiled) Melatonin Isomer in Red Wine. *Int. J. Tryptophan Res.* 8, IJTR.S22450. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S22450>.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., and Trollat, P. (1995). Resveratrol Content of Wines of Different Ages: Relationship With Fungal Disease Pressure in the Vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 1–4. .
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., Cheynier, V., and Sommerer, N. (2015). A High-Throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. *Molecules* 20, 7890–7914. <https://doi.org/10.3390/molecules20057890>.

- Leborgne, C., Lambert, M., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Masson, G., Mouret, J.-R., and Cheynier, V. (2022). Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics. *Molecules* 27, 1359. <https://doi.org/10.3390/molecules27041359>.
- Leborgne, C., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Carrillo, S., Sommerer, N., Vernhet, A., Mouret, J.-R., and Cheynier, V. (submitted). Impact of fermentation on the polyphenol composition and color of Grenache, Cinsault, and Syrah rosé wines. *Submitt. FoodChemistry*.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., and Velasco, R. (2006). Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7692–7702. <https://doi.org/10.1021/jf061538c>.
- OIV (2019). RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV Caractéristiques Chromatiques.
- Ontañón, I., Sánchez, D., Sáez, V., Mattivi, F., Ferreira, V., and Arapitsas, P. (2020). Liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolomics for understanding the compositional changes induced by oxidative or anoxic storage of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 68, 13367–13379. .
- Peres, S., Giraud-Heraud, E., Masure, A.-S., and Tempere, S. (2020). Rose Wine Market: Anything but Colour? *Foods* 9, 1850. <https://doi.org/10.3390/foods9121850>.
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, J.M., Fernández-Fernández, J.I., and Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in Anthocyanin Extractability from Grapes to Wines According to Variety. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 212–219. .
- Roullier-Gall, C., Hemmler, D., Gonsior, M., Li, Y., Nikolantonaki, M., Aron, A., Coelho, C., Gougeon, R.D., and Schmitt-Kopplin, P. (2017). Sulfites and the wine metabolome. *Food Chem.* 237, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.039>.
- Ruiz-Rodríguez, A., Carrera, C.A., Setyaningsih, W., Barbero, G.F., Ferreiro-González, M., Palma, M., and Barroso, C.G. (2017). Tryptophan Levels during Grape Ripening: Effects of Cultural Practices. *Molecules* 22, 941. <https://doi.org/10.3390/molecules22060941>.
- Somers, T.C., Vérette, E., and Pocock, K.F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.* 40, 67–78. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740400109>.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., et al. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3, 211–221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>.
- Trouillas, P., Sancho-García, J.C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., and Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.* 116, 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>.
- Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Eder, M., Lamuela-Raventos, R.M., Sommerer, N., and Cheynier, V. (2017). The Hidden Face of Wine Polyphenol Polymerization Highlighted by High-Resolution Mass Spectrometry. *ChemistryOpen* 6, 336–339. <https://doi.org/10.1002/open.201700044>.
- White, W.H., Gunyuzlu, P.L., and Toyn, J.H. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Is Capable of de Novo Pantothenic Acid Biosynthesis Involving a Novel Pathway of β -Alanine Production from Spermine*. *J. Biol. Chem.* 276, 10794–10800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009804200>.

Discussion générale

L'objectif de ce travail était 1/ d'approfondir les connaissances fondamentales sur les pigments des vins rosés et leur relation avec la couleur et 2/ de mieux comprendre l'impact de la fermentation alcoolique sur cette couleur perçue et la composition en pigments. Pour mieux appréhender ces questions, nous avons commencé par utiliser un jeu de données existant regroupant des analyses de composition phénolique et de couleur pour plus de 250 vins rosés commerciaux. Ensuite, nous avons réalisé des fermentations alcooliques en utilisant des moûts issus de trois cépages emblématiques de Provence – Syrah, Grenache et Cinsault – fournis par le centre du rosé, pour étudier plus en détails l'impact de cette étape du procédé de vinification sur la couleur et les polyphénols. En effet, les professionnels ont observé que cette étape se traduit par des pertes de couleur parfois importantes avec des variations dont l'origine n'est pas expliquée.

Dans un premier temps, notre étude s'est intéressée au lien existant entre couleur et composition phénolique des vins rosés. Pour ce faire, nous avons utilisé un grand jeu de données et mis en place des traitements chimiométriques. Ce jeu de données regroupait 1/ les concentrations de 125 composés phénoliques, obtenues par une approche métabolomique ciblée utilisant la chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle (UHPLC-QqQ-MS) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) et 2/ l'analyse de la couleur caractérisée par spectrophotométrie, pour 268 vins rosés commerciaux.

Les vins analysés présentaient une grande diversité de couleur, allant du presque blanc au rouge clair, couvrant toute la gamme de nuances décrites par le nuancier du Centre du Rosé (<https://centredurose.fr/>). Les résultats démontrent de grandes différences dans la composition phénolique et surtout pigmentaire entre les vins rosés pâles et les vins présentant une couleur plus intense. Ces données démontrent que les différences de couleur ne sont pas simplement liées à un phénomène de dilution et établissent des profils phénoliques spécifiques aux différents styles de couleur. Ainsi, la composition des vins rosés pâles de Provence est plus proche de celle des vins blancs, avec des composés phénoliques représentés principalement par des hydroxycinnamoyltartrates et de faibles concentrations de pigments, tandis que les vins présentant une intensité de couleur plus élevée contiennent des proportions plus importantes de flavanols et d'anthocyanes, extraits des pellicules des raisins.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence trois groupes distincts, ayant des intensités colorantes croissantes et donc des valeurs de L^* décroissantes. Dans un premier temps, nous avons constaté que la couleur et la teinte saumon-orange des vins du groupe le plus clair, pour lequel les composantes rouge (a^*) et jaune (b^*) sont fortement corrélées, sont principalement dues aux phénylpyranoanthocyanes dérivées des hydroxycinnamates et aux carboxypyrananthocyanes formées à partir de l'acide pyruvique, un métabolite de levure. En effet, ces composés sont des pigments orangés et, contrairement à leurs précurseurs anthocyaniques, ils sont totalement colorés en solution aqueuse indépendamment du pH. La couleur plus intense et plus rouge (a^*) des vins du groupe intermédiaire est associée à des niveaux plus élevés d'anthocyanes et de carboxypyrananthocyanes et à des valeurs de pH plus faibles. Enfin, la couleur rouge (a^*) des vins les plus foncés est influencée par des pigments dérivés des anthocyanes et des flavanols. Seuls les composés de faible masse (dimères) de ces familles figurent parmi les cibles de la méthode MRM utilisée dans l'étude mais ils peuvent être considérés comme des marqueurs des composés de plus haut poids moléculaire issus des mêmes réactions, de même que les unités de flavanols libérées par

phloroglucinolyse, également dosées dans la méthode. L'interprétation de la composante jaune de la couleur, b^* pour les deux groupes les plus colorés est plus complexe. Pour le groupe intermédiaire, elle est associée à une faible intensité de couleur, à des valeurs de pH élevées et à des niveaux élevés de composés tels que les dihydroflavonols, les acides aminés aromatiques, les flavanols et les adduits anthocyane-flavanol. Ces composés ne sont pas eux-mêmes colorés mais, en particulier dans des conditions d'oxydation, ils pourraient être les précurseurs de pigments jaunes qui nécessitent une étude plus approfondie. Pour les vins plus foncés, le jaunissement semble associé à l'oxydation, et en particulier aux produits dérivés des réactions de l'acétaldéhyde avec les anthocyanes et les flavanols, qui peuvent être considérés comme des marqueurs de familles plus larges de composés apparentés.

Ce premier screening a permis de mettre en lumière trois profils différents des vins rosés basés sur leurs couleurs et leurs compositions phénoliques. Plusieurs étapes de la vinification peuvent impacter cette couleur : la macération et la fermentation alcoolique. L'ajout d'agents de collage au cours de la vinification peut aussi avoir un impact qui a déjà été étudié pour les vins rosés (Gil et al., 2017, 2019).

La macération pré-fermentaire correspond à l'étape d'extraction des pigments des parties solides de la baie au moût. Cette étape est très étudiée dans le cas des vinifications en rouge et blanc. Les travaux publiés sur les étapes pré-fermentaires en vinification en blanc s'intéressent surtout aux phénomènes d'oxydation enzymatique impliqués dans le brunissement des moûts. Cependant, il a été démontré que les flavanols extraits lors des opérations pré-fermentaires, s'ils n'ont pas été éliminés à ce stade par oxydation, sont les principaux responsables du brunissement vins blancs (Cheynier et al., 1989). Pour la vinification en rouge, le but est plutôt l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols tout en conservant les arômes variétaux thermosensibles. De nombreuses études existent déjà sur cette étape de la vinification qui reste similaire pour tous les types de vins et dépend donc des cépages (caractéristiques pariétales, composition phénolique...) et des techniques et modalités d'extraction mises en place (température, temps, PEF, macération carbonique...).

A l'inverse, la fermentation alcoolique est une étape encore peu étudiée pour son impact sur la couleur ou la composition phénolique surtout dans le cas de la vinification en rosé. C'est pourquoi la suite de cette étude s'est concentrée sur cette étape de la vinification.

De nombreuses études s'intéressent au métabolisme levurien et à l'adsorption des composés phénoliques sur les parois de levures pour les vins rouges. La production de métabolites tels que l'acétaldéhyde est impactée par la souche utilisée (Morata, Gómez-Cordovés, Colomo, et al., 2003b) mais aussi par les conditions du milieu comme la concentration en SO_2 (Ochando et al., 2020). Les études d'interaction entre levures et polyphénols ont montré une plus grande affinité pour les proanthocyanidines de haut poids moléculaire (Bindon et al., 2010; Fournand et al., 2006) et pour les anthocyanes *p*-coumaroylées (Abi-Habib, Poncet-Legrand, et al., 2021; Gonçalves et al., 2012). De plus, certaines études se focalisent la production de pigments lors de cette étape de la vinification en rouge. Il a été démontré que la vitisine B découlant de la réaction de la malvidine-3-O-glucoside avec l'acétaldéhyde était formée majoritairement durant la fermentation alcoolique (Asenstorfer et al., 2003). Par ailleurs, des pertes d'anthocyanes très importantes ont été observées pendant la fermentation de vins rouges en phase homogène (Morel-Salmi et al., 2006; Vernhet et al., 2020) mais la perte de couleur observée n'est pas proportionnelle à celle des polyphénols ou des pigments analysés (Somers & Evans, 1979). En revanche, il n'existe pas de travaux sur l'évolution des pigments au cours de la fermentation dans le cas des vins rosés. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur cette étape de la vinification des vins rosés connue pour avoir un très fort impact sur la couleur.

La première étape a été d'étudier les effets simples et d'interaction du pH (3,1 ; 3,5 ; 3,9), de la température (12°C ; 16°C ; 20°C) et de la concentration en sulfites (20mg/L ; 50mg/L ; 80mg/L) lors de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition en polyphénols des vins rosés en fin de fermentation. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en place des plans d'expérience permettant de construire un modèle mathématique statistique. Au cours de ce projet, nous avons évalué trois cépages différents de *Vitis vinifera* utilisés couramment pour l'élaboration des vins rosés dans la région de la Provence française et sélectionnés pour leur potentiel de coloration différent : Grenache, Syrah et Cinsault (Cayla et al., 2011). Les techniques d'analyses employées ont été similaires à celles utilisées pour le chapitre 3. La composition phénolique a été obtenue par une approche métabolomique ciblée utilisant la chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle (UHPLC-QqQ-MS) en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) et la couleur caractérisée par spectrophotométrie.

Au cours de cette première étude, nous avons constaté que les trois paramètres étudiés n'avaient aucun impact sur la composition phénolique et un impact limité sur la couleur, en lien avec les équilibres chimiques en solution des anthocyanes et des sulfites pour les moûts. Il est important de noter que ces résultats sont valables pour la souche de levure utilisée (K1) et dans les gammes de variation de pH, température et concentration en SO₂ étudiées.

De manière générale, le SO₂ est utilisé en œnologie pour son caractère antioxydant et est connu pour son effet de décoloration des anthocyanes. Lors de l'étude précédente sur la couleur des vins rosés commerciaux, un impact du SO₂ sur la couleur en lien avec des phénomènes d'oxydation a été montré (Leborgne et al., 2022). En effet, le SO₂ inhibe l'oxydation enzymatique et donc permet de maintenir dans les moûts des concentrations plus élevées de composés oxydables qui peuvent conduire au brunissement des vins. Ces nouveaux résultats suggèrent que cet impact n'intervient pas au cours de la fermentation alcoolique mais plutôt lors des étapes post-fermentaires ou pré-fermentaires (brunissement des moûts).

Toutefois, des pertes de couleur et de composition phénolique ont été observées pendant la fermentation alcoolique. Afin d'évaluer l'impact de cette étape importante de la vinification sur la couleur et la composition phénolique, les points centraux (réalisés en quadruplicat ou en duplicat) des plans expérimentaux mis en œuvre précédemment ont été étudiés plus en détails. Les résultats des analyses de composition ciblées et de la couleur ont été utilisés et complétés par des analyses par chromatographie d'exclusion stérique couplée à la spectrophotométrie. De plus, une analyse des composés phénoliques adsorbés par les parois de levure a été réalisée. Ce focus permet de révéler l'impact de la fermentation alcoolique sur la composition phénolique et la couleur mais aussi de comparer les trois cépages choisis.

Les six moûts issus des trois cépages utilisés ont montré de grandes variations de couleur et de composition. En prenant en compte l'intensité colorante, les six moûts se classent dans le groupe des rosés foncés (groupe 3). Cependant, la composition des moûts de Grenache et Cinsault se rapproche de celle des vins rosés clairs (groupe 1) avec une majorité d'acides hydroxycinnamiques et de leurs dérivés alors que la composition des moûts de Syrah représente bien celle des rosés foncés avec une grande quantité d'anthocyanes, de flavanols et d'acides hydroxycinnamiques.

Après fermentation alcoolique, une forte perte de couleur a été observée pour les modalités Grenache et Cinsault tandis que la perte a été plus limitée pour la Syrah. Les vins de Syrah appartiennent toujours au groupe des rosés foncés tandis que les vins de Cinsault et de Grenache se classent dans le groupe 1 des rosés clairs en accord avec leur composition phénolique constituée majoritairement d'acides hydroxycinnamiques et de leurs dérivés. Les différentes couleurs observées

entre les cépages sont dues à des compositions phénoliques différentes, reflétant l'étendue de l'extraction des raisins et de l'oxydation, mais aussi des taux différents d'adsorption sur les lies. Ainsi, les vins de Syrah présentent des niveaux élevés d'anthocyanes et de pigments dérivés de leurs réactions avec les métabolites de levure (c'est-à-dire l'acétaldéhyde et l'acide pyruvique) et avec les flavanols, tandis que les vins de Grenache et de Cinsault contiennent surtout des acides hydroxycinnamiques et des pigments dérivés de ceux-ci, notamment par oxydation enzymatique. De plus, les analyses par chromatographie d'exclusion stérique ont révélé la présence de composés de haut poids moléculaire qui semblent structurellement différents en fonction des cépages.

Ces différences, observées dès le stade du moût, peuvent s'expliquer par un taux d'extraction plus élevé, malgré une macération plus courte, et/ou un degré d'oxydation enzymatique plus faible des moûts de Syrah par rapport aux moûts de Grenache et de Cinsault. Elles résultent peut-être des caractéristiques spécifiques des raisins mais sont aussi probablement renforcées par le niveau plus élevé de sulfitage utilisé pour la Syrah. La plupart des produits et notamment des pigments formés par oxydation enzymatique dans les moûts de Grenache et de Cinsault sont des composés de poids moléculaire plus élevé qui ont été perdus pendant la fermentation, en raison de l'adsorption sur les lies, comme cela a été montré précédemment pour les vins blancs (Cheynier et al., 1989). En revanche, les pigments des vins colorés de Syrah n'ont été adsorbés que dans une mesure limitée par les lies et les pertes d'anthocyanes observées pendant la fermentation ont pu être attribuées principalement à leurs réactions, comme cela a été observé pour le vin rouge (Morata et al., 2003 ; Vernhet et al., 2020).

Les moûts utilisés lors de cette étude ont été préparés en fonction des pratiques locales avec des temps de macération adaptés à chaque cépage ne permettant pas de conclure sur les différences observées dès le stade moût. En outre, les conditions de vendange de la Syrah n'étant pas optimales, un sulfitage plus intense a été réalisé sur ce cépage rendant encore plus compliquée l'interprétation des résultats.

L'étude suivante a donc été réalisée en normalisant les étapes pré-fermentaires pour les trois cépages et ainsi révéler les différences intrinsèques aux cépages et non dues aux techniques de vinifications. De plus, les fermentations ont été réalisées à l'échelle pilote (100L) mais aussi à l'échelle laboratoire (300mL) afin d'évaluer l'impact de l'échelle de fermentation sur les phénomènes ayant lieu lors de la fermentation alcoolique. Comme pour les études précédentes, une analyse de la couleur a été réalisée par spectrophotométrie sur les moûts et les vins. Cependant, une méthode d'analyse sans a priori, la HPLC-HRMS, a été utilisée pour déterminer la composition phénolique des moûts et des vins. Cette technique d'analyse non ciblée a été utilisée dans le but de révéler certains composés inconnus mais dont la présence a été montrée indirectement. En effet, le chapitre 3 a montré un lien entre la couleur jaune (b^*) et des composés incolores (les dihydroflavonols, les acides aminés aromatiques, les flavanols) qui pourraient être impliqués dans la formation de pigments. De plus, les analyses d'HPSEC et la détection UV-Vis utilisée dans le chapitre 5 ont permis d'observer la présence de composés à haut poids moléculaire non pris en compte dans la méthode d'analyse ciblée et possédant une absorbance dans le visible. Cette approche non ciblée permet de pouvoir acquérir un jeu de donnée extrêmement complet et précis. Cependant, les traitements de ces données restent fastidieux. De nombreux auteurs publient des méthodologies détaillées servant aux traitements de ces énormes jeux de donnée (Arapitsas & Mattivi, 2018; Vallverdú-Queralt et al., 2017a), illustrant bien la complexité de la tâche.

Les résultats de l'analyse UHPLC-HRMS ont montré très peu de différences entre les vins issus des deux échelles de fermentation même si une légère oxydation a pu être observée par spectrophotométrie (augmentation de la composante jaune b^*) à l'échelle laboratoire, probablement causée par les prélèvements réalisés au cours du procédé fermentaire. Ces données permettent donc

de conclure que l'échelle laboratoire permet de « mimer » correctement l'échelle pilote et donc de valider le protocole d'étude des vins rosés pendant la fermentation alcoolique même si une attention particulière doit être portée à l'oxydation qui peut entraîner une plus grande variabilité.

L'impact de la fermentation alcoolique et les pertes engendrées ont été différentes pour la Syrah comparée aux cépages Grenache et Cinsault comme observé dans le chapitre 5. En effet, les pertes ont été beaucoup plus importantes lors des fermentations des cépages Grenache et Cinsault alors qu'un impact beaucoup plus faible est observé lors des fermentations de Syrah. Nous avons vu lors du chapitre 5 que ces différences sont liées à différents phénomènes, notamment une forte adsorption des polyphénols sur les parois des levures pour les vins de Grenache et de Cinsault et à une transformation des anthocyanes natives en pigments dérivés pour les vins de Syrah.

La comparaison des vins et des moûts élaborés à partir de Syrah, Grenache et Cinsault selon le même procédé de vinification a mis en évidence des différences importantes dues aux caractéristiques des raisins. Ainsi, les moûts et les vins issus de Syrah présentaient des valeurs d'absorbance plus élevées à 280 et 520 nm et des concentrations plus importantes de nombreux composés phénoliques et en particulier de pigments tels que les anthocyanes et les flavonols, reflétant la teneur plus élevée de ces molécules dans les raisins de Syrah (Mattivi et al., 2006; Romero-Cascales et al., 2005) et/ou leur taux d'extraction élevé à partir de cette matière première.

Les moûts et les vins de Grenache se sont révélés intermédiaires en termes de contenu phénolique total mais présentaient les valeurs les plus élevées d' A_{320} et des niveaux plus élevés de dérivés de l'acide caftarique, ce qui est cohérent avec les concentrations élevées d'acides hydroxycinnamiques rapportées précédemment dans les raisins de Grenache (Wirth et al., 2012).

Les moûts et les vins de Cinsault présentaient quant à eux des valeurs d'absorbance intermédiaires à 280 et 520 nm mais des niveaux de composés phénoliques beaucoup plus faibles que les échantillons de Syrah et de Grenache. Cette divergence indique que l'absorbance des échantillons de Cinsault est due à la présence d'autres composés, qui peuvent être des composés de poids moléculaire plus élevé formés par l'oxydation enzymatique des composés phénoliques du raisin. Ces composés détectés comme marqueurs du Cinsault, étaient présents en plus forte concentration dans les vins.

Ces différences de couleur et de composition phénoliques sont en accord avec celles observées lors de la précédente étude, confirmant l'effet des caractéristiques variétales sur l'impact des étapes pré-fermentaires. En effet, les moûts et vins de Syrah sont principalement composés d'anthocyanes, de flavanols et d'acides hydroxycinnamiques ce qui les classe parmi les vins rosés foncés (groupe 3) décrits au début de ce travail, même lorsqu'ils sont obtenus après une macération très courte. La couleur soutenue des vins du groupe 3 n'est donc pas uniquement liée aux pratiques œnologiques telles que la durée de macération mais aussi aux caractéristiques de la matière première. Les moûts et vins de Grenache et Cinsault sont eux apparentés aux vins clairs (groupe 1) principalement composés d'acides hydroxycinnamiques et de leurs dérivés.

En terme de couleur, l'analyse à 520 nm sous différentes conditions a mis en lumière dans les chapitres 5 & 6 une plus grande proportion de forme flavylum qu'attendue par le calcul théorique. En effet, dans le chapitre 6, on observe 30% à 40% de forme colorée flavylum alors que d'après les conditions de pH la forme flavylum devrait représenter entre 12% et 15%. Cette différence est sûrement imputable à des phénomènes de copigmentation ou d'auto-association (Trouillas et al., 2016). Cependant, la technique d'analyse de la copigmentation par dilution du vin n'est pas applicable aux vins rosés clairs même si des études ont montré que cela pouvait se produire dans les conditions de ratio molaire pigment/copigment retrouvées dans ces rosés (Oliveira et al., 2021).

Conclusions et perspectives

La couleur des rosés est un aspect qualitatif primordial dans la perception de ces vins particuliers. Ce travail représente une première approche du sujet permettant d'identifier les points critiques pour la couleur lors de la fermentation alcoolique.

Nous avons pu observer différents profils phénoliques en fonction de la couleur des vins expliqués par des phénomènes d'extraction ou d'oxydation. Au-delà de leurs implications sur la couleur et donc la qualité des vins rosés, les profils de composition phénolique obtenus peuvent être utiles pour l'authentification des origines variétales ou géographiques de ces vins.

L'étude de trois cépages emblématiques de Provence a aussi révélé des potentiels de couleurs différents pour ces cépages avec des vins de Syrah très rouges et comprenant des anthocyanes natives et des flavanols en plus des acides hydroxycinnamiques. Au contraire, les cépages Grenache et Cinsault ont permis de vinifier des vins pâles apparentés à ceux du groupe 1, riches en acides hydroxycinnamiques et sujets à l'oxydation enzymatique comme les vins blancs. De plus, l'adsorption des pigments sur les parois de levure n'est pas du tout négligeable pour ces vins, contrairement à ce qui est observé sur la Syrah ou décrit dans la littérature pour la vinification en rouge. Le choix du cépage est donc primordial pour la vinification en rosé. En effet, un rosé clair ne peut-être produit à partir de Syrah seulement et nécessite un assemblage avec d'autres cépages moins colorés indépendamment du temps de macération.

Le protocole de fermentation en phase homogène à l'échelle laboratoire (300mL) des vins rosés a été représentatif des phénomènes se produisant à l'échelle pilote. Ce protocole permettra de pouvoir multiplier le nombre de modalités testées tout en réduisant la quantité de raisin nécessaire. Cependant, l'apport oxygène reste un point de vigilance important qui peut engendrer de grandes variations à cette petite échelle. Il est donc conseillé de travailler autant que possible à l'abri de l'oxygène ou en présence de sulfites protégeant le moût de l'oxydation.

Lors de ce travail, le Cinsault a montré une composition atypique, constituée en grande partie de composés à haut poids moléculaire difficilement détectables et absorbant dans le visible. De plus, la corrélation entre la composante jaune b^* et des composés incolores dans le chapitre 3 suggère la présence de pigments jaunes inconnus et donc non analysés par les méthodes ciblées. Les résultats de la composition phénolique obtenus par l'approche sans a priori restent encore à approfondir. En effet, seul le jeu de données en mode positif contenant 735 variables a été exploité. Seulement 40 de ces composés ont été identifiés comme des composés phénoliques sur la base de leurs temps de rétention, m/z et spectre UV. Ce nombre est donc bien inférieur à celui des composés dosés par la méthode ciblée, plus sensible. Cependant, cette approche a également permis de détecter d'autres types de marqueurs et en particulier un grand nombre de composés azotés comme décrit dans une précédente étude (Arapitsas et al., 2020). Ces composés comprennent des dérivés de peptides et de bases puriques mais aussi probablement des adduits formés par réaction entre des peptides et des composés phénoliques. Ainsi, ces méthodes d'analyse permettent de générer de large jeux de données mais leurs interprétations restent encore longues et fastidieuses, la plupart des annotations devant être faites ou vérifiées manuellement. L'analyse des clusters décrits au chapitre 6 doit être poursuivie, par exemple par les approches de Van Krevelen et la recherche de motifs structuraux répétés (diagramme de Kendrick) comme décrit pour les mélanges complexes résultant de la condensation de l'épicatéchine et de la malvidine-3-glucoside avec l'éthanal (Vallverdu-Queral et al, 2017), afin d'attribuer les formules brutes à des familles plus précises. En outre, la comparaison des spectres de

fragmentation devrait permettre de mettre en évidence des parentés structurales entre ces marqueurs et de progresser dans leur identification. Les études futures viseront à identifier ces composés ainsi que d'autres marqueurs du cépage et/ou du stade (avant ou après fermentation) détectés par analyse HRMS non ciblée. En effet, seul un jeu de données a été exploité (mode positif) et de nombreux traitements restent encore à appliquer. D'autres analyses ont été effectuées sur l'impact du collage et en partie présentés via un poster au congrès Macrowine 2021. Une fois la méthode de retraitement adaptée, ces jeux de données pourraient nous en apprendre beaucoup sur les phénomènes impactant la couleur des vins rosés.

Références bibliographiques

- Abbal, P., Vernhet, A., Habib, E. A., Carrillo, S., Ducasse, M.-A., & Poncet-Legrand, C. (2020). Mechanical tests and definition of new indexes of grape berry firmness. Evolution of berry skin hardness during alcoholic fermentation. *Vitis*, 59, 163. <https://doi.org/10.5073/vitis.2020.59.163-168>
- Abi Habib, E. (2017). *Extraction des anthocyanes et des tanins en vinifications en rouge : Étude de certains mécanismes et impact de la matière première* [These en préparation, Montpellier, SupAgro]. <http://www.theses.fr/s185045>
- Abi-Habib, E., Poncet-Legrand, C., Roi, S., Carrillo, S., Doco, T., & Vernhet, A. (2021). Impact of grape variety, berry maturity and size on the extractability of skin polyphenols during model wine-like maceration experiments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(8), 3257-3269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10955>
- Abi-Habib, E., Vernhet, A., Roi, S., Carrillo, S., Jørgensen, B., Hansen, J., Doco, T., & Poncet-Legrand, C. (2021). Impact of the variety on the adsorption of anthocyanins and tannins on grape flesh cell walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/jsfa.11685>
- Adams, D. O. (2006). Phenolics and Ripening in Grape Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 249-256.
- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing : A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 238-254. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.028>
- Alluis, B., Pérol, N., El hajji, H., & Dangles, O. (2000). Water-Soluble Flavonol (=3-Hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) Derivatives : Chemical Synthesis, Colouring, and Antioxidant Properties. *Helvetica Chimica Acta*, 83(2), 428-443. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2675\(20000216\)83:2<428::AID-HLCA428>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2675(20000216)83:2<428::AID-HLCA428>3.0.CO;2-J)
- Amrani Joutei, K. (1993). *Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin : Étude de leur extractibilité* [These de doctorat, Bordeaux 2]. <http://www.theses.fr/1993BOR20238>
- Anderson, D. W. (1970). Identification of acetic acid as an acylating agent of anthocyanin pigments in grapes. *Phytochemistry*, 9, 1579-1583.
- Andreu-Navarro, A., Fernández-Romero, J. M., & Gómez-Hens, A. (2012). Determination of polyphenolic content in beverages using laccase, gold nanoparticles and long wavelength fluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 713, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.049>

- Andújar-Ortiz, I., Pozo-Bayón, M. Á., Garrido, I., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2012). Effect of using glutathione-enriched inactive dry yeast preparations on the phenolic composition of rosé Grenache wines during winemaking. *OENO One*, 46(3), 241. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2012.46.3.1516>
- Arapitsas, P., & Mattivi, F. (2018). LC-MS Untargeted Protocol for the Analysis of Wine. Dans G. A. Theodoridis, H. G. Gika, & I. D. Wilson (Éds.), *Metabolic Profiling : Methods and Protocols* (p. 225-235). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7643-0_16
- Arapitsas, P., Ugliano, M., Marangon, M., Piombino, P., Rolle, L., Gerbi, V., Versari, A., & Mattivi, F. (2020). Use of Untargeted Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Metabolome To Discriminate Italian Monovarietal Red Wines, Produced in Their Different Terroirs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13353-13366. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00879>
- Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11(3), 1139-1144. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88467-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88467-8)
- Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1975). Anthocyanin, flavonol copigments, and pH responsible for larkspur flower color. *Phytochemistry*, 14(12), 2677-2682. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85249-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85249-6)
- Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H., & Massie, D. R. (1970). A stable blue non-metallic co-pigment complex of delphinidin and C-glycosylflavones in Prof. Blaauw Iris. *Phytochemistry*, 9(3), 619-627.
- Asenstorfer, R. E., Hayasaka, Y., & Jones, G. P. (2001). Isolation and Structures of Oligomeric Wine Pigments by Bisulfite-Mediated Ion-Exchange Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12), 5957-5963. <https://doi.org/10.1021/jf011261a>
- Asenstorfer, R. E., Markides, A. J., Iland, P. G., & Jones, G. P. (2003). Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 40-46. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00230.x>
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 15-27. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01617-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01617-8)
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters*, 43(35), 6151-6153. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)01294-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)01294-7)
- Bae, Y. S., Foo, L. Y., & Karchesy, J. J. (1994). *GPC of Natural Procyanidin Oligomers and Polymers*. 3.

- Bakker, J., Picinelli, A., & Bridle, P. (1993). Model wine solutions : Colour and composition changes during ageing. *Vitis*, 32, 111-118.
- Bakker, J., & Timberlake, C. (1997a). Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry - J AGR FOOD CHEM*, 45. <https://doi.org/10.1021/jf960252c>
- Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1985a). The distribution and content of anthocyanins in young port wines as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(12), 1325-1333. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740361218>
- Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1985b). The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(12), 1315-1324. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740361217>
- Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1997b). Isolation, Identification, and Characterization of New Color-Stable Anthocyanins Occurring in Some Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 35-43. <https://doi.org/10.1021/jf960252c>
- Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., & Casetta, B. (1995). HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2104-2109. <https://doi.org/10.1021/jf00056a027>
- Baranowski, E. S., & Nagel, C. W. (1983). Kinetics of Malvidin-3-Glucoside Condensation in Wine Model Systems. *Journal of Food Science*, 48(2), 419-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10756.x>
- Bate-Smith, E. C. (1954). Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochemical Journal*, 58(1), 122-125.
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Hernández, A., Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2016). Anthocyanins influence tannin-cell wall interactions. *Food Chemistry*, 206, 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.045>
- Bavaresco, L., Fregoni, C., Cantù, E., & Trevisan, M. (1999). Stilbene compounds : From the grapevine to wine. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25(2-3), 57-63.
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry*, 36(18), 5566-5577. <https://doi.org/10.1021/bi9700328>
- Beart, J., H. Lilley, T., & Haslam, E. (1985). Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric

proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 0(9), 1439-1443.

<https://doi.org/10.1039/P29850001439>

- Becerra-Rodríguez, C., Taghouti, G., Portier, P., Dequin, S., Casal, M., Paiva, S., & Galeote, V. (2021). Yeast Plasma Membrane Fungal Oligopeptide Transporters Display Distinct Substrate Preferences despite Their High Sequence Identity. *Journal of Fungi*, 7(11), 963. <https://doi.org/10.3390/jof7110963>
- Bely, M., Sablayrolles, J. M., & Barre, P. (1990). Description of Alcoholic Fermentation Kinetics : Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 319-324.
- Benabdeljalil, C., Cheynier, V., Fulcrand, H., Hafiki, A., Mosaddak, M., & Moutounet, M. (2000). Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levure. *Sciences des Aliments*, 20(2), 203-220. <https://doi.org/10.3166/sda.20.203-220>
- Berké, B., Chèze, C., Vercauteren, J., & Deffieux, G. (1998). Bisulfite addition to anthocyanins : Revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters*, 39(32), 5771-5774. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01205-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01205-2)
- Berké, B., & Freitas, V. (2005). Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chemistry - FOOD CHEM*, 90, 453-460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.009>
- Biau, S. (1996). *Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux*. Université Bordeaux 2.
- Bindon, K. A., Kassara, S., & Smith, P. A. (2017). Towards a model of grape tannin extraction under wine-like conditions : The role of suspended mesocarp material and anthocyanin concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1(23), 22-32. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12258>
- Bindon, K. A., Madani, S. H., Pendleton, P., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2014). Factors affecting skin tannin extractability in ripening grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(5), 1130-1141. <https://doi.org/10.1021/jf4050606>
- Bindon, K. A., Smith, P. A., & Kennedy, J. A. (2010). Interaction between grape-derived proanthocyanidins and cell wall material. 1. Effect on proanthocyanidin composition and molecular mass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2520-2528. <https://doi.org/10.1021/jf9037453>
- Blouin, . (2014). *Le SO2 en oenologie*. Dunod. <https://www.dunod.com/sciences-techniques/so2-en-oenologie>

- Bondar, J. V. (1983). Universal optimality of experimental designs : Definitions and a criterion. *Canadian Journal of Statistics*, 11(4), 325-331. <https://doi.org/10.2307/3314890>
- Boss, P. k., Davies, C., & Robinson, S. P. (1996). Anthocyanin composition and anthocyanin pathway gene expression in grapevine sports differing in berry skin colour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2(3), 163-170. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1996.tb00104.x>
- Boulet, J.-C., Ducasse, M.-A., & Cheynier, V. (2017). Ultraviolet spectroscopy study of phenolic substances and other major compounds in red wines : Relationship between astringency and the concentration of phenolic substances. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), 193-199. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12265>
- Boulet, J.-C., Trarieux, C., Souquet, J.-M., Ducasse, M.-A., Caillé, S., Samson, A., Williams, P., Doco, T., & Cheynier, V. (2016). Models based on ultraviolet spectroscopy, polyphenols, oligosaccharides and polysaccharides for prediction of wine astringency. *Food Chemistry*, 190, 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.062>
- Boulton, R. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine : A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.
- Boursiquot, J. M., Sapis, J. C., & Macheix, J. J. (1986a). Application of hydroxycinnamic ester determinations to taxonomy problems in *Vitis* genus. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie 3 Sciences de la Vie (France)*.
- Boursiquot, J. M., Sapis, J. C., & Macheix, J. J. (1986b). Les esters hydroxycinnamiques chez le genre *Vitis*. Essai d'application taxonomique. Premiers resultats. Note presentee par Roger Buvat. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, 302(6), 177.
- Bourzeix, M., Weyland, D., & Heredia, N. (1986). Etudes des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne. 1. Interet physiologique, natures chimiques des catechines et des procyanidols; 2. Travaux de recherches [chromatographie liquide haute performance; gelee de raisin. *Bulletin de l'OIV*, 59(669-670), 1171.
- Božič, J. T., Butinar, L., Albreht, A., Vovk, I., Korte, D., & Vodopivec, B. M. (2020). The impact of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts on wine colour : A laboratory study of vinylphenolic pyranoanthocyanin formation and anthocyanin cell wall adsorption. *LWT*, 123, 109072. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109072>
- Brouillard, R., & Dangles, O. (1993). *Flavonoids and flower colour. The Flavonoids. Advances in research since 1986*. J. B. Harborne. London. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-2913-6_16

- Brouillard, R., & Dangles, O. (1994). Anthocyanin molecular interactions : The first step in the formation of new pigments during wine aging? *Food Chemistry*, 51(4), 365-371.
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90187-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90187-2)
- Brouillard, R., & Dubois, J.-E. (1977). Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, 99(5), 1359-1364.
<https://doi.org/10.1021/ja00447a012>
- Brouillard, R., & El Hage Chahine, J. M. (1980). Chemistry of anthocyanin pigments. 6. Kinetic and thermodynamic study of hydrogen sulfite addition to cyanin. Formation of a highly stable Meisenheimer-type adduct derived from a 2-phenylbenzopyrylium salt. *Journal of the American Chemical Society*, 102(16), 5375-5378. <https://doi.org/10.1021/ja00536a043>
- Bührle, F., Gohl, A., & Weber, F. (2017). Impact of Xanthylum Derivatives on the Color of White Wine. *Molecules*, 22(8), 1376. <https://doi.org/10.3390/molecules22081376>
- Cai, Y., H. Lilley, T., & Haslam, E. (1990). Polyphenol–anthocyanin copigmentation. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 0(5), 380-383.
<https://doi.org/10.1039/C39900000380>
- Carlucci, A., & Monteleone, E. (2001). Statistical validation of sensory data : A study on wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(8), 751-758. <https://doi.org/10.1002/jsfa.879>
- Casu, F., Pinu, F. R., Fedrizzi, B., Greenwood, D. R., & Villas-Boas, S. G. (2016). The effect of linoleic acid on the Sauvignon blanc fermentation by different wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 16(5), fow050. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow050>
- Cave, J. R., Parker, E., Lebrilla, C., & Waterhouse, A. L. (2019). Omics Forecasting : Predictive Calculations Permit the Rapid Interpretation of High-Resolution Mass Spectral Data from Complex Mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(48), 13318-13326.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04384>
- Cayla, L., Pouzalgues, N., & Masson, G. (2011). *Connaissance et maîtrise de la couleur des vins Rosés*. 8.
- Chen, J.-Y., Wen, P.-F., Kong, W.-F., Pan, Q.-H., Wan, S.-B., & Huang, W.-D. (2006). Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development. *Journal of Plant Physiology*, 163(2), 115-127.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.07.006>
- Cheynier, Owe, C., & Rigaud, J. (1988). Oxidation of Grape Juice Phenolic Compounds in Model Solutions. *Journal of Food Science*, 53(6), 1729-1732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb07828.x>

- Cheynier, Rigaud, J., Souquet, J. M., Barillere, J. M., & Moutounet, M. (1989). Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of grenache and chardonnay wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(1), 36-42.
- Cheynier, Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M. J., & Wylde, R. (1986). Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(2), 217-221. <https://doi.org/10.1021/jf00068a016>
- Cheynier, V., Doco, T., Fulcrand, H., Guyot, S., Roux, E. L., Souquet, J. M., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1997). ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers. *Analisis*, 8(25), M32-M37.
- Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 298-305.
- Cheynier, V., & Fulcrand, H. (1998). 13. *Oxydation des polyphénols dans les moûts et les vins*. Flanzky. <https://www.eyrolles.com/Loisirs/Livre/oenologie-fondements-scientifiques-et-technologiques-9782743002435/>
- Cheynier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., & Moutounet, M. (1997). Application des techniques analytiques a l'étude des composés phenoliques et de leurs réactions au cours de la vinification. *Analisis*, 3(25), M14-M21.
- Cheynier, V., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1990). Oxidation kinetics of trans-caffeoyltartrate and its glutathione derivatives in grape musts. *Phytochemistry*, 29(6), 1751-1753. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85008-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85008-4)
- Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J.-M., Duprat, F., & Moutounet, M. (1990). Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(4), 346-349.
- Cheynier, V., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1989). Glutathione Content and Glutathione to Hydroxycinnamic Acid Ratio in *Vitis vinifera* Grapes and Musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(4), 320-324.
- Cheynier, & Van Hulst, M. W. J. (1988a). Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1), 10-15. <https://doi.org/10.1021/jf00079a003>
- Cheynier, & Van Hulst, M. W. J. (1988b). Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1), 10-15. <https://doi.org/10.1021/jf00079a003>

- Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., & Teissèdre, P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0293-3>
- Cordente, A. G., Capone, D. L., & Curtin, C. D. (2015). Unravelling glutathione conjugate catabolism in *Saccharomyces cerevisiae* : The role of glutathione/dipeptide transporters and vacuolar function in the release of volatile sulfur compounds 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), 9709-9722. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6833-5>
- Cortell, J. M., Halbleib, M., Gallagher, A. V., Righetti, T. L., & Kennedy, J. A. (2007). Influence of Vine Vigor on Grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) Anthocyanins. 1. Anthocyanin Concentration and Composition in Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6575-6584. <https://doi.org/10.1021/jf070195v>
- Cruz, L., Teixeira, N., Silva, A. M. S., Mateus, N., Borges, J., & de Freitas, V. (2008). Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside--catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10980-10987. <https://doi.org/10.1021/jf8021496>
- Czochanska, Z., Yeap Foo, L., H. Newman, R., & J. Porter, L. (1980). Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0(0), 2278-2286. <https://doi.org/10.1039/P19800002278>
- Dangles, O., & Brouillard, R. (1992a). A spectroscopic method based on the anthocyanin copigmentation interaction and applied to the quantitative study of molecular complexes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 0(2), 247-257. <https://doi.org/10.1039/P29920000247>
- Dangles, O., & Brouillard, R. (1992b). Polyphenol interactions. The copigmentation case : Thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Canadian Journal of Chemistry*, 70(8), 2174-2189. <https://doi.org/10.1139/v92-273>
- Dangles, O., & Fenger, J.-A. (2018). The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Molecules*, 23(8), 1970. <https://doi.org/10.3390/molecules23081970>
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, 34(1), 119-124. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90792-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90792-1)
- De Freitas, V. A. P. de, Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., & Mateus, N. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One*, 51(1), Article 1. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.1.1604>
- De Freitas, V. A. P. (1995). Recherches sur les tanins condensés : Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin [Thesis, Bordeaux 2]. Dans [Http://www.theses.fr](http://www.theses.fr). <http://www.theses.fr/1995BOR20353>

- de Freitas, V., & Mateus, N. (2011). Formation of pyranoanthocyanins in red wines : A new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(5), 1463-1473. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4479-9>
- del Álamo, M., Casado, L., Hernández, V., & Jiménez, J. J. (2004). Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1049(1), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.017>
- Delcambre, A., & Saucier, C. (2012). Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 47(6), 727-736. <https://doi.org/10.1002/jms.3007>
- Dott, W., & Trüper, H. G. (1976). Sulfite formation by wine yeasts. *Archives of Microbiology*, 108(1), 99-104. <https://doi.org/10.1007/BF00425098>
- Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J. A., Teissedre, P.-L., & Saucier, C. (2007). Analysis of Ethylidene-Bridged Flavan-3-ols in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1109-1116. <https://doi.org/10.1021/jf0626258>
- Duc, C., Maçna, F., Sanchez, I., Galeote, V., Delpech, S., Silvano, A., & Mouret, J.-R. (2020). Large-Scale Screening of Thiol and Fermentative Aroma Production during Wine Alcoholic Fermentation : Exploring the Effects of Assimilable Nitrogen and Peptides. *Fermentation*, 6(4), 98. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040098>
- Dueñas, M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2006). Formation of anthocyanin–flavanol adducts in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.062>
- Durner, D., Nickolaus, P., Weber, F., Trieu, H.-L., & Fischer, U. (2015). Evolution of Anthocyanin-Derived Compounds during Micro-Oxygenation of Red Wines with Different Anthocyanin-Flavanol Ratios. Dans *Advances in Wine Research* (Vol. 1203, p. 253-274). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1203.ch016>
- Eschenbruch, R. (1974). Sulfite and Sulfide Formation during Winemaking—A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(3), 157-161.
- Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). Study of the Reactions between (+)-Catechin and Furfural Derivatives in the Presence or Absence of Anthocyanins and Their Implication in Food Color Change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 5946-5954. <https://doi.org/10.1021/jf000394d>

- Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003). Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5), 535-553.
[https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00019-X)
- Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Studies on the Acetaldehyde-Induced Condensation of (–)-Epicatechin and Malvidin 3-O-Glucoside in a Model Solution System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2096-2102.
<https://doi.org/10.1021/jf9806309>
- Es-Safi, N.-E., Le Guernevé, Christine, Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). New Phenolic Compounds Formed by Evolution of (+)-Catechin and Glyoxylic Acid in Hydroalcoholic Solution and Their Implication in Color Changes of Grape-Derived Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 4233-4240. <https://doi.org/10.1021/jf000283e>
- Es-Safi, N.-E., Meudec, E., Bouchut, C., Fulcrand, H., Ducrot, P.-H., Herbette, G., & Cheynier, V. (2008). New Compounds Obtained by Evolution and Oxidation of Malvidin 3-O-Glucoside in Ethanolic Medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4584-4591.
<https://doi.org/10.1021/jf8001872>
- Es-Safi, N.-E., Le Guernevé, Christine, Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). New Polyphenolic Compounds with Xanthylum Skeletons Formed through Reaction between (+)-Catechin and Glyoxylic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 5211-5217.
<https://doi.org/10.1021/jf990424g>
- Faria-Oliveira, F. (2013). *The role of yeast lactic acid bacteria in the production of fermented beverages in South America*. Food production and industry.
- Favre, G., Hermosín-Gutiérrez, I., Piccardo, D., Gómez-Alonso, S., & González-Neves, G. (2019). Selectivity of pigments extraction from grapes and their partial retention in the pomace during red-winemaking. *Food Chemistry*, 277, 391-397.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.085>
- Ferreira-Lima, N., Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Pinasseau, L., Verbaere, A., Bordignon-Luiz, M. T., Le Guernevé, C., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2018). Quantification of hydroxycinnamic derivatives in wines by UHPLC-MRM-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3483-3490.
<https://doi.org/10.1007/s00216-017-0759-y>
- Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., & Brouillard, R. (1996). New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry*, 41(1), 301-308. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00530-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00530-7)
- Flanzzy, C., Masson, G., & Millo, F. (2009). *Le vin Rosé*. <https://www.furet.com/livres/le-vin-rose-claude-flanzzy-9782351560440.html>

- Flanzy, C., & Poux, C. (1958). Les possibilités de la microvinification, application à l'étude de la macération. *Annales de technologie agricole*.
- Fletcher, A. C., Porter, L. J., Haslam, E., & Gupta, R. K. (1977). Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 14, 1628-1637.
- Foo, L. Y., Lu, Y., Howell, A. B., & Vorsa, N. (2000). The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. *Phytochemistry*, 54(2), 173-181. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00573-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00573-7)
- Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J.-M., Moutounet, M., & Cheynier, V. (2006). Accumulation and Extractability of Grape Skin Tannins and Anthocyanins at Different Advanced Physiological Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7331-7338. <https://doi.org/10.1021/jf061467h>
- Francia-Aricha, E. M., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (1997). New Anthocyanin Pigments Formed after Condensation with Flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2262-2266. <https://doi.org/10.1021/jf9609587>
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47(7), 1401-1407. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00772-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00772-3)
- Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., & Moutounet, M. (1997). An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-OL condensation. *Phytochemistry*, 46(2), 223-227. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00276-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00276-8)
- Fulcrand, H., Doco, T., Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 752(1), 85-91. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00485-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00485-2)
- Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., & Cheynier, V. (2006). Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 289-297.
- Fulcrand, H., Mané, C., Preys, S., Mazerolles, G., Bouchut, C., Mazauric, J.-P., Souquet, J.-M., Meudec, E., Li, Y., Cole, R. B., & Cheynier, V. (2008). Direct mass spectrometry approaches to characterize polyphenol composition of complex samples. *Phytochemistry*, 69(18), 3131-3138. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.03.016>
- Fulcrand, H., Santos, P. J. C. dos, Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Favre-Bonvin, J. (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1, 735.

- Gagné, S., Saucier, C., & Gény, L. (2006). Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(25), 9465-9471. <https://doi.org/10.1021/jf061946g>
- Geny, L., Saucier, C., Bracco, S., Daviaud, F., & Glories, Y. (2003). Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(27), 8051-8054. <https://doi.org/10.1021/jf030418r>
- Gil, M., Avila-Salas, F., Santos, L. S., Iturmendi, N., Moine, V., Cheynier, V., & Saucier, C. (2017). Rosé Wine Fining Using Polyvinylpolypyrrolidone : Colorimetry, Targeted Polyphenomics, and Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(48), 10591-10597. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04461>
- Gil, M., Louazil, P., Iturmendi, N., Moine, V., Cheynier, V., & Saucier, C. (2019). Effect of polyvinylpolypyrrolidone treatment on rosés wines during fermentation : Impact on color, polyphenols and thiol aromas. *Food Chemistry*, *295*, 493-498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.125>
- Glories, Y. (1984). LA COULEUR DES VINS ROUGES. *Connaissance Vigne Vin*, *18*(3), 195-217.
- Gonçalves, F. J., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2012). Study of the retention capacity of anthocyanins by wine polymeric material. *Food Chemistry*, *134*(2), 957-963. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.214>
- Gonzalez-San Jose, M. L., Santa-Maria, G., & Diez, C. (1990). Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *3*(1), 54-66. [https://doi.org/10.1016/0889-1575\(90\)90009-B](https://doi.org/10.1016/0889-1575(90)90009-B)
- Goto, T., & Kondo, T. (1991). Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins—Flower Color Variation. *Angewandte Chemie International Edition in English*, *30*(1), 17-33. <https://doi.org/10.1002/anie.199100171>
- Gougeon, R. D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Feuillat, F., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., Hertkorn, N., & Schmitt-Kopplin, P. (2009). The chemodiversity of wines can reveal a metabiogeography expression of cooperage oak wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(23), 9174-9179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901100106>
- Gueffroy, D. E., Kepner, R. E., & Webb, A. D. (1971). Acylated anthocyanin pigments in *Vitis vinifera* grapes : Identification of malvidin-3-(6-p-coumaroyl) glucoside. *Phytochemistry*, *10*(4), 813-819. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97151-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97151-6)
- Guittin, C., Maçna, F., Sanchez, I., Poitou, X., Sablayrolles, J.-M., Mouret, J.-R., & Farines, V. (2021). Impact of high lipid contents on the production of fermentative aromas during white wine

fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(16), 6435-6449.

<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11479-5>

- Gunata, Y. Z., Sapis, J., & Moutounet, M. (1987). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenol oxidases. *Phytochemistry*, 26(6), 1573-1575.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82247-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82247-5)
- Guyot, S., Marnet, N., & Drilleau, J.-F. (2001). Thiolysis–HPLC Characterization of Apple Procyanidins Covering a Large Range of Polymerization States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 14-20. <https://doi.org/10.1021/jf000814z>
- Guyot, S., Vercauteren, J., & Cheynier, V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, 96, 1279.
- Gyllang, H., Winge, M., & Korch, C. (1989). Regulation of SO₂ formation during fermentation. *European Brewery Convention, Proceedings of the 22nd Congress*, 347-354.
- Haslam, E. (1980). In vino veritas : Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, 19(12), 2577-2582. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83922-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83922-9)
- Haslam, E. (1998). *Practical Polyphenolics : From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*. Cambridge University Press.
- He, F., He, J.-J., Pan, Q.-H., & Duan, C.-Q. (2010). Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(3), 464-468.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00107.x>
- Hoshino, T. (1991). An approximate estimate of self-association constants and the self-stacking conformation of Malvin quinonoidal bases studied by ¹H NMR. *Phytochemistry*, 30(6), 2049-2055. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85065-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85065-8)
- Iriti, M., & Vigentini, I. (2015). Tryptophan-Ethylester, the False (Unveiled) Melatonin Isomer in Red Wine. *International Journal of Tryptophan Research*, 8, IJTR.S22450.
<https://doi.org/10.4137/IJTR.S22450>
- Jackowetz, J. N., Dierschke, S., & Mira de Orduña, R. (2011). Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 44(1), 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.014>
- Jacques, D., Haslam, E., Bedford, G. R., & Greatbanks, D. (1973). Structure of the dimeric proanthocyanidin-A2 and its derivatives. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 15, 518-520. <https://doi.org/10.1039/C39730000518>

- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., & Trollat, P. (1995). Resveratrol Content of Wines of Different Ages : Relationship With Fungal Disease Pressure in the Vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 1-4.
- Jia, W., Chu, X., Ling, Y., Huang, J., Lin, Y., & Chang, J. (2014). Simultaneous determination of dyes in wines by HPLC coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 37(7), 782-791. <https://doi.org/10.1002/jssc.201301374>
- Joutei, K. A., & Glories, Y. (1994). Etude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *OENO One*, 28(4), 303-317. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1994.28.4.1134>
- Joutei, K. A., Glories, Y., & Mercier, M. (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 33(3), 133-133. <https://doi.org/10.5073/vitis.1994.33.133-138>
- Jurd, L. (1964). Reactions Involved in Sulfite Bleaching of Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 29(1), 16-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1964.tb01685.x>
- Jurd, L. (1969). Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in the aging of wines. *Amer J Enol Viticult.* https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Review+of+polyphenol+condensation+reactions+and+their+possible+occurrence+in+the+aging+of+wines&author=Jurd%2C+L.&publication_year=1969
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I. S., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E., & Psarra, E. (2001). Instrumental and sensory analysis of Greek wines; implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry*, 73(4), 501-514. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00327-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00327-7)
- Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2007). HPLC-DAD-MS Analysis of Anthocyanins in Rose Wine Made From cv. Öküzgözü Grapes, and Effect of Maceration Time on Anthocyanin Content. *Chromatographia*, 66(3), 207-212. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0277-8>
- Kelm, M. A., Johnson, J. C., Robbins, R. J., Hammerstone, J. F., & Schmitz, H. H. (2006). High-Performance Liquid Chromatography Separation and Purification of Cacao (Theobroma cacao L.) Procyanidins According to Degree of Polymerization Using a Diol Stationary Phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1571-1576. <https://doi.org/10.1021/jf0525941>
- Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1740-1746. <https://doi.org/10.1021/jf001030o>
- Kiefer, J. (1959). Optimum Experimental Designs. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 21(2), 272-304. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1959.tb00338.x>

- Kondo, K., Kurihara, M., Fukuhara, K., Tanaka, T., Suzuki, T., Miyata, N., & Toyoda, M. (2000). Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type : Evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Letters*, 41(4), 485-488. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)02097-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02097-3)
- Kosma, C. I., Koloka, O. L., Albanis, T. A., & Konstantinou, I. K. (2021). Accurate mass screening of pesticide residues in wine by modified QuEChERS and LC-hybrid LTQ/Orbitrap-MS. *Food Chemistry*, 360, 130008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130008>
- Kusano, R., Tanaka, T., Matsuo, Y., & Kouno, I. (2007). Structures of Epicatechin Gallate Trimer and Tetramer Produced by Enzymatic Oxidation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(12), 1768-1772. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.1768>
- Laborde, J.-L. (1987). *Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydation dans les vins rouges : Rôle joué par l'anhydride sulfureux* [These de doctorat, Bordeaux 2]. <https://www.theses.fr/1987BOR20160>
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2015). A High-Throughput UHPLC-QqQ-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. *Molecules*, 20(5), 7890-7914. <https://doi.org/10.3390/molecules20057890>
- Lambert, S. G., Asenstorfer, R. E., Williamson, N. M., Iland, P. G., & Jones, G. P. (2011). *Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine*. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/513881>
- Larice, J. L. (1989). Composition anthocyanique des cépages. II. Essai de classification sur trois ans par analyse en composantes principales et étude des variations annuelles de cépages de même provenance. *Cahiers scientifiques Revue Française d'Œnologie*, 121, 7-12.
- Leborgne, C., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Carrillo, S., Sommerer, N., Vernhet, A., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (submitted). Impact of fermentation on the polyphenol composition and color of Grenache, Cinsault, and Syrah rosé wines. *submitted to FoodChemistry*.
- Leborgne, C., Lambert, M., Ducasse, M.-A., Meudec, E., Verbaere, A., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Masson, G., Mouret, J.-R., & Cheynier, V. (2022). Elucidating the Color of Rosé Wines Using Polyphenol-Targeted Metabolomics. *Molecules*, 27(4), 1359. <https://doi.org/10.3390/molecules27041359>
- Lee, C. Y., & Jaworski, A. W. (1990). Identification of Some Phenolics in White Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41(1), 87-89.
- Liao, H., Cai, Y., & Haslam, E. (1992). Polyphenol interactions. Anthocyanins : Co-pigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(3), 299-305. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590305>

- Longo, E., Rossetti, F., Jouin, A., Teissedre, P.-L., Jourdes, M., & Boselli, E. (2019). Distribution of crown hexameric procyanidin and its tetrameric and pentameric congeners in red and white wines. *Food Chemistry*, 299, 125125. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125125>
- López-Rituerto, E., Savorani, F., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M., & Engelsen, S. B. (2012). Investigations of La Rioja terroir for wine production using ¹H NMR metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3452-3461. <https://doi.org/10.1021/jf204361d>
- Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. The cell research institute and department of Botany, University of Texas, Austin.
- Mach, H., & Middaugh, C. R. (1994). Simultaneous Monitoring of the Environment of Tryptophan, Tyrosine, and Phenylalanine Residues in Proteins by Near-Ultraviolet Second-Derivative Spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 222(2), 323-331. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1499>
- Macheix, J. (1996). *Les composés phénoliques des végétaux : Quelles perspectives à la fin du XXe siècle?* (Acta Bot Gallica, Vol. 143). Acta Bot Gallica.
- Malaj, N., De Simone, B. C., Quartarolo, A. D., & Russo, N. (2013). Spectrophotometric study of the copigmentation of malvidin 3-O-glucoside with p-coumaric, vanillic and syringic acids. *Food Chemistry*, 141(4), 3614-3620. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.017>
- Mané, C., Souquet, J. M., Ollé, D., Verriés, C., Véran, F., Mazerolles, G., Cheynier, V., & Fulcrand, H. (2007). Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design : Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7224-7233. <https://doi.org/10.1021/jf071301w>
- Markaris, P., Livingston, G. E., & Fellers, C. R. (1957). QUANTITATIVE ASPECTS OF STRAWBERRY PIGMENT DEGRADATION a,b. *Journal of Food Science*, 22(2), 117-130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1957.tb16991.x>
- Marković, J. M., Petranović, N. A., & Baranac, J. M. (2000). A spectrophotometric study of the copigmentation of malvin with caffeic and ferulic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5530-5536. <https://doi.org/10.1021/jf000038v>
- Martendal, E., Budziak, D., & Carasek, E. (2007). Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples. *Journal of Chromatography A*, 1148(2), 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.079>
- Mateus, N., Carvalho, E., Carvalho, A. R. F., Melo, A., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., Silva, A. M. S., & de Freitas, V. (2003). Isolation and Structural Characterization of New Acylated

Anthocyanin–Vinyl–Flavanol Pigments Occurring in Aging Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 277-282. <https://doi.org/10.1021/jf020695i>

- Mateus, N., Silva, A. M. S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & de Freitas, V. (2002). Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2110-2116. <https://doi.org/10.1021/jf0111561>
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite Profiling of Grape : Flavonols and Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7692-7702. <https://doi.org/10.1021/jf061538c>
- Mazauric, J.-P., & Salmon, J.-M. (2006). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging. II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3876-3881. <https://doi.org/10.1021/jf060037o>
- Mazerolles, G., Preys, S., Bouchut, C., Meudec, E., Fulcrand, H., Souquet, J. M., & Cheynier, V. (2010). Combination of several mass spectrometry ionization modes : A multiblock analysis for a rapid characterization of the red wine polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 678(2), 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.07.034>
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009-4017. <https://doi.org/10.1021/jf990449f>
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). *Grapes : Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351069700>
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2005). Yeast Interactions with Anthocyanins during Red Wine Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(2), 104-109.
- Mekoue Nguela, J., Vernhet, A., Sieczkowski, N., & Brillouet, J.-M. (2015). Interactions of Condensed Tannins with *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells and Cell Walls : Tannin Location by Microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(34), 7539-7545. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02241>
- Morata, A., Calderón, F., González, M. C., Gómez-Cordovés, M. C., & Suárez, J. A. (2007). Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisins A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chemistry*, 100(3), 1144-1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.024>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., & Suárez, J. A. (2006a). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with

two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 123-129.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.019>

- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., & Suárez, J. A. (2006b). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.019>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Calderón, F., & Suárez, J. A. (2006c). Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.019>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003a). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* : Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7402-7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003b). Pyruvic Acid and Acetaldehyde Production by Different Strains of *Saccharomyces cerevisiae* : Relationship with Vitisin A and B Formation in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7402-7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, 220(3-4), 341-346. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1053-8>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4084-4088. <https://doi.org/10.1021/jf021134u>
- Morata, A., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2007). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 144-152. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.12.032>
- Morata, A., Vejarano, R., Ridolfi, G., Benito, S., Palomero, F., Uthurry, C., Tesfaye, W., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2013). Reduction of 4-ethylphenol production in red wines using HCDC+ yeasts and cinnamyl esterases. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(2), 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.11.001>

- Morel-Salmi, C., Souquet, J.-M., Bes, M., & Cheynier, V. (2006). Effect of Flash Release Treatment on Phenolic Extraction and Wine Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4270-4276. <https://doi.org/10.1021/jf053153k>
- Mortimer, R., & Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150(3), 199-204. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9)
- Moskowitz, A. H., & Hrazdina, G. (1981). Vacuolar Contents of Fruit Subepidermal Cells from Vitis Species 1. *Plant Physiology*, 68(3), 686-692.
- Mouls, L., & Fulcrand, H. (2012). UPLC-ESI-MS study of the oxidation markers released from tannin depolymerization : Toward a better characterization of the tannin evolution over food and beverage processing. *Journal of Mass Spectrometry: JMS*, 47(11), 1450-1457. <https://doi.org/10.1002/jms.3098>
- Noble, A. C., & Shannon, M. (1987). Profiling Zinfandel Wines by Sensory and Chemical Analyses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 1-5.
- Nonaka, G., Morimoto, S., & Nishioka, I. (1983). Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric, and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0(0), 2139-2145. <https://doi.org/10.1039/P19830002139>
- Oancea, S. (2021). A Review of the Current Knowledge of Thermal Stability of Anthocyanins and Approaches to Their Stabilization to Heat. *Antioxidants*, 10(9), 1337. <https://doi.org/10.3390/antiox10091337>
- Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Aguera, E., Sablayrolles, J.-M., & Farines, V. (2020). Comprehensive study of the dynamic interaction between SO₂ and acetaldehyde during alcoholic fermentation. *Food Research International*, 136, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109607>
- OIV. (2006). *Méthode OIV-MA-AS2-07B*.
- OIV. (2019). *RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV Caractéristiques Chromatiques*.
- OIV. (2021). *SO₂ and wine : A review*.
- Okamura, S., & Watanabe, M. (1981). Determination of Phenolic Cinnamates in White Wine and Their Effect on Wine Quality. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(9), 2063-2070.
- Oliveira, J., Azevedo, J., Seco, A., Mendoza, J., Basílio, N., de Freitas, V., & Pina, F. (2021). Copigmentation of anthocyanins with copigments possessing an acid-base equilibrium in moderately acidic solutions. *Dyes and Pigments*, 193, 109438. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109438>

- Oliveira, J., Azevedo, J., Silva, A. M. S., Teixeira, N., Cruz, L., Mateus, N., & de Freitas, V. (2010). Pyranoanthocyanin Dimers : A New Family of Turquoise Blue Anthocyanin-Derived Pigments Found in Port Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5154-5159. <https://doi.org/10.1021/jf9044414>
- Oliveira, J., Brás, N. F., da Silva, M. A., Mateus, N., Parola, A. J., & de Freitas, V. (2014). Grape anthocyanin oligomerization : A putative mechanism for red color stabilization? *Phytochemistry*, 105, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.006>
- Oliveira, J., da Silva, M. A., Jorge Parola, A., Mateus, N., Brás, N. F., Ramos, M. J., & de Freitas, V. (2013). Structural characterization of a A-type linked trimeric anthocyanin derived pigment occurring in a young Port wine. *Food Chemistry*, 141(3), 1987-1996. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.091>
- Oliveira, J., de Freitas, V., Silva, A. M. S., & Mateus, N. (2007). Reaction between Hydroxycinnamic Acids and Anthocyanin–Pyruvic Acid Adducts Yielding New Portisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6349-6356. <https://doi.org/10.1021/jf070968f>
- Ontañón, I., Sánchez, D., Sáez, V., Mattivi, F., Ferreira, V., & Arapitsas, P. (2020a). Liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolomics for understanding the compositional changes induced by oxidative or anoxic storage of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13367-13379.
- Ontañón, I., Sánchez, D., Sáez, V., Mattivi, F., Ferreira, V., & Arapitsas, P. (2020b). Liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolomics for understanding the compositional changes induced by oxidative or anoxic storage of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13367-13379.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). Anthocyanin fingerprint of grapes : Environmental and genetic variations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(10), 1460-1467. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2511>
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J., López-Roca, J. M., & Gomez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.024>
- Oszmianski, J., & Lee, C. Y. (1990). Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(5), 1202-1204. <https://doi.org/10.1021/jf00095a009>
- Ough, C. S., & Were, L. (2005). "Sulfur dioxide and sulfites", in *Antimicrobials in food* (3^e éd.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420028737>

- Patras, A., Brunton, Nigel. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21(1), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.004>
- Pechamat, L., Zeng, L., Jourdes, M., Ghidossi, R., & Teissedre, P.-L. (2014). Occurrence and Formation Kinetics of Pyranomalvidin-Procyanidin Dimer Pigment in Merlot Red Wine : Impact of Acidity and Oxygen Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1701-1705. <https://doi.org/10.1021/jf4052754>
- Peres, S., Giraud-Heraud, E., Masure, A.-S., & Tempere, S. (2020). Rose Wine Market : Anything but Colour? *Foods*, 9(12), 1850. <https://doi.org/10.3390/foods9121850>
- Pérez-Torrado, R., Carrasco, P., Aranda, A., Gimeno-Alcañiz, J., Pérez-Ortín, J. E., Matallana, E., & del Olmo, M. (2002). Study of the First Hours of Microvinification by the Use of Osmotic Stress-response Genes as Probes. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1), 153-161. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00087>
- Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M., & Metche, M. (1994). Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chemistry*, 50(2), 115-120. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90106-6)
- Pinasseau, L., Vallverdú-Queralt, A., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Le Cunff, L., Peros, J.-P., Ageorges, A., Sommerer, N., Boulet, J.-C., Terrier, N., & Cheynier, V. (2017). Cultivar Diversity of Grape Skin Polyphenol Composition and Changes in Response to Drought Investigated by LC-MS Based Metabolomics. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1826. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01826>
- Pinasseau, L., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Vallverdú-Queralt, A., Terrier, N., Boulet, J.-C., Cheynier, V., & Sommerer, N. (2016). A Fast and Robust UHPLC-MRM-MS Method to Characterize and Quantify Grape Skin Tannins after Chemical Depolymerization. *Molecules*, 21(10), 1409. <https://doi.org/10.3390/molecules21101409>
- Pinu, F. R. (2018). Grape and Wine Metabolomics to Develop New Insights Using Untargeted and Targeted Approaches. *Fermentation*, 4(4), 92. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040092>
- Pinu, F. R., Edwards, P. J. B., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2014). Nitrogen and carbon assimilation by *Saccharomyces cerevisiae* during Sauvignon blanc juice fermentation. *FEMS Yeast Research*, 14(8), 1206-1222. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12222>
- Poncet-Legrand, C., Cabane, B., Bautista-Ortín, A.-B., Carrillo, S., Fulcrand, H., Pérez, J., & Vernhet, A. (2010). Tannin Oxidation : Intra- versus Intermolecular Reactions. *Biomacromolecules*, 11(9), 2376-2386. <https://doi.org/10.1021/bm100515e>

- Porter, L. J., Hrstich, L. N., & Chan, B. G. (1985). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223-230.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94533-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94533-3)
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36(3), 781-784. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89817-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89817-9)
- Puértolas, E., Saldaña, G., Álvarez, I., & Raso, J. (2011). Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rosé wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. *Food Chemistry*, 126(3), 1482-1487.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.164>
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols : Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586-621. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>
- Rashtbari, S., Dehghan, G., Amini, M., Khorram, S., & Khataee, A. (2022). A sensitive colorimetric/fluorimetric nanoprobe for detection of polyphenols using peroxidase-mimic plasma-modified MoO₃ nanoparticles. *Chemosphere*, 295, 133747.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133747>
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J. M., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2002). Adsorption of Phenolic Compounds and Browning Products in White Wines by Yeasts and Their Cell Walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7432-7437.
<https://doi.org/10.1021/jf025733c>
- Rein, M. J., & Heinonen, M. (2004). Stability and Enhancement of Berry Juice Color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 3106-3114. <https://doi.org/10.1021/jf035507i>
- Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2000). First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(6), 745-751. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000501\)80:6<745::AID-JSFA611>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<745::AID-JSFA611>3.0.CO;2-4)
- Remy-Tanneau, S., Le Guernevé, Christine, Meudec, E., & Cheynier, V. (2003). Characterization of a Colorless Anthocyanin–Flavan-3-ol Dimer Containing Both Carbon–Carbon and Ether Interflavanoid Linkages by NMR and Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3592-3597. <https://doi.org/10.1021/jf021227b>
- Revilla, E., García-Beneytez, E., Cabello, F., Martín-Ortega, G., & Ryan, J.-M. (2001). Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape

cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, 915(1), 53-60.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00635-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00635-5)

- Ribéreau-Gayon. (1965). Identification d'esters acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *C. R. Arc. Sci.*, 265, 341.
- Ribéreau-Gayon, P. (1959). *Recherches sur les anthocyanes des végétaux : Application au genre Vitis*. Librairie générale de l'enseignement.
- Ribéreau-Gayon, P. (1964). *LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN ET DU VIN*. INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE.
- Ribéreau-Gayon, P. (1982). *The anthocyanins of grapes and wines*. In : P. Markakis (Anthocyanins as food colors). New York: Academic Press.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2012). *Traité d'oenologie* (6^e éd., Vol. 2). Dunod. <https://www.dunod.com/sciences-techniques/traite-d-oenologie-tome-2-chimie-du-vin-stabilisation-et-traitements-0>
- Ricardo da Silva, J. M., Bourzeix, M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1991). Procyanidin composition of Chardonnay, Mauzac and Grenache blanc grapes. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 30, 245-252.
- Ricardo da Silva, J. M., Rosec, J. P., Bourzeix, M., Mourgues, J., & Moutounet, M. (1992). Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvedre grapes and red wines. *Vitis*, 31, 55-63.
- Rigaud, J., Cheynier, V., Asselin, C., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). *Caractérisation des flavonoïdes de la baie de raisin. Application à une étude terroir*. 5. Symposium international d'oenologie. <https://hal.inrae.fr/hal-02778410>
- Rigaud, J., Perez-Illarbe, J., Da Silva, J. M. R., & Cheynier, V. (1991). Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 540, 401-405. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)88830-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)88830-0)
- Roggero, J. P., Coen, S., & Larice, J. L. (1986). Etude comparative de la composition anthocyanique des cepages. *Bulletin Liaison Groupe Polyphenols*, 13, 380-388.
- Roggero, J. P., Larice, J. L., Rocheville-Divorne, C., Archier, P., & Coen, S. (1988). Composition anthocyanique des cepages. I. Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante. *Cahiers scientifiques Revue Française d'Oenologie*, 112, 277-284.
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., & Mouret, J.-R. (2015). Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2291-2304. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6210-9>

- Romero, C., & Bakker, J. (2001). Anthocyanin and colour evolution during maturation of four port wines : Effect of pyruvic acid addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(2), 252-260. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20010115\)81:2<252::AID-JSFA810>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20010115)81:2<252::AID-JSFA810>3.0.CO;2-5)
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in Anthocyanin Extractability from Grapes to Wines According to Variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 212-219.
- Romeyer, F. M. (1985). Hydroxycinnamic esters and browning potential in mature berries of some grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 36(8), 728-732.
- Roullier-Gall, C., Hemmler, D., Gonsior, M., Li, Y., Nikolantonaki, M., Aron, A., Coelho, C., Gougeon, R. D., & Schmitt-Kopplin, P. (2017). Sulfites and the wine metabolome. *Food Chemistry*, 237, 106-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.039>
- Roullier-Gall, C., Witting, M., Gougeon, R. D., & Schmitt-Kopplin, P. (2014). High precision mass measurements for wine metabolomics. *Frontiers in Chemistry*, 2, 102. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00102>
- Roux, E. L., Doco, T., Sarni-Manchado, P., Lozano, Y., & Cheynier, V. (1998). A-type proanthocyanidins from pericarp of Litchi chinensis. *Phytochemistry*, 48(7), 1251-1258. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)01070-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01070-4)
- Ruiz-Rodríguez, A., Carrera, C. A., Setyaningsih, W., Barbero, G. F., Ferreiro-González, M., Palma, M., & Barroso, C. G. (2017). Tryptophan Levels during Grape Ripening : Effects of Cultural Practices. *Molecules*, 22(6), 941. <https://doi.org/10.3390/molecules22060941>
- Saha, B., Longo, R., Torley, P., Saliba, A., & Schmidtke, L. (2018). SPME Method Optimized by Box-Behnken Design for Impact Odorants in Reduced Alcohol Wines. *Foods*, 7(8), 127. <https://doi.org/10.3390/foods7080127>
- Salas, E., Atanasova, V., Poncet-Legrand, C., Meudec, E., Mazauric, J. P., & Cheynier, V. (2004). Demonstration of the occurrence of flavanol–anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.11.084>
- Salas, E., Dueñas, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., Cheynier, V., & Fulcrand, H. (2005). Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4536-4546. <https://doi.org/10.1021/jf0478096>
- Salas, E., Fulcrand, H., Meudec, E., & Cheynier, V. (2003). Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7951-7961. <https://doi.org/10.1021/jf0345402>

- Salas, E., Guernevé, C., Fulcrand, H., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V. (2004). Structure determination and color properties of a new directly linked flavanol-anthocyanin dimer. *Tetrahedron Letters - TETRAHEDRON LETT*, 45, 8725-8729. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.09.127>
- Salinas, M. R., Garijo, J., Pardo, F., Zalacain, A., & Alonso, G. L. (2003). *Color, Polyphenol, and Aroma Compounds in Rosé Wines after Prefermentative Maceration and Enzymatic Treatments*. 8.
- Salinas, M. R., Garijo, J., Pardo, F., Zalacain, A., & Alonso, G. L. (2005). Influence of prefermentative maceration temperature on the colour and the phenolic and volatile composition of rosé wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(9), 1527-1536. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2133>
- Sarni, P., Fulcrand, H., Souillol, V., Souquet, J.-M., & Cheynier, V. (1995). Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(3), 385-391. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740690317>
- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. <https://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/les-polyphenols-en-agroalimentaire/sarni-manchado/descriptif-9782743008055>
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1997). Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry*, 45(7), 1365-1369. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00190-8)
- Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J.-M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Stability and Color of Unreported Wine Anthocyanin-derived Pigments. *Journal of Food Science*, 61(5), 938-941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10906.x>
- Satake, R., & Yanase, E. (2018). Mechanistic studies of hydrogen-peroxide-mediated anthocyanin oxidation. *Tetrahedron*, 74(42), 6187-6191. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.09.012>
- Saucier, C., Little, D., & Glories, Y. (1997). First Evidence of Acetaldehyde-Flavanol Condensation Products in Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 370-373.
- Schwarz, M., Wabnitz, T. C., & Winterhalter, P. (2003). Pathway Leading to the Formation of Anthocyanin-Vinylphenol Adducts and Related Pigments in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3682-3687. <https://doi.org/10.1021/jf0340963>
- Seabrook, A., & van der Westhuizen, T. (2018). Fining during fermentation : Focus on white and rose: Advantages of fining in must rather than wine on aroma and colour. *Wine & Viticulture Journal*. <https://search.informit.org/doi/abs/10.3316/informit.420520286361778>
- Sheridan, M. K., & Elias, R. J. (2015). Exogenous acetaldehyde as a tool for modulating wine color and astringency during fermentation. *Food Chemistry*, 177, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.077>

- Shoji, T., Yanagida, A., & Kanda, T. (1999). Gel Permeation Chromatography of Anthocyanin Pigments from Rosé Cider and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2885-2890. <https://doi.org/10.1021/jf981311k>
- Simpson, R. F. (1982). Factors affecting oxidative browning of white wine. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, 21(3), 233-233. <https://doi.org/10.5073/vitis.1982.21.233-239>
- Singleton, V. L. (1987). Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems : Observations and Practical Implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 69-77.
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 50-56.
- Singleton, V. L., Timberlake, C. F., & Lea, A. G. H. (1978). The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(4), 403-410. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290416>
- Somers, T. C. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, 10(9), 2175-2186. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97215-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97215-7)
- Somers, T. C., & Evans, M. E. (1979). Grape pigment phenomena : Interpretation of major colour losses during vinification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(6), 623-633. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740300612>
- Somers, T. C., Vérette, E., & Pocock, K. F. (1987). Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera* : Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40(1), 67-78. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740400109>
- Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2), 509-512. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00301-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00301-9)
- Sudraud, P. (1958). Interpretation of red wine absorption curves. *Anal. Technol. Agric*, 7, 203-208.
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., Fan, T. W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J. L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A. N., Lindon, J. C., Marriott, P., Nicholls, A. W., ... Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3(3), 211-221. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>

- Suriano, S., Alba, V., Tarricone, L., & Di Gennaro, D. (2015). Maceration with stems contact fermentation : Effect on proanthocyanidins compounds and color in Primitivo red wines. *Food Chemistry*, 177, 382-389. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.063>
- Tanaka, T., Matsuo, Y., & Kouno, I. (2005). A Novel Black Tea Pigment and Two New Oxidation Products of Epigallocatechin-3-O-gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7571-7578. <https://doi.org/10.1021/jf0512656>
- Thorngate, J. H., & Singleton, V. L. (1994). Localization of Procyanidins in Grape Seeds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(2), 259-262.
- Timberlake, C. F., & Bridle, P. (1967). Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. II. Reactions with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(10), 479-485. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740181009>
- Timberlake, C. F., & Bridle, P. (1976). Interactions Between Anthocyanins, Phenolic Compounds, and Acetaldehyde and Their Significance in Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(3), 97-105.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation : Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937-4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>
- Tsai Su, C., & Singleton, V. L. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, 8(8), 1553-1558. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85929-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85929-4)
- Tumanov, S., Pinu, F. r., Greenwood, D. r., & Villas-Bôas, S. g. (2018). Effect of free fatty acids and lipolysis on Sauvignon Blanc fermentation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24(4), 398-405. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12352>
- Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Eder, M., Lamuela-Raventos, R. M., Sommerer, N., & Cheynier, V. (2017a). Targeted filtering reduces the complexity of UHPLC-Orbitrap-HRMS data to decipher polyphenol polymerization. *Food Chemistry*, 227, 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.106>
- Vallverdú-Queralt, A., Meudec, E., Eder, M., Lamuela-Raventos, R. M., Sommerer, N., & Cheynier, V. (2017b). The Hidden Face of Wine Polyphenol Polymerization Highlighted by High-Resolution Mass Spectrometry. *ChemistryOpen*, 6(3), 336-339. <https://doi.org/10.1002/open.201700044>
- Vasserot, Y., Caillet, S., & Maujean, A. (1997). Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), 433-437.

- Vernhet, A., Carrillo, S., & Poncet-Legrand, C. (2014). Condensed Tannin Changes Induced by Autoxidation : Effect of the Initial Degree of Polymerization and Concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7833-7842. <https://doi.org/10.1021/jf501441j>
- Vernhet, A., Carrillo, S., Rattier, A., Verbaere, A., Cheynier, V., & Nguela, J. M. (2020). Fate of Anthocyanins and Proanthocyanidins during the Alcoholic Fermentation of Thermovinified Red Musts by Different *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3615-3625. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00413>
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.-M., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2002). Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2261-2266. <https://doi.org/10.1021/jf011180e>
- Vidal, S., Hayasaka, Y., Meudec, E., Cheynier, V., & Skouroumounis, G. (2004). Fractionation of Grape Anthocyanin Classes Using Multilayer Coil Countercurrent Chromatography with Step Gradient Elution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 713-719. <https://doi.org/10.1021/jf034906a>
- Vidal, S., Meudec, E., Cheynier, V., Skouroumounis, G., & Hayasaka, Y. (2004). Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(23), 7144-7151. <https://doi.org/10.1021/jf048939h>
- Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., Francia-Aricha, E., & Rivas-Gonzalo, J. C. (1999). Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines / Formación de pigmentos derivados de antocianos en vinos tintos experimentales. *Food Science and Technology International*, 5(4), 347-352. <https://doi.org/10.1177/108201329900500407>
- Vivas de Gaulejac, N., Vivas, N., Absalon, C., & Nonier, M.-F. (2001). Identification of procyanidin A2 in grape and wine of *Vitis vinifera* L. cv : Merlot noir and Cabernet Sauvignon. *OENO One*, 35(1), 51. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2001.35.1.995>
- Waterhouse. (2002). *Determination of Total Phenolics*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.
- Weber, F., Greve, K., Durner, D., Fischer, U., & Winterhalter, P. (2013). Sensory and Chemical Characterization of Phenolic Polymers from Red Wine Obtained by Gel Permeation Chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(1), 15-25. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12074>
- White, W. H., Gunyuzlu, P. L., & Toyn, J. H. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Is Capable of de Novo Pantothenic Acid Biosynthesis Involving a Novel Pathway of β -Alanine Production from Spermine*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10794-10800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009804200>

- Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L. (1974). The Production of Aldehydes as a Result of Oxidation of Polyphenolic Compounds and its Relation to Wine Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25(2), 119-126.
- Willemse, C. M., Stander, M. A., Vestner, J., Tredoux, A. G. J., & de Villiers, A. (2015). Comprehensive Two-Dimensional Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) × Reversed-Phase Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry (RP-LC-UV-MS) Analysis of Anthocyanins and Derived Pigments in Red Wine. *Analytical Chemistry*, 87(24), 12006-12015. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03615>
- Wirth, J., Caillé, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chemistry*, 132(4), 1861-1871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.019>
- Wirth, J., Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123(1), 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.008>
- Wulf, L. W., & Nagel, C. W. (1978). High-Pressure Liquid Chromatographic Separation of Anthocyanins of *Vitis Vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29(1), 42-49.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2004). Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins : Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 255-260. <https://doi.org/10.1021/jf030117h>
- Zara, G., & Nardi, T. (2021). Yeast Metabolism and Its Exploitation in Emerging Winemaking Trends : From Sulfite Tolerance to Sulfite Reduction. *Fermentation*, 7(2), 57. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020057>
- Zeng, L., Pons-Mercadé, P., Richard, T., Krisa, S., Teissèdre, P.-L., & Jourdes, M. (2019). Crown Procyanidin Tetramer : A Procyanidin with an Unusual Cyclic Skeleton with a Potent Protective Effect against Amyloid- β -Induced Toxicity. *Molecules*, 24(10), 1915. <https://doi.org/10.3390/molecules24101915>
- Zerbib, M., Mazauric, J.-P., Meudec, E., Le Guernevé, C., Lepak, A., Nidetzky, B., Cheynier, V., Terrier, N., & Saucier, C. (2018). New flavanol O-glycosides in grape and wine. *Food Chemistry*, 266, 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.019>
- Zhang, B., Liu, R., He, F., Zhou, P.-P., & Duan, C.-Q. (2015). Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions : Experimental and theoretical investigations. *Food Chemistry*, 170, 226-233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.026>

- Zhang, Y., Zhong, L., Du, J., Chen, J., Dong, X., & Li, C. (2014). Assessment of Inner Filter Effect Corrections in Fluorimetry of the Interaction Between Polyphenols and Proteins. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 34(1), 116-121. [https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593\(2014\)01-0116-06](https://doi.org/10.3964/j.issn.1000-0593(2014)01-0116-06)

Annexe 1 :
« Supplementary data » Chapitre 3

Supplementary data S1

Phenolic compounds	codes
Benzoic acids and ethyl esters (mg/L)	
protocatechuic acid	BA1
protocatechuic acid ethyl ester	BA2
gallic acid	BA3
gallic acid ethyl ester	BA4
vanillic acid	BA5
syringic acid	BA6
Hydroxycinnamic acids (free and ethyl esters) (mg/L)	
p-coumaric acid	HCA1
p-coumaric acid ethyl ester (mg/L caffeic acid ethyl ester equivalent)	HCA2
caffeic acid	HCA3
caffeic acid ethyl ester	HCA4
ferulic acid	HCA5
Hydroxycinnamoyl tartrates (mg/L)	
p-coumaroyltartaric acid (mg/L caffeoyltartaric acid equivalent)	HCA6
caffeoyltartaric acid	HCA7
feruloyltartaric acid (mg/L caffeoyltartaric acid equivalent)	HCA8
2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid (Grape Reaction Product) (mg/L caffeoyltartaric acid equivalent)	GRP
Stilbenoids (mg/L)	
trans-piceid	ST1
cis-piceid (mg/L trans-piceid equivalent)	ST2
trans-resveratrol	ST3
cis-resveratrol (mg/L trans-resveratrol equivalent)	ST4
resveratrol dimer 1 (mg/L trans-resveratrol equivalent)	ST5
resveratrol dimer 2 (mg/L trans-resveratrol equivalent)	ST6
Flavonols (mg/L)	
quercetin 3-O-glucuronide (mg/L quercetin 3-O-glucoside equivalent)	FLO1
quercetin 3-O-glucoside	FLO2
myricetin 3-O-glucuronide (mg/L quercetin 3-O-glucoside equivalent)	FLO3
myricetin 3-O-glucoside (mg/L quercetin 3-O-glucoside equivalent)	FLO4
quercetin	FLO5
Dihydroflavonols (mg/L)	
taxifolin	DHF1
astilbin (mg/L quercetin 3-O-glucoside equivalent)	DHF2

Flavan-3-ol monomers and oligomers (mg/L)

catechin	FLA1
epicatechin	FLA2
procyanidin dimer B1 (mg/L procyanidin dimer B2 equivalent)	FLA3
procyanidin dimer B2	FLA4
procyanidin dimer B3 (mg/L procyanidin dimer B2 equivalent)	FLA5
procyanidin dimer B4 (mg/L procyanidin dimer B2 equivalent)	FLA6
procyanidin dimer gallate (mg/L catechin equivalent)	FLA7
procyanidin trimer 1 (mg/L catechin equivalent)	FLA8
procyanidin trimer 2 (mg/L catechin equivalent)	FLA9

Flavan-3-ol phloroglucinolysis data

total flavanol units (phloroglucinolysis) (mg/L)	FLAT
mean degree of polymerisation (phloroglucinolysis)	mDP

Anthocyanins (mg/L malvidin 3-O-glucoside equivalent or mg/L malvidin 3,5-diglucoside equivalent *)

cyanidin 3-O-glucoside	AC1
delphinidin 3-O-glucoside	AC2
petunidin 3-O-glucoside	AC3
peonidin 3-O-glucoside	AC4
malvidin 3-O-glucoside	AC5
cyanidin 3-O-acetylglucoside	AC6
delphinidin 3-O-acetylglucoside	AC7
petunidin 3-O-acetylglucoside	AC8
peonidin 3-O-acetylglucoside	AC9
malvidin 3-O-acetylglucoside	AC10
cyanidin 3-O-coumaroylglucoside	AC11
delphinidin 3-O-coumaroylglucoside	AC12
petunidin 3-O-coumaroylglucoside	AC13
peonidin 3-O-coumaroylglucoside	AC14
malvidin 3-O-coumaroylglucoside	AC15
cyanidin 3-O-caffeoylglucoside	AC16
delphinidin 3-O-caffeoylglucoside	AC17
petunidin 3-O-caffeoylglucoside	AC18
peonidin 3-O-caffeoylglucoside	AC19
malvidin 3-O-caffeoylglucoside	AC20
cyanidin 3,5-diglucoside*	AC21
delphinidin 3,5-diglucoside*	AC22
petunidin 3,5-diglucoside*	AC23
peonidin 3,5-diglucoside*	AC24
malvidin 3,5-diglucoside*	AC25

Pyranoanthocyanins (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

pyranocyanidin 3-O-glucoside	PY1
pyranodelphinidin 3-O-glucoside	PY2

pyranopetunidin 3-O-glucoside	PY3
pyranopeonidin 3-O-glucoside	PY4
Pyranomalvidin 3-O-glucoside = vitisin B	PY5
pyranocyanidin 3-O-acetylglucoside	PY6
pyranodelphinidin 3-O-acetylglucoside	PY7
pyranopetunidin 3-O-acetylglucoside	PY8
pyranopeonidin 3-O-acetylglucoside	PY9
pyranomalvidin 3-O-acetylglucoside	PY10
pyranopetunidin 3-O-coumaroylglucoside	PY11
pyranopeonidin 3-O-coumaroyl-glucoside	PY12
pyranomalvidin 3-O-coumaroylglucoside	PY13

Carboxypyrananthocyanins (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

carboxypyranocyanidin 3-O-glucoside	CP1
carboxypyranodelphinidin 3-O-glucoside	CP2
carboxypyranopetunidin 3-O-glucoside	CP3
carboxypyranopeonidin 3-O-glucoside	CP4
carboxypyranomalvidin 3-O-glucoside = vitisin A	CP5
carboxypyranodelphinidin 3-O-acetylglucoside	CP6
carboxypyranopetunidin 3-O-acetylglucoside	CP7
carboxypyranopeonidin 3-O-acetylglucoside	CP8
carboxypyranomalvidin 3-O-acetylglucoside	CP9
carboxypyranopetunidin 3-O-coumaroylglucoside	CP10
carboxypyranopeonidin 3-O-coumaroylglucoside	CP11
carboxypyranomalvidin 3-O-coumaroylglucoside	CP12

Flavanol-anthocyanin adducts (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

(epi)catechin-cyanidin 3-O-glucoside	FA1
(epi)catechin-delphinidin 3-O-glucoside	FA2
(epi)catechin-petunidin 3-O-glucoside	FA3
(epi)catechin-peonidin 3-O-glucoside	FA4
(epi)catechin-malvidin 3-O-glucoside	FA5
(epi)catechin-peonidin 3-O-acetylglucoside	FA6
(epi)catechin-malvidin 3-O-acetylglucoside	FA7
(epi)catechin-malvidin 3-O-coumaroylglucoside	FA8

Anthocyanin-flavanol adducts (A-type) (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

cyanidin 3-O-glucoside -(epi)catechin (A-type)	AF1
delphinidin 3-O-glucoside -(epi)catechin (A-type)	AF2
petunidin 3-O-glucoside -(epi)catechin (A-type)	AF3
peonidin 3-O-glucoside -(epi)catechin (A-type)	AF4
malvidin 3-O-glucoside-(epi)catechin (A-type)	AF5

Caftaric-anthocyanin adducts (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

caftaric-peonidin 3-O-glucoside	CAF1
caftaric-malvidin 3-O-glucoside	CAF2

Ethyl-flavanol dimers (mg/L catechin equivalent)

(epi)catechin-ethyl-(epi)catechin-1	EF1
(epi)catechin-ethyl-(epi)catechin-2	EF2

Flavanol-ethyl-anthocyanins (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

(epi)catechin-ethyl-peonidin 3-O-glucoside-1	FEA1
(epi)catechin-ethyl-peonidin 3-O-glucoside-2	FEA2
(epi)catechin-ethyl-peonidin 3-O-glucoside-3	FEA3
(epi)catechin-ethyl-peonidin 3-O-glucoside-4	FEA4
(epi)catechin-ethyl-malvidin 3-O-glucoside-1	FEA5
(epi)catechin-ethyl-malvidin 3-O-glucoside-2	FEA6
(epi)catechin-ethyl-malvidin 3-O-glucoside-3-4	FEA7
(epi)catechin-ethyl-malvidin 3-O-coumaroylglucoside	FEA8

Phenylpyranoanthocyanins (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

p-hydroxyphenylpyranopeonidin 3-O-glucoside	PP1
p-hydroxyphenylpyranomalvidin 3-O-glucoside	PP2
p-hydroxyphenylpyranopeonidin 3-O-acetylglucoside	PP3
p-hydroxyphenylpyranomalvidin 3-O-acetylglucoside	PP4
p-hydroxyphenylpyranopeonidin 3-O-coumaroylglucoside	PP5
p-hydroxyphenylpyranomalvidin 3-O-coumaroylglucoside	PP6
p-hydroxyphenylpyranopetunidin 3-O-glucoside + catechylpyranopeonidin 3-O-glucoside	PP7
catechylpyranomalvidin 3-O-glucoside (pinotin A)	PP8
catechylpyranopetunidin 3-O-acetylglucoside	PP9
catechylpyranopeonidin 3-O-acetylglucoside+p-hydroxyphenylpyranopetunidin 3-O-acetylglucoside	PP10
catechylpyranomalvidin 3-O-acetylglucoside	PP11
catechylpyranopetunidin 3-O-coumaroylglucoside	PP12
catechylpyranopeonidin 3-O-coumaroylglucoside+p-hydroxyphenylpyranopetunidin 3-O-coumaroylglucoside	PP13
catechylpyranomalvidin 3-O-coumaroylglucoside	PP14
guaiacylpyranomalvidin 3-O-glucoside	PP15
guaiacylpyranomalvidin 3-O-acetylglucoside	PP16
guaiacylpyranomalvidin 3-O-coumaroylglucoside	PP17
syringylpyranomalvidin 3-O-glucoside	PP18

Flavanyl-pyranoanthocyanins (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)

pyranopeonidin 3-O-glucoside-(epi)catechin	FPY1
pyranomalvidin 3-O-glucoside-(epi)catechin	FPY2
pyranomalvidin 3-O-coumaroylglucoside-(epi)catechin	FPY3

Others

unknown 581 (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)	U581
unknown 551 (mg/L malvidin-3-O-glucoside equivalent)	U551
tryptophol	A1
tyrosol	A2
hydroxytyrosol	A3

tyrosine	AA1
tryptophane	AA2
glutathione (GSH)	GSH
oxidized glutathione (GSSG)	GSSG
Enological variables	
pH	pH
Free SO2	FSO2
Combined SO2	CSO2
Alcohol (%)	ALC
Color variables	
Color intensity	CI
Hue	H
L*	L
a*	a
b*	b

Supplementary data S2

[ZIP-Document](#) (ZIP, 290 KiB)

Annexe 2 :
« Supplementary data » Chapitre 5

Supplementary data S1

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration Range (mg/L)
Benzoic acids	<i>Protocatechuic acid</i>	-	152.9	109.0	80.9	3.08	0.01–20
	<i>Syringic acid</i>	+	199.0	140.1	155.1	9.98	0.01–20
	<i>Vanillic acid</i>	+	169.0	125.0	93.0	7.29	0.01–20
Hydroxycinnamoyl tartrates	<i>Caffeoyltartaric acid (cis- and trans- isomers)</i>	-	311.0	149.0	179.0; 135.0	4.30; 4.94	0.01–100
	<i>p-coumaroyltartaric acid (cis- and trans- isomers)</i>	-	295.1	163.1	149.1; 119.1	6.48; 6.81	as equivalents of <i>trans</i> -caftaric acid
	<i>Feruloyltartaric acid</i>	-	325.1	193.0	134.0; 149.2	9.25	as equivalents of <i>trans</i> -caftaric acid
	<i>2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid (cis- and trans- isomers)</i>	-	616.0	149.1	167.0	6.13; 7.52	as equivalents of <i>trans</i> -caftaric acid

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration Range (mg/L)
	<i>Quercetin 3-O-glucoside</i>	+	465.2	303.0	84.9	15.54	0.01–30 as equivalents of Quercetin glucoside
	<i>Myricetin 3-O-glucoside</i>	+	481.2	319.1	123.1	13.52	as equivalents of Quercetin glucoside
Flavonols	<i>Myricetin g3-O-lucuronide</i>	+	495.2	319.1	84.9	13.34	as equivalents of Quercetin glucoside
	<i>Quercetin 3-O-glucuronide</i>	+	479.2	303.1	85.1; 153.1	15.21	as equivalents of Quercetin glucoside
	<i>Catechin</i>	+	291.1	139.0	123.1; 165.1	6.95	0.01–50 as equivalents of Catechin
	<i>Procyanidin dimer gallate</i>	+	731.2	127.0	139.0; 123.0	11.29	as equivalents of Catechin
	<i>Procyanidin trimer-1 (1 isomer)</i>	+	867.3	127.1	579.2; 289.1	3.47	as equivalents of Catechin
	<i>Procyanidin trimers-2 (several isomers)</i>	+	867.3	127.1	579.2; 289.1	5.5–14.0	as equivalents of Catechin
	<i>Epicatechin</i>	+	291.1	139.1	123.1; 165.1	10.84	0.01–50 as equivalents of Dimer B2
Flavanol monomers and oligomers	<i>Procyanidin dimer B2</i>	+	579.2	127.0	139.1; 289.1	9.89	0.01–15 as equivalents of Dimer B2
	<i>Procyanidin dimer B1</i>	+	579.2	127.0	139.1; 289.1	6.74	as equivalents of Dimer B3
	<i>Procyanidin dimer B3</i>	+	579.3	127.1	139.1; 289.2	6.21	as equivalents of Dimer B2
	<i>Procyanidin dimer B4</i>	+	579.2	127.0	139.1; 289.1	8.20	as equivalents of Dimer B2
Ethyl-flavanol dimers	<i>(epi)catechin-ethyl-(epi)catechin-1 (1 isomer)</i>	+	607.1	317.2	165.1	13.91	as equivalents of Catechin
	<i>(epi)catechin-ethyl-(epi)catechin-2 (2 co-eluted isomers)</i>	+	607.1	317.2	165.1	21.37	as equivalents of Catechin

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration Range (mg/L)
	<i>Malvidin 3,5-di-O-glucoside</i>	+	655.2	331.2	493.2	11.87	0.01–30
	<i>Delphinidin 3,5-di-O-glucoside</i>	+	627.2	303.2	465.2	9.74	as equivalents of Malvidin 3,5-di-O-glucoside
	<i>Cyanidin 3,5-di-O-glucoside</i>	+	611.2	287.2	449.2	10.71	as equivalents of Malvidin 3,5-di-O-glucoside
	<i>Petunidin 3,5-di-O-glucoside</i>	+	641.2	317.2	479.2	11.13	as equivalents of Malvidin 3,5-di-O-glucoside
	<i>Peonidin 3,5-di-O-glucoside</i>	+	625.2	301.2	463.2	11.70	as equivalents of Malvidin 3,5-di-O-glucoside
	<i>Malvidin 3-O-glucoside</i>	+	493.2	331.2	315.0	13.80	0.01–50
	<i>Delphinidin 3-O-glucoside</i>	+	465.2	303.1	229.0	11.78	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
Anthocyanins	<i>Cyanidin 3-O-glucoside</i>	+	449.2	287.1	137.2	12.37	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Petunidin 3-O-glucoside</i>	+	479.2	317.2	302.3	12.87	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Peonidin 3-O-glucoside</i>	+	463.2	301.2	286.1	13.40	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Delphinidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	507.2	303.0	229.0	16.04	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Cyanidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	491.2	287.1	137.0	18.33	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Petunidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	521.2	317.2	302.3	19.76	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Peonidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	505.2	301.1	286.2	20.97	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration
							Range (mg/L)
	<i>Malvidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	535.2	331.2	315.	21.18	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Delphinidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i> (<i>cis-</i> and <i>trans-</i> isomers)	+	611.2	303.1	229.1	20.71; 22.05	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Cyanidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i> (<i>cis-</i> and <i>trans-</i> isomers)	+	595.2	287.1	157.1	21.60; 22.67	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Petunidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i> (<i>cis-</i> and <i>trans-</i> isomers)	+	625.2	317.2	302.3	21.97; 22.83	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Peonidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i> (<i>cis-</i> and <i>trans-</i> isomers)	+	609.2	301.2	286.2	22.53; 23.17	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Malvidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i> (<i>cis-</i> and <i>trans-</i> isomers)	+	639.2	331.2	315.2	22.60; 23.18	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
Anthocyanins	<i>Delphinidin 3-O-caffeoyl-glucoside</i>	+	627.2	303.1	569.2	20.21	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Cyanidin 3-O-caffeoyl-glucoside</i>	+	611.2	287.0	-	21.27	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Petunidin 3-O-caffeoyl-glucoside</i>	+	641.2	317.2	-	21.69	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Peonidin 3-O-caffeoyl-glucoside</i>	+	625.2	301.2	286.2	22.35	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Malvidin 3-O-caffeoyl-glucoside</i>	+	655.2	331.2	315.1	22.43	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration Range (mg/L)
Flavanol-ethyl-anthocyanins	<i>(epi)catechin-ethyl-peonidin 3-O-glucoside</i> (4 isomers)	+	779.2	327.1	489.1	16.98; 18.38; 20.26; 20.90	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>(epi)catechin-ethyl-malvidin 3-O-glucoside</i> (4 isomers)	+	809.2	357.3	519.1	17.93; 19.46; 20.46 (2 co-eluted isomers)	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>(epi)catechin-ethyl-malvidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i> (2 co-eluted isomers)	+	955.2	647.2	357.1	23.31	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
Flavanol-anthocyanins adducts	<i>(epi)catechin-peonidin 3-O-glucoside</i>	+	751.2	589.2	301.1	10.98	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>(epi)catechin-malvidin 3-O-glucoside</i>	+	781.2	619.2	257.1	11.05; 12.09	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>(epi)catechin-peonidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	793.2	343.1	589.2; 301.1	13.22	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>(epi)catechin-malvidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	823.2	373.2	331.1; 619.2	13.49	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
Anthocyanin-flavanol adducts (A-type)	<i>Peonidin 3-O-glucoside-(epi)catechin</i>	+	753.2	313.1	601.2	12.87	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Malvidin 3-O-glucoside-(epi)catechin</i>	+	783.2	343.1	469.2	13.14	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
Cafftaric-anthocyanin adducts	<i>Cafftaric-peonidin 3-O-glucoside</i>	+	773.2	611.2	151.0	11.07	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside
	<i>Cafftaric-malvidin 3-O-glucoside</i>	+	803.2	641.2	181.1	11.62	as equivalents of Malvidin 3-O-glucoside

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration Range (mg/L)
Pyrananthocyanins	<i>Pyranopeonidin 3-O-glucoside</i>	+	487.2	325.1	310.2	14.67	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Pyranomalvidin 3-O-glucoside (vitisin B)</i>	+	517.2	355.1	339.2	15.55	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Pyranopeonidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	529.2	325.2	309.2	15.97	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Pyranomalvidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	459.2	355.2	339.2	16.67	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Pyranopeonidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i>	+	633.2	325.2	310.2	21.69	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Pyranomalvidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i>	+	663.2	355.2	-	21.78	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
Carboxy-pyrananthocyanins	<i>Carboxypyranopeonidin 3-O-glucoside</i>	+	677.2	385.2	370.2	19.13	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Carboxypyranomalvidin 3-O-glucoside (vitisin A)</i>	+	561.2	369.2	297.2	14.97	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Carboxypyranopeonidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	573.2	369.2	281.2	16.28	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Carboxypyranomalvidin 3-O-acetyl-glucoside</i>	+	603.2	399.2	383.2	16.90	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Carboxypyranopeonidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i>	+	677.2	369.2	354.1	21.37	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Carboxypyranomalvidin 3-O-coumaroyl-glucoside</i>	+	707.2	399.0	383.0	21.44	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration Range (mg/L)
	<i>p</i> -hydroxyphenylpyranopeonidin 3- <i>O</i> -glucoside	+	579.2	417.2	402.2	23.52	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>p</i> -hydroxyphenylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -glucoside	+	609.2	447.2	431.1	23.56	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>p</i> -hydroxyphenylpyranopeonidin 3- <i>O</i> -acetylglucoside	+	621.2	417.2	-	23.59	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>p</i> -hydroxyphenylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -acetylglucoside	+	651.2	447.2	431.2	23.63	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>p</i> -hydroxyphenylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	+	755.2	447.1	431.1	23.68	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Catechylpyranopeonidin 3- <i>O</i> -glucoside	+	595.2	433.2	418.1	23.39	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Catechylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -glucoside (pinotin A)	+	625.2	463.2	447.2	23.44	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Catechylpyranopeonidin 3- <i>O</i> -acetylglucoside	+	637.2	433.2	-	23.47	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Catechylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -acetylglucoside	+	667.2	463.2	-	23.51	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Catechylpyranopeonidin 3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	+	741.2	433.2	-	23.55	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Catechylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	+	771.2	463.2	-	23.59	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Guaiacylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -glucoside	+	639.2	477.2	462.2	23.60	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Guaiacylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -acetylglucoside	+	681.2	477.2	-	23.63	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	Guaiacylpyranomalvidin 3- <i>O</i> -coumaroylglucoside	+	785.2	477.1	461.3	23.71	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside

Phenolic groups	Phenolic compounds	Ion Mode	<i>m/z</i> Precursor Ion ^a (Th)	<i>m/z</i> Quantifier ^a (Th)	<i>m/z</i> Qualifiers ^a (Th)	Retention Time (min)	Calibration Range (mg/L)
Flavanyl-pyranoanthocyanins	<i>Pyranopeonidin 3-O-glucoside-(epi)catechin</i>	+	775.2	613.2	461.2	23.19	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Pyranomalvidin 3-O-glucoside-(epi)catechin</i>	+	805.2	491.0	643.2	23.43	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
	<i>Pyranomalvidin 3-O-coumaroyl-glucoside-(epi)catechin</i>	+	951.2	643.2	-	23.43	as equivalents of Malvidin 3- <i>O</i> -glucoside

Supplementary data S2

	Musts												
	Cinsault1		Cinsault2		Grenache1		Grenache2		Syrah1		Syrah2		
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Concentrations (mg/L)													
Benzoic acids	2.73 ± 1.61 ^{ab}	2.79 ± 2.48 ^{ab}	2.92 ± 2.56 ^{ab}	3.02 ± 2.01 ^{ab}	3.98 ± 5.35 ^{ab}	0.27 ± 0.06 ^{ab}							
Hydroxycinnamoyl tartrates	7.30 ± 1.02 ^g	30.21 ± 1.41 ^d	28.54 ± 2.63 ^d	23.84 ± 0.34 ^e	36.75 ± 1.23 ^{bc}	52.13 ± 1.29 ^a							
2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid (GRP)	0.94 ± 0.18 ^{hi}	2.78 ± 0.42 ^g	7.78 ± 0.92 ^d	6.24 ± 0.27 ^e	15.53 ± 0.60 ^b	17.60 ± 1.26 ^a							
Flavonols	0.41 ± 0.06 ^{de}	2.37 ± 0.30 ^c	0.29 ± 0.08 ^e	0.65 ± 0.03 ^{de}	6.01 ± 0.73 ^a	3.55 ± 0.99 ^b							
Flavanol monomers and oligomers	0.14 ± 0.03 ^d	2.61 ± 0.32 ^d	0.80 ± 0.40 ^d	1.01 ± 0.25 ^d	56.91 ± 5.28 ^b	63.82 ± 6.18 ^a							
Anthocyanins	0.72 ± 0.05 ^g	10.20 ± 0.30 ^f	0.36 ± 0.01 ^g	0.62 ± 0.02 ^g	199.79 ± 0.93 ^b	219.39 ± 1.40 ^a							
Pyranoanthocyanins	0.02 ± 0.00 ^b	0.19 ± 0.03 ^b	0.02 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.17 ± 0.00 ^b	0.17 ± 0.01 ^b							
Carboxypyrananthocyanins	0.05 ± 0.01 ^d	0.16 ± 0.02 ^c	0.03 ± 0.01 ^d	0.03 ± 0.01 ^d	0.15 ± 0.00 ^c	0.15 ± 0.01 ^c							
Flavanol-anthocyanin adducts	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.13 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.05 ^b							
Anthocyanin-flavanol adducts (A-type)	0.00 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b							
Caftaric-anthocyanin adducts	0.14 ± 0.02 ^c	0.82 ± 0.21 ^b	0.09 ± 0.02 ^c	0.23 ± 0.03 ^c	0.04 ± 0.00 ^c	0.07 ± 0.01 ^c							
Ethyl-flavanol dimers	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.04 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.02 ^{ab}	0.07 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^{ab}							
Flavanol-ethyl-anthocyanins	0.00 ± 0.00 ^d	0.01 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.02 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^d							
Phenylpyrananthocyanins	0.01 ± 0.00 ^{cde}	0.03 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^{cde}	0.01 ± 0.00 ^{cde}	0.04 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a							
Flavanyl-pyranoanthocyanins	0.003 ± 0.000 ^e	0.011 ± 0.000 ^c	0.003 ± 0.000 ^e	0.003 ± 0.000 ^e	0.018 ± 0.002 ^a	0.016 ± 0.001 ^b							

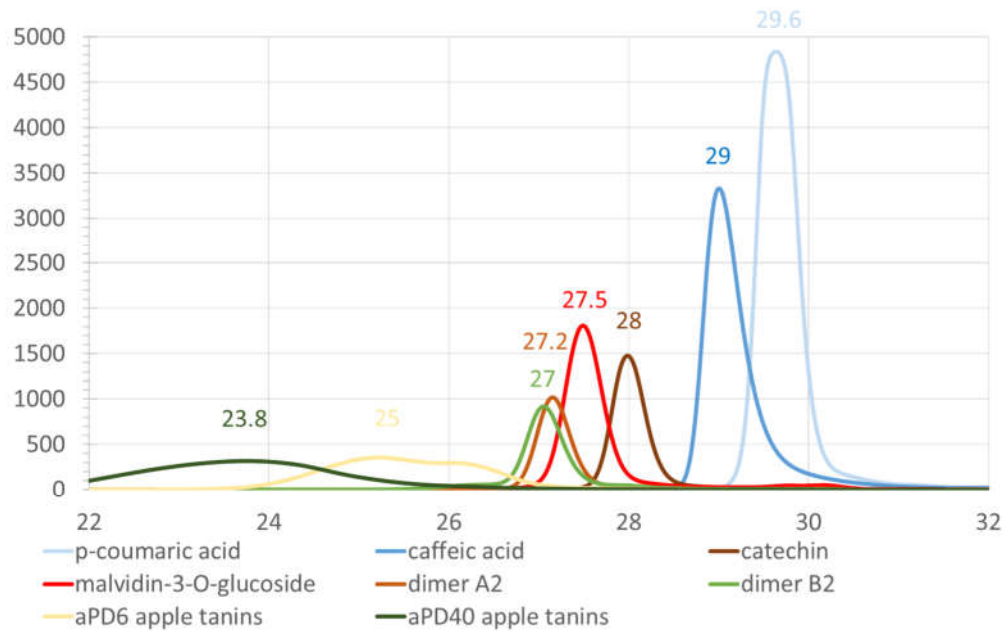
Wines												
	Cinsault1		Cinsault2		Grenache1		Grenache2		Syrah1		Syrah2	
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Concentrations (mg/L)												
Benzoic acids	3.64 ± 0.92 ^{ab}	4.66 ± 1.42 ^{ab}	2.63 ± 2.42 ^{ab}	6.06 ± 1.59 ^a	5.89 ± 4.12 ^a	2.18 ± 1.76 ^{ab}						
Hydroxycinnamoyl tartrates	9.43 ± 1.38 ^g	40.62 ± 3.25 ^b	34.81 ± 2.40 ^c	22.51 ± 1.72 ^e	37.85 ± 1.06 ^{bc}	36.27 ± 0.03 ^{bc}						
2-S-glutathionylcaffeoyltartaric acid (GRP)	0.85 ± 0.09 ^{hi}	4.07 ± 0.88 ^f	8.72 ± 0.62 ^{cd}	4.24 ± 0.36 ^f	7.96 ± 1.78 ^d	7.76 ± 0.46 ^d						
Flavonols	0.25 ± 0.07 ^e	1.20 ± 0.19 ^d	0.01 ± 0.01 ^e	0.16 ± 0.05 ^e	2.90 ± 0.50 ^{bc}	3.43 ± 0.12 ^b						
Flavanol monomers and oligomers	0.18 ± 0.05 ^d	2.42 ± 0.31 ^d	1.36 ± 0.16 ^d	1.30 ± 0.42 ^d	46.32 ± 9.26 ^c	62.30 ± 3.89 ^a						
Anthocyanins	0.88 ± 0.10 ^g	9.99 ± 0.18 ^f	0.40 ± 0.02 ^g	0.50 ± 0.05 ^g	103.00 ± 0.28 ^d	116.05 ± 5.44 ^c						
Pyranoanthocyanins	0.02 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.03 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	1.77 ± 0.31 ^a	1.74 ± 0.03 ^a						
Carboxypyrananthocyanins	0.06 ± 0.01 ^d	0.13 ± 0.03 ^c	0.02 ± 0.01 ^d	0.03 ± 0.00 ^d	0.73 ± 0.05 ^b	1.04 ± 0.16 ^a						
Flavanol-anthocyanin adducts	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.13 ± 0.03 ^b	0.19 ± 0.00 ^a						
Anthocyanin-flavanol adducts (A-type)	0.00 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.02 ^a						
Caftaric-anthocyanin adducts	0.10 ± 0.02 ^c	1.55 ± 0.19 ^a	0.07 ± 0.01 ^c	0.24 ± 0.29 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.01 ^c						
Ethyl-flavanol dimers	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.00 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}						
Flavanol-ethyl-anthocyanins	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^d	0.07 ± 0.02 ^b	0.21 ± 0.01 ^a						
Phenylpyrananthocyanins	0.01 ± 0.00 ^{cde}	0.01 ± 0.00 ^{cde}	0.01 ± 0.00 ^{cde}	0.01 ± 0.00 ^{cde}	0.03 ± 0.00 ^b	0.04 ± 0.02 ^a						
Flavanyl-pyrananthocyanins	0.003 ± 0.000 ^e	0.003 ± 0.000 ^e	0.003 ± 0.000 ^e	0.003 ± 0.000 ^e	0.011 ± 0.000 ^c	0.016 ± 0.005 ^b						

Musts						
	Cinsault1	Cinsault2	Grenache1	Grenache2	Syrah1	Syrah2
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Concentrations (mg/L)	17.19 ± 1.99 ^h	50.30 ± 2.93 ^e	7.23 ± 0.87 ^{ijkl}	11.11 ± 0.83 ^{ijk}	89.00 ± 4.36 ^b	108.57 ± 0.88 ^a
Total flavanol units (phloroglucinolysis)	1.28 ± 0.12 ⁱ	1.16 ± 0.01 ⁱ	1.66 ± 0.16 ⁱ	1.57 ± 0.06 ⁱ	6.45 ± 0.15 ^d	5.99 ± 0.67 ^e
Mean degree of polymerisation						

Wines						
	Cinsault1	Cinsault2	Grenache1	Grenache2	Syrah1	Syrah2
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Concentrations (mg/L)	1.60 ± 0.19 ^l	8.01 ± 0.82 ^{jk}	1.26 ± 0.13 ^l	2.25 ± 0.38 ^l	54.74 ± 4.65 ^d	81.40 ± 10.06 ^c
Total flavanol units (phloroglucinolysis)	1.56 ± 0.05 ⁱ	1.74 ± 0.22 ⁱ	1.29 ± 0.32 ⁱ	1.21 ± 0.19 ⁱ	3.01 ± 0.10 ^g	2.28 ± 0.07 ^h
Mean degree of polymerisation						

Lees						
	Cinsault1	Cinsault2	Grenache1	Grenache2	Syrah1	Syrah2
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
Concentrations (mg/L)	5.02 ± 0.52 ^{kl}	14.22 ± 1.69 ^{hi}	9.53 ± 0.60 ^{ijk}	12.20 ± 2.09 ^{hij}	41.03 ± 6.07 ^f	30.13 ± 2.91 ^g
Total flavanol units (phloroglucinolysis)	8.46 ± 0.34 ^c	5.38 ± 0.10 ^f	6.65 ± 0.22 ^d	5.66 ± 0.19 ^{ef}	10.78 ± 0.61 ^a	8.94 ± 0.28 ^b
Mean degree of polymerisation						

Supplementary data S3



S3 : The elution time of different polyphenols standards : *p*-coumaric acid, 29.6 ± 0.13 min; caffeic acid, 29 ± 0.13 min; catechin, 28 ± 0.13 min; oenin chloride, 27.5 ± 0.13 min; aDP6 apple tannins, 25 ± 0.13 min; aDP 40 apple tannins, 23.7 ± 0.13 min)

Abstract

Drivers of pigment behavior during alcoholic fermentation of rosé wines

Color is essential for perception of rosé wine quality and is a key element in the consumer's purchasing act, due to their packaging in clear glass bottles. This project aims at understanding the pigments responsible for the diversity of rosé wine color and the mechanisms involved in color and pigment evolution during wine-making, in order to better control them. This thesis focuses on alcoholic fermentation, which is a major stage of the wine-making process, known to have a strong influence on color.

The first results were obtained on 268 commercial rosé wines, using an approach combining color analysis by UV-visible spectrophotometry, polyphenol analysis by a targeted metabolomics approach based on high performance liquid chromatography hyphenated with tandem mass spectrometry in the MRM (multiple reaction monitoring) mode and chemometrics treatment of the data. They revealed a great diversity in the color of rosé wines, which can be explained by their very different phenolic compositions. The color of light rosé wines is mainly due to pigments derived from the reactions of anthocyanins with hydroxycinnamic acids and with pyruvic acid, a yeast metabolite. In contrast, the color of dark rosé wines is due to anthocyanins and flavanols for the red component a^* , in connection with extraction, and, for the yellow component b^* , to oxidation products resulting from the reactivity of anthocyanins and ethanal. This first approach allowed to identify the pigments involved in the color of rosé wines in order to study them during the alcoholic fermentation.

The same analytical strategy was applied to investigate the impact of alcoholic fermentation on color and pigment composition of wines made from three varieties commonly used in Provence for rosé wine-making, with two levels of maceration. The influence of three parameters, namely pH, sulfite content, and fermentation temperature, were analyzed simultaneously using experimental designs. Except for the well-established impact of pH and sulfites on anthocyanin color, these three parameters had no significant impact on the final characteristics of wines fermented at laboratory scale, under the selected experimental conditions. Analysis of the replicated central points of the experimental designs highlighted polyphenol compositions specific of each variety, responsible for the observed color differences. Size exclusion chromatography analysis revealed the presence of higher molecular weight compounds that were not analyzed by the targeted MRM method but contributed absorbance in the UV-visible range, with spectra suggesting structural differences between the three varieties. Moreover, selective adsorption of some pigments on the lees during fermentation was demonstrated enhancing this varietal effect. Indeed, a significant part of the color of the rosé wines was adsorbed on the yeast walls, highlighting the importance of this phenomenon in rosé wine-making. A non-targeted metabolomics approach using high resolution mass spectrometry coupled to high performance liquid chromatography provided confirmation of these results and allowed us to validate the protocol for alcoholic fermentation at laboratory scale. It also established lists of markers of the must and/or wine of each variety and, in particular, revealed a specific composition of Cinsault wines, characterized by higher molecular weight polyphenols presumably resulting from enzymatic oxidation at must stage;

These results shed light on the color diversity of rosé wines and allowed progress in the understanding of the reaction and interaction mechanisms involving phenolic compounds during alcoholic fermentation.

Keywords: rosé wines, polyphenols, color, alcoholic fermentation, lees adsorption

Résumé

Déterminants du comportement des pigments au cours de la fermentation alcoolique des vins rosés

La couleur est essentielle pour la perception de la qualité des vins rosés et constitue un élément clé de l'acte d'achat des consommateurs, du fait de leur conditionnement en bouteilles de verre transparent. Ce projet vise à caractériser les pigments responsables de la couleur des vins rosés et plus particulièrement à comprendre les mécanismes impliqués dans leur évolution au cours de la fermentation, étape primordiale de la vinification réputée pour avoir un impact fort sur la couleur, afin de mieux les maîtriser.

Les premiers résultats ont été obtenus sur un échantillon de 268 vins rosés commerciaux, par une approche combinant l'analyse de la couleur par spectrophotométrie UV-visible, l'analyse de la composition phénolique par une analyse ciblée reposant sur le couplage chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode MRM (multiple reaction monitoring) et le traitement de ces données par chimiométrie. Ils ont révélé une grande diversité de couleur des vins rosés qui s'explique par leurs compositions phénoliques très différentes. La couleur des vins rosés clairs est principalement due à des pigments dérivés résultant des réactions des anthocyanes avec les acides phénols et l'acide pyruvique, un métabolite de la levure. Au contraire, la couleur des vins rosés foncés est due, d'une part, aux anthocyanes et aux flavanols pour la composante rouge a*, en lien avec l'extraction, d'autre part, pour la composante jaune b *, à des produits d'oxydation découlant de la réactivité des anthocyanes et de l'éthanal.

La même stratégie analytique a été mise en œuvre pour étudier l'impact de la fermentation alcoolique sur les pigments et la couleur des vins élaborés à partir de cépages emblématiques des rosés de Provence, Cinsault, Grenache et Syrah, avec deux niveaux de macération. Les travaux réalisés à l'aide de plans d'expérience faisant varier 3 paramètres (pH, teneur en sulfites et température) au cours de la fermentation, ont montré qu'hormis l'impact bien connu du pH et des sulfites sur la couleur des anthocyanes, ces paramètres, dans les conditions expérimentales choisies, n'ont pas affecté les caractéristiques des vins fermentés en laboratoire. L'analyse approfondie des points centraux des plans d'expérience a permis de mettre en évidence des compositions spécifiques de chaque cépage, à l'origine de leurs différences de couleur. Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique ont révélé la présence de composés de haut poids moléculaire, non analysés par la méthode MRM ciblée, qui semblent structurellement différents en fonction des cépages. Une adsorption sélective de certains pigments sur les lies au cours de la fermentation, renforçant cet effet cépage, a également été démontrée, mettant en lumière l'importance de ce phénomène dans la vinification des vins rosés. Une dernière approche métabolomique non ciblée par spectrométrie de masse haute résolution a permis de confirmer ces résultats, de valider le protocole de fermentation alcoolique en laboratoire et d'établir des listes de marqueurs des différents cépages au stade moût et /ou vin. Elle a notamment révélé une composition particulière du Cinsault avec la présence de composés de haut poids moléculaire résultant probablement de l'oxydation enzymatique des moûts.

Mots clés : vins rosés, couleur, polyphénols, fermentation alcoolique, adsorption levure