Analyses métabolomiques du vin : "chemical messages in a bottle"

Chloé Roullier-Gall

▶ **To cite this version:**

Chloé Roullier-Gall. Analyses métabolomiques du vin : "chemical messages in a bottle". Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS080 . tel-01281917

HAL Id: tel-01281917

https://theses.hal.science/tel-01281917

Submitted on 3 Mar 2016

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

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

THESE DE DOCTORAT en Co-tutelle

Discipline : Sciences des Aliments

Unité de recherche PAPC-UMR PAM
AgroSup Dijon
Université de Bourgogne

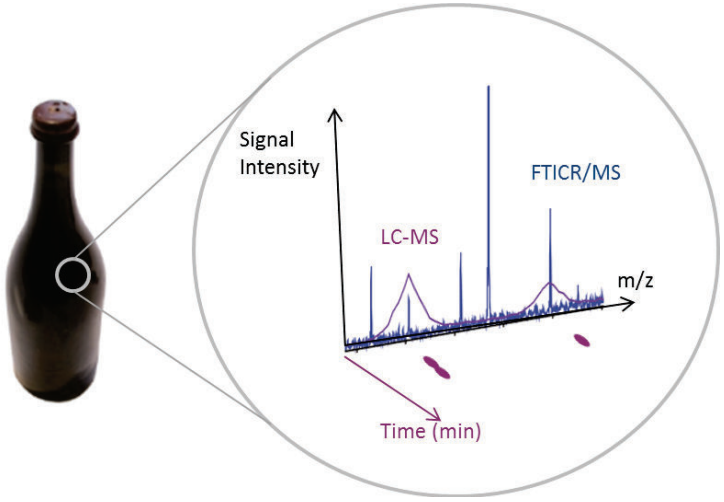
Unité de recherche de BioGéochimie et Analytique
Helmholtz Zentrum München
Université Technique de Munich

Présentée par

Chloé ROULLIER-GALL

Pour obtenir le grade de Docteur de l´Université de Bourgogne

Analyses métabolomiques du vin : « Chemical messages in a bottle »



Soutenue publiquement le 16 décembre 2014 devant la commission d´examen suivante :

Pr. Philippe JEANDET	Université de Reims	Rapporteur
Pr. Michael RYCHLIK	Université Technique de Munich	Rapporteur
Pr. Michael GONSIOR	Université du Maryland	Rapporteur
Pr. Marielle ADRIAN	Institut de la vigne et du vin	Examinateur
Franck BROSSAUD	Bureau Interprofessionel de la vigne et du vin	Membre invité
Pr. Régis GOUGEON	Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Pr. Philippe SCHMITT-KOPPLIN	Université Technique de Munich	Co-directeur de thèse

Remerciements

Ce travail n'aurait pas pu exister sans Régis Gougeon, directeur de cette thèse, et Philippe Schmitt-Kopplin, co-directeur. Je tiens à les remercier pour m'avoir accordé leur confiance, leur soutien ainsi que pour leur engagement dans mon travail de recherche. Votre aptitude à voir le meilleur dans toutes les situations est un vrai plus dans la vie du labo.

Les travaux de recherches de cette thèse ont pu exister grâce au soutien financier de la Région Bourgogne, du Bureau interprofessionnel des vins de Bourgogne, du comité interprofessionnel des vins de champagnes et de la Chaire UNESCO culture et tradition du vin. Ils ont été réalisés au sein du laboratoire PAPC dans l'enceinte de l'institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV) à Dijon ainsi que dans le centre Helmotz à Munich, au sein de l'équipe de Biogéochimie analytique.

Je tiens également à remercier les professeurs Marielle Adrian, Philippe Jeandet, Michael Rychlik et Michael Gonsior qui me font l'honneur d'examiner mon travail de thèse ainsi qu'aux professeurs Hervé Alexandre et Zelimir Gobelica pour leur participation à mes comités de pilotages.

D'autre part, j'adresse un grand merci à l'ensemble des domaines, maisons et vignerons qui nous ont offert de précieux échantillons, et sans qui cette aventure n'aurait jamais été possible : Domaine de la Romanée Conti, et notamment Aubert et Bertrand de Villaine; Domaine Vincent Dauvissat ; Domaine Louis Jadot, Domaine des comte Lafon ; Domaine Bouchard père et fils et notamment Géraud-Pierre Aussendou et enfin le domaine de la Velle qui en nous accordant la première série verticale a permis d'initier ce travail. Merci pour les inoubliables discussions, dégustations, visites et tout simplement pour votre confiance.

Il me faut également remercier Marielle Adrian, qui a su être à l'écoute, disponible et plein de bons conseils pendants ces trois années, et parce que la pluridisciplinarité est essentielle !

Je voudrais adresser mes remerciements à l'ensemble de mon équipe de recherche au sein de l'Institut Jules Guyot et du centre Helmoltz qui ont su faire de ces lieux une deuxième maison. J'adresse plus particulièrement mes remerciements à Alexandra Da Silva pour sa disponibilité et sa joie de vivre permanente !

Un grand merci à l'ensemble des doctorants, post doc et stagiaire avec qui j'ai partagé les joies (ou pas) de la recherche et qui sont devenus pour moi des amis : Aurélie, Charlie, Maryse, Lemia, Magalie, Mohand, Maud, Alex, Cedric & Cedric, Bao et Youzhong, ainsi que mes collègues de Munich, Tanja,Yan, Sabine, Kirill, Jenny, Alesia, Michael, Juliano, Dimitrios, Katharina, Sara, Mourad, Moritz, Basem, Wendolin, Marianna, Franco, Theresa et Alexander.

Je remercie tout particulièrement Lemia qui avec patience m'a transmis son expertise dans les domaines de la chimie analytique, de la métabolomique et du traitement de données, qui m'a accompagné lors de mon premier séjour à Munich et qui m'a été d'une grande aide pour ce travail.

Un merci particulier à Magalie, Maud, Alex, Mohand, Cédric & Cédric pour nos sorties décompression du vendredi soir, merci aussi pour vos talents de testeurs de cuisine expérimentale, même si « je n'ai jamais gouté un truc comme ça » n'est pas vraiment un compliment… Une pensée particulière pour Aurélie toujours de bonne humeur et disponible, pour notre passion commune pour les bonbons, les befoods, les films de filles, (+/-) la piscine, et tout simplement pour ton amitié. Une note pour Charlie qui a su me faire découvrir l'univers incroyable du thésard, mille merci pour ton amitié et ton soutien. ☺

Un merci particulier à Maud et Alex pour les pauses déjeuners irremplaçables, même si Alex ne veux jamais partager son dessert. Une attention particulière pour Maud en vrac pour les cours de tricot (j'ai encore du travail question détente), nos sorties piscines, nos réunions Tupperware, et notre voyage en Afrique du Sud, parce qu'à deux c'est quand même plus fun…. on a survécu à l'attaque des « water buffalo », la jungle de Joanesburg, la conduite à gauche avec attaque de camion et à mes tentatives de communications avec les manchots !

Un merci spécial à Michael et Jenny pour le soutien scientifique, leur patience en toute occasion et les sorties climbing and boldering quotidiennes. Merci pour votre permanente bonne humeur, et pour toutes vos petites attentions. Je ne peux oublier mes collègues de bureau de Munich : Yan, Sabine, Tanja et Kirill, merci pour tous ces moments partagés, des pauses déjeuners aux soirées pizza, en passant par les sorties Asian Shop ou les dégustations de vins, de bières ou de thé….

Je tiens également à dire un grand merci à toutes ces personnes qui ont su rendre ma vie plus facile au cours de ces trois années, à commencer par Andrène qui en plus de son amitié, de ses bons plans mode, de nos passion communes pour les lapins et les animaux en général, les bouquins, la cuisine, le thé j'en passe et des meilleurs, a pris le temps de venir me voir à Munich à chacun de mes séjours ! Puis vient le tour de Dimitrios, François, Charles et Marilou, ma bande Munichoise ! Merci pour ces soirées / weekend / randonnées / diners / découvertes / bbq / baignades et tout simplement pour avoir fait de mes séjours à Munich des moments inoubliables ! Grosse pensée pour le Comte, super nounou pour Pepette et les Jean…. ne t'inquiètes pas plus qu'un an ! ou deux… enfin tu verras ! ;D

Enfin, et c'est le plus important, un grand merci à ma famille sans qui je n'aurai pu arriver jusque-là et tout particulièrement à Tom pour son soutien permanent, sa patience et pour tout le reste. ♥

Sommaire

SOMMAIRE 1

RÉSUMÉ 5

ABSTRACT 6

LISTE DES TRAVAUX 7

1 Articles publiés 7
2 Articles acceptés 7
3 Articles en préparation 7
4 Présentations orales et posters 8

LISTE DES ABRÉVIATIONS 9

LISTE DES TABLEAUX 10

LISTE DES FIGURES 11

LISTE DES ANNEXES 15

INTRODUCTION GÉNÉRALE 20

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 26

1 De la baie de raisin au vin 26
2 L'analyse du vin 28
2.1 Approche ciblée 29
2.1.1 Chromatographie gazeuse 29
2.1.2 Chromatographie liquide 31
2.2 Approche non ciblée 32
2.2.1 Métabolomique 33
2.2.2 La spectrométrie de masse 34
2.2.3 Spectroscopie de Fluorescence 38
2.2.4 La résonance magnétique nucléaire 39
3 Le vieillissement en bouteille 40
3.1 Conditions de conservation 41
3.2 Les phénomènes d'hydrolyse et d'estérification 44
3.3 Les phénomènes d'oxydation 46
3.3.1 Réaction d'oxydation des vins blancs 47
3.3.2 Protection des vins contre l'oxydation et chimie du soufre 48
3.4 Micro-oxygénation et vieillissement artificiel 51
3.5 Étude de séries verticales de vins en bouteille 52
4 Influences des facteurs environnementaux 54
5 Conclusion 58

MATÉRIELS ET MÉTHODES 60

1 Solvants et réactifs 60
2 Matériels biologiques 60
2.1 Influences des pratiques œnologiques 60
2.2 Les vins pour l'analyse « oxygénation contrôlée » 61
2.3 Les vins pour l'analyse terroir 62

2.3.1 Domaine de la Romanée Conti *62*
2.3.2 Domaine Louis Jadot *63*
2.4 Les séries verticales de vins blancs et rouges *63*
2.4.1 Domaine de la Velle *65*
2.4.2 Domaine Bouchard père & fils *65*
2.4.3 Domaine Comtes Lafon *65*
2.4.4 Domaine Dauvissat *66*
2.4.5 Domaine de la Romanée Conti *66*
2.5 Les millésimes anciens *67*
3 MÉTHODES ANALYTIQUES 67
3.1 Préparation des échantillons *67*
3.1.1 Les vins *67*
3.1.2 Les baies de raisin *68*
3.2 Analyses UPLC *69*
3.3 Métabolomique *70*
3.3.1 FTICR-MS *71*
3.3.2 UPLC-Q-TOF -MS *73*
3.3.3 La spectroscopie de fluorescence *74*
3.4 Traitements des données *76*
3.4.1 Netcalc *76*
3.4.2 Diagramme de van Krevelen *77*
3.4.3 Statistiques *78*
3.4.4 Bases de données *82*

RÉSULTATS ET DISCUSSION **86**

CHAPITRE 1 : DÉVELOPPEMENTS MÉTHODOLOGIQUES **87**

1 DÉVELOPPEMENT ET APPLICATION DE DEUX APPROCHES COMBINÉES POUR L'ANALYSE NON CIBLÉE DU VIN. 87
2 ULTRA HAUTE PRÉCISION DE MESURE DE MASSE POUR L'ANALYSE MÉTABOLOMIQUE DU VIN 111
3 CONCLUSION GÉNÉRALE DU CHAPITRE 1 131

CHAPITRE 2 : ÉTUDE DE SÉRIES VERTICALES DE VINS ET VIEILLISSEMENT EN BOUTEILLE **132**

1 MARQUEURS DE VIEILLISSEMENT 132
2 SAINT VIVANT 148
3 CONCLUSION GÉNÉRALE DU CHAPITRE 2 163

CHAPITRE 3 : PRATIQUES ŒNOLOGIQUES ET DIVERSITÉ CHIMIQUE **165**

1 INFLUENCE DE PRATIQUES ŒNOLOGIQUES : OXYGÉNATION CONTRÔLÉE LORS DE LA PRISE DE MOUSSE EN VINIFICATION CHAMPENOISE. 166
2 INFLUENCE DES PRATIQUES ŒNOLOGIQUES : SULFITAGE AU PRESSURAGE, DÉBOURBAGE, UTILISATION DE BENTONITE EN FERMENTATION ET BOUCHAGE, EN VINIFICATION BOURGUIGNONNE. 191
2.1 Impact du millésime *191*
2.2 Impact du bouchage *192*
2.3 Impact du débourbage *196*
2.4 Impact du sulfitage *196*
2.5 Conclusion *200*
3 COMPARAISON ENTRE DES VINS PERÇUS OXYDÉS ET NON OXYDÉS LORS DE DÉGUSTATIONS PAR ANALYSES NON CIBLÉES 202
4 CONCLUSION GÉNÉRALE DU CHAPITRE 3 207

CHAPITRE 4: APPLICATION À L'ÉTUDE DU TERROIR **208**

1 COMPARAISON DE LA DIVERSITÉ CHIMIQUE DE RAISINS ET DE VINS ISSUS DE DIFFÉRENTES APPELLATIONS BOURGUIGNONNES : EFFET DE TERROIR VS MILLÉSIME. 208
2 DESCRIPTION DE LA SIGNATURE CHIMIQUE DE DEUX « CLIMATS DE BOURGOGNE » 227
3 CONCLUSION GÉNÉRALE DU CHAPITRE 4 254
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 255
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 261

Résumé

L'objectif premier de ce travail de thèse était de développer des analyses métabolomiques non ciblées de vins en bouteilles afin de déchiffrer les informations chimiques relatives à l'évolution de leurs compositions avec le temps. Cette recherche initiale était fondée sur l'hypothèse que, lors de l'analyse, les vins en bouteilles gardent une mémoire chimique des paramètres environnementaux à l'œuvre au moment de leur élaboration (gestion du vignoble, pratiques œnologiques, climat, terroir). Une seconde hypothèse reposait sur la nécessité d'étudier le passé pour anticiper l'évolution de la qualité du vin du point de vue de sa composition chimique.

À cet effet et pour la première fois dans la science du vin, la Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions et à Transformée de Fourier (FTICR-MS), la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (UPLC-Q-TOF-MS), la spectroscopie de Fluorescence d'Excitation et d'Émission (EEMF) et les statistiques multivariées ont été combinées. Le développement méthodologique a révélé l'avantage de coupler les mesures de masses exactes par FTICR-MS à la discrimination des isomères par UPLC-Q-TOF-MS afin d'étendre la gamme des métabolites détectables. Ces outils ont été appliqués à l'identification de marqueurs de vieillissement sur des séries verticales de vins rouges et blancs de Bourgogne, y compris sur des vins très anciens (millésimes inconnus) considérés comme des points extrêmes d'évolution, introduisant ainsi la notion de verticalomics. La caractérisation d'une série de vins blancs de Bourgogne (Chardonnay) a révélé que les espaces chimiques spécifiquement liés à des pratiques œnologiques (SO_2 ajouté lors du pressurage, niveau de débourbage ou perméabilité du bouchon) pourraient être déchiffrés, bien que les signatures de millésimes étaient les plus significatives. Des expériences similaires sur les vins de Champagne (Chardonnay, et mélanges de Chardonnay, Pinot noir et Pinot Meunier) après la prise de mousse et le vieillissement sur lattes ont mis en évidence l'effet d'hormesis associé à l'oxygénation du vin. Enfin, les analyses non ciblées d'extraits de raisin et des vins correspondants provenant de différentes appellations et élaborés par le même vigneron ont révélé qu'il était possible de lire des signatures liées au terroir, en particulier après quelques années de vieillissement en bouteille. Plus largement, nos résultats fournissent une description globale sans précédent de la composition chimique du vin et de sa modification par le vieillissement.

Mots clés: Chardonnay, Pinot noir, Pinot meunier, vin, vieillissement, oxydation, métabolomique, FTICR-MS et UPLC-Q-ToF-MS, EEMF.

Abstract

The main objective of this work was to develop non-targeted metabolomics analyses of bottled wines in order to decipher chemical informations from the time-related evolution of their composition. This original research was based on the hypothesis that, when analyzed, bottled wines would still hold chemical memories of envionmental parameters (vineyard management, oenological practices, climate, terroir…) at the moment of their elaboration, even after several years of ageing. A second hypothesis was that in order to anticipate the future evolution of the wine quality in terms of chemical composition, it is necessary to know what it was in the past.

To that purpose, and for the first time in wine science, Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – Mass Spectrometry (FTICR-MS), Liquid Chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-Q-ToF-MS), Excitation Emission Matrix Fluorescence (EEMF) and multivariate statistics were used in combination. Methodological develoments revealed the advantage of coupling exact mass measurements by FTICR-MS to isomeric discrimination by UPLC-Q-ToF-MS in order to extend the range of detectable metabolites. Such tools were applied to the identification of ageing markers in vertical series of red and white wines from Burgundy, including very old wines (unknown vintages) considered as evolution end points, thus introducing the concept of verticalomics. The characterization of series of white wines from Burgundy (Chardonnay) revealed that chemical spaces specifically related to eonological practices (SO2 addition at pressing, settling level, and permeability of the stopper) could indeed be deciphered although the vintage signatures were confirmed to be the most significant. Similar experiments on Champagne wines (Chardonnay, and blends of Chardonnay, Pinot noir and Pinot Meunier) after the "prise de mousse" and the ageing "sur lattes" further highlighted the hormesis effect associated with the oxygenation of wine. Finally, non-targeted analyses of series of grape extracts and corresponding wines from different appelations – though elaborated by the same winemaker – revealed that terroir-related signatures could be indeed read in wines, in particular after a few years of bottle ageing. Altogether our results provide an unprecedented comprehensive description of the chemical composition of wine and its modification through ageing.

Key words: Chardonnay, Pinot noir, Pinot meunier, wine, ageing, oxidation, metabolomics, FTICR-MS, UPLC-Q-ToF-MS, EEMF.

Liste des travaux

1 Articles publiés

- Roullier-Gall C, Boutegrabet L, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P (2014) A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. Food Chemistry 152: 100–107. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.11.056.

- Roullier-Gall C, Lucio M, Noret L, Schmitt-Kopplin P and Gougeon R. D. (2014). How Subtle Is the "Terroir" Effect? Chemistry-Related Signatures of Two "Climats de Bourgogne." *PLoS ONE* 9, e97615. DOI:10.1371/journal.pone.0097615.

- Roullier-Gall C, Witting M, Gougeon R and Schmitt-Kopplin P. Application of Ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry to metabolic profiling and identification in wine. Frontiers in Food Chemistry. DOI: 10.3389/fchem.2014.00102

- Gougeon R, Roullier-Gall C and Schmitt-Kopplin P (2014). Le rôle de la cave dans l'élaboration du vin. Rencontres du Clos-Vougeot 2013 "De la cave au vin: une fructueuse alliance".

- Assifaoui A, Huault L, Maissiat C, Roullier-Gall C, Jeandet P, Hirschinger J, Raya J, Jaber M, Lambert J.F, Cayot P, Gougeon R and Loupiac C. Structural studies of adsorbed protein (Betalactoglobulin) on natural clay (Montmorillonite). RSC Advances. DOI: 10.1039/C4RA11607K

- Roullier-Gall C, Witting M, Ruf A, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P. Combined non-targeted analytical methodologies: one step further for wine metabolomics. Tetrahedron. DOI: 10.1016/ j.tet.2015.02.054

2 Articles Acceptés

- Roullier-Gall C, Witting M, Tziotis D, Ruf A, Lucio M, Schmitt-Kopplin P and Gougeon RD. Combined non-targeted analytical methodologies for the characterization of the chemical evolution of bottled wines. ASC Books.

3 Articles soumis

- Philippe Jeandet, Silke Heinzmann, Chloé Roullier Gall, Clara Cilindre, Alissa Aron, Marie-Alice Deville, Franco Moritz, Thomas Karbowiak, Dominique Demarville, Cyril Brun, Fabienne Moreau, Bernhard Michalke, Gerard Liger-Belair, Michael Witting, Marianna Lucio, Damien Steyer, Regis D. Gougeon, and Philippe Schmitt-Kopplin. Chemical messages in 170-year-old champagne bottles from the Baltic Sea: Revealing tastes from the past. PNAS.

- Christian Coelho, Alissa Aron, Chloé Roullier-Gall, Michael Gonsior, Philippe Schmitt-Kopplin and Régis D. Gougeon. Fluorescence fingerprinting of bottled wines can reveal memories of sulfur dioside treatements of the must. Analytical Chemistry.

4 Articles en préparation

- Roullier-Gall C, Witting M, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P. Verticalomics: non targeted metabolomics of vertical series of wines.

- Roullier-Gall C, Witting M, Moritz F, Schmitt-Kopplin P and Gougeon RD. Natural oxygenation of Champagne wine during the *prise de mousse*: a dose-response.

- Roullier-Gall C, Garcia JP, Schmitt-Kopplin P and Gougeon RD. Wine metabolomics reveals chemical messages from an ancient buried bottle.

5 Présentations orales et posters

- Roullier-Gall C, Witting M, Heinzmann S, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P. Combined non-targeted analytical methodologies: one step further for wine metabolomics. In Vino Analytical Scientia 2013 Reims, France. (Oral)

- Roullier-Gall C, Witting M, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P. Metabolomics characterization of the chemical evolution of bottled wines. Wine Active Compounds (WAC) 2014, Beaune, France. (Poster)

- Roullier-Gall C, Marianna L, Schmitt-Kopplin P and Gougeon RD. How subtle can be the "terroir"? Chemistry-related signatures of four "Climats de Bourgogne". Wine Active Compounds (WAC) 2014, Beaune, France. (Poster)

- Roullier-Gall C, Witting M, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P. Non targeted metabolomics for understanding wine aging. FJC 2014, Besançon, France. (Oral) Prix de la meilleure présentation.

- Roullier-Gall C, Lucio M, Noret L, Schmitt-Kopplin P, and Gougeon RD. From the “climats de Bourgogne” to the terroir in bottles. Terroir Congress Tokaj 2014, Hungary. (Oral) Prix de la meilleure présentation.

- Roullier-Gall C, Witting M, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P. Metabolomics characterization of the chemistry of vintage Burgundy wines using MS techniques. Macrowine 2014, Stellenbosch, Afrique du Sud. (Oral)

Liste des abréviations

LC	Liquid Chromatography
GC	Gaz Chromatography
UPLC	Ultrahigh performance liquid chromatography
MeOH	Methanol
ACN	Acetonitrile
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and genomes
HMDB	Human Metabolome DataBase
Da	Dalton
ppm	Parts per million
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
PCA	Principal component analysis
PLS-DA	Partial least squares-Discriminant Analysis
FTICR-MS	Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass spectrometry
UHR-ToF-MS	Ultrahigh Resolution Time of Flight Mass Spectreometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
MS^2	Tandem Mass Spectrometry
ESI	Electro Spray Ionisation
MassTRIX	MassTranslator Into Pathways
m/z	Mass/Charge
S/N	Signal to Noise

Liste des tableaux

Table 1: Composition du vin (5) 27
Table 2: Concentration des composés soufrés volatils dans des échantillons de vins blancs commerciaux (Pinot gris, pinot blanc et chardonnay) (54) ……..……30
Table 3: Composition moyenne d'esters en µg/L pour différents vins rouges et blancs (177). 45
Table 4: Composition moyenne d'un vin en principaux acides et alcools en g/L (5). 45
Table 5: liste des réactifs et solvants utilisés. 60
Table 6: Tableau résumant les vins de champagne, leurs cépages, les millésimes étudiés et la perméabilité de la capsule. 62
Table 7: Tableau résumant les séries verticales de vins, leurs origines et les millésimes étudiées. 63

Liste des figures

Figure 1: Schéma d'une baie de raisin 26
Figure 2: Schémas illustrant les procédés de vinification en Bourgogne incluant la vinification des vins rouge d'une part et la vinification des vins blancs d'autre part. 28
Figure 3: Gènes, transcrits, protéines et métabolites agissent ensemble dans un réseau complexe pour construire la vie. Bien que le nombre de gènes, de transcrits et de protéines soient plus nombreux que celui des métabolites ceux-ci sont bien plus divers chimiquement. Adapté à partir de (103). 34
Figure 4: Principe de l'UPLC-Q-ToF-MS. (A) photo de l'équipement, (B) principe de la spectrométrie de masse Q-ToF 36
Figure 5 : Principes de la FTICR-MS (A) photo de l'instrument, (B) Illustration du système de détection du signal temporel et de sa transformation en signal fréquentiel. 38
Figure 6: (A) Carte de fluorescence correspondant à un échantillon de vin rouge indiquant les propriétés fluorescentes de fluorophores typiques du vin tel que l'acide cinnamique, ou le flavan-3-ol (144) (B) Représentation 2D des scores (Composante 1 et 4) en fonction du cépage merlot ou cabernet sauvignon (143). 39
Figure 7: (A) Ion hydrogénosulfite, (B) acide ascorbique et (C) glutathion. 49
Figure 8 : Réaction entre l'ion hydrogénosulfite, le peroxyde d'hydrogène et une o-quinone suite à l'oxydation du catéchol (202, 208) 49
Figure 9: (A) Glutathion réduit, (B) formation d'un disulfure par oxydation de deux molécules de glutathion, (C) formation du GRP (Grape Reaction Product) par interaction du glutathion avec la quinone de l'acide caftarique. 51
Figure 10: Paramètres du vin de la série verticale de 50 ans : (a) Concentration en alcool % EtOH; (b) pH; (c) acidité titrable en g/L d'équivalent d'acide tartarique; (d) acidité volatile (VA) en g/L (230). . 53
Figure 11: Schéma de synthèse résumant les différents niveaux d'impact des facteurs environnementaux sur la composition finale d'un vin : biodiversité du matériel végétal, pratiques culturales et œnologiques, conditions de vieillissement. 55
Figure 12: Communautés bactériennes issues de moûts de raisins provenant de différentes régions. (A) dendrogramme comparant les communautés bactériennes des moûts de Chardonnay à travers la Californie. (B) ACP des communautés bactériennes dans les moûts de Chardonnay de toute la Californie. (C) Analyse canonique discriminante comparant les moûts de Chardonnay de Napa, Sonoma, et Central Coast. (D) Diagramme comparant tous les moûts de Chardonnay classés par région de production (254). 57
Figure 13: Localisation des applellations considérées pour les séries verticales. 64
Figure 14: Photo des bouteilles de la série verticale de Corton Charlemagne. 65
Figure 15: Photo des bouteilles de la série verticale de Meursault Clos de la Barre. 66
Figure 16: Photo d'une bouteille de la série verticale Chablis, La Forest et de la cave du domaine Dauvissat. 66
Figure 17: Photos illustrant d'une part la vieille bouteille SV1, l'échantillonnage, le bouchon et la bouteille RSV 1915, la vieille bouteille SV2 ainsi que son bouchon. 67
Figure 18: Compilation de photos illustrant l'échantillonnage sous argon dans une boîte à gants gonflable, une boîte à gants rigide et enfin les échantillons en cours de remplissage lors des prélèvements. 68

Figure 19: Schéma illustrant les différentes étapes nécessaires à l'extraction des pellicules lors de l'échantillonnage des raisins. 69
Figure 20: Chromatogramme des composés phénoliques standards séparés par UPLC avec détection à 280 nm. 70
Figure 21: Schéma résumant l'analyse métabolomique pour chaque étude. Après la préparation d'échantillons, les mesures (FTICR-MS et LC-MS) et les processus de calibration commencent. Les spectres sont ensuite alignés et intégrés dans des matrices. La phase de pré-traitement des données est suivie par l'analyse statistique. Une liste de biomarqueurs possible est extraite et représentée graphiquement (van Krevelen). La composition de ces biomarqueurs est exposée par l'interrogation de bases de données et l'analyse des voies métabolomiques. La vérification de l'annotation des biomarqueurs est alors réalisée à l'aide d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS^2) permettant l'identification de la structure. 71
Figure 22: Visualisation de la très haute résolution de la FTICR-MS aux masses 219,05087 et 453,05556 permettant de constater la baisse de résolution avec les hautes masses. 73
Figure 23: Comparaison de la résolution (R) et de l'erreur de calcul de la masse (error) pour deux pics de masses m/z 227,07136 et 227,12887, permettant de constater la différence de résolution entre RP-UPLC-MS (en bleu) et FTICR-MS (en gris). 74
Figure 24: Spectromètre de Fluorescence Aqualog et spectre EEMF pour un vin blanc de cépage chardonnay et de millésime 2010. 75
Figure 25 : Spectre EEMF typique d'un vin blanc de Bourgogne et composantes PARAFAC (C1, C2, C3 et C4) déterminées pour l'ensemble des vins blancs de Bourgogne analysés. 76
Figure 26: Interface du logiciel Netcalc, et exemple de réseau obtenu à partir de l'utilisation du logiciel netcalc (259). 77
Figure 27: Exemple de diagrammes de van Krevelen montrant le positionnement du glucose et de la malvidine (gauche), et plus généralement de différentes familles moléculaires (droite). 78
Figure 28: Représentation schématique de l'alignement des spectres de masses. A, B et C représentent les spectres de masses. L'ampleur de la fenêtre de regroupement des masses par similarité est basée sur la moyenne des masses et est déterminée en avance, sur une gamme allant de 1 ppm en FTICR-MS jusqu'à 3 ppm pour la LC-MS. D'après la thèse de Marianna Lucio (260). 79
Figure 29: Exemple de validation. Données FTICR-MS issues d'une étude sur des vins provenant de trois domaines différents. (A) valeur de Q2 et de R2X pour les trois composantes C1, C2 et C3. (B) Un test de permutation aléatoire (200 permutations) a été appliqué pour évaluer la robustesse du modèle PLS. 80
Figure 30: Exemple de dendrogramme avec la carte d'intensité correspondante séparant trois groups d'échantillons (A, B et C). Données FTICR-MS issues d'une étude sur des échantillons provenant de trois catégories : vin, extrait de pellicule et pulpe. 81
Figure 31: Illustration des principes de l'ACP, du cluster hiérarchique et de la PLS (258) : (A) L'ACP projette les données multivariées selon les composantes qui possèdent la variance maximum. (B) Le cluster hiérarchique classe les objets par mesure de la similarité. (C) La PLS est basée sur la combinaison linéaire des variables X et utilise les informations de Y pour ajuster le modèle (258, 262, 263). 81
Figure 32: Processus d'utilisation de MassTRIX et KEGG pour les données métabolomiques. Les masses annotées par MassTRIX dans l'échantillon de vin et pour l'organisme *Vitis vinifera* sont cartographiées dans le réseau métabolique obtenu par KEGG. 83

Figure 33: Cluster hiérarchique de l'ensemble des vins blancs d'appellation Rully, montrant un regroupement privilégié des échantillons en fonction de leurs millésimes (2008 en noir, 2009 en rouge ou 2010 en bleu). 192
Figure 34: PLS-DA des échantillons de vins issus de FTICR-MS permettant la distinction des échantillons vieillis en ampoules en verre et de l'ensemble des autres échantillons (bouchage naturel, diams®, et nomacorc®) et ce indépendamment du millésime. Code couleur : en vert les vins vieillis en ampoules en verre, en noir les vins issus des bouchages naturel, diams® et nomacorc®. 193
Figure 35: Diagramme de van krevelen des masses spécifiques discriminant les groupes de vins ayant vieilli avec bouchage naturel, diams® et nomacorc® (A), de ceux ayant vieilli en ampoules de verre (B). 194
Figure 36: Annotation dans les bases de données KEGG et lipidmap à l'aide de l'interface MassTRIX des masses spécifiques des groupes de vins ayant vieilli en ampoules (vert) de ceux ayant vieilli avec différents types d'obturateurs (noir). 194
Figure 37: PLS-DA pour chaque millésime, 2008, 2009 et 2010 des masses issues de l'analyse FTICR-MS en fonction du type d'obturateur (diams® en noir, nomacorc en bleu, naturel en rouge et ampoule en verre en vert). 195
Figure 38: PLS-DA des échantillons de vins en fonction de l'intensité du débourbage, 150 NTU (en marron clair) et 300 NTU (en marron foncé) indépendamment du millésime, du bouchage et de la présence de bentonite en vinification. 196
Figure 39: Score plot des PLS-DA (2006) et ACP (2007) des composés phénoliques des vins mesurés par UPLC. Code couleur : en gris 0 g/hL, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet et avec bouchons naturels en liège (N) les bouchons Diams® (D) et Nomacorc® (NC). 197
Figure 40: Analyses PLS-DA des données UPLC avec diagrammes des individus pour le millésime 2006 (A) et 2007 (B), montrant la séparation par taux de sulfitage (0 g/hL de SO_2 au pressurage en gris, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet). Les symboles correspondent au type d'obturateur : point = bouchons en liège, losange = Diam®, croix = Nomacorc®. Histogramme des variables (C) pour les deux millésimes; 2006 en bleu et 2007 en vert, montrant les composés ayant une concentration plus élevée en absence de sulfitage (valeurs positives) et ceux ayant une concentration plus élevée après sulfitage à 4 ou 8 g/hL (valeurs négatives). 198
Figure 41 : Comparaison des scores PARAFAC pour les vins de 2006 et 2007. Scores (%) de C1 versus C2. Taux de sulfitage est représenté par la couleur du marqueur (0 g/hL de SO_2 au pressurage en gris, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet) et le type d'obturateur par sa forme (bouchons naturels en liège sont indiqués par des points, Diam® par des losanges, et Nomacorc® par des croix). 199
Figure 42: PCA des masses identifiées par FTICR-MS pour les millésimes 2006 et 2007. Code couleur : en gris 0 g/hL, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet et avec bouchons naturels en liège (N) les bouchons Diams® (D) et Nomacorc® (NC). 200
Figure 43: (A) OPLS-DA des vins notés oxydés (en orange) en opposition aux vins notés comme étant « normaux » (en gris) lors de la dégustation analysés par FTICR-MS et (B) S-Plot dérivant de l´OPLS-DA permettant de mettre en évidence les masses responsables de la séparation entre les vins oxydés/non oxydés. 203
Figure 44: Spectre EEMF de deux vins d'âges très différents (A) 1934 et (B) 2010 de la série verticale de Corton Charlemagne. 204
Figure 45: Évolution des composantes C1 C2 C3 et C4 en fonction des millésimes pour la série verticale de Corton Charlemagne. Code couleur : Bleu composante C1, orange composante C2, vert

composante C3, violet composante C4 et rouge vins détectés comme oxydés lors de la dégustation. 204
Figure 46: Évolution du rapport des composantes C2 sur C4 en fonction des millésimes pour la série verticale de Corton Charlemagne. L'évolution du rapport C2/C4 présente deux tendances avec une rupture de pente au niveau des années 1980-1990. Code couleur : rose rapport des composantes C2/C4, rouge vins détectés comme oxydés lors de la dégustation, courbe bleu première tendance du rapport C2/C4 et coure verte deuxième tendance du rapport C2/C4. 205
Figure 47: (A) Diagramme de van Krevelen des masses suivant l'évolution du rapport C2/C4 (violet) ainsi que celles suivant la courbe de tendance A (bleu) et la courbe de tendance B (bleu) issus des données de FTICR-MS. (B) exemple de masses de la verticale de Corton Charlemagne suivant l'évolution du rapport C2/C4 en violet (m/z 259,02819), suivant la courbe A en vert (m/z 217,01763) et suivant la courbe B en bleu (m/z149,00919)..... 206

Liste des annexes

Annexe 1: Exemple de liste de masses utilisées pour la calibration des spectres FT-ICR-MS en mode d'ionisation négative. 279
Annexe 2: Série verticale, Corton-Charlemagne du Domaine Bouchard-père et fils. Dégustation en novembre 2012. 280
Annexe 3: Série verticale, Meursault Clos de la Barre du Domaine Comte Lafon. Dégustation en février 2013. 282
Annexe 4: Série verticale, Meursault, Domaine de la Velle. Dégustation en 2009. 283

« La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas « Eurêka » mais plutôt « tiens, c'est marrant… » »
Isaac Asimov

Introduction générale

Introduction générale

Selon le rapport de l'OIV (2012), le raisin représente l'un des fruits les plus cultivés du monde. *Vitis vinifera* L. représente la seule espèce du genre *Vitis* (1). Elle est reconnue comme l'espèce la plus importante et constitue la base de production du raisin de table, de cuve ainsi que celle destinée au séchage. Elle est cultivée sur une superficie de 7585 Mha avec une production de 692 MhL de raisin et 265 MhL de vin en 2011. Presque 70% de la production des raisins sont destinés à la vinification et environ 60% de la viticulture est concentrée en Europe (1). Cependant la production de vins issus d'Amérique, d'Australie, d'Afrique du Sud et de Nouvelle Zélande ne cesse de se développer. Dans ce contexte de globalisation du secteur viti-vinicole, il est primordial pour valoriser les vins français de miser sur leur qualité ainsi que sur leur appartenance culturelle à des terroirs reconnus.

Le vin, produit riche et complexe qui fait partie de notre culture, est avant tout un produit plaisir. En Bourgogne, cette notion de plaisir renvoie à l'histoire des pratiques de vinification qui, depuis des siècles, s'appuient sur la tradition, cependant régulièrement revisitée en bonne intelligence. Pourtant le vin n'a cessé d'évoluer : il n'y a rien de commun entre les premiers vins et ceux que nous consommons actuellement, de même qu'il y a autant de vins différents que d'occasions d'en boire. On peut naturellement s'interroger sur l'origine de ces différences, notamment en Bourgogne où la pratique de mono-encépagement est de mise (2), avec le pinot noir pour les vins rouges, et le Chardonnay pour les vins blancs.

À ce jour, l'archéologie nous montre que des vins existaient déjà il y a plus de 7500 ans. Des résidus de vins retrouvés à Hajji Firuz Tepe dans les Montagnes Zagros au nord de l'Iran proviennent du début du cinquième millénaire av. J.-C. (3). Des résidus de vin retrouvés en Géorgie dans des poteries datant de l'époque néolithique, suggèrent quant à eux que la production de vin a été dispersée dans cette région d'Europe centrale (3). La présence de résidus de vin est généralement identifiée par la présence d'acide tartrique, même si des procédures supplémentaires pour l'identification de résidus de raisin ainsi que de tanins sont en développement (4).

235 constituants du vin avaient déjà été isolés et identifiés en 1975 (5). Depuis, à l'aide de nouvelles techniques d'analyses telles que l'UPLC, l'électrophorèse capillaire, la

spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire (RMN), des milliers d'autres composés ont été identifiés et quantifiés (6–10). Cependant, les travaux les plus récents montrent que la majorité (de l'ordre de 90%) des molécules organiques présentes dans un vin reste non identifiée (10–12).

Une telle diversité moléculaire, toujours partiellement inconnue, justifie donc les interrogations quant à l'origine et la nature des processus qui transforment la baie de raisin en vin et leur rôle sur l'enrichissement de la diversité métabolomique. Il est important de noter que cette diversification de composition ne cessera d'augmenter lors du vieillissement du vin en bouteille. En effet, en plus des composés présents initialement dans la baie, on retrouve dans le vin ceux ajoutés ou transformés sous l'action des levures, de la fermentation alcoolique ou de la dégradation malolactique.

D'autre part, l'environnement module énormément la composition initiale du vin. Le terroir, incluant le climat, la géologie des sols, mais également les pratiques viti-vinicoles, les échanges avec l'oxygène au cours de l'élaboration du vin ou au cours de son vieillissement et bien sûr l'action humaine lors des différentes étapes de vinification sont des facteurs environnementaux déterminants de cette diversité de composition (13–16). Toutes ces étapes soigneusement agencées vont permettre au vin d'acquérir les clés nécessaires à sa stabilité et à son évolution harmonieuse vers un optimum sensoriel durant sa conservation en bouteille.

Les approches analytiques ciblées, utilisées pour l'étude de la composition du vin, sont principalement des techniques de séparation chromatographique en phase gazeuse (GC) (17–20) ou en phase liquide (LC) (21–25) couplées à des méthodes de détection telles que la spectrométrie UV, la fluorimétrie ou la spectrométrie de masse (25, 26). Cependant, au regard de la diversité chimique potentielle des vins, si ces approches ciblées ont apporté des informations précieuses, elles restent insuffisantes à ce jour et mettent en lumière la nécessité de développer des méthodes analytiques non ciblées permettant d'appréhender un système biologique complexe de manière plus holistique.

Parmi ces méthodes non ciblées et de par sa grande sélectivité, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permet l'analyse structurale simultanée de nombreux métabolites du vin, mais sa sensibilité est un frein à l'obtention d'informations fines sur les molécules actives présentes en faibles concentrations (27). A l'inverse, la grande sélectivité et sensibilité de la Spectrométrie de Masse à Résonnance Cyclotronique des Ions et à Transformée de Fourier (FTICR-MS) permet d'analyser directement un système biologique

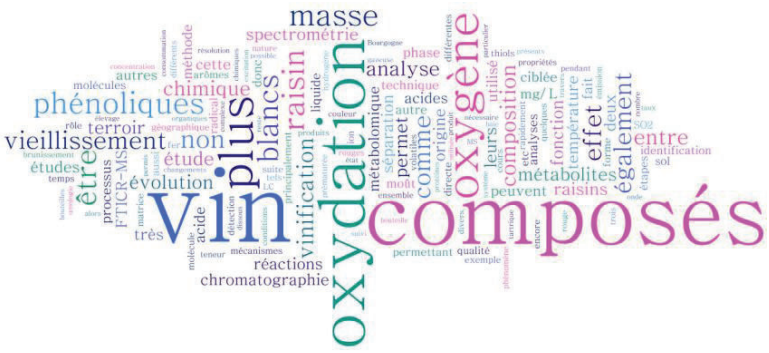
complexe et d'obtenir en une seule analyse une représentation d'un très grand nombre de métabolites ionisables dans une gamme de masse donnée (27–29). La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS) permet alors d'apporter une dimension supplémentaire au travers d'une sélection de molécules en fonction de leurs affinités pour une interface (30).

Le vin est un produit qui évolue avec le temps dans sa composition globale, sa couleur et bien entendu son goût. Chaque millésime possède son propre style en fonction des conditions environnementales. Certains ont des points communs, mais aucun ne se ressemble. Il est donc évident que pour étudier l'évolution de la complexité chimique au cours du vieillissement, l'idéal serait de choisir un millésime et d'en étudier le devenir au cours des années. Cependant dans le cadre d'un travail de thèse, le temps est une limite inéluctable et l'étude du phénomène sur les deux ou trois millésimes que traverse la thèse n'est pas satisfaisante. Pour s'affranchir de cette limite temporelle, nous avons décidé pour cette étude d'analyser des vins ayant vieilli en bouteille, en développant des approches combinées de méthodes d'analyses non ciblées dans le but de caractériser l'évolution de la complexité chimique du vin au cours de son vieillissement en bouteille.

L'hypothèse fondamentale sur laquelle reposait ce travail était qu'un vin conserve dans sa composition métabolique des signatures relatives à différentes conditions environnementales à l'œuvre au moment de son élaboration (pratiques viticoles ou œnologiques, climat…), et ce, même après plusieurs années de vieillissement en bouteille. Ainsi la démarche conceptuelle originale de ce travail pourrait être : « lire le passé du vin pour en comprendre le présent ».

Dans cette optique sont présentés ici, d'une part divers aspects – tous originaux – du développement méthodologique et d'autre part les applications de ces développements à l'analyse du vin. Pour se rapprocher des conditions réelles de vieillissement en bouteilles, l'analyse non ciblée de différentes séries verticales de vins de bourgogne (blanc et rouge) a été réalisée afin de suivre l'évolution des espaces chimiques de ces vins au cours d'une période allant de 1934 (pour la plus grande série) jusqu'à nos jours. Cependant, notre voyage temporel nous emmènera ponctuellement jusqu'au 19ème siècle à travers l'étude de vieux millésimes considérés ici comme des points ultimes du processus de vieillissement en bouteille. Notre démarche conceptuelle sera plus spécifiquement appliquée à l'étude de

l'oxydation des vins blancs de Bourgogne et de Champagne – en considérant peu de millésimes, mais avec différentes pratiques œnologiques, et à la lecture de signatures de terroirs dans des raisins et des vins issus de différentes appellations d'un même viticulteur.



Étude bibliographique

Étude bibliographique

1 De la baie de raisin au vin

De l'extérieur vers l'intérieur, la baie de raisin est constituée successivement de la pellicule (exocarpe), de la pulpe (mésocarpe) et de l'endocarpe entourant les pépins. Elle est reliée par le pédicelle à la rafle, partie ligneuse ramifiée supportant le grain (**Figure 1**). Le développement du raisin est divisé en trois phases principales selon des critères phénologiques, biochimiques et physiologiques: la fleur puis le développement herbacé ou végétatif (l´ovaire) de la fin du mois de mars jusqu'à la nouaison qui est la formation de la baie au début du mois de juin, puis la véraison qui commence début août et correspond aux changements de texture (amollissement) et de couleur (ambre pour les raisins blancs, violet foncé pour les noirs) et enfin la période de maturation (31). La maturation entraîne de profondes modifications qualitatives et quantitatives des constituants biochimiques et des paramètres physicochimiques de la baie (32).

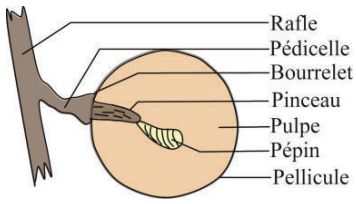


Figure 1: Schéma d'une baie de raisin

D'un point de vue chimique, le vin est un milieu hydro alcoolique acide composé de 750 à 900 g/L d'eau. Le vin n'est pourtant pas qu'une simple solution contenant de l'eau, de l'alcool, des acides organiques (etc...) (**Table 1**). La plupart des produits présents dans le vin sont liés à ceux que l'on retrouve dans le raisin, auxquels s'ajoutent ceux produits ou transformés par la fermentation sous l'action des levures et des bactéries lactiques (11, 29). Ainsi le vin contient en moyenne 87% d'eau, 12% d'alcool, 0,5% d'acides organiques et 0.5% d'autres composés qui font toute la différence (31, 33). La composition chimique d'un vin est le résultat d'interactions complexes entre des facteurs environnementaux, génétiques et des pratiques viticoles (34). Ainsi, une cascade de modifications de la composition en métabolites va conduire à ce que, à maturité, la baie de raisin contienne l'ensemble des molécules essentielles pour l'élaboration d'un vin, en particulier les sucres, les acides

organiques, les composés phénoliques et les précurseurs de composés aromatiques. Durant les étapes de la vinification (**Figure 2**), ces composés vont être soit transférés directement du raisin dans le vin, soit réagir pour donner naissance à de nouveaux composés qui vont enrichir la composition métabolique du vin. Cette composition chimique contient donc un grand nombre de petites molécules provenant de trois sources principales : les grappes de raisin, les souches levuriennes et bactériennes utilisées pour la fermentation ainsi que celles présentes à la surface du raisin au moment des vendanges et le contenant utilisé lors de la vinification et du stockage (35). Des milliers de composés sont donc potentiellement présents en quantités variables et transitoires dans un vin.

Table 1: Composition du vin (5)

Type de constituant	Constituant	Concentration (g/L)
Composés volatils	eau	750 - 900
	alcool éthylique	85 - 170
	alcools supérieurs	0,15 - 0,5
	ethanal	0,005 - 0,5
	esters	0,5 - 1,5
Composés non volatils	acide acétique	0,15 - 0,9
	glucides	0,8 - 1,8
	glycérol	5 - 12,0
	polysaccharides	0,5 - 1,5
	tannins et matières colorantes	0,4 - 4
	gommes et matières pectiques	1,0 - 3,0
Acides organiques	acide tartrique	5,0 - 10,0
	acide malique	0 - 1,0
	Acide lactique	0,2 - 1,2
	acide succinique	0,5 - 1,5
	acide citrique	0,12 - 0,88
Gaz dissous	CO_2	0,2 - 0,7
	SO_2 total	0,006
	SO_2 libre	0,002
Métaux	Fer	0,005 - 0,016
	Cuivre	0 - 0,001

Il existe deux grands types de vinification en Bourgogne associés aux deux cépages emblématiques de cette région : le Pinot noir et le Chardonnay. Ces deux procédés ont de nombreuses étapes communes auxquelles s'ajoutent quelques spécificités responsables des

différences entre vins blancs et rouges. Les principales étapes de ces deux modes de vinification sont rappelées dans la figure ci-dessous (**Figure 2**), qui montre que la différence fondamentale entre les deux procédés réside dans la sélection de la matière première à fermenter : les baies entières avec éventuellement les rafles pour la vinification en rouge, alors que seul le jus issu du pressurage des raisins à la vendange est fermenté dans le cas de vinification en blanc.

La vinification est suivie de l'élevage en fût ou en cuve. Dans le cas du fût, cette étape a pour objectif de faire évoluer les arômes du vin ainsi que de stabiliser sa couleur et complexifier sa structure par l'apport de tannins par exemple. De nombreux travaux ont montré en particulier l'impact de la chauffe du bois et/ou l'impact de l'âge du fût sur les transferts de matière entre le bois et le vin (36, 37) notamment sur le chardonnay (38).

Une des caractéristiques de l'élevage Bourguignon est liée à l'élevage traditionnel effectué sur lies. De fortes interactions entre les lies et les composés phénoliques permettraient notamment de stabiliser la couleur du vin rouge (39, 40). Il apparaît que la fraction macromoléculaire des vins, et tout particulièrement les polysaccharides, jouent un rôle prépondérant dans les propriétés organoleptiques et notamment dans la sapidité et dans les propriétés physico-chimiques telles que la filtrabilité (41, 42). Or à ce jour, nous ne connaissons que très peu de choses sur la composition polysaccharidique et oligosaccharidique des vins issus de Pinot noir ou de Chardonnay.

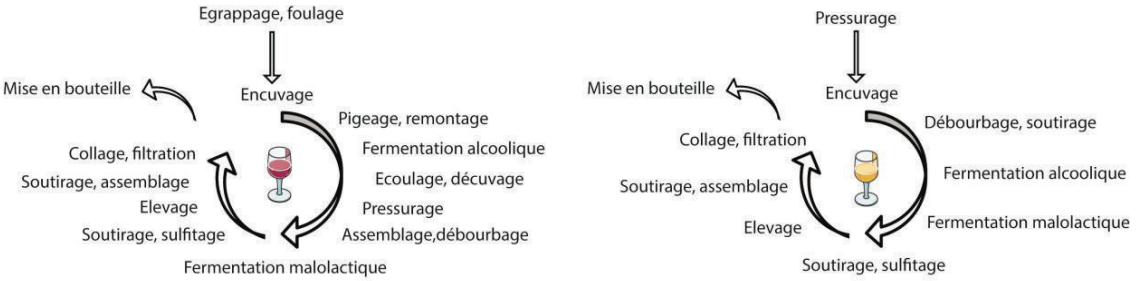


Figure 2: Schémas illustrant les procédés de vinification en Bourgogne incluant la vinification des vins rouge d'une part et la vinification des vins blancs d'autre part.

2 L'analyse du vin

En œnologie comme dans d'autres disciplines scientifiques, les méthodes analytiques utilisées peuvent être classées en deux catégories en fonction de la démarche conceptuelle développée. Lorsque la méthode vise à détecter, à caractériser et à quantifier des molécules

ou des familles de molécules spécifiques, nous parlerons d'une méthode ciblée. A l'inverse, lorsque la méthode permet de considérer le système d'étude dans toute la complexité de sa composition chimique sans nécessairement la réduire à une seule famille de composés, nous parlerons alors d'une méthode non ciblée. Ces deux catégories d'analyses sont complémentaires et donc nécessaires. Cette complémentarité se manifeste notamment par le fait que les approches non ciblées effectuant l'analyse simultanée d'un plus grand nombre de composés ne permettent que des analyses qualitatives ou semi-quantitatives.

2.1 Approche ciblée

Les outils analytiques ciblés, comprenant les techniques de séparation chromatographique en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (HPLC, UPLC) couplées aux méthodes de détection telles que la spectrophotométrie UV, la fluorimétrie ou la spectrométrie de masse, ont été de loin les plus utilisés et les plus appliqués dans le suivi de l'évolution et de la teneur en composés (composés phénoliques, composés volatiles, etc.) au cours des différentes étapes de l'élaboration du vin ou pour étudier et expliquer des mécanismes réactionnels. Dans le cadre de cette introduction bibliographique, nous ne nous attarderons pas sur la technique de GC permettant l'analyse des composés volatils qui ne sont pas l'objet de cette thèse.

2.1.1 Chromatographie gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse, apparue en 1952, est une technique qui permet de séparer les composés volatils d'une matrice complexe (43). Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Sur une colonne capillaire GC appropriée aux composés d'intérêt, plutôt à caractère hydrophobe, ces substances seront éluées avec un gaz inerte (azote, hélium). Les analyses en chromatographie gazeuse peuvent être couplées à divers détecteurs allant de la spectrométrie de masse (GC-MS) à l'olfactométrie (GCO). Le spectromètre de masse permet l'identification et la caractérisation des substances volatiles par fragmentation de chacune des molécules séparées en molécules ionisées suivis de leur détection en fonction de leur rapport masse sur charge (*m/z*) (44, 45). L'olfactomètre détermine la nature des odeurs perçues à l'aide d'un nez humain ou d'un nez artificiel (46).

La littérature fait apparaître que les premières études analysant les composés d'arôme dans le vin et le raisin utilisent la GC couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) (47, 48), qui est aussi utilisé dans le suivi de l'évolution des changements qualitatifs des arômes au cours du vieillissement (17). Différents détecteurs peuvent être couplés avec la GC, notamment le Détecteur par Photométrie de Flamme (FPD) spécifique des composés soufrés volatils, le Détecteur de Phosphore Azote (NPD) spécifique des composés contenant de l'azote ou du phosphore et enfin le détecteur à ionisation de flamme (FID) qui est utilisé plus généralement pour l'analyse des composés organiques.

L'étude des composés soufrés est primordiale pour une meilleure compréhension de la composition du vin puisque peu de choses sont connues à leur sujet dans le chardonnay alors qu'environ 10% des composés volatils détectés dans les boissons et plus généralement dans la nourriture sont des composés soufrés (49). Les composés soufrés se déclinent en cinq familles structurales, les thiols, les sulfures, les polysulfures, les thioesters et les composés hétérocycliques (49, 50). Cependant et de façon générale, ces composés sont classés en deux grandes familles, les composés soufrés légers et les composés soufrés lourds. Dans le premier cas, les composés soufrés sont rarement perceptibles dans le vin et possèdent un caractère organoleptique plutôt négatif, odeur de réduit, d'oignon ou d'œuf pourri pour le méthyl-mercaptan (CH_4S), l'éthyl-mercaptan (C_2H_6S) et l'hydrogène sulfuré (H_2S). Dans le second cas, les composés soufrés impactent le vin de façon plus ou moins agréable (arôme de fruit de la passion, notamment dû à la présence en faible quantité du 3-mercaptohexanol, du 4-mercapto-4-methylpentan 2-ol ou du 4-mercapto-4-methylpentan 2-one) et peuvent exalter les notes typiques de certains cépages comme pour le sauvignon (50–53).

Les composés soufrés se comportent différemment en fonction de la matrice du vin, cependant l'analyse de ces composés soufrés volatils par GC-FPD dans des vins blancs (Pinot gris, Pinot blanc et Chardonnay) provenant de Californie, du Canada et d'Oregon n'a pas permis de discriminer ces différents cépages (**Table 2**) (54).

Table 2: Concentration des composés soufrés volatils dans des échantillons de vins blancs commerciaux (Pinot gris, pinot blanc et chardonnay) (54).

Sulfur compound	Wine sample						
	Wine A Pinot Grigio from California	Wine B Pinot Grigio from Canada	Wine C Pinot Gris, from Oregon	Wine D Pinot Blanc from Oregon	Wine E Chardonnay from California	Wine F Chardonnay from California	Wine G Chardonnay From Oregon
H_2S (ppb)	4.60 ± 1.20	1.66 ± 0.49	7.89 ± 1.32	9.03 ± 1.60	1.45 ± 0.58	2.14 ± 0.43	3.59 ± 0.39
MeSH (ppb)	4.88 ± 0.37	1.09 ± 0.32	4.28 ± 0.77	2.94 ± 0.29	1.02 ± 0.40	0.48 ± 0.11	1.64 ± 0.14
EtSH (ppb)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DMS (ppb)	17.00 ± 1.03	35.37 ± 2.15	18.08 ± 0.84	12.05 ± 0.25	27.38 ± 1.13	52.60 ± 1.54	31.57 ± 1.20
DES (ppb)	nd	nd	nd	0.27 ± 0.05	nd	nd	nd
MeSOAc (ppb)	1.68 ± 0.11	0.32 ± 0.00	1.55 ± 0.29	3.50 ± 0.82	2.18 ± 0.10	1.42 ± 0.06	1.60 ± 0.06
EtSOAc (ppb)	0.17 ± 0.00	1.00 ± 0.19	20 ± 6	22 ± 6	0.51 ± 0.03	0.58 ± 0.04	11 ± 0
DMDS (ppt)	19 ± 1	70 ± 10	0.34 ± 0.02	0.64 ± 0.20	65 ± 7	24 ± 2	nd
DEDS (ppt)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DMTS (ppt)	18 ± 2	55 ± 6	nd	nd	111 ± 29	35 ± 6	11 ± 1
Methionol (ppm)	0.41 ± 0.14	0.22 ± 0.06	0.75 ± 0.02	0.83 ± 0.04	0.43 ± 0.11	0.47 ± 0.13	0.67 ± 0.10

nd: Not detected.

2.1.2 Chromatographie liquide

La chromatographie liquide est une technique de séparation qui permet l'identification ainsi que la purification des composés non volatils (55–57). Elle est basée sur l'affinité des composés pour une phase stationnaire (la colonne) et pour une phase mobile (l'éluant). Elle peut être couplée à différents types de détecteurs, UV, DAD, Fluorescence et MS. Les premières analyses en LC ont été effectuées il y a environ un siècle par le botaniste russe Tzvet qui a fait des tests de séparation de divers pigments végétaux (58), suivi par ceux de Synge et Martin qui ont introduit les débuts du concept de chromatographie liquide haute performance en suggérant que l'utilisation de petites particules et de hautes pressions pour la chromatographie liquide pourrait améliorer la séparation (59). Aujourd'hui, la LC a beaucoup progressé et est largement utilisée dans divers domaines comme méthode d'analyse chimique.

Plus récemment, la Chromatographie Liquide à Ultra-haute Pression (UPLC) est apparue comme une nouvelle technique d'analyse qui fait appel aux mêmes principes que l'HPLC dont elle constitue une amélioration sur différents points : résolution des pics, vitesse d'analyse (temps de séparation) et sensibilité. Elle a été rapidement appliquée dans l'identification des composés du raisin et du vin (12, 24, 60–62). En œnologie, la chromatographie liquide est notamment utilisée pour étudier la complexité et la diversité chimique des raisins et des vins à travers l'analyse de leurs composés après une éventuelle extraction et séparation (21, 63). Il y a encore peu de temps, la LC couplée à une détection UV, DAD (LC-UV, LC-DAD), ou fluorescence (LC-Fluo) représentait la méthode la plus appliquée dans l'analyse des composés du vin tels que le sotolon (25), les polyphénols (64–66) et notamment le resvératrol (67), les acides organiques (66), ou encore les produits

d'oxydation tels que l'acétaldéhyde, le glyceraldéhyde, l'acide pyruvique, l'acide 2-cetoglutarique et le formaldéhyde (68).

Toutes ces analyses par LC ont principalement été appliquées pour la détermination et le dosage de petites molécules (composés phénoliques, sucres, acides aminés, etc.) ou des macromolécules (peptides, protéines, polysaccharides) (6, 69–73). Les composés phénoliques sont sans aucun doute les métabolites secondaires non volatils les plus étudiés dans le vin en raison de leur rôle dans les propriétés organoleptiques et thérapeutiques des vins rouges (24, 62, 74–79), mais aussi pour leurs propriétés anti oxydantes qui peut contribuer à la protection des vins blancs, comme dans le cas des principaux acides phénoliques présent dans le chardonnay : l'acide caftarique et l'acide coutarique (80, 81).

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse (MS) est apparue comme une nouvelle méthode de détection utilisée en LC permettant d'augmenter significativement non seulement la sensibilité de la détection et donc de mesurer des composés présents en quantité infime (comme pour la recherche de composés allergènes, présents à l'état de trace (82)), mais également l'augmentation de la résolution permettant d'identifier des composés de structures inconnues. Le développement de techniques de LC-MS/MS permet, en plus de la détection de composés nouveaux, la caractérisation structurale de ces composés (83, 84). C'est pour l'étude de ces nouveaux composés que l'analyse non ciblée est primordiale puisqu'elle permet une grande résolution et une haute sensibilité afin d'identifier ces composés parfois concentrés mais dont on ne connait pas la structure.

2.2 Approche non ciblée

L'utilisation des outils classiques de chromatographie liquide et gazeuse couplés avec des détecteurs plus puissants permet de passer de l'analyse quantitative sur des métabolites ciblés et connus à l'exploration de la composition moléculaire inconnue du vin. Pour ce faire, l'utilisation de techniques couplant sélectivité et haute résolution telle que la LC-MS se développe. Cependant, dans l'optique d'une analyse non ciblée et donc non sélective, on peut ne garder que le détecteur, comme dans le cas de la FTICR-MS (technique de détection haute résolution sans séparation préalable et donc sans sélection). La Résonance magnétique

nucléaire vient parfaitement compléter ces deux techniques de spectrométrie de masse. Celle-ci ne sera que brièvement présentée ici puisqu'elle ne fait pas l'objet de notre étude.

Enfin l'analyse non ciblée passe également par des approches non sélectives telles que la fluorescence par matrice d'excitation et d'émission (EEMF), complémentaire des techniques de spectrométrie de masse de par son faible coût et sa facilité de mise en œuvre. Enfin l'analyse non ciblée renvoie vers des approches omiques et par conséquent vers le concept d'analyse métabolomique.

2.2.1 Métabolomique

La métabolomique est le plus récent descendant des technologies dites "omiques", incluant la génomique, la transcriptomique et la protéomique (**Figure 3**). Dans un système défini par sa composition en métabolites, l'identification de biomarqueurs ainsi que la quantification de l'ensemble des métabolites et la compréhension des changements de composition par des mécanismes et interactions biochimiques définissent la métabolomique (85–87). Cette idée a été introduite par Holmes, Lindon et Nicholson à la fin des années 1990 pour être rapidement développée par la suite (87).

La métabolomique est appliquée dans différents domaines, de la recherche fondamentale à la science médicale. D'un point de vue biologique, les informations vont du gène aux protéines qui sont ensuite dirigées en fonction de leurs fonctions cellulaires, vers le métabolisme (**Figure 3**). Comparé au génome, le métabolome est relativement petit, de quelques centaines de métabolites différents dans une bactérie simple à des dizaines de milliers dans les plantes. À ce jour, l'intégralité des métabolites et des voies métaboliques reste inconnue. Pourtant la métabolomique devient un outil de plus en plus performant pour l'étude et l'identification de biomarqueurs discriminants.

En 2001 Cooper et Marshall étaient les premiers à appliquer l'outil de l'analyse métabolomique au système vin (88). En 2008 Skogerson et ses collaborateurs ont introduit la notion de «oenomique» à l'analyse métabolomique dans le domaine œnologique (89). Depuis ce concept est largement utilisé pour l'analyse du vin et du raisin (10–12, 90–93). Pour couvrir la grande diversité chimique de l'ensemble des métabolites présent dans un échantillon, la métabolomique non ciblée nécessite des outils analytiques divers et

complémentaires. Cette stratégie complétée par des analyses statistiques multivariées permet notamment l'identification de marqueurs responsables de la discrimination de groupes d'échantillons (94). Les plateformes utilisées couramment en métabolomique sont la spectroscopie RMN, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et la spectrométrie de masse à injection directe à très haute résolution (30, 87, 95–102).

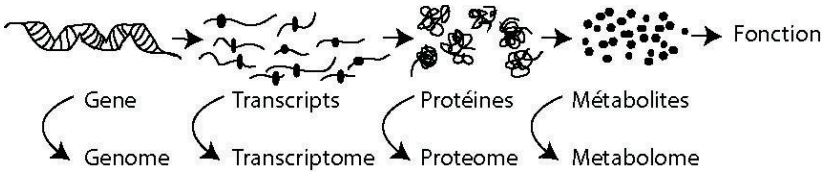


Figure 3: Gènes, transcrits, protéines et métabolites agissent ensemble dans un réseau complexe pour construire la vie. Bien que le nombre de gènes, de transcrits et de protéines soient plus nombreux que celui des métabolites ceux-ci sont bien plus divers chimiquement. Adapté à partir de (103).

2.2.2 La spectrométrie de masse

La description qualitative du métabolome peut être réalisée par la mesure de la masse exacte de chaque métabolite auquel est attribuée une composition élémentaire. En plus d'une description qualitative, la spectrométrie de masse apporte une mesure quantitative en mesurant l'abondance des ions de chaque masse. La spectrométrie de masse à haute résolution utilise différents types d'analyseurs qui se différencient par le principe de mesure du rapport *m/z* des ions (104). La FTICR-MS est basée sur la précession des ions en réponse à l'application d'un champ magnétique, le ToF-MS est basé sur la vitesse des ions qui parcourent une distance donnée et l'OrbiTrap est basé sur le mouvement périodique dans un champ magnétique ou électrodynamique.

Avant d'être analysé par spectrométrie de masse, le composé doit en premier lieu être ionisé et transféré de la phase liquide à une phase gazeuse. Cette étape est généralement effectuée par pulvérisation de l'échantillon à travers un capillaire métallique contourné par un flux d'air. Sur la base de ce principe, trois méthodes principales d'ionisation sont utilisées:

photo ionisation à pression Atmosphérique (APPI), ionisation chimique à pression Atmosphérique (APCI) et électro ionisation (ESI). Les bases de données internet, telles que Web of knowledge (www.webofknowledge.com) ou PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), compilant la littérature sur la métabolomique, montrent que 90% des publications utilisent l'ionisation par electrospray (ESI) contre 5.85% pour l'APCI et 1.8% pour l'APPI (30).

Les spectromètres de masse tels que le ToF-MS, l'Orbitrap et la FTICR-MS sont communément utilisés lors d'analyses métabolomiques et le détail de leurs qualités et défauts est présenté dans plusieurs études (30, 104). Ces techniques de spectrométrie de masse sont principalement caractérisées par leur pouvoir de résolution de masse, leur sensibilité et leur précision dans la mesure de masse. Le pouvoir de résolution est défini par la largeur maximale à mi-hauteur du pic maximal (voir partie Matériels et Méthodes). La précision de la mesure de masse est définie comme la différence entre les masses expérimentales et théoriques d'un composé.

Elle peut être calculée comme ($m_{mesurée} - m_{calculée}$) en Dalton (Da) ou par (($m_{mesurée} - m_{calculée}$)/ $m_{calculée}$) x 1000000 en ppm (voir partie Matériels et Méthodes).

2.2.2.1 Chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de masse (LC-MS)

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est largement utilisée en métabolomique. Les spectromètres de masse les plus fréquemment utilisés sont le spectre de masse à triple quadrupole (QQQ-MS), principalement pour les analyses ciblées, et le spectromètre de masse à quadrupole et temps de vol (Q-ToF-MS) pour les analyses non ciblées (**Figure 4**). La spectrométrie de masse Temps de vols (ToF) possède une haute résolution de masse et est suffisamment rapide pour permettre le couplage avec des techniques de séparation (**Figure 4**). La nouvelle génération d'instruments ToF offre des résolutions supérieures à 60000 et une précision de masse inférieure à 2 ppm (30). De plus en plus d'études non ciblées associent la séparation par chromatographie liquide à la détection par spectrométrie de masse, la détection par Q-ToF-MS est alors majoritairement utilisée (95, 105–107), couvrant de vastes domaines comme celui de la santé (30, 95, 108, 109), des plantes (110, 111) ou encore de l'œnologie (97, 112–115).

La séparation par chromatographie liquide permet de réduire au maximum la compétition des composés pour l'ionisation, ce qui permet une meilleure précision dans la quantification des métabolites par rapport à l'analyse par spectrométrie de masse en injection directe (28, 30, 116). En effet, même si elle prend plus de temps, la séparation chromatographique offre deux principaux avantages par rapport à l'injection directe : l'amélioration de la quantification des métabolites et la séparation des composés isomères (de même poids moléculaire) (30). Les problèmes majeurs dus à la séparation chromatographique sont notamment le possible chevauchement de pics et le décalage des temps de rétention. Pour pallier à ces problèmes, des logiciels sont disponibles, libres d'accès comme mzMine et metalign ou commerciaux comme Genedata Expressionist Refiner MS ou MarkerLynx (117–119). Tous ces logiciels fonctionnent de façon identique et produisent des matrices de données comprenant les noms d'échantillons, leurs identifications chromatographiques ainsi que l'aire et l'intensité maximum des pics qui seront utilisées pour des analyses statistiques multivariées.

Différents modes de séparation peuvent être employés. La chromatographie en phase inverse (RP) est la plus commune et permet la séparation des composés moyennement polaires à apolaires, tandis que la séparation des métabolites polaires est effectuée par la chromatographie HILIC (106, 120).

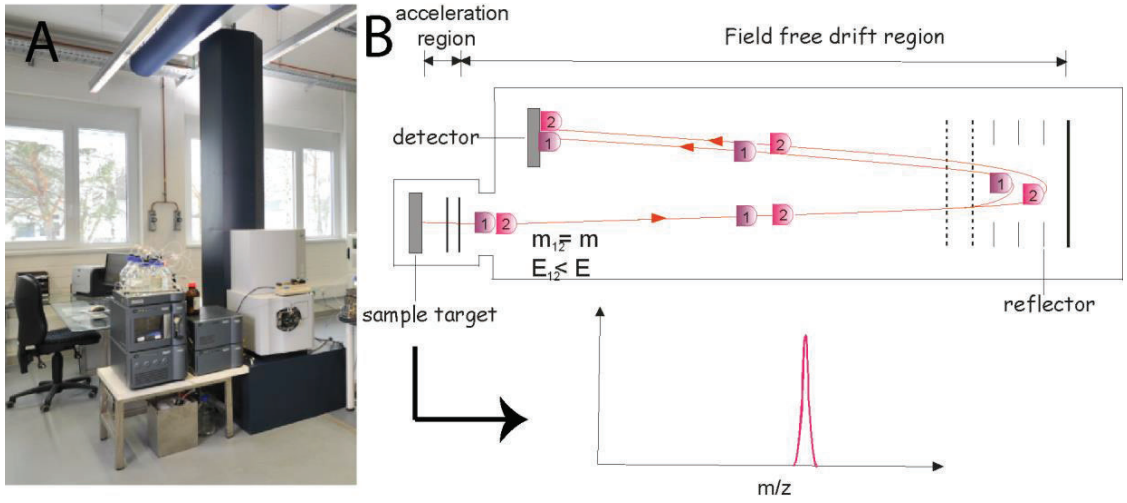


Figure 4: Principe de l'UPLC-Q-ToF-MS. (A) photo de l'équipement, (B) principe de la spectrométrie de masse Q-ToF.

2.2.2.2 Spectrométrie de masse à ultra haute résolution et à transformée de Fourier

La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier (FTICR-MS - **Figure 5**) offre une excellente résolution (supérieure à 1000000) et une précision de mesure de masse inférieure à 0.1 ppm lorsqu'elle est utilisée comme technique métabolomique (12, 28, 121). Cette technique permet l'annotation de métabolites potentiels et le calcul de formules élémentaires possibles en utilisant l'information donnée par la masse exacte. La FTICR-MS est une analyse de masse basée sur la précession des ions dans un champ magnétique homogène.

Après ionisation, les ions chargés positivement ou négativement sont transférés dans le champ magnétique d'un aimant supraconducteur où un courant électrique oscillant leur impose une trajectoire (**Figure 5**). Les masses sont ensuite résolues en fonction de leurs fréquences de rotation dans le champ magnétique. L'oscillation des ions est détectée par une paire de détecteur et le signal temporel induit par cette détection est la superposition de plusieurs fréquences associées aux ions de masses différentes. La transformation de Fourier est utilisée pour convertir ce signal temporel en signal fréquentiel : le spectre de masse (30, 102, 122). Pour bénéficier des avantages du pouvoir de résolution élevé ainsi que de la précision de masse, la FTICR-MS est généralement utilisée en injection directe sans séparation chromatographique ou électrophorétique préalable (122).

La première utilisation de la FTICR-MS comme méthode d'analyse non ciblée a été publiée en 2002 par Asaph Aharoni sur l'étude des changements à maturité de la fraise (123). Depuis cette étude, de nombreux travaux rapportent l'utilisation de la FTICR-MS pour l'étude métabolomique dans des domaines variés allant de la santé avec par exemple l'étude d'infections par Chlamydia pneumoniae, jusqu'aux matières organiques naturelles, en passant par le champagne ou encore par l'étude de météorites (12, 27, 29, 92, 121, 124–127).

La FTICR-MS est maintenant régulièrement utilisée pour l'analyse du raisin et du vin, ou encore de la vigne (11, 29, 92, 128, 129). À titre d'exemple, l'étude métabolomique de feuilles de vignes saines ou atteintes de mildiou a permis de distinguer les deux groupes d'échantillons par FTICR-MS (128). L'empreinte chimique du vin analysée par FTICR-MS a également permis de révéler non seulement l'origine géographique du bois de chêne dans

lequel le vin a été élevé mais également l'espèce de ces chênes, pédonculé ou sessile ayant servi à faire le fût (10, 130). D'autre part, la comparaison de la diversité chimique de vins de champagne après versement avec celle de l'aérosol formé au-dessus de celui-ci a montré qu'un grand nombre de masses se retrouvent concentrées dans l'aérosol illustrant ainsi le phénomène de partitionnement naturel associé au processus d'effervescence (92).

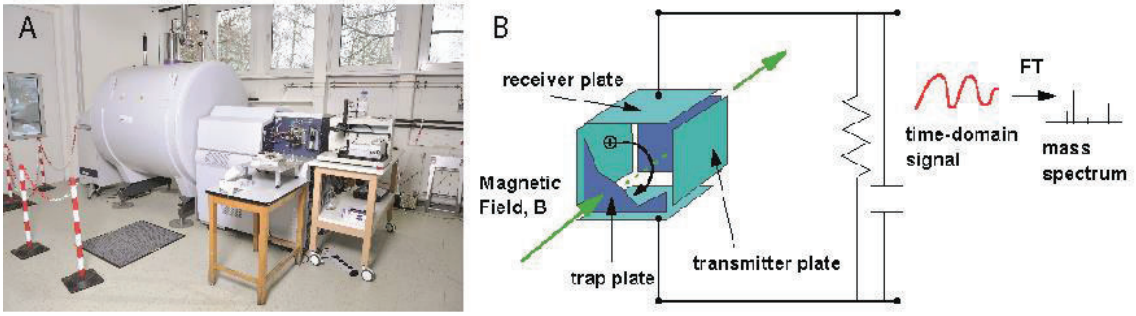


Figure 5 : Principes de la FTICR-MS (A) photo de l'instrument, (B) Illustration du système de détection du signal temporel et de sa transformation en signal fréquentiel.

2.2.3 Spectroscopie de Fluorescence

La spectrométrie de fluorescence en matrice d'excitation et d'émission (EEMF) est une technique analytique non ciblée, régulièrement utilisée notamment pour l'étude de matière organique naturelle (131–133), d'eaux douce (126, 134–136), des eaux de mer (137), des eaux potables (138) et des effluents (139). Cette méthode est particulièrement intéressante pour son coût abordable comparé aux techniques analytiques par spectrométrie de masse ou à la RMN et est également facile mettre en place, non destructive et rapide (138).

Le principe de la fluorescence repose sur la propriété de certaines molécules d'absorber de la lumière provoquant une émission de cette énergie absorbée sous forme de photon. La relation entre la longueur d'onde d'excitation (qui sera absorbée par la molécule) et la longueur d'onde d'émission dépend de l'identité de la molécule et de son environnement chimique précis, donc de la cohabitation des molécules et de la matrice de l'échantillon (140). Dans la spectroscopie de fluorescence EEMF, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont enregistrées simultanément afin de produire une matrice prenant en compte les spectres d'émission de chaque longueur d'onde d'excitation. La matrice obtenue a donc trois dimensions, la longueur d'onde d'excitation, la longueur d'onde d'émission et l'intensité de l'émission fluorescente (**Figure 6**A).

Depuis 2006, cette technique est également utilisée pour l'analyse de vin rouge ou de dérivés de vinification (141–146). Dans la littérature, les études d'EEMF sur le vin ont tendance à employer la spectroscopie de fluorescence de surface ("Front Face") pour analyser les vins rouges (142–144, 146). Par exemple en 2009, Airado-Rodriguez a utilisé la spectrométrie EEMF pour caractériser l'empreinte spécifique de 57 vins rouges de cépages différents (Merlot et Cabernet Sauvignon) provenant d'origines différentes (**Figure 6**B) (143). Deux ans plus tard cette même équipe affinait les résultats en discriminant des vins en fonction de leurs appellations pour des vins d'âges différents (144). Depuis une équipe de Nouvelle-Zélande a utilisé la spectrométrie de fluorescence pour identifier les facteurs contribuant à discriminer des vins rouges (Pinot noir) en fonction de leur origine de production (147). L'intégralité des analyses utilisant la spectrométrie EEMF a donc été réalisée sur des vins rouges, or celui-ci à une concentration plus importante de composés fluorescents, notamment associés aux composés phénoliques.

La EEMF est maintenant régulièrement utilisée en combinaison avec des analyses de FTICR-MS pour l'analyse de matieres organique (OM), que ce soit des matieres organiques naturels (NOM) ou de matieres organiques dissoue (DOM) (126, 134).

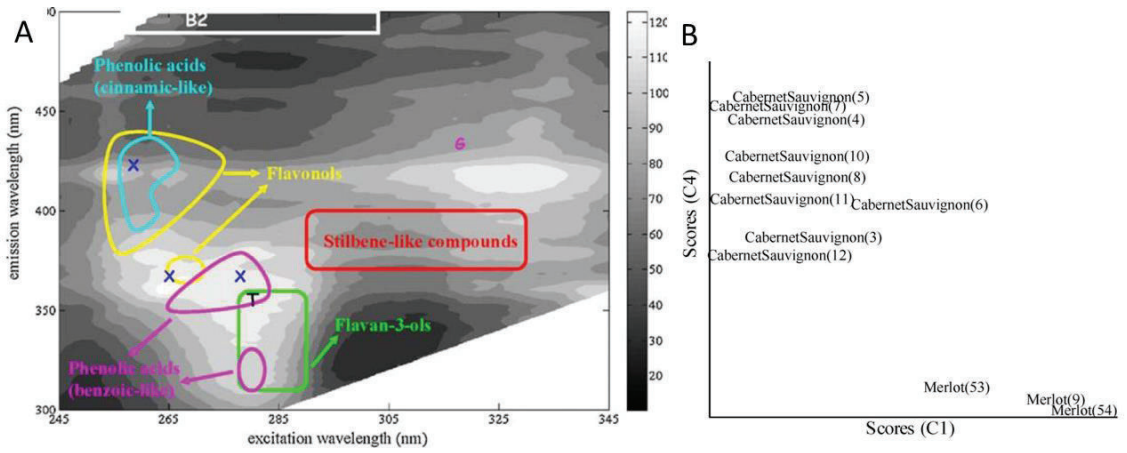


Figure 6: (A) Carte de fluorescence correspondant à un échantillon de vin rouge indiquant les propriétés fluorescentes de fluorophores typiques du vin tel que l'acide cinnamique, ou le flavan-3-ol (144) (B) Représentation 2D des scores (Composante 1 et 4) en fonction du cépage merlot ou cabernet sauvignon (143).

2.2.4 La résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie RMN, aussi bien en phase liquide qu'en phase solide, est d'une grande sélectivité dans l'analyse moléculaire et apporte des renseignements extrêmement intéressants sur la structure des molécules (148, 149). Son principe de fonctionnement est basé sur l'utilisation des propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique. Au même titre que la spectrométrie de masse, la RMN est une technique incontournable pour la caractérisation structurale de nouvelles molécules et a été déjà largement utilisée dans le domaine de l'œnologie pour la caractérisation, par exemple, des produits de condensation et de polymérisation des vins (malvidine 3,5-diglucoside/flavanol ou flavanol/flavanol) au cours du vieillissement (150).

Ce sont cependant les récents progrès technologiques avec l'apparition de spectromètres à très hauts champs équipés de sondes cryogéniques qui permettent d'utiliser la RMN comme outil d'analyse non ciblée des vins avec la perspective d'obtenir une signature de l'ensemble des molécules organiques présentes dans un échantillon. En réalité et à ce jour, la plupart des études mentionnées dans la littérature ont démontré que même en RMN du proton ^{1}H (100 % d'abondance isotopique naturelle), seuls les composés en concentrations relatives suffisamment élevées peuvent être potentiellement détectés (27, 151).

L'approche métabolomique par RMN permet de différencier les raisins ou les vins en fonction de leurs cépages (152, 153), leurs origines géographiques (153, 154) ou leurs années de production (151, 155). Elle a été notamment appliquée à l'étude de vins de cépage chardonnay, pour étudier l'impact de *Botrytis cinerea* sur la composition chimique du vin de base champenois (156). Ces études ont ainsi montré que la composition métabolomique des vins issus de raisins sains peut être clairement séparée de celle des vins issus de raisins infectés par ACP. Cette séparation semble être due à une concentration plus basse en glycérol, 2,3-butanediol, succinate, tyrosine, dérivés de valine et phénylpropanoides ainsi qu'à un niveau plus haut en oligosccharides provoquant un retard de la fermentation alcoolique (156).

3 Le vieillissement en bouteille

Après avoir fait l'état des lieux des approches méthodologiques de l'analyse du vin, il convient de s'intéresser au vieillissement en bouteille et notamment à celui du vin blanc. Selon Ribéreau-Gayon (31), le vieillissement en bouteille correspond à une évolution du vin

en état de réduction (contrairement à la théorie de Pasteur qui en 1866, pensait que le vieillissement du vin était de type oxydatif) dans lequel celui-ci doit être protégé de l'oxygène et progresse vers une qualité organoleptique supérieure à celle qu'il possédait au départ, résultat d'une chimie complexe dont on commence à pénétrer les secrets. En plus de la modification de la couleur (du rouge vif au rouge brique pour les vins rouges, de jaune pâle au doré pour les vins blancs secs), le vieillissement s'accompagne d'une augmentation de la complexité et de la finesse des arômes (diminution des arômes fruités et floraux comme le litchi, la framboise ou encore la pivoine et la vanille, vers des arômes de vieillissement tel que le miel, le café, la truffe, la violette, la cerise, l'amande ou encore le musc) (157–160). Le temps nécessaire à l'obtention de cet optimum varie beaucoup en fonction du type de vin, de quelques années à plusieurs dizaines années. Les «grands vins» sont généralement caractérisés par une très longue tenue au vieillissement, contrairement aux vins plus modestes qui ne doivent être conservés que peu de temps pour développer leur potentiel (31). La nature faisant bien les choses, chaque millésime est différent et on trouve ainsi des « petites » années où les vins sont à leur optimum jeunes et au contraire de « grandes » années où il faut avoir la sagesse d'attendre plus longtemps avant que le vin ne dévoile toute sa capacité. Trois phases d'évolution sont à distinguer au cours du vieillissement : la première phase correspond à la phase de maturation, suivie d'une phase de maturité ou d'épanouissement et enfin une troisième phase qui pourrait correspondre à une phase de déclin.

Nous nous attarderons successivement sur les conditions de conservation, sur les deux principaux mécanismes chimiques associés au vieillissement (estérification/hydrolyse et oxydation), sur le vieillissement simulé avec l'étude de la micro-oxygénation et enfin sur l'étude du vieillissement à l'aide de séries verticales de vins.

3.1 Conditions de conservation

Les conditions d'entreposage des bouteilles de vins jouent un rôle capital dans la qualité du vieillissement en raison de quatre éléments primordiaux : la température ambiante, l'hygrométrie, la lumière et les vibrations. Plusieurs vins de millésimes identiques et provenant d'un même viticulteur peuvent avoir des espérances de vie totalement différentes, variant aisément de plusieurs années à l'avantage de celui qui aura été stocké dans des conditions idéales de conservation (température constante comprise entre 10 et 12°C, hygrométrie oscillant entre 70 et 80%, absence totale de lumière et aucune vibration) (161).

Les conditions et la durée de conservation ont donc une influence considérable sur la qualité du vin. Pour évaluer l'effet global de la conservation, une étude à suivi la composition de 20 vins rouges, sur deux ans, conservés en cave (température comprise entre 15 et 17 °C, humidité relative de 70 %) ou dans une maison (température comprise entre 20 et 27 °C en fonction des saisons, humidité non contrôlée). Les analyses de la composition, réalisées par LC-MS montrent que le vin conservé dans la maison évolue plus rapidement, atteignant une composition similaire aux vins conservés en cave pendant 2 ans après seulement 6 mois (129). Les anthocyanes (cyanidine 3-glucoside, delphinidine 3-glucoside, malvidine 3-glucoside et peonidine 3-glucoside), les procyanidines B1, B3 et B4 ainsi que l'acide pantothenique ont été identifiés comme des marqueurs de la «condition cave» tandis que la malvidine 3-glucoside-4-vinylcatechol, la quercétine et le proanthocyanidine-bisuflide ont été identifiés comme des marqueurs de la conservation domestique (129).

Une fois encore, la majorité des études impliquant les conditions de conservation ont été réalisées sur des vins rouges. Or la température de conservation a un impact majeur sur la couleur, les composés phénoliques et les composés volatils des vins blancs. Une étude menée par Recamales (161) sur des vins blancs conservés en bouteilles et ayant subi des variations de températures a montré que la durée du vieillissement a un effet significatif sur les paramètres de couleur et la teneur totale en composés phénoliques (161). La modification de la teneur en composés phénoliques détectée lors du vieillissement a été mise en évidence par de nombreuses équipes (7, 8, 161–165) et se traduit notamment par un changement de couleur, pour les vins blancs du jaune pâle au jaune brun (161, 166–168). Il a également été noté que la perte en composés phénoliques était significativement plus élevée dans des vins soumis à des variations de température que dans le cas de vins stockés à une température constante pour la même durée de vieillissement (129, 161, 168). L'étude de la composition et du profil sensoriel de sauvignons blancs en fonction de leurs températures de conservation (5, 10 et 18 °C) montre qu'une température élevée accélère le taux d'hydrolyse des esters et par conséquent, les vins ont des concentrations inférieures en acétate d'esters et éthyle esters d'acides gras comparés aux vins gardés à des températures plus fraiches (5 et 10 °C) (169, 170). Enfin ces mêmes vins sont caractérisés par des arômes fruités et végétaux lorsqu'ils sont conservés aux températures les plus fraiches (5 et 10 °C) tandis que ceux à haute température de conservation (18 °C) ont des notes aromatiques dominantes de beurre, de bois, de fumé ou encore de silex (169, 170).

Le bouchage représente l'ultime intervention du vinificateur sur le vin. Au-delà, l'évolution de la qualité du produit embouteillé est supposée ne dépendre plus que des conditions de stockage et des performances de l'obturateur employé. En effet, le bouchon contribue aux échanges existant entre le vin et son environnement. C'est pourquoi le choix de l'obturateur selon ses propriétés barrières est déterminant (171). Différentes études se sont penchées sur la perméabilité des obturateurs et l'impact de celles-ci sur les qualités organoleptiques et/ou les propriétés physico-chimiques des vins (171–174), dans l'optique d'une part de mesurer les propriétés barrières de ces obturateurs, et d'autre part d'évaluer le rôle éventuel de cette perméabilité dans les phénomènes d'oxydation prématurée des vins blancs. En effet, qu'il s'agisse de SO_2 (172) ou d'oxygène (173), ces études ont montré que des quantités non négligeables de gaz peuvent pénétrer dans la bouteille ou s'en échapper et ainsi provoquer une accélération du processus d'évolution du vin. Cependant, bien que de telles études suggèrent que ces transferts de matière au travers du bouchon pourraient expliquer une évolution prématurée des vins blancs, d'autres études récentes tendent à montrer que les quantités de matières mises en jeu – dans le cas du SO_2 par exemple – ne seraient pas suffisantes pour être à elles seules responsables de ce défaut d'évolution (171). Le mécanisme de diffusion de l'oxygène à travers le bouchon reste partiellement inexpliqué, mais il se pourrait que l'oxygène initial contenu dans le bouchon se diffuse dans le vin suivi par une diffusion de l'oxygène atmosphérique (175).

Enfin, la qualité du vieillissement pourrait également être liée au volume du contenant. En effet, même si très peu d'études se sont intéressées à l'impact du volume de la bouteille sur l'évolution du vin contenu, l'étude des pertes de CO_2 à travers le bouchon lors du vieillissement du champagne dans trois différents formats de bouteilles (demi-bouteille (37.5cl), bouteille standard (75cl) et magnum (150cl)) montre que plus le volume du contenu est important, plus les pertes de CO_2 dissous à travers le bouchon de liège sont faibles (176). Il est en effet bien connu que les Champagnes et les vins mousseux vieillissent mieux en magnum que dans des bouteilles plus petites (176). Aucune étude similaire n'a été réalisée sur des vins Bourguignons, cependant on peut facilement s'imaginer que de même que pour le Champagne, selon le volume de la bouteille, les processus chimiques responsables de l'évolution du vin seraient plus ou moins ralentis.

3.2 Les phénomènes d'hydrolyse et d'estérification

Deux cas illustrant les connaissances récentes des mécanismes chimiques lors du vieillissement en bouteille sont présentés ici au travers de l'étude des phénomènes d'hydrolyse et d'estérifications. L'estérification permet d'obtenir à partir d'un acide et d'un alcool, un ester, la réaction inverse (hydrolyse) se produisant simultanément. Les phénomènes d'estérification et d'hydrolyse sont des réactions lentes et limitées par leur réaction inverse. On constate expérimentalement au cours du vieillissement du vin que le pH, la température, et la composition du vin, notamment la présence d'une grande quantité d'alcool et d'acide, agissent comme des catalyseurs des réactions d'hydrolyse et d'estérification (169, 177, 178). La vitesse d'estérification est directement liée à la température du vin (169, 170).

Le vin contenant un grand nombre d'alcools et d'acides différents, le nombre d'esters possibles est par conséquent important, comme le montre le tableau présentant la concentration en principaux esters de différents vins rouge et blanc, incluant le Chardonnay (**Table 3**). Les principaux acides organiques présents dans le raisin (acide tartrique, malique, citrique ou succinique) (**Table 4**) permettent la formation d'esters au cours du vieillissement.

La concentration en éthyl ester d'acides ramifiés augmente significativement avec l'âge du vin et présente des profils similaires pour les vins rouges et blancs (**Table 3**), ce qui suggère une synthèse par estérification (177). Le manque évident d'hydrolyse des éthyl esters d'acides gras observé pendant le vieillissement tend à montrer que l'équilibre entre les acides et les alcools est atteint dès les premiers mois de vieillissement (177), comme dans le cas de l'éthyl butyrate (169). Enfin, la concentration en acétates d'alcool supérieurs diminue fortement avec le vieillissement du vin blanc, reflétant un taux important d'hydrolyse (177). Ces résultats permettent de considérer que l'hydrolyse d'esters d'origine biologique et l'estérification chimique modifient la nature et la quantité des esters par des phénomènes complexes difficiles à quantifier (177).

Table 3: Composition moyenne d'esters en µg/L pour différents vins rouges et blancs (177).

Compound	Young red (n = 22)	Aged red (n = 61)	Beaujolais Nouveau (n = 19)	Young dry white (n = 31)	Aged dry white (n = 22)	Sweet white (n = 11)	Rosé (n = 17)	Total red (n = 83)	Total dry white (n = 53)
Ethyl esters of straight-chain fatty acids									
Ethyl butyrate	177 ± 42 b	147 ± 32 b	367 ± 95 a	347 ± 118 a	310 ± 75 a	193 ± 72 b	301 ± 45 a	157 ± 37 β	331 ± 103 α
Ethyl hexanoate	387 ± 94 d	326 ± 72 d	793 ± 158 b	1046 ± 280 a	1099 ± 235 a	517 ± 189 c	1064 ± 135 a	347 ± 83 β	1068 ± 261 α
Ethyl octanoate	479 ± 106 c	365 ± 95 d	1001 ± 221 b	1516 ± 433 a	1420 ± 265 a	930 ± 321 b	1352 ± 192 a	400 ± 110 β	1476 ± 372 α
Ethyl decanoate	108 ± 45 c	52.9 ± 33 d	364 ± 120 b	491 ± 177 a	387 ± 146 b	327 ± 166 b	359 ± 141 b	69.5 ± 44 β	448 ± 171 α
Ethyl dodecanoate	2.88 ± 3.06 d	0.59 ± 0.7 e	13.3 ± 10.3 ab	18.8 ± 16.8 a	5.84 ± 5.01 c	7.93 ± 10.6 bc	10.8 ± 11.8 ab	1.25 ± 1.95 β	13.4 ± 14.6 α
Higher alcohol acetates									
Propyl acetate	11.3 ± 4 d	13.7 ± 5.9 cd	78.7 ± 46 a	44.9 ± 34 b	15.6 ± 6.9 c	30.6 ± 14 b	16.6 ± 10.1 c	13.3 ± 5.6 β	32.7 ± 29 α
Isobutyl acetate	62.7 ± 21.2 b	59.9 ± 26.5 b	126.4 ± 64 a	55 ± 29.2 b	22.7 ± 13.7 c	50.6 ± 18.9 b	21.9 ± 11.2 c	60.5 ± 25.1 α	41.6 ± 28.7 β
Butyl acetate	0.5 ± 0.4 b	0.2 ± 0.4 b	2.4 ± 2.3 a	2.3 ± 2 a	0.6 ± 0.3 b	0.7 ± 0.2 b	0.5 ± 0.4 b	0.3 ± 0.4 β	1.6 ± 1.8 α
Isoamyl acetate	507 ± 142 c	324 ± 98 d	3190 ± 1788 a	2235 ± 1423 a	406 ± 295 cd	439 ± 422 c	1198 ± 950 b	378 ± 137 β	1476 ± 1425 α
Hexyl acetate	2.25 ± 2.26 d	1.55 ± 0.73 e	22.7 ± 15 c	251 ± 212 a	21.6 ± 20.6 c	11.1 ± 26 c	65.8 ± 64 b	1.74 ± 1.34 β	156 ± 198 α
Octyl acetate	0.02 ± 0.02 d	0.02 ± 0.02 d	0.73 ± 0.67 a	0.47 ± 0.49 a	0.06 ± 0.04 c	0.11 ± 0.16 b	0.16 ± 0.15 b	0.02 ± 0.02 β	0.3 ± 0.42 α
Phenylethyl acetate	57.5 ± 18.5 d	37.3 ± 16.3 e	311 ± 195 a	170 ± 105 b	29.7 ± 18.4 e	106 ± 182 c	133 ± 139 bc	43.4 ± 19.1 β	112 ± 107 α
Ethyl esters branched acids									
Ethyl isobutyrate	110 ± 43 c	221 ± 70 a	69 ± 48 d	43.5 ± 29 e	108 ± 45 c	156 ± 76 b	70.9 ± 40 d	192 ± 80 α	70.2 ± 48 β
Ethyl 2-methylbutyrate	20.0 ± 8.0 b	66.0 ± 32.2 a	12.1 ± 14.4 c	6.2 ± 4.5 d	18.9 ± 10.2 b	23.5 ± 15.2 b	12.4 ± 8.6 c	53.5 ± 34 α	11.4 ± 9.7 β
Ethyl isovalerate	36.1 ± 14.6 b	110 ± 49.6 a	20.2 ± 17 c	15.2 ± 12.3 c	39.8 ± 20.9 b	32.1 ± 23.4 b	32.0 ± 21.4 b	90.1 ± 54 α	25.4 ± 20.3 β
Ethyl phenylacetate	7.51 ± 2.02 b	18.3 ± 9.94 a	3.57 ± 2.90 c	2.20 ± 1.12 c	6.26 ± 4.46 b	14.5 ± 11.2 a	3.44 ± 2.6 c	15.3 ± 9.8 α	3.89 ± 3.58 β
Cinnamates									
Ethyl cinnamate	0.85 ± 0.38 c	1.10 ± 0.48 b	2.05 ± 1.45 a	0.26 ± 0.2 e	0.42 ± 0.35 d	0.82 ± 0.35 c	0.32 ± 0.13 de	1.03 ± 0.47 α	0.33 ± 0.29 β
Ethyl dihydrocinnamate	0.68 ± 0.19 b	0.81 ± 0.47 b	1.47 ± 0.42 a	0.35 ± 0.26 c	0.23 ± 0.15 d	0.63 ± 0.64 b	0.30 ± 0.19 cd	0.81 ± 0.41 α	0.3 ± 0.23 β
Methyl fatty acid esters									
Methyl butyrate	1.0 ± 0.4 a	0.7 ± 0.3 a	1.0 ± 0.5 a	0.8 ± 0.3 a	0.6 ± 0.3 a	0.6 ± 0.3 a	0.6 ± 0.2 a	0.8 ± 0.4 α	0.7 ± 0.3 α
Methyl hexanoate	1.59 ± 0.48 a	1.17 ± 0.28 b	1.63 ± 0.35 a	1.52 ± 0.49 ab	1.48 ± 0.56 ab	0.74 ± 0.26 c	1.29 ± 0.29 b	1.28 ± 0.39 α	1.5 ± 0.51 α
Methyl octanoate	1.61 ± 0.52 b	0.96 ± 0.32 c	2.23 ± 0.60 a	2.25 ± 0.79 a	2.10 ± 0.85 a	1.11 ± 0.58 c	1.59 ± 0.38 b	1.14 ± 0.48 β	2.19 ± 0.81 α
Methyl decanoate	0.28 ± 0.15 b	0.13 ± 0.08 c	0.69 ± 0.34 a	0.65 ± 0.33 a	0.45 ± 0.35 b	0.34 ± 0.33 b	0.32 ± 0.14 b	0.17 ± 0.13 β	0.57 ± 0.35 α
Isoamyl esters of fatty acid									
Isoamyl butyrate	0.36 ± 0.19 b	0.36 ± 0.12 b	0.77 ± 0.55 a	0.38 ± 0.19 b	0.44 ± 0.48 b	0.23 ± 0.07 d	0.40 ± 0.11 b	0.37 ± 0.14 α	0.40 ± 0.34 α
Isoamyl hexanoate	0.98 ± 0.39 c	0.82 ± 0.27 c	2.19 ± 0.71 a	1.65 ± 0.54 b	1.72 ± 0.44 b	0.93 ± 0.3 c	2.06 ± 0.39 a	0.87 ± 0.32 β	1.68 ± 0.50 α
Isoamyl octanoate	1.70 ± 0.8 c	0.96 ± 0.37 d	3.83 ± 1.59 a	2.26 ± 0.75 b	2.20 ± 0.76 b	1.28 ± 0.91 c	2.53 ± 0.82 b	1.17 ± 0.61 β	2.23 ± 0.75 α
Ethyl esters of odd carbon number fatty acids									
Ethyl heptanoate	0.64 ± 0.21 b	0.93 ± 0.39 a	1.00 ± 0.22 a	0.36 ± 0.09 d	0.48 ± 0.18 c	0.73 ± 0.38 a	0.34 ± 0.09 d	0.85 ± 0.37 α	0.41 ± 0.15 β
Ethyl nonanoate	0.42 ± 0.14 b	0.38 ± 0.18 b	0.75 ± 0.57 a	0.26 ± 0.13 bc	0.33 ± 0.4 bc	0.78 ± 1.07 a	0.23 ± 0.05 c	0.39 ± 0.17 α	0.29 ± 0.28 α
Miscellaneous esters									
Ethyl propionate	91.9 ± 20 c	112 ± 29 b	111 ± 26 b	62.3 ± 18 d	102 ± 29 b	148 ± 65 a	79.7 ± 28 c	107 ± 28 α	78.7 ± 30 β
Ethyl *trans*-2-hexenoate	1.31 ± 0.43 c	1.79 ± 0.85 b	0.50 ± 0.09 d	3.40 ± 1.26 a	2.82 ± 1.07 a	0.93 ± 0.73 c	3.26 ± 1.69 a	1.65 ± 0.79 β	3.16 ± 1.21 α
Isobutyl hexanoate	0.16 ± 0.06 c	0.13 ± 0.06 c	0.27 ± 0.07 a	0.16 ± 0.07 c	0.20 ± 0.07 b	0.12 ± 0.04 c	0.17 ± 0.07 bc	0.14 ± 0.06 α	0.17 ± 0.07 α

Table 4: Composition moyenne d'un vin en principaux acides et alcools en g/L (5).

Famille	Constituant	Formule	Teneur moyenne (g/L)
Alcools	Éthanol	C_2H_6O	60 à 150
	3-méthyl butan-1-ol	$C_5H_{12}O$	0,4
	Méthanol	CH_4O	0,015 à 0,30
	2-méthyl butan-1-ol	$C_5H_{12}O$	0,15
	2-methyl propan-1-ol	$C_4H_{10}O$	0,08
	Propan-1-ol	C_3H_8O	0,03
Acides organiques	Acide tartrique	$C_4H_6O_4$	2 à 5
	Acide malique	$C_4H_6O_5$	0 à 5
	Acide succinique	$C_4H_6O_4$	0,5 à 1,5
	Acide pyruvique	$C_3H_4O_3$	0,10
	Acide citrique	$C_6H_8O_7$	0 à 0,5

3.3 Les phénomènes d'oxydation

L'oxydation du vin est majoritairement dépendante de l'oxygène. L'oxygène (O_2) est ubiquitaire et présente une proportion d'environ 21% dans l'atmosphère à une température de 20°C et une pression de 1013 hPa. De ce fait, le vin ne peut être entièrement protégé de l'oxygène (175). Ce dernier peut jouer un rôle important pendant le processus de vinification et de vieillissement au cours duquel il peut influer sur la composition du moût et du vin. Plus on avance dans le processus de vinification et d'élevage, plus cet oxygène risque d'être néfaste et d'entraîner des modifications chimiques et organoleptiques non souhaitées (179). Certain vins comme le porto ou les vins du Jura recherchent cependant les caractéristiques aromatiques de l'oxydation. Pourtant l'oxydation reste considérée dans les vins blancs secs comme un défaut (180, 181).

L'oxydation est un phénomène bien connu dans le vin où de nombreux arômes ont étés identifiés comme caractéristiques de l'oxydation (miel, pomme cuite, noix rance, sucre brulé ou encore curry). Les composés les plus associés avec les arômes d'oxydation sont le sotolon, l'eugénol, le phénylacétaldéhyde, le méthanethiol, le 2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane, le méthional, le 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN), le 2,2-dimethyl-5-(1-methylpropenyl)-tetrahydrofuran, l'oxide de linalool (180) et des aldéhydes aliphatiques tels que le *trans*-2-nonenal (180, 182, 183). Depuis quelques années, en Bourgogne comme dans de nombreuses régions viticoles mondiales, les vins blancs sont confrontés au problème de l'oxydation prématurée.

L'oxydation prématurée se caractérise par le fait que des vins qui viennent d'être mis en bouteille développent très rapidement des arômes caractéristiques d'évolution oxydative (182, 183) associés à une modification de la couleur (du jaune pâle au jaune brun) (5, 184). Ce défaut du vin blanc qui a des conséquences économiques considérables pour la filère du vin est bien caractérisé mais seulement une fois le vin oxydé (185, 186). Étant donné les symptômes associés à ce vieillissement atypique, divers auteurs ont évidemment étudié le rôle de la perméabilité des obturateurs sur le potentiel de vieillissement de vin (186–188). Si les résultats s'accordent généralement sur le fait que la faible pénétration de l'oxygène au travers du bouchon préserve la qualité aromatique d'un vin, des teneurs trop faibles en oxygène peuvent également conduire à des arômes réduits non souhaités (188). Ces résultats soulignent surtout que la composition du vin est dépendante du processus d'oxygénation

durant lequel les vins peuvent présenter une réactivité différente à l'égard de l'oxygène. Sur la base d'expériences répétées sur plusieurs années en vinification champenoise, il a été montré qu'il existe une perte progressive de CO_2 à travers le bouchon lors du vieillissement qui est corrélée à une augmentation progressive de la diffusion de l'oxygène depuis l'extérieur vers de vin (189).

3.3.1 Réaction d'oxydation des vins blancs

Grâce aux nombreux travaux réalisés sur les vins rouges – naturellement plus riches en composés phénoliques que les vins blancs – le rôle du dioxygène a été mis en évidence dans les mécanismes d'oxydation des composés phénoliques, catalysés par des métaux tels que le fer et le cuivre (31, 190).

Dans les vins blancs, les composés non flavonoïdes tels que les dérivés hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques représentent les principaux composés phénoliques (5). Ces dérivés constituent principalement des dérivés d'esters d'acide tartrique, coumarique et caféique (191, 192). Ces dérivés d'esters sont présents à des concentrations comprises entre 10 et 29 mg/L dans les vins de Chardonnay (193) et ont été identifiés comme étant les substrats d'oxydation et de brunissement des vins blancs (194, 195). D'autres composés phénoliques sont aussi présents en grande quantité dans les vins blancs tels les flavan-3-ols qui regroupent la catéchine, l'épicatéchine, les procyanidines B1 et B2, et les flavonols dont la quercétine (5, 196). Parmi ces composés phénoliques, ce sont les di- et tri-hydroxyphénols qui s'oxydent le plus rapidement et en particulier les composés portant un groupement o-diphénol (catéchol) (5, 175).

De par son abondance dans le vin, l'éthanol est aussi l'un des premiers substrats pour former de l'acétaldéhyde par oxydation qui, à son tour, peut donner naissance à l'acide acétique (5). On retrouve également quelques acides qui peuvent s'oxyder, notamment les acides tartrique, malique et lactique (5, 191, 197). Enfin, les métaux tels que le fer et le cuivre peuvent également interagir avec l'oxygène dans le moût et le vin et servir de catalyseurs de réactions d'oxydation (5, 190, 197). Cependant en l'état actuel, la connaissance sur les processus complexes d'oxydation du vin reste réduite.

Les études sur vins modèles se sont révélées être d'une grande aide pour l'exploration des fonctions catalytiques du fer et du cuivre et pour l'étude des mécanismes d'action des sulfites dans les vins. Cependant dans le vin blanc, il semblerait que les acides tartrique et malique, présents en grande quantité en comparaison des polyphénols, pourraient être les ligants principaux du fer contrairement au vin rouge où les polyphénols seraient en compétition avec l'acide tartrique (197). Ces résultats récents confirment donc que les mécanismes d'oxydation du vin rouge et du vin blanc sont différents.

Pour les vins blancs, l'un des principaux problèmes lié au vieillissement est la couleur instable après la mise en bouteille. Pour l'essentiel, le brunissement est dû à l'oxydation de phénols en quinones, qui à leur tour se polymérisent pour former des macromolécules ayant une teinte caractéristique jaune-brun (191). Ce brunissement est cependant bien connu dès les premiers stades de la vinification où il est formé par des réactions enzymatiques (198) dans lesquelles les esters d'acides hydroxy cinnamique jouent un rôle prépondérant (199). L'acide caffeoyl tartrique et l'acide p-coumaroyl tartaric sont tous deux convertis en acide caffeoyl tartaric o-quinone qui subissent alors une réduction supplémentaire ou une addition impliquant d'autres composés, phénoliques ou non (198, 200).

3.3.2 Protection des vins contre l'oxydation et chimie du soufre

Durant le processus de vinification et d'élevage, le vin peut être en contact avec l'air pendant différentes étapes ce qui mène à des concentrations parfois importantes d'oxygène dissous. Le moût se trouve saturé en O_2 pendant les étapes de pressurage des raisins frais (201), et l'ajout de SO_2 est alors nécessaire pour protéger les composés d'arômes variétaux dans le cas de cépages aromatiques et pour s'opposer au brunissement du moût en réduisant les quinones produites par oxydation enzymatique (202, 203). Les composés tels que le dioxyde de soufre (SO_2), l'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$) et le glutathion ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$) (**Figure 7**) sont considérés comme des agents de conservation permettant au vin de résister au vieillissement oxydatif du fait de leur capacité à stabiliser les thiols (cépages aromatiques) et à agir comme des réducteurs de quinones (204–207). Parmi ces trois protecteurs, le SO_2 et le glutathion font référence à la chimie du soufre qui est au centre des mécanismes de protection contre l'oxygène.

Le dioxyde de soufre (SO_2) est le premier anti-oxydant exogène utilisé en œnologie, il est présent majoritairement sous la forme d'ion hydrogénosulfite (HSO_3^-) au pH du vin (**Figure 7**).

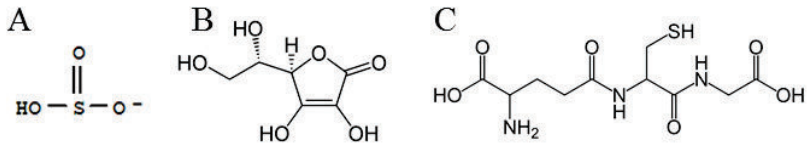


Figure 7: (A) Ion hydrogénosulfite, (B) acide ascorbique et (C) glutathion.

Dans le moût, la consommation d'oxygène diminue de façon drastique avec l'ajout du SO_2. Ceci est dû au fait que le SO_2 n'a aucun effet antioxydant dans le moût mais inhibe l'oxydation enzymatique (175). La capacité antioxydante du SO_2 est liée à sa capacité à réagir avec les agents oxydants ou à être préférentiellement oxydé par rapport à d'autres composés du vin. Parmi ces agents oxydants très réactifs, le peroxyde d'hydrogène est un des produits de l'oxydation chimique des catéchols (208) (**Figure 8**). Malgré le fait que l'ion hydrogénosulfite (HSO_3^-) interagisse directement et rapidement avec le peroxyde d'hydrogène, son effet reste limité et l'acétaldéhyde (produit d'oxydation de l'éthanol) est toujours produit même à des concentrations de 177 mg/L de SO_2 (208, 209). Cet ion hydrogénosulfite est aussi capable d'interagir avec les o-quinones pour les réduire en phénols (**Figure 8**). Cette réaction est rapide, en particulier dans le cas de l'acide caféique par rapport à la (+)-catéchine ou la quercétine (202, 210).

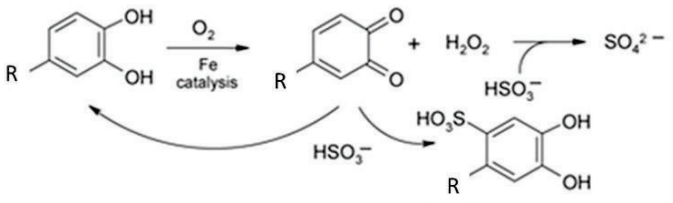


Figure 8 : Réaction entre l'ion hydrogénosulfite, le peroxyde d'hydrogène et une o-quinone suite à l'oxydation du catéchol (202, 208)

Les composés soufrés organiques sont présents à de très faibles teneurs dans le vin. En l'état actuel des connaissances, ils se résument à certains acides aminés et peptides (80, 211) et à des composés soufrés volatils dont principalement des thiols volatils (50, 212). Les

thiols volatils sont généralement très oxydables et très réactifs. Beaucoup d'entre eux sont à l'origine d'odeurs désagréables tels que celles d'oignon et de chou pourri causés par le methional et le méthane thiol (50) mais certains composés soufrés sont responsables d'odeurs très agréables comme l'arôme du fruit de la passion et le café (51, 213). Dans le cas du chardonnay les thiols volatils sont présents en très faibles quantités.

Parmi les substrats de l'oxygène, on trouve également les composés antioxydants exogènes ou endogènes du raisin, avec notamment les composés soufrés tels que le glutathion ayant un comportement sacrificiel vis-à-vis de l'oxygène (207), et plus généralement, l'ensemble des molécules portant une fonction thiol (214, 215). Le tri-peptide glutathion (acide glutamique - cystéine - glycine) est un antioxydant indigène au raisin découvert pour la première fois dans le raisin en 1989 (198) et largement étudié pour son action contre l'oxydation dans le moût et le vin (210, 216). Des études antérieures ont montré que le glutathion en combinaison avec des niveaux réduits de SO_2 inhibe la perte de composés d'arôme souhaitables telles que les mono-terpènes et les esters, et d'autre part, retarde la formation de brunissement oxydatif, en particulier du pigment jaune xanthylium (217). En outre, Lavigne et Dubourdieu ont observé que le glutathion protège directement le vin contre la perte de thiols volatils, au cours de l'élevage en fûts (205).

Au travers du mécanisme d'oxydation des composés soufrés à fonction thiol, on observe que l'oxydation de deux thiols fait perdre un atome d'hydrogène (H) par molécule. Un exemple est illustré pour le glutathion (**Figure 9**). Par oxydation le glutathion qui a pour formule brute $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ interagit alors soit avec une autre molécule de glutathion pour former un composé disulfure ($C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$) (**Figure 9**B), soit avec une quinone issue de l'oxydation des composés portant un groupement o-diphénol tels que l'acide caftarique pour former un produit incolore appelé « Grape Reaction Product » (GRP), empêchant ainsi le brunissement du moût en piégeant cette quinone (218) (**Figure 9**C).

Cependant, la compréhension de l'action du glutathion ainsi que d'autres peptides soufrés dans la protection des vins reste encore très méconnue, comme le montrent les résultats de Ugliano *et al* (188) où en conditions d'oxygénation du vin en bouteille, aucune formation de glutathion oxydé n'est observée. Par ailleurs les propriétés antioxydantes complémentaires du SO_2 et de l'acide ascorbique offrent des possibilités très prometteuses pour la gestion de l'oxydation du vin (219).

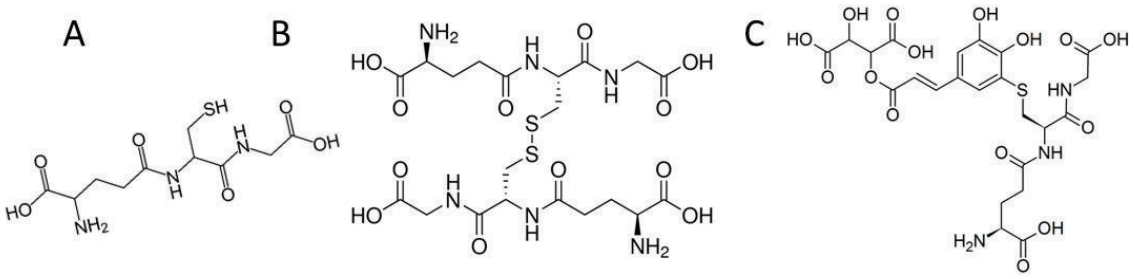


Figure 9: (A) Glutathion réduit, (B) formation d'un disulfure par oxydation de deux molécules de glutathion, (C) formation du GRP (Grape Reaction Product) par interaction du glutathion avec la quinone de l'acide caftarique.

3.4 Micro-oxygénation et vieillissement artificiel

La micro-oxygénation est une pratique commune en œnologie pour les vins rouges qui consiste en l'addition de faibles quantités d'oxygène au moût et permettant d'améliorer la couleur, les arômes, la texture ainsi que la conservation (220–223). Cependant la micro-oxygénation du vin est également utilisée comme processus de vieillissement simulé par ajout continuel de faibles quantités d'oxygène au vin.

Les effets de l'oxygène sur la qualité sensorielle du vin sont fortement dépendants de la quantité. Clairement positif à faible dose (222, 223) en augmentant la teneur en composés volatils comme l'acétaldéhyde, la vanilline et la syringaldéhyde ainsi que les produits de réaction de stabilisation des anthocyanes (220, 222, 224–228), l'oxygène devient négatif pour des concentrations plus fortes.

Récemment, une expérimentation a été menée sur des vins rouges pour quatre niveaux d'oxygénation (0, 5, 10 et 15 mg/L/mois) pendant sept semaines à l'aide d'analyses non ciblées (229). Bien que la micro-oxygénation ait été étudié extensivement ces vingt dernières années, aucune donnée n'avait été apportée sur son influence sur les sucres, les acides aminés, les acides organiques ou encore les acides gras (229). Les résultats de cette étude ont confirmé l'identification de la plupart des biomarqueurs connus de la micro-oxygénation qui sont principalement des tannins et des pigments. Cependant le caractère novateur de ce travail est qu'il a révélé de nouvelles classes de composés impliqués dans les changements dus à la présence d'oxygène, notamment des métabolites primaires et secondaires qui n'avaient pas

été considérés dans les études précédentes (229). Ont ainsi été identifiés des polyphénols tels que l'acide caféique, l'acide caftarique, l'acide vanillique, l'acide gallique, l'acide ellagique, la quercetine glucoside, le trans-picéide mais aussi des acides organiques tels que l'acide succinique, l'acide lactique, l'acide malique, l'acide abscisique, l'acide indolique et l'acide gluconique, ou encore des acides aminés comme l'arginine, la proline, l'histidine ou la leucine, des acides gras comme l'acide linolénique, l'acide arachidonique, l'acide hexénoique, l'acide oléique et enfin des oligosaccharides tels que le raffinose ou encore des stérols (229).

On constate ainsi que de très nombreuses familles moléculaires sont impactées par la micro-oxygénation. Pourtant, bien que la micro-oxygénation soit un processus prometteur pour l'étude du vieillissement du vin, celui-ci reste artificiel et est actuellement appliqué très majoritairement aux vins rouges.

3.5 Étude de séries verticales de vins en bouteille

Etudier des séries verticales comme une approche alternative du vieillissement repose sur l'hypothèse qu'il est possible à un instant donné de comparer des signatures de vins ayant plusieurs points communs (cépage, origine, procédé œnologique…) mais n'ayant pas la même durée de vieillissement. Ce paramètre fondamental est au cœur du challenge que constitue la présente approche. En effet, il s'agit d'être en mesure de différencier dans les signatures métaboliques les contributions liées au vieillissement du vin de celles dues au millésime.

Aucun article dans la littérature ne rapporte à ce jour une approche de ce genre, et les rares résultats portant sur des séries verticales de vins illustrent à merveille ce challenge, à l'image de la récente étude sur des séries de vins rouges australiens de 50 millésimes (de 1954 à 2004) (230). En effet, l'analyse de paramètres œnologiques classiques tels que la concentration en tannins, le pH (± 3,5), le taux alcoométrique (±13%) ou encore l'acidité volatile (±0,6 g/L) n'a pas pu faire apparaître de corrélations avec l'âge du vin (230) (**Figure 10**), révélant ainsi les limites de l'analyse ciblée pour comprendre des mécanismes complexes pouvant eux-mêmes impliquer une multitude de composés. Cependant, cette même étude sur deux séries de vins rouges australiens de 30 millésimes (de 1977 jusqu'à 2006) montre une décroissance de la concentration en anthocyanes (diminution de la concentration en malvidin-3-glucoside qui passe de ± 200 mg/L pour le vin de 2006 à ± 0 mg/L pour les vins

plus anciens que 2001) (230), qui est aisément corrélable avec l'évolution connue de la couleur des vins rouge au cours du vieillissement, où le taux de combinaison des anthocyanes atteint progressivement les 100% (23, 230, 231). Il est intéressant de constater que selon cette étude, la vinification semble avoir un impact plus fort que le millésime sur la composition du vins, ce qui suggére que les variations d'astringence lors du vieillissement du vin sont dues à des modifications de la structure des tannins plus qu'à des évolutions de concentrations (230).

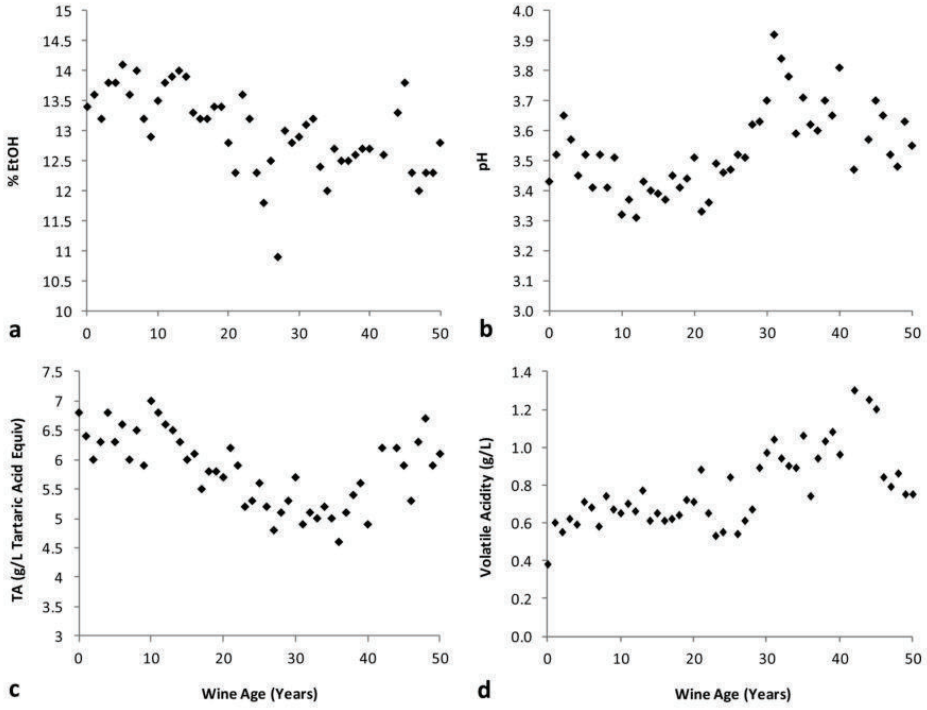


Figure 10: Paramètres du vin de la série verticale de 50 ans : (a) Concentration en alcool % EtOH; (b) pH; (c) acidité titrable en g/L d'équivalent d'acide tartarique; (d) acidité volatile (VA) en g/L (230).

L'étude de 24 millésimes (1978 à 2005) de Cabernet-Sauvignon et de 7 millésimes (1979, 1986, 1988, 1994, 1995, 1998 et 2003) de Merlot conforte le lien entre vieillissement et évolution de la teneur en composés phénoliques, anthocyanes totales, et tannins (23). Cependant, elle illustre également les limites des approches actuelles, notamment en terme de couleur des vins étudiés où seuls les vins rouges, riches en composés phénoliques ont été considérés.

Enfin, un certain nombre d'études se sont intéressées au lien entre vieillissement et évolution du profil aromatique. Les changements de propriétés aromatiques liées à l'oxydation sont très souvent relatives à la formation d'aldéhydes (232, 233) et principalement de méthional et de phényl acétaldéhyde (206, 234). Le rôle de ces aldéhydes dans le processus de l'oxydation et leur conséquence dans le vin blanc a été bien étudié (22, 182, 183, 235). Cependant, ces travaux ont également montré les limites des approches ciblées pour comprendre l'origine des mécanismes d'oxydation, dans la mesure où aucune corrélation n'a pu être établie entre la concentration en précurseurs supposés et celle du composé marqueur.

Ces travaux démontrent que tout reste à faire sur l'analyse de séries verticales de vins, notamment par approches non ciblées afin d'aborder l'évolution de la composition globale du vin au cours de son vieillissement en bouteille

4 Influences des facteurs environnementaux

Globalement et comme le suggèrent les paragraphes ci-dessus, chaque étape du processus œnologique peut donc conduire à une modulation plus ou moins fine de la composition du vin. En réalité, ce raisonnement peut être étendu à l'ensemble des facteurs que nous appellerons "environnementaux" pouvant être considérés depuis la parcelle, jusqu'à la bouteille (**Figure 11**). Par influences environnementales nous pouvons considérer l'ensemble des propriétés qui sont couramment associées au concept de terroir : le cépage, le porte-greffe, l'ensemble des conditions climatiques, la localisation géographique ou encore l'action de l'homme depuis la vigne jusqu'au vin. Puisque l'étude de la composition globale du vin en bouteille est censée permettre une lecture de l'histoire du vin relative à tout ce qui s'est passé en amont du vieillissement, il est donc en théorie possible de retrouver dans le vin des informations relatives au matériel biologique et aux pratiques culturales ou œnologiques ayant été utilisées lors de son élaboration (**Figure 11**). La composition en métabolites d'un vin est donc non seulement due à la composition du raisin et aux modifications chimiques apportées lors du vieillissement, mais est également influencée par toutes les étapes viti-vinicoles, les pratiques œnologiques, les pathogènes de la vigne, ou encore les modes de conservation et de vieillissement (**Figure 11**).

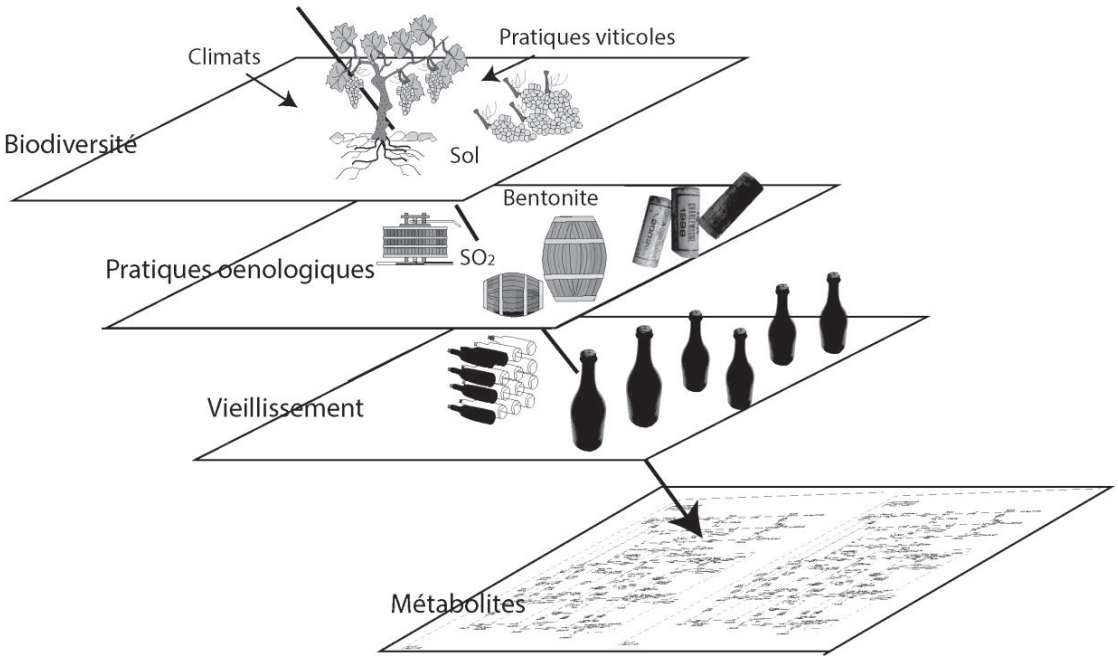


Figure 11: Schéma de synthèse résumant les différents niveaux d'impact des facteurs environnementaux sur la composition finale d'un vin : biodiversité du matériel végétal, pratiques culturales et œnologiques, conditions de vieillissement.

L'origine géologique du sol, à une influence directe sur les caractéristiques du raisin (236). Les raisins sont cultivés sur des sols dérivés de trois types de roches de base: Igné (exemple, le granit), sédimentaires (exemple, la craie, le calcaire), ou métamorphique (exemple l'ardoise, la quartzite et le schiste) (237). Si certains auteurs écrivent que le sol à l'impact le moins significatif sur la qualité du raisin et du vin comparé à l'ensemble des influences environnementales (238–240), d'autres comme Pereira (241) indiquent que l'effet le plus significatif pour la discrimination de vins pour un millésime donné est l'effet du sol. Il existe une relation directe entre la géologie et le sol et donc entre la géologie et le vin (236, 242). Certains aspects de la géologie ont un effet direct sur les performances de la vigne, comme la texture du sol, sa composition, sa structure et son inclinaison (242, 243) mais aussi de par sa composition chimique, son pH, sa température, son statut hydrique (243, 244). Bavaresco (245, 246) a étudié l'effet du calcaire sur la productivité des vignes ainsi que sur la qualité du vin de Merlot, il a montré une production accrue de stilbène dans les pellicules.

En plus du fort impact du sol, les conditions météorologiques saisonnières, en particulier la température (247), les précipitations et l'humidité relative de l'air (247) ont une

influence importante, notamment lors du dernier mois avant la vendange où elles affectent la synthèse de métabolites primaires (sucres, acides) et secondaires (resveratrol, composés aromatique et phénoliques (248). En effet la teneur en resveratrol ou en cis-piceide (glucoside de resveratrol) augmente significativement dans les pellicules à la suite de précipitations survenant à la fin de la maturation, tandis que la teneur est bien plus faible pendant les saisons les plus chaudes (245, 249). Il est généralement admis qu'un faible potentiel hydrique a un effet positif sur le potentiel aromatique des raisins (248). Enfin, dans un contexte de réchauffement climatique, l'impact du climat sur la viticulture fait l'objet de plus en plus d'études afin notamment d'anticiper des adaptations variétales (16, 250–253).

Au travers de ces deux exemples d'influences que sont le sol et le climat, nous constatons que la qualité du vin est supposée dépendre en grande partie du terroir duquel il provient (248). La notion de terroir est une problématique d'actualité en œnologie et un grand nombre d'équipes s'intéressent à ce que le terroir représente en termes de qualité de raisin ou de vin, ainsi qu'au développement de méthodologies permettant la détermination de l'origine géographique de raisin et de vins (254, 255). Le terroir fait en premier lieu référence à une zone de production et possède donc une dimension géographique (256). Le concept de terroir en viticulture est principalement utilisé en France, où il est décrit comme la somme des conditions naturelles environnementales d'un lieu. De nombreux auteurs ont donné leur définition de ce concept complexe (13, 14, 236, 243) que l'on peut décrire comme l'effet combiné du sol, de l'orientation par rapport au soleil, de l'élévation (topographie), plus chaque nuance du climat incluant la pluie, la vélocité du vent, le brouillard, l'ensoleillement, les températures minimum et maximum ainsi que le cépage et le porte-greffe des raisins produits sur le site (13, 14, 236, 243).

Des études récentes en microbiologie ont permis par une approche méta-génomique non ciblée de déterminer que les populations microbiennes présentes sur les baies de raisin variaient en fonction du terroir (254, 255). En effet les études des populations microbiennes des raisins provenant de différentes régions de nouvelle Zélande (255) et de Californie (254) ont été comparées, permettant de mettre en évidence une biogéographie des populations microbiennes associées au raisin (**Figure 12**). Il est ainsi montré que l'impact du terroir sur la composition du raisin est primordiale (254, 255, 257). Ainsi, si les raisins possèdent une empreinte spécifique de terroir, les vins produits à partir de ces raisins devraient également contenir dans leur composition une signature de ce terroir.

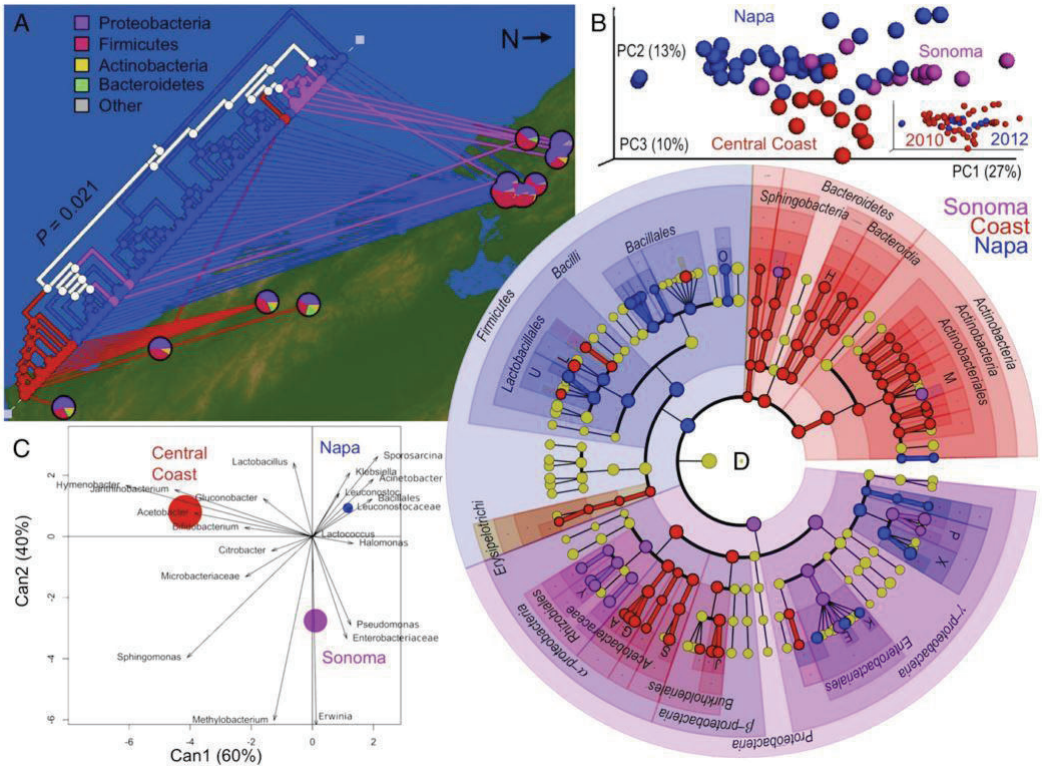


Figure 12: Communautés bactériennes issues de moûts de raisins provenant de différentes régions. (A) dendrogramme comparant les communautés bactériennes des moûts de Chardonnay à travers la Californie. (B) ACP des communautés bactériennes dans les moûts de Chardonnay de toute la Californie. (C) Analyse canonique discriminante comparant les moûts de Chardonnay de Napa, Sonoma, et Central Coast. (D) Diagramme comparant tous les moûts de Chardonnay classés par région de production (254).

5 Conclusion

Le vin est un système complexe comprenant plusieurs milliers de composés différents dont une partie contribue à son arôme, son parfum, ses caractéristiques sensorielles ou encore à ses bénéfices pour la santé. Comme cela a été mentionné auparavant, ces composés sont originaires des raisins, des conversions enzymatiques réalisées lors des fermentations mais également des réactions chimiques souvent très lentes prenant place lors du vieillissement en bouteille. Actuellement, seule une faible partie des composés du vin ont été identifiés et la majorité des études se sont concentrées sur ces composés connus. Ces analyses ciblées n'ont pas permis pas de comprendre ni d'expliquer de façon univoque les interactions impliquées lors de l'évolution de la composition du vin. De plus, très peu d'études on tenté d'analyser les modifications de la composition du vin sur un grand nombre de millésimes. C'est donc dans l'optique d'améliorer la compréhension des changements de composition pendant le vieillissement ainsi que des mécanismes responsables de ces changements par l'étude de séries de vins aillant vieilli en bouteille, que cette thèse s'est focalisée sur la combinaison de méthodes analytiques non ciblées.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

Cette partie regroupe l'ensemble des protocoles communs à toutes les expérimentations réalisées dans ce travail, ainsi qu'une description des échantillons. Pour une lecture plus facile et une meilleure compréhension, un paragraphe « méthodologie » est redonné dans chaque chapitre de la partie résultats et discussions.

1 Solvants et réactifs

De par sa sensibilité et sa sélectivité, la FTICR-MS requiert l'utilisation de solvants sans impuretés (**Table 5**).

Table 5: liste des réactifs et solvants utilisés.

Solvants

Noms	Origine	Description
Méthanol	Fluka	LC-MS Chromasolv, 34966 1L
Acétonitrile	Fluka	LC-MS Chromasolv, 34967 1L

Tampons

Noms	Origine	Description
Acétate d 'amonium	Biosolve	ULC-MS grade, 01244156
Acide formique	Fluka	MS, 94318 50ml

2 Matériels biologiques

Des vins de Bourgogne et de Champagne ont été sélectionnés pour notre étude. Ils proviennent de diverses appellations réparties en côte de Nuits, côte de Beaune, Chablis et en Champagne.

2.1 Influences des pratiques œnologiques

Trois millésimes successifs (2008, 2009 et 2010) d'un vin blanc d'une même appellation (Rully) et provenant du même domaine ont été analysés dans le but de déterminer l'impact de différentes pratiques œnologique sur la composition globale en métabolite. 48

bouteilles de vins blancs de Bourgogne ont été analysées lors de cette étude. La gamme d'échantillons présentait 4 variables : Intensité du débourbage (150 et 300 NTU), collage à la bentonite (0 et 30 g/hL), type d'obturateur (liège naturel (N), Diam® (D), Nomacorc® (NC) et dans des ampoules en verre scellées sous atmosphère protectrice ne permettant aucun échange avec l'environnement) et bien entendu millésime (2008, 2009 et 2010). Les bouchons en liège étaient de 49 mm de long. Les obturateurs Diam®, marque de bouchons agglomérés, sont fabriqués à partir de particules de liège naturel et agglomérés avec de la colle. Les obturateurs Diam® étaient de 49 mm de long, avec une perméabilité basse de niveau P1 sur l'échelle Diam® allant de P1 à P10 (ou P10 est le bouchon le plus perméable). Les obturateurs Nomacorc® employés dans cette étude étaient de type « Nomacorc light » de 47 mm de long et 22,5 mm de diamètre, avec une densité de 0,285 g/cm^3 et un OTR de 0.090 cm^3/jour. Ils sont issus de l'extrusion et sont conseillés pour les vins à conserver jusqu'à 12 mois.

Enfin, l'impact de la dose de soufre ajouté lors du pressurage a été étudié (0, 4 et 8 g/hL) sur deux millésimes 2006 et 2007. 44 bouteilles de vins blancs de Bourgogne (Montagny) ont été analysées lors de cette étude. Les vins provenaient du Domaine Sauvestre à Meursault. La gamme d'échantillons présentait trois variables : millésime (2006 et 2007), taux de sulfitage au pressurage (0, 4 et 8 g/hL) et type d'obturateur (liège naturel, Diam® et Nomacorc®). Pour chaque modalité de cette étude, trois réplicas ont été considérés correspondant à trois bouteilles de vins.

2.2 Les vins pour l'analyse « oxygénation contrôlée »

Un total de 27 bouteilles (75 cl) de vins de Champagne de même producteur et de deux millésimes (2006 et 2008) ont été analysés à la fin de la prise de mousse sur lattes, peu de temps après le dégorgement en juillet 2013. Une série d'échantillons de deux millésimes correspondent à des vins d'assemblage de base (⅓ chardonnay, ⅓ pinot noir, ⅓ Pinot Meunier) mis en bouteille pour la prise de mousse, en juillet 2007 et juillet 2009, respectivement. Pour le millésime 2008, les vins de champagne de chacun des trois cépages ont également été analysés (100% chardonnay, 100% pinot noir et 100% pinot meunier) (**Table**).

Ainsi, les vins de champagne de cette étude ont été analysés au bout de 6 ou 4 ans de vieillissement en bouteille. Pour chaque millésime, les bouteilles avaient été fermées lors la prise de mousse, avec des bouchons synthétiques à joints couronnes présentant trois niveaux de perméabilité contrôlée à l'oxygène: faible (Capsule Bar et BO avec pertes d'O2 de 0,2 mg/L/ans), moyen (Capsule Scel++ avec pertes d'O_2 de 0,7 mg/L/an) et élevé (Capsule Scel+ avec pertes d'O_2 de 1,8 mg/L/an). Pour chaque modalité de cette étude, trois réplicats ont été considérés correspondant à trois bouteilles de vins (**Table 6**).

Table 6: Tableau résumant les vins de champagne, leurs cépages, les millésimes étudiés et la perméabilité de la capsule.

Groupe	Cépages	Millésimes	Perméabilité de la capsule mg/L/ans d'O_2	Nombre d'échantillons (A - B - C)
PN.	Pinot Noir	2008	0,7	3
Meu.	Pinot Meunier	2008	0,7	3
Ch.	Chardonnay	2008	0,7	3
07 Low	PN. / Meu. / Ch.	2006	0,2	3
09 Low	PN. / Meu. / Ch.	2008	0,2	3
07 Middle	PN. / Meu. / Ch.	2006	0,7	3
09 Middle	PN. / Meu. / Ch.	2008	0,7	3
07 High	PN. / Meu. / Ch.	2006	1,8	3
09 High	PN. / Meu. / Ch.	2008	1,8	3

2.3 Les vins pour l'analyse terroir

2.3.1 Domaine de la Romanée Conti

Deux vins de Bourgogne, un Grand Echezeaux et un Romanée Conti, ont été échantillonnés juste après leur fermentation alcoolique et analysés pour trois millésimes successifs (2010, 2011 et 2012). Les raisins correspondant ont été prélevés lors de vendanges pour chaque millésime et les extraits de leurs pellicules ainsi que leurs moûts ont été analysés.

2.3.2 Domaine Louis Jadot

Quatre vins issus de Côte de Nuits (appellations Clos Saint Jacques et Clos Vougeot) et de Côte de Beaune (Appellation Clos des Couchereaux et Les Avaux) ont également été échantillonnés juste après leur fermentation alcoolique. Les millésimes étudiés étaient 2007, 2008 et 2009. Les raisins correspondant aux vins étudiés ont été prélevés lors des vendanges pour chacun des millésimes étudiés et les extraits de leurs pellicules ainsi que leurs moûts ont été analysés. Les mêmes vins ont été analysés de nouveau mais après 3, 4 et 5 ans de vieillissement en bouteille dans la cave du domaine.

2.4 Les séries verticales de vins blancs et rouges

L'originalité de ce travail réside dans l'analyse non ciblée de séries verticales de vin. Une série verticale de vin est issue d'une même parcelle et élaborée par un même viticulteur sur une période de temps la plus longue possible, afin de pouvoir lire l'histoire métabolique de ces vins et la corréler à des données environnementales relatives à l'année d'élaboration de ceux-ci. Quatre séries de vins blancs et trois séries de vins rouges provenant de différents terroirs en Bourgogne ont été analysés (**Figure 13**). Ces séries regroupaient des millésimes de 1934 à 2012 avec plus ou moins d'interruptions selon les domaines (**Table 7**). Chacune de ces verticales a été prélevée, dégustée et analysée individuellement par des méthodes œnologiques traditionnelles ainsi que par analyses non ciblée.

Table 7: Tableau résumant les séries verticales de vins, leurs origines et les millésimes étudiées.

	Appellation	Domain	Period	Vintages analysed	number of vintages
White	Meursault	la Velle	1979 to 2006	1979 to 2006	27
	Corton Charlemagne	Bouchard père et fils	1934 to 2010	1934 - 1955 - 1957 to 1960 - 1965 to 1967 - 1972 - 1973 - 1975 - 1976 - 1978 - 1980 - 1982 to 1984 - 1987 to 1989 - 19991 - 1994 to 2010	34
	Chablis	Vincent Dauvissat	1984 to 2012	1983 to 1990 - 1992 to 2012	29
	Meursault	Comtes Lafon	1969 to 2010	1969 - 1976 - 1979 - 1982 - 1985 - 1990 to 1992 - 1994 - 1996 - 1997 - 1999 to 2010	24
Red	Côte de Beaune	la Velle	1976 to 2007	1976 to 1979 - 1981 to 1986 - 1988 to 1993 - 1995 - 1996 - 1998 to 2003 - 2005 to 2007	26
	Richebourg	Romanée Conti	1959 to 2009	1959 - 1966 - 1979 - 1989 - 1999 - 2009	6
	Grand Echezeau	Romanée Conti	1959 to 2009	1959 - 1966 - 1979 - 1989 - 1999 - 2009	6

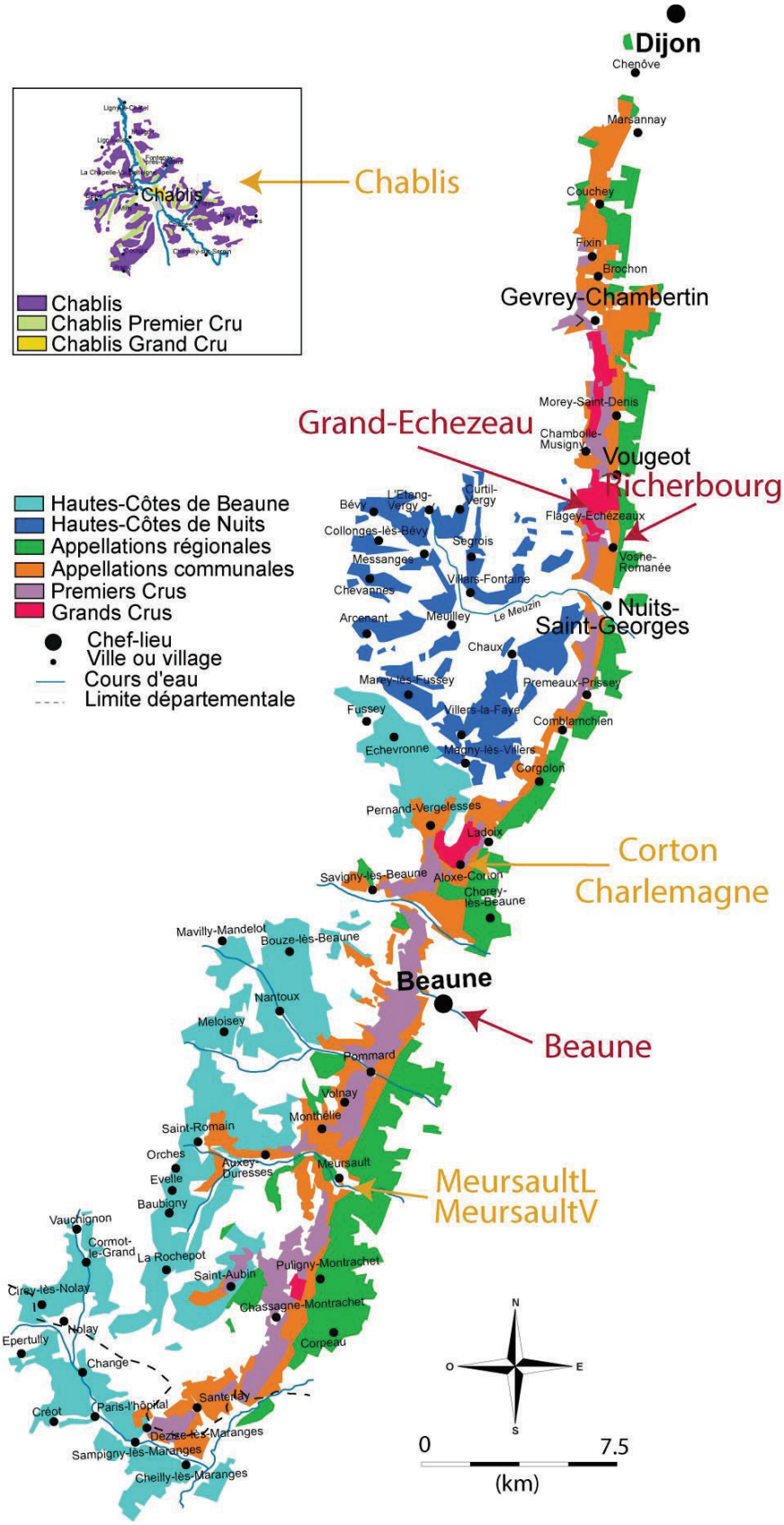


Figure 13: Localisation des applellations considérées pour les séries verticales.

2.4.1 Domaine de la Velle

Une série de vins rouges (Pinot Noir) provenant du domaine de la Velle à Meursault (**Figure 13**), d'appellation Côte de Beaune et regroupant les millésimes 1976 à 2007 (à noter l'absence des millésimes 1980, 1987, 1994, 1997 et 2004) ainsi qu'une série de vins blancs (Chardonnay) provenant du même domaine, d'appellation Meursault et regroupant les millésimes 1979 à 2006 ont étés analysés. Chacune de ces bouteilles était bouchée d'origine et aucune ne présentait de défauts avérés ou perçus à la dégustation (**Annexe 4**).

2.4.2 Domaine Bouchard père & fils

Une série de vins blancs (Chardonnay) (**Figure 14**) provenant du domaine Bouchard père et fils à Beaune (**Figure 13**), d'appellation Corton Charlemagne et regroupant les millésimes de 1934 à 2010 avec l'absence des millésimes de 1934 à 1954; 1956 à 1961; 1964 à 1968; 1971; 1974 à 1977; 1979; 1981; 1985 à 1986; 1990; 1992 à 1993 et avec deux bouteilles (dont une bouchée avec Diam5) pour les millésimes 2006; 2007; 2008 et 2010 a été analysée et dégustée (**Annexe 2**).

Figure 14: Photo des bouteilles de la série verticale de Corton Charlemagne.

2.4.3 Domaine Comtes Lafon

Une série de vins blancs (Chardonnay) (**Figure 15**) provenant du domaine des Comtes Lafon à Meursault d'appellation Meursault Clos de la Barre a été analysée (**Figure 13**). Cette série de vins regroupait les millésimes de 1969 à 2010 avec l'absence des millésimes de 1970 à 1975; de 1977 à 1978; de 1980 à 1981; de 1983 à 1984; de 1986 à 1988; 1989; de 1993 à 1995; 1998. Deux bouteilles du millésime 2005 ont été analysées (la première bouteille avait été jugée oxydée), de même, deux bouteilles de 2002 (la première bouteille avait été jugée bouchonnée), de 1999 (la première bouteille avait été jugée très oxydée, la deuxième oxydative), de 1985 (la première bouteille avait été jugée bouchonnée) et quatre de 1996 (la

première bouteille avait été jugée très oxydée, la deuxième moyennement oxydée, et les deux dernières excellentes) ont été analysées (**Annexe 3**).

Figure 15: Photo des bouteilles de la série verticale de Meursault Clos de la Barre.

2.4.4 Domaine Dauvissat

Une série de vins blancs (Chardonnay) provenant du domaine Dauvissat à Chablis (**Figure 13)** d'appellation Chablis premier cru, La Forest, regroupant les millésimes de 1984 à 2012 avec l'absence du millésime 1991 a été analysée. Chacune de ces bouteilles étaient bouchée d'origine et aucune ne présentait de défauts avérés (**Figure 16**).

Figure 16: Photo d'une bouteille de la série verticale Chablis, La Forest et de la cave du domaine Dauvissat.

2.4.5 Domaine de la Romanée Conti

Deux séries verticales de vin rouge (Pinot Noir) provenant du domaine de la Romanée Conti à Vosne Romanée (**Figure 13**), d'appellations Richebourg et Grand Echezeaux et

regroupant les millésimes de 2009 à 1959 avec une année tous les dix ans (soit les millésimes 2009, 1999, 1989, 1979, 1966 et 1959) ont étés analysées.

2.5 Les millésimes anciens

Une première bouteille ancienne d'origine et d'âge inconnus, nommée SV1, a été trouvée dans les caves de l'abbaye Saint Vivant. L'ouverture de la bouteille, son échantillonnage et sa dégustation ont étés réalisés en 2012, en même temps qu'une bouteille de Romanée Saint-Vivant de 1915 pour en permettre la comparaison (**Figure 17**). Une deuxième bouteille ancienne, SV2, provenant d'un cave particulière a été ouverte, échantillonnée et dégustée en 2013 en même temps qu'une bouteille de Richebourg 1946 (**Figure 17**).

Figure 17: Photos illustrant d'une part la vieille bouteille SV1, l'échantillonnage, le bouchon et la bouteille RSV 1915, la vieille bouteille SV2 ainsi que son bouchon.

3 Méthodes analytiques

3.1 Préparation des échantillons

3.1.1 Les vins

L'échantillonnage des vins a été réalisé le plus souvent possible à l'abri de l'oxygène, dans une boîte à gant sous atmosphère protectrice d'argon (**Figure 18**). Pour cela, après ouverture des bouteilles, des flacons ambrés de 2ml étaient remplis à ras bord à l'aide de pipettes pasteurs puis refermées, gardant ainsi les échantillons à l'abri de l'oxygène. Les

échantillons ont ensuite été conservés à l'abri de la lumière au frais à une température constante de 7°C dans un réfrigérateur en attendant les analyses. Huit vials ont été échantillonnés pour chacune des bouteilles ouvertes.

Figure 18: Compilation de photos illustrant l'échantillonnage sous argon dans une boîte à gants gonflable, une boîte à gants rigide et enfin les échantillons en cours de remplissage lors des prélèvements.

3.1.2 Les baies de raisin

L'échantillonnage des baies de raisins a consisté à séparer les différentes parties de la baie par pressurage d'un lot de 100 baies considérées comme représentatives de la parcelle (c'est-à-dire prélevées aléatoirement à différents endroits de la parcelle). Le jus a été récupéré et conservé au frais. Le reste des baies préalablement pressées a ensuite été séparé manuellement de tous les restes de pulpe, puis les pellicules ont été lavées à l'eau distillée et séchées individuellement pour être broyées dans 40 mL de méthanol (**Figure 19**). Les solutions méthanoliques de pellicules ont alors été placées sur un agitateur pendant deux heures, puis centrifugées (5 min 4000 t/min), le surnageant a été récupéré par filtration sur du coton de verre. 20 mL de méthanol ont alors été ajoutés au culot de centrifugation et ces étapes ont été répétées (**Figure 19**). Après les trois cycles d'agitations/ centrifugations/ filtrations, le filtrat a été complété à 100 mL avec du méthanol puis conservé à -20 °C.

Les moûts ont quant à eux été filtrés à l'aide de cartouches BEH C18 permettant notamment l'élimination des sucres. Pour ce faire, les moûts ont étés acidifiés par de l'acide formique dilué (2 %) jusqu'à un pH compris entre 1,5 et 2. Les cartouches C18 étaient alors conditionnées par passages successifs de 1 mL de méthanol et 1 mL d'acide formique dilué

dans de l'eau ultra pure (2 %). Le passage du solvant dans la colonne a été réalisé à l'aide d'une pompe à vide. 1 mL de moût acidifié était ensuite passé au travers de la colonne C18, puis de nouveau 1 mL d'acide formique dilué, et enfin 500 µL de méthanol qui étaient alors récupérés dans des flacons ambrés et conservés à -20 °C pour l'analyse.

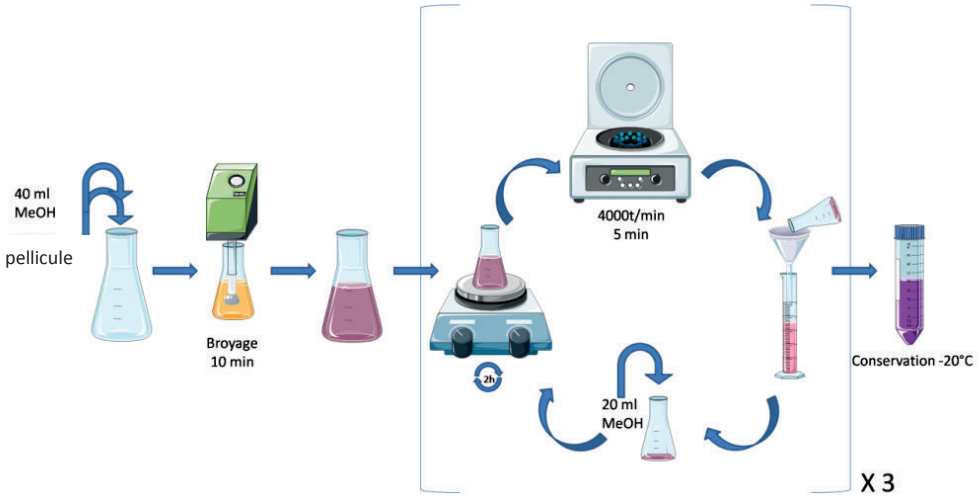


Figure 19: Schéma illustrant les différentes étapes nécessaires à l'extraction des pellicules lors de l'échantillonnage des raisins.

3.2 Analyses UPLC

L'analyse quantitative des composés phénoliques non volatils contenus dans les vins a été réalisée par Chromatographie Liquide à Ultra haute Performance, après optimisation d'une méthode de séparation pour les vins blancs et rouges (Figure 20). Les vins étaient préalablement filtrés (filtre à seringue Uptidisc de 0,20 µm). Les standards des composés phénoliques utilisés (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne et Extrasynthèse, Genay, France) ont été passés en UPLC pour établir des courbes de calibration permettant la quantification de ces mêmes composés dans les échantillons de vins. L'identité des pics dans les vins a été validée par comparaison des temps de rétention et des spectres UV ainsi que Fluo dans le cas du resveratrol.

Le système d'acquisition UPLC (Waters, Milford, MA, USA) était équipé d'un détecteur à barrette de Diode (PDA) de modèle 2996, d´une pompe Auto-Blend et d´un injecteur passeur Smart Seal Optimisation. Le système était relié à un ordinateur équipé du logiciel Empower pour la collection et le traitement mathématique des chromatogrammes. 10

µl d'échantillons étaient injectés avec un débit de 0,25 ml.min^{-1} sur une colonne BEH C18 (150x2,1 mm, 1,7 µm ; Waters) dont la température était maintenue à 35°C tandis que les échantillons étaient gardés à 8°C. L'élution était réalisée grâce à un gradient de deux solvants (solvant A : eau-méthanol-acide formique 100:5:0,1 (v/v), et solvant B : méthanol). Les composés étaient détectés par une barrette de photodiode entre 250 et 360 nm. Le système optimisé consistait en un gradient pas à pas comme suit : de 3 à 5 %B (0-4 min), 5 à 8 %B (4-10 min), 8 %B (10-12 min), de 8 à 10 %B (12-14 min), de 10 à 15 %B (14-17 min), de 15 à 30.1 %B (17-19 min), de 30.1 à 38 %B (19-21 min), de 38 à 41 %B (21-24 min), de 41 à 50 %B (24-30 min), de 50 à 100 %B (30-31 min), 100 %B (31-31,5 min), de 100 à 3 %B (31,5-32,5 min) et 3 %B (32,5-35 min). Ce programme optimisé a permis l'excellente séparation de 23 composés standards (**Figure 20**).

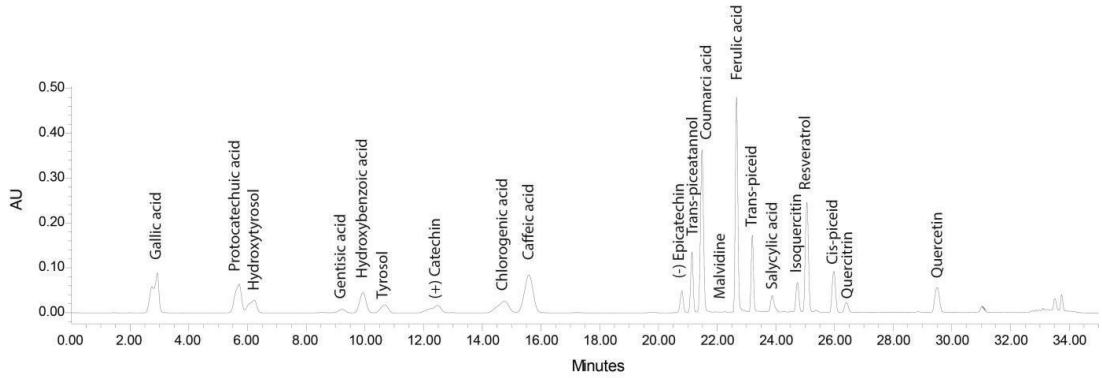


Figure 20: Chromatogramme des composés phénoliques standards séparés par UPLC avec détection à 280 nm.

3.3 Métabolomique

Les analyses métabolomiques ont toutes un déroulement similaire et la **Figure 21** illustre le cheminement classique d'une étude non ciblée. En outre, une partie des travaux réalisés durant cette thèse porte précisément sur cet aspect de développement méthodologique qui sera présenté en détails dans le chapitre 1 de la partie résultats et discussion. Nous ne détaillerons donc ci-dessous que les caractéristiques spécifiques aux outils employés.

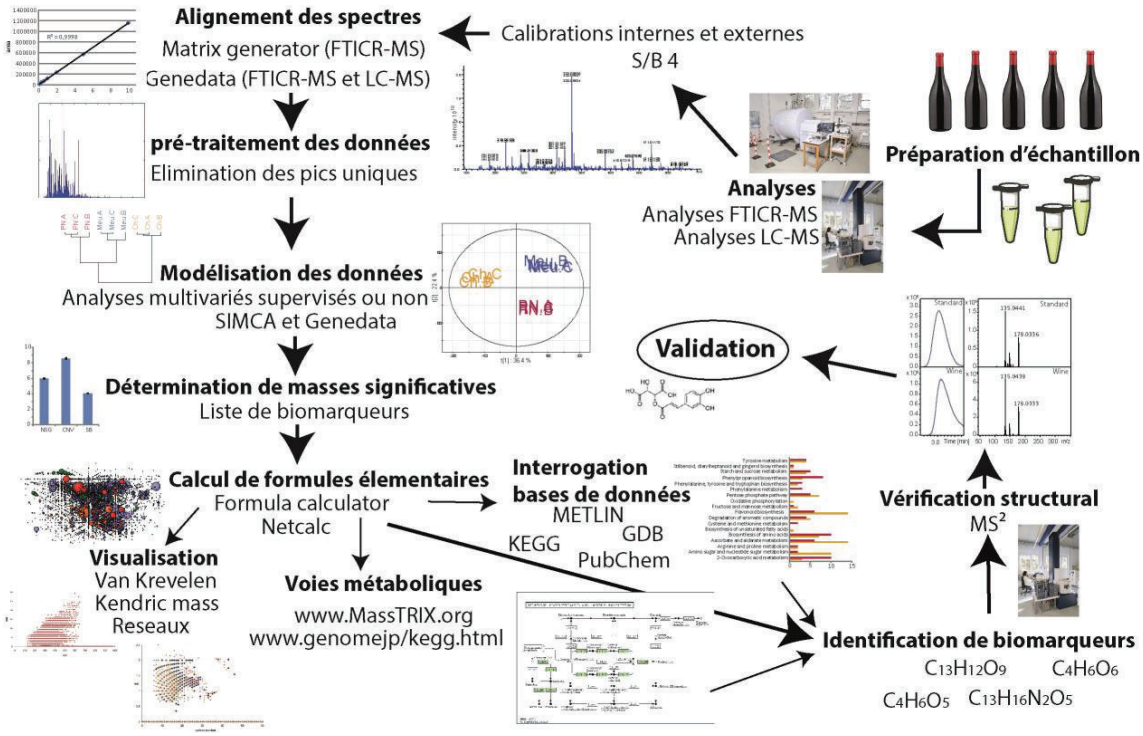


Figure 21: Schéma résumant l'analyse métabolomique pour chaque étude. Après la préparation d'échantillons, les mesures (FTICR-MS et LC-MS) et les processus de calibration commencent. Les spectres sont ensuite alignés et intégrés dans des matrices. La phase de pré-traitement des données est suivie par l'analyse statistique. Une liste de biomarqueurs possible est extraite et représentée graphiquement (van Krevelen). La composition de ces biomarqueurs est exposée par l'interrogation de bases de données et l'analyse des voies métabolomiques. La vérification de l'annotation des biomarqueurs est alors réalisée à l'aide d'une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS^2) permettant l'identification de la structure.

3.3.1 FTICR-MS

Les vins ont étés analysés par un spectromètre de masse SOLARIS (Brucker Daltonics, Brème, Allemagne), équipé d'un aimant supraconducteur de 12 Tesla (Magnex, UK). L'instrument est équipé d'une source d'ionisation par électro spray Apollo II avec la capacité d'ionisation en mode négatif ou positif. Les échantillons peuvent être injectés directement dans une source micro electrospray avec un débit de 120 µL/h. L'injection peut etre manuelle ou à l'aide d'un auto-injecteur d'une capacité de 84 échantillons. Une

calibration externe utilisant une solution de cluster d'arginine à 5ppm préparée quotidiennement est réalisée avant chaque début de run, avec une tolérance de 0,2 ppm. Les spectres ont été enregistrés avec 500 accumulations pour un domaine de 4 MW (megawords), en ionisation négative et pour des valeurs comprises entre m/z 100 et 1000. La préparation d'échantillons pour l'analyse en FTICR-MS consistait en une simple dilution du vin (ou des extraits de pellicule et de pulpe) dans du méthanol dans les proportions 1/20 (soit 50 µL dans 1mL).

Les spectres obtenus par analyse FTICR-MS étaient ensuite calibrés en interne à l'aide d'une liste de masse contenant des acides gras et des composés quasi ubiquitaires du vin (**Annexe 1**), puis filtrés avec un rapport signal sur bruit (S/N) de 4.

La résolution de masse est suffisamment importante, notamment pour les échantillons complexes, pour permettre la différenciation de signaux extrêmement proches les uns des autres (m/z). La résolution d'un instrument est définie par la finesse de ses pics à un pourcentage spécifique de la hauteur des pics, communément 50% en FTICR-MS ou ToF-MS [44]. De plus la résolution est bien plus élevée dans le domaine des petites masses (**Figure 22**).

$$R = \frac{m/z}{\Delta m/z}$$

m/z (masse observée expérimentalement)
Δm/z (largeur du pic à 50% de la hauteur totale)

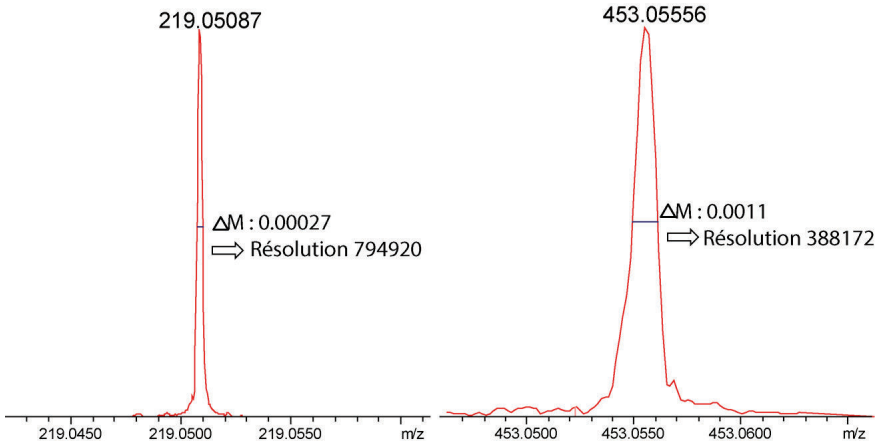


Figure 22: Visualisation de la très haute résolution de la FTICR-MS aux masses 219,05087 et 453,05556 permettant de constater la baisse de résolution avec les hautes masses.

La précision de masse augmente quant à elle de façon synergique avec la résolution et détermine à quel point les masses mesurées expérimentalement reflètent les masses exactes calculées. L'erreur relative est calculée selon le rapport Δm/z (variation de masse entre la masse expérimentale et la masse exacte) sur m/z (masse expérimentale) x 10^6 :

$$\text{Erreur relative [ppm]} = \frac{\Delta m/z}{m/z} \times 10^6$$

3.3.2 UPLC-Q-TOF-MS

Les vins ont ensuite été analysés en utilisant un système de chromatographie liquide à ultra haute performance (Water Acquity UPLC) couplé à un spectromètre de masse UHR-ToF-MS (maXis, Bruker, Allemagne). Deux différents modes de séparation ont été utilisés, la chromatographie en phase inverse (RP) et la chromatographie d'interaction des liquides hydrophiles (HILIC). En mode RP, les métabolites moyennement polaires à apolaires ont été séparés en utilisant une colonne BEH C8 (150 mm x 2,1 mm ID) avec un gradient d'acétonitrile (ACN). Le tampon A consistait en un mélange constitué de 10% ACN dans de l'eau et le tampon B était de l'ACN pur. Les deux tampons ont été additionnés de 0.1% d'acide formique. La séparation des métabolites polaire a été réalisée en utilisant une colonne BEH Amide (150 mm x 2,1 mm ID) avec un gradient passant de 95% d'ACN et 5% d'eau à 50% d'ACN et 50% d'eau, les deux ont été additionnés de 10 mM d'ammonium formiate et

de 0,1% d'acide formique. La préparation d'échantillons pour l'analyse en UPLC-Q-ToF-MS consistait en l'addition de 10 % d'ACN au vin centrifugé.

La détection a été réalisée en mode d'ionisation négative avec les caractéristiques suivantes : pression Nebulizer = 2,0 bar, débit du gaz = 8,0 l/min, température du gaz = 200°C, voltage du capillaire = 3500 V, domaine de masse = 50 à 1000 m/z. La résolution est supérieure à 20000 pour des m/z de 300 et la précision de masse inférieure à 2 ppm dans le cas de l'utilisation d'un instrument UHR-q TOF (**Figure 23**). Les problèmes majeurs de la chromatographie sont la superposition de pics et les décalages de temps de rétention, ce qui peut être maîtrisé par la déconvolution, l'addition de marqueurs de temps de rétention et l'alignement des données obtenues. Pour ce faire, le logiciel Genedata Expressionist Refiner MS permettant la production de matrices construites à partir des identifiants des échantillons, des caractéristiques chromatographiques et de valeurs comme par exemple l'aire des pics et les intensités maximales a été utilisé (Chapitre 1 de la partie résultats et discussion).

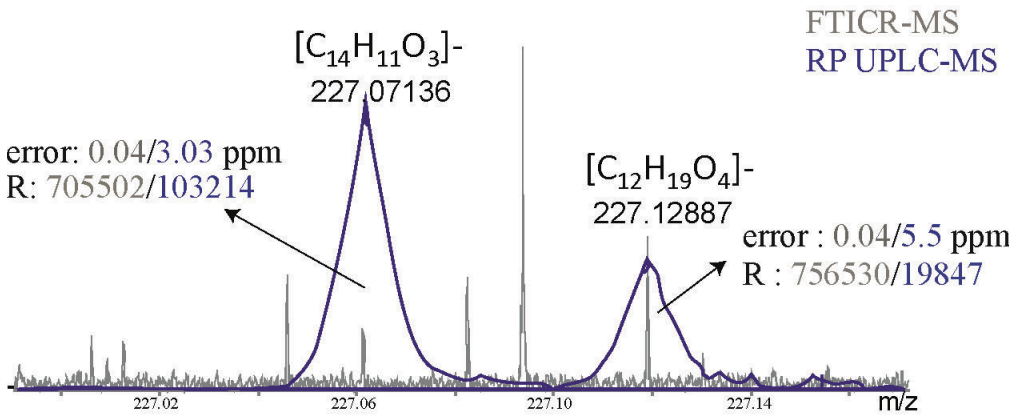


Figure 23: Comparaison de la résolution (R) et de l'erreur de calcul de la masse (error) pour deux pics de masses m/z 227,07136 et 227,12887, permettant de constater la différence de résolution entre RP-UPLC-MS (en bleu) et FTICR-MS (en gris).

3.3.3 La spectroscopie de fluorescence

La fluorescence de vins blancs a été mesurée par spectrométrie de fluorescence en matrice d'excitation et d'émission (EEMF). Cette méthode est efficace pour les solutions transparentes ou diluées, donc tout à fait appropriée pour l'analyse de vins blancs. Les spectres EEMF ont été générés avec un instrument Aqualog Spectrofluoromètre (HORIBA,

Edision, NJ, USA) (**Figure 24**) équipé d´une source de lumière de xénon de 150W. Le détecteur à angle droit mesurait l'excitation par intervalles de 3 nm entre 225-600 nm et l'émission de 210 à 620 nm. Les vins ont été dilués dans un rapport de 1/40 dans de l'eau ultrapure. La cuve (3mL) possèdait une longueur du trajet optique de 1cm. 320 vins blancs, de cépage chardonnay et provenant de différentes appellations en Bourgogne, ont été analysés permetant la création d´un model pour l´analyse statistique par PARAFAC (**Figure 25**). Les millésimes analysés couvraient une large période de 1934 à aujourd'hui.

Les signaux EEMF ont été corrigés pour tenir compte de la dispersion de Rayleigh et de Raman avec une dilution dans de l'eau ultra pure, et normalisés quotidiennement avec un "blanc" de sulfate de quinine. Les spectres ont été analysés par le logiciel Origin (OriginLab, Northampton, MA, USA). Les spectres finaux ont été décomposés statistiquement par l'analyse parallèle des facteurs (PARAFAC) pour en retirer des composantes statistiques permettant d'expliquer les variations entre échantillons. La méthode statistique PARAFAC a été utilisée pour modéliser l'ensemble des données obtenues en utilisant un algorithme alternatif aux PLS en trois dimensions. Le modèle a quant à lui été construit à l'aide du logiciel SoloMio (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA).

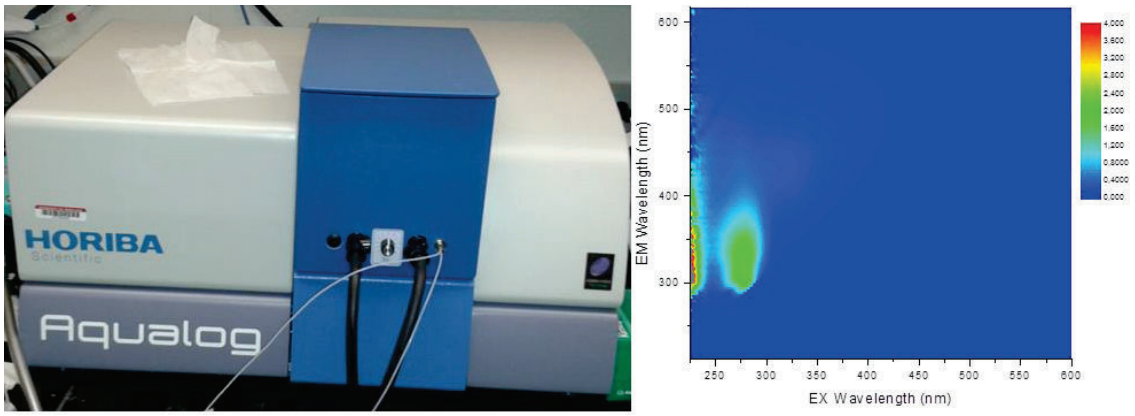


Figure 24: Spectromètre de Fluorescence Aqualog et spectre EEMF pour un vin blanc de cépage chardonnay et de millésime 2010.

Ainsi 324 échantillons de vins, provenant d'origines et de millésimes différents et présentant des états d'oxydation variés ont étés analysés par EEMF. Ils ont permis la construction du modèle statistique PARAFAC et l'extraction de quatres composantes

principale significatives (**Figure 25**), dont les deux premières (C1 et C2) sont majoritaires à plus de 80%.

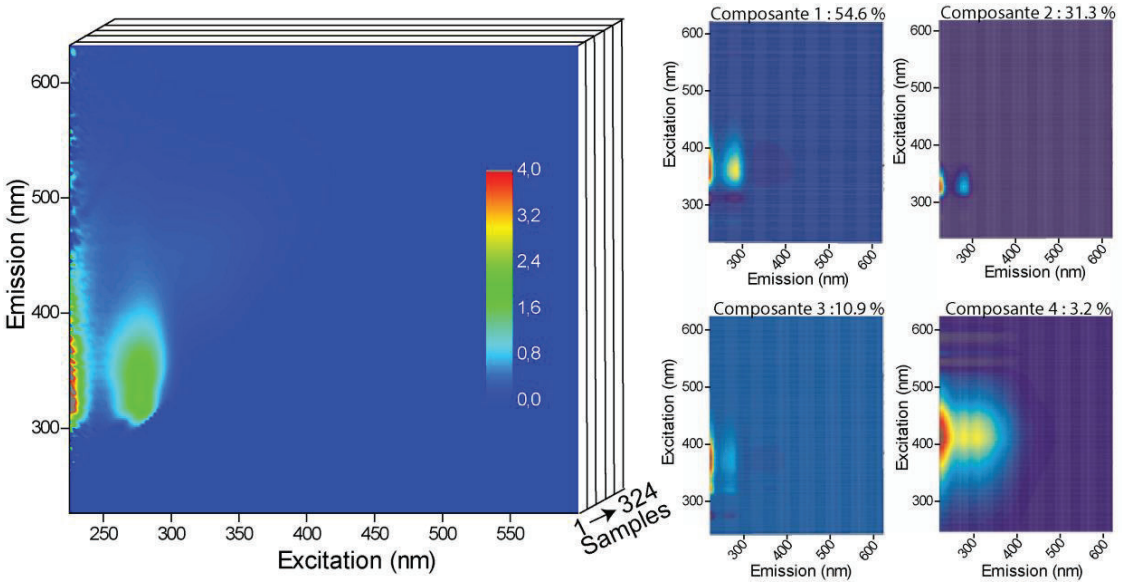


Figure 25 : Spectre EEMF typique d'un vin blanc de Bourgogne et composantes PARAFAC (C1, C2, C3 et C4) déterminées pour l'ensemble des vins blancs de Bourgogne analysés.

3.4 Traitements des données

Les analyses non ciblées génèrent un très grand nombre de données qui nécessitent l'utilisation d'outils statistiques pour avoir un aperçu du profil général de l'ensemble des données mais avant tout pour permettre le passage à un jeu de données plus restreint et discernable à partir des données brutes (94). Deux concepts doivent être distingués : les méthodes supervisées ou non supervisées. Les techniques non supervisées sont généralement utilisées lors des premières étapes d'analyse pour explorer le jeu de données. Les techniques supervisées sont appliquées ensuite pour trouver des éléments permettant un regroupement prédéterminé (258).

3.4.1 Netcalc

Le calcul de réseau Netcalc est un programme développé dans le laboratoire BGC du centre Helmoltz à Munich, basé sur l'établissement d'un graphique non supervisé (259). Les points, ou nœud, représentent les masses exactes et les liens entre les points sont prédéfinis

par des différences de masses correspondant aux principales réactions biochimiques que l'on peut retrouver dans un système biologique. La visualisation du réseau permet de différencier les masses hautement connectées qui vont être représentées au centre, des masses faiblement connectées qui vont se retrouver dans la périphérie du graphique. Le nombre de masses connectées à une masse donnée donne son degré de connectivité. L'utilisation de netcalc pour l'attribution des formules brutes permet de limiter les erreurs et les fausses annotations (Figure 26). L'attribution d'une composition élémentaire à chaque différence de masse distinguant deux composés permet de relier ces compositions élémentaires à des transformations biochimiques permettant de calculer la composition élémentaire d'une masse inconnue à partir du moment où l'un des éléments qui la lie dans le réseau est connu. Par exemple, dans la **Figure 26**, les masses m/z 187,1339 et m/z 203,1526 ont une différence de masse de 16,0187 correspondant à la composition élémentaire NH_2. Si la formule élémentaire de la masse 187,1339 est connue, dans ce cas $[C_{10}H_{19}O_3]^-$, alors la composition élémentaire de la masse 203,1526 peut être déduite par addition de NH_2: $[C_{10}H_{21}NO_3]^-$.

Le développement des réseaux et de leurs applications futures sont en cours au sein de l'équipe de BioGeoChemistry du centre Helmholtz de Munich.

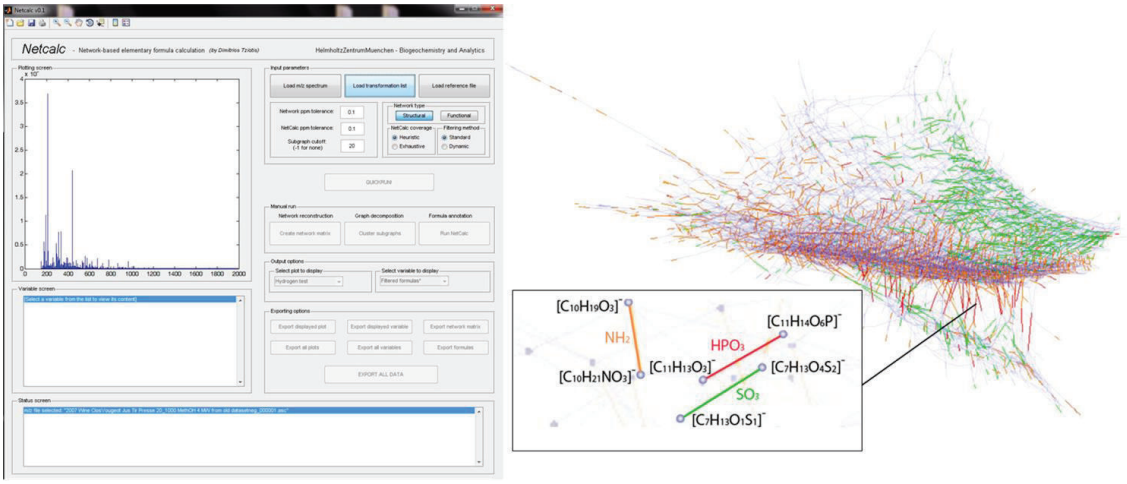


Figure 26: Interface du logiciel Netcalc, et exemple de réseau obtenu à partir de l'utilisation du logiciel netcalc (259).

3.4.2 Diagramme de van Krevelen

Le diagramme de van Krevelen permet d'assigner à chaque formule brute des coordonnées calculées comme étant le rapport entre le nombre d'atomes d'hydrogène et le

nombre d'atomes de carbone (H/C communément représenté en ordonnée) en fonction du rapport entre le nombre d'atomes d'oxygène et le nombre d'atomes de carbone (O/C communément représenté en abscisse). À titre d'exemple, prenons le glucose, de formule brute $C_6H_{12}O_6$. Ses coordonnées seront de 1 pour l'ordonnée (6 H/6 O) tandis que l'abscisse sera de 2 (12 H/6 C) (**Figure 27**). D'autres dimensions peuvent également être incorporées en considérant par exemple les rapports (N/C) ou simplement les masses mesurées (m/z). L'intérêt de tels diagrammes est de trier les compositions élémentaires en familles chimiques (acide aminé, gras, polyphenols etc) et donc de fournir une description visuelle qualitative sur la distribution des familles chimiques du système complexe analysé (**Figure 27**).

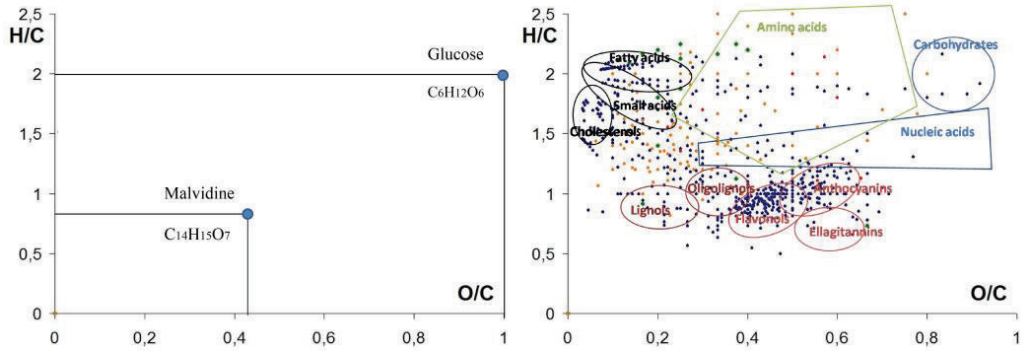


Figure 27: Exemple de diagrammes de van Krevelen montrant le positionnement du glucose et de la malvidine (gauche), et plus généralement de différentes familles moléculaires (droite).

3.4.3 Statistiques

L'analyse non ciblée génère une très grande quantité de données et requiert l'utilisation d'outils statistiques appropriés, tout d'abord pour grouper et aligner les différents spectres de masses en une seule matrice (**Figure 28**), afin de trouver un modèle dans le jeu de données, mais aussi pour compresser et réduire la très grande quantité de données en un jeu de données plus faible et plus perceptible (94). Les statistiques multivariées sont une extension multidimensionnelle des statistiques univariées. Les techniques multivariées peuvent prendre en compte des données de dimension très élevée et ce même en présence de bruit de fond. Deux concepts peuvent être utilisés : les méthodes supervisées ou non supervisées.

Les méthodes non supervisées sont généralement appliquées dans les premières étapes de l'analyse de données, permettant l'identification des valeurs aberrantes et la réduction du

jeu de données. Les techniques supervisées sont utilisées pour trouver les caractéristiques spécifiques de chaque groupe de données. Un grand nombre de techniques peuvent être appliquées, depuis l'analyse par composante principale (ACP) et l'analyse par cluster hiérarchique (HCA) jusqu'aux méthodes supervisées telles que l'analyse discriminante par régression partielle (PLS-DA) et l'analyse discriminante par régression des moindres carrés partiels (PLS : partial Least Squares) (**Figure 31**). Nous présentons brièvement ci-dessous les principales caractéristiques de ces méthodes.

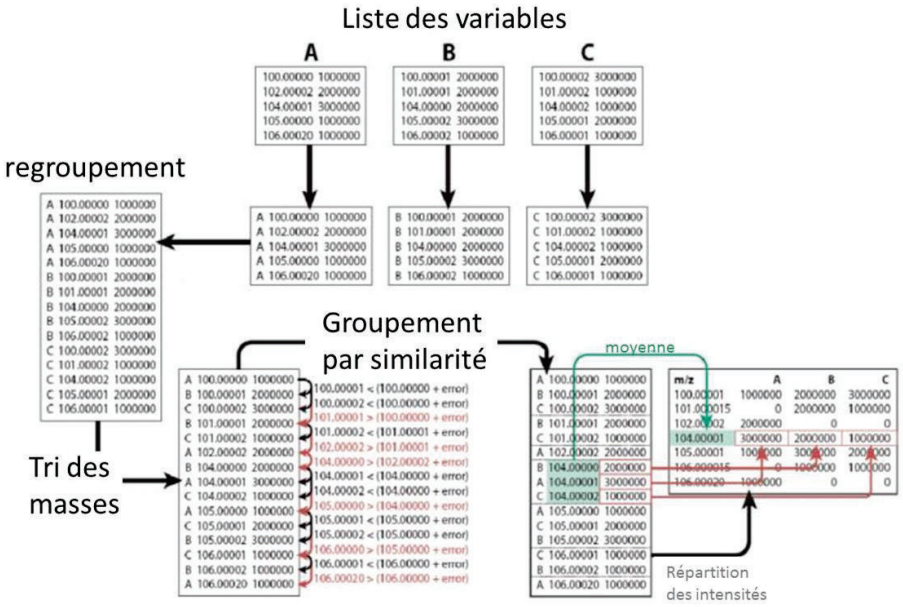


Figure 28: Représentation schématique de l'alignement des spectres de masses. A, B et C représentent les spectres de masses. L'ampleur de la fenêtre de regroupement des masses par similarité est basée sur la moyenne des masses et est déterminée en avance, sur une gamme allant de 1 ppm en FTICR-MS jusqu'à 3 ppm pour la LC-MS. D'après la thèse de Marianna Lucio (260).

Pour définir la qualité des modèles, les paramètres R^2 et Q^2 peuvent être donnés. R^2 mesure la variance expliquée du modèle et permet de voir si le modèle suit les données. Q^2 explique quant à lui la qualité de prédiction du modèle, obtenu par validation croisée. Un bon modèle sera alors caractérisé par un $Q^2 > 0.9$ et la différence entre la valeur de R^2 et Q^2 ne doit pas dépasser 0,2 à 0,3 (**Figure 29**A). Pour les analyses discriminantes (PLS) un test de permutation peut être effectué pour évaluer la qualité de la régression (**Figure 29**B). Ces deux tests permettent la validation de l'analyse statistique (94).

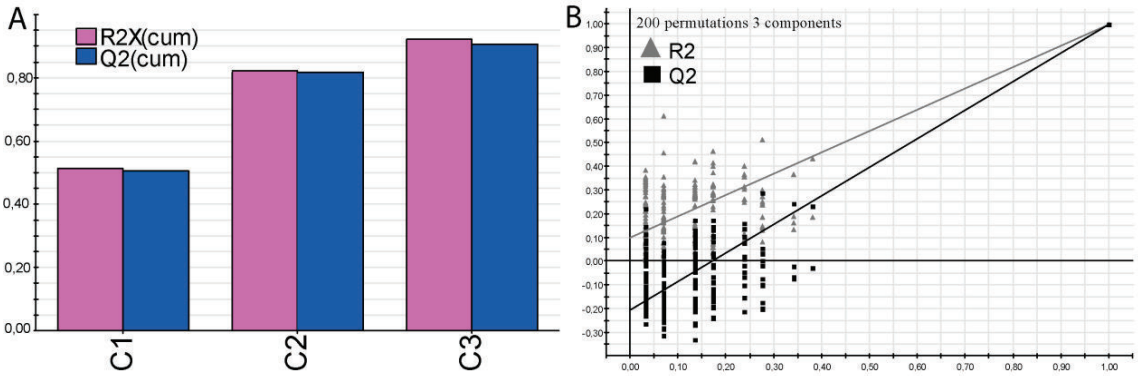


Figure 29: Exemple de validation. Données FTICR-MS issues d'une étude sur des vins provenant de trois domaines différents. (A) valeur de Q2 et de R2X pour les trois composantes C1, C2 et C3. (B) Un test de permutation aléatoire (200 permutations) a été appliqué pour évaluer la robustesse du modèle PLS.

Analyse en composante principale (ACP) : L'analyse en composante principale est une méthode robuste et fréquemment utilisée pour les modèles statistiques multivariés. La dimensionnalité des données est réduite et transformée en composantes linéaires permettant d'expliquer le maximum de variation dans le jeu de données (**Figure 31**). L'ACP permet la visualisation rapide et puissante des données, les échantillons possédant des profils métaboliques similaires étant groupés et séparés de ceux possédant des profils différents (261). Par conséquence l'ACP donne la possibilité d'explorer rapidement les données.

Analyse hiérarchique des clusters (HCA) : Une autre méthode fréquemment utilisée permettant de réduire la complexité des jeux de données est l'analyse hiérarchique des clusters (HCA). C'est une analyse multivariée qui a pour but de trouver des groupes relativement homogènes, les données y sont organisées en groupes basés sur leurs similarités avec quantification de celles-ci sous forme de distances (**Figure 31**). Le résultat est présenté sous forme de dendrogrammes et/ou de cartes d'intensités (**Figure 30**).

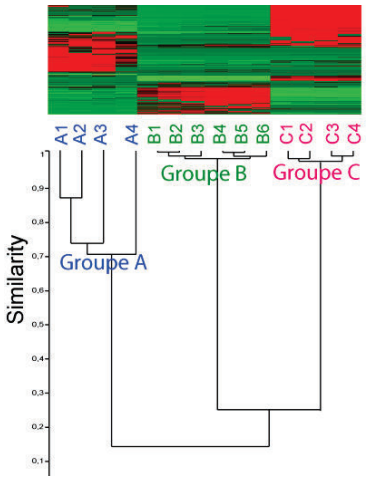


Figure 30: Exemple de dendrogramme avec la carte d'intensité correspondante séparant trois groups d'échantillons (A, B et C). Données FTICR-MS issues d'une étude sur des échantillons provenant de trois catégories : vin, extrait de pellicule et pulpe.

Méthodes supervisées: L'analyse discriminante par régression partielle (PLS) est une méthode d'analyse multivariée classiquement utilisée. Le processus est similaire à l'approche par ACP, mais les composantes doivent avoir une corrélation avec le vecteur de prédiction (Y), et chaque composante est vérifiée par validation croisée. La PLS consiste à remplacer la matrice de données comprenant n lignes et m colonnes, par une nouvelle matrice, comprenant le même nombre de lignes (n) mais un nombre de colonnes très inferieur par combinaison linéaire des variables (m) d'origine (**Figure 31**).

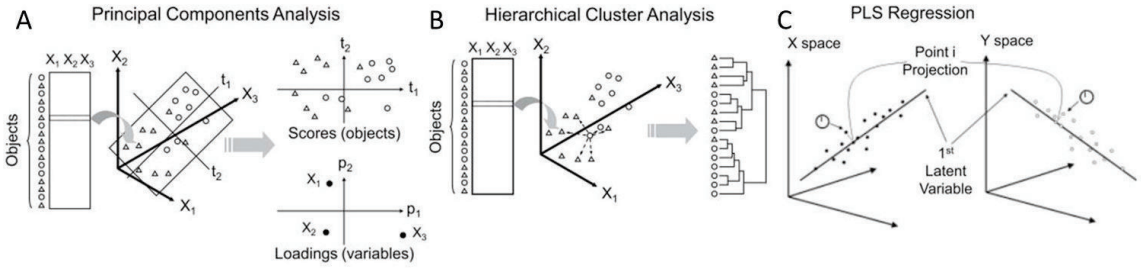


Figure 31: Illustration des principes de l'ACP, du cluster hiérarchique et de la PLS (258) : (A) L'ACP projette les données multivariées selon les composantes qui possèdent la variance maximum. (B) Le cluster hiérarchique classe les objets par mesure de la similarité. (C) La PLS est basée sur la combinaison linéaire des variables X et utilise les informations de Y pour ajuster le modèle (258, 262, 263).

3.4.4 Bases de données

Si les analyses moléculaires non ciblées présentées auparavant présentent indiscutablement des avantages précieux (sensibilité, précision sur la mesure de la masse), elles ont également leurs limites dont la principale est de ne pas pouvoir fournir directement une information structurale. Par conséquent, l'exploitation des données mesurées, tout en cherchant à conserver la richesse de l'information (signature complexe), impose de passer par une étape de formulation d'hypothèses structurales. Pour cela, différentes stratégies peuvent être mises en œuvre, dont l'interrogation de bases de données.

MassTRIX est un serveur informatique – originalement développé par Karsten Suhre et Phillippe Schmitt-Kopplin – pour l'annotation directe de données FTICR-MS à partir de la comparaison avec des données structurales associées à des voies métabolomiques connues (264). Une nouvelle version a été mise à jour pour permettre la combinaison des données issues d'analyses de transcriptomique et de metabolomique (265).

La fonctionnalité de base utilise une liste de masses données et la compare à une liste de masses théoriques ainsi qu'avec des adduits (pour une ionisation négative ; [M-H]-, [M+Br]- et [M+Cl-]- et pour une ionisation positive ; [M+H]+, [M+Na]+ et [M+K]+) provenant d'une base de données avec une marge d'erreur connue (**Figure 32**). Des métabolites provenant de diverses bases de données sont utilisés par MassTRIX pour le processus d'annotation et les masses sont recalculées en se basant sur les masses exactes des formules moléculaires conservées dans chaque base de données. MassTRIX utilise les bases de données KEGG, HMDB, Lipidmaps et MetaCyc mais peut également rechercher des annotations a partir de bases de données spécifiques telles que GDB, base de données interne spécifique au raisin et au vin (**Figure 32**). Cependant ces bases de données sont loin de répertorier l'ensemble des métabolites qui sont potentiellement présents dans les matrices biologiques et permettent donc une annotation limitée des composés du vin.

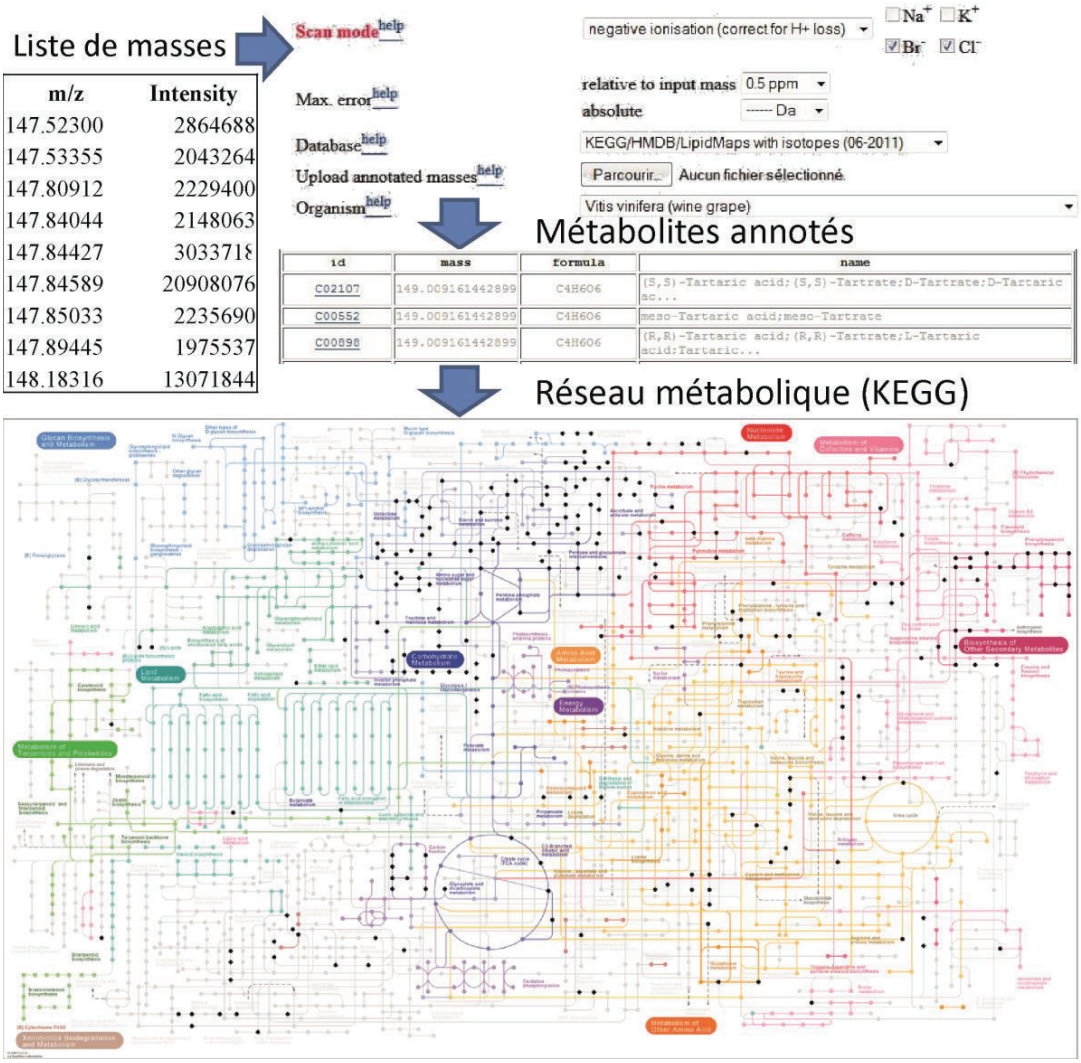


Figure 32: Processus d'utilisation de MassTRIX et KEGG pour les données métabolomiques. Les masses annotées par MassTRIX dans l'échantillon de vin et pour l'organisme *Vitis vinifera* sont cartographiées dans le réseau métabolique obtenu par KEGG.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Cette partie est organisée en chapitres autour de l'analyse métabolomique de la diversité chimique de vins en bouteille. Sont présentées ici, tout d'abord des aspects de développement méthodologique et ensuite les applications de ces développements à l'analyse du vin.

Cette partie se décompose donc en quatre chapitres qui sont présentés sous forme d'articles scientifiques – tous finalisés – qui sont soit en cours de soumission, soit acceptés ou publiés :

Chapitre 1 : Développements méthodologiques

Chapitre 2 : Étude de séries verticales de vins et vieillissement en bouteilles

Chapitre 3 : Pratiques œnologiques et diversité chimique

Chapitre 4 : Application à l'étude du terroir

Chapitre 1 : Développements méthodologiques

1 Développement et application de deux approches combinées pour l'analyse non ciblée du vin.

L'objectif principal de cette étude était de combiner la spectrométrie de masse à résonnance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier (FTICR-MS) et la chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS) pour l'analyse non ciblée des métabolites du vin.

L'avantage de la combinaison de ces méthodes réside dans la très haute résolution de mesure des masses permise par la FTICR-MS et dans la séparation des isomères et isobares par l'UPLC-MS, ce qui augmente de façon significative le nombre de métabolites détectables et identifiables dans le vin. Cette combinaison, que nous présentons comme une plateforme analytique (FTICR-MS et UPLC-MS), est associée aux outils statistiques multivariés et à l'interrogation de bases de données qui apportent une description nouvelle de la complexité chimique du vin. En plus de la détection de nouveaux métabolites, cette combinaison d'analyses permet de confirmer les résultats obtenus par une méthode directement à l'aide des données obtenues par l'autre. Cette méthodologie est illustrée par la comparaison de l'espace chimique de deux vins rouges de Bourgogne, l'un récent et l'autre très ancien, datant probablement du début du 19ème siècle.

La combinaison de deux méthodes chromatographiques, phase inverse (RP) et interaction hydrophilique (HILIC) couplées à la spectrométrie de masse permet d'associer à une masse exacte, mesurée par FTICR-MS, jusqu'à 5 isomères pour la gamme de masse explorée. Cette combinaison analytique est appliquée à l'analyse du vin et permet la comparaison de l'empreinte chimique des deux vins. Les espaces chimiques composés des éléments CHO, CHOS et CHONS montrent une plus grande diversité dans le vin ancien, illustrant le procédé d'oenodiagénèse lors du vieillissement du vin, tandis que les composés contenant de l'azote (CHON) semblent disparaitre dans le vin ancien, ce qui peut être expliqué par leurs précipitations.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié, en 2015, dans le journal scientifique Tetrahedron.
DOI :10.1016/j.tet.2015.02.054

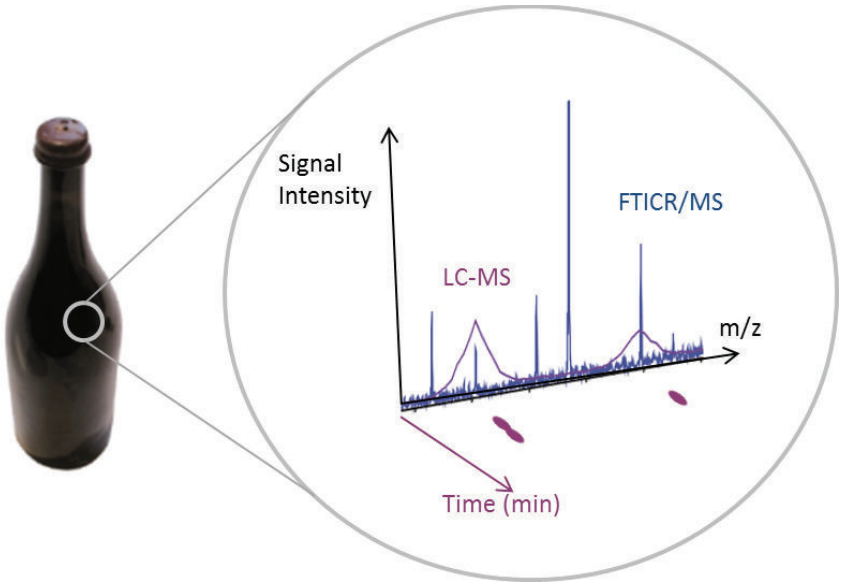
Integrating analytical resolutions in non-targeted wine metabolomics

Roullier-Gall C.[a,b], Witting M.[b], Tziotis D.[b], Ruf A.[b], Gougeon R.D.*[a] and Schmitt-Kopplin P.*[b,c]

[a] Equipe Procédés Alimentaires et Physico-Chimie (PAPC), UMR PAM Université de Bourgogne/Agrosup Dijon, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, Dijon, France.
[b] German Research Center for environmental Health, Department of BioGeoChemistry and Analytics, Helmholtz Zentrum Munchen, Germany.
[c] Chair of Analytical Food Chemistry, Technische Universitat Munchen, Freising-Weihenstephan, Germany.

Correspondence:
Pr Régis Gougeon
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot UMR PAM Université de Bourgogne/Agrosup Dijon
Rue Claude Ladrey, 21000 Dijon, France
regis.gougeon@u-bourgogne.fr
Pr Philippe Schmitt-Kopplin
HelmholtzZentrum München Department of Environmental Sciences (DES) Research Unit Analytical BioGeoChemistry (BGC) Ingolstaedter Landstrasse 1 85764 Neuherberg Germany
schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

Graphical abstract



Abstract

In the present study, we have combined direct injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICR-MS), and ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS) for the non-targeted analysis of wine metabolites. The advantage of such combination relies on the unrivalled resolution on mass measurement allowed by the former and on the separation ability of isomeric and isobaric substances by the latter, which clearly increases the scope of detectable unknown metabolites in wines. In combination with multivariate statistical tools and the questioning of relevant databases, these analytical platforms (FTICR-MS, UPLC-MS) provide an unprecedented synoptic description of the chemical complexity of wines, where results obtained with one platform can directly be validated with data from the other. Such methodology is illustrated here through the comparison of chemical spaces of a young and an older Pinot noir wine from Burgundy. As shown for several exact masses measured by FTICR-MS, the combination of both RP and HILIC chromatography can reveal up to five isomers for a given mass, throughout the explored mass range. Interestingly, CHO, CHOS and CHONS chemical spaces exhibited higher diversities in the older wine, illustrating a molecular oeno-diagenesis process during wine ageing, whereas nitrogen-containing compounds (CHON chemical space) appeared to be fewer in the older wine, likely due to precipitation. Even though it is applied to only two wine samples here, this methodological combination is a promising contribution to the wine metabolomics toolkit.

Keywords: Wine, metabolites, direct injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry

1. Introduction

Most of the current analyses of wine with classical analytical targeted technologies have definitely contributed to a better knowledge of the wine chemistry (Flamini, 2013). Alternatively, metabolomics approaches have shown great potential for the study of grape or wine and they have helped to unravel the extremely high yet unknown chemical diversity of wine (Gougeon et al., 2009). Metabolomics is considered here as the non-targeted metabolite

analysis through the semi-quantitative description of all low molecular weight metabolites in a specified biological sample (wine) (Gougeon et al., 2009; Tarr et al., 2013; Forcisi et al., 2013; Theodoridis et al., 2012; Müller et al., 2013). Typical analytical techniques used in metabolomic research are FTICR-MS, LC-MS, GC-MS and NMR spectroscopy combined with multivariate statistics, and the advantages and disadvantages of these different analytical tools have been well described (Theodoridis et al., 2012; Cevallos-Cevallos et al., 2009; Heeren et al., 2004; Hertkorn et al., 2007; Hong, 2011).

Although limited in sensitivity, non-invasive sampling and structural identification of organic compounds are only two of the advantages of NMR spectroscopy, which has allowed the differentiation of wines according to the grape variety (Kashif et al., 2011), the geographical origin of grapes (López-Rituerto et al., 2012), or the vintage (Kashif et al., 2011). In contrast, mass spectrometry allows the identification of a larger number of metabolites and even more when liquid chromatography is used before the MS detection to allow for the determination of different isomers and isobars. Several articles have already been published on wine metabolomics using LC-MS, which enabled the classification and differentiation of wine attributes such as grape variety, vintage and quality (Cuadros-Inostroza et al., 2010), or to visualize the changing metabolic profiles during late berry developments (Toffali et al., 2011).

Ultra high resolution mass spectrometry can provide – with an unprecedented sensitivity – a highly resolved description of wine fingerprints, as shown for the first time by Cooper and Marshall in 2001 (Cooper and Marshall, 2001). A few years later, this method allowed the characterization of must and wines of six varieties of grapes (Catharino et al., 2006), the discrimination of wines according to the geographic origin of oaks used for barrel aging (Gougeon et al., 2009), or the identification of distinct chemical fingerprints between a champagne served in a glass and its aerosol above the glass (Liger-Belair et al., 2009). High resolution FTICR-MS is now able to reveal the diversity of metabolites present in complex biological systems and enables the distinction and characterization of wines according to their terroirs, vintages, or qualities (Cuadros-Inostroza et al., 2010; Catharino et al., 2006; Villagra et al., 2012; Roullier-Gall et al., 2014).

Combined analytical methods have already demonstrated the molecular complexity and diversity in various systems including meteorites (Schmitt-Kopplin et al., 2010),

Chlamydia pneumonia infections (Müller et al., 2013) or natural organic matter (Hertkorn et al., 2013). The possibility of combining analytical tools is vast, but LC-MS and FTICR-MS appear to be very effective combined tools for the study of wine because they combine ultra-high resolution and sensitivity with selectivity and isomer identification. Increasing the range of detectable metabolites in wine or in any other biological samples is a challenge for the better understanding of their physico-chemical and/or organoleptic properties, of their ageing ability or even for authentication purposes (Gougeon et al., 2011). The literature indeed reports various studies where correlations between a specific property of wines and their actual chemical compositions were constrained because of the limited number of targeted compounds (Sauvageot and Feuillat, 1999), thus illustrating the necessity to integrate a more comprehensive chemical diversity through the research of yet unknown metabolites for the identification of subtle discriminations (Gougeon et al., 2009). To that respect, the combination of DI-FTICR-MS analysis with two orthogonal UHPLC-MS methods increases the scope of detectable metabolites, decreases putative ion suppression effects and achieves a separation between isomeric and isobaric compounds. These analytical platforms combining high resolution mass spectrometry (HRMS) and ultrahigh resolution mass spectrometry (UHRMS) thus provide an unprecedented synoptic description of the chemical complexity of wines, where results obtained with one platform can directly be validated with data from the other.

2. Material and methods

2.1. Materials

Methanol, acetonitrile and water (LC-MS grade) were purchased from Fluka Analytical (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Low concentration ESI Tuning Mix for Q-ToF calibration was obtained from Agilent (Agilent, Waldbronn, Germany).

2.2. Sampling and sample preparation.

All of the measurements were done on two Pinot noir wines from Burgundy with a young 2009 vintage and an older wine from the nineteenth century (exact age unknown), sampled directly from the bottles in 2 ml vials under argon to protect them from oxygen. 50

µl of wine was diluted into 950ml methanol for FTICR-MS analysis and 40 µl of acetonitrile was added to 960 µl of wine with for both RP and HILIC LC-MS analysis.

2.3. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Analysis (FTICR-MS).

Ultra high-resolution mass spectra were acquired using an FTICR-MS instrument (solariX, Bruker Daltonik, Bremen, Germany) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet and an Apollo II electrospray ionization source operated in the negative ionization mode. Samples were introduced at a flow rate of 120 $\mu L.h^{-1}$ using a syringe pump. The MS was externally calibrated on clusters of arginine (10 $mg.L^{-1}$) in methanol. Spectra were acquired with a time domain of 4 mega-words per second with a mass range from m/z 100 to 1000 to guarantee a high accuracy in elemental formula assignments in this proof-of-principle study. Up to 500 scans per sample were accumulated. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR) spectra were internally recalibrated on list composed by fatty acids and recurrent compounds in wine, linear until m/z 600, with mass errors below 50 ppb and peak with a signal-to-noise ratio (S/N) of 4 and higher were exported to peak lists. In conjunction with an automated theoretical isotope pattern comparison, the generated formulas were validated by setting sensible chemical constraints (n rule; O/C ratio ≤ 1; H/C ratio $\leq 2n+2$; element counts: $C \leq 100$, $H \leq 200$, $O \leq 80$, $N \leq 3$, $S \leq 3$ and $P \leq 1$).

2.4. Ultra performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry Analysis (UPLC/Q-ToF-MS).

Analyses were performed on a Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, USA) coupled to a maXis™ UHR-ToF-MS (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) system using reversed phase (RP) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) separation. Sample analyses were carried out in (-) ESI.

RP separation was performed using a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 µm; 1.0x150 mm) using gradient elution with an initial isocratic hold of 100% A for 0.5 min, followed by a linear increase to 100% solvent B in 4.9 min, isocratic conditions for 3 min and return to initial conditions in 1.6 min (solvent A: 10% ACN, 1 mM ammonium formate; solvent B: 100% ACN).

HILIC separations were performed on a Waters ACQUITY UPLC BEH Amide column (1.7 µm; 2.1x150 mm) using a two-step gradient elution program from 100% A to 100% solvent B (solvent A: 95% ACN, 5% water, 1 mM ammonium formate; solvent B: 50% ACN, 50% water, 1 mM ammonium formate).

The flow rate for both separation modes was set to 0.25 ml/min with a column temperature of 40 °C and a full loop injection of 10 µl.

UHR-ToF-MS acquisitions were carried out in profile spectra mode with 1 Hz accumulation time. Instrument tuning focused on detection and resolution of molecular weight compounds in the mass range of 50-2000 Da. Mass calibration was carried with Low Concentration ESI Tuning Mix (Agilent, Waldbronn, Germany). Data was exported to mzXML format using Bruker Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). MZmine 2.6 was applied for peak alignment and extraction (http://mzmine.sourceforge.net/).

2.5. Network Analysis

To obtain chemical formulas for subsequent use in querying chemical databases, exact masses were subjected to mass difference network analysis using the Netcalc algorithm and in-house software tool (Tziotis et al., 2010). In a mass difference network, nodes represent m/z values (metabolite candidates) and edges represent chemical reactions. Netcalc enables network reconstruction by comparing the mass differences of all experimental masses of a mass spectrum to a list of user-defined theoretical mass differences (selected according to atomic units, e.g. C, H, N, O, S, P, or common functionality groups, e.g. homologous series of CH_2, H_2, or OH (Table S1). The mass difference list used in this example was optimized to detect chemical differences between all annotatable nodes in the experimental data in order to reveal patterns in compositional or functional chemical spaces. The purpose of mass difference network analysis is the visualization of the sample's compositional structure and the calculation of elemental formulae of experimental masses. In such a scale-free network, highly inter-connected nodes tend to cluster together while sparsely connected ones are peripherally dispersed. Netcalc increases the percentage of m/z peaks, which can be assigned to a preliminary formula up to a 40-60% per dataset including isotope peaks ^{13}C (Forcisi et al., 2013). The goal of this model is the visual and mathematical evaluation of organic molecular complexity in terms of elemental composition, an approach that permits explicitly defined relationships between different samples (Tziotis et al., 2010).

Table S1: Mass differences used for functional network calculation.

Difference formula	Biological meaning	mass difference
CH_2	methanol (-H_2O)	14.01565
H_2	reduction/oxydation	2.0156501
OH	hydroxylation (-H)	15.994915
CO_2	Carboxylation	43.989829
^{13}C	Carbon-13	1.003355
N	tertiary amine	14.003074
NH	secondary amine	15.010899
NH_2	primary amine	16.018724
S	Thiol	31.972071
SO_3	sulfate (-H_2O)	79.956816
HPO_3	Phosphate	79.966332

3. Results

3.1. FTICR-MS

To explore its nature and generate a chemical fingerprint each sample was first analyzed by direct injection ESI (-) FTICR-MS as previously described (Gougeon et al., 2009; Liger-Belair et al., 2009; Roullier-Gall et al., 2014). Negative ionization was used as it provides a higher number of different resolved ion signals in the chosen mass range than the positive ionization mode (Hertkorn et al., 2008). The ultra-high resolution power of FTICR-MS spectra enabled the detection and distinction of more than 4847 mass signals with a signal-to-noise ratio of ≥ 4 in the negative-ion mode in the 100-1000 Da mass range from younger wine (Fig. 1). Only singly charged peaks were detected as shown in the enlargement of the young wine mass spectrum (Fig. 1). Using exact mass difference network analysis (Netcalc), most of the experimental data could be converted into elemental compositions and more than 2048 of the 4847 observed m/z signals were converted into elemental compositions based on the main isotopic elements (^{12}C, ^{14}N, ^{17}O, ^{32}S, H) within an error window of 200 ppb; the other signals comprise the corresponding isotopologues (involving also ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O, ^{34}S in their natural abundance) and possible adducts, and were used for elementary composition validation. A resolving power (R), greater than 500,000 at mass 400,

and defined as the observed mass centroid divided by the mass peak width at 50% height for a well-isolated single mass spectral peak, was achieved. An enlarged spectrum showing the fine structure in the mass range 227.00-227.25 (Δm = 0.25 Da) is shown in Figure 1 (average R is 934,168 in this nominal mass). The FTICR-MS detected 10 masses in a 0.2 Da window separating several nearly isobaric substances. The peak at m/z 227.0713 corresponds to the $[M-H]^-$ ion with the mass formula $[C_{14}H_{11}O_3]^-$ and can most likely be assigned to resveratrol isomers. The corresponding van Krevelen diagram (Fig. 1) revealed a wine with typical positioning of the respective molecular series (acting as a typical foot print or bare code with molecular information at this level of data visualisation). This wine appeared very complex in CHO and CHON with the CHO compounds having higher intensities. Carbohydrate-containing molecules (top right corner of the van Krevelen diagram) were particularly dominant. In comparison, the older wine exhibited more CHO, CHOS and CHONS containing compounds (Fig.1 in grey), whereas the opposite was observed for CHON containing compounds, which were more abundant in the younger wine. As far as wine ageing is concerned, this result is particularly interesting since it is usually thought that upon ageing wine gets depleted due to the precipitation of colloids or proteins along with polymerized tannins and tartar salts (Flanzy, 1998). Indeed, if this could explain the observed trend for CHON compounds, through for instance the precipitation of polypeptides or proteins, this would not be true for the numerous CHO, CHOS and CHONS compounds in the older wine, which thus witness to the fact that wine ageing is actually driven by a chemical balance between some precipitation and the oeno-diagenesis of age-related metabolites, including for instance the anoxic depolymerization of tannins.

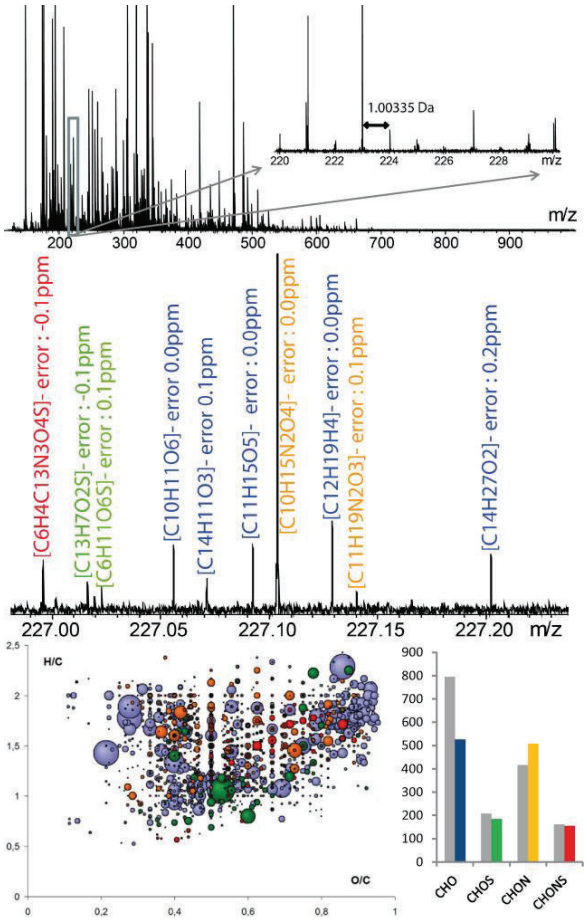


Figure 1: Progressive detailed visualization of the ESI (-) FTICR/MS spectrum from 2009 wine in the mass ranges 100-1000Da, 220-230Da and 227.00-227.25Da with credible elemental formula assignments. Visualisation of the FTICR/MS data as a van Krevelen diagram (H/C vs. O/C atomic ratios), and through the relative frequency histogram of CHO (blue), CHOS (green), CHON (yellow), CHONS (red) elemental compositions of a 2009 red wine and an older red wine (grey). The bubble sizes correspond to the number of compounds having the same O/C and H/C ratio.

Mass difference network analyses were used to determine elementary compositions and thus improve metabolite annotation as well as visualize functional connectivity within the data (Fig.2). Using common structural functional-group (Fig.2 and Table S1), which may be seen in highly complex data, a mass difference network was created. For these wine samples, several regions (colour codes) showed a local density of masses with mostly CHO compounds. Sulphur-containing compounds (CHOS and CHONS) seemed to be distributed over the entire network showing an unspecific reactivity of sulphur within the structural

domain. Some sub networks appeared to be disconnected from the main graph, showing that the functional mass differences list may be incomplete; ongoing work implies the mass difference networking based on more than hundred biological transformations derived from databases and literature to set up a more comprehensive metabolic. Only simple transformations like oxidation can be represented by mass differences. Frequencies of individual modifications can be found in the histogram (Fig.2). Highest frequencies were found for hydroxylation or oxidation/ reduction (the gain of OH or the gain or loss of H_2, respectively). The comparison with the older wine (in grey (Fig.2)) provides additional details. The distribution of modification frequencies is preserved in the older wine, although with some differences, particularly for N-containing transformations. Interestingly, there were more than three times more NH transformations in the younger wine while N and NH2 transformations were more prevalent in the older one, thus indicating a higher content in peptide like containing compounds in the latter. This is all the more interesting because typical peptide like containing compounds are supposed to be good substrates for oxidation and/or precipitation during wine ageing. Oxidation of polyphenolic compounds is another classical example of the evolution of the wine chemistry upon ageing (Cheynier et al., 2006), in particular during the first years of bottle storage, and after a certain time, more condensed structures tend to precipitate. When combined with a lower occurrence of CHO chemical formulas (Fig.1) the higher occurrence of OH structural transformations in the younger wine observed here also witnessed to the fact that the chemical diversity of CHO containing compounds in the older wine, including polyphenolic structures, is the result of mechanisms other than oxidation upon such long ageing.

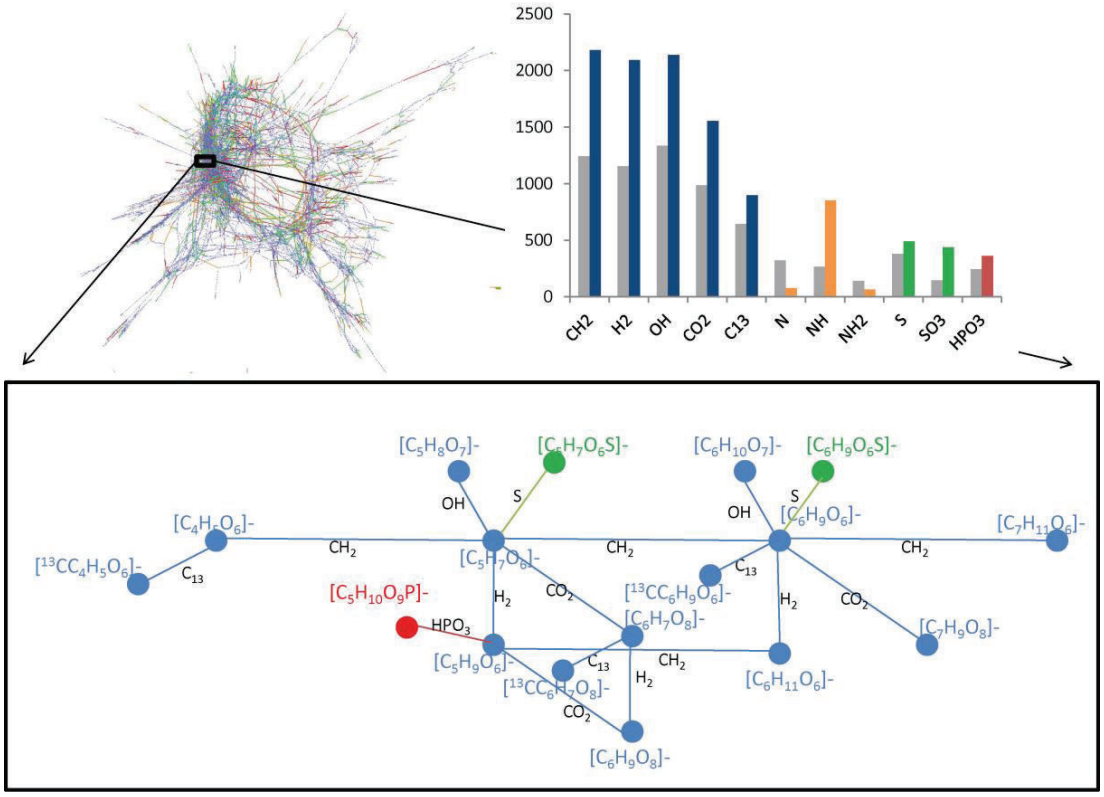


Figure 2: Overview on Netcalc networks. Main network from negative ionization mode, Counts of different mass differences observed in the main network and enlargement of this network centered on few masses. Color code : CHO (blue), CHOS (green), CHON (yellow), CHONS (red) of red wine and an older red wine (grey).

As an illustration of the complexity of the network, a sub region has been magnified (Fig. 2). In this case, the enlargement of a small portion of the network illustrated the high connectivity between masses. It focused on 163.02481, 165.04046 and 207.01464 masses, which correspond to $[M-H]^-$ ions with the following mass formulas: $[C_5H_7O_6]^-$ which could be attributed to tartaric acid, $[C_6H_9O_6]^-$, which could be attributed to dimethyl tartrate and $[C_6H_7O_8]^-$ which could be attribute to hydroxycitrate. As an example, m/z 163.02481 ($[C_5H_7O_6]^-$) is connected to m/z 177.04046 ($[C_6H_9O_6]^-$) by an accurate 14.01565 mass difference, which corresponds to a CH_2. This means that the difference between these two masses (a CH_2 group) can be used to find the elemental composition of the second metabolite based on the elemental composition of the first one. In this case, Netcalc adds CH_2 to the initial formula $[C_5H_7O_6]^-$, providing a composition of $[C_6H_9O_6]^-$ for the 177.04046 mass.

Similarly, the m/z 165.04046 ($[C_6H_9O_6]^-$) is connected to the mass ($[C_6H_{11}O_6]^-$) by the mass of H_2 (2.01565 Da), a difference which is itself connected to the m/z 165.04046 ($[C_5H_9O_6]^-$) through a CH_2 (14.01565 Da) exchange, which is itself connected to the m/z 163.02481 ($[C_5H_7O_6]^-$) by H_2 (2.01565 Da). This same mass is also connected to 4 other masses in addition to the 165.04046 and 163.02481 masses ($[C_6H_9O_6]^-$ and $[C_5H_7O_6]^-$), and each of these masses are themselves connected to other masses. Through this approach, this network theoretically enables the calculation of the elemental formulas of multiple metabolites in a sample, starting from a small number of known metabolites.

3.2. Combination of FTICR-MS, reverse phase and HILIC UPLC/Q-ToF MS

FTICR-MS is thus a sensitive and powerful analytical tool, which allows for a rapid detection of several thousands of masses with high resolution and high mass accuracy. It enables the calculation of elemental formulas using accurately measured masses, and the direct annotation of potential metabolites and sum formulas. To increase the scope of detectable metabolites and get structural information, in particular through the separation of isobaric and isomeric compounds, data obtained by direct infusion FTICR-MS can be combined with data obtained by on-line UPLC/Q-ToF-MS techniques. Since FTICR-MS combines excellent mass accuracy and ultra-high resolution, it offers high sensitivity and dynamic range, which allows the detection of analytes on a wide range of concentrations (Brown et al., 2005) and the combination with two orthogonal UPLC/Q-ToF-MS methods increases the scope of detectable metabolites, decreases putative ion suppression effects and achieves a separation between isobaric substances (Müller et al., 2013; Forcisi et al., 2013). The advantages and disadvantages of metabolomics methods are given in Table S2.

Table S2: Advantages and disadvantages of FTICR/MS and LC/MS metabolomics methods.

Method	Advantage	Disadvantage
FTICR/MS	•Direct injection •Fast •Ultra high resolution (>500000) •Ultra high mass accuracy (<0,2ppm) •Ultra high sensitivity	•No separation of isobaric •No separation of isomeric substances •Restricted to ionizable compounds •Molecules competing for ionization
UPLC/MS	•High resolution (>50000) •High scaning rate •High sensitivity •Separation of isobaric substances •Separation of isomeric substances	•Slow •Restricted to ionizable compounds

To enable good sensitivity in FTICR-MS an accumulation of many hundreds of scans (minutes scale) is needed in the instrumental setup leading to highest resolution in full scan; coupling of FTICR-MS to liquid chromatography is certainly possible but only in reducing to single scans (second scale of a chromatographic signal) thus only with consequent reduction in sensitivity and spectral resolution (Forcisi et al., 2013). In LC-MS, metabolites were first separated using either reversed phase (RP) or hydrophilic liquid interaction chromatography (HILIC) and then detected Q-ToF-MS. To demonstrate the complementary nature of both methods, retention times of 51 standards compounds including amino acids, sugars and organic acids, were measured under RP and HILIC conditions (Table S3). These were plotted against their calculated logP values for reversed phase separation (in red) and HILIC separation (in blue) (Fig.3 and Table S3). Serine for example, a very polar metabolite with a logP value of -3.07, exhibits a retention time value of 1.4 in RP and 8.4 in HILIC, while lauric acid with a logP value of 4.6 shows a retention time value of 6.9 in RP and 2.1 in HILIC.

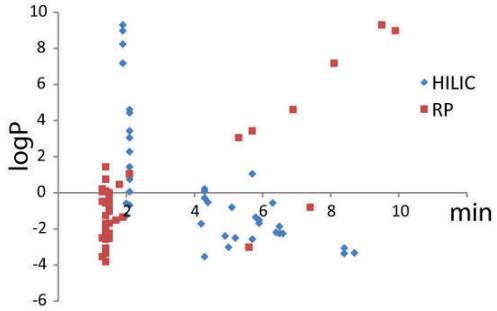


Figure 3: The predicted logP values of standard compounds plotted against retention times. LogP retention time regression for standards of RP UPLC-MS and HILIC-MS data.

This approach, which depends both on column characteristics and chromatographic methods, thus brings two additional criteria for the structure determination. Reversed phase (RP) chromatography mostly separates mid- to non-polar metabolites and molecules elute according to their hydrophobicities, starting with the most hydrophilic substance in the mixture while HILIC is used for polar metabolites like amino acids. The coupling of a chromatographic technique and mass spectrometry extends the investigation of the widest range of compound classes and helps in the characterization of important compounds.

Table S3: The predicted logP values of standard compounds. LogP and retention time for standards of RP UPLC-MS and HILIC-MS data.

	m/z	Retention time (min) HILIC UPLC/QTOF-MS	Retention time (min) RP UPLC/QTOF-MS	Identity	Formula	logP
Amino acids	174,11	-	1,5	Arginine	C6H14N4O2	-1.652
	132,05	-	1,4	Asparagine	C4H8N2O3	-3.82
	155,07	-	1,5	Histidine	C6H9N3O2	-2,52
	131,09	5,9	1,5	Isoleucine	C6H13NO2	-1,69
	131,09	5,9	1,7	Leucine	C6H13NO2	-1,52
	146,11	-	1,5	Lysine	C6H14N2O2	-1,04
	149,05	6,5	1,4	Methionine	C5H11NO2S	-1,87
	165,08	5,8	1,9	Phenylalanine	C9H11NO2	-1,35
	115,06	6,3	1,4	Proline	C5H9NO2	-0,57
	105,04	8,4	1,4	Serine	C3H7NO3	-3,07
	204,09	5,7	2,1	Tryptophane	C11H12N2O2	1,04
	181,07	6,6	1,5	Tyrosine	C9H11NO3	-2,26
	117,08	6,5	1,4	Valine	C5H11NO2	-2,26
Sugars	150,05	5,0	5,6	Arabinose	C5H10O5	-3,02
	122,06	-	1,4	Erythriol	C4H10O4	-2,29
	180,06	-	1,4	Fructose	C6H12O6	-2,45
	164,07	4,9	-	Fucose	C6H12O5	-2,39
	180,06	-	1,4	Galactose	C6H12O6	-2,57
	180,06	-	1,4	Glucose	C6H12O6	-3,24
	504,17	8,7	1,4	Melezitose	C18H32O16	-3,34
	504,17	8,4	1,4	Raffinose	C18H32O16	-3,36
	150,05	-	1,4	Ribose	C5H10O5	-2,32
	182,08	6,4	1,4	Sorbitol	C6H14O6	-2,2
Organic acids	146,06	4,3	1,4	Adipic acid	C6H10O4	0,08
	197,07	2,1	1,5	2-Amino-4,5-dimethoxybenzoic acid	C9H11NO4	-0,69
	312,3	1,9	9,5	Arachidic acid	C20H40O2	9,29
	144,12	2,1	5,3	Caprylic acid	C8H16O2	3.05
	190,03	2,1	1,4	Coumarin-3-carboxylic acid	C10H6O4	1,43
	192,03	4,2	1,4	Citric acid	C6H8O7	-1,72
	129,02	4,4	-	Cyanuric acid	C3H3N3O3	-0,53
	441,14	5,2	1,3	Folic acid	C19H19N7O6	-2.5
	116,01	-	1,8	Fumaric acid	C4H4O4	0,46
	170,02	-	1,3	Gallic acid	C7H6O5	0.70
	194,04	5,7	1,4	Glucuronic acid	C6H10O7	-2,57
	130,03	2,1	1,3	Glutaconic acid	C5H6O4	0,05
	147,05	4,3	1,3	Glutamic acid	C5H9NO4	-3,54
	132,04	4,3	1,5	Glutaric acid	C5H8O4	-0,29
	326,32	1,9	9,9	Heneicosanoic acid	C21H42O2	8,97
	152,05	2,1	1,4	4-Hydroxyphenylacetic acid	C8H8O3	0,75
	200,18	2,1	6,9	Lauric acid	C12H24O2	4,6
	116,01	1,4	1,3	Maleic acid	C4H4O4	-0,48
	134,02	-	1,4	Malic acid	C4H6O5	-1,26
	104,01	5,1	7,4	Malonic acid	C3H4O4	-0,81
	130,03	4,3	1,3	Mesaconic acid	C5H6O4	0,21
	158,13	2,1	5,7	Nonanoic acid	C9H18O2	3,42
	256,24	1,9	8,1	Palmitic acid	C16H32O2	7,17
	284,27	1,9	8,7	Stearic acid	C18H36O2	8,23
	118,03	2,0	1,4	Succinic acid	C4H6O4	-0,59
	150,02	2,0	1,4	Tartaric acid	C4H6O6	-1,27
	136,05	2,1	3,8	Toluic acid	C8H8O2	2,27
	186,16	2,1	6,5	Undecanoic acid	C11H22O2	4,42

Limitations of MS-based separation such as the inability to differentiate isobars or isomers and the suppression effect caused by the molecules competing for ionization, can be overcome by UPLC separation prior to MS injection (Forcisi et al., 2013; Müller et al., 2013). As examples, Table 1 reports the possible number of isomers (retention times) that could be detected by RP UPLC/Q-ToF-MS for 11 mass peaks observed in FTICR-MS. For instance, m/z 149.00916 ($[C_4H_5O_6]^-$) actually corresponded to an unique isomer with a retention time of 8.06 min, whereas m/z 289.07176 ($[C_{15}H_{14}O_6]^-$) could be related to three different isomers with retention times of 3.69, 4.41 and 5.22 min (Table 1). As also illustrated for m/z 465,10385 ($[C_{21}H_{21}O_{12}]^-$), up to five different isomers can actually contribute to a single FTICR-MS peak for both wines. However, Table 1 shows in this case that these five isomers are not consistently present in both wines, thus illustrating the further input of RP UPLC/QTOF-MS for the assignment of FTICR-MS peaks.

Table 1: Example of isomers, which were detected by RP UPLC-MS for the individual masses measured by FTICR-MS.

m/z FTICR-MS	Formula	Isobar/Isomer RP UPLC-MS	
		Retention time (min) Old wine	Retention time (min) Young wine
149,00916	$[C_4H_5O_6]^-$	8.06	8.06
173,1044	$[C_6H_{13}N_4O_2]^-$	1.82	1.82
187,13396	$[C_{10}H_{19}O_3]^-$	-	2.63
		4.16	4.16
		4.32	4.32
		4.58	4.58
227,07136	$[C_{14}H_{11}O_3]^-$	4.27	4.27
		4.61	4.61
		4.96	-
289,07176	$[C_{15}H_{13}O_6]^-$	4.41	4.41
		3.69	3.69
		5.22	5.22
315,08741	$[C_{17}H_{15}O_6]^-$	2.58	2.58
		3.44	3.44
		2.90	2.90
317,03029	$[C_{15}H_9O_8]^-$	3.49	3.49
		3.89	3.89
		4.43	4.43
		5.29	5.29

341,10893	$[C_{12}H_{21}O_{11}]^-$	1.19	1.19
		1.45	1.45
440,1324	$[C_{19}H_{18}N_7O_6]^-$	1.32	1.32
465,10385	$[C_{21}H_{21}O_{12}]^-$	1.58	-
		3.19	-
		3.49	3.49
		-	3.99
		4.32	4.32
		3.49	3.49
503,16175	$[C_{18}H_{31}O_{16}]^-$	1.40	1.40
		4.12	4.12

The FTICR-MS, RP UPLC/Q-ToF-MS and HILIC/Q-ToF-MS data were compared through some commonly detected masses. RP and HILIC used different methods in term of gradients and solvents but above all, different columns, which lead to very different total mass spectrum profiles (Fig.3). As the resolution of Q-ToF-MS is lower than that of FTICR-MS, the RP and HILIC CHONS elemental compositions were assigned using netcalc with a 1 ppm tolerance. The visualization of data as a plot of H/C vs m/z ratio for each instrument (Fig.4), gave an idea of the mass distributions without taking into account the signal strength while separating the individual metabolites based on their hydrogen-to-carbon ratio. FTICR-MS revealed an organized plot composed of a majority of CHO compounds, whereas RP UPLC/Q-ToF-MS showed a better separation of masses with most masses corresponding to nitrogen-containing compounds (CHON and CHONS).

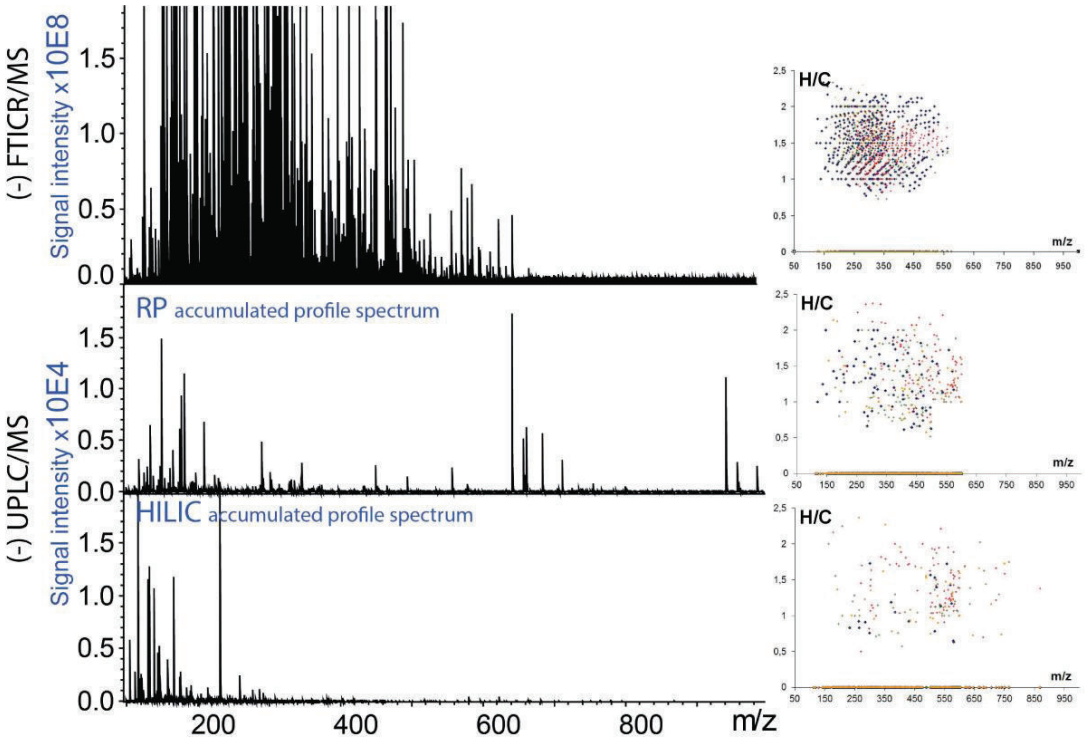


Figure 4: Combined visualization of the ESI(-) FTICR-MS spectrum, (-) RP UPLC- and HILIC-MS spectra in the 100-1000Da mass range plus H/C vs m/z diagrams for detected masses in each case. Color code: CHO (blue), CHOS (green), CHON (yellow) and CHONS (red).

Although the mass resolution of the Q-ToF instrument is clearly not sufficient to separate all the m/z features observed in FTICR-MS, mass profiles exhibited similarities among the techniques (Fig.5). An enlargement of the m/z 227.00-227.20 region of the mass spectrum illustrates the limitation of the resolving power of the ToF. The mass error for the 227.07136 peak, (corresponding to the $[M-H]^-$ ion $[C_{14}H_{11}O_3]^-$ which can be assigned to resveratrol isomers) was 0.04 ppm for FTICR-MS, whereas the error was higher by factor of about 100 for RP UPLC/Q-ToF-MS (3.03 ppm). No peaks were detected at that mass using HILIC/Q-ToF-MS. Similarly, the mass error of the 227.10335 peak (corresponding to the [M-H]- ion $[C_{10}H_{13}N_2O_4]^-$) was 1.62 ppm for FTICR-MS and approximately ten times higher for HILIC/Q-ToF-MS (19.8 ppm) (Fig.5). Five major peaks were present in the FTICR-MS for this mass range, and two of them could also be found using RP UPLC/Q-ToF-MS, while a third metabolite was confirmed with HILIC/Q-ToF-MS. The Venn diagram (Fig. 5) showed the overlap of masses found by the three applied techniques. 4847 masses were detected using (-) FTICR-MS, only 2857 were detected by (-) RP UPLC/Q-ToF-MS and 3060 with (-) HILIC/Q-ToF-MS. Up to 30 percent of all of the annotations were detected in at least two analytical procedures and masses common to all instruments represented only 2.38 percent of

the detected masses. As shown by the survey view, which corresponds to the two-dimensional chromatogram plot (Fig.5), the advantage of the UPLC separation prior to MS injection is that it allows for the separation and identification of isomeric compounds, for example, the detection of two different isomers, at two close though distinct retention times (4.1 and 4.3 min), for the m/z 227.07136. Within an error of 0.1 ppm, the corresponding [M-H]- ions with mass formula $[C_{14}H_{11}O_3]^-$ could be associated with up to 2011 substances (from the SciFinder search facility: https://scifinder.cas.org) but only two of them, i.e. resveratrol (Gougeon et al., 2009) and benzilic acid (Dugo, G.; Salvo, F.; Bambara, G.; Picciolo, F.; Mondello, L.; Dugo, P, 2000), actually appeared to be consistent with compounds that are known to be present in red wine. Conversely, only one isomer was detected for the 227.09921 mass using HILIC/Q-ToF-MS (Fig.5). Our results show that both methods are working orthogonal and complementary, rather than being redundant.

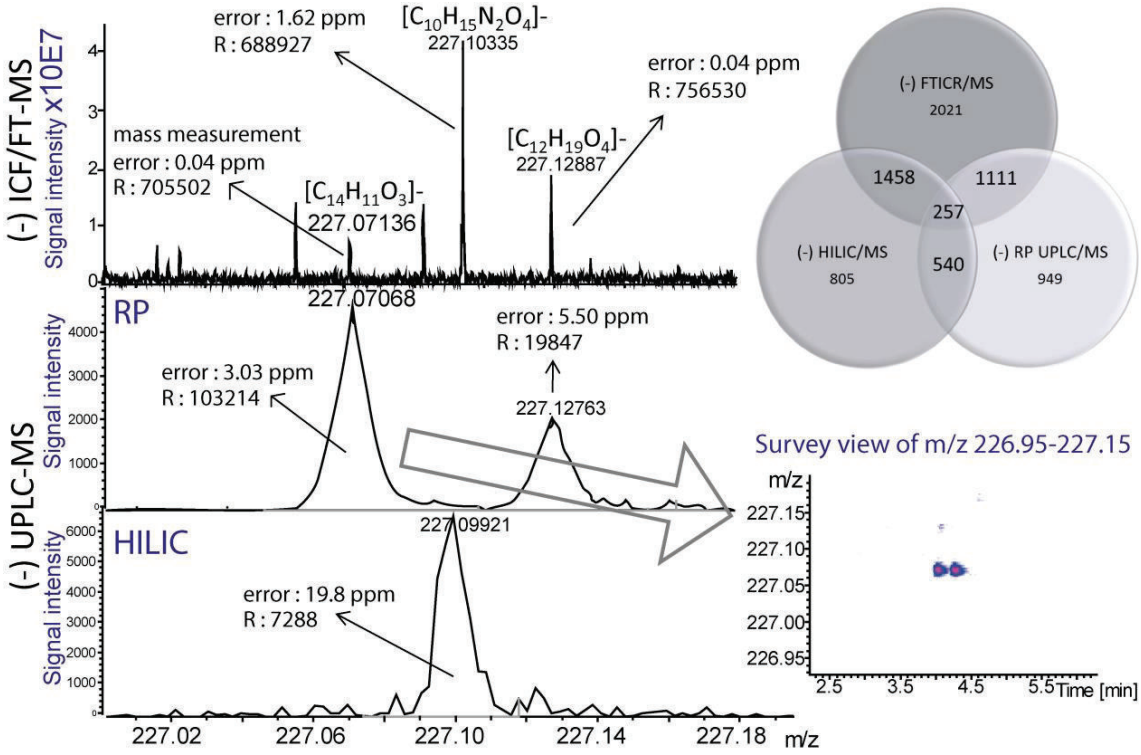


Figure 5: Enlargement of combined visualizations of the ESI(-) FTICR-MS spectrum, (-) RP UPLC- and HILIC- MS spectra in the 227.00-227.20Da mass range and zoom into the survey view of m/z 226.90-227.20 in RP LC-MS. Venn diagram showing the comparison of masses recovery in applied techniques. Given numbers represent the count of unique or common detected masses.

3.3. Identification and annotation

Although 4847 masses were detected using FTICR-MS (Fig.5), only 904 masses could be detected and annotated using MassTRIX, a webserver for direct annotation of FTICR-MS data to metabolic pathways (Suhre and Schmitt-Kopplin, 2008; Wägele et al., 2012) using different databases and especially the KEGG (Kanehisa et al., 2011) and HMDB (Wishart et al., 2012) databases, see for example flavonoid biosynthesis pathway with 18 annotated metabolites by KEGG (supplemental Figure 1). 672 metabolites could be identified using an in-house database specific for plants, which includes known grape and wine metabolites (Table 2). To obtain a larger number of chemical formulas, masses were identified by mass difference network analysis using Netcalc based on accurate mass differences as described in table 1. A total of 2048 formulas could be identified from the 4847 masses provided by FTICR-MS data. However, Netcalc only gives information about the elemental formula, whereas MassTRIX provides hypothetical structural identifications, and our in-house database gives possible identifications of compounds related to plants including wine and grape. MassTRIX also enabled the assignment of 285 masses from the RP UPLC/Q-ToF-MS data and 377 from HILIC/Q-ToF-MS data, of which only 65 masses are found in both FTICR-MS and RP for example. Thus the combination of analytical tools not only allows for a considerable increase in the scope of detectable metabolites, but the combination of identification techniques also helps to refine metabolites assignments. The next logical step is obtaining possible candidates that can be analyzed quantitatively but it is not the goal of this paper.

Table 2: Comparison of counts of masses and annotated metabolites for each technique applied.

	(-) FTICR/MS	(-) RP UPLC/MS	(-) HILIC/MS
Total features	4847	2857	3060
Elemental formula	2048	1215	540
Annotated metabolites (masstrix)	904	285	377
Annotated metabolites (in house data base)	672	177	134

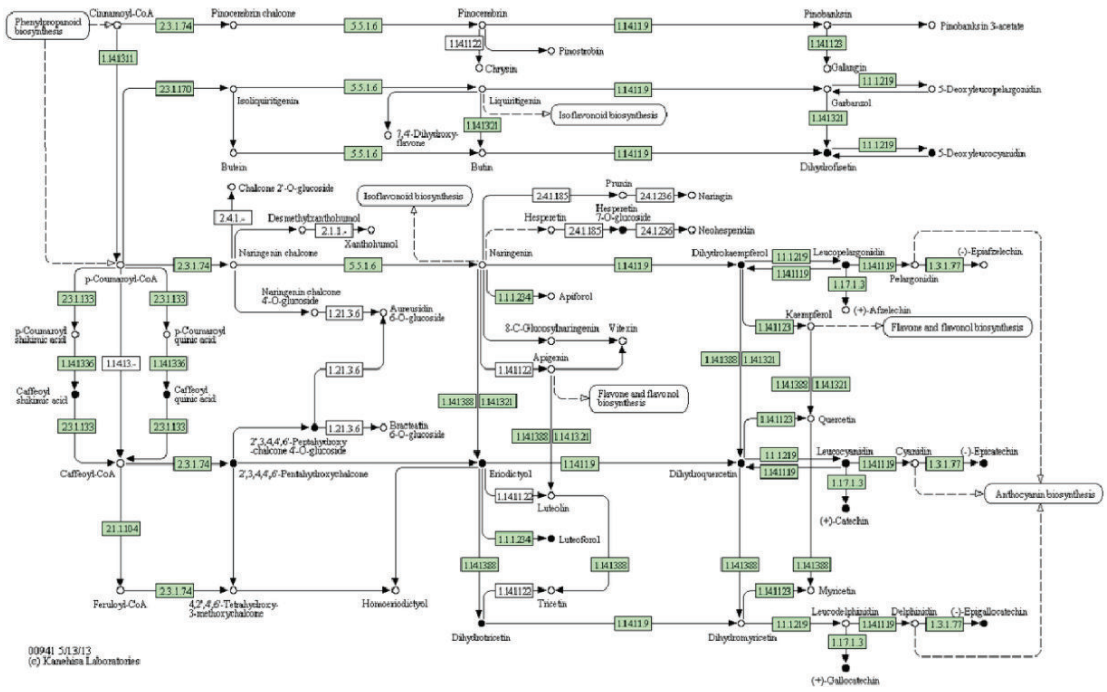


Figure S1: Metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism as annotated from ICR-FT/MS data with the MassTRIX translator into pathways for flavonoid biosynthesis pathway with 18 annotated metabolites (in black) present in old red wines.

4. Discussion

A methodology based on the combination of ultra-high resolution FTICR-MS and both RP UPLC/Q-ToF-MS and HILIC UPLC/Q-ToF- MS for non-targeted metabolomics has been adapted for the analysis of wines. A major problem in metabolomics using mass spectrometry is the structural identification of the detected masses. The attribution of correct elemental compositions demands high accuracy in the mass calculation, which needs to consider all of the elementals which might be present, not only carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, sulphur and phosphorous, but also isotopes.

There are thus several advantages in combining different non-targeted approaches: FTICR-MS data allow for the precise determination of exact masses and their correlation with UPLC/Q-ToF-MS signals obtained at lower resolution, while UPLC/Q-ToF-MS when based on multiple separation criteria, enables the validation of annotations of important compounds, along with distinguishing between isomers. The current capacity to describe complex samples, in this case wine samples, by means of FTICR-MS and UPLC/Q-ToF-MS

is thus greatly expanded and our results indicated that up to 4800 accurate masses could be detected by FTICR-MS.

Considering a lower average value of two isomers, as detected by UPLC/Q-ToF-MS per exact masses, this would extend the current count of chemical compounds in wine far beyond the known and identified volatile and non-volatile metabolites in wine so far (about 3,000 altogether). When applied to the comparison of two wines from the same grape variety but from two different vintages, the methodology presented here revealed that, through the actually high chemical diversity of the older wine, the evolution of the chemical composition upon ageing can be seen as a balance between the precipitation of condensed structures and the diagenesis of many – yet unknown – new metabolites, even for a century-old wine.

Acknowledgments

We warmly thank the Association des Amis de l'Abbaye de Saint Vivant for providing the wine samples, and especially Aubert de Villaine for his interest and enthusiastic discussions. This work was financially supported by the Région Bourgogne, the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) and the Comité Interprofessionnel des Vin de Champagne (CIVC).

References

Brown, S. C., Kruppa, G., and Dasseux, J.-L. (2005). Metabolomics applications of FT-ICR mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 24, 223–231. doi:10.1002/mas.20011.

Catharino, R. R., Cunha, I. B. S., Fogaça, A. O., Facco, E. M. P., Godoy, H. T., Daudt, C. E., Eberlin, M. N., and Sawaya, A. C. H. F. (2006). Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 41, 185–190. doi:10.1002/jms.976.

Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., and Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 557–566. doi:10.1016/j.tifs.2009.07.002.

Cheynier, V., Dueñas-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.

Cooper, H. J., and Marshall, A. G. (2001). Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5710–5718. doi:10.1021/jf0108516.

Cuadros-Inostroza, A., Giavalisco, P., Hummel, J., Eckardt, A., Willmitzer, L., and Peña-Cortés, H. (2010). Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. *Anal. Chem.* 82, 3573–3580. doi:10.1021/ac902678t.

Dugo, G.; Salvo, F.; Bambara, G.; Picciolo, F.; Mondello, L.; Dugo, P (2000). Volatile components in wines produced from autochthon Sicilian cultivars under clonal selection. *Vignevini*, 120–124.

Flamini, R. (2013). Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols. *ISRN Spectrosc.* 2013, 1–45. doi:10.1155/2013/813563.

Flanzy, C. (1998). *ØEnologie: fondements scientifiques et technologiques*. Technique & Documentation Lavoisier Paris.

Forcisi, S., Moritz, F., Kanawati, B., Tziotis, D., Lehmann, R., and Schmitt-Kopplin, P. (2013). Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A* 1292, 51–65. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.017.

Gougeon, R. D., Lucio, M., Boutegrabet, L., Peyron, D., Feuillat, F., Chassagne, D., Alexandre, H., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., et al. (2011). "Authentication Approach of the Chemodiversity of Grape and Wine by FTICR-MS," in *Progress in Authentication of Food and Wine*, eds. S. E. Ebeler, G. R. Takeoka, and P. Winterhalter (Washington, DC: American Chemical Society), 69–88.

Gougeon, R. D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Feuillat, F., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., et al. (2009). The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9174–9179.

Heeren, R. M. A., Kleinnijenhuis, A. J., McDonnell, L. A., and Mize, T. H. (2004). A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1048–1058. doi:10.1007/s00216-003-2446-4.

Hertkorn, N., Frommberger, M., Witt, M., Koch, B. P., Schmitt-Kopplin, P., and Perdue, E. M. (2008). Natural Organic Matter and the Event Horizon of Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 80, 8908–8919. doi:10.1021/ac800464g.

Hertkorn, N., Harir, M., Koch, B., Michalke, B., and Schmitt-Kopplin, P. (2013). High-field NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry: powerful discovery tools for the molecular level characterization of marine dissolved organic matter. *Biogeosciences* 10, 1583–1624.

Hertkorn, N., Ruecker, C., Meringer, M., Gugisch, R., Frommberger, M., Perdue, E. M., Witt, M., and Schmitt-Kopplin, P. (2007). High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1311–1327. doi:10.1007/s00216-007-1577-4.

Hong, Y.-S. (2011). NMR-based metabolomics in wine science. *Magn. Reson. Chem.* 49, S13–S21. doi:10.1002/mrc.2832.

Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2011). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 40, D109–D114. doi:10.1093/nar/gkr988.

Kashif, A., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y. H., and Verpoorte, R. (2011). Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *J. Biomol. NMR* 49, 255–266. doi:10.1007/s10858-011-9487-3.

Liger-Belair, G., Cilindre, C., Gougeon, R. D., Lucio, M., Gebefügi, I., Jeandet, P., and Schmitt-Kopplin, P. (2009). Unraveling different chemical fingerprints between a champagne wine and its aerosols. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16545–16549. doi:10.1073/pnas.0906483106.

López-Rituerto, E., Savorani, F., Avenoza, A., H. Busto, J., Peregrina, J. M., and Engelsen, S. B. (2012). Investigations of La Rioja terroir for wine production using 1H NMR metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3452–3461.

Müller, C., Dietz, I., Tziotis, D., Moritz, F., Rupp, J., and Schmitt-Kopplin, P. (2013). Molecular cartography in acute Chlamydia pneumoniae infections-a non-targeted metabolomics approach. *Anal. Bioanal. Chem.*

Roullier-Gall, C., Boutegrabet, L., Gougeon, R. D., and Schmitt-Kopplin, P. (2014). A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. *Food Chem.* 152, 100–107. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.056.

Sauvageot, F., and Feuillat, F. (1999). The Influence of Oak Wood (Quercus robur L., Q. petraea Liebl.) on the Flavor of Burgundy Pinot noir. An Examination of Variation Among Individual Trees. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 447–455.

Schmitt-Kopplin, P., Gabelica, Z., Gougeon, R. D., Fekete, A., Kanawati, B., Harir, M., Gebefuegi, I., Eckel, G., and Hertkorn, N. (2010). High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2763–2768. doi:10.1073/pnas.0912157107.

Suhre, K., and Schmitt-Kopplin, P. (2008). MassTRIX: mass translator into pathways. *Nucleic Acids Res.* 36, W481–W484. doi:10.1093/nar/gkn194.

Tarr, P. T., Dreyer, M. L., Athanas, M., Shahgholi, M., Saarloos, K., and Second, T. P. (2013). A metabolomics based approach for understanding the influence of terroir in Vitis Vinifera L. *Metabolomics* 9, 170–177. doi:10.1007/s11306-013-0497-x.

Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., and Wilson, I. D. (2012). Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal. Chim. Acta* 711, 7–16. doi:10.1016/j.aca.2011.09.042.

Toffali, K., Zamboni, A., Anesi, A., Stocchero, M., Pezzotti, M., Levi, M., and Guzzo, F. (2011). Novel aspects of grape berry ripening and post-harvest withering revealed by untargeted LC-ESI-MS metabolomics analysis. *Metabolomics* 7, 424–436. doi:10.1007/s11306-010-0259-y.

Tziotis, D., N, H., and P, S.-K. (2010). Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.* 17, 415–421.

Villagra, E., Santos, L. S., Vaz, B. G., Eberlin, M. N., and Felipe Laurie, V. (2012). Varietal discrimination of Chilean wines by direct injection mass spectrometry analysis combined with multivariate statistics. *Food Chem.* 131, 692–697. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.078.

Wägele, B., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., and Suhre, K. (2012). MassTRIX Reloaded: Combined Analysis and Visualization of Transcriptome and Metabolome Data. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0039860.

Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., et al. (2012). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41, D801–D807. doi:10.1093/nar/gks1065.

2 Ultra haute précision de mesure de masse pour l'analyse métabolomique du vin

L'objectif principal de ce travail était de montrer l'importance de la combinaison de la chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS) avec la spectrométrie de masse à résonnance cyclotronique des ions et à transformée de Fourrier (FTICR-MS) comme moyen de caractérisation d'un ensemble de modifications chimiques de la composition de vin.

Les différentes étapes, depuis l'analyse de données jusqu'à l'identification de marqueurs en passant par l'analyse statistique sont détaillées dans ce projet. Les données issues d'UPLC-Q-ToF-MS sont enrichies par l'alignement avec les masses exactes provenant de l'analyse des échantillons par FTICR-MS et UPLC-Q-ToF-MS.

L'intérêt de ce processus analytique est illustré par l'exemple de l'étude de vins blancs (Chardonnay) et de vins rouges (Pinot noir) d'origines géographiques variées en Bourgogne. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-Q-ToF-MS²) pour l'identification de marqueurs des séries de vins est présentée au travers d'un exemple. Enfin, la combinaison des outils de statistique multivariée et l'annotation de masses à l'aide des bases de données permettent une description fine de la complexité chimique du vin.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans le journal scientitifique Frontiers in Chemistry, section Food Chemistry en 2014, présentée ci-après.

DOI : 10.3389/fchem.2014.00102

High precision mass measurements for wine metabolomics

Chloé Roullier-Gall[1,2], Michael Witting[2], Regis D. Gougeon[1*], Philippe Schmitt-Kopplin[2,3*]

Chloé Roullier-Gall and Michael Witting have equally contributed to this paper

[1]UMR A 02.102 PAM, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, Dijon, France.
[2] Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany.
[3] Chair of Analytical Food Chemistry, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany.
[*]Correspondance: regis.gougeon@u-bourgogne.fr / schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

Abstract

An overview of the critical steps for the non-targeted Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-Q-ToF-MS) analysis of wine chemistry is given, ranging from the study design, data preprocessing and statistical analyses, to markers identification. UPLC-Q-ToF-MS data was enhanced by the alignment of exact mass data from FTICR-MS, and marker peaks were identified using UPLC-Q-ToF-MS². In combination with multivariate statistical tools and the annotation of peaks with metabolites from relevant databases, this analytical process provides a fine description of the chemical complexity of wines, as exemplified in the case of red (Pinot noir) and white (Chardonnay) wines from various geographic origins in Burgundy.

Keywords : wine, Non-targeted metabolomics, UPLC-Q-ToF-MS, FTICR-MS, MS/MS, Multivariate data analysis

Introduction

The large amount of wine analytical targeted analyses have definitely contributed to a better knowledge of the wine chemistry (Flamini, 2013). Alternatively, metabolomics approaches have shown great potential for the study of grape or wine (Gougeon et al., 2009). The concept of wine omics (Metabolomics: Wine-omics, 2008), for the untargeted wine analyses coupling NMR and GC-MS were followed by the oenomics approaches, described by Gougeon *et al*. (Gougeon et al., 2009), exemplified by the revealing of the metabologeography expression of cooperage oak wood by FTICR-MS. The composition of wine is determined by a complex interplay between environmental factors, genetic factors

(grape varieties) and viticultural practices (Atanassov et al., 2009; Roullier-Gall et al., 2014a), and metabolomics offers the toolbox for integrated analyses of the wine composition resulting from all of these factors. Holistic analyses require access to sensitive and powerful instruments, therefore metabolomics typically employs high resolution techniques like FTICR-MS, LC-MS, GC-MS and NMR spectroscopy combined with multivariate statistics. The advantages and disadvantages in terms of selectivity, sensitivity, dynamic range, robustness, and accuracy of these different analytical tools have been well described (Theodoridis et al., 2012a; Cevallos-Cevallos et al., 2009; Heeren et al., 2004; Hertkorn et al., 2007; Hong, 2011).

Vine and wine are well-documented fields of chemistry and various NMR-based or MS-based studies have been published in recent years. As examples, NMR now allows the differentiation of important parameters like the grape variety, geographical origin and year of vintage (Godelmann et al., 2013) whereas FTICR-MS enables the separation of wines according to the geographical origin inside proximate areas (Roullier-Gall et al., 2014a, 2014b).

FTICR-MS is a powerful technique for studying wine, mostly employed in direct infusion experiments to benefit from its ultrahigh resolving power and mass accuracy (Gougeon et al., 2009; Liger-Belair et al., 2009; Roullier-Gall et al., 2014b). However, as a major disadvantage, direct infusion techniques do not allow to discriminate between isomeric and isobaric compounds (Forcisi et al., 2013). If a chromatographic separation is not applied at the first stage, a large number of molecules are subjected simultaneously to the ionization process causing ion suppression for numerous analytes and the inability to separate isobaric and isomeric substances (Forcisi et al., 2013; Gika et al., 2014). Due to this fact, chromatographic separation prior to MS-analysis is particularly important for both targeted and non-targeted metabolomics, and is already used for untargeted metabolomics analysis of grape to differentiate grape berry ripening and post-harvest withering (Toffali et al., 2011), for wine authentication (Rubert et al., 2014), or for the understanding of the terroir impact in wine (Tarr et al., 2013).

LC-MS is designed for the analyses of non-volatile compounds present in complex matrices such as amino acids (Tolin et al., 2012), phenolic compounds (Jaitz et al., 2010), fatty acids (Della Corte et al., 2013). A large number of LC-MS metabolite profiling studies have been realized using a combination of UPLC with time-of-flight mass spectrometry

(TOF-MS) (Fontana et al., 2011; Forcisi et al., 2013; Grata et al., 2008; Rubert et al., 2014; Vaclavik et al., 2011). LC-Q-ToF–MS was applied in many wine studies for targeted analyses such as the separation and detection of resveratrol (Wang et al., 2002), of phenolic compounds (Gruz et al., 2008; Jaitz et al., 2010; Prosen et al., 2007; Püssa et al., 2006; Sun et al., 2006) or toxins (Zöllner et al., 2000). In contrast, very few studies have used this technique for untargeted metabolomics analyses of grapes and wines, as shown for instance by Arapitsas *et al.* or Vaclavik *et al.* for the understanding of the mechanism of wine micro-oxygenation or to discriminate wines according to grape varieties (Arapitsas et al., 2012; Vaclavik et al., 2011). Such approach combines the highest chromatographic resolution with an excellent sensitivity, fast data acquisition and high mass accuracy (Forcisi et al., 2013; Gika et al., 2014). However, it does not refer to the highest resolution that can only be achieved by FTICR-MS, which typically requires higher time domains and thus do not fully exploit the potential of fast UPLC.

MS-based techniques are in perpetual development, improving the mass resolution, the precision and velocity of acquisition, thus enabling improved detection and identification (Allwood and Goodacre, 2010; Forcisi et al., 2013). The selection of the ionization mode and sorbent materials will have a significant effect on the obtained metabolic profile. Some molecules are ionized more efficiently in one ionization mode. In order to cover the widest range of compounds separated via LC, UPLC-Q-ToF-MS combined with both reversed phase and hydrophilic interaction chromatography represents a powerful analytical platform (Forcisi et al., 2013; Theodoridis et al., 2012a). Reversed-phase (RP) liquid chromatography has been highlighted as the mostly used separation mode for the metabolome analysis (Gika et al., 2014; Theodoridis et al., 2012a, 2012b; Vaclavik et al., 2011). RP separation covers a large part of the metabolome, and at the same time provides the most reliable, robust and sophisticated LC stationary phases, while the number of available chemistries, geometrical characteristics of particles and columns surpasses the corresponding numbers for all other modes. Alternative separation mechanisms are required to separate polar analytes. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) provides separations complementary to those obtained by RPLC–MS in that early eluting analytes in the RP mode are often well retained by HILIC (Forcisi et al., 2013; Gika et al., 2014; Müller et al., 2013).

The current bottleneck in MS based metabolomics is the structural identification of compounds associated with the detected masses. The high levels of resolution and mass

accuracy make Q-ToF-MS appropriate for combined MS profiling and MS/MS analysis, thus allowing the complete metabolite discovery process from the untargeted analyses to the structural elucidation of markers (Allwood and Goodacre, 2010; Rubert et al., 2014; Vaclavik et al., 2011). Novel approaches for the analysis of MS/MS spectra are currently developed, e.g. *in silico* fragmentation, offering interesting alternatives for metabolite identification.

The development of non-targeted combined metabolomics approaches have already demonstrated its importance for the metabolite coverage, validation of data and identification of biomarkers, meaning that no method can describe the whole metabolome alone (Forcisi et al., 2013; Theodoridis et al., 2012a; Müller et al., 2013). In this study, we present a complete workflow based on RP-UPLC-Q-ToF-MS and on the exact mass measurement by FTICR-MS, together with multivariate statistics and the usage of *in silico* fragmentation for non-targeted metabolomics analyses of wines. We show that this workflow is at the forefront of wine metabolomics, enabling differentiation of wine from various geographic origins in Burgundy and exemplified here through the identification of common metabolites from wines native to five different producers in Burgundy.

Material and Methods

Wines samples

A total of 152 samples of bottled white and red wines from different appellations in Burgundy were analyzed. White wines (Chardonnay) and red wines (Pinot Noir) were sourced from five different producers in Burgundy (Chablis, two different Meursault, Aloxe-Corton and Vosne-Romanée). They cover vintages from 1934 to 2012.

FTICR-MS metabolic profiling

High-resolution mass spectra were acquired on a Bruker solariX Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass Spectrometer (FTICR-MS) (BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Germany) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet (Magnex Scientific Inc., Yarnton, GB) and a APOLO II ESI source (BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Germany) operated in the negative ionization mode. The negative ion mode fingerprints showed greater variety in the composition and abundance of compounds in the analyzed wines and a smaller

number of adducts, as well as higher resolution compared to positive ionization. 20 µL of the samples were diluted in 1 ml of methanol prior to injection and introduced into the microeletrospay source at a flow rate of 120µL.h^{-1}. Spectra were externally calibrated on clusters of arginine (10mg.L^{-1} in methanol). Further internal calibration was performed for each sample by using ubiquitous fatty acids, reaching mass accuracies lower than 0.1 ppm in routine day-to-day measurement (Roullier-Gall et al., 2014b, 2014a; Gougeon et al., 2009). Spectra were acquired with a time domain of 4 mega words over a mass range of m/z 100 to 1000. 500 scans were accumulated for each sample.

FTICR-MS pre-processing

The FTICR mass spectra were exported to peak lists with a cut-off signal-to-noise ratio (S/N) of 4. Peak alignment was performed with maximum error thresholds of 1 ppm and filtered for masses occurring in minimum of 10% of all samples. In total, 281432 and 21419 masses composed the final matrix before and after filtration, respectively.

UPLC-Q-ToF-MS metabolic profiling

1950 µL of the samples were mix with 50 µL of acetonitrile (ACN) prior to UPLC-Q-ToF-MS analyses. Metabolites were separated using a Waters Acquity UPLC system coupled to a Bruker maXis UHR-ToF-MS. A reversed-phase (RP) separation method was employed. In RP mode, middle to non-polar metabolites were separated using a BEH C8 column (150 mm x 2.1 mm ID). Buffer A consisted of 10% acetonitrile (ACN) in water and buffer B of 100% ACN, both with 0.1% formic acid. Detection was carried out in negative ionization mode with the following parameters: Nebulizer pressure = 2.0 bar, dry gas flow = 8.0 l/min, dry gas temperature = 200°C, capillary voltage = 3500 V, end plate offset = - 500 V, mass range = 50-1200 m/z.

UPLC-Q-ToF-MS data pre-processing

Calibration, alignment and peak picking of individual LC-MS runs were performed using the Genedata Expressionist for MS 8.0 software (Genedata AG, Basel, Switzerland). Internal recalibration was based on 1:4 diluted low concentration tune mix (Agilent,

Waldbronn, Germany), which was injected prior to each run using a 6-port valve mounted to the MS. Individual steps of data pre-processing are described in the Results and Discussion section. Briefly, the complete processing consisted of three stages: Stage 1 performed chemical noise substraction; Stage 2 performed recalibration and alignment and Stage 3 achieved peak picking and export.

UPLC-Q-ToF-MS and FTICR-MS Alignment

Alignment of both data types was performed using a custom Perl script. For each matching masses between UPLC-Q-ToF-MS and FTICR-MS, the exact mass error was calculated. If the error was smaller than a set threshold (detailed in results and discussion part), the masses were supposed to be the same.

Statistical analysis

Filtering of masses was performed in MS Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA). All further statistical analyses were performed with Genedata Expressionist for MS 8.0 (Genedata, Basel, Switzerland). Principal Component Analysis (PCA) is an unsupervised method with the capacity to reduce the complexity of a huge dataset. Its goal is to extrapolate important information and display it as a set of new independent variables called principal components. This method discloses the similarity pattern of the observations or variables.

MS/MS spectra processing

Marker peaks from statistical analyses were subjected to tandem MS. Target lists for fragmentation experiments were converted to MS/MS acquisition methods using MetShot (Neumann et al., 2013). After acquisition, MS/MS spectra were manually extracted using Bruker Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) and files were exported to .mgf format and converted to MetFusion batch files using a custom Perl script.

Results and Discussion

Prerequisites for succesfull metabolic profiling of wines using UPLC-Q-ToF-MS

For unambiguous profiling of the metabolic signature of wines using UPLC-Q-ToF-MS several points have to be taken into account. First, due to the number of samples we aimed to profile, we had to split them into several batches. We decided to consider batches according to appellations, thus leading to four unequally sized batches of 12, 24, 29 and 87 samples. This approach ensured that similar samples are comparable even, if batch-to-batch differences occur. However, to minimize batch-to-batch effects and to have a marker for comparison, we used quality control samples, which are a pool of all samples analyzed (Naz et al., 2014; Gika et al., 2014). These QC samples were injected 10 times prior to each batch in order to equilibrate the system and injected every ten samples to monitor retention and intensity shifts. Lastly, to make use of the high resolving power of the employed mass spectrometer, prior to each analytical run a calibrant was automatically injected allowing individual recalibration for the correction of mass shifts. All of these points helped to guarantee the highest possible quality of data.

Pre-processing of FTICR-MS data

Non targeted FTICR-MS analysis generates a tremendous amount of data and requires pre-treatment prior to the application of statistical tools. Raw data were first aligned in order to discover occurring patterns, to identify outliers, to reduce the dimensionality of the data, and also to compress large datasets into smaller and more discernable ones (Lucio, 2009). A common approach for the identification of unknown molecules is the calculation of possible elemental formulas. Molecular formulae were calculated using an in-house software tool with the following chemical constraints: N rule; O/C ratio ≤ 1; H/C ratio $\leq 2n+2$; element counts: C ≤ 100, H ≤ 200, O ≤ 80, N ≤ 3, S ≤ 3 and P ≤ 1 (Schmitt-Kopplin et al., 2010; Gougeon et al., 2009; Roullier-Gall et al., 2014b, 2014a). On the total of 21419 masses composing the matrix after filtration, 8455 unambiguous elemental formulas were found. Due to the expected high complexity of the metabolome, visualization strategies dealing with very complex data matrices have been adapted (Hertkorn et al., 2007). The Van Krevelen diagram displays the hydrogen/carbon (H/C) versus oxygen/carbon (O/C) ratios of these elemental formulas and provide a commonly used qualitative description of the molecular complexity of wine data (Gougeon et al., 2011; Roullier-Gall et al., 2014b, 2014a). This plot enables the localization of areas covering metabolite classes, which are specified by different elemental compositions, enabling a representation of a sample's composition (Figure 1A). The richness of the observed mass gives evidence of the compositional diversity of molecules as

carbohydrates, polyphenols or amino acids and chemical alteration as hydrogenation / dehydrogenation (Figure 1A ligne B) for example. A second plot for visualization and interpretation of ultrahigh resolution mass spectrometry data is the CH_2 Kendrick plot (Hertkorn et al., 2007), which is based on distinct mass defects calculated from each elemental composition (Figure 1B). Molecules of different elemental composition differ in their mass defect and it became possible distinguish homologous series of compounds from each other.

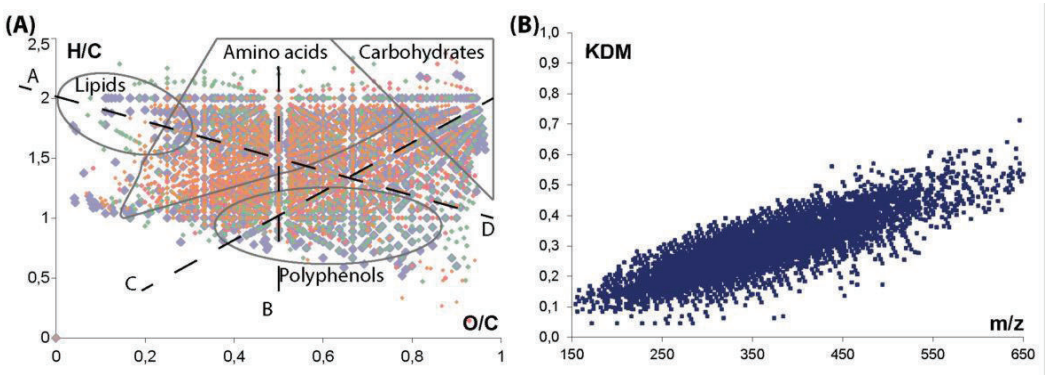


Figure 1: Van krevelen diagram (A) and Kendrick Mass Defects plot (B) representations of (-) FTICR-MS data corresponding to the complete data set (152 samples) after filtration; annotation of distinctive areas and lines of regions of predominant appearances of metabolite classes and formal chemical alterations: (A) methylation/demethylation (CH_2); (B) hydrogenation/dehydrogenation (H_2); (C) hydratation/condensation (H_2O) and (D) oxidation/reduction (O). Colors correspond to elemental formulas composition: (CHO) blue; (CHOS) green; (CHON) red and (CHONS) orange.

Automated data pre-processing of UPLC-Q-ToF-MS data

A total of 286 chromatograms were obtained, including blank injections and QC samples. To analyze this amount of data, automated pre-processing is needed. Several open-source software packages exist for this task. We employed Genedata Expressionist for MS 8.0, which allows workflow-based data processing in a user-friendly graphical user interface. Our processing strategy consisted in three stages. Stage 1 mainly aims at data reduction by use of chemical noise subtraction. This is performed in a so-called repetition activity, which handles only one chromatogram at a time, enabling faster processing, because memory of the employed computer system is optimally used and no files have to be paged to cache plates. Additionally, this prevents an overhead of the memory of very big studies with > 250

chromatograms. The noise subtracted data is stored in the proprietary .sbf format yielding a 124 fold data reduction compared to initial raw data. These noise subtracted chromatograms served as input for the second stage. All files were internally recalibrated on the calibrant segment in the retention time range from 0.05 to 0.3 minutes. A mass error < 5 ppm could be achieved for the calibrant masses. All of the chromatograms were then aligned in the RT direction. A pairwise alignment tree was constructed to guide the alignment, with the following procedure: two most similar chromatograms are first aligned, followed by the next more similar and so on until all chromatograms have been aligned. This methodology is especially useful for samples with high chemical diversity, which is the case for wine. Intermediate results were again stored in the .sbf format. In the third and last stage, noise subtracted, recalibrated and aligned spectra underwent peak picking. All of the detected features were combined into isotopic clusters and data were finally exported to .gda and .xlsx files for statistical analyses and alternative analyses, respectively.

Metabolite annotation using different metabolomics databases

A first overview of potential structures corresponding to detected metabolites was obtained by metabolite annotation using both the MassTRIX interface and a home-build (including grape and wine) metabolite database (Roullier-Gall et al., 2014b, 2014a; Wägele et al., 2012; Suhre and Schmitt-Kopplin, 2008) (figure 2). A search against KEGG, HMDB and LipidMaps with maximum error of 3 ppm was performed. MassTRIX and KEGG enable the visualization of compounds annotation on pathways of a chosen organism (*Vitis vinifera* in this example) (figure 2A.B). In total, 3351 detected masses from FTICR-MS could be annotated using MassTRIX, whereas 2613 detected masses could be annotated using our home-build metabolite database (Figure 2C). Around 22 % of total detected features from FTICR-MS are detected by both MassTRIX and homemade data base. Only few features, 119, from UPLC-Q-ToF-MS were annotated using MassTRIX, comparing to the 3351 masses from FTICR-MS (figure 2C) proving the necessity of the alignment of both datasets.

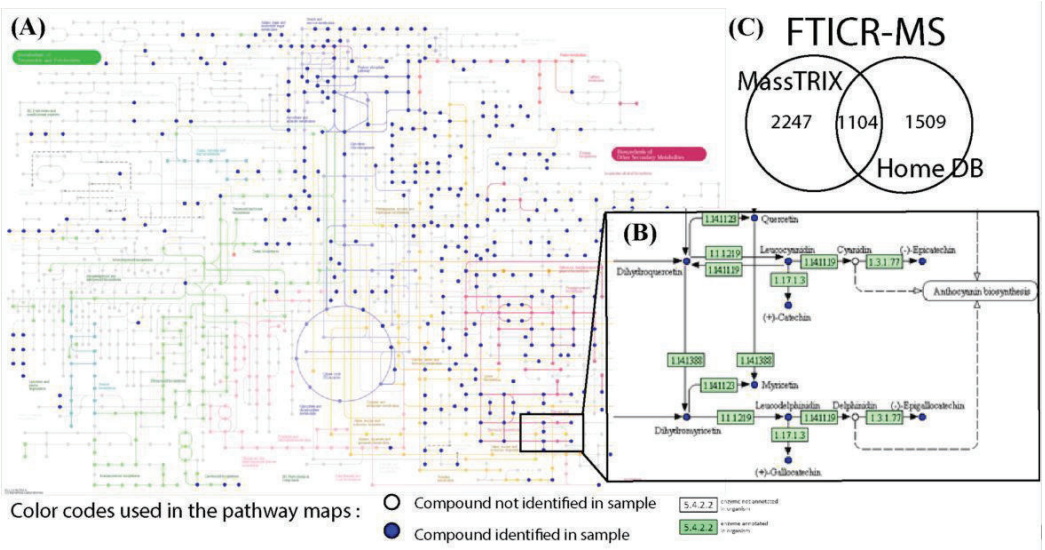


Figure 2: (A) Pathways for the biosynthesis of secondary metabolites from KEGG for the *vitis vinifera* organism and (B) enlargement of a portion of flavonoid biosynthesis pathways, with annotated compounds (blue dots) possibly corresponding to detected masses from all of the (-) FTICR-mass spectra; (C) Venn diagrams showing the convergence between annotations from different data bases (MassTRIX versus home build wine data base, top).

UPLC-Q-ToF-MS and FTICR-MS alignment.

In order to compare both datasets and confirm exact masses for the UPLC-Q-ToF-MS data, we performed the alignment of both datasets using a custom Perl script. In order to find optimal alignment conditions we used maximum error thresholds from 1 to 15 ppm in 1 ppm steps and compared the number of unique, double, triple or more hits. The procedure of alignment gives us the remarkable advantage of combining exact mass information from FTICR-MS with retention time data from UPLC-UHR-ToF-MS. With this information, elemental formulas related to unknown metabolites can also be supplied with putative chemical structures, that are not necessarily covered by metabolites present in the databases used for annotation. Figure 3 shows a plot of the number of UPLC-Q-ToF-MS features with an exact mass hit in the ICR-FT/MS data set. A feature could either have no hit, one, two, three or more hits, which are depicted individually. 2 ppm had the highest number of features with a unique hit. However we used 3 ppm for further investigation, because it is the last error having higher number of unique hits compared to features with more hits. This enabled us to cover as many different solutions as possible, without having too many false positives which were observed at the higher range of the thresholds (Figure 3). Surprisingly, we still had 158 LC-MS features with no FTICR-MS hit. These were further investigated regarding

their mass and intensity. A possible explanation is that we used different mass ranges for the two different methods. However, all of these LC-MS features were in the mass range of the FTICR-MS, from m/z 124.9920 to 688.9692. Since no specific trends in either intensities or retention time regions could be identified (data not shown), we therefore concluded that these features were molecules likely easily suppressed in direction infusion ESI, thus showing the added value of a chromatographic separation, and more generally the complementarity between the two mass spectrometry methods.

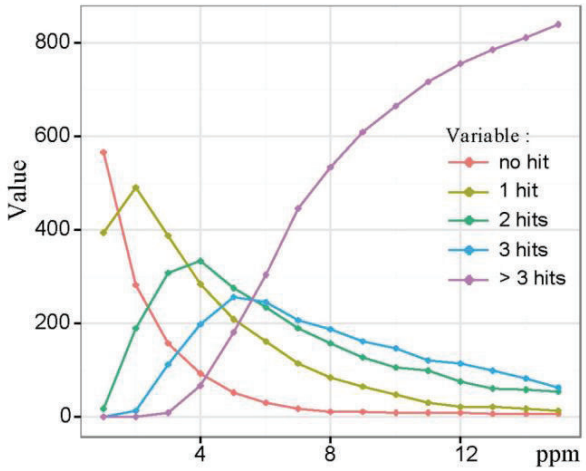


Figure 3: Statistics of LC-FT-MS alignment showing number of hits between LC-MS and FTICR-MS masses as function of error. With higher errors number of clusters with no hits decreased, but also the number of clusters with multiple hits increased. We have chosen an error of 3 ppm, which is the last point were unique hits exceed multiple hits.

Statistical analysis of FTICR-MS and UPLC-Q-ToF-MS data

Mass lists obtained from all of the samples were merged into one data matrix and the calculated molecular compositions of all m/z features detected in UPLC-Q-ToF-MS were visualized in a van Krevelen diagram (in color) after alignment with the FTICR-MS mass list (in grey) (figure 4A). The molecular composition of all m/z features detected in (-) FTICR-MS appears very complex (grey), with regions of carbohydrates, amino acids and polyphenolics being extremely occupied (Figure 1A and 4A). A convergence between mass spectrometry data sets can be observed even if the number of m/z features detected in UPLC-Q-ToF-MS (in color) is significantly lower than m/z features from FTICR-MS (in grey) (figure 4A), the peak abundances and the distributions for CHO, CHOS, CHON and CHONS

were characteristic of wine sample (Figure 4B) with a majority of CHO compounds, follow by CHON compounds (Gougeon et al., 2009; Roullier-Gall et al., 2014b).

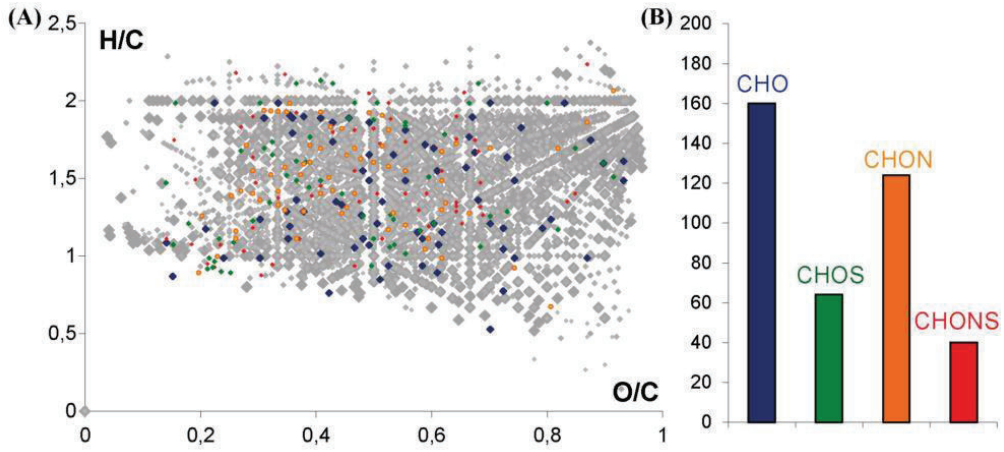


Figure 4: (A) H/C versus O/C van Krevelen diagram of the masses from FTICR-MS (grey) and common masses from UPLC-QToF-MS and FTICR-MS. (B) Histograms of the relative frequency of common masses from UPLC-QToF-MS and FTICR-MS. Color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange.

To evaluate the stability of the UPLC-Q-ToF-MS system we used QC samples and checked the RSD of peak intensity of detected peaks in all QC samples. However we did not use this as filtering criteria because the QC samples consisted of a pool of > 120 different wines from different appellations, vintages and ages and therefore the chance was high to dilute out significant and/or discriminant peaks specific to certain samples. Furthermore, samples were measured in two attempts within a timeframe of one year. To make both measurements comparable, we used the aligned matrix and filtered it for masses occurring in minimum 10% of all samples of one measurement run. In total, we obtained 977 features for further statistical analyses. However, differences in intensities between the QC samples from the two measurements were found. In order to take them into account by normalization, we used Z-transformation, which performs unit variance scaling and back transformation. This transformation strongly reduced variation across QC samples from the two measurement regimes, and thus drastically reduced, but not completely removed differences based on different times of measurement. It must be noted that the design of batches was done in a way that it resulted in sample sets that could be analyzed individually, allowing overall comparison of markers.

A PCA analysis of wines was performed on RP-UPLC-Q-ToF-MS data for the four series of Burgundy Chardonnay wines, which clearly separated them according to their appellation (Chablis, two different Meursault and Aloxe-corton) (figure 5A). This result shows for the first time that it is possible to discriminate wines according to their appellations of origin (geographical origin of grapes), regardless of the vintage, and thus nicely confirms that wine's metabolic diversity holds various chemical fingerprints that advanced non targeted metabolomics can read. Possible structural assignments for specific masses for geographical origins (figure 5B) could be obtained from databases or interfaces such as SciFinder Scholar or MassTrix (Wägele et al., 2012). However, on average more than 80% of the discriminant masses could not be annotated. Through the MassTRIX interface, 56 elemental formulas specific to Chablis wines, 59, 50 and 3 elementals formulas specific to Meursault 1, Meursault 2 and Corton wines, respectively (out of 304, 327, 204 and 267 masses, specific to Chablis, Meursault 1, Meursault 2 and Aloxe-Corton wines, respectively) could be correlated to hypothetical metabolite structures from the various metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism (Figure 5B) (Suhre and Schmitt-Kopplin, 2008; Wägele et al., 2012). If Chablis wines were clearly characterized by hits in each represented pathways (except for the flavanoid biosynthesis), Meursault1 wines were characterized by hits in degradation of aromatic compounds pathways and Merusault2 in Flavanoid biosynthesis pathways. All of the metabolic pathways appeared to be involved in this discrimination and covering a large number of molecular families including polyphenols, fatty acids, carbohydrates and amino acids (figure 5B).

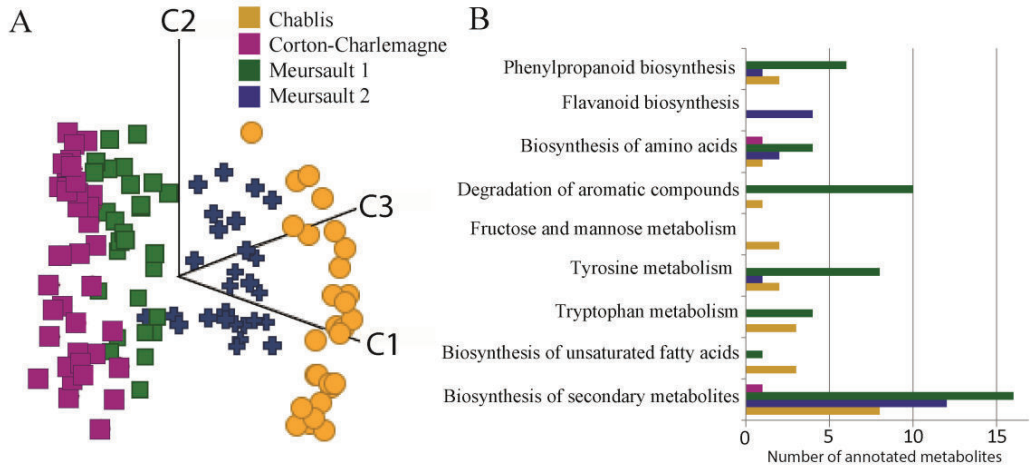


Figure 5: (A) PCA score plot for the first three components from RP-UPLC-QToF-MS data sets of white wines, from three distinct appellations in Burgundy, showing the discrimination between wines according to the appellation, regardless of the age of the wine. (B) Number of metabolite structures

that could be associated with elemental formulas specific to the different geographical origins, in some of the *Vitis vinifera* metabolic pathways, using MassTRIX.

Analysis of marker peaks

Putative annotations of significantly different metabolites only give small evidence on their real structure, because several possible isomers and isobars might exist, especially for secondary metabolites. Therefore we performed MS/MS experiments on statistically identified markers from the different data sets. We used the R package MetShot to sort given RT and m/z into different subgroups for MS/MS to have a minimum number of acquisition methods that cover all features (Neumann et al., 2013). MS/MS spectra were manually extracted and exported to .mgf files from which MetFusion batch files were generated using a custom Perl script. Identification of metabolites is the current bottleneck of metabolomics (Evans et al., 2009).

Although tandem MS libraries are growing fast, numerous metabolites are still missing. The most promising solution to overcome this problem is *in silico* fragmentation. Several tools exist and we used MetFusion for analysis (Gerlich and Neumann, 2013; Tohge and Fernie, 2009; Allen et al., 2014; Heinonen et al., 2012). This web-based tool uses the in silico fragmentation tool MetFrag in combination with different MS/MS databases, like MassBank or Metlin. Results were ranked based on spectral similarities to the *in silico* spectrum of compound matching the precursor mass and spectral similarities to spectra stored in different databases. All spectra were uploaded to a MetFusion batch client. To prove the applicability of this approach for metabolite identification we have chosen an example, which will be discussed in more detail.

As example we show results for m/z 311.0406 at retention time 3.46 min. This mass was putatively annotated as caftaric acid (Figure 6A) with an error of -0.79 ppm. Cafltaric acid is known to take part of the colour of white wine and is considered to be one of the strongest natural antioxydant of Chardonnay (Cheynier et al., 2006), and it's concentration is known to decease upon oxidation (Gawel et al., 2014; Fernández de Simón et al., 2014). From FTICR-MS, the exact mass of 311.0408523 was aligned to this feature. Using our MetShot based approach we obtained a MS/MS spectrum suitable for further analysis. We uploaded the most intense fragment peaks to MetFusion, then searched the ChemSpider

database with an error of 1 ppm and used the European mirror of MassBank for MS/MS search. Six potential candidates were found and caftaric acid yielded the highest score with 5 explained peaks (Figure 6D). Comparison to known MS/MS spectra showed spectral similarities with caffeic acid, rosmarinic acid and aesculetin (Figure 6B). Since we could not find a MS/MS spectrum in other databases for confirmation, we ran the LC-MS analysis of a standard caftaric acid under identical conditions. The comparison of MS/MS spectrum from standard with data from wine, allow to confirm the identity of this peak as caftaric acid.

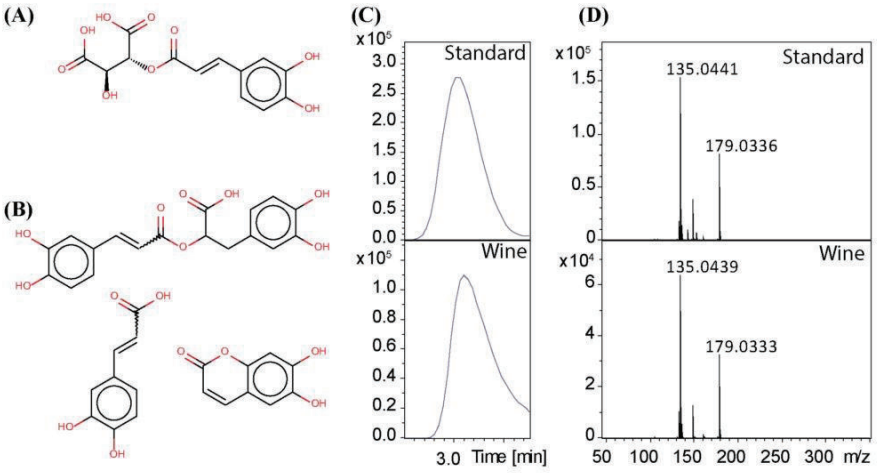


Figure 6: (A) Caftaric acid, (B) structures with spectral similarities: rosmarinic acid, caffeic acid and aesculetin. (C) Chromatographic peaks, (D) MS/MS spectrum with data from the standard and from the wine.

Conclusion

The use of Ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-ToF-MS) and Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass Spectrometer (FTICR-MS) for non-targeted metabolic profiling and metabolite identification of wine is shown here. Alignment between FTICR-MS and UPLC-Q-ToF-MS was used to obtain retention time informations together with exact mass measurements. The combination of these two methods of metabolic profiling enable a superior resolution and mass accuracy, it provides good group separation and revealed possible markers for each group. This approach added the possibility to obtain exact masses for formula calculation with retention time information of unknown molecules, which can add hints about possible molecule structures. Wine is considered as a complex biological

system impacted by many environmental conditions related to grape growth, winemaking practices, or to wine storage. From oenological point of view, the use of these two different methods of metabolic pofiling allows the authentification of wine, regardless of the vintage, depending on its geographical origin. These results provide insight novelty in terms of the wine identification by the specific chemical composition of wine from different appellations in Burgundy.

Acknowledgements

The authors would like to gratefully thank Steffen Neumann and Michael Gerlich for their help with MetFusion. We thank the Domaine de la Romanée Conti (Vosne Romanée, France), Domaine Vincent Dauvissat (Chablis, France), Domaine Conte Lafon (Meursault, France), Domaine Bouchard père & fils (Beaune, France) and Domaine La Velle (Meursault, France) for providing wine samples. This work was financially supported by the Région Bourgogne, the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) and the Comité Interprofessionnel des Vin de Champagne (CIVC).

References

Allen, F., Pon, A., Wilson, M., Greiner, R., and Wishart, D. (2014). CFM-ID: a web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra. *Nucleic Acids Res.*, gku436. doi:10.1093/nar/gku436.

Allwood, J. W., and Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Anal.* 21, 33–47. doi:10.1002/pca.1187.

Arapitsas, P., Scholz, M., Vrhovsek, U., Di Blasi, S., Biondi Bartolini, A., Masuero, D., Perenzoni, D., Rigo, A., and Mattivi, F. (2012). A Metabolomic Approach to the Study of Wine Micro-Oxygenation. *PLoS ONE* 7, e37783. doi:10.1371/journal.pone.0037783.

Atanassov, I., Hvarleva, T., Rusanov, K., Tsvetkov, I., and Atanassov, A. (2009). Wine Metabolite Profiling: Possible Application in Winemaking and Grapevine Breading in Bulgaria. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 23, 1449–1452. doi:10.2478/V10133-009-0011-9.

Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., and Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 557–566. doi:10.1016/j.tifs.2009.07.002.

Cheynier, V., Dueñas-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.

Della Corte, A., Mattivi, F., and Vrhovsek, U. (2013). Development of a targeted LC-MS/MS method for the determination of different classes of grape lipids. in, 47 (CA3).

Evans, A. M., DeHaven, C. D., Barrett, T., Mitchell, M., and Milgram, E. (2009). Integrated, Nontargeted Ultrahigh Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization

Tandem Mass Spectrometry Platform for the Identification and Relative Quantification of the Small-Molecule Complement of Biological Systems. *Anal. Chem.* 81, 6656–6667. doi:10.1021/ac901536h.

Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Martínez, J., Esteruelas, E., and Muñoz, A. M. (2014). Polyphenolic compounds as chemical markers of wine ageing in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood. *Food Chem.* 143, 66–76. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.096.

Flamini, R. (2013). Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols. *ISRN Spectrosc.* 2013, 1–45. doi:10.1155/2013/813563.

Fontana, A. R., Rodríguez, I., Ramil, M., Altamirano, J. C., and Cela, R. (2011). Solid-phase extraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for the selective determination of fungicides in wine samples. *J. Chromatogr. A* 1218, 2165–2175. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.025.

Forcisi, S., Moritz, F., Kanawati, B., Tziotis, D., Lehmann, R., and Schmitt-Kopplin, P. (2013). Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A* 1292, 51–65. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.017.

Gawel, R., Schulkin, A., Smith, P. a., and Waters, E. j. (2014). Taste and textural characters of mixtures of caftaric acid and Grape Reaction Product in model wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 25–30. doi:10.1111/ajgw.12056.

Gerlich, M., and Neumann, S. (2013). MetFusion: integration of compound identification strategies. *J. Mass Spectrom.* 48, 291–298. doi:10.1002/jms.3123.

Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Plumb, R. S., and Wilson, I. D. (2014). Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87, 12–25. doi:10.1016/j.jpba.2013.06.032.

Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., and Spraul, M. (2013). Targeted and Nontargeted Wine Analysis by 1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5610–5619. doi:10.1021/jf400800d.

Gougeon, R. D., Lucio, M., Boutegrabet, L., Peyron, D., Feuillat, F., Chassagne, D., Alexandre, H., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., et al. (2011). "Authentication Approach of the Chemodiversity of Grape and Wine by FTICR-MS," in *Progress in Authentication of Food and Wine*, eds. S. E. Ebeler, G. R. Takeoka, and P. Winterhalter (Washington, DC: American Chemical Society), 69–88.

Gougeon, R. D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Feuillat, F., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., et al. (2009). The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9174–9179.

Grata, E., Boccard, J., Guillarme, D., Glauser, G., Carrupt, P.-A., Farmer, E. E., Wolfender, J.-L., and Rudaz, S. (2008). UPLC–TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in Arabidopsis thaliana. *J. Chromatogr. B* 871, 261–270. doi:10.1016/j.jchromb.2008.04.021.

Gruz, J., Novák, O., and Strnad, M. (2008). Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chem.* 111, 789–794. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.014.

Heeren, R. M. A., Kleinnijenhuis, A. J., McDonnell, L. A., and Mize, T. H. (2004). A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1048–1058. doi:10.1007/s00216-003-2446-4.

Heinonen, M., Shen, H., Zamboni, N., and Rousu, J. (2012). Metabolite identification and molecular fingerprint prediction through machine learning. *Bioinformatics* 28, 2333–2341. doi:10.1093/bioinformatics/bts437.

Hertkorn, N., Ruecker, C., Meringer, M., Gugisch, R., Frommberger, M., Perdue, E. M., Witt, M., and Schmitt-Kopplin, P. (2007). High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1311–1327. doi:10.1007/s00216-007-1577-4.

Hong, Y.-S. (2011). NMR-based metabolomics in wine science. *Magn. Reson. Chem.* 49, S13–S21. doi:10.1002/mrc.2832.

Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak, G., Abranko, L., Koellensperger, G., and Hann, S. (2010). LC–MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chem.* 122, 366–372. doi:10.1016/j.foodchem.2010.02.053.

Liger-Belair, G., Cilindre, C., Gougeon, R. D., Lucio, M., Gebefügi, I., Jeandet, P., and Schmitt-Kopplin, P. (2009). Unraveling different chemical fingerprints between a champagne wine and its aerosols. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16545–16549. doi:10.1073/pnas.0906483106.

Lucio, M. (2009). *Datamining Metabolomics: The Convergence Point of Non-target Approach and Statistical Investigation*.

Metabolomics: Wine-omics (2008). *Nature* 455, 699–699. doi:10.1038/455699a.

Müller, C., Dietz, I., Tziotis, D., Moritz, F., Rupp, J., and Schmitt-Kopplin, P. (2013). Molecular cartography in acute Chlamydia pneumoniae infections-a non-targeted metabolomics approach. *Anal. Bioanal. Chem.*

Naz, S., Vallejo, M., García, A., and Barbas, C. (2014). Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J. Chromatogr. A* 1353, 99–105. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.071.

Neumann, S., Thum, A., and Böttcher, C. (2013). Nearline acquisition and processing of liquid chromatography-tandem mass spectrometry data. *Metabolomics* 9, 84–91. doi:10.1007/s11306-012-0401-0.

Prosen, H., Strlic, M., Kocar, D., and Rusjan, D. (2007). In Vino Veritas: LC-MS in wine analysis. *LC GC EUR* 20, 617–+.

Püssa, T., Floren, J., Kuldkepp, P., and Raal, A. (2006). Survey of Grapevine Vitis vinifera Stem Polyphenols by Liquid Chromatography−Diode Array Detection−Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7488–7494. doi:10.1021/jf061155e.

Roullier-Gall, C., Boutegrabet, L., Gougeon, R. D., and Schmitt-Kopplin, P. (2014a). A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. *Food Chem.* 152, 100–107. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.056.

Roullier-Gall, C., Lucio, M., Noret, L., Schmitt-Kopplin, P., and Gougeon, R. D. (2014b). How Subtle Is the "Terroir" Effect? Chemistry-Related Signatures of Two "Climats de Bourgogne." *PLoS ONE* 9, e97615. doi:10.1371/journal.pone.0097615.

Rubert, J., Lacina, O., Fauhl-Hassek, C., and Hajslova, J. (2014). Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: a reliable tool for wine authentication? *Anal. Bioanal. Chem.* doi:10.1007/s00216-014-7864-y.

Schmitt-Kopplin, P., Gabelica, Z., Gougeon, R. D., Fekete, A., Kanawati, B., Harir, M., Gebefuegi, I., Eckel, G., and Hertkorn, N. (2010). High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2763–2768. doi:10.1073/pnas.0912157107.

Suhre, K., and Schmitt-Kopplin, P. (2008). MassTRIX: mass translator into pathways. *Nucleic Acids Res.* 36, W481–W484. doi:10.1093/nar/gkn194.

Sun, B., Leandro, M. C., de Freitas, V., and Spranger, M. I. (2006). Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1128, 27–38. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.026.

Tarr, P. T., Dreyer, M. L., Athanas, M., Shahgholi, M., Saarloos, K., and Second, T. P. (2013). A metabolomics based approach for understanding the influence of terroir in Vitis Vinifera L. *Metabolomics* 9, 170–177. doi:10.1007/s11306-013-0497-x.

Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., and Wilson, I. D. (2012a). Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal. Chim. Acta* 711, 7–16. doi:10.1016/j.aca.2011.09.042.

Theodoridis, G., Gika, H., Franceschi, P., Caputi, L., Arapitsas, P., Scholz, M., Masuero, D., Wehrens, R., Vrhovsek, U., and Mattivi, F. (2012b). LC-MS based global metabolite profiling of grapes: solvent extraction protocol optimisation. *Metabolomics* 8, 175–185. doi:10.1007/s11306-011-0298-z.

Toffali, K., Zamboni, A., Anesi, A., Stocchero, M., Pezzotti, M., Levi, M., and Guzzo, F. (2011). Novel aspects of grape berry ripening and post-harvest withering revealed by untargeted LC-ESI-MS metabolomics analysis. *Metabolomics* 7, 424–436. doi:10.1007/s11306-010-0259-y.

Tohge, T., and Fernie, A. R. (2009). Web-based resources for mass-spectrometry-based metabolomics: A user's guide. *Phytochemistry* 70, 450–456. doi:10.1016/j.phytochem.2009.02.004.

Tolin, S., Pasini, G., Simonato, B., Mainente, F., and Arrigoni, G. (2012). Analysis of commercial wines by LC-MS/MS reveals the presence of residual milk and egg white allergens. *Food Control* 28, 321–326. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.015.

Vaclavik, L., Lacina, O., Hajslova, J., and Zweigenbaum, J. (2011). The use of high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Anal. Chim. Acta* 685, 45–51. doi:10.1016/j.aca.2010.11.018.

Wägele, B., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., and Suhre, K. (2012). MassTRIX Reloaded: Combined Analysis and Visualization of Transcriptome and Metabolome Data. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0039860.

Wang, Y., Catana, F., Yang, Y., Roderick, R., and van Breemen, R. B. (2002). An LC-MS Method for Analyzing Total Resveratrol in Grape Juice, Cranberry Juice, and in Wine. *J. Agric. Food Chem.* 50, 431–435. doi:10.1021/jf010812u.

Zöllner, P., Leitner, A., Lubda, D., Cabrera, K., and Lidner, W. (2000). Application of a chromolith speedROD RP-18e HPLC column: Determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 52, 818–820. doi:10.1007/BF02491011.

3 Conclusion générale du chapitre 1

En conclusion, la combinaison de FTICR-MS à ultra-haute résolution et de deux méthodes de chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse, RP-UPLC/Q-ToF-MS et HILIC-UPLC/Q-ToF-MS pour l'analyse métabolomique non ciblée a été adaptée pour l'analyse du vin. La combinaison de ces méthodes de profilage apporte une résolution et une puissance de détection exceptionnelle, ce qui permet une séparation optimale des vins, rendant possible la détection de nombreux marqueurs discriminant différentes appellations de vins blancs, ou discriminant des vins anciens (SV1) par rapport à des vins de millésimes plus récents. La capacité de caractérisation d'échantillons complexes par cette plateforme combinée est ainsi améliorée.

Le problème majeur de la métabolomique utilisant la spectrométrie de masse est l'identification structurale des masses détectées. Cependant il y a de nombreux avantages à combiner ces différentes approches non ciblées. En effet, la corrélation entre les signaux de FTICR-MS et ceux obtenus à l'aide d'une résolution plus faible par UPLC/Q-ToF-MS permet la validation d'annotations de composants, la distinction entre les isomères ainsi que la détermination précise de masses associées aux temps de rétentions.

Chapitre 2 : Étude de séries verticales de vins et vieillissement en bouteille

1 Marqueurs de vieillissement

Dans cette étude, la combinaison d'approches métabolomiques non ciblées a été utilisée pour l'analyse de séries verticales de vins de Bourgogne représentant l'évolution naturelle de vins en bouteilles conservés en cave. Sept différentes séries de vins rouges (Pinot noir) et blancs (Chardonnay) provenant de cinq vignobles Bourgignons de millésimes 1934 à 2010, ont été analysées par Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions et Transformée de Fourier (FTICR-MS) et Chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de masse à quadrupole et temps de vol (UPLC/Q-ToF-MS). Il est supposé que la composition chimique d'un vin contient une mémoire des divers facteurs environnementaux qui ont eu une incidence sur son bagage métabolique au moment de son élaboration et ainsi refléte son millésime. Des milliers de métabolites suivant une évolution spécifique et dont la concentration augmente ou diminue avec le vieillissement des bouteilles pourraient être révélés, soulignant le fort impact du vieillissement sur la composition du vin. Les analyses métabolomiques non ciblées ainsi que les analyses statistiques multivariées pourraient révéler des familles importantes de métabolites spécifiques discriminant le vieillissement. Le but de cette étude était de caractériser l'évolution de la diversité chimique des vins en bouteille. Les masses spécifiques qui ont influencé le plus la composition du vin lors du vieillissement ont été identifiées par FTICR-MS et UPLC/Q-ToF-MS et structurellement caractérisées par UPLC/Q-ToF-MS et UPLC/Q-ToF-MS².

Cette publication est en cours de finalisation, par conséquent les résultats sont présentés sous format d'article mais la partie résultats et discussions doit être complétée.

Verticalomics: non targeted metabolomics of vertical series of wines

Roullier-Gall C.[a,b], Witting M.[b], Gougeon R.D.*[a] and Schmitt-Kopplin P.*[b,c]

[a]UMR A 02.102 PAM, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, Dijon, France.
[b] Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany.
[c] Chair of Analytical Food Chemistry, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany.
*Correspondance: regis.gougeon@u-bourgogne.fr / schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

* Gougeon, Régis: Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, Rue Claude Ladrey, BP 27877 Dijon Cedex, France, (+33) 0380396191, regis.gougeon@u-bourgogne.fr
Schmitt-Kopplin, Philippe: Helmholtz Zentrum Munchen, Ingolstädter Landstr. 1, 85758 Neuherberg, Germany, (+49) 08931873246, schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

Abstract

Combined non-targeted metabolomics approaches (FTICR-MS and both RP and HILIC UPLC/Q-ToF-MS were used for the analysis of vertical series of red and white Burgundy wines, representing natural bottle evolution in cellars, over a period ranging from 1934 to 2010. Unsupervised statistical analyses of the tens of thousands of detected masses exhibited an unprecedented efficiency for the discrimination of very close appellations, regardless of the age of the wine, in particular for white wines. Supervised PLS-DA further allowed the extraction of thousands of masses, common to both red and white wines, whose intensity exhibited decreasing and increasing trends with the age of the wine. For the first time, such age-related markers, which provide a remarkable example of the ability to read chemical memories of bottle-aged wines, could be identified. Advanced untargeted-base MS^2 analyses were implemented for the structural identification of some age-related biomarkers.

Keywords

Vertical series of wine, ageing chemistry, direct injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry, tandem mass spectrometry, non-targeted metabolomics.

Introduction

As for spirits, sensory properties of premium wines are known to improve during the period of bottle aging, where the composition changes through a complex array of chemical reactions that are only partly understood (1, 2). An optimum is thus reached more or less

quickly depending on the initial metabolic baggage of the wine (3). Many studies have attempted to describe the chemical changes during bottle aging, with particular emphasis on the phenolics composition, the color, or the aroma and flavor compounds (1, 2, 4–8). Red wines have been naturally more studied because of their globally higher concentrations in polyphenols, which make them more resistant against oxidation, considered here as the major mechanism involved in the aging process of bottled wines (9, 10). In contrast, nearly no experimental results have been reported on the long-term bottle ageing of white wines. However, attention has been brought to the short-term ageing of the latter in the particular context of premature oxidation, characterized by the rapid disappearance of fruity aromas and the concomitant appearance of unpleasant sensory notes often described as "heavy" along with the browning of the color (11). Volatile compounds specifically associated with this untypical ageing have been identified, and they include in particular aldehydes with acetaldehyde (12), phenylacetaldehyde or methional (13), along with sotolon (14) or o-aminoacetophenone (15).

This particular example of premature oxidation studies raises the question of the nature of the information that is searched for, when analyzing wines upon ageing. Indeed, besides the molecular characterization of the wine that is considered to be sensorialy oxidized, the identification of compounds responsible for the aroma is also designed for the possible deciphering of the chemical mechanisms by which these compounds were formed, and subsequently for the identification of precursor molecules for these mechanisms. Attempts to identify methional or o-amino acetophenone precursors have however shown that such targeted approaches were unable to succeed (13, 15), thus illustrating the yet-unknown diversity of mechanisms possibly involved in the formation of oxidation markers.

An alternative approach for adressing wine ageing is to analyze vertical series of wines as shown recently for Bordeaux Cabernet and Merlot wines (4) or for 50 and 30 year series of Cabernet and Shiraz wines from Australia (6), where fundamentals of the conceptual approach lie in the fact that any analyzed feature corresponds to an instanteneous snapshot of wines exhibiting distinct time-related evolutions. Here again, targeted analyses were able to provide only restrictive trends related to the chemistry of wine ageing, as examplified by the evidence that non-bleachable pigments play a much larger role in long-term wine color than anthocyanins (6).

Here, we show that the combination of FTICR-MS and UPLC-QTOF-MS non-taregted analyses of four vertical white wine series (Chardonnay) ranging from 1934 to 2012, and three vertical red wines series (Pinot noir) from 1959 to 2009 allowed for the first time the identification of chemical markers associated with the ageing process, regardless of the appellation or the colour.

Materials and methods:

Materials

All solvents used were high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry grade (Methanol, acetonitrile and water) from Fluka Analytical (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). An electrospray ionization (ESI) tuning mix (Argilent, Santa Clara, USA) was used for time of flight ToF-MS calibration.

Sampling and sample preparation.

A total of 152 samples of bottled Chardonnay and Pinot noir wines from Burgundy were analyzed. The four Chardonnay vertical series were from three different appellations in Burgundy, with two series from the same Meursault appellation, but from two distinct estates. The three Pinot noir vertical series were from three different appellations in Burgundy, but two of these series were from the same estate (Table 1).Wines were sampled into a 2ml vial under argon atmosphere to protect it from oxygen and stored in dark at 7 °C. 50 µl of wine were diluted into 950 µl methanol for FTICR-MS analysis and 40 µl of acetonitrile were added to 960 µl of wine for both RP UPLC/Q-ToF-MS and HILIC UPLC/Q-ToF-MS analyses. Quality control (QC) samples were made by mixing 10 µl of each samples. All MS/MS measurements were performed on QC samples.

Table 1: Details on vertical series of wines

	Appellation	Estate	Period	Vintages analysed	number of vintages
White	Meursault	la Velle	1979 to 2006	1979 to 2006	27
	Corton Charlemagne	Bouchard père et fils	1934 to 2010	1934 - 1955 - 1957 to 1960 - 1965 to 1967 - 1972 - 1973 - 1975 - 1976 - 1978 - 1980 - 1982 to 1984 - 1987 to 1989 - 19991 - 1994 to 2010	34
	Chablis	Vincent Dauvissat	1984 to 2012	1983 to 1990 - 1992 to 2012	29
	Meursault	Comtes Lafon	1969 to 2010	1969 - 1976 - 1979 - 1982 - 1985 - 1990 to 1992 - 1994 - 1996 - 1997 - 1999 to 2010	24
Red	Côte de Beaune	la Velle	1976 to 2007	1976 to 1979 - 1981 to 1986 - 1988 to 1993 - 1995 - 1996 - 1998 to 2003 - 2005 to 2007	26
	Richebourg	Romanée Conti	1959 to 2009	1959 - 1966 - 1979 - 1989 - 1999 - 2009	6
	Grand Echezeau	Romanée Conti	1959 to 2009	1959 - 1966 - 1979 - 1989 - 1999 - 2009	6

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry analysis (FTICR-MS).

High-resolution mass spectra were acquired using an FTICR-MS instrument (SOLARIX, Bruker Daltonik, Bremen, Germany) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet and an APOLO II electrospray ionization source in the negative ionisation mode. Sample was introduced at a flow rate of 120 µL.h-1 using a syringe pump. The MS was externally calibrated on clusters of arginine (10mg.L^{-1}) in methanol. Spectra were acquired with a time domain of 4 mega-words with a mass range of m/z 100 to 1000. Up to 500 scans were accumulated per sample. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR) spectra were internally recalibrated on fatty acid with mass errors below 0.05 ppm and exported to peak lists at a signal-to-noise ratio (S/N) of 4 and higher.

Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry analysis (UPLC/Q-ToF-MS)

Metabolites were separated using a Waters Acquity UPLC system coupled to a Bruker maXis UHR-ToF-MS. Two different separation methods, reversed-phase (RP) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) were employed. In RP mode middle to non-polar metabolites were separated using a BEH C8 column (150 mm x 2.1 mm ID) with an ACN gradient. Buffer A consisted of 10% ACN in water and buffer B of 100% ACN, both with 0.1% formic acid. Separation of polar metabolites was achieved with a BEH Amide column (150 mm x 2.1 mm ID) and a gradient from 95% ACN / 5% water to 50% ACN / 50% water, both with 10 mM ammonium formiate and 0.1% formic acid. Detection was carried out in negative ionization mode with following parameter: Nebulizer pressure = 2.0 bar, dry gas flow = 8.0 l/min, dry gas temperature = 200°C, capillary voltage = 3500 V, end plate offset = - 500 V, mass range = 50-1200 m/z.

MS1 data processing: Bruker raw data files were imported into Genedata Expressionist for MS 7.6, noise subtracted aligned and peak picked. Intermediate results were stored in .sbf format. The final data matrix was exported as .xlsx file and .gda file for further statistical analysis using Genedata Expressionist for MS Analyst 7.6. Visual comparison of the quality control (QC) sample injected in the beginning, the middle (every 10 samples) and the end of a run allowed the data quality control and demonstrated the system stability (16).

MS2 data processing: Peaks identified as potential ageing markers were selected for fragmentation using AutoMSn and scheduled precursor lists (SPL). Several acquisitions were performed to avoid overlap of isolation regions. MS/MS spectra were picked and exported from Bruker DataAnalysis 4.1 SP2 using a custom VB script. Masses with S/N > 5, minimum absolute intensity of 100, relative intensity > 0.1 % were exported to .asci files. For identification purposes MS/MS spectra were converted to MetFusion batch files using a custom perl script. In silico fragmentation was performed with following parameters: mf Search = 10 ppm, mf Limit = 20000, clustering = true, mf MZ = 10.0 ppm, mf Database = pubchem / chemspider, mf MZabs = 0.01. Precursors were selected from PubChem and/or Chemspider. MS/MS spectra were additionally matched against MassBank. Results were re-ranked using chemical similarity as described previously.

Statistical analysis

Hierarchical Clustering Analysis (HCA) was performed with the Hierarchical clustering explorer 3.5 sofltware (Maryland, USA) on normalized data. Euclidian distances and average linkages were chosen to measure distance. This method allowed samples to be grouped into homogeneous and distinct clusters, without imposing preliminary hypotheses on the data.

Principal Component Analysis (PCA) is another unsupervised method with the capacity to reduce the complexity of a multivariate dataset. Its goal is to extrapolate important information and display it as a set of new independent variables called principal components. This method, like Hierarchical clustering, discloses the similarity pattern of the observations or variables. A 95% cut-off of the frequencies was used to select the optimum number of principal components. Partial least square discriminative analysis (PLS-DA*)* models were used to extract the most discriminative metabolites, which were further manually checked within the spectra. Discriminative masses with a variable importance in

projection (VIP) value >1 and *p* values <0.05 were considered as relevant. PCA and PLS-DA were performed with Genedata Expressionist for MS Analyst 7.6 for LC-MS data.

Two-dimensional van Krevelen diagrams were constructed using compositional networks (based on elemental compositions) and functional networks based on selected functional group equivalents enabling improved assignment option of elemental composition and classification of organic complexity with tuneable validation windows (20).

Results & discussion

Classical analyses in oenology

Among the different vertical series, we gathered the classical oenological parameters recorded at bottling for the 34 Corton Charlemagne wines spanning vintages from1934 to 2010 (Fig.1). These wines were analyzed for total acidity, malic acid, pH, SO_2, volatile acidity, dry extract, sugars and iron (Fig.1). Results clearly showed that the iron content at bottling was the only measured parameter which exhibited a nearly linear increasing trend with the age of the wine, from 0.01 mg/L in 2010 to more than 12 mg/L in 1934. Interestingly, we could observe here, that none of the other parameters actually exhibited variation that could be correlated with the age of the wine, in agreement with the study of McRae et al., bearing in mind that the latter referred to analyses done at the same time for all of the wines from the vertical series, and not at bottling (6). Observed inter annual variation for the parameters in Fig. 1 would thus be mostly driven by vintage characteristics, including climatic conditions, vineyard management and oenological processes.

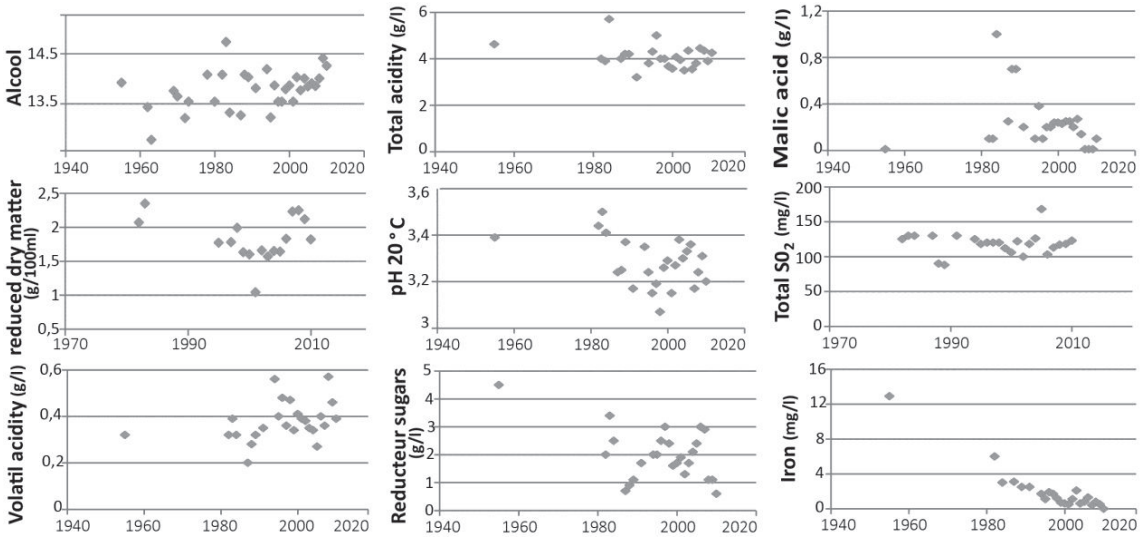


Figure 1: Classical oenological parameters measured before bottling for the 76 wines from the Corton Charlemagne vertical series. These analyses were done on site.

Untargeted metabolomics.

Four vertical series of white wine (Chardonnay) and three vertical series of red wine (Pinot noir) from Burgundy (Table 1) were analyzed through a combination of untargeted MS-based metabolomics plateform (Supp Fig.1). Both reverse (RP) and hydrophilic (HILIC) phase liquid chromatography, coupled to Q-ToF-MS were used to increase the number of detected metabolite features (16), in combination with direct injection FTICR-MS to increase the sensibility and the precision of mass measurement (22,23). Up to 68,986, 14,507 and 14,934 distinct mass features, using FTICR-MS, HILIC Q-ToF-MS and RP Q-ToF-MS respectively, could be extracted by data filtering with the GeneData software. Only 4,672 of these features were actually common to the three analytical tools (Fig.2).

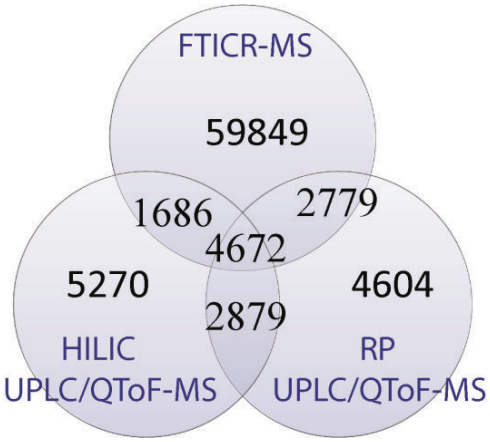


Figure 2: Venn diagram of masses common to both red and white wines, using FTICR-MS, HILIC Q-ToF-MS and RP Q-ToF-MS.

Geographical and varietal signatures.

An unsupervised statistical analysis of all of the RP UPLC Q-ToF-MS data straightforwardly led to a clear discrimination of wines according to the grape variety they were made of (Chardonnay or Pinot noir) (Fig.3A). Such discrimination, which could also be obtained from FTICR-MS or HILIC-MS data, further provided an unprecedented sub-discrimination among vertical series. Appellations indeed appeared discriminated regardless of the vintage for both red and white wines. This result is all the more remarkable that two vertical series were from the same Meursault appellation, thus emphasizing the potentiality of

such MS-based metabolomics for authentication purposes (18–20). Separate PLS-Discriminant Analyses of red and white wines subsets provided enhanced representations of the discriminations between appellations, in particular for wines from Chablis along the first component (Fig. 3C). Interestingly again, the two vertical series of Meursault were separated along any of the first thre components. In contrast for red wines, the two neighbouring appellations of Grands Echezeaux and Richebourg could not be separated (Fig. 3B), and the first two components could only discriminate wines from the Côte de Beaune (Beaune) to those from the Côte de Nuits (Grands Echezeaux and Richebourg).

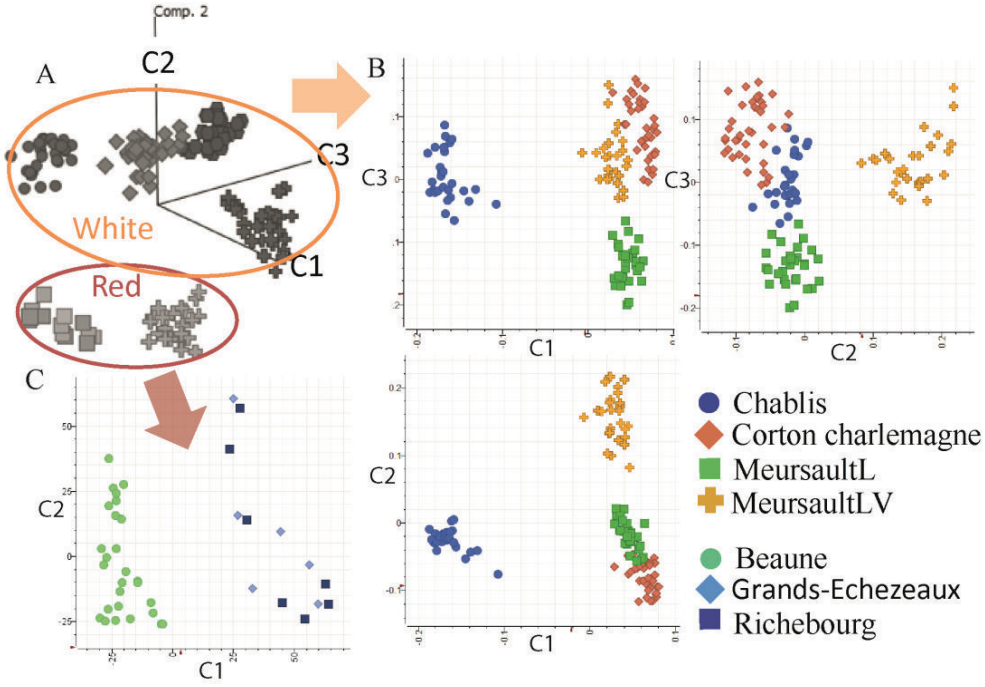


Figure 3: RP-UPLC-Q-ToF-MS data (A) PCA of all vertical series, (B) PLS-DA of red wines series and (C) white wines series.

Aging markers.

In order to extract age-related metabolomics signatures, supervised PLS-Discriminant Analyses of RP UPLC/Q-ToF-MS data were designed (Fig. 4A), and masses common to both red and white wines, which drove this age-related model (highest VIP score value) were reduced to 1,691, 1,429 and 2,288 pertinent masses for FTICR-MS, HILIC/QtoF-MS and RP/QtoF-MS, respectively (Fig. 4B). The Venn diagram (Fig. 4B) showed that while most of these markers were unique to the MS method used, only 91 masses were common to the three analytical techniques. Discriminant masses, common to both red and white wines were

thereafter mapped into van Krevelen diagrams according to their time-related evolution (Fig.4C and Supp Fig.2). Various classes of metabolites seemed to follow either of the age-related trends (masses whose intensity increases with age in yellow and those whose intensity decreases with the age in red). However, sugar-containing compounds, polyphenols and amino acids appeared to be specifically involved, with the latter particularly increasing with the age, consistently with results from old wines analyses (Ref à publie sur SV1). The involvement of polyphenolics is in agreement with the literature (4, 6, 21). Different databases, including metlin, KEGG, and a homemade database specific to plants, grape and wine, were questioned for the annotation of these markers (Fig. 4D) and only 20% of them actually found hits in these databases, with metlin always giving the highest number of hits. This approach was used to produce a shortlist of potential candidates that could be confirmed by MS-MS experiments.

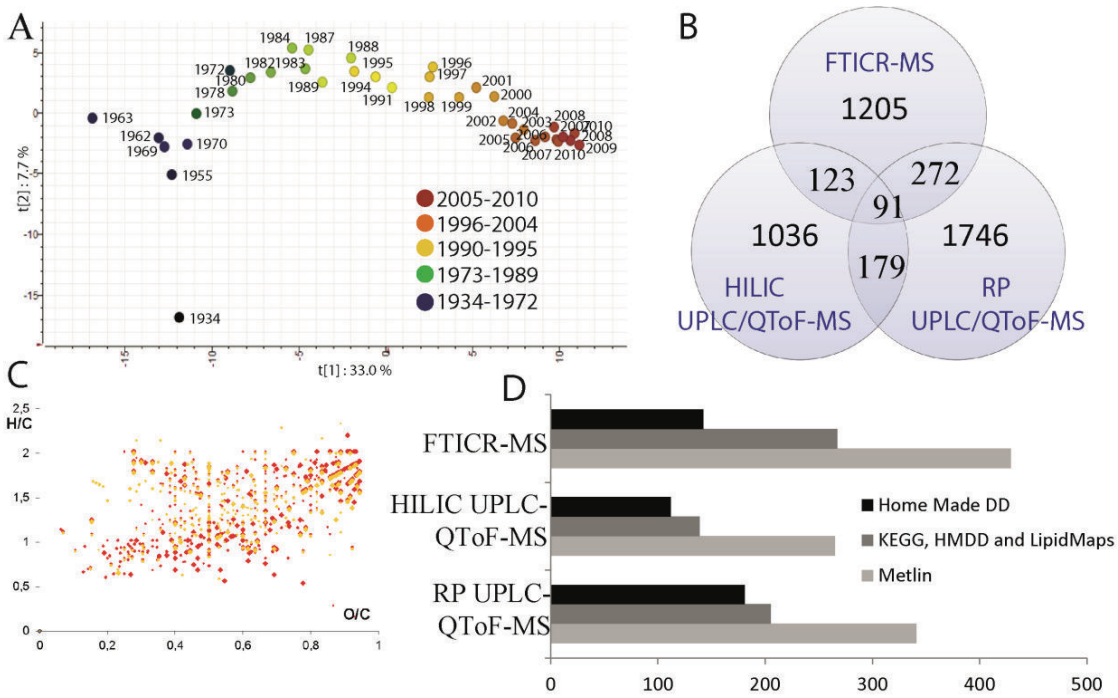


Figure 4: (A) PLS-DA score plot for the first two components from RP UPLC/Q-ToF-MS data for the Corton Charlemagne white wines, showing the age-related model built from vintage. (B) Venn diagram of masses common to both red and white wines, which followed these aging trends. (C) Van Krevelen diagram of FTICR-MS masses whose intensity increased (yellow) or decreased (red) with the age of wines. (D) Counts of masses which found hits in our home made data base, KEGG HMDD Lipidmaps and Metlin.

Age-related biomarkers for both red and white wines were individually extracted and analyzed by RP-UPLC-Q-ToF-MS² for structural characterization. Figure 5 illustrates the corresponding identification and characterization workflow in the case of a white wine, for UPLC-Q-ToF-MS with TIC for the all MS spectrum (Fig. 5A) together with the survey view (Fig.5B) and the total spectrum corresponding to the sum of spectra from all retention times (Fig.5C). MS/MS was done on the same UPLC-Q-ToF-MS system for the 2,288 wine aging biomarkers and figures 5D and 5E show some examples of fragmentation for the parent ions at m/z 241.0372 and m/z 320.9947. The latter were examples of the 272 detected masses by both RP UPLC-MS and FTICR-MS (Fig. 4B). MetShot was then used to extract pertinent structures for these MS^2 features, from Metfusion, Massbank or Metfrag databases. These structural assignments were carried out on the basis of probable elemental compositions estimated from accurate m/z values, a careful analysis of the isotopic patterns and the occurrence of diagnostics in MS/MS spectra. However the limited coverage of available databases, especially in the case of ESI-MS/MS (22) identified only few markers. 507 possible biomarkers for wine aging were identified. It must be noted that some of the potential biomarkers could not be identified by MS/MS because of their low intensity in QC samples.

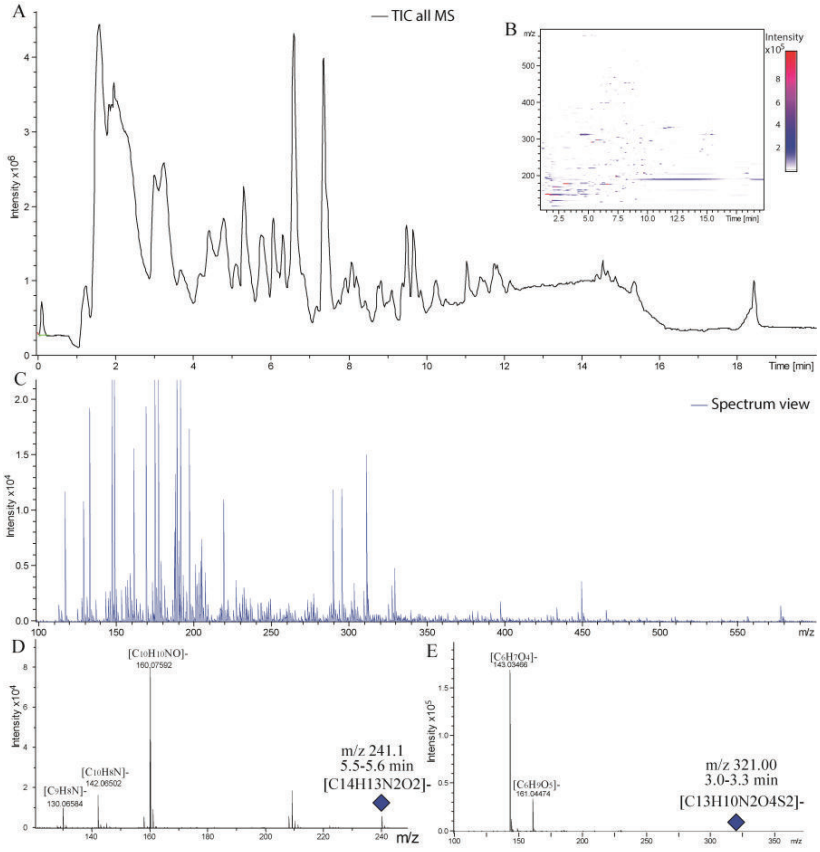


Figure 6: (-) RP-UPLC-Q-ToF-MS/MS for the characterization of wine aging biomarkers. (A) TIC and (B) Survey view of the sample (m/z versus retention time). (C) Total spectrum of the sample (intensity versus m/z). MRM spectrum for two examples of wine aging parent ion biomarkers at m/z 241.1 (D) and m/z 321.0 (E).

Conclusions

This paper reports the first combined use of FTICR, RP- and HILIC- UPLC Q-ToF mass spectrometry for the detection and identification of yet-unknown wine aging biomarkers. Questions addressed in this "verticalomics" conceptual approach concerned the nature of the information that is searched for when recording an instantaneous picture of vertical series of wines, which inherently exhibit different chemical compositions because of at least two reasons: (i) they were not made of the same grapes and therefore, they were not holding the same metabolic baggage at bottling; (ii) they did not age for the same time. Our results showed that within that frame, only non-targeted analyses can possibly decipher pertinent chemical fingerprints. Aging markers, which correspond here to elemental formulas associated with masses that are more and more abundant – or more and more scarce – with the age of the wine at the moment of analysis, are among such fingerprints.

Our results not only confirmed that such fingerprint could indeed be recorded, but also that it would be common to any of the vertical series regardless of the grape variety (chardonnay or Pinot noir). However, the structural identification of biomarkers remains the most challenging and time-consuming step, despite the ultra high resolution of FTICR-MS. Besides, our results show for the first time, that non-targeted MS-based analyses of wines potentially exhibit a remarkable ability to discriminate wines of the same grape variety and from neighboring appellations, regardless of their vintages, with highly potential applications in authentication issues.

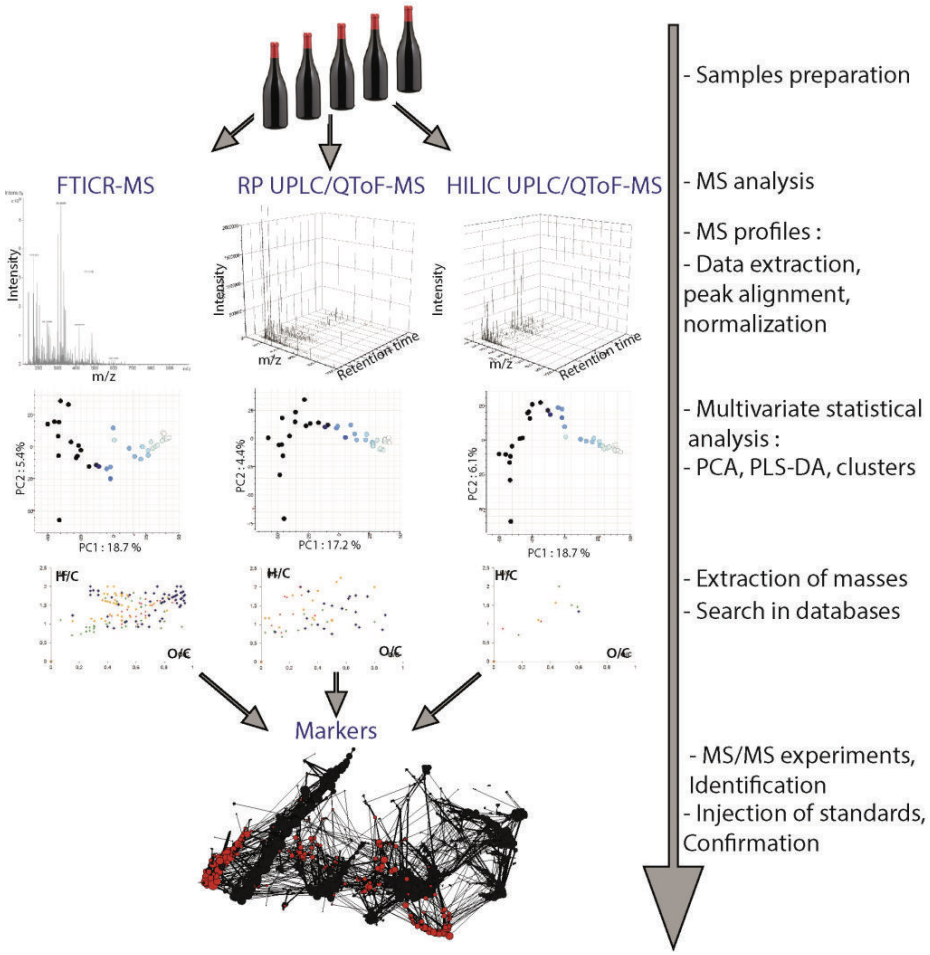
Acknowledgments. The authors warmly thank the domaine La Velle, Bouchard père et fils, Dauvissat, Lafon, Romanée Conti for providing wines samples. This work was financially supported by the Région Bourgogne, the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) and the Comité Interprofessionnel des Vin de Champagne (CIVC).

References

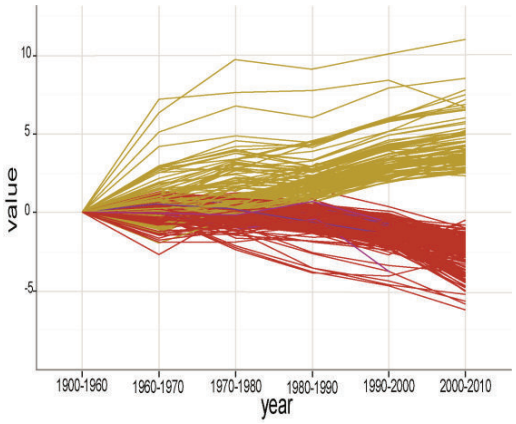
1. Recamales ÁF, Sayago A, González-Miret ML, Hernanz D (2006) The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Res Int* 39(2):220–229.
2. Ugliano M (2013) Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. *J Agric Food Chem* 61(26):6125–6136.
3. Ribéreau-Gayon P, DUBOURDIEU D, DONÈCHE B (2012) Traité d'oenologie. Tome 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements (6 Éd.).
4. Chira K, Pacella N, Jourdes M, Teissedre P-L (2011) Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem* 126(4):1971–1977.
5. Marquez A, Serratosa MP, Merida J (2014) Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chem* 146:507–514.
6. McRae JM, et al. (2012) Phenolic Compositions of 50 and 30 Year Sequences of Australian Red Wines: The Impact of Wine Age. *J Agric Food Chem* 60(40):10093–10102.
7. Monagas M, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C (2006) Statistical interpretation of the color parameters of red wines in function of their phenolic composition during aging in bottle. *Eur Food Res Technol* 222(5-6):702–709.
8. Puškaš V, Miljić U (2012) The application of D-optimal design for modelling the red wine ageing process. *Food Control* 28(2):362–367.
9. Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V, Silva AMS (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res Int* 44(5):1115–1126.
10. Karbowiak T, et al. (2009) Wine Oxidation and the Role of Cork. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50(1):20–52.
11. Cheynier V, Rigaud J, Souquet J-M, Duprat F, Moutounet M (1990) Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *Am J Enol Vitic* 41(4):346–349.

12. Kreitman GY, Laurie VF, Elias RJ (2013) Investigation of Ethyl Radical Quenching by Phenolics and Thiols in Model Wine. *J Agric Food Chem* 61(3):685–692.
13. Escudero A, Hernandez-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2000) Clues about the Role of Methional As Character Impact Odorant of Some Oxidized Wines. *J Agric Food Chem* 48(9):4268–4272.
14. Lopes P, et al. (2009) Impact of Oxygen Dissolved at Bottling and Transmitted through Closures on the Composition and Sensory Properties of a Sauvignon Blanc Wine during Bottle Storage. *J Agric Food Chem* 57(21):10261–10270.
15. Hoenicke K, et al. (2002) "Untypical aging off-flavor" in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors. *Anal Chim Acta* 458(1):29–37.
16. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID (2012) Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Anal Chim Acta* 711:7–16.
17. Tziotis D, Hertkorn N, Schmitt-Kopplin P (2011) Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. *Eur J Mass Spectrom Chichester Engl* 17(4):415–421.
18. Roullier-Gall C, Boutegrabet L, Gougeon RD, Schmitt-Kopplin P (2014) A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. *Food Chem* 152:100–107.
19. Roullier-Gall C, Lucio M, Noret L, Schmitt-Kopplin P, Gougeon RD (2014) How Subtle Is the "Terroir" Effect? Chemistry-Related Signatures of Two "Climats de Bourgogne." *PLoS ONE* 9(5):e97615.
20. Gougeon RD, et al. (2011) in *Progress in Authentication of Food and Wine*, eds Ebeler SE, Takeoka GR, Winterhalter P (American Chemical Society, Washington, DC), pp 69–88.
21. Del Álamo M, Nevares I, Gallego L, Martin C, Merino S (2008) Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Anal Chim Acta* 621(1):86–99.
22. Allen F, Pon A, Wilson M, Greiner R, Wishart D (2014) CFM-ID: a web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra. *Nucleic Acids Res*:gku436.
23. Roullier-Gall C, Witting M, Tziotis D, Ruf A, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P (2014) Integrating analytical resolutions in non-targeted wine metabolomics. Tetrahedron (Submitted)
24. Roullier-Gall C, Witting M, Gougeon RD and Schmitt-Kopplin P (2014) High precision mass measurements for wine metabolomics. Frontiers in Food Chemistry (Submitted).

Supplemental:



Supplemental figure 1: Workflow showing the successive steps for data acquisition and analysis of vertical series. Samples were analyzed by FTICR-MS, RP-UHPLC-MS and HILIC-MS in order to collect the widest range of metabolites potentially present. MS profiles were scrutinized and data extractions were performed with optimized parameters. Multivariate statistical analysis included PCA, PLS-DA and HCA aimed at highlighting underlying trends. Markers were extracted and identified by tandem MS experiments with confirmation by standards injection.



Supplemental figure 2: Discriminant masses, common to both red and white wines whose intensity increases with age in red and those whose intensity decreases with the age in yellow.

2 Saint Vivant

Les travaux de restauration de l'ancien monastère clunisien de Saint-Vivant en Bourgogne a révélé, enterrée dans une cave, une bouteille de vin (SV1) datée de 1772 à 1860. Des analyses non ciblées par FTICR-MS des échantillons prélevés au niveau du haut, du bas ainsi que des extraits du dépôt ont révélé une augmentation de la concentration de l'ensemble de la diversité chimique du haut vers le bas, ainsi que la présence d'acide tartrique et de resvératrol confirmant la nature des raisins rouge formant le vin SV1. Les espaces chimiques CHNOS de SV1 présentent des similitudes avec une série de vins rouges de Romanée Saint Vivant (de cépage pinot noir), couvrant six millésimes différents de 1915 à 2009, bien que cette bouteille est caractérisée par une plus grande abondance de composés azotés. La comparaison de SV1 à 68 vins rouges différents provenant de Bourgogne et répartis sur l'ensemble du 20ème siècle par une analyse des données FTICR-MS par OPLS a montré que le vin SV1 datait probablement du 19ème siècle. Enfin, l'analyse par composante principale des masses discriminantes des cépages Grenache, Syrah et Pinot apporte une preuve supplémentaire dans l'identification du cépage Pinot noir des raisins constituant SV1.

Cette publication sera soumise prochainement.

Wine metabolomics reveals chemical messages from an ancient buried bottle

Roullier-Gall C.[a,b], Garcia J.P.[c], Schmitt-Kopplin P.*[b,d] and Gougeon R.D.*[a]

[a] UMR A 02.102 PAM Université de Bourgogne/Agrosup Dijon, Equipe PAPC, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, Rue Claude Ladrey, BP 27877 Dijon Cedex, France
[b] German Research Center for environmental Health, Department of BioGeoChemistry and Analytics, Helmholtz Zentrum Munchen, Ingolstädter Landstrasse. 1, 85758 Neuherberg, Germany
[c] UMR 6298 ArTeHis, Université de Bourgogne/CNRS/culture , Université de Bourgogne, 6 bd Gabriel, 21000 Dijon, France
[d] Technische Universität München, Chair of Analytical Food Chemistry, Alte Akademie 1085354 Freising-Weihenstephan, Germany.
* regis.gougeon@u-bourgogne.fr / schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

Abstract

Restoration works in the old Clunisian Saint-Vivant monastery in Burgundy revealed a buried bottle dating between 1772 and 1860 (SV1). Non-targeted FTICR-MS analyses of samples taken from the top, the bottom and the deposit revealed concentration increase from top to bottom of the whole chemical diversity, including in particular tartaric acid and resveratrol, thus confirming the red grape wine nature of its content. CHONS chemical spaces of the SV1 wine exhibited similarity with a series of Romanée Saint Vivant red wines (pinot noir variety) from six different vintages spanning vintages from 1915 to 2009, although characterized by a higher abundance of N-containing compounds. When compared to 68 different red wines from Burgundy, spanning nearly all of the decades from the 20th century, an OPLS analysis of FTICR-MS data consistently showed that the SV1 wine was most likely from the 19th century. Finally, the PCA analysis of discriminant masses for SV1 along with discriminant masses for Grenache, Syrah and Pinot noir varieties brought further evidence for the Pinot noir variey of the grapes from which SV1 had been made.

Keywords: Wine, Aging, FTICR-MS, metabolites

Introduction

If a wealth of analytical data have already been published about the composition of grape and wine [1–6], recent non targeted analyses have emphasized the extent of the yet unknown bio-chemistry involved throughout the winemaking process [7]. Such quest for the

description and the understanding of the composition of wine is undoubtedly fostered by its various features ranging from organoleptic to health-related properties [8–10]. However, it is also driven by a unique universally shared cultural heritage, which has always aroused the curiosity of both scientists and non-scientists for this specific food product, "transformed to be consumed within a culturally constructed set of rules and beliefs, often in situations strongly associated with reinforcing social identity" [11]. This excitement is all the more pronounced that the wine in question is aged, precisely because of the messages it may hold from the time – supposedly long ago – where it has been made.

To that respect, archaeochemistry is becoming increasingly powerful for assessing time-related features such as the revealing of the beginning of winemaking through the analysis of traces of tartaric acid [12] or the long-lasting antioxidant properties of a 600-year old fermented fruit juices found in amphorae in the relict of a ship of the Sicilian coast [13]. Extending such targeted analytical approaches to combined modern non-targeted analyses now provides unprecedented chemical snapshots in terms of molecular resolution and chemical diversity, that can allow reading messages related to various aspects of the winemaking practices [14,15] or describing more generally the chemistry of complex unknowns in a wide range of bio-geo-chemical samples [16,17].

Here we show that ultrahigh-resolution FTICR/MS analyses of the content of an unlabeled bottle buried in a cellar of the old Clunisian Saint-Vivant monastery reveal a filiation with the contemporary Romanée Saint-Vivant appellation, through the description of the chemical diversity.

Materials and methods

Sampling and sample preparation.

SV1 samples from top, middle and bottom of the bottle, were collected immediately after opening the bottle 68 other red wines were collected from various vintages and appellations in Burgundy, including six Romanée Saint Vivant wines (1915, 2003, 2007, 2008 and 2009), five Pommard wines (1921), and 57 red wines from various appellation in Burgundy and various vintage between 1956 and 2009 (twenty six Côte de Beaune wines from 1976 to 2007, eight Grand Echezeaux and eight Richebourg from 1959, 1966, 1979, 1989, 1999, 2007, 2008 and 2009, five la Tâche from 1956, 1991, 2007, 2008 and 2009, four Romanée Conti from 1965, 2007, 2008 and 2009 and six Echezeaux from 1978, 1999, 2004, 2007, 2008 and). Wines were sampled into 2ml vials under argon atmosphere to protect it

from oxidation, and diluted in methanol (1/20) for FTICR-MS measurements. The SV1 bottom sample, mainly corresponding to amorphous precipitates was extracted in methanol, and the extract further diluted (1/20) for FTICR/MS. For the purpose of variety identification, related FTICR/MS analyses realized on 36 wines from a previous experimental setup (Tonnelerie 2000 [18]) were compared to SV1. In brief, red wines from the Tonnelerie 2000 experiment were divided into 3 lots corresponding to the grape variety wines were made of: Pinot noir (Mercurey, 12 wines), Syrah (Côte Rotie, 12 wines) and Grenache (Gigondas, 12 wines) [18].

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry Analysis (FTICR/MS).

Ultra high-resolution mass spectra were acquired using an FTICR-MS instrument (solariX, Bruker Daltonik, Bremen, Germany) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet and an Apollo II electrospray ionization source operated in the negative ionization mode. Samples were introduced at a flow rate of 120 µL.h-1 using a syringe pump. External calibration was realized on clusters of arginine (10 mg.L-1) in methanol. Spectra were acquired with a time domain of 4 mega-words on a m/z 100 to 1000 mass range to guarantee a high accuracy in elemental formula assignments. A resolving power greater than 500000 was reached. Up to 500 scans per sample were accumulated. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR) spectra were internally recalibrated from a list composed of fatty acids and recurrent compounds in wine, with linearity up to m/z 600, and with mass errors below 50 ppb. In conjunction with an automated theoretical isotope pattern comparison, the generated formulas were validated by setting sensible chemical constraints (N rule; O/C ratio ≤ 1; H/C ratio $\leq 2n+2$; element counts: C ≤ 100, H ≤ 200, O ≤ 80, N ≤ 3, S ≤ 3 and P ≤ 1). The FTICR mass spectra were exported to peak lists with a cut-off signal-to-noise ratio (S/N) of 4. Peak alignment was performed with maximum error thresholds of 1 ppm and filtered for masses occurring in minimum of 10% of all samples.

Results & discussion

This SV1 bottle was discovered still filled, buried 10 cm beneath a heavy limestone pave remaining from the East wine cellar floor, in 2006 during the restoration works of the old Clunisian Saint-Vivant monastery (Figure 1), the first owner of the most famous vineyards in Vosne-Romanée (Burgundy, France). Besides the question of the actual nature

and characteristics of its content, the discovery of this bottle was inevitably associated with the willing to identify its age. If we assume that this cellar was the first storage for the bottle, its content should be younger than1772– when the reconstruction of the abbey was achieved – but older than 1793, when the abbey was destroyed to ruins during the French Revolution (Supp. Fig. 1). However, the still preserved cellars were continuously used for wine storage from 1830 to about 1860 [19]. Therefore, the bottle could have also possibly been buried during the first half of the 19th century. Typologically, the SV1 75 cl wine bottle (Figure 1) is of « Burgundy » style whose morphology is referred to, as those figured in Van den Bossche [20] from France and Belgium during the 1780-1820 period (Supp. Fig. 1).

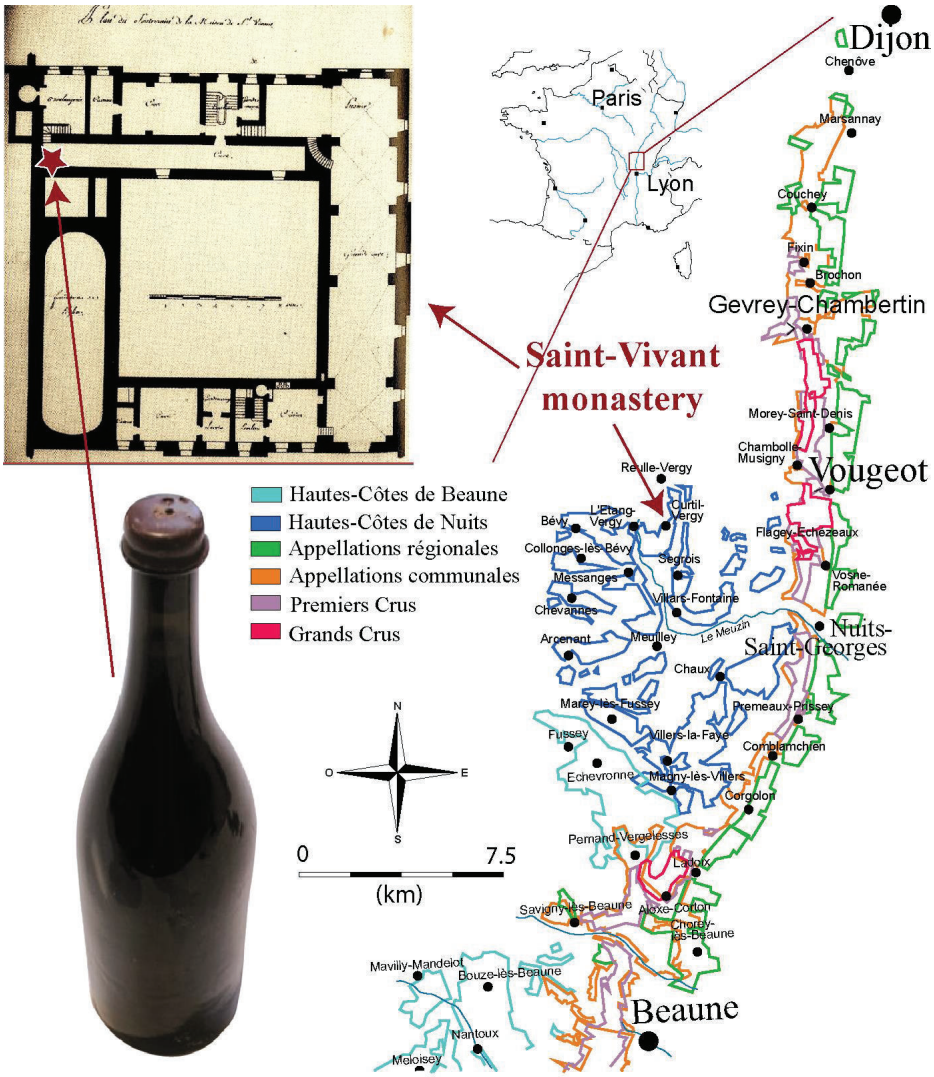
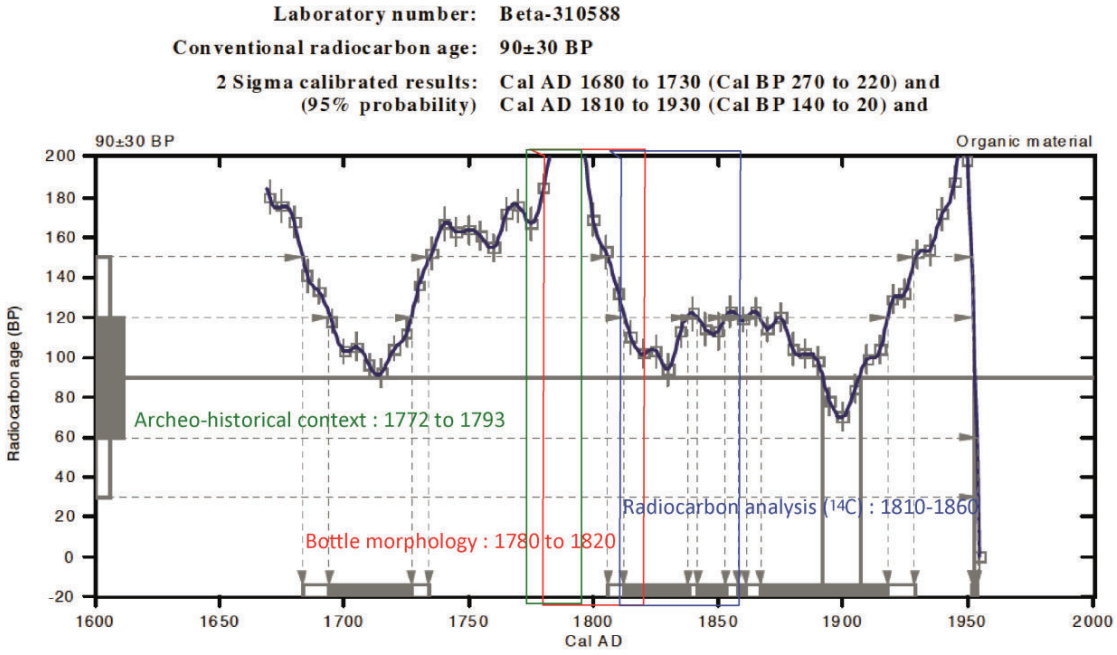


Figure 1: Picture of the SV1 bottle with the discrovery location inside the monastery east wine cellar floor and the Saint Vivant monastery location.

Radiocarbon analysis of organic deposits found at the bottle bottom (Miami Beta Analytic Inc laboratory sample Beta – 310588) gave an analytic age of 90 +/- 30 years BP and calibrated date ranges (95% probability) from Cal AD 1680 to 1730 and from Cal AD 1810 to 1930 (Supp. Fig.1). Excluding the first interval ages for historical reasons (see above), the wine should have consequently been bottled after AD 1810, a fact that implies the bottle was buried during the 19th century. However, contamination with mixing of some amount of 21st century « post-bomb » radiocarbon from the air with genuine « old » radiocarbon in the wine (therefore older than 1810) cannot be excluded. In fact, this could have occurred between 2006 – when the bottle was discovered – and 2011, when the wine was finally sampled for the present analysis. In summary, the wine in the bottle could date either from the 1772 (or a few years before) to 1793 period, implying some post-bomb XXIe s. radiocarbon contamination; or, if no contamination occurred, from 1810 to 1860.



Sup Figure 1: Estimation of the SV1 age according to archeo-historical context, bottle morphology and radiocarbon analysis (^{14}C).

Neither the typology of the bottle (from 1780-1820) nor archeo-historical data allow for choosing between the first and the second period. Therefore the « old » wine analyzed in

the present study was considered to be as old as about two centuries, taking into account possible minimum and maximum ages of 150 and 239 years, respectively, when it was sampled in 2011.

Upon service, the SV1 wine exhibited an increased darkness with the depth in the bottle. As a consequence, it was sampled at three levels (Fig. 2), *i.e.* close to the above surface (Top), at roughly the middle of the largest body of the bottle (Low), and at the deposit (Dep). To explore the chemical nature and generate an identity card, based on the comparison of metabolomics signatures, these samples were analyzed by previously described flow injection ESI(-) FTICR-MS [16], along with 5 supposedly related red wines, from the Saint-Vivant vineyard in Vosne Romanée, spanning vintages from 1915 to 2009, for comparison. More than 8000 m/z values were detected and more than 3000 were converted into elemental compositions within an error window of 200 ppb. Using an exact mass difference analysis, experimental data were converted into elementary composition [21].

Tartaric acid (m/z = 149,00915 for the negative molecular ion), the principal biomarker for grape wine, was clearly detected in every sample, with a higher relative intensity in SV1, thus confirming the wine nature of SV1 [22], and further witnessing to its rather acidic structure (Fig. 2A). Consistently with the observed color gradient in the bottle, the FTICR-MS analysis of SV1 samples actually revealed a striking gradient in both relative peak intensity and metabolic diversity from top to bottom, as shown by van Krevelen diagrams (Fig. 2D). Remarkably, various chemical families including carbohydrates, polyphenols, organic acids and fatty acids exhibited this trend towards an increased concentration from top to bottom, with a significantly higher abundance of CHO-based compounds. Spectra enlargement at the m/z 227 nominal mass illustrated this chemical diversity gradient (Fig. 2C). Up to 16 major peaks were detected within this 400 mDa range, including in particular the peak at m/z 227.0713, corresponding to the [M-H]- ion with $[C_{14}H_{11}O_3]$- absolute mass formula, most likely assignable to resveratrol isomers [18] (Fig.2). Interestingly, if resveratrol would be mostly present in recent wines (2007, 2008 and 2009), it would still be detectable in the older wines, and in relatively higher concentrations in the bottom deposit than in the wine (Fig. 2). Such still measurable concentrations in a nearly 200-year old wine is reported for the first time here.

Of the 16 elemental formulas at m/z 227 (Fig. 2C), up to 12 could be identified in the RSV 1915 wine, whereas 10 and only 13 could be seen in the SV1 and RSV 2007 wines, respectively. This trend towards a modulation of the chemical diversity with ageing – and a decrease observed only for very long ageing – was further illustrated by the count of some common compositional differences, which were calculated from all exact masses measured for each of the wines [1,24,20] (Fig 2B). Except for N, and to a lesser extent, NH_2, the number of possible compositional transformations was significantly higher for the 1915 and 2007 wines. This can be explained by precipitations occurring naturally over time during wine ageing for unfiltered and/or non fined wines at bottling, which must have been the case most likely for the SV1 wine.

However, the number of N and NH_2 transformations – still comparable to younger wines – suggests that if proteins and/or peptide-like compounds have precipitated, they have been degraded into smaller amino acid-containing molecules (Fig. 2B). It is also worth of note that the RSV 1915 wine exhibited more CH_2 and OH compositional transformations than the young 2007 wine, thus emphasizing the time-related process of oenodiagenesis in bottle, which can proceed over periods as long as a century for wines with high ageing-potential. H_2O or CH_2O transformations showed a consistent decrease with the wine ageing, whereas NH, S or SO_3 transformations appeared to be similar for the young 2007 wine and the nearly 100-year old 1915 wine (Fig. 2B).

Altogether, these mass spectra of Romanée Saint Vivant wines exhibited great qualitative similarities with the SV1 wine, with comparable signal profiles in many nominal masses, thus suggesting that the latter could have possibly been made of grapes from the Saint Vivant vineyard in Vosne Romanée. This is particularly striking when the H/C versus m/z van Krevelen diagrams of SV1 and RSV 1915 wines are compared (Fig. 2D).

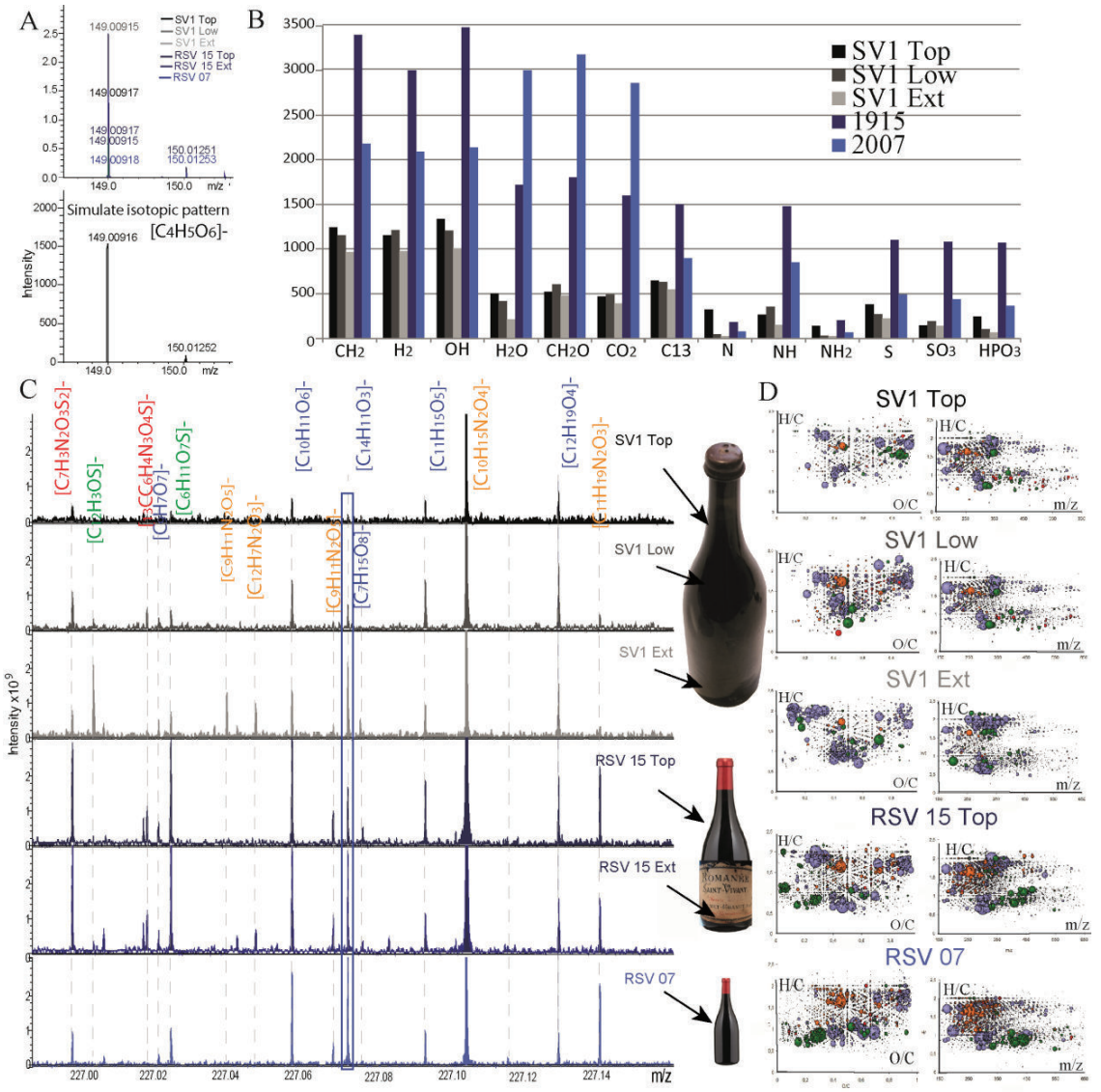
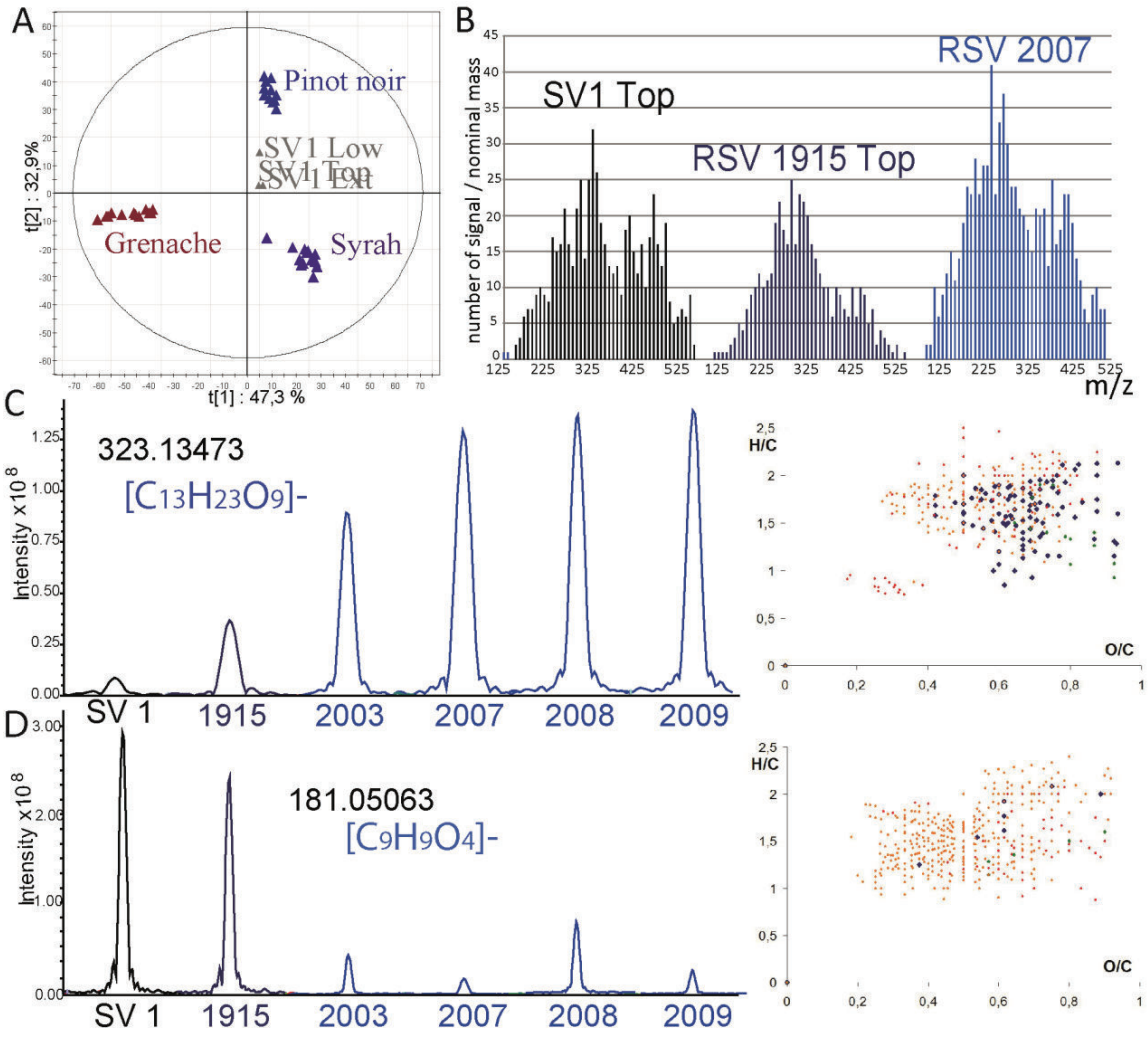


Figure 2: Negative-ion ESI FTICR mass spectra showing the overall similarity Saint-Vivant wines. (A) Comparison of the simulated isotopic pattern for tartaric acid $[C_4H_5O_6]^-$ (bottom) with data from wines (top); (B) Frequency histogram of the number of exact mass differences calculated from masses measured for SV1 (Top, Low and Ext), RSV 1915 and 2007 wines. (C) Comparison of spectra in the m/z 226.90-227.20 Da mass range with the m/z 227.0713 identified by a blue box; (D) H/C versus O/C van Krevelen diagrams and H/C versus m/z diagrams of masses characteristic to SV1, RSV 1915 and RSV 2007 vintages. Bubble sizes indicate relative intensities of corresponding peaks in the spectra. Color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange.

In order to further assess this hypothesis, we used our previously published data from the Tonnellerie 2000 experiment [18], and in particular the set of discriminant masses for the three grape varieties involved in the latter (Pinot noir, Syrah and Grenache). 522 signals were found representative for Pinot noir, whereas 425 and 746 signals were found

representative for Syrah and Granache varieties, respectively. The corresponding principal component analysis (PCA) score plot, including discriminant masses for SV1 samples wines illustrated the clear discrimination of the Tonnellerie 2000 wines according to the grape variety (Supp. Fig. 2A). The two predictive components of the PCA (t1: 47.3% and t2: 32.9%) identified SV1 samples (top, low and ext) most likely as Pinot noir-based samples (Supp. Fig. 2A). Such result would be the very first identification of the variety of an unknown bottled wine.



Sup Figure 2: Negative-ion ESI FTICR mass spectrum (A) PCA score plot of variety specific masses of Pinot noir (blue), Grenache (red) and Syrah (purple) wines from Tonnellerie 2000 experiment [18] and SV1 wines (grey). (B) Histogram of number of signals by nominal mass for SV1, RSV 1915 and 2007. Specific masses and H/C versus O/C van Krevelen diagram which (C) decreasing with aging (m/z 323.13473 Da) and (D) increasing with aging (m/z 181.05063 Da) (van Krevelen diagram color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange).

Considering all masses detected (S/N 4) in spectra from the SV1 and RSV wines, the Venn diagram (Fig. 3A) shows that 12,520, 10,070 and 7,040 unique masses could characterize the young wines, the RSV 1915 and the SV1 wine samples, respectively. Only 1,597 of them were common to the three groups, although 60% (4,453 + 1,597) of the RSV 1915 specific masses were actually common with those of the younger wines. In contrast, about 50% of the SV1 specific masses were common with those of the 1915 wine, or with those of the younger wines. Most interestingly, young wines were characterized by CHO compounds, whereas the SV1 wine was characterized by N-containing compounds. The RSV 1915 wine appeared as an intermediate, still exhibiting few CHO compounds but mostly N-containing ones (Fig. 3A), thus placing it at a supposed intermediate ageing process. A hierarchical cluster analysis (HCA) (Fig. 3C) readily confirmed this progressive differentiation through the identification of the three groups, confirming an increased dissimilarity from the young wines to SV1 samples.

A further indication of the evolution state of the SV1 wine was provided by an OPLS analysis of FTICR mass spectra of SV1 samples along with up to 80 red wines from Burgundy, spanning vintages from nearly all the decades from the 20th century down to 1915 (Fig.3B). This analysis led to a remarkable differentiation of groups of wines along the first axis (explaining 20.6% of the variance) with a negative correlation of the latter with the age. Thus, going from left to right, all of the young wines produced after 1990 appeared in a first group, followed by a second group comparising wines older than 1990 but produced after 1950, and a third group of Pommard wines from 1921. It is remarkable to observe that RSV1915 samples consistently appeared at the right of the previous groups, and that SV1 samples exhibited the more negative correlation with the first component, thus confirming a vintage older than 1915 and most likely from the 19th century. This group distribution along the first component, and according to the age, clearly showed that the global wine matrix is progressively modulated by aging, in particular through the oenodiagenesis process.

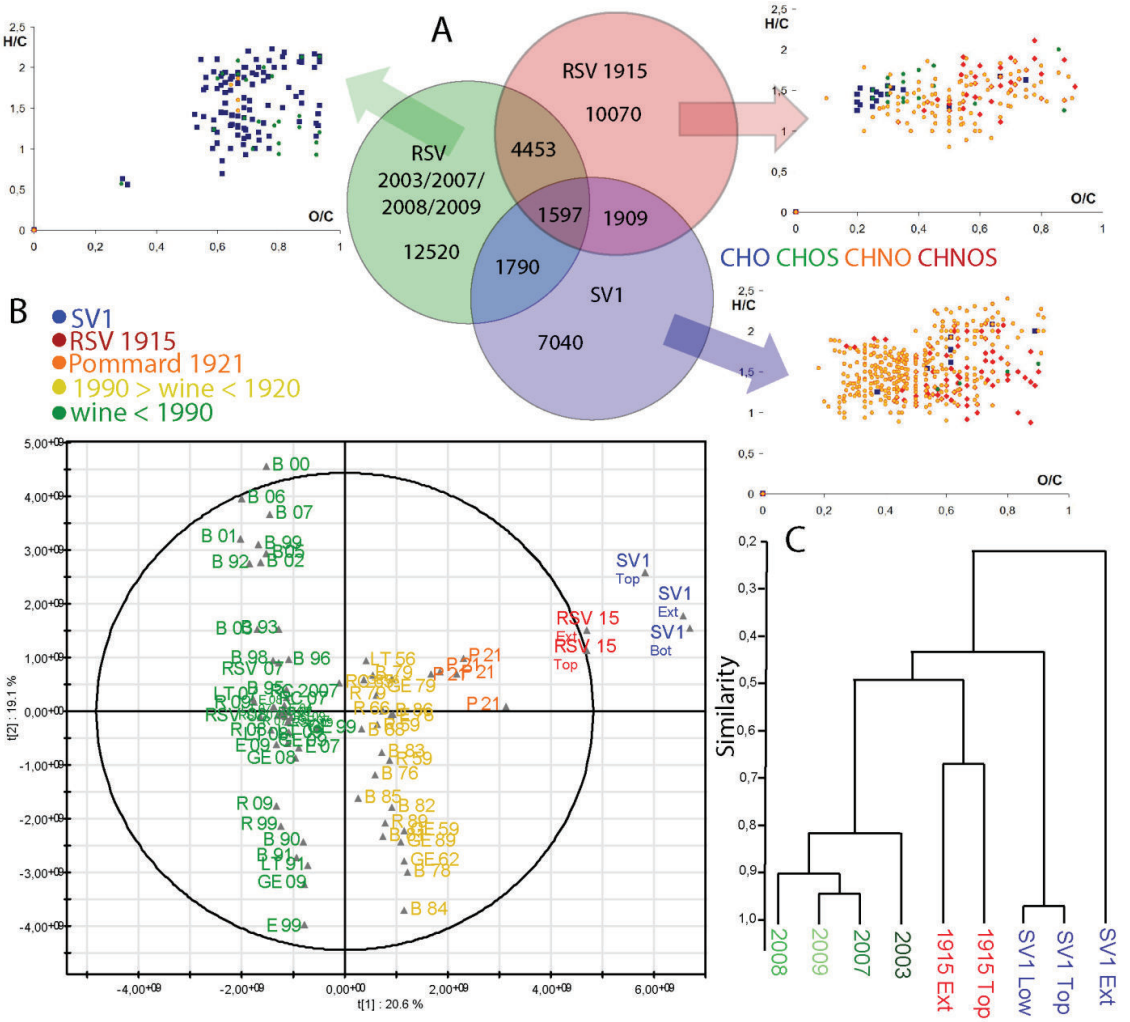


Figure 3: Negative-ion ESI FTICR data showing the discrimination of wines. (A) Venn diagram showing the counts of unique/commonly detected masses in the three following groups of wine: RSV 2003, 2007, 2008, 2009; RSV 1915 (top and Ext); SV1 (top, bottom and Ext); H/C versus O/C van Krevelen diagrams of corresponding elemental compositions specific to these groups (color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange). (B) OPLS score plot of SV1 samples along with 77 red wines from Burgundy. R^2(cum)=0.973 and R^2(Y)=0.979 (color code : wines younger than 1990, green; wine older than 1990, yellow; Pommard 1921 wines, orange; RSV 1915, red; SV1, blue). (C) Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of wines from the three groups.

This matrix modulation also appeared in the histograms of masses per nominal mass (Supp. Fig 2B), which showed a relative increase of the number of detected masses for high nominal masses when going from the young to the old SV1 wines, consistently with the oenodiagenesis process whereby small metabolites react with each other to form condensed structures, as classically exemplified by tannin-anthocyanin condensation [3,25,26]. Actually,

the non-targeted approach reported here allowed characterizing this ageing process by masses either decreasing or increasing with the age of the wine (Supp. Fig 2C-D). Possible structural assignments for these specific masses could be obtained from accessible databases or interfaces such as SciFinder Scholar or MassTrix [27]. However, almost 95% of these discriminant masses could not be annotated, which is consistent with the actual lack of knowledge about the chemistry of wine ageing [15]. Typical molecular signatures on the basis of pertinent annotation (Supp Table 1 and Supp. Fig. 2C-D) were polyphenols and in particular resveratrol, and residual sugars for pool of masses which decrease with the age, and nitrogen compounds for masses whose relative intensity increase with the age.

Supplemental Table 1: Examples of elemental compositions and annotations assigned to peaks in the negative-Ion ESI FTICR mass spectra, corresponding to the pool of masses with decreasing and increasing intensities with the gradient the age.

Decreasing with aging		
Detected m/z	**Elemental composition**	**Annotations**
163.03998	$C_9H_8O_3$	p-Coumaric acid
227.07137	$C_{14}H_{12}O_3$	Resveratrol
229.01187	$C_6H_{10}O_7$	Glucuronic acid
259.02243	$C_6H_{13}O_9P$	Fructose 6-phosphate
609.18835	$C_{34}H_{30}N_2O_9$	Atalanine

Increasing with aging		
Detected m/z	**Elemental composition**	**Annotations**
191.05594	$C_7H_{12}O_6$	Quinic acid
283.06861	$C_{10}H_{12}N_4O_6$	Xanthosine
312.12413	$C_{18}H_{19}NO_4$	N-Feruloyltyramine
337.09291	$C_{16}H_{18}O_8$	1-Caffeoyl-4-deoxyquinic acid
483.03054	$C_{16}H_{20}N_2O_9S_2$	Glucobrassicin

Conclusion

This is the first time that non-targeted metabolomics was used for deciphering specific wine features from an ancient buried bottle, whose age and origin were unknown. The strategy used here was to compare the CHONS chemical spaces of this SV1 bottle to those of series of red wines from Burgundy, spanning vintages from nearly all of the decades from the 20th century, and including in particular wines from the supposedly related Romanée Saint Vivant appellation. Our results showed that such comparison indeed revealed similarities between the SV1 and Romanée Saint Vivant wines. However, a precise quantification of the degree of similarity could not be obtained, mainly because of the lack of other wine references from the same period. Neverthless, these comparisons provided an unprecedented illustration of the chemical evolution of wine upon ageing through the oenodiagenesis process whereby small metabolites react with each other to form more condensed structures, but also whereby peptidic macromolecules could also likely be fragmented into smaller oligomers, as particularly exemplified by the increasing abundance of nitrogen containing

compounds for the older vintages. Our results also showed that, statistical analyses of such series of samples could actually provide remarkable hints for the characterization of both the age of the SV1 wine and the grape variety it was made of. Samples taken at three levels of the bottle, considered here as replicates, indeed appeared consistently older than the oldest compared sample (1915) and closer to Pinot noir than Grenache or Syrah wines.

Acknowledgments.

We warmly thank the Association des Amis de l'Abbaye de Saint Vivant and the Domaine de la Romanée Conti (Vosne Romanée, France), for providing the wine samples, and especially Aubert de Villaine for his interest and enthusiastic discussions. This work was financially supported by the Région Bourgogne, the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) and the Comité Interprofessionnel des Vin de Champagne (CIVC).

References

1. Flamini R (2003) Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. Mass Spectrometry Reviews 22: 218–250.
2. Guasch-Jané MR, Ibern-Gómez M, Andrés-Lacueva C, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM (2004) Liquid chromatography with mass spectrometry in tandem mode applied for the identification of wine markers in residues from ancient Egyptian vessels. Analytical Chemistry 76: 1672–1677.
3. Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B (2006) Evolution of the phenolic content of red wines from Vitis vinifera L. during ageing in bottle. Food Chemistry 95: 405–412. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.004.
4. Del Alamo M, Bernal JL, del Nozal MJ, Gómez-Cordovés C (2000) Red wine aging in oak barrels: evolution of the monosaccharides content. Food Chemistry 71: 189–193. doi:10.1016/S0308-8146(00)00145-X.
5. Lavigne V, Pons A, Darriet P, Dubourdieu D (2008) Changes in the Sotolon Content of Dry White Wines during Barrel and Bottle Aging. J Agric Food Chem 56: 2688–2693. doi:10.1021/jf072336z.
6. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID (2012) Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. Analytica Chimica Acta 711: 7–16. doi:10.1016/j.aca.2011.09.042.
7. Arapitsas P, Scholz M, Vrhovsek U, Di Blasi S, Biondi Bartolini A, et al. (2012) A Metabolomic Approach to the Study of Wine Micro-Oxygenation. PLoS ONE 7: e37783. doi:10.1371/journal.pone.0037783.
8. Michel J, Jourdes M, Silva MA, Giordanengo T, Mourey N, et al. (2011) Impact of Concentration of Ellagitannins in Oak Wood on Their Levels and Organoleptic Influence in Red Wine. J Agric Food Chem 59: 5677–5683. doi:10.1021/jf200275w.
9. Teissedre PP-L, Jourdes M (2013) Tannins and Anthocyanins of Wine: Phytochemistry and Organoleptic Properties. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, editors. Natural Products. Springer Berlin Heidelberg. pp. 2255–2274.

10. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, et al. (1996) Varietal Differences in the Phenolic Content and Superoxide Radical Scavenging Potential of Wines from Different Sources. J Agric Food Chem 44: 37–41. doi:10.1021/jf950190a.
11. Crewe L, Hill I (2012) Finding beer in the archaeological record: A case study from Kissonerga-Skalia on Bronze Age Cyprus. Levant 44: 205–237.
12. McGovern PE, Hartung U, Badler VR, Glusker DL, Exner LJ (1997) The beginnings of winemaking and viniculture in the ancient Near East and Egypt. Expedition 39: 3–21.
13. Bertelli AA, Morelli R, Loscalzo R, Ferrara F (2004) Long-lasting antioxidant activity in a 600-year-old fermented fruit juice. Antioxidants & redox signaling 6: 934–940.
14. Roullier-Gall C, Boutegrabet L, Gougeon RD, Schmitt-Kopplin P (2014) A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. Food Chemistry 152: 100–107. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.056.
15. Roullier-Gall C, Lucio M, Noret L, Schmitt-Kopplin P, Gougeon RD (2014) How Subtle Is the "Terroir" Effect? Chemistry-Related Signatures of Two "Climats de Bourgogne." PLoS ONE 9: e97615. doi:10.1371/journal.pone.0097615.
16. Schmitt-Kopplin P, Gelencsér A, Dabek-Zlotorzynska E, Kiss G, Hertkorn N, et al. (2010) Analysis of the Unresolved Organic Fraction in Atmospheric Aerosols with Ultrahigh-Resolution Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Organosulfates As Photochemical Smog Constituents†. Anal Chem 82: 8017–8026. doi:10.1021/ac101444r.
17. Schmitt-Kopplin P, Gabelica Z, Gougeon RD, Fekete A, Kanawati B, et al. (2010) High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. PNAS 107: 2763–2768. doi:10.1073/pnas.0912157107.
18. Gougeon RD, Lucio M, Frommberger M, Peyron D, Chassagne D, et al. (2009) The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. PNAS 106: 9174–9179.
19. Bazin J-F (2010) XIXe-XXe s. : le destin d'une ruine romantique. In : Saint-Vivant de Vergy. Gaud Editions. A. Rauwel.
20. Van den Bossche W (2001) Antique Glass Bottles: Their History and Evolution (1500-1850) a Comprehensive, Illustrated Guide With a World-Wide Bibliography of Glass Bottles. Antique Collectors Club Limited.
21. Tziotis D, Hertkorn N, Schmitt-Kopplin P (2011) Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng) 17: 415–421. doi:10.1255/ejms.1135.
22. McGovern PE, Luley BP, Rovira N, Mirzoian A, Callahan MP, et al. (2013) Beginning of viniculture in France. Proceedings of the National Academy of Sciences 110: 10147–10152.
23. Adrian M, Jeandet P (2012) Effects of resveratrol on the ultrastructure of Botrytis cinerea conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. Fitoterapia 83: 1345–1350. doi:10.1016/j.fitote.2012.04.004.
24. Rauwel A (2011) Saint-Vivant de Vergy : un prieuré clunisien au cœur de la Bourgogne. Bulletin du centre d'études médiévales d'Auxerre | BUCEMA: 459–462. doi:10.4000/cem.12075.
25. 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: 745–751.
26. Vivas N, Glories Y (1996) Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. American journal of enology and viticulture 47: 103–107.
27. Wägele B, Witting M, Schmitt-Kopplin P, Suhre K (2012) MassTRIX Reloaded: Combined Analysis and Visualization of Transcriptome and Metabolome Data. PLoS One 7.

3 Conclusion générale du chapitre 2

L'utilisation combinée de la spectrométrie de masse FTICR et UPLC/Q-ToF-MS pour la détection et l'identification de marqueurs formés pendant le vieillissement du vin est présentée dans ces travaux pour la première fois.

L'étude de séries verticales de vins présentant un grand nombre de millésimes pour un vin issu d'un même domaine et d'une même appellation, ainsi que l'analyse de vieux millésimes considérés ici comme l'aboutissement du vieillissement en bouteille permet notamment d'appréhender le devenir d'un vin à partir de sa mise en bouteille jusqu'à un point ultime de vieillissement.

L'information principale extraite de l'analyse de séries verticales de vins est que quel que soit l'appellation ou le cépage, un point de rupture dans les millésimes est observé au niveau des années 1990 et ce indépendamment de la technique analytique utilisée. Dans un deuxième temps, les verticales de vins ont permis l'extraction et l'identification de marqueurs de vieillissement pour les vins blancs et les vins rouges. Ces masses présentant une évolution suivant une pente croissante ou décroissante au fur et à mesure des millésimes lors du vieillissement sont particulièrement intéressantes dans la mesure ou on pourrait imaginer que dans un future proche, celles-ci soient utilisées pour identifier un millésime ou encore pour valider l'âge d'un vin.

Enfin l'étude de séries provenant de différentes appellations en Bourgogne a également permis de suivre l'impact du terroir lors du vieillissement. En effet l'étude des séries verticales de vin permet une excellente séparation des vins en fonction de leur appellation (Chablis, Meursault et Corton-Charlemagne).

L'étude de millésimes anciens confirme les résultats précèdents et apporte une dimension supplémentaire puisque les vins étudiés sont dans un état extrême de vieillissement. Malgré l'âge supposé de ces vins, la signature chimique caractéristique est toujours présente et comparable avec celle de vins récents Bourguignons.

Ces résultats sont fondamentaux dans la mesure où ils confirment définitivement l'hypothèse selon laquelle le vin garde une mémoire métabolique des événements environnementaux à l'œuvre au moment de l'élaboration, à savoir notamment des informations relatives à son millésime, à son cépage ou encore aux procédés œnologiques employés lors de son élaboration. Même si actuellement il est impossible de déterminer avec certitude le cépage ou les différents procédés œnologiques utilisés lors de l'élaboration de ces vins, l'analyse de plus en plus fine permet d'imaginer qu'il sera possible à l'avenir de

disposer d'une base de données suffisamment grande pour identifier et certifier des vins très anciens.

Chapitre 3 : Pratiques œnologiques et diversité chimique

Une seconde source de variabilité conduisant à la modulation de l'empreinte chimique d'un vin est la diversité des pratiques œnologiques.

Afin d'aborder la problématique de l'influence des pratiques œnologiques sur les vins, ce travail explore grâce à la FTICR-MS et l'UPLC-MS la possibilité d'utiliser l'approche analytique métabolomique non ciblée comme moyen de caractériser un ensemble de modifications de la diversité chimique associée à l'oxygénation des composés du vin.

Dans le but d'aborder la problématique de l'oxydation prématurée au travers de l'analyse de vins ayant vieilli en bouteille, cette partie se propose d'étudier des séries de vins blancs de Bourgogne, présentant des itinéraires de vinification distincts (Sulfitage, débourbage, collage ou bouchage) ainsi qu'une série de champagnes présentant différents états d'oxygénation induits volontairement par la modification de la perméabilité des capsules utilisées pour la prise de mousse et lors de l'élevage sur lattes, provoquant ainsi une oxygénation contrôlée

1 Influence de pratiques œnologiques : oxygénation contrôlée lors de la prise de mousse en vinification champenoise.

L'oxygénation des vins de base de Champagne a été étudiée sur des bouteilles après 4 et 6 ans de vieillissement sur lies à la suite de la prise de mousse à l'aide d'analyses combinant FTICR-MS et UPLC-Q-TOF-MS. Trois niveaux de perméabilité ont été considérés pour les bouchons, allant de 0,2 à 1,8 mg / L d'entrée d'oxygène par ans. Nos résultats confirment la très bonne répétabilité de la FTICR-MS à ultra-haute résolution, à la fois en termes de m/z entre les séries d'échantillons étroitement liés (plus de 70% de tous les pics ont été détectés dans au moins 50% des 18 échantillons) et en termes de coefficient de variation de l'intensité des pics (96% des pics présentaient un coefficient de variation d'intensité inférieure à 0,3). Le millésime semble être la caractéristique la plus simple à discriminer par des analyses statistiques non supervisées, et les annotations métaboliques ont suggéré que les vins les plus anciens (2006) ont été caractérisés par une plus grande sensibilité à l'oxygénation, illustrant ainsi l'impact premier de la chimie liée au millésime des raisins et des vins correspondant notamment sur la stabilité à l'oxydation du vin en bouteille. Au sein de chaque millésime, les mécanismes d'oxygénation concernés semblaient être différent selon les entrées d'oxygène élévées ou faibles, en parfait accord avec l'effet d'hormèse de l'oxygénation du vin. Les analyses des données FTICR-MS par réseaux compositionels ont suggéré que parmi les nombreux marqueurs la glutamyl-cystéine semble être un composé potentiellement actif impliqué dans la protection du vin. Dans le cas particulier des vins de cépages uniques et pour un niveau donné de perméabilité du bouchon, nos résultats ont également montré que la discrimination par cépage pourrait être facilement réalisée parmi les vins.

Des vins de Champagne, de cépages assemblés au 1/3 (Chardonnay, Pinot Noir et Pinot Meunier) appartenant à deux millésimes (2007 et 2008), et ayant différents niveaux d'oxygénation ont été pris en compte dans la présente étude. Ils ont été analysés par techniques métabolomiques non ciblées, Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions et à Transformée de Fourier (MS-FTICR), et Chromatographie Liquide à Ultra haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (UPLC-MS). Les différents niveaux d'oxygénation du champagne ont été contrôlés par un suivi de la diffusion d'oxygène à travers l'obturateur : faible perméabilité (0,2 mg/L O_2), perméabilité moyenne (0,7 mg/L O_2) et une perméabilité élevée (1,8 mg/L O_2). Les spectres de masse ont montré des différences de composition chimique selon la variété de raisin (Chardonnay et Pinot), le millésime (2006 et

2008) et selon le degré d'oxygénation. En combinaison avec des outils statistiques multivariés et l'interrogation de bases de données pertinentes, ces plate-formes d'analyse (FTICR-MS et UPLC-MS) fournissent une description sans précédent de la complexité chimique du champagne dont les résultats permettent notamment l'identification de marqueurs d'oxygénation.

Cette publication sera soumise prochainement.

Natural oxygenation of Champagne wine during the *prise de mousse*: a metabolomics picture of hormesis.

Chloé Roullier-Gall[1,2], Michael Witting[2], Franco Moritz[2], Philippe Schmitt-Kopplin [2,3*], Régis D Gougeon[1*]

[1] Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, UMR A 02.102 PAM AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, Rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078 Dijon Cedex, France.
[2] German Research Center for environmental Health, Department of BioGeoChemistry and Analytics, Helmholtz Zentrum Munchen, Germany.
[3] Chair of Analytical Food Chemistry, Technische Universitat Munchen, Freising-Weihenstephan, Germany.

Correspondence:
Pr. Régis Gougeon : regis.gougeon@u-bourgogne.fr
Pr. Philippe Schmitt-Kopplin : schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

Abstract

Oxygenation of Champagne base wines was studied by FTICR-MS and UPLC-Q-TOF-MS analyses of bottles after 4 and 6 years of ageing on lees following the prise de mousse. Three levels of permeability were considered for the stoppers, ranging from 0.2 to 1.8 mg/L of oxygen ingress. Our results confirmed the very good repeatability of ultra-high resolution FTICR-MS, both in terms of m/z matching among series of closely related samples (more than 70% of all peaks were detected in at least 50% of the 18 biological replicates) and in terms of coefficient of variation of peak intensities (96% of the peaks exhibiting an intensity coefficient of variation lower than 0.3) among biological replicates. Vintages appeared to be the most straightforward discriminated features by unsupervised statistical analyses, and metabolite annotations suggested that the oldest wines (2006) were characterized by a higher sensitivity towards oxygenation, thus illustrating the prime impact of the vintage-related chemistry of grapes and corresponding wines on the further oxidative stability of the wine in bottle. Within each vintage, involved oxygenation mechanisms appeared to be different for low and high ingresses, in perfect agreement with the hormesis character of wine oxygenation. Compositional networks-based analyses of FTICR-MS data suggested that, among numerous putative biomarkers, the glutamyl-cystein precursor of glutathione appeared to be a potentially active compound involved in the protection of the wine. In the particular case of single variety wines and for a given

level of stopper permeability, our results also showed that variety discrimination could be easily achieved among wines.

Keywords

Champagne base wine, oxygenation,,vintage, prise de mousse, ageing on lees, direct injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry, network.

Introduction

If the role of oxygen in life has been – and is still – extensively studied [1] it's impact on the winemaking process not only constitutes a remarkable example of hormesis [2] but also addresses complex interplays ranging throughout the elaboration steps from pure biological mechanisms to pure chemical ones. Numerous authors have already reported studies of these mechanisms [3,4], and many of them were targeted to phenolic compounds, considered to be primary substrates for oxidation, whether it is enzymatic before the alcoholic fermentation, or chemical after [5–8].

In the particular case of dry white wine making, oxidation has become a major concern with the appearance of premature oxidation or untypical ageing, characterized by recently bottled wines – which are supposed to age for years before reaching an organoleptic optimum – actually exhibiting colours and aromas of old wines. To that respect, analyses were targeted in particular to the understanding of the origin of aroma descriptors and in particular sotolon and aldehydes [9–11]. However, given the symptoms associated with this untypical ageing, various authors have obviously investigated the role of the permeability of bottle closures on the ageing potential of wine [12–14]. If results generally agree on the fact that low oxygen ingress through the closure does preserve the aromatic quality of a wine, too low oxygen inputs can also lead to non-desired reduced aromas [14]. Above all, these results emphasized the wine composition dependency of the oxygenation process, where different wines could exhibit different reactivity towards oxygen, thus stressing the need for analytical approaches that can provide comprehensive pictures of subtle mechanistic variations among series of samples.

To that respect, non-targeted mass spectrometry-based metabolomics has recently shown great potential in describing the evolution of chemical spaces involved in enological practices [15–18], but very few non-targeted studies have actually analyzed the oxygenation of wine so far, and they only concerned red wines [2,19]. Nevertheless, all these studies highlighted the extent of the yet unknown chemistry, which can be involved in enological processes, and the need for high resolution and sensitivity in mass measurements [18,20–22]. Thousands of compounds have indeed been identified in wine, the proportions of which varying according to factors such as the vineyard environment, the grape variety, the vintage and the vinification strategy [17,18,23–26].

Like still wines, champagne and sparkling wines are complex matrices made of compounds derived from all of the organisms (grapevine, yeast, bacteria, oak...) and processes involved in its production. However, the characteristic feature of champagne compared to still wine is its supersaturation with carbon dioxide (CO_2) dissolved molecules formed during the second fermentation process, called *prise de mousse* [27]. This CO_2 formation (together with ethanol) is the result of the addition of yeasts and sugar inside bottles already containing a still wine, called *base wine*, which are then kept sealed with caps and lying in a cellar for at least 15 months. Finally, after disgorging of these bottles to remove lees, a *liqueur d'expédition* may be added to adjust the desired sugar content before corking. When uncorked, these bottles release the approximately 5 liters of dissolved CO2 through the famous and typical effervescence process [28]. Three varieties of grapes are used in the production of champagne: Chardonnay (white grape), Pinot Noir and Pinot Meunier (both red grapes), and depending on the desired organoleptic profile, winemakers either realize single variety Champagne or blend two or three of these varieties.

The key step in champagne making is definitely the second fermentation in bottles where a part of CO_2 molecules produced by the yeast will be dissolved progressively into the champagne, and the other part will be concentrated under the cork establishing equilibrium between the CO_2 in the two phases [27]. A few studies of this step for the elaboration of sparkling wines in general have been reported, which highlighted the importance of the particular contact between wine and lees for the onset of enzymatic reactions responsible for the organoleptic trait of the final wine, both in terms of phenolic composition [29] or in terms of volatile compounds, some of them being considered as age

markers [30–32]. However, Champagne wine making differs from sparkling wine making in that the *prise de mousse* period can last up to several years, during which the base wine composition is first driven by biological processes associated with the fermentation itself and then by biochemical and finally chemical processes for actually the major part of the time [33]. If the literature on Champagne has particularly focused on the physics and physical chemistry of the effervescence process [28,34,35], or the formation of adsorbed layers of amphiphilic macromolecules at the air/champagne interface (Ref), very few studies were precisely targeted on this several-year period of wine ageing. Valade and co-workers in particular, showed that as the produced CO_2 concentration increases the yeast metabolism is rapidly decaying, leaving the CO_2-supersaturated wine composition under the prime influence of gas exchanges through closure [33].

Interestingly, and on the basis of repeated experiments over several years, using synthetic seal-crown caps with controlled CO_2 permeability, these authors showed that upon ageing, there is a progressive loss of CO_2 through the closure, which is correlated to a progressive increase of the oxygen diffusion from the outside [33]. Here we report for the first time a non-targeted metabolomics analysis of a series of Champagne wines at the end of a 6 and 4-years period of *prise de mousse*, considered as a unique experimental setup for the identification of the chemical evolution of white wines upon slow oxygenation.

Material and Methods

Champagne wines samples

A total of 27 bottles (75 cL) of champagne wines from the same producer and from two vintages (2006 and 2008) were analyzed at the end of the prise de mousse sur lattes, shortly after disgorging in july 2013. A series of samples from both vintages corresponded to blended base wines (⅓ chardonnay, ⅓ Pinot noir, ⅓ Pinot Meunier) bottled for the prise de mousse, in july 2007 and july 2009, respectively. Thus, champagne wines of this study were analyzed after 6 or 4 years of bottle ageing. For each vintage, bottles had been stopped for the prise de mousse, with synthetic seal-crown caps having three levels of controlled permeability to oxygen (Table 1). Thus for instance, bottles from the 2006 vintage, stopped with caps exhibiting permeabilities of 0.2, 0.7 and 1.8 mg/L/year of O2, were analyzed after consumption of a total amount of 0.9, 3.15 and 8.1 mg of O2,

respectively. Sensory analyses of the corresponding wines repeated over several years have shown that low permeabilities consistently lead to wines with sulphur or reductive aromas, whereas high permeabilities lead to oxidized aromas [33]. Additionally for the 2008 vintage and in the case of intermediate permeability, bottles made of single variety base wines were also analyzed (Table 1). All measurements were done in triplicate (3 biological replicates).

Table 1: Characteristics for each sub-grouped samples.

Sub-group	variety	Vintage	capsule permeability mg/L/years of O_2	number of samples (A - B - C)
PN.	Pinot Noir	2008	0,7	3
Meu.	Pinot Meunier	2008	0,7	3
Ch.	Chardonnay	2008	0,7	3
07 Low	PN. / Meu. / Ch.	2006	0,2	3
09 Low	PN. / Meu. / Ch.	2008	0,2	3
07 Middle	PN. / Meu. / Ch.	2006	0,7	3
09 Middle	PN. / Meu. / Ch.	2008	0,7	3
07 High	PN. / Meu. / Ch.	2006	1,8	3
09 High	PN. / Meu. / Ch.	2008	1,8	3

FTICR-MS

High-resolution mass spectra were acquired on a Bruker solariX Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass Spectrometer (FTICR-MS) (BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Germany) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet (Magnex Scientific Inc., Yarnton, GB) and a APOLO II ESI source (BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Germany) operated in the negative ionization mode. The negative ion mode fingerprint showed greater variety in the composition and abundance of compounds in the analyzed wines and a smaller number of adducts, as well as higher resolution compared to positive ionization [17]. 20 µL of the samples were diluted in 1 ml of methanol prior to injection and introduced into the microeletrospay source at a flow rate of 120µL.h^{-1}. Spectra were externally calibrated on clusters of arginine (10mg.L^{-1} in methanol). Further internal calibration was performed for each sample by using ubiquitous fatty acids, reaching mass

accuracies lower than 0.1 ppm in routine day-to-day measurement [16–18]. Spectra were acquired with a time domain of 4 mega words over a mass range of m/z 100 to 1000. 500 scans were accumulated for each sample.

UPLC-Q-ToF-MS

Metabolites were separated using a Waters Acquity UPLC system coupled to a Bruker maXis Q-ToF-MS. A reversed-phase (RP) separation method was employed. In RP mode, middle to non-polar metabolites were separated using a BEH C8 column (150 mm x 2.1 mm ID) with an ACN gradient. Buffer A consisted of 10% ACN in water and buffer B of 100% ACN, both with 0.1% formic acid.

Detection was carried out in negative ionization mode with the following parameters: Nebulizer pressure = 2.0 bar, dry gas flow = 8.0 l/min, dry gas temperature = 200°C, capillary voltage = 3500 V, end plate offset = - 500 V, mass range = 50-1200 m/z. Calibration, alignment and peak picking of individual LC-MS runs were performed using the Genedata Expressionist for MS 8.0 software (Genedata AG, Basel, Switzerland). Internal recalibration was based on 1:4 diluted low concentration tune mix (Agilent, Waldbronn, Germany), which was injected prior to each run using a 6-port valve mounted to the MS. UPLC-QToF-MS measurements were monitored by injection of standards prior to each analytical run allowing individual recalibration for the correction of mass shifts. Quality control samples (QC) were injected ten time prior to each batch allowing colomn conditioning and every ten sample to control the measurement quality.

Statistical analysis

FTICR-MS peak alignment and filtering of masses was performed in MS Excel 2010 with maximum error thresholds of 1 ppm and filtered for masses occurring in minimum of 10% of all samples (Microsoft, Redmond, USA). Alignment of both data types (FTICR-MS and UPLC-QToF-MS) was performed using a custom Perl script with error thresholds of 3 ppm. All further statistical analyses were performed with Simca-P 9.0 software (Umetrics, Sweden) and Genedata Expressionist for MS 8.0 (Genedata, Basel, Switzerland). Principal Component Analysis (PCA) is an unsupervised method with the capacity to reduce the complexity of a huge dataset. Its goal is to extrapolate important information and display it as a set of new independent variables called principal components. This method discloses the similarity pattern of the observations or variables.

Partial least square discriminative analysis (PLS-DA*)* models were used to extract the most discriminative metabolites, which were further manually checked within the spectra. Discriminant masses with a variable importance in projection (VIP) value >1 were considered as relevant. Two-dimensional van Krevelen diagrams were constructed using compositional networks (based on elemental compositions) and functional networks based on selected functional group equivalents enabling improved assignment options of elemental compositions and classification of organic complexity with tuneable validation windows [36].

Results

FTICR-MS repeatability

The repeatability of FTICR-MS, along with the presence of putative contamination, were first investigated through the comparison of various biological replicates among the 18 spectra of blended wines. The three randomly chosen replicates presented in Figure 1A-B-C show the very good m/z - and thus ionization - repeatability among samples which may only differ by subtle differences in chemical composition, thus illustrating the strength of high field FTICR-MS measurement for the comparison of series of complex chemically close samples.

The richness of FTICR-MS spectra is further illustrated through the comparison with RP UPLC-Q-ToF-MS measurements (Figure 1B-D). Although the overall mass profiles are comparable, the mass resolution and sensitivity of ToF-MS are clearly not sufficient to account for all of the FTICR-MS features, characterized by more than 25 annotated peaks on that nominal mass (Figure 1B-D). The repeatability of FTICR-MS measurements was further evaluated by the count of m/z features frequencies among the 18 samples of blended wines (Figure 1E). 39.5 % (5862 peaks) of all peaks were detected in all of the 18 biological replicates, and this percentage dropped down to 4.6 % when only 17 samples were considered. Altogether, 70.2 % (10431 peaks) of all peaks were detected in at least 50% of the 18 biological replicates (Figure 1E).

Finally, and most importantly, the coefficient of variation (CV) of detected intensities among biological replicates appeared to be very good with 96% of the peaks exhibiting an intensity CV lower than 0.3 (Figure 1F). As an example and regardless of the vintage or the permeability, more than 4000 peaks showed a CV lower than 0.1 among the

three replicates (Figure 1E), thus putting the basis of robust and efficient comparisons within series of complex biological samples such as wines by FTICR-MS.

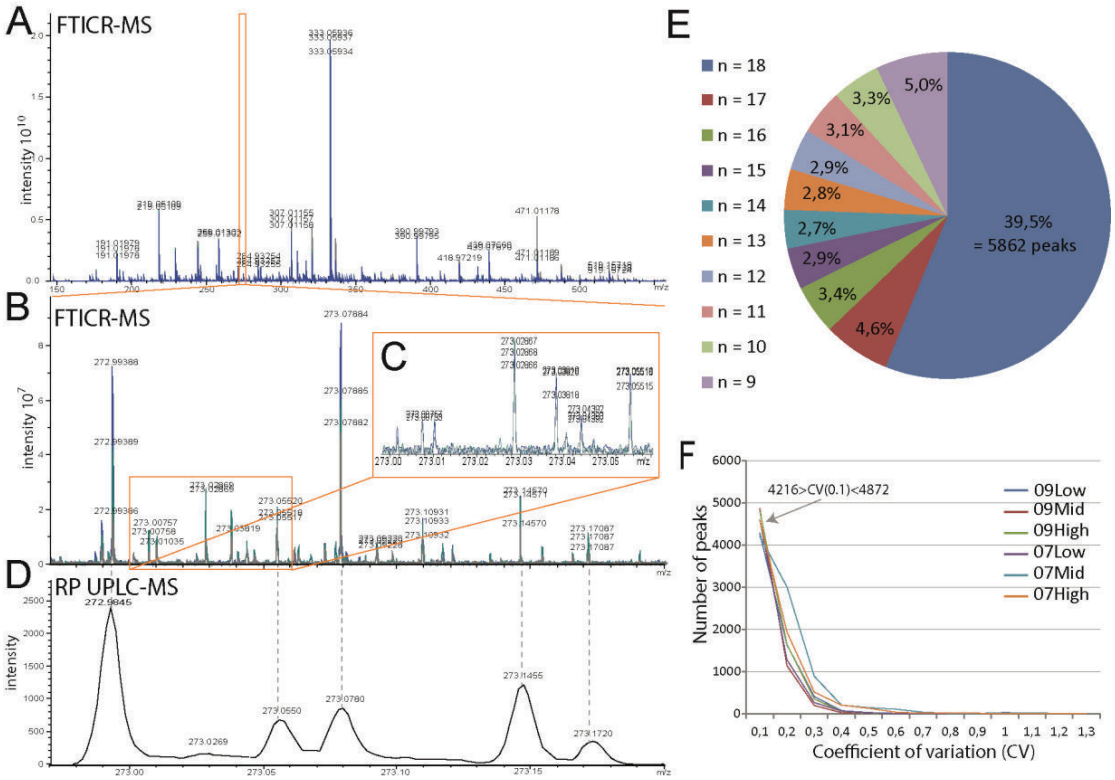


Figure 1: Evaluation of the repeatability of FTICR-MS measurements: (A) repeatability of m/z detection for three randomly chosen samples over the whole m/z range (B) zoom in the m/z 272.90-273.20 mass range (C) zoom in the m/z 273.00-273.05 mass range and (D) same m/z mass range as B for the summed up mass spectra obtained by RP UPLC-Q-ToF-MS (E) Frequency of common detected peaks over n biological samples (F) Coefficient of variation (CV) of intensities of common detected peaks among biological replicates for each sub-groups in Table 1.

Variety discriminations

Hierarchical cluster analysis of spectra from single variety samples readily provided an excellent separation of the champagne wines according to the grape variety they were made of (Figure 2A). Furthermore, wines made of Chardonnay grapes appeared to be better separated from both Pinot wines (Pinot Noir and Pinot Meunier), which is consistent with the genetic proximity of the two latter grapes, as Pinot meunier is the name of a genetic variant of Pinot Noir [37]. This discrimination was further characterized by elemental compositions associated with extracted masses from the HCA analysis, and represented as van Krevelen diagrams in Figure 2B (Pinot noir and Pinot meunier) and 2C

(Chardonnay). Such diagrams, which are used to represent densities of molecular families, revealed that Chardonnay wines have a greater diversity in nitrogen-containing compounds, including peptides, whereas Pinot wines are richer in sulfur-containing and phenolic compounds, consistently with the fact that Chardonnay is a white grape variety and Pinot (noir and meunier) are red grapes.

Through the MassTRIX interface, 287 elemental formulas specific to chardonnay wines and 630 elementals formulas specific to Pinot wines (from 886 and 1341 masses, specific to chardonnay and pinot wines respectively) could be correlated to hypothetical metabolite structures from the various metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism (Figure 2D) [38,39]. If Pinot wines were clearly characterized by a much higher number of hits in each pathways (except for the arachidonic acid metabolism), all of the metabolic pathways appeared to be involved in this discrimination of white from reds, thus covering a large number of molecular families including vitamins, polyphenols, fatty acids, carbohydrates and amino acids (Fig.2D). As an example of discrimination between Chardonnay and Pinot wines, Figure 2E compares possible annotations in the stilbenoids biosynthesis metabolic pathway, which refers to defense metabolites mostly synthesized in grape skins. Most interestingly, the higher number of Pinot annotations (19 red discs throughout the entire metabolic map) than Chardonnay annotations (8 yellow stars) revealed that although skin maceration of red grapes (Pinot noir and meunier) is reduced as much as possible in order to avoid colour extraction, skin-related metabolites were actually transferred into the juice during the pressing of berries, and subsequently to the wine. Consistently with those observations, reseveratrol would be present only in Pinot wines, whereas piceatannol or pterostilbene would be present in both Chardonnay and Pinot wines. Altogether, these results reveal that important health-associated compounds may be present in aged Champagne wines, and in particular those wines made from red grapes.

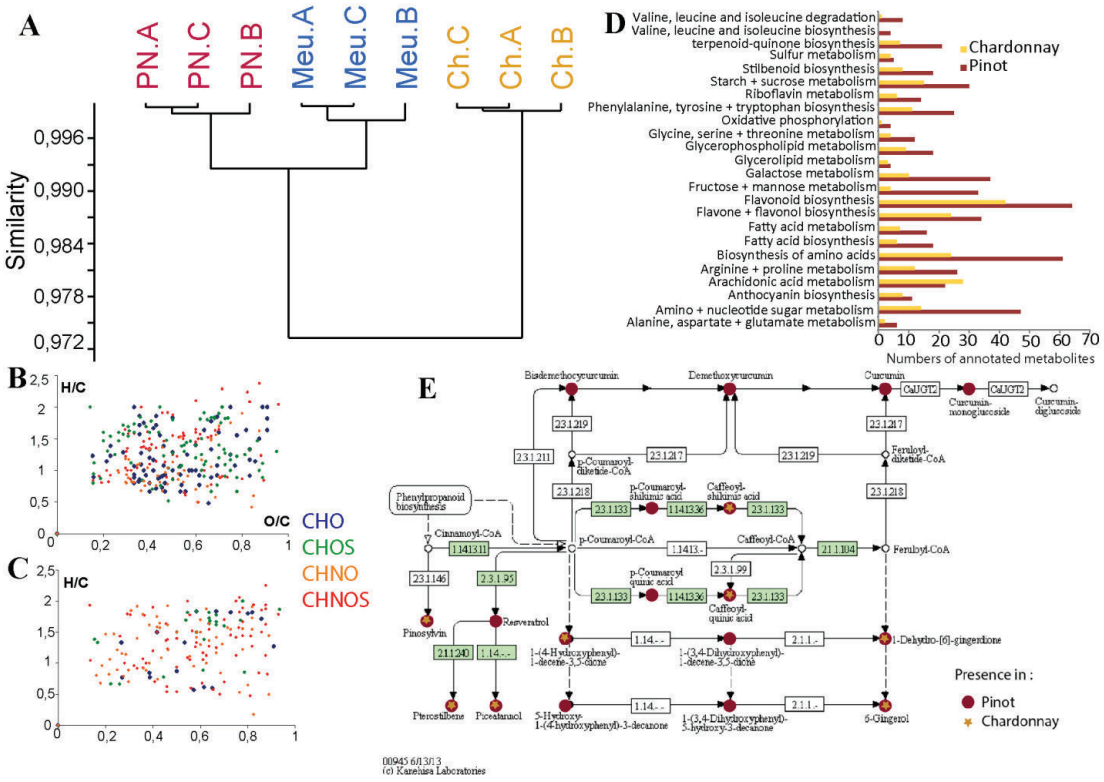


Figure 2: FTICR-MS data for single variety wines (vintage 2008). (A) Hierarchical cluster analysis of spectra from Pinot noir wines (red) Pinot Meunier wines (blue) and Chardonnay wines (yellow), showing the higher similarity between the two Pinots. (B) van Krevelen diagram (H/C versus O/C) of specific masses for Pinot wines (Pinot Noir and Meunier). (C) van Krevelen diagram (H/C versus O/C) of specific masses for Chardonnay. (D) Comparison of the number of possible Pinot (red) and Chardonnay (yellow) metabolites annotations in the various metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism. (E) Comparison of Pinot (red discs) and Chardonnay (yellow stars) possible annotations in the stilbenoids biosynthesis pathway.

Vintage impact

The principal component analysis (PCA) of the 18 blended samples (Figure 3A) straightforwardly discriminated Champagne wines according to vintages, regardless of the oxygenation states, confirming once again that vintage has the highest impact on the instantaneous chemical composition of wines assessed by FTICR-MS [17,18]. Remarkably though, this PCA also indicated specific features related to the oxygenation state of the wine, within each vintage (Figure 3A). Replicates corresponding to a middle oxygenation appeared less grouped than the others, for both vintage, although it was more pronounced for the 2008 vintage. Furthermore, highly oxygenated wines from the 2006 vintage appeared to be clearly separated from the other oxygenation states of this vintage. These two observations indicate that either the two more years of oxygenation for the 2006

vintage (at the moment of the analysis) have led to a better discrimination among oxidized states than for the 2008 vintage, or that a same wine from two distinct vintages is characterized by two distinct reactivities towards oxygen consumption.

Although the former hypothesis seems more straightforward, and consistent with time-related oenodiagenesis processes in the bottle [17], the latter is likely correct also, because the second axis of this PCA was positively correlated with highly oxygenated wines in 2006 and mildly oxygenated ones in 2008. A further evidence of the intrinsic difference in reactivity for the two vintages was provided by the comparison of MassTRIX metabolite annotations of vintage discriminant elemental formulas (Figure 3B). Indeed, the two very distinct distributions of annotations among the various pathways clearly witnessed to the fact that 2008 samples are not just 2006 samples with 2 years less of oxygenation. In that case, results of Figure 3 would suggest that base wines from the 2006 vintage already exhibited a higher sensitivity towards oxygen, and thus a different intrinsic composition, before the beginning of the *prise de mousse*, leading to more different wines upon higher oxygenation.

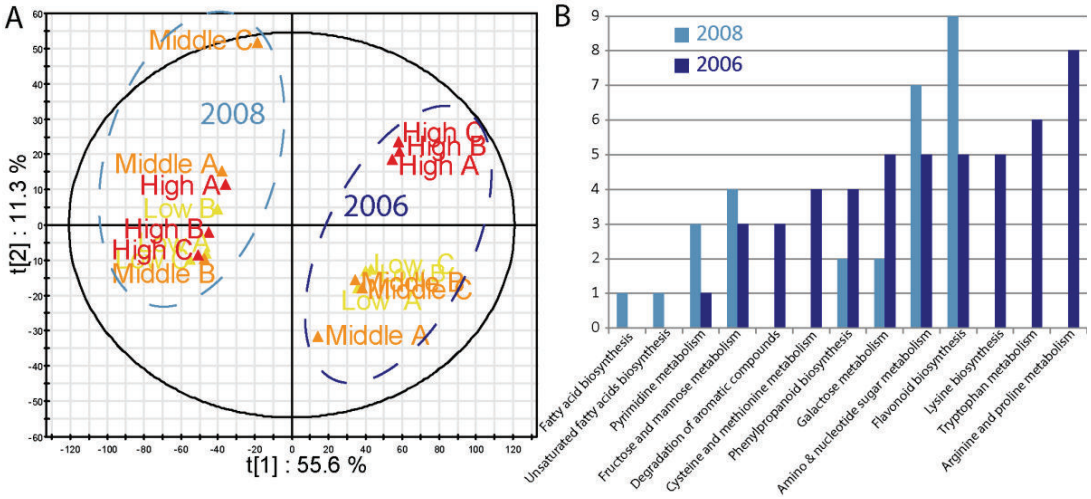


Figure 3: FTICR-MS data from the 18 blended wines from two 2006 and 2008 vintages (A) Principal component analysis (PCA) and (B) MassTRIX comparison of the number of possible 2006 (dark blue) and 2008 (pale blue) metabolite annotations in the various metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism.

Oxygenation impact

A visual comparison of spectra profiles at two nominal masses and for the two extreme oxygenation levels is presented in figure 4A for the 2006 vintage. These peak distributions, which are representative of the entire spectra, illustrate the complex mechanisms involved in the oxygenation of a wine, whereby the instantaneous chemical composition is characterized by both the appearance and the disappearance of specific compounds upon oxygenation. The peak at m/z 451.00146 for instance, is absent for weakly-oxygenated samples and appears for highly-oxygenated ones (Figure 4A), whereas in contrast, the peak at m/z 298.12984 disappears with oxygenation (Figure 4B). These two examples highlighted the advantage of non-targeted approaches for unravelling the various and simultaneous impacts of the oxygen consumption on the instantaneous chemistry of wines. All of the masses which actually discriminated wines according to the oxygenation state and regardless of the vintage, could be accessed through an orthogonal Partial Least Squares regression (OPLS) [40]. The quality of the fitted model for the OPLS scores plot (figure 4C was confirmed by excellent values for the prediction Q^2(cum)=0.962 and for the fitting R^2(Y)=0.995, with the three oxygenation states grouped together along the first axis, while axis 2 would partly allow for the distinction between vintages (Figure 4C).

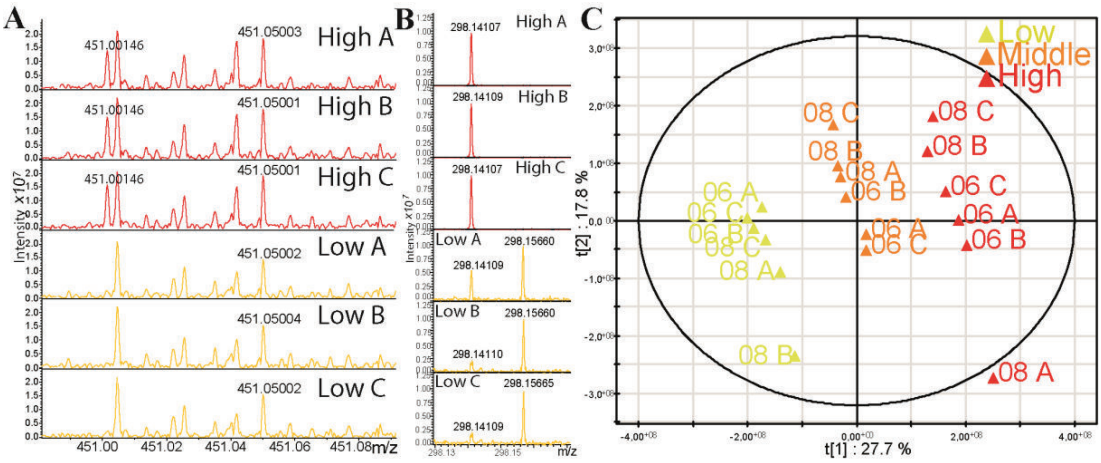


Figure 4: FTICR-MS data for blended wines and for the two vintages. Comparison of spectra at nominal masses m/z 451 (A) and m/z 298 (B) for the three replicates of the low and high oxygenation samples. Note the very good repeatability of FTICR-MS measurements among the three replicates. (C) OPLS scores plot of FTICR-MS data for the 18 blended wines, showing the discrimination of oxygenation states regardless of vintages.

Blended wines were also analyzed with RP UPLC-Q-ToF-MS in order to restrict the number of discriminant masses drawn from the model to only those chromatographically significant (187 peaks and 140 peaks discriminating the group of high and low oxygenated samples, respectively). The integration of FTICR-MS elemental formula ultra-high precision annotations to RP UPLC-Q-ToF-MS of the same data set could indeed offer a fast opportunity to annotate the common features between the two different platforms.

PLS-DA scores plot of RP UPLC-Q-ToF-MS reinforced our results and separated perfectly high and low oxygenated samples regardless of vintages (Figure 5A). Interestingly, if T1 *vs* T2 and T1 *vs* T3 projections discriminated wines according to oxygenation states, regardless of the vintage, the T2 *vs* T3 projection led to the reverse. It must be noted that whatever the oxygenation state, 2008 wines appeared less grouped than 2006 wines, thus confirming the particular ability of RP UPLC-Q-ToF-MS to not only identify specific chemical fingerprints but also to reveal their transience when applied to wines with different ages. Again, and as already mentioned above, such transient character - characterized here by the fact that the model better explains the older 2006 wines than the 2008 wines - likely originate from both the fact that the oenodiagenesis process associated with oxygenation has proceeded further for 2006 wines than for the 2008 wines, and from the fact that overall grapes and wines compositions - and thus resistances to oxygenation - were different for the two vintages.

UPLC-Q-ToF-MS discriminant elemental formulas (also identified by FTICR-MS) were used to question metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism using MassTRIX [38,39]. Pathways with highest annotation rates, along with their distributions for the two extreme oxygenation states, are shown in Figure 5B. For example, 14 metabolites from the flavonoid biosynthesis pathway found hits among elemental formulas discriminant for the low oxygenated group, whereas only 6 did so for the highly oxygenated one (Figure 5B). Conversely, pathways like the phenylpropanoid biosynthesis or the biosynthesis of amino acids exhibited more hits for the high oxygenated group than for the other one. Different informations can be drawn from these annotations. First of all, few discriminant elemental formulas actually found hits in the different accessible metabolic pathways through MassTRIX, thus confirming the extent of yet unknown metabolites involved in the oxygenation mechanisms of wines.

Considering the two extreme oxygenation states as an example, the model was characterized by 187 peaks and 140 peaks discriminating the group of high and low oxygenated samples, respectively, of which 142 and 88, respectively, could be assigned unambiguous elemental formulas. Finally, only 40 (high oxygenation) and 58 (low oxygenation) of these elemental formulas could find hits in the pertinent metabolic pathways from the KEGG database, thus confirming the extent of yet unknown metabolites involved in the oxygen consumption of wines (Figure 5B). Interestingly, the significantly higher number of hits (relative to the number of elemental formulas) for the low oxygenated samples, was consistent with the fact that known primary and secondary metabolites from grape-related organisms were less subject to multiple reactions (condensation, oxidation…) than upon elevated oxygenation where they were consumed. Besides, and most importantly, these non-regular distributions of hits between the two oxygenation states indicate that mechanisms of oxygenation consumption by wines do not seem to be linear with the level of oxygen and distinct chemistries seem to explain what is happening when a wine is exposed to low or high concentrations of oxygen.

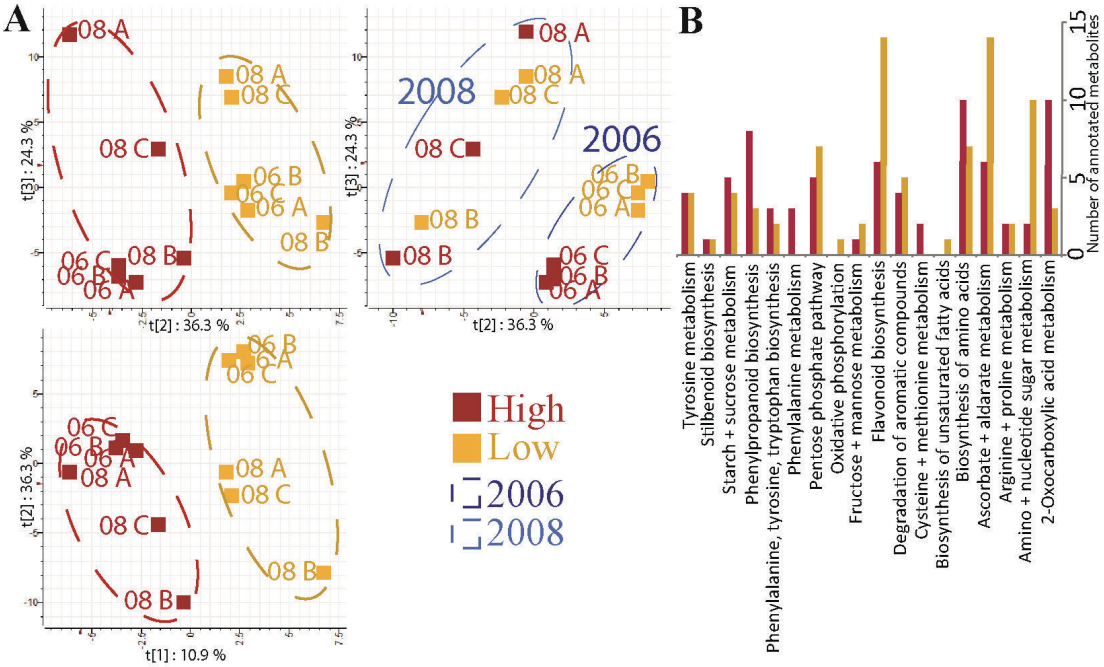


Figure 5: UPLC-Q-ToF-MS data for blended wines. (A) T1 *vs* T2, T1 *vs* T3 and T2 *vs* T3 projections for the PLS-DA scores plot (B) Number of discriminant elemental formulas which could be associated with metabolites from the various metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism using MassTRIX.

Compositional networks

An alternative description of discriminant features for the two oxygenation states exploits the exact mass information provided by FTICR-MS through the building of compositional networks, which enable mass coverage beyond classical annotations, and thus the identification of unknowns. Exact masses from FTICR-MS data thus provide the chemical basis on which we can construct sample-related metabolic pathways in a data driven network based approach. By displaying data points (assigned elemental formulas) as nodes which conditionally get connected (edges) among each other, networks have been proven ideal for efficient modelling and visualization of multivariate data [20,36,39]. Connections may refer here to basic functional differences (OH, NH, N…) or mass differences specific to selected reactions between a substrate and a product. Peak intensities can also be used to perform statistical inference on the data and to further add weights to the constructed mass difference networks [36]. Thus, combining these data-driven pathways with multivariate statistics gives insight into known biochemical mechanisms and their dynamics.

10589 links were found between annotated peaks from the low and high oxygenated blended wines FTICR-MS data, on the basis of 180 different transformations (Supplemental Table 1). Such a compositional network is shown in Figure 6A, with an enlargement to appreciate the high rate of mass connectivity (Figure 6C). Many of the masses with significant variation of the intensity upon oxygenation appeared grouped together in condensed points of the network, witnessing to a high connectivity among detected masses within the data set (Figure 6A) [36]. Some of the discriminant masses exhibited a very high connectivity (> 10), thus suggesting their key role in the reaction to oxygen exposure.

For instance, the m/z 249.0552 (Figure 6B-C), discriminant for low oxygenated wines, unambiguously assigned the $[C_8H_{13}N_2O_5S]^-$ elemental composition, and hypothetically annotated as the Glutamyl-cysteine dipeptide, exhibited 47 connections with others masses. All of these connections were with other masses discriminant for low oxygenated wines, *i.e.* masses for which the intensity decreased with the increase of the oxygen uptake (Figure 6B). Among connected masses for instance, m/z 267.0657 could be assigned the $[C_8H_{15}N_2O_6S]^-$ elemental composition, linked to m/z 249.0552 by hydrolysis or condensation mass difference (H_2O transformation) and could be annotated as

homolenthionine. Similarly, m/z 363.0870, assigned $[C_{13}H_{19}N_2O_8S]^-$, was linked to m/z 249.0552 by a $C_5H_6O_3$ transformation that could be a glutarate condensation, and m/z 419.07659, assigned $[C_{15}H_{19}N_2O_{10}S]^-$, was linked by a $C_7H_6O_5$ compositional transformation that could be a gallic acid addition.

If these few examples are only putative structures and biochemical transformations, the elemental formulas for both nodes and edges are unambiguous thanks to the accuracy of m/z measurements, and thus illustrate the actual diversity of yet-unknown mechanisms and compounds which can be involved in the oxidation process of a wine. These examples are all the more interesting that the hypothetical glutamyl-cysteine structure would refer to the L-γ-glutamyl-L-cysteine, precursor of the well-known glutathion tripeptide, and supposed to exhibit similar antioxydant properties [41,42]. Resulting from yeasts metabolism [42–45], its decrease with oxygen uptake during the *prise de mousse*, would be consistent with this antioxydant property, although its presence should be accompanied by the presence of glutathion [41], which we did not observe. Under this hypothesis, the correlated intensity decrease of m/z 419.07659 (putative gallic acid adduct) upon oxygen uptake would indicate that the glutamyl-cysteine dipeptide possibly reacted with the easily oxydized gallic acid [46] through a nucleophilic addition to the quinonic form of the latter. The presence of gallic acid among markers for low oxygenated wines supports this hypothesis. However, since this adduct is also a marker for low oxygenation, it would further react with the increase of oxygenation.

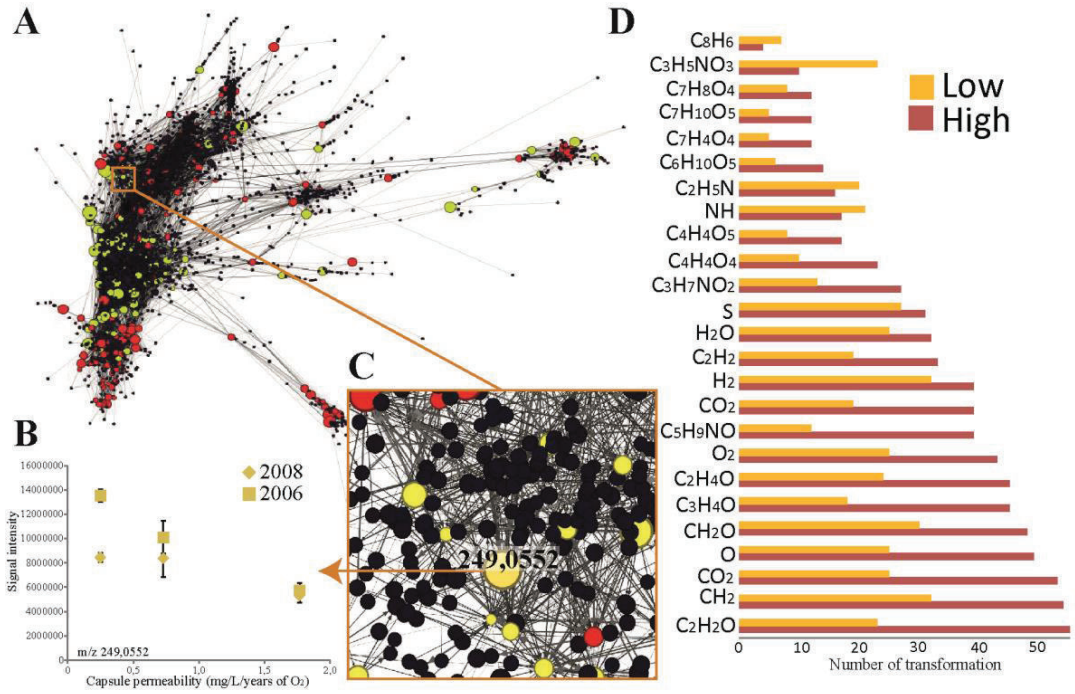


Figure 6: FTICR-MS data for blended wines. (A) Mass difference network within the whole matrix composed of data from the high and low oxygenated samples. (B) Evolution of the m/z 249.0552 intensity for the two vintages 2006 (square) and 2008 (diamond). (C) Enlargement of the network centered on the m/z 249.0552 showing the high number of connections with other masses. (D) Histogram of some of the most abundant compositional transformations linking discriminant masses for high (red) and low (yellow) oxygenated wines.

Conclusion

Non-targeted FTICR-MS and UPLC-Q-ToF-MS, together with multivariate statistics were applied to the study of the oxygenation process of Champagne base wines during the p*rise de mousse*. For the first time, our results confirmed the very good repeatability of ultra-high resolution FTICR-MS, both in terms of m/z matching among series of closely related samples and in terms of coefficient of variation of peak intensities among biological replicates.

In agreement with previous results, these experiments run on two vintages confirmed that straightforward metabolomic fingerprints of bottled wines are first driven by vintage characteristics, even after several years of ageing. As a consequence, unsupervised multivariate statistical analyses clearly discriminated the series of blended

wines according to the vintage, and regardless of their oxygenation levels. But they also revealed that grapes and wines from these two vintages did not hold the same sensibility to oxygen. Nevertheless, further supervised multivariate statistics of both FTICR-MS and UPLC-Q-ToF-MS data easily revealed discriminant chemical signatures for low and high oxygenated wines, regardless of the vintage. The non-linear distribution of metabolites annotations for these signatures suggested that mechanisms of oxygenation of base wines do not proceed similarly for low and high oxygen exposure. Compositional networks proved to be efficient in identifying yet-unknown hypothetical structures involved in the oxygenation process.

Altogether, these results illustrated the advance of non-targeted metabolomics for questioning bottled wines in order to understand the impact of enological processes on the chemistry of wines.

Acknowledgments. This work was financially supported by the Région Bourgogne, the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) and the Comité Interprofessionnel des Vin de Champagne (CIVC).

References

1. Dowling DK, Simmons LW (2009) Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. Proc R Soc B Biol Sci 276: 1737–1745.
2. Arapitsas P, Scholz M, Vrhovsek U, Di Blasi S, Biondi Bartolini A, et al. (2012) A Metabolomic Approach to the Study of Wine Micro-Oxygenation. PLoS ONE 7: e37783. doi:10.1371/journal.pone.0037783.
3. Karbowiak T, Gougeon RD, Alinc J-B, Brachais L, Debeaufort F, et al. (2009) Wine Oxidation and the Role of Cork. Crit Rev Food Sci Nutr 50: 20–52. doi:10.1080/10408390802248585.
4. Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V, Silva AMS (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. Food Res Int 44: 1115–1126. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.050.

5. Cheynier V, Basire N, Rigaud J (1989) Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. J Agric Food Chem 37: 1069–1071.
6. Danilewicz JC (2011) Mechanism of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: key role of iron. Am J Enol Vitic: ajev – 2011.
7. Singleton VL (1987) Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. Am J Enol Vitic 38: 69–77.
8. Waterhouse AL, Laurie VF (2006) Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. Am J Enol Vitic 57: 306–313.
9. Bueno M, Culleré L, Cacho J, Ferreira V (2010) Chemical and sensory characterization of oxidative behavior in different wines. Food Res Int 43: 1423–1428.
10. Grant-Preece P, Fang H, Schmidtke LM, Clark AC (2013) Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide. Food Chem 141: 304–312.
11. Pons A, Lavigne V, Landais Y, Darriet P, Dubourdieu D (2010) Identification of a sotolon pathway in dry white wines. J Agric Food Chem 58: 7273–7279.
12. Karbowiak T, Mansfield AK, Barrera-García VD, Chassagne D (2010) Sorption and diffusion properties of volatile phenols into cork. Food Chem 122: 1089–1094. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.089.
13. Skouroumounis GK, Kwiatkowski MJ, Francis IL, Oakey H, Capone DL, et al. (2005) The influence of ascorbic acid on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. Aust J Grape Wine Res 11: 355–368.
14. Ugliano M, Kwiatkowski M, Vidal S, Capone D, Siebert T, et al. (2011) Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. J Agric Food Chem 59: 2564–2572.
doi:10.1021/jf1043585.

15. Cuadros-Inostroza A, Giavalisco P, Hummel J, Eckardt A, Willmitzer L, et al. (2010) Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. Anal Chem 82: 3573–3580. doi:10.1021/ac902678t.
16. Gougeon RD, Lucio M, Frommberger M, Peyron D, Chassagne D, et al. (2009) The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. Proc Natl Acad Sci 106: 9174–9179.
17. Roullier-Gall C, Boutegrabet L, Gougeon RD, Schmitt-Kopplin P (2014) A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. Food Chem 152: 100–107. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.056.
18. Roullier-Gall C, Lucio M, Noret L, Schmitt-Kopplin P, Gougeon RD (2014) How Subtle Is the "Terroir" Effect? Chemistry-Related Signatures of Two "Climats de Bourgogne." PLoS ONE 9: e97615. doi:10.1371/journal.pone.0097615.
19. Arapitsas P, Speri G, Angeli A, Perenzoni D, Mattivi F (2014) The influence of storage on the "chemical age" of red wines. Metabolomics: 1–17. doi:10.1007/s11306-014-0638-x.
20. Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, Tziotis D, Lehmann R, et al. (2013) Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. J Chromatogr A 1292: 51–65. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.017.
21. Hertkorn N, Ruecker C, Meringer M, Gugisch R, Frommberger M, et al. (2007) High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems. Anal Bioanal Chem 389: 1311–1327. doi:10.1007/s00216-007-1577-4.
22. Hertkorn N, Harir M, Koch B, Michalke B, Schmitt-Kopplin P (2013) High-field NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry: powerful discovery tools for the molecular level characterization of marine dissolved organic matter. Biogeosciences 10: 1583–1624.
23. Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S, de la Torre-Boronat M del C (1997) Influence of variety and aging on foaming properties of cava (sparkling wine). 2. J Agric Food Chem 45: 2520–2525.

24. Coelho E, Coimbra MA, Nogueira JMF, Rocha SM (2009) Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption. Anal Chim Acta 635: 214–221.
25. Pozo-Bayón MÁ, Martínez-Rodríguez A, Pueyo E, Moreno-Arribas M (2009) Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. Trends Food Sci Technol 20: 289–299.
26. Robillard B, Delpuech E, Viaux L, Malvy J, Vignes-Adler M, et al. (1993) Improvements of methods for sparkling base wine foam measurements and effect of wine filtration on foam behavior. Am J Enol Vitic 44: 387–392.
27. Liger-Belair G, Polidori G, Jeandet P (2008) Recent advances in the science of champagne bubbles. Chem Soc Rev 37: 2490–2511.
28. Liger-Belair G, Religieux J-B, Fohanno S, Vialatte M-A, Jeandet P, et al. (2007) Visualization of mixing flow phenomena in champagne glasses under various glass-shape and engravement conditions. J Agric Food Chem 55: 882–888.
29. Chamkha M, Cathala B, Cheynier V, Douillard R (2003) Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. J Agric Food Chem 51: 3179–3184.
30. Bosch-Fusté J, Riu-Aumatell M, Guadayol JM, Caixach J, López-Tamames E, et al. (2007) Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. Food Chem 105: 428–435.
31. Campo E, Cacho J, Ferreira V (2008) The chemical characterization of the aroma of dessert and sparkling white wines (Pedro Ximenez, Fino, Sauternes, and Cava) by gas chromatography- olfactometry and chemical quantitative analysis. J Agric Food Chem 56: 2477–2484.
32. Francioli S, Torrens J, Riu-Aumatell M, López-Tamames E, Buxaderas S (2003) Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. Am J Enol Vitic 54: 158–162.
33. Valade M, Tribaut-Sohier I, Bunner D, Laurent M, Moncomble D, et al. (2006) Les apports d'oxygène en vinification et leur impact sur les vins. Vign Champen 9: 60–95.

34. Liger-Belair G, Marchal R, Robillard B, Dambrouck T, Maujean A, et al. (2000) On the velocity of expanding spherical gas bubbles rising in line in supersaturated hydroalcoholic solutions: application to bubble trains in carbonated beverages. Langmuir 16: 1889–1895.
35. Liger-Belair G, Vignes-Adler M, Voisin C, Robillard B, Jeandet P (2002) Kinetics of gas discharging in a glass of champagne: The role of nucleation sites. Langmuir 18: 1294–1301.
36. Tziotis D, Hertkorn N, Schmitt-Kopplin P (2011) Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. Eur J Mass Spectrom Chichester Engl 17: 415–421. doi:10.1255/ejms.1135.
37. Jackson DI, Lombard PB (1993) Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. Am J Enol Vitic 44: 409–430.
38. Suhre K, Schmitt-Kopplin P (2008) MassTRIX: mass translator into pathways. Nucleic Acids Res 36: W481–W484. doi:10.1093/nar/gkn194.
39. Wägele B, Witting M, Schmitt-Kopplin P, Suhre K (2012) MassTRIX Reloaded: Combined Analysis and Visualization of Transcriptome and Metabolome Data. PLoS ONE 7.
40. Wiklund S, Johansson E, Sjöström L, Mellerowicz EJ, Edlund U, et al. (2008) Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. Anal Chem 80: 115–122.
41. Marchand S, de Revel G (2010) A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. Anal Chim Acta 660: 158–163.
42. Rodríguez-Bencomo JJ, García-Ruiz A, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B (2014) Volatile and Phenolic Composition of A Chardonnay Wine Treated with Antimicrobial Plant Extracts before Malolactic Fermentation. J Agric Stud 2: 62–75.
43. Demirkol O, Adams C, Ercal N (2004) Biologically important thiols in various vegetables and fruits. J Agric Food Chem 52: 8151–8154.

44. Nishiuchi H, Umezawa Y, Wakabayashi H (2011) An improved method to determine gamma-glutamylcysteine content in foodstuffs using 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazole. Food Sci Technol Res 17: 573–577.
45. Rossouw D, Olivares-Hernandes R, Nielsen J, Bauer FF (2009) Comparative transcriptomic approach to investigate differences in wine yeast physiology and metabolism during fermentation. Appl Environ Microbiol 75: 6600–6612.
46. Waterhouse AL (2002) Wine Phenolics. Ann N Y Acad Sci 957: 21–36. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x.

2 Influence des pratiques œnologiques : sulfitage au pressurage, débourbage, utilisation de bentonite en fermentation et bouchage, en vinification bourguignonne.

La publication de ces résultats étant en cours d'élaboration, ceux-ci seront présentés ici sous un format classique.

La problématique de l'oxydation prématurée des vins blancs est au centre des préoccupations de la Bourgogne vitivinicole et, à ce titre, des expérimentations ont été menées depuis plusieurs années par le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) et l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (IUVV) au travers d'expérimentations menées par les étudiants du Diplôme National d'œnologue. Ces expérimentations avaient pour but d'étudier l'impact de pratiques œnologiques sur la stabilité oxydative des vins blancs de Chardonnay. Les paramètres explorés ont été : la perméabilité de l'obturateur, l'influence du sulfitage au pressurage, l'intensité du débourbage, et l'utilisation de bentonite en fermentation.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés aux vins de ces expérimentations, considérés ici comme ayant conservé une mémoire chimique associée aux modalités comparatives qui ont été mises en œuvre lors de leur élaboration. Nous avons ainsi recherché des signatures spécifiques en mettant en œuvre deux approches analytiques non ciblées complémentaires : la FTICR-MS et la spectroscopie EEM. Aucun impact n'a été observé sur la composition du vin par l'ajout ou non de bentonite, ce paramètre ne sera donc pas abordé dans ce chapitre.

2.1 Impact du millésime

En accord avec l'ensemble des résultats présentés auparavant, l'analyse statistique par cluster hiérarchique des données issues de l'analyse par FTICR-MS de l'ensemble des échantillons montre une répartition privilégiée des vins par millésime, sans distinction de bouchage, de turbidité ou d'une quelconque autre pratique (**Figure 33**).

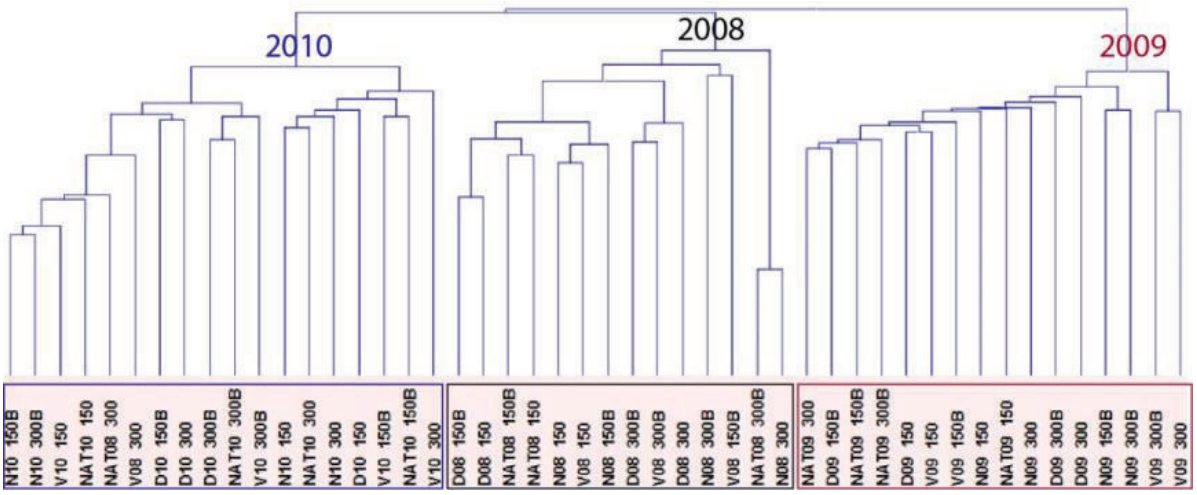


Figure 33: Cluster hiérarchique de l'ensemble des vins blancs d'appellation Rully, montrant un regroupement privilégié des échantillons en fonction de leurs millésimes (2008 en noir, 2009 en rouge ou 2010 en bleu).

2.2 Impact du bouchage

Dans le cas d'une étude sur un vin d'appellation Rully, bouché avec quatre types d'obturateurs (ampoule en verre, bouchage liège naturel, diams® ou nomacorc®) et de trois millésimes (2008, 2009 et 2010), l'analyse statistique multivariée discriminante par régression partielle (PLS-DA) permet l'excellente séparation des échantillons conservés dans les ampoules en verre de l'ensemble des autres vins et ce indépendamment du millésime (**Figure 34**). Ce résultat essentiel confirme que les ampoules en verre ont protégé le vin du contact avec l'oxygène, conduisant ainsi à une matrice chimique significativement différente des autres vins, pouvant être considérée comme témoin. Or les vins conservés dans les bouteilles bouchées par du liège naturel, reconstitué (Diams®) ou en plastique (nomacorc®) ont tous évolué de façons différentes.

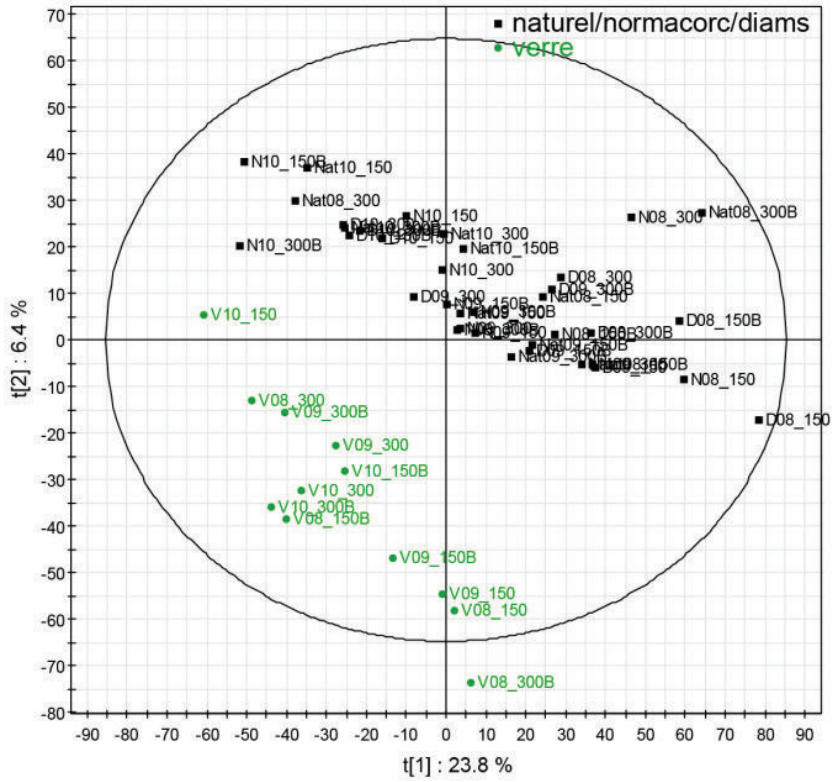


Figure 34: PLS-DA des échantillons de vins issus de FTICR-MS permettant la distinction des échantillons vieillis en ampoules en verre et de l'ensemble des autres échantillons (bouchage naturel, diams®, et nomacorc®) et ce indépendamment du millésime. Code couleur : en vert les vins vieillis en ampoules en verre, en noir les vins issus des bouchages naturel, diams® et nomacorc®.

Pour décrire plus précisément l'impact du bouchage sur la matrice globale, les masses discriminant les groupes de vins vieillis en ampoules de verre d'une part et les vins avec obturateurs naturel, nomacorc® et diams® d'autre part ont été extraites et analysées. Ces masses sont représentées dans des diagrammes de van krevelen pour identifier les familles de composés impliqués dans la séparation (**Figure 35**). Dans un premier temps, la diversité des masses spécifiques aux vins ayant vieilli en bouteilles semble nettement supérieure à celle des vins ayant vieilli en ampoules. Ces masses sont réparties sur l'ensemble du diagramme, indiquant que l'ensemble des familles chimiques composant le vin ont été impliquées dans les mécanismes liés à l'intrusion d'oxygène.

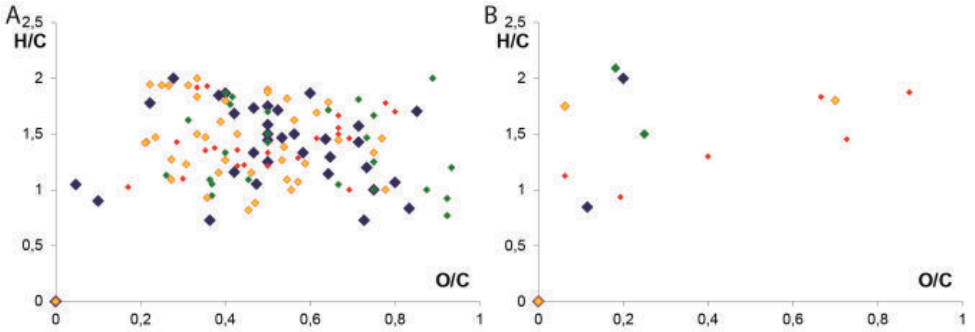


Figure 35: Diagramme de van krevelen des masses spécifiques discriminant les groupes de vins ayant vieilli avec bouchage naturel, diams® et nomacorc® (A), de ceux ayant vieilli en ampoules de verre (B).

Ces mêmes masses ont ensuite été analysées à l'aide de MassTRIX pour obtenir les annotations éventuelles. Ainsi, 11 métabolites spécifiques des vins bouchés avec Diams®, nomacorc® ou bouchon naturel et 6 métabolites spécifiques des vins en ampoules ont été identifiés (**Figure 36**). Les voies de biosynthèse dont sont issues ces annotations sont présentées ci-dessous pour permettre la comparaison entre les différents modes de bouchages.

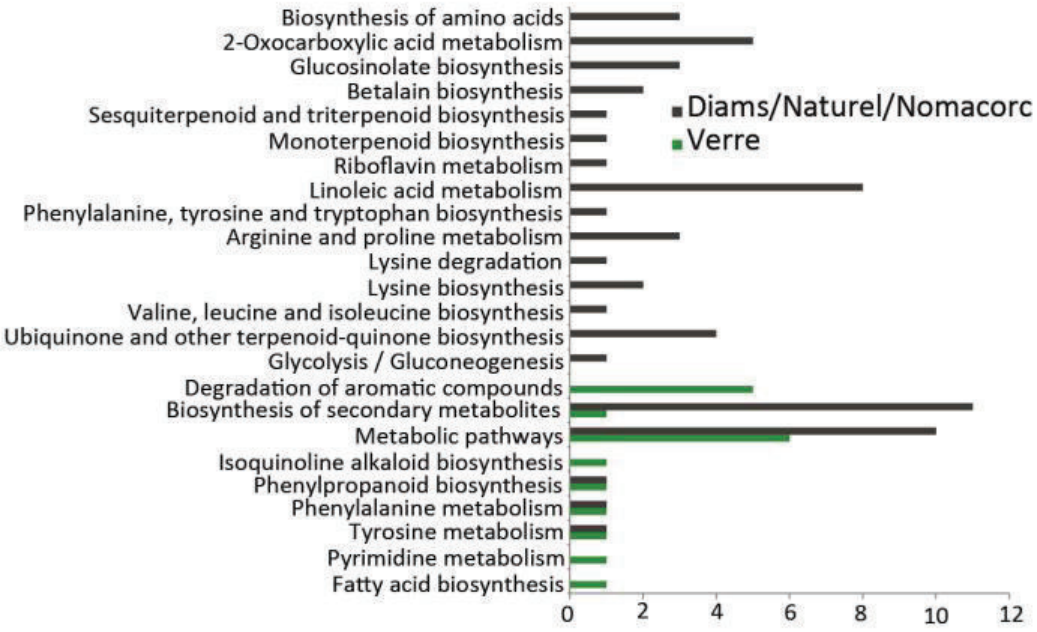


Figure 36: Annotation dans les bases de données KEGG et lipidmap à l'aide de l'interface MassTRIX des masses spécifiques des groupes de vins ayant vieilli en ampoules (vert) de ceux ayant vieilli avec différents types d'obturateurs (noir).

La même analyse statistique par PLS-DA, mais pour chaque millésime indépendamment, affine ce résultat et détaille les groupes d'échantillons similaires (**Figure 37**). Ainsi, les vins ayant vieilli en ampoules sont les plus différents pour les millésimes 2009 et 2010 tandis que pour 2008, ceux-ci semblent plus proches du reste des vins. De plus, le millésime 2009 présente une séparation nette entre les quatre différents bouchages selon l'axe 2 de l´ACP.

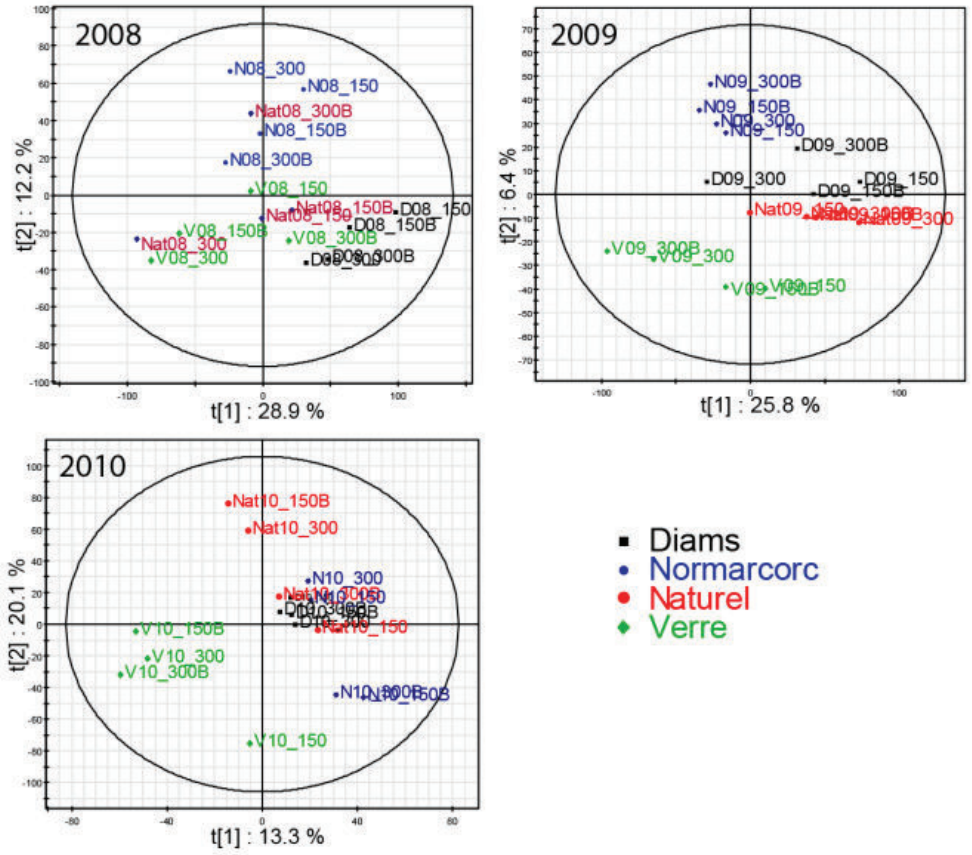


Figure 37: PLS-DA pour chaque millésime, 2008, 2009 et 2010 des masses issues de l'analyse FTICR-MS en fonction du type d'obturateur (diams® en noir, nomacorc en bleu, naturel en rouge et ampoule en verre en vert).

De façon générale, les bases de données permettent de proposer plus d'hypothèses structurales pour les signatures associées aux vins ayant vieilli en bouteille que pour ceux ayant vieilli en ampoule. Ce résultat suggère qu'en absence d'oxygène, un vin continue d'évoluer malgré tout selon des mécanismes réactionnels non connus à ce jour. Enfin, aucune discrimination entre les bouchages Diams®, Normacorc® et Naturel n'est significative, et ce même après l'exclusion des échantillons de vins ayant vieilli en ampoule en verre. Ce dernier

résultat confirme le fait que le mode de bouchage, exception faite pour le cas de l'ampoule, n'induit pas de différence significative sur la composition du vin au moment de l'étude, c'est-à-dire respectivement après 2, 3 et 4 ans de vieillissement.

2.3 Impact du débourbage

Dans un deuxième temps, l'analyse discriminante par régression partielle (PLS-DA) a permis la mise en évidence de l'impact du débourbage sur la matrice vin (**Figure 38**). La diversité chimique des vins est fortement impactée par l'intensité du débourbage. En effet, cette discrimination est visible dans la composition du vin indépendamment du bouchage ou du millésime étudié. Au contraire aucune discrimination en fonction de la présence ou non de bentonite n'est significative.

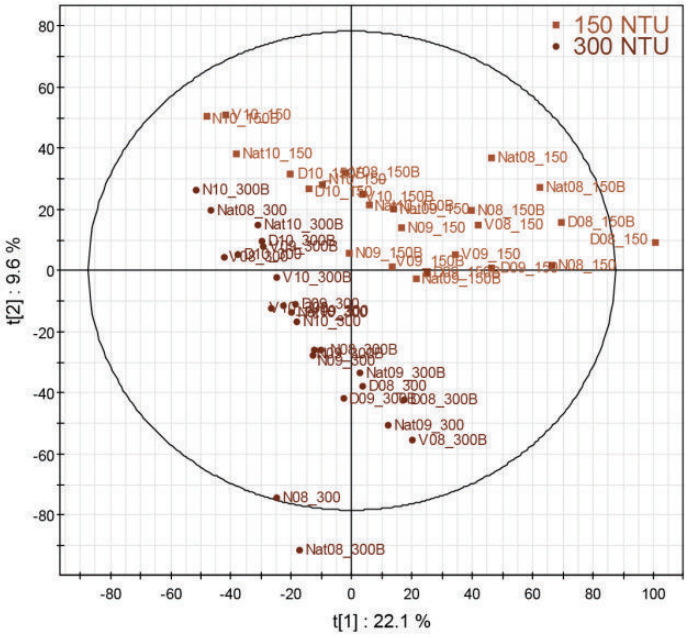


Figure 38: PLS-DA des échantillons de vins en fonction de l'intensité du débourbage, 150 NTU (en marron clair) et 300 NTU (en marron foncé) indépendamment du millésime, du bouchage et de la présence de bentonite en vinification.

2.4 Impact du sulfitage

Pour l'étude du sulfitage, trois réplicats biologiques ont été considérés pour chaque modalité (trois bouteilles de vins).

L'impact du sulfitage sur le vin a été suivi par analyses ciblées des composés phénoliques par UPLC (**Figure 39**), mais également par analyse non ciblée par FTICR-MS (**Figure 42**) et également par fluorescence (**Figure 41**). Les résultats obtenus par ces diverses techniques analytiques concordent et permettent une exploration plus complète de l'influence de la dose du sulfitage sur la composition chimique du vin.

Le tableau présentant les différentes teneurs en composés phénoliques permet de constater que ces mêmes composés sont en concentrations plus élevées dans les vins issus des moûts protégés par SO_2 au pressurage.

L'ACP réalisée sur les vins de 2007 ainsi que la PLS-DA sur les vins de 2006 montrent une séparation par taux de sulfitage (**Figure 39**). Les vins n'ayant pas reçu de SO_2 au pressurage (en gris) se distinguent clairement des vins ayant reçu 4 (en rouge) et 8 (en violet) g/hL au pressurage et ce quel que soit le millésime étudié. Ces séparations entre vins avec et sans SO_2 au pressurage se fait en fonction de l'axe 1 pour chacun des deux millésimes, l'axe 1 expliquant respectivement 28,7% de la variance en 2006 et 36,8% en 2007.

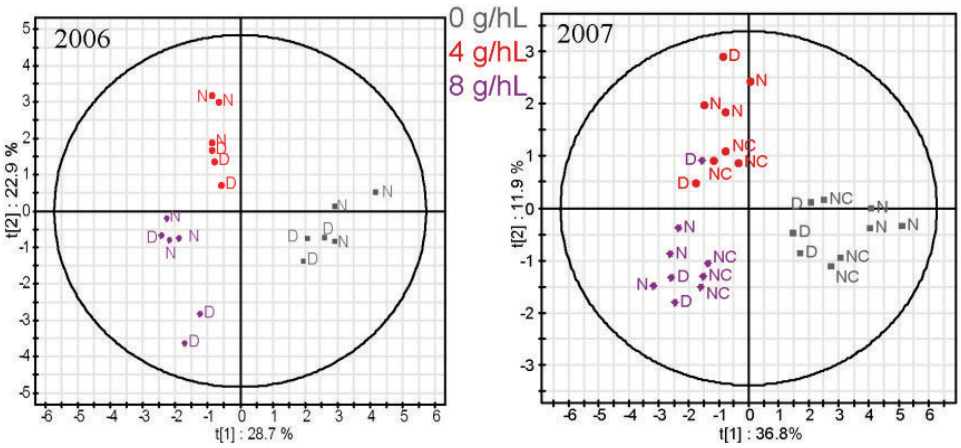


Figure 39: Score plot des PLS-DA (2006) et ACP (2007) des composés phénoliques des vins mesurés par UPLC. Code couleur : en gris 0 g/hL, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet et avec bouchons naturels en liège (N) les bouchons Diams® (D) et Nomacorc® (NC).

Pour analyser en détail les composés plus ou moins impactés par le taux de sulfitage, l'analyse supervisée PLS-DA a été effectuée pour séparer les échantillons selon le taux de SO_2 au pressurage (**Figure 40**). De même que précédemment, une différenciation est remarquée selon l'axe 1entre les vins ayant ou non reçu du SO_2 et ce indépendamment du

type d'obturateur. Les contributions respectives des différents composés phénoliques à l'axe des abscisses (t[1]) sont montrées sous forme d'histogramme des variables (**Figure 40**). Ces histogrammes de variables sont très différents pour les deux millésimes. Par exemple, les concentrations en acide gallique, acide protocatéchuique, hydroxytyrosol et acide gentisique sont plus élevées parmi les vins sans ajout de SO_2 au pressurage en 2006, alors qu'elles sont plus élevées dans les vins sulfités en 2007. Inversement, l'acide hydroxybenzoïque, la (+)-catéchine et le resvératrol sont plus abondants dans les vins sulfités en 2006, et plus élevés dans les vins sans SO_2 au pressurage en 2007. Cette analyse révèle également une augmentation du taux de tyrosol avec le sulfitage au pressurage. Il y a donc une relation entre l'état oxydatif du moût et la production de tyrosol lors de la fermentation alcoolique, en accord avec ce qui a été observé auparavant (266). Il a été constaté que la production élevée du tyrosol parmi les vins fermentés avec SO_2 est probablement due à la capacité du SO_2 de promouvoir la consommation des acides aminés pendant la fermentation (267).

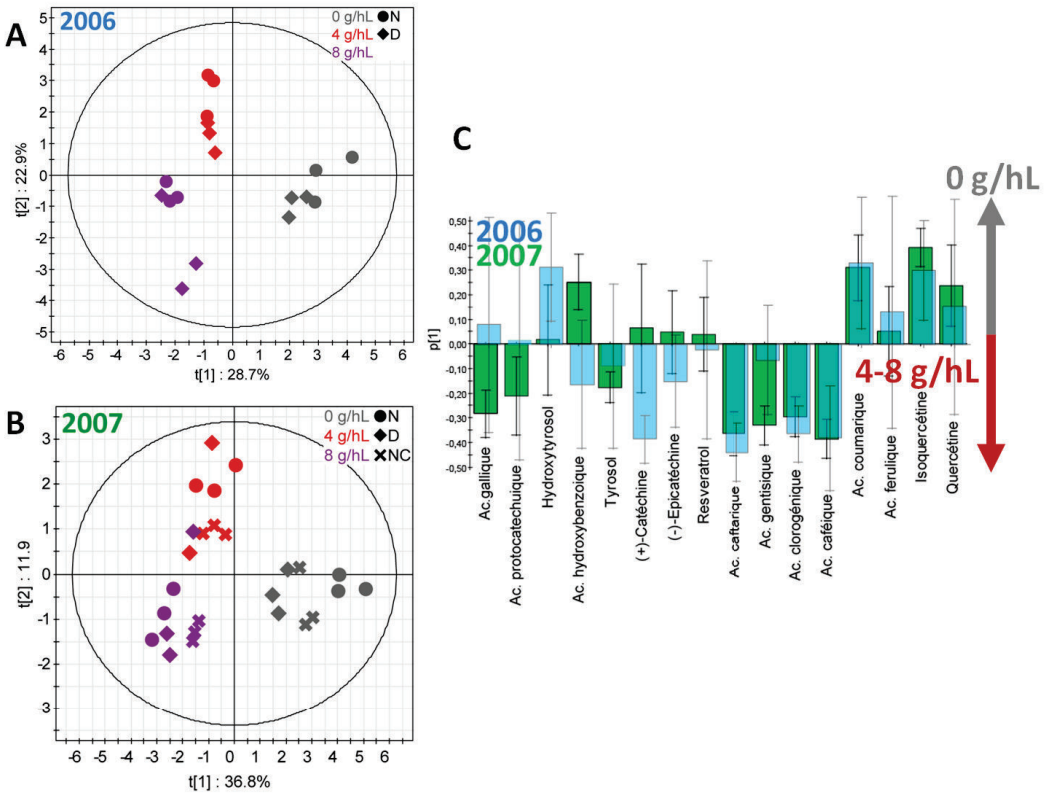


Figure 40: Analyses PLS-DA des données UPLC avec diagrammes des individus pour le millésime 2006 (A) et 2007 (B), montrant la séparation par taux de sulfitage (0 g/hL de SO_2 au pressurage en gris, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet). Les symboles correspondent au type d'obturateur : point = bouchons en liège, losange = Diam®, croix = Nomacorc®. Histogramme des variables (C) pour les

deux millésimes; 2006 en bleu et 2007 en vert, montrant les composés ayant une concentration plus élevée en absence de sulfitage (valeurs positives) et ceux ayant une concentration plus élevée après sulfitage à 4 ou 8 g/hL (valeurs négatives).

Si on continue la comparaison des échantillons avec des méthodes non ciblées, comme l'analyse par fluorimétrie (EEMF) suivie d'un traitement statistique PARAFAC (**Figure 41**), les résultats obtenus confirment les précédents, à savoir que la distinction des modalités de sulfitage est prépondérante au sein des deux millésimes. Cependant, les millésimes doivent être analysés indépendamment puisque l'effet millésime reste l'impact le plus fort sur la composition chimique des vins. Pour les vins de 2006 (**Figure 41**), c'est la corrélation entre les deux premières composantes qui discrimine les trois modalités de sulfitage. On observe ainsi que quel que soit l'obturateur, l'augmentation du taux de sulfitage conduit à une diminution de la composante 2 et à une augmentation corrélée de la composante 1. Les vins non sulfités sont expliqués à environ 48% et 38% respectivement pour les composantes 1 et 2, tandis que ces proportions atteignent 54% et 30% pour les vins avec 8 g/hL de SO_2 (**Figure 41**). En 2007 (**Figure 41**), la séparation par taux de sulfitage est très nette, il faut noter cependant et en accord avec les résultats UPLC, que les discriminations se font surtout entre vins non sulfités et vins sulfités (4 ou 8 g/hL). Il est intéressant de noter que ces tendances sont valables pour les deux millésimes, ce qui signifie que les paramètres de fluorescence seraient des marqueurs robustes de sulfitage du moût.

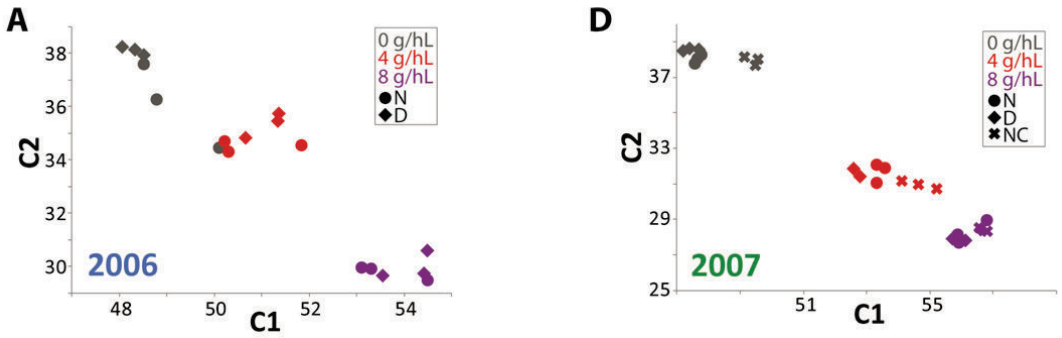


Figure 41 : Comparaison des scores PARAFAC pour les vins de 2006 et 2007. Scores (%) de C1 versus C2. Taux de sulfitage est représenté par la couleur du marqueur (0 g/hL de SO_2 au pressurage en gris, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet) et le type d'obturateur par sa forme (bouchons naturels en liège sont indiqués par des points, Diam® par des losanges, et Nomacorc® par des croix).

Enfin, ces mêmes vins ont étés analysés par FTICR-MS et l'analyse statistique par ACP permet une excellente séparation des échantillons en fonction de la dose de soufre, mais

également une séparation par bouchage (**Figure 42**). La séparation par dose de soufre pour le millésime 2007 suit l'axe 1 expliquant 15,2 % des masses, tandis que pour 2006 cette séparation est fonction des deux axes. D'autre part, le bouchage le plus impactant, ou tout du moins le plus différenciant est le bouchage par nomacorc (NC). En effet, en 2007, en présence des vins bouchés par nomacorc, les vins bouchés par du liège naturel ou diams sont plus proches, voire même d'influence comparable alors qu'ils étaient parfaitement différenciés en 2006 en l'absence des échantillons bouchés par nomacorc. La plus grande valeur de l'axe 2 pour l'ACP de 2007 peut donc s'expliquer en grande partie par la présence de nomacorc qui provoque une différenciation significative de la composition chimique des vins.

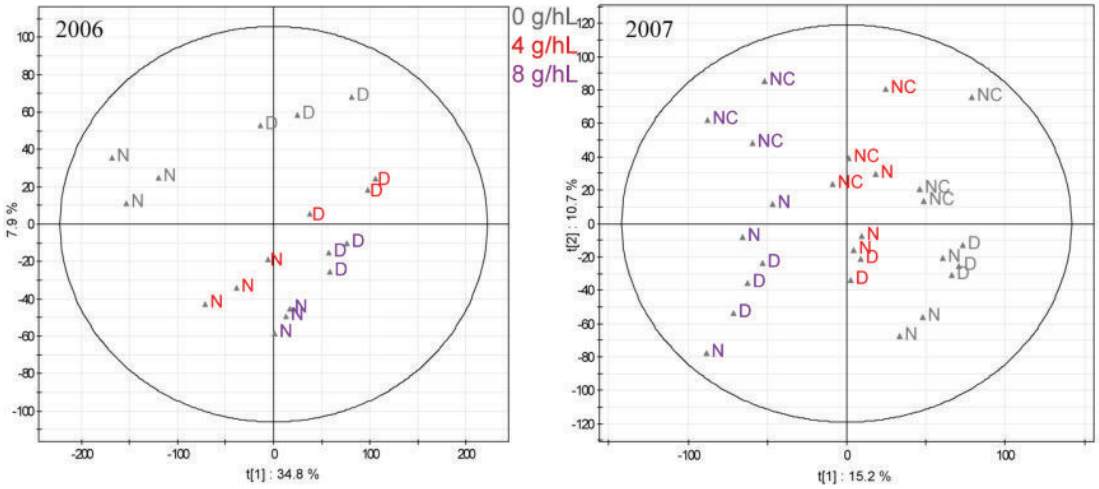


Figure 42: PCA des masses identifiées par FTICR-MS pour les millésimes 2006 et 2007. Code couleur : en gris 0 g/hL, 4 g/hL en rouge, et 8 g/hL en violet et avec bouchons naturels en liège (N) les bouchons Diams® (D) et Nomacorc® (NC).

2.5 Conclusion

Au travers de l'étude des vins présentant différents itinéraires œnologiques : bouchages, turbidités, soufre au pressurage et ajout ou non de bentonites sur différents millésimes, il est possible de constater qu'un grand nombre de composés sont identifiables par FTICR-MS illustrant la complexité moléculaires des vins, et l'influence de ces paramètres sur cette diversité. L'analyse non ciblée permet également d'observer des différences de compositions métaboliques globales principalement entre millésimes et entre mode de bouchages.

L'impact du millésime est systématiquement l'effet le plus fort sur la composition du vin. L'effet le plus impactant après le millésime semble être la dose de sulfites utilisée sous le pressoir, suivie directement par le type de bouchage. Les études statistiques multivariées confirment que les vins en ampoules verres, supposés être représentatifs de l'état initial des vins, ont en fait évolué selon des mécanismes non connus à ce jour. De plus, les vins bouchés par des bouchons nomacorc se trouvent être les plus différents après les ampoules en verres, les bouchages Diams et en liège naturel étant les plus proches. Cependant aucune différence significative ne nous permet d'extraire les masses spécifiques induites par le mode de bouchage, et ce même après l'exclusion des vins provenant des ampoules verres. Ce résultat pourrait signifier qu'après 2, 3 et 4 années en bouteilles, la composition des vins n'a été que très peu impactée par le bouchage, il serait certainement intéressant de recommencer l'expérience, mais après un vieillissement plus long, pour comparer des vins plus évolués.

L'influence du débourbage sur la matrice chimique du vin est confirmée par l'analyse statistique de l'ensemble des échantillons et la discrimination en deux groupes, 150 NTU d'une part et 300 NTU d'autre part. Cependant, aucun lien entre la turbidité et l'état oxydatif n'a pu être mis en avant. Enfin, aucune différence significative n'a pu être démontrée par nos analyses entre les échantillons ayant été vinifiés en présence ou en absence de bentonite. L'ajout d'argile ne semble donc pas impacter la composition du vin.

3 Comparaison entre des vins perçus oxydés et non oxydés lors de dégustations par analyses non ciblées

Dans cette dernière partie nous nous sommes concentrés plus spécifiquement sur deux aspects différents, d'une part la corrélation entre deux méthodes non ciblées (FTICR-MS et EEMF) et d'autre part la comparaison entre des vins perçus oxydés et non oxydés lors de dégustations. La publication de ces résultats étant en cours d'élaboration, ceux-ci seront présentés ici sous un format classique.

Pour l'étude, les vins blancs de trois séries verticales notés comme oxydés par les vignerons et nous-même lors des dégustations qui ont suivi l'ouverture des bouteilles ont également fait l'objet d'une étude statistique rigoureuse dans le but d'isoler les masses spécifiques à ce groupe et ce indépendamment de la verticale analysée (**Figure 43**). La série verticale de Chablis n'a pas été intégrée à cette analyse statistique car elle n'a pas été dégustée. Ainsi la Figure 43A présente une OPLS-DA (données issues de FTICR-MS) discriminant les vins notés oxydés des vins non oxydés lors de la dégustation. L'axe 1 permet la séparation des deux groupes d'échantillons (oxydés / non oxydés), expliquant 20% de la répartition des masses. Le graphique illustrant les masses responsables de la séparation des vins en deux groupes (oxydés/non oxydés) (**Figure 43**B) met en évidence le rôle des masses m/z 175,06088 et 189,00409 dans la discrimination des vins oxydés, correspondant aux formules élémentaires $[C_7H_{11}O_5]^-$ et $[C_6H_5O_7]^-$ respectivement.

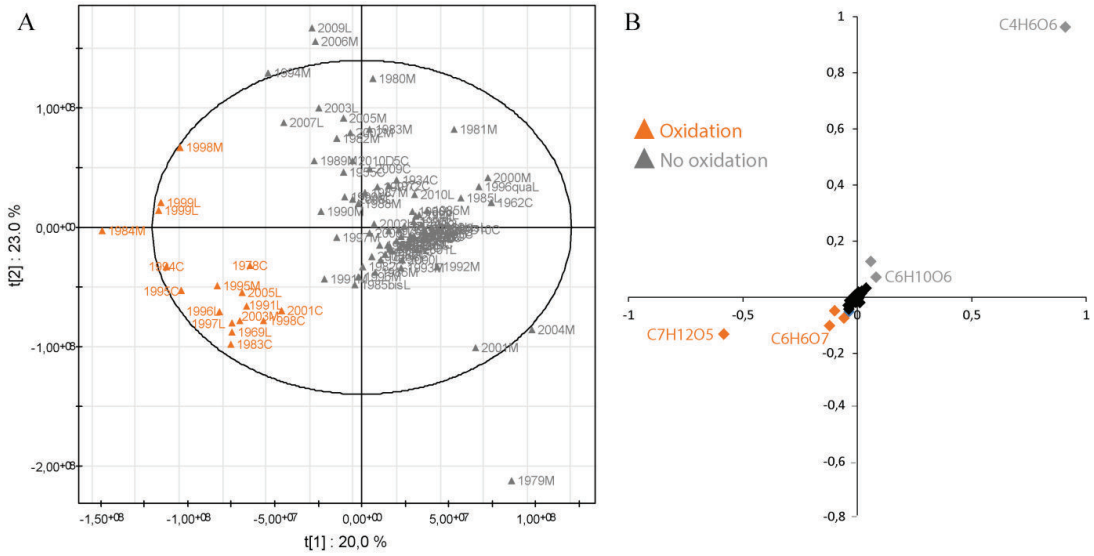


Figure 43: (A) OPLS-DA des vins notés oxydés (en orange) en opposition aux vins notés comme étant « normaux » (en gris) lors de la dégustation analysés par FTICR-MS et (B) S-Plot dérivant de l´OPLS-DA permettant de mettre en évidence les masses responsables de la séparation entre les vins oxydés/non oxydés.

Pour confirmer et compléter les résultats obtenus par FTICR-MS, tous les vins blancs étudiés dans ce travail de thèse ont été analysés par fluorescence d'excitation émission dans le but d'étudier l'impact de l'oxydation et du vieillissement de façon non ciblée sur les composés fluorescents du vin. Le but de cette analyse supplémentaire était de tester la capacité de la fluorescence à discriminer des échantillons de vin. L'utilisation de la fluorescence pour l'identification de vins oxydés ainsi que pour la détermination du niveau de vieillissement d'un vin serait primordiale. En effet, la ségrégation et la description de ces groupes de vins ont été réalisées par spectrométrie de masse, or cette technique reste onéreuse, longue et ponctuelle. La mise en relation de nos résultats de FTICR-MS avec ceux obtenus en EEMF pourrait permettre d'utiliser la fluorescence de façon globale comme technique analytique permettant la discrimination des vins et l'identification de leur état.

Les différences entre les spectres EEMF des vins ne sont pas observables visuellement (Figure 44), c'est pourquoi, la méthode statistique PARAFAC a été appliquée. À titre d'exemple les spectres EEMF de deux vins de la série de Corton Charlemagne sont présentés pour les millésimes 1934 d'une part (**Figure 44**A) et 2010 d'autre part (**Figure 44**B). Ces deux spectres sont hautement similaires et seules des différences minimes dans l'intensité de la coloration et la répartition des zones sont présentes, rendant impossible toute distinction visuelle. PARAFAC est une méthode statistique multivariée, conçue comme une ACP en trois dimensions. Cette technique permet de décomposer un ensemble de matrices en une série de composantes principales, identifiant la contribution de chaque composante par spectre. Les scores de chaque composante, peuvent ensuite être comparés entre eux permettant de détailler finement les échantillons.

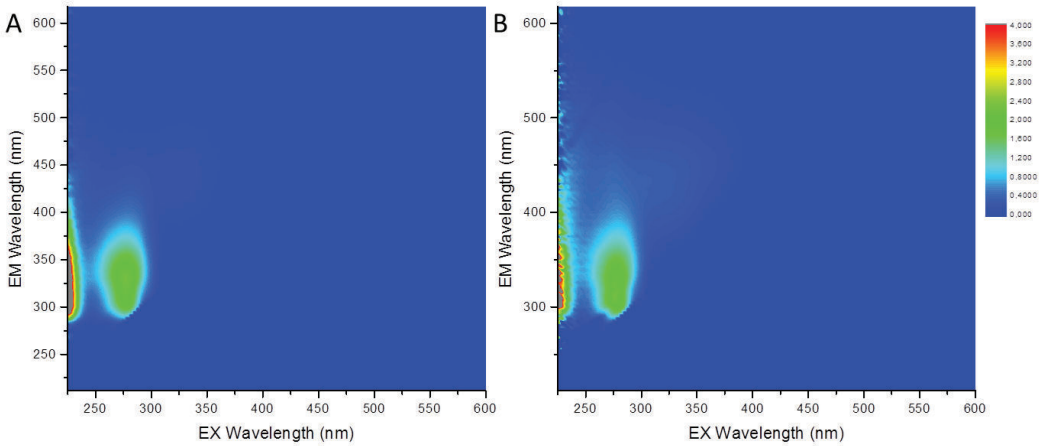


Figure 44: Spectre EEMF de deux vins d'âges très différents (A) 1934 et (B) 2010 de la série verticale de Corton Charlemagne.

L'étude de l'évolution des composantes en fonction des millésimes (**Figure 45**) ne permet pas de mettre en évidence un rapport net entre évolution des composantes et vieillissement du vin. En effet, même si les composantes C2 et C4 semblent évoluer de façon monotone, il n'existe pas de lien fort entre l'une de ces composantes et le millésime. De la même manière, les vins détectés comme étant oxydés lors de l'analyse sensorielle (ici colorés en rouge) ne semblent pas sortir du lot et ce pour chacune des composantes.

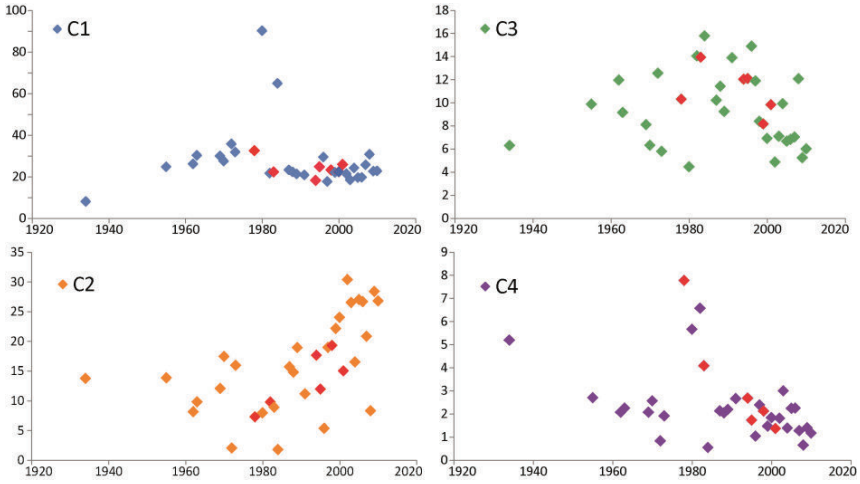


Figure 45: Évolution des composantes C1 C2 C3 et C4 en fonction des millésimes pour la série verticale de Corton Charlemagne. Code couleur : Bleu composante C1, orange composante C2, vert composante C3, violet composante C4 et rouge vins détectés comme oxydés lors de la dégustation.

Le rapport de la composante C2 sur la composante C4 a été calculé puisque ces deux composantes sont celles qui présentent le plus grand potentiel de discrimination des vins en

fonction du vieillissement (**Figure 46**). De la même façon que précédemment pour l'étude des composantes seules, aucune relation n'a été trouvée entre les vins détectés comme oxydés lors de la dégustation (représentés en rouge) et le rapport des composantes C2/C4 (en rose). L'évolution du rapport C2/C4 en fonction de l'âge montre cependant une décroissance pour les millésimes de 2010 à environ 1980 puis une croissance pour les millésimes 1985 à 1950 (**Figure 46**). Deux courbes de tendances peuvent être associées à cette évolution (A et B) avec un point de rencontre au niveau des millésimes 1983-1984. Il est particulièrement intéressant de remarquer que le rapport C2/C4 illustre un point de rupture de courbe autour des millésimes 1980-1990 comme cela avait été observé pour l'ensemble des séries verticales en FTICR-MS.

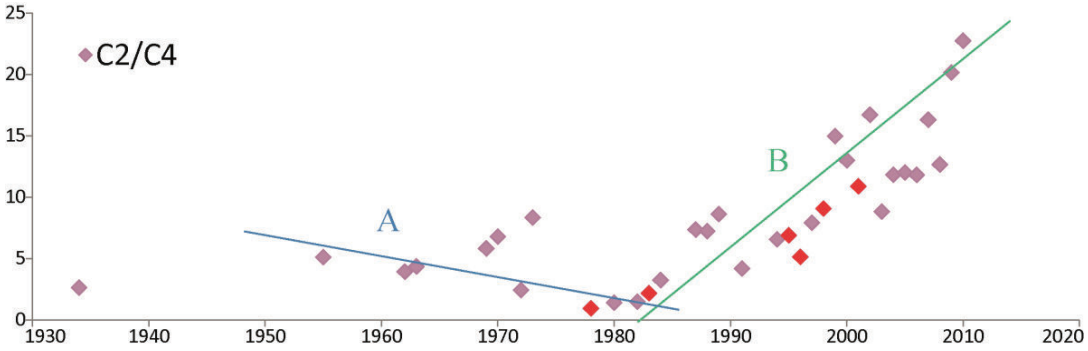


Figure 46: Évolution du rapport des composantes C2 sur C4 en fonction des millésimes pour la série verticale de Corton Charlemagne. L'évolution du rapport C2/C4 présente deux tendances avec une rupture de pente au niveau des années 1980-1990. Code couleur : rose rapport des composantes C2/C4, rouge vins détectés comme oxydés lors de la dégustation, courbe bleu première tendance du rapport C2/C4 et coure verte deuxième tendance du rapport C2/C4.

Si on combine l'évolution des composantes obtenues avec PARAFAC pour l'analyse des vins par EEMF avec les résultats de FTICR-MS, on peut extraire les masses FTICR-MS qui suivent la même évolution que le rapport C2/C4 en fonction des millésimes, mais également celles qui suivent la courbe A et B (**Figure 46**). Le diagramme de van Krevelen (**Figure 47**A) permet de visualiser les masses suivant les évolutions indiquées précédemment. Ainsi il est possible de constater qu'il y a de nombreuses masses suivant la courbe A (en vert) ou la courbe B (en bleu) mais que le nombre de masses combinant ces deux évolutions et donc suivant le rapport des composante C2/C4 (en violet) est beaucoup plus faible. D'autre part pour visualiser de façon plus claire les évolutions de masses présentées dans le diagramme de van Krevelen, trois exemples ciblés sur les trois évolutions étudiées sont présentés dans la **Figure 47**B. Ainsi la masse m/z 217,01763 suit la courbe de tendance A des

millésimes 1934 à 1984, la masse m/z 149.00919 suit la courbe de tendance B des millésimes 1980 à 2010 et enfin la masse m/z 259.02819 suit le rapport des composantes C2/C4 pour l'ensemble des millésimes étudiés de 1934 à 2010 (**Figure 47**B).

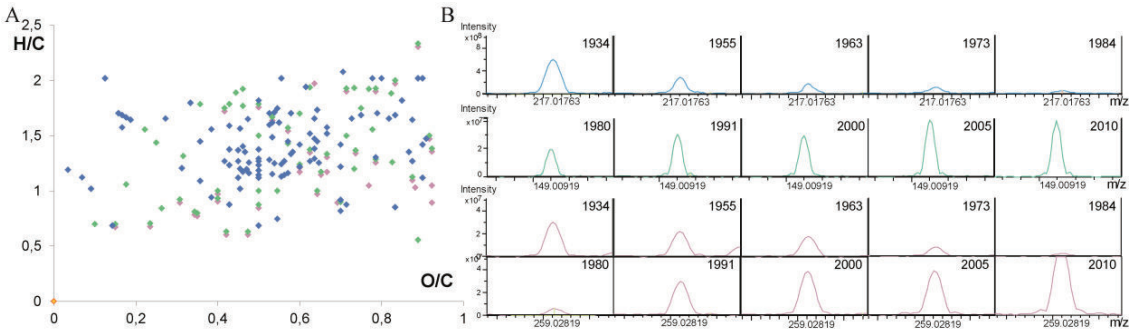


Figure 47: (A) Diagramme de van Krevelen des masses suivant l'évolution du rapport C2/C4 (violet) ainsi que celles suivant la courbe de tendance A (bleu) et la courbe de tendance B (bleu) issus des données de FTICR-MS. (B) exemple de masses de la verticale de Corton Charlemagne suivant l'évolution du rapport C2/C4 en violet (m/z 259,02819), suivant la courbe A en vert (m/z 217,01763) et suivant la courbe B en bleu (m/z149,00919).

L'EEMF ne permet pas de différencier les vins oxydés des non oxydés au sein d'une verticale. La combinaison de l'EEMF et de la FTICR-MS permet cependant d'identifier des ensembles de composés qui évoluent avec le vieillissement. Ces masses n'évoluent pas comme on pourrait s'y attendre de façon linéaire mais subissent une rupture de pente dans les années 1980-1985 provoquant une inversion de courbe. Aussi, l'EEMF ne détectant que les composés fluorescents, cette technique ne permet pas de prendre en compte l'intégralité des composés de nos vins. Cela dit, les techniques d'EEMF et PARAFAC restent des outils très utiles pour comprendre le comportement général de l'ensemble des composés fluorescents lors des modifications de la composition du vin pendant le vieillissement ou lors de changement de procédés œnologiques par exemple.

4 Conclusion générale du chapitre 3

En conclusion, ces expérimentations ciblant différents facteurs (millésime, turbidité, ajout de bentonite lors de la fermentation, niveau de protection du moût par le soufre, perméabilité et type d'obturateur) interagissent pour donner des profils uniques à chaque vin, induisant des résistances différentes à l'oxydation prématurée.

Tout d'abord, le regroupement des échantillons par millésime est une constante quelle que soit l'étude. Il semblerait que l'effet millésime, en impactant la composition métabolomique, module la sensibilité des vins.

La perméabilité de l'obturateur est le deuxième plus fort impact après le millésime, principalement pour les vins de Champagne. En effet la perméabilité des capsules impacte de façon importante la composition des vins de Champagne, avec un effet plus ou moins répétable en fonction de la perméabilité de la capsule étudiée. Pour les vins de Bourgogne, l'ensemble des types d'obturateurs étudiés impacte la composition du vin, sans cependant avoir un effet spécifique par type de bouchage (Diams®, Nomacorc® et Naturel).

Le facteur suivant dans la hiérarchie d'impact est le taux de sulfitage appliqué au pressurage, utilisé pour protéger le moût. En accord avec la littérature, l'analyse ciblée des composés phénoliques ainsi que l'analyse non ciblée (FTICR-MS et EEMF) montrent que le sulfitage des moûts a un effet protecteur sur les composés phénoliques, mais aucune différence notable n'est constatée avec la dose de SO_2 appliquée (4 ou 8 g/hL).

Enfin, la corrélation entre deux méthodes non ciblée (FTICR-MS et EEMF), pour la comparaison de vins perçus oxydés ou non lors de dégustation apporte un regard nouveau et non sélectif sur la problématique actuelle de l'oxydation. Le développement de la fluorescence pour l'étude et la détection précoce de l'oxydation des vins blancs offre d'intéressantes perspectives pour le contrôle de l'oxydation prématurée.

Chapitre 4: Application à l'étude du terroir

1 Comparaison de la diversité chimique de raisins et de vins issus de différentes appellations bourguignonnes : effet de terroir vs millésime.

Cette étude vise à évaluer la capacité de la Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions et à Transformée de Fourier (FTICR-MS) à différencier des raisins et les vins correspondants provenant de 4 vignobles distincts, gérés par un même domaine, à partir de leurs empreintes chimiques complexes. Les vins provenant de 4 Climats Bourguignons – 2 en Côte de Nuits et 2 en Côtes de Beaune, ont étés échantillonnés immédiatement après la fermentation alcoolique sur trois millésimes successifs, puis analysés par FTICR-MS. Des milliers de métabolites identifiés comme étant spécifiques à un millésime donné ou à une classe donnée (vin, pellicule de raisin ou encore pulpe de raisin) ont été révélés, soulignant ainsi un effet millésime fort. Les mêmes vins ont été analysés de nouveau après quelques années de vieillissement en bouteille dans la cave du domaine. Dans le cadre de cette étude, la FTICR-MS ainsi que des analyses statistiques multivariées pourraient révéler des familles de métabolites importantes pour la discrimination des terroirs et ce même dans le cas de terroirs présentant une très grande proximité géographique, mais seulement après quelques années de vieillissement en bouteille. Il est supposé que la composition chimique d'un vin détient en mémoire le souvenir de divers facteurs environnementaux qui ont une incidence sur son bagage métabolomique au moment de son élaboration. Pour la première fois, ces résultats préliminaires indiquent que les expérimentations non ciblées peuvent révéler cette mémoire métabolomique à travers des signatures chimiques liées au terroir du vin sur une échelle régionale qui peut potentiellement être aussi réduite que les innombrables «climats» de Bourgogne.

Cette étude a fait l'objet d'une publication scientifique, en 2014, dans le journal : Food Chemistry.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.056

A GRAPE AND WINE CHEMODIVERSITY COMPARISON OF DIFFERENT APPELLATIONS IN BURGUNDY: VINTAGE VS TERROIR EFFECTS

Chloé ROULLIER-GALL [a,b], Lemia BOUTEGRABET [a,b], Régis D. GOUGEON [a*], Philippe SCHMITT-KOPPLIN [b,c*]

[a] C. Roullier-Gall, L. Boutegrabet, R.D. Gougeon
UMR A02.102 PAM AgroSup Dijon/Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la vigne et du vin, Jules Guyot, Rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078 Dijon Cedex, France.
[b] C. Roullier-Gall, L. Boutegrabet, P. Schmitt-Kopplin
German Research Center for Environmental Health, Departement of BioGeoChemistry and Analytics, Helmholtz Zentrum München, Ingolstädter Landstr. 1, 85758 Neuherberg, Germany.
[c] P. Schmitt-Kopplin
Chair of Analytical Food Chemistry, Technical University of Munich, 80333 Freising, Germany.

*Corresponding authors. Tel.: +33380396191; Fax: +33380396265; E-mail adress: regis.gougeon@u-bourgogne.fr (Régis D. GOUGEON) / Tel.: +498931873246; Fax: +498931873358; E-mail adress: schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de (Philippe SCHMITT-KOPPLIN)

Abstract

This study aimed at assessing the ability of high resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – Mass Spectrometry (FTICR-MS) to differentiate grapes and corresponding wines from distinct vineyards managed by a same producer, according to complex chemical fingerprints. Grape extracts (at harvest) and corresponding wines from four different vineyards, sampled immediately after the alcoholic fermentation over three successive vintages, were analyzed by FTICR-MS. Thousands of metabolites that are specific to a given vintage, or a given class (wine, skin or must) could be revealed, thus emphasizing a strong vintage effect. The same wines were reanalyzed after a few years in bottle. Within the frame of this study, FTICR-MS along with multivariate statistical analyses could reveal significant terroir-discriminant families of metabolites from geographically close – though distinct – vineyards, but only after a few years of bottle ageing. It is supposed that the chemical composition of a wine holds memories of various environmental factors that have impacted its metabolic baggage at the moment of its elaboration. For the first time, such preliminary results indicate that non-targeted experiments can reveal such memories through terroir-

related metabolic signatures of wines on a regional-scale that can potentially be as small as the countless "climats" of Burgundy.

Key words : pinot noir grapes, wine, terroir, bottle ageing, FTICR-MS

1. Introduction

Wine can be described as a molecular kaleidoscope integrating signatures from grapes, yeasts, the winemaking and the environment, reflected in the variety of compounds, including primary (e.g., sugars, organic acids, amino acids) and secondary metabolites (e.g., flavonoids, anthocyanins, and other pigments). All of these compounds have a strong influence on the overall properties – including organoleptic – of wines (Cuadros-Inostroza et al., 2010). Thus, several metabolic changes already occur during the growth of grape berries and at harvest time because berries contain the major compounds contributing to flavour (Lund & Bohlmann, 2006). During winemaking processes and particularly during fermentation, these compounds will either disappear, directly be transferred to wine or react to form new molecules, and yeasts driven metabolisms will further contribute to its enrichment through, for instance, the enzymatic liberation of volatile organic molecules responsible for the aroma of wine. Thanks to available state of the analytical technologies, thousands of metabolites – some of them in exceedingly small quantities – can be spotted in wine, which are not only a consequence of gene and enzyme regulation of metabolic pathways in grapes but also a consequence of microbiological processes, climatic conditions, viticultural and oenological practices (Gougeon et al., 2009).

The composition of a given wine is actually determined by a complex interplay between environmental factors, genetic factors (grape varieties) and viticultural practices (Atanassov, Hvarleva, Rusanov, Tsvetkov, & Atanassov, 2009). The effect of climate in viticulture is largely documented (Gladstones, 1992; Winkler, Cook, Kliewer, & Lider, 1974), and according to Pereira (Giuliano E. Pereira et al., 2006) and Morlat (R. Morlat, Barbeau, & Asselin, 2001), climatic conditions of the vintage greatly impact the grape composition. Nevertheless, wine quality is not fully described by the simple summation of individual chemical traits (Deloire, Zebic, Bernard, Brenon, & Hunter, 2005; G. E. Pereira, Soares, Guerra, & Pereira, 2007), as illustrated by the "terroir" effect. Historically, terroir refers to an usually rather small area whose soil and microclimate impart distinctive qualities to food products (Barham, 2003) and it is now accepted that metabolites in wine could be affected by the terroir (Brescia et al., 2002; Leeuwen et al., 2004; G. E. Pereira et al., 2007).

Cultural, historical and empirical bases, which have allowed men to identify vineyards now give rise to growing interests from the scientific community. Most of analytical studies so far have obviously tackled the question of "terroir" from the viticultural point of view, considering the impact of environmental factors (soils composition, climatic changes, vine phenology) on the quality of the grape or the wine (Leeuwen et al., 2004; René Morlat & Bodin, 2006). However, in the climate-soil-ecosystem it is difficult, when studying soil alone, to determine its influence on the constitution and the quality of grape and wine (Seguin, 1986).

Terroir is the greatest determining factor of all great wines. It deals with the quality and the typicality of an agricultural product in relation to its geographical origin, and it wears a major importance in Burgundy, where wines are made with single grape varieties (Pinot noir for red wines and Chardonnay for white wines) planted in a mosaic of vineyards. Burgundy vineyards are indeed characterized by chaotic orientations and variables lopes, where soils can exhibit abruptly changing natures beyond a road or a path. This terroir description is definitely brought to its apex in the Côte d'Or area, where – in addition to alternating reliefs and climatic conditions - vineyards sit on up to 11 different soil natures covering geological times ranging from -175 My (Côte de Nuits) to – 150 My (Côte de Beaune) within a 50 km distance (Fanet & Brutton, 2004). Each vineyard site has its own unique terroir, which is reflected in the corresponding wines more or less consistently from year to year, and to some degree, regardless of variations in methods of viticulture and winemaking (Mouton, 2006; Wilson, 1998).

In this paper, we have recorded instantaneous chemical pictures of Pinot noir grape extracts and corresponding wines from four different appellations run by the same producer, over three successive vintages, using Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FTICR-MS) for metabolite profiling, combined with metabolomics data analyses. FTICR-MS is a fast and reliable analytical tool especially applicable to the analysis of series of samples and it is indicated for the qualitative distinction between samples in combination with multivariate statistical (Sawaya et al., 2011 and Villagra et al., 2012). Therefore, and for a given vintage and a given appellation, terroir was treated as the composite of all possible environmental factors, which could influence the overall characteristics of vineyard-related grapes and subsequent wines (Deloire et al., 2005).

2. Materials and methods

2.1. Wine samples and preparation (wines, must and skin extracts)

This work was carried on four distinct vineyards managed by the same domain in Burgundy. Two of them are located in the “Côte de Nuits” and the two others in the “Côte de Beaune", thereafter referred to as CN1 and CN2, and CB1 and CB2, respectively. 100 Pinot noir berries were collected during the harvest of three successive vintages (2007, 2008 and 2009). Musts (2009 CB1 and CB2 are missing), and skins were separated upon the pressing of berries in a laboratory-scale press, and skins were subsequently dried on filter papers. Skin extracts (SEs) were obtained by crushing (Ultra Turrax, IKA, Wilmington) skins (two times for 10 min) in pure methanol (LC-MS grade). Mixtures were then centrifuged (10 min, 25400 g). 20 µl of supernatant were diluted in 1 ml of methanol prior to injection. Centrifuged samples of musts were acidified by HCl (hydrochloric acid) to pH 2. Musts were then extracted using C18-SPE cartridges (100 mg.ml-1 Backerbond SPE columns). The cartridges were rinsed with 1 ml methanol, followed by 1 ml acidified ultra-pure water (1.25% formic acid) for conditioning, and must samples were passed through each cartridge by gravity. Musts extracts (MEs) were eluded with 500 µl of methanol and stored in vials at -20°C. The corresponding wines (Ws) were collected immediately after the alcoholic fermentation in the producer cellar and subsequently analysed. The same wines from 2007, 2008 and 2009 vintages were re-analysed in 2013 after 5, 4 and 3 years of bottling, respectively.

2.2. FTICR-MS analyses

High-resolution mass spectra were acquired on a Bruker (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) solariX Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass Spectrometer (FTICR-MS) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet (Magnex Scientific Inc., Yarnton, GB) and a APOLO II ESI source (Brucker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) in the negative ionisation mode. 20 µl of each methanol extract or wine were diluted in 1 ml of methanol (P. Schmitt-Kopplin et al., 2012) prior to direct injection into the microeletrospay source at a flow rate of 120 µL.h-1. Spectra were externally calibrated by using clusters of arginine (10 mg.L-1 in methanol), and the accuracy reached values of less than 0.1 ppm in day-to-day measurements (Gougeon et al., 2009). Further internal calibrations were performed for each sample through the identification of ubiquitous fatty acids. Spectra were acquired with a time domain of 4 mega-word and a mass range of m/z 100 to 1000. 500 scans

were accumulated for each sample. Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) spectra with m/z from 150 to 1000 were exported to peak lists at a signal-to-noise ratio (S/N) of 2 and higher (Philippe Schmitt-Kopplin et al., 2010). After calibration, mass spectra can be annotated with unambiguous elemental formulas due to the ultra high resolution (R= 400.000 at m/z 400, thus differentiating two masses separated by the mass of an electron) and to the mass accuracy of 0.1 ppm (electron mass accuracy). Thousands of such compositions could be calculated, which contained C, H, O, N and S elements. They were represented using two-dimensional van Krevelen diagrams, which sort them onto two axes according for instance to H/C and O/C atomic ratios (Hertkorn et al., 2007; Tziotis, N, & P, 2010).

2.3. Statistical analyses

Row data (mass spectra) were normalized, and then transformed to log(X+0.00001) to reduce variation between samples.

Hierarchical Clustering was performed by the unsupervised Hierarchical clustering analysis (HCA) method on the normalized data. Euclidian distances and average linkages were used to build the head map. This method allows showing similarities or differences between samples, without preliminary hypotheses.

Unsupervised multivariate statistical analysis was applied: Principal Component Analysis (PCA) reduces the complexity of multivariate data and displays the information in fewer dimensions, with principal components as the new variables. This method – like Hierarchical clustering – allows showing similarities or differences between samples, without preliminary hypotheses. PCA were performed with the SIMCA 9 software (http://www.umetrics.com). A 95% cut-off of the explained variance was used to select the optimum number of principal components. Partial least square discriminative analysis (PLS-DA) models were used to extract the most discriminative metabolites, which were further manually checked within the spectra. Discriminative masses with a variable importance in projection (VIP) value >2 and p values <0.05 were considered as relevant. PLS-DA were performed with the SIMCA 9 software (http://www.umetrics.com).

Two dimensional van Krevelen diagrams were obtained using compositional networks (based on elemental compositions) and functional networks, which are based on selected functional group equivalents that enable improved assignment options of elemental compositions and a better classification of organic complexities with tuneable validation windows (Tziotis et al., 2010).

3. Results and discussion

Chemical spaces of wines can be as diverse as there are steps involved in their elaborations, and even within each of these steps, chemical spaces will be subjected to various environmental influences. We can characterize such chemical spaces by the number of elemental formulas that can be identified in the mass spectrum acquired under selected experimental electrospray conditions (Gougeon et al., 2009). As an example, Figure 1 shows how complex such chemical spaces can be, with the spectrum (Fig.1A-C) and a two-dimensional van Krevelen diagram of a 2007 ME from CB1 (Fig.1D). Such diagram enables a structural representation of masses converted to elemental compositions, which correspond to a plot of H/C versus O/C atomic ratios. Identified elemental compositions can thus be sorted according to chemical families, which provide a visual qualitative description of chemical spaces, which may transiently contribute to the chemical matrix of a wine. Up to 7016 signals (S/N=2) of the spectrum (Fig.1A-B), of which 4794 (with 500 ppb tolerances), could be assigned to elemental formulae containing C, H, O, N and S (Fig.1C). Only a few hundreds of these formulas actually correspond to known masses of metabolites present in grape and wine. Here for instance, 2700 CHO elemental compositions (Fig.1E) could be identified (an overall of more than 5000 compositions including CHOS, CHON and CHONS chemical spaces), which could be associated with fatty acids, amino acids, sugars, phenolic compounds, or organic acids (Gougeon et al., 2009). Bearing in mind that distinct isomers can exist for a given elemental formula, figure 1 can be considered as an instantaneous picture of probably more than 25 000 compounds present at various concentrations in this 2007 ME. The considerable variance of these FTICR mass spectra denotes the diversity of chemical spaces of wine, that can already be observed in a must extract spectrum (Fig.1A-B),and in the mass distribution within the 200 millimass range of a single nominal mass (Fig.1C). 10 theoretically possible elemental combinations appear in this 227 nominal mass when considering only the compositions based on C, H, N, O and S (CHO, CHOS, CHON, CHONS chemical spaces in Fig.1E). The peak at m/z 227.0713, corresponds to the [M-H]- ion with absolute mass formula [C14H11O3]- and can most likely be assigned to resveratrol isomers (Gougeon et al., 2009). Beyond the basic sorting of elemental formulas according to H/C versus O/C ratios, the van Krevelen diagram (Fig.1D) provides a semi-quantitative overview of chemical formulas contributing to this ME chemical space: if we consider for instance CHO formulas, the diagram shows that relatively abundant compounds were found in the amino acids and phenolic regions, with also a few ones in the carbohydrate region,

consistently with a must composition. It must be noted though that carbohydrates are not easily ionized in ESI conditions (Boutegrabet et al., 2012).

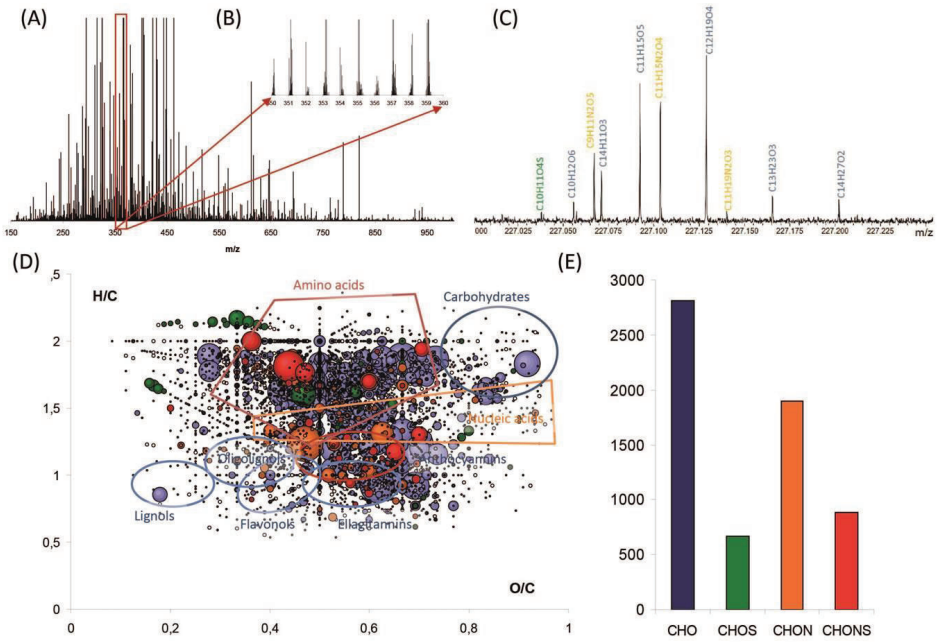


Fig.1. Progressive detailed visualization of the ESI(-) FTICR/MS spectrum of the 2007 CB1must extract in the mass ranges (A) 150-1000Da, (B) 250-260 and (C) 227.00-227.23 with credible elemental formula assignment. Visualisation of the FTICR/MS data (D) as a van Krevelen diagram (H/C vs. O/C atomic ratios) with the interpretation of molecular family, and (E) through the relative frequency histograms of CHO (blue), CHOS (green), CHON (yellow) and CHONS (red) elemental compositions. Point sizes indicate mass peak intensities in the van Krevelen diagram.

Using statistical approaches and considering all of these thousands of CHONS compositions together for a given vintage allows to represent how such complex chemical spaces actually reflect distinct vineyard fingerprints, though still exhibiting proximities within grape extracts and wines. Figure 2A shows the PCA score plot extracted from FTICR mass spectra of must and skin extracts along with corresponding wines for the four vineyards and for the 2008 vintage. It must be noted that the first two components accounted for 72.4 % of the total variability, thus ensuring a significant discrimination and confirming the suitability of ESI-MS characterizations (Catharino et al., 2006). As far as grapes were concerned, chemical spaces from the four vineyards appeared to be closer in composition to one another within a grape compartment (skin or must) than they were to chemical spaces of another compartment (Fig.2A). Wines appeared to be clearly separated from grape extracts along the first axis, whereas must and skin extracts were separated along the second axis. The

loading plot (Fig.2B) shows that variables were mainly grouped in three regions of hundreds of masses directly correlated with each class (MEs, SEs, Ws). Projecting data (masses as filtered from the PCA and representative for the classification of these three matrices) on van Krevelen diagrams (Fig.2C-D-E) revealed the specific distributions of elemental compositions (CHO in blue, CHOS in green, CHON in orange and CHONS in red) that discriminate the three groups (MEs, SEs and Ws). This specificity is characterized in particular by the presence of sulfur compounds (CHOS) especially in the aromatic area for wine along with carbohydrates (CHO) compounds (Fig.2D). Interestingly, Figure 2D and 2E also confirm that when considering CHO elemental formulas, chemical fingerprints of wines were closer to those of skin extracts than to those of must extracts (Gougeon et al., 2011).

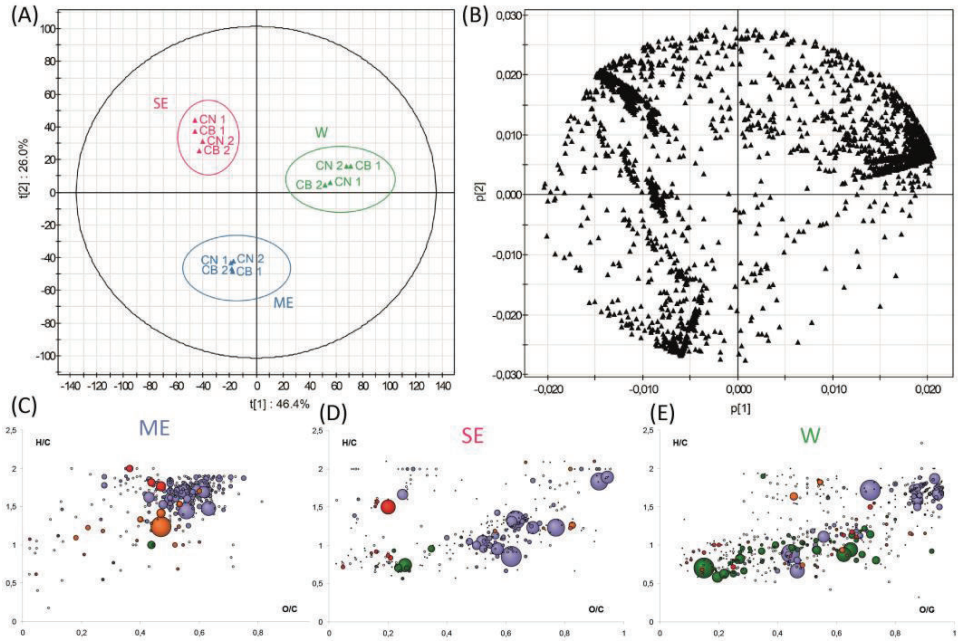


Fig.2. (A) scores plot and (B) loading plot of the PCA analysis of the FTICR-MS data for CB and CN Wines (green), Skin (pink) andMust (blue) extracts of the 2008 vintage.The first two components retained 72.4% of the variation. (C) van Krevelen diagrams of specific masses to all CB and CN must extracts, (D) all CB and CN skin extracts and (E) all CB and CN wines from the 2008 vintage (color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange). Point sizes indicate mass peak intensities.

Possible structural assignments for masses that discriminate must and skin extracts, and wines could be obtained from the literature and relevant databases or interfaces such as SciFinder Scholar or MassTRIX (Wägele, Witting, Schmitt-Kopplin, & Suhre, 2012). However, almost 95% of the discriminant masses could not be annotated, thus illustrating the

yet unknown chemical complexity of grape and wine metabolic compositions. Typical molecular signatures on the basis of pertinent annotations (Table 1) were aliphatic oxygenated structures for MEs, polyphenolic structures for SEs and residual sugars along with polyphenols for Ws.

Table 1: Examples of unique masses specific to SEs, MEs and Ws and putative annotations.

masses from skin		
Exact mass	Formulae	Annotations
455.353064	C30H48O3	Oleanolic acid
433.2360429	C21H39O7P	Phosphatidic acid
343.045805	C17H12O8	3,4,3'-Tri-O-methylellagic acid
199.00132	C4H9O7P	D-Erythrose 4-phosphate
179.0561165	C6H12O6	D-Glucose
405.1191286	C20H22O9	Astringin
447.0932873	C21H20O11	Quercitrin
463.0882094	C21H20O12	Quercetin 3-O-glucoside
masses from wine		
Exact mass	Formulae	Annotations
300.9989943	C14H6O8	Ellagic acid
179.0349969	C9H8O4	Caffeic acid
161.0455756	C6H10O5	3-Ethylmalate
153.0193743	C7H6O4	Gentisic acid
167.0349925	C8H8O4	Vanillic acid
177.019346	C9H6O4	Caffeoquinone
181.0717731	C6H14O6	Mannitol
285.0404564	C15H10O6	Kaempferol
masses from must		
Exact mass	Formulae	Annotations
173.081942	C8H14O4	Suberic acid
203.0826083	C11H12N2O2	L-Tryptophan
273.170732	C14H26O5	(11-Hydroxyundecyl)malonic acid
299.2591775	C18H36O3	2-hydroxy stearic acid
311.1136213	C15H20O7	4-Hydroxycinnamyl alcohol 4-D-glucoside
336.108818	C16H19NO7	Indole-3-acetyl-myo-inositol
341.1241571	C16H22O8	Coniferin
425.1817225	C21H30O9	Abscisic acid glucose ester

Annotated examples specific for wines, are given by exact masses at m/z 153.01937; 285.04045 and 300.99899, which could be unambiguously associated with $[C_7H_5O_4]^-$, $[C_{15}H_{15}O_6]^-$ and $[C_{14}H_5O_8]^-$ absolute mass formulas, respectively. Likely structural hypotheses could be gentisic acid (del Alamo Sanza, Nevares Domínguez, Cárcel Cárcel, & Navas Gracia, 2004), Kaempferol (Fang, Li, Pan, & Huang, 2007) and Ellagic acid (Talcott & Lee, 2002), respectively, which are known compounds in wine. Similarly, masses at m/z 179.05611 and 173.08194 with absolute mass formula $[C_6H_{11}O_6]^-$ possibly assigned to D-glucose (Berthels, Cordero Otero, Bauer, Thevelein, & Pretorius, 2004) or one of its isomers, and $[C_8H_{13}O_4]^-$ possibly assigned to suberic acid (Schreier, Drawert, & Junker, 1976), were specific for SEs and MEs, respectively.

van Leeuwen (Leeuwen et al., 2004) showed that climatic conditions of the vintage, soil types and cultivars can actually influence the berry composition and the corresponding wines, but Pereira (Giuliano E. Pereira et al., 2006) demonstrated that the vintage has a higher impact on the metabolic pattern of grape berries. Our results agree with such conclusions. Figure 3 shows the PCA score plot extracted from FTICR-MS mass spectra of all the wines from the three vintages (2007, 2008 and 2009), where it can be seen that wines could be rather well separated according to vintages but not according to the terroir. Interestingly, there was a better discrimination between the 2007 vintage and the two others along the second axis, whereas the separation between the 2008 and 2009 vintages along the first axis was less straight forward. However, the 2008 vintage exhibited the narrowest scores distribution (Fig.3).

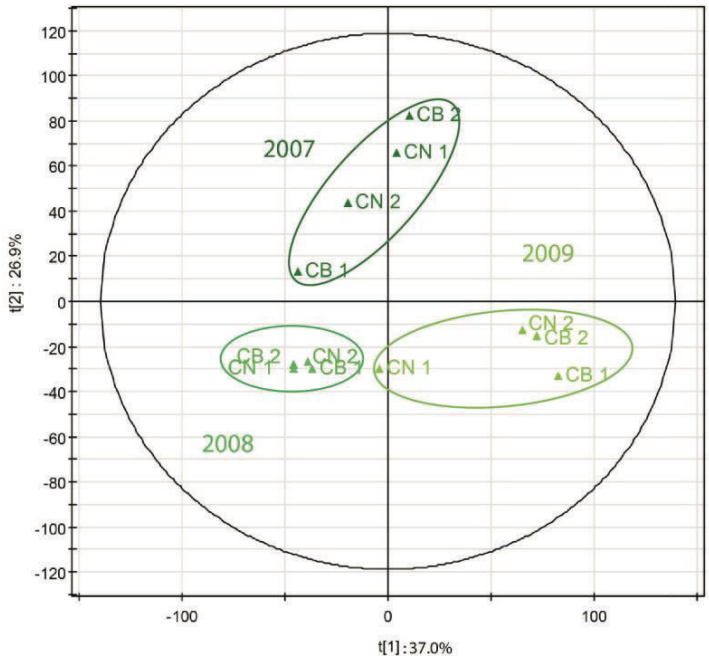


Fig.3. PCA Scores plot extracted from the FTICR-MS data of all of the CN and CB wines ; the first two components retained 63.9% of the variation.

Hundreds of elemental formulas actually allowed the discrimination of the three matrices, regardless of the vintage. Within each matrix subset, a vintage classification is more clearly achieved with the HCA, hierarchical cluster analysis, shown in Figure 4, where not only were the three matrices better separated, but where a more distinct differentiation between vintages within each matrix could be seen. Interestingly, skin extracts showed the highest vintage differentiation compared to must extracts and wines. However, such HCA

failed to consistently discriminate vineyards within each CB and CN areas, and for some vintages, a CB vineyard could be closer to a CN vineyard as shown for the 2007 wines, whereas a consistency could be observed in some cases, as shown for 2008 must extracts (Fig.4).

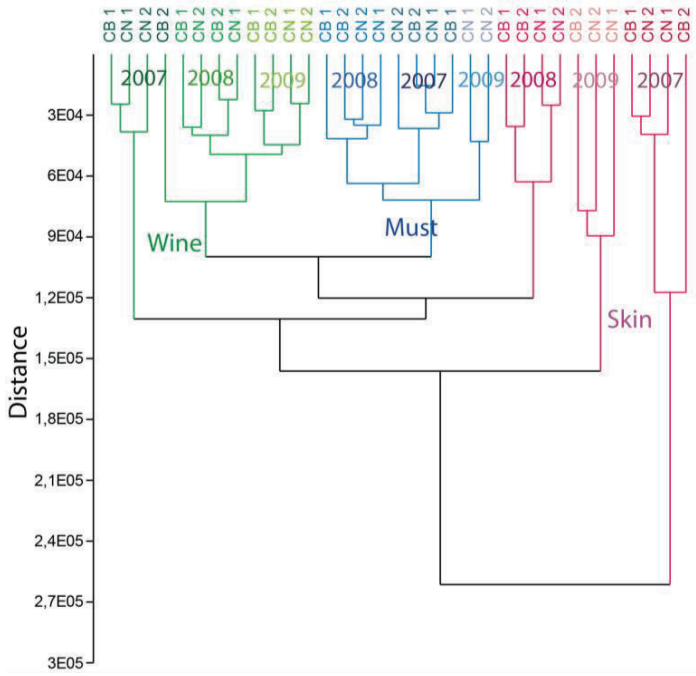


Fig.4. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of combined analysis of FTICR-MS data for Ws (green), SEs (pink) and MEs (blue) from the Côte de Beaune (CB) and the Côte de Nuits (CN) vineyards from the three vintages.

In order to assess the impact of the ageing in bottle on a possible vineyard-related chemical complexity, the same CB and CN wines were re-analyzed after 5, 4 and 3 years of bottling for the 2007, 2008 and 2009 vintages, respectively. FTICR-Mass spectra of these wines were thus acquired within the same experimental run. Most interestingly, PLS-DA treatments of the complex chemical patterns of bottle-aged wines could readily discriminate vintages regardless of vineyards, although they appeared partly separated within each vintage (Fig.5A) and vineyards regardless of vintages, although the latter also appeared partly discriminated within each vineyard (Fig.5B). For the latter discrimination, wines from the Côte de Beaune (CB) could be separated from wines from the Côte de Nuits (CN) along the first component, whereas the second component appeared to discriminate vintages within each geographical area, although to a lesser extent for CN wines from the 2007 vintage (Fig.5B). This fundamental result highlights the fact that the terroir as a whole – i.e. that

considers the vine-soil-climate-human ecosystem – definitely impacts the initial chemical complexity of a wine, but time – i.e. bottle ageing – might be required to fully reveal it through the in-bottle diagenesis of complex chemical signatures. Projecting the masses as filtered from the PLS-DA analysis (Fig.5B) on van Krevelen diagrams, reveals specific chemical fingerprints for CB and CN wines (Fig.5C-D). Up to 621 elemental compositions containing C, H, O, N and S actually discriminate CB wines regardless of vintages (Fig.5D), whereas only 185 compositions are discriminant for CN wines (Fig.5C). Interestingly, CB wines appear to be specifically richer in more diverse CHO- and CHON-containing compounds, located in particular in the area of amino acids and sugar-containing compounds (Fig.5D). Another interesting feature arising from these diagrams is that both CN and CB wines are discriminated by roughly the same number of CHONS compositions, but which are related to completely different hypothetical structures, since CN wines would be discriminated by amino acid-like compounds whereas CB wines would be discriminated by nucleic acid-like structures (Fig.5C-D). Altogether, these discriminations clearly indicate that various and distinct chemical reaction pathways can actually exist in bottles, which provide after a few years of ageing an instantaneous picture of the chemical complexity associated with a specific terroir that could potentially be as small as the countless "climats" of Burgundy.

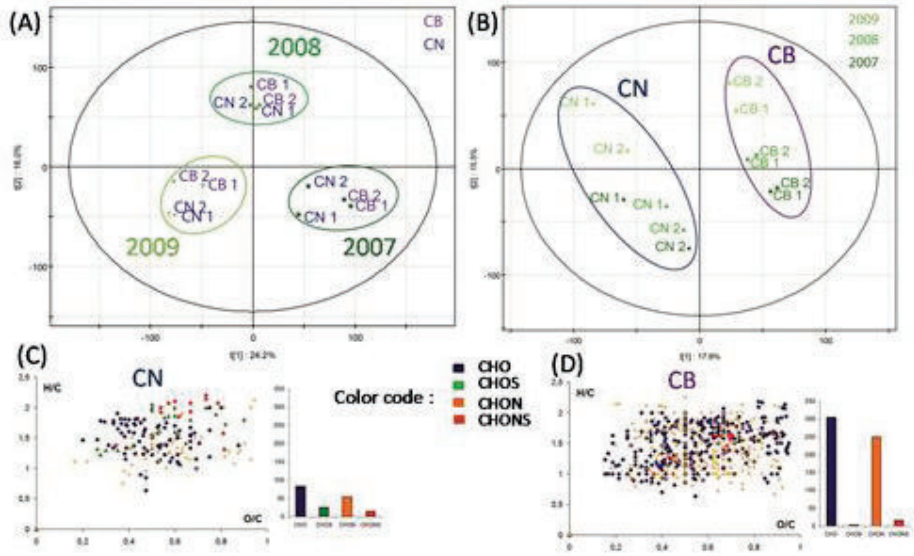


Fig.5. Combined analysis of FTICR-MS data for wines from the Côte de Beaune (CB) and the Côte de Nuits (CN) vineyards re-analyzed after 5, 4 and 3 years of bottling for the 2007, 2008 and 2009 vintages, respectively. (A) Scores plot of the PLS-DA depending on the vintage, the first two components retained 40.2% of the variation. (B) Scores plot of the PLS-DA depending on the terroir, the first two components retained 33.4% of the variation. Color code : CB, purple ; CN, blue; 2007,

darker green; 2008, middle green; 2009 pale green. H/C versus O/C van Krevelen diagram and related histograms of specific masses from (C) CN and (D) CB wines, respectively. Color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange.

4. Conclusion

In this study and for the first time, non-targeted analyses of grape extracts and corresponding wines from a same producer were implemented in order to assess terroir/vintages discriminations among four distinct vineyards selected within a 30-km long distance along the Côte de Beaune and the Côte de Nuits in Burgundy, France. Our results showed that FTICR-MS spectra of grape extracts and wines could actually be used to compare the importance of terroir and vintage effects on wine and grape chemodiversities. When analyzed immediately after harvest (for the grapes) or after the alcoholic fermentation (for the corresponding wines), the vintage effect is the most significant discriminant within each class (wines, skin extracts or must extracts) taken separately or together. No significant terroir discrimination could be observed for these classes, thus suggesting either that successive measurements made each year can lead to excessive distinction between similar samples from a given vineyard (analytical variability), or that the initial chemical complexity of a wine is not discriminant enough. In contrast, the single-run analysis of the same wines after bottle ageing clearly allows a perfect separation between closely related vineyards from the Côte de Beaune and the Côte de Nuits, thus emphasizing a crucial role of the ageing time during which molecular diageneses occur in bottles. In the particular case of bottled Pinot noir wines from Burgundy, our non-targeted instantaneous analyses were thus able to reveal possible intrinsic terroir-related chemical fingerprints, i.e. according to the RESOLUTION OIV/VITI 333/2010, fingerprints related to an area in which collective knowledge of the interactions between the identifiable physical and biological environment and applied vitivinicultural practices develops, providing distinctive characteristics for the products originating from this area. As such, terroir is not just the sum of discrete processing steps, and this is all the more true in Burgundy. Our approach consistently showed that a way to integrate all of these interactions is to be able to embrace the highest instantaneous chemical complexity. To conclude, these analytical results reveal that the chemodiversity of a wine is initially influenced by environmental parameters, and FTICR-MS now allows to obtain the highest visualisation of such chemodiversities. However, differences due to the volatility, the polarity, the solubility and chromatographic behaviors mean that multiple methods are

needed to comprehensively analyze different subsets of wine metabolites. In this context FTICR-MS could be complemented in the future by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS) and high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).

Acknowledgements

We warmly thank the Maison Louis Jadot (Beaune, France) for providing grape and wine samples, and Jacques Lardière for helpful and enthusiastic discussions. This work was financially supported by the Région Bourgogne, the Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) and the Comité Interprofessionnel des Vin de Champagne (CIVC).

References

Atanassov, I., Hvarleva, T., Rusanov, K., Tsvetkov, I., & Atanassov, A. (2009). Wine Metabolite Profiling: Possible Application in Winemaking and Grapevine Breading in Bulgaria. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23(4), 1449‑1452.

Barham, E. (2003). Translating terroir: the global challenge of French AOC labeling. Journal of Rural Studies, 19(1), 127‑138.

Berthels, N. j., Cordero Otero, R. r., Bauer, F. f., Thevelein, J. m., & Pretorius, I. s. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains. FEMS Yeast Research, 4(7), 683–689.

Boutegrabet, L., Kanawati, B., Gebefügi, I., Peyron, D., Cayot, P., Gougeon, R. D., & Schmitt-Kopplin, P. (2012). Attachment of Chloride Anion to Sugars: Mechanistic Investigation and Discovery of a New Dopant for Efficient Sugar Ionization/Detection in Mass Spectrometers. Chemistry – A European Journal, 18(41), 13059–13067.

Brescia, M. ., Caldarola, V., De Giglio, A., Benedetti, D., Fanizzi, F. ., & Sacco, A. (2002). Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. Analytica Chimica Acta, 458(1), 177‑186.

Catharino, R. R., Cunha, I. B. S., Fogaça, A. O., Facco, E. M. P., Godoy, H. T., Daudt, C. E., … Sawaya, A. C. H. F. (2006). Characterization of must and wine of six

varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 41(2), 185–190.

Cuadros-Inostroza, A., Giavalisco, P., Hummel, J., Eckardt, A., Willmitzer, L., & Peña-Cortés, H. (2010). Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. Analytical Chemistry, 82(9), 3573‑3580.

Del Alamo Sanza, M., Nevares Domínguez, I., Cárcel Cárcel, L. ., & Navas Gracia, L. (2004). Analysis for low molecular weight phenolic compounds in a red wine aged in oak chips. Analytica Chimica Acta, 513(1), 229‑237.

Deloire, A., Zebic, O., Bernard, N., Brenon, E., & Hunter, J. (2005). Influence de l'etat hydrique de la vigne sur le style de vin. Revue Française d'Œnologie, 215, 11.

Fanet, J., & Brutton, F. (2004). Great Wine Terroirs. University of California Press.

Fang, F., Li, J.-M., Pan, Q.-H., & Huang, W.-D. (2007). Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. Food Chemistry, 101(1), 428‑433.

Gladstones, J. (1992). Viticulture and environment., x + 310 pp.

Gougeon, R. D., Lucio, M., Boutegrabet, L., Peyron, D., Feuillat, F., Chassagne, D., Schmitt-Kopplin, P. (2011). Authentication Approach of the Chemodiversity of Grape and Wine by FTICR-MS. In S. E. Ebeler, G. R. Takeoka, & P. Winterhalter (Éd.), Progress in Authentication of Food and Wine (Vol. 1081, p. 69‑88). Washington, DC: American Chemical Society.

Gougeon, R. D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Schmitt-Kopplin, P. (2009). The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(23), 9174‑9179.

Hertkorn, N., Ruecker, C., Meringer, M., Gugisch, R., Frommberger, M., Perdue, E. M., Schmitt-Kopplin, P. (2007). High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389(5), 1311‑1327.

Leeuwen, C. van, Friant, P., Choné, X., Tregoat, O., Koundouras, S., & Dubourdieu, D. (2004). Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. American Journal of Enology and Viticulture, 55(3), 207‑217.

Lund, S. T., & Bohlmann, J. (2006). The Molecular Basis for Wine Grape Quality-A Volatile Subject. Science, 311(5762), 804‑805.

Morlat, R., Barbeau, G., & Asselin, C. (2001). Facteurs naturels et humains des terroirs viticoles fran\ccais: méthode d'étude et de valorisation. Etudes et Recherches sur les Systèmes Agraires et le Développement, 32, 111–127.

Morlat, René, & Bodin, F. (2006). Characterization of Viticultural Terroirs using a Simple Field Model Based on Soil Depth – II. Validation of the Grape Yield and Berry Quality in the Anjou Vineyard (France). Plant and Soil, 281(1-2), 55‑69.

Mouton, G. D. (2006). TERROIR– THE FOOTPRINT OF GREAT WINES. Cape Wine Master Diploma.

Pereira, G. E., Soares, J. M., Guerra, C. C., & Pereira, M. M. (2007). Caractérisation de vins rouges tropicaux produits au Nord-Est du Brésil. In Proceedings of the 59th German Viticulture Congress Wine in Motion. Stuttgart, Alemanha.

Pereira, Giuliano E., Gaudillere, J.-P., Leeuwen, C. van, Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., … Rolin, D. (2006). 1H NMR metabolite fingerprints of grape berry: Comparison of vintage and soil effects in Bordeaux grapevine growing areas. Analytica Chimica Acta, 563(1–2), 346‑352.

Sawaya, A. C. H. F., Catharino, R. R., Facco, E. M. P., Fogaça, A., Godoy, H. T., Daudt, C. E., & Eberlin, M. N. (2011). Monitoring of wine aging process by electrospray ionization mass spectrometry. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 31(3), 730‑734.

Schmitt-Kopplin, P., Liger-Belair, G., Koch, B. P., Flerus, R., Kattner, G., Harir, M., Herkorn, N. (2012). Dissolved organic matter in sea spray: a transfer study from marine surface water to aerosols. Biogeosciences.

Schmitt-Kopplin, Philippe, Gabelica, Z., Gougeon, R. D., Fekete, A., Kanawati, B., Harir, M., … Hertkorn, N. (2010). High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(7), 2763‑2768.

Schreier, P., Drawert, F., & Junker, A. (1976). Identification of volatile constituents from grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24(2), 331‑336.

Seguin, G. (1986). 'Terroirs' and pedology of wine growing. Experientia, 42(8), 861‑873.

Talcott, S. T., & Lee, J.-H. (2002). Ellagic Acid and Flavonoid Antioxidant Content of Muscadine Wine and Juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(11), 3186‑3192.

Tziotis, D., N, H., & P, S.-K. (2010). Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. European journal of mass spectrometry (Chichester, England), 17(4), 415‑421.

Villagra, E., Santos, L. S., Vaz, B. G., Eberlin, M. N., & Felipe Laurie, V. (2012). Varietal discrimination of Chilean wines by direct injection mass spectrometry analysis combined with multivariate statistics. Food Chemistry, 131(2), 692‑697.

Wägele, B., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., & Suhre, K. (2012). MassTRIX Reloaded: Combined Analysis and Visualization of Transcriptome and Metabolome Data. PLoS ONE, 7(7).

Wilson, J. E. (1998). Terroir /; [by James E. Wilson ; foreword by Hugh Johnson].

Winkler, A. J., Cook, J. A., Kliewer, W. M., & Lider, L. A. (1974). Climate and soils. General Viticulture. University of California Press, Berkeley, 58–75.

Supplemental information:

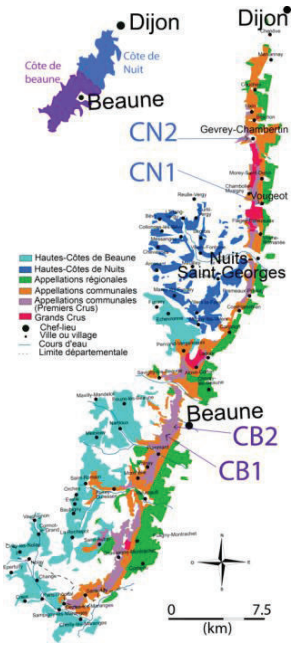


Figure 48: Map of the Côte de Beaune and Côte de Nuit, from Burgundy appellations. Annotation of the vineyards locations where analyzed wines come from.

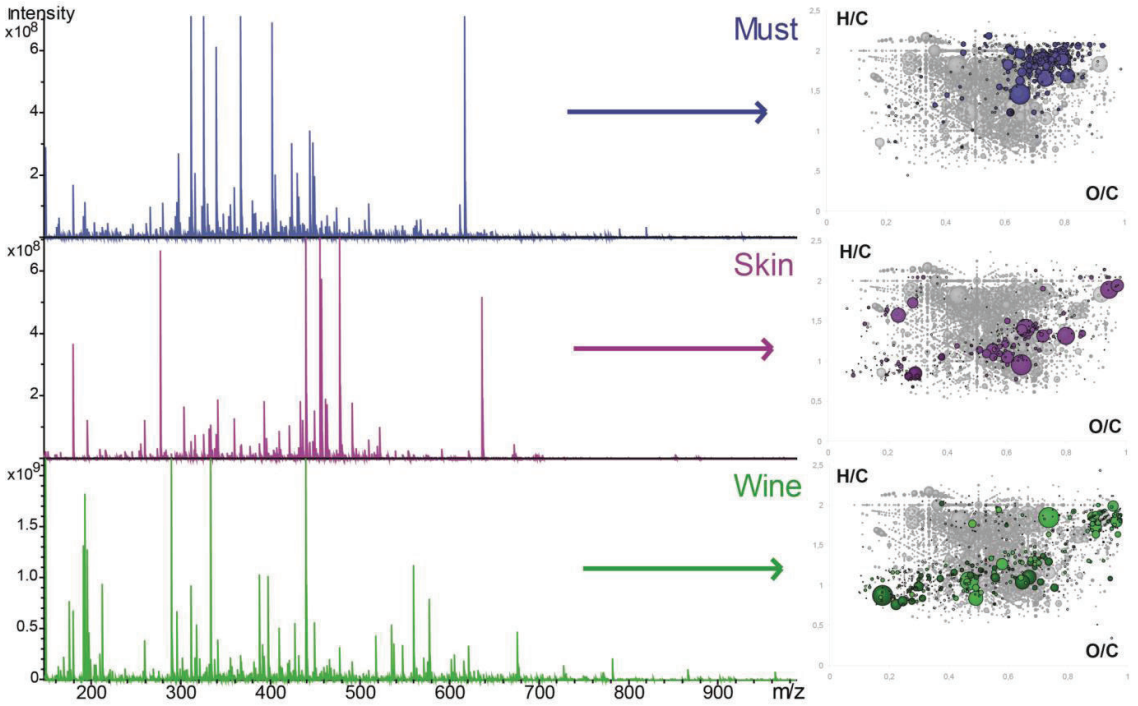


Figure 49 : Visualization of the ESI(-) FTICR/MS spectrum of the 2009 CN1 must (blue) and skin (pink) extract and wine (green) in the mass range 100-1000 Da. van Krevelen diagrams (H/C vs. O/C atomic ratios) with grey dots corresponding to common masses to all samples and colored dots corresponding to specific masses for each spectrum. Point sizes indicate mass peak intensities in the van Krevelen diagram.

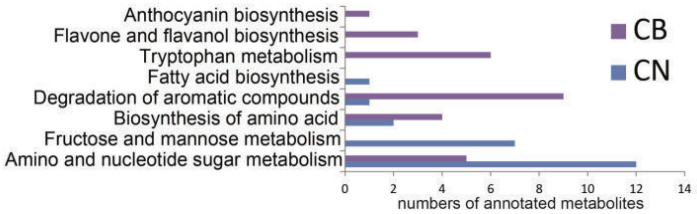


Figure 50 : Pathways overview of discriminative annotated metabolites according to KEGG. Color code: CB, purple; CN, blue

2 Description de la signature chimique de deux « climats de Bourgogne »

La composition de baies de raisin est influencée par diverses conditions environnementales pouvant être considérées comme représentatives du terroir. Si les raisins provenant d'un terroir donné sont supposés refléter leurs origines dans leurs compositions chimiques, alors les vins correspondant devraient également refléter une part de cette information. Le but de ce travail était de révéler l'expression du terroir au sein de la diversité chimique en utilisant la Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions et Transformée de Fourier (FTICR-MS). Pour cela, le raisin (Pinot noir) et les vins correspondant issus de deux villages bourguignons voisins travaillés par un même vinificateur et ce pendant trois millésimes successifs (2010, 2011 et 2012) ont été sélectionnés. La FTICR-MS et la Chromatographie Liquide à Ultra haute Résolution (UPLC) ont été utilisées comme approches respectivement non ciblée et ciblée sur les polyphénols dans le but de discriminer l'empreinte chimique complexe correspondant aux millésimes, à la classe (vin, pulpe et extrait de pellicules) ainsi qu'au terroir. Les analyses statistiques réalisées en aval sur les données ont révélés que même si le millésime possède l'impact le plus puissant sur l'empreinte chimique, l'impact du terroir reste visible.

Cette étude a fait l'objet d'une publication scientifique, en 2014, dans le journal PlosOne.
DOI:10

How subtle is the “terroir” effect? Chemistry-related signatures of two "Climats de Bourgogne"

Chloé ROULLIER-GALL [a,b], Marianna LUCIO[b], Laurence NORET[a], Philippe SCHMITT-KOPPLIN[*b,c] and Régis D. GOUGEON[*a]

[a]C. Roullier-Gall, Laurence Noret, R.D. Gougeon
Institut Universitaire de la vigne et du vin, Jules Guyot, UMR A 02.102 Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe Procédés Alimentaires et Physico Chimie, AgroSupDijon/Université de Bourgogne, Dijon, France.
[b]C. Roullier-Gall, M. Lucio, P. Schmitt-Kopplin
Analytical BioGeoChemistry, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany
[c]P. Schmitt-Kopplin
Chair of Analytical Food Chemistry, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany.

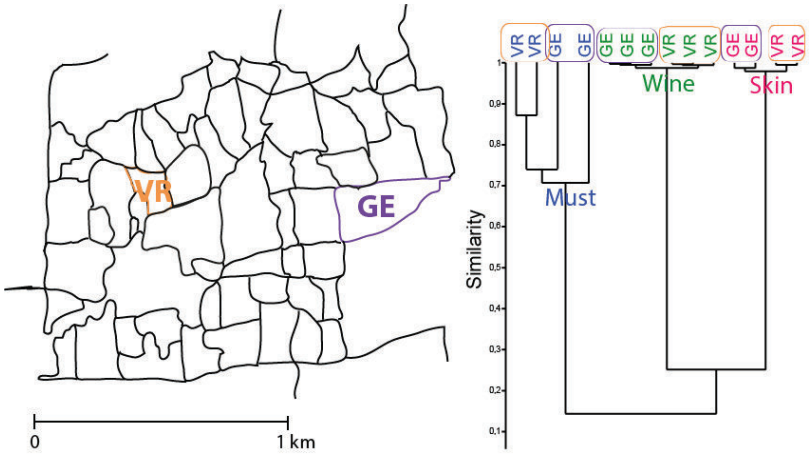
* regis.gougeon@u-bourgogne.fr / schmitt-kopplin@helmholtz-muenchen.de

Abstract

The chemical composition of grape berries is influenced by various environmental conditions often considered to be representative of a "terroir". If grapes from a given terroir are assumed to reflect this origin in their chemical compositions, the corresponding wine should also reflect it. The aim of this work was therefore to reveal the "terroir" expression within the chemodiversity of grapes and related wines, using ultrahigh-resolution mass spectrometry. Grapes and corresponding wines, from two distinct– though very proximate – terroirs of Burgundy were analyzed over three vintages (2010, 2011 and 2012). Ultrahigh-resolution mass spectrometry and ultra-high performance liquid chromatography were used as untargeted and targeted approaches to discriminate complex chemical fingerprints for vintages, classes (wines, skins or musts), and terroirs. Statistical analyses revealed that even if vintages have the most significant impact on fingerprints, the most significant terroir differences are seen in the grapes of a given vintage.

Key words: pinot noir; grapes; wine; terroir; vintage; FTICR-MS; UHPLC; phenolics; "Climats de Bourgogne"

Graphical Abstract



INTRODUCTION

Wine, a beverage with a long tradition and high value, arises from a complex interplay between environmental, genetic and human factors. Metabolic compositions of grapes and related wines are complex, and they include primary (e.g., sugars, organic acids, amino acids) and secondary metabolites (e.g., flavonoids, anthocyannins, and other pigments). Although phenolic compounds play a major role[1], all of these compounds influence the quality and organoleptic character of wines[2]. Grape berries contain the major compounds contributing to flavour, resulting from metabolic changes that occur during the growth of grape berries up until harvest [3]. During winemaking and particularly during the alcoholic fermentation, these compounds will either disappear, be directly transferred to wine or react to form new molecules. Yeast-driven metabolism further contributes to the chemical enrichment of the wine through, for instance, the enzymatic liberation of volatile organic molecules responsible for the aroma of wine. Modern technologies have allowed for the identification of thousands of metabolites existing in exceedingly small quantities in wine, which are a consequence of microbiological processes, climatic conditions, viticultural and oenological practices [4].

The notion of terroir in viticulture precisely refers to this complex interplay of factors. It involves the vine and its environment, including phenology, geography, geology, pedology and the local climate of a vineyard, along with human activity[5]. If numerous authors have proposed varying definitions of the concept of terroir (Seguin[5], Vaudour[6],

Riou [7] or van Leeuwen [8]), they all agree on its geographical dimension. On this basis, it could be proposed that if grape composition is marked by chemical fingerprints from a given terroir, wines made from these grapes should also reflect related fingerprints. Most analytical studies so far have tackled the question of "terroir" from the viticulture point of view, considering the impact of environmental factors on the quality of the grape or the wine[9,10]. Several factors such as soil type, environmental, agricultural practices, climatic conditions, vine phenology or winemaking processes – all of them considered to contribute to the terroir effect –may indeed change the chemical composition of grapes and wine [11,12,17,18]. Regarding the analytical tools, parameters such as isotopic ratios, trace element compositions, phenolic and/or volatile profiles and geological markers have been employed to determine the geographical origin of wines [8,9,10,13–16].In any cases where wines exhibited a significant terroir effect, any differences were overshadowed by the vintage effect[18]. From a sampling point of view, all of the studies so far have considered grapes and/or wines from different local areas [17,19–21], regions [17,20,22,23] or even countries [14,15,24,25]. However, grapes were in all cases either from distinct varieties or made by distinct winemakers [20,26], which added an intrinsic variability among samples that was not necessarily related to genuine terroir effects. Indeed, Tarr [27] has shown that both the varietal character and the terroir influence the metabolome of grape berry. We have recently shown that a terroir effect on grapes and related wines could be demonstrated in the case of four distinct vineyards located 40 km apart and managed by the same producer [18]. It clearly appears that a robust methodology for the discrimination of terroirs using a single measurement system would be a great advance. Matching techniques now allow the analytical profile (all of the targeted analytical measurements together) of a wine to be used to predict its region of origin[14,15,24]. Non-targeted analytical tools, especially NMR spectroscopy[19,26,28–30] and FTICR mass spectrometry [2,4,31,32] have been shown to be efficient methodologies. In this study, FTICR mass spectrometry is considered as a non-targeted metabolomics approach through the semi-quantitative description of all low molecular weight metabolites in a specified biological sample (wine) [4,18,27,33–35].

The objective of this work was therefore to go beyond our previous work [18] and implement strategies to discriminate grapes and related wines from two distinct terroirs (vineyards) in two neighboring villages in the Côte de Nuits (Burgundy), separated by less than 2 km and managed by a unique vine grower/winemaker. We employ a single powerful untargeted analytical approach in addition to classic UHPLC targeted phenolic compounds. For each terroir, Pinot noir grapes from young and old vines along with corresponding wines

were considered over three successive vintages (2010, 2011 and 2012). Here we show that through the direct analysis of grape extracts and related wines using Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FTICR-MS), it is possible to obtain the spectrum of thousands of metabolites that can ionise within a given mass range, and which provide the complex specific metabolic fingerprints of vineyards. It is a fast and reliable process especially applicable to high-throughput analysis and in combination with multivariate statistics it can be used to quantitatively distinguish between samples [36,37].

MATERIALS AND METHODS

Wine samples and preparation (Pinot noir wine, must and skin extracts)

This work was carried out on two distinct vineyards managed by the same producer. The first is in the village of Flagey-Echezeaux and will be referred to as GE and the second vineyard is in the village of Vosne Romanée and will be referred to as VR. Both the GE and the VR vineyards are characterized by clay limestone soils standing on 175 My calcareous basements. For each vineyard, three vintages (2010, 2011 and 2012) were considered.

Two distinct grape samples (GE and VR) were thus considered for a given vintage, and 100 Pinot noir berries were collected at harvest for each of them. Musts and skins were separated by pressing berries using a laboratory-scale press, and skins were further dried on filter papers. Skin extracts were obtained by crushing (Ultra Turrax, IKA, Wilmington) twice in pure methanol (LC-MS grade). Mixtures were then centrifuged (10 min, 25400 g).

Must samples were obtained by solid phase extraction (C18-SPE cartridges; 100 mg.mL-1 Backer bond SPE columns) to remove ions and target the analysis of moderately polar to non-polar organic matter. The cartridges were conditioned with 1 mL methanol, followed by 1 mL acidified ultra-pure water (1.25 % formic acid), and the must samples were passed through each cartridge by gravity. Musts were eluted with 500 µL of methanol and stored in vials at -20°C.

For the 2012 vintage, corresponding wines were collected immediately after the alcoholic fermentation, and three types of wine were collected: free run, press and blended wines.

Targeted UHPLC analysis of phenolic compounds

An Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a model 2996 PDA detector was used for the analysis on BEHC18 column purchased from Waters

(Eschborn, Germany). Under the optimised conditions, the column oven was thermostated at 30°C and the sample system at 8°C. The sample (10 µL) was injected via full-loop injection. We used water-methanol-formic acid 100:5:0.1 (v/v) as solvent A and methanol as solvent B with a flow rate to 0.25 mL.min-1. The optimized system consisted in a stepwise gradient as follows: from 3 to 5% B (0-4 min), 5 to 8% B (4-10 min), 8% B (10-12 min), 8 to 10% B (12-14), 10 to 15% B (14-17 min), 15 to 30.1% B (17-19 min), 30.1 to 38% B (19-21 min), 38 to 41% B (21-24 min), 41 to 50% B (24-30 min), 50 to 100% B (30-31 min), 100% B (31-31.5 min), 100 to 3% B (31.5-32.5 min), 3% B (32.5-35 min). Detection was performed at 280 nm, 305 nm, 320 nm and 360nm, and the chromatographic characteristics were calculated with the Waters Empower software. Chemically pure standards of trans-resveratrol, gallic acid, hydroxytyrosol, gentisic acid, caffeic acid, coumaric acid, isoquercitrin, cis-piceid, quercitin, quercetin, catechin, (-)-epicatechin and malvidin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The purity of all phenolic standards was greater than 95 %. Individual stock solutions (1000 ppm) were prepared in pure methanol and kept at -20 °C in the dark. A working solution was prepared daily by dilution with water. Calibration standards were freshly prepared on the day of analysis by diluting the appropriate working solution with initial middle phase solution. The range of concentration was selected in function of the sensitivity of the UHPLC-PDA for each polyphenol. As shown for trans-resveratrol (Figure S1A), highly satisfying correlation curves between standard concentrations (mg.L-1) and peak areas as detected by UPLC were recorded. Resveratrol concentrations shown in Figure S1 were measured in triplicate over two consecutive days for three different samples (NSG, CNV and SB), thus illustrating the very high reproducibility of the UPLC quantitation, and showing that changes in the UPLC response to individual analytes reflect differences in levels of these analytes. Error bars indicate standard deviations lower than 0.5%.

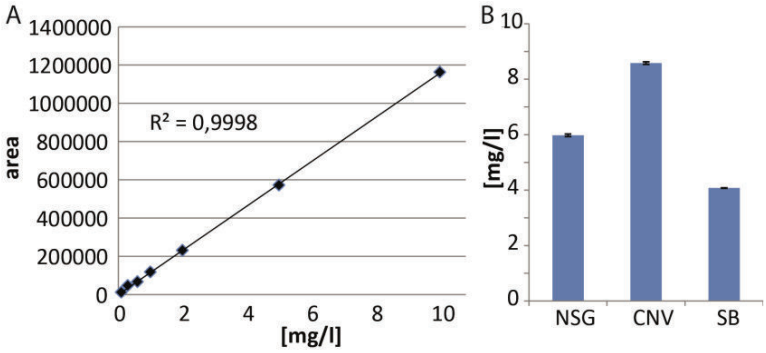


Figure S1: Details of the UPLC analysis of resveratrol standards and wines: (A) Correlation curve between the concentration of resveratrol standards (mg.L-1) and the peak areas as detected by UPLC along with its calculated correlation coefficient (B) Histogram of resveratrol concentrations (mg.L-1) from three red wines from Burgundy (NSG, CNV and SB) resulting from three technical replicates, with standard deviation less than 0.5%.

FTICR-MS analysis

High-resolution mass spectra were acquired on a Bruker (BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Germany) solariX Ion Cyclotron Resonance Fourier Transform Mass Spectrometer (FTICR-MS) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet (Magnex Scientific Inc., Yarnton, GB) and a APOLO II ESI source (BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Germany) in the negative ionisation mode. The negative ion mode fingerprint showed greater variety in the composition and abundance of components in the analysed wines and a smaller number of adducts, as well as higher resolution[38]. 20 µL of the samples were diluted in 1 ml of methanol prior to injection [39] and introduced into the microeletrospay source at a flow rate of 120µL.h-1. Spectra were first externally calibrated by using clusters of arginine (10mg.L-1 in methanol), and the accuracy attained. Further internal calibration was performed for each sample by using ubiquitous fatty acids, reaching accuracy values of less than 0.1 ppm in routine day-to-day measurement[4]. Spectra were acquired with a time domain of 4 mega words over a mass range of m/z 100 to 1000. 500 scans were accumulated for each sample. The FTICR mass spectra were exported to peak lists at a signal-to-noise ratio (S/N) of 2 and higher[41]. After calibration and peak alignment [37], the m/z values can be annotated with unambiguous elemental formulas by in-house written software, due to the ultrahigh resolution (R= 400.000 at m/z 400, differentiating two masses differing with the pass of an electron) and mass accuracy of 0.1ppm (electron mass accuracy). In conjunction with an automated theoretical isotope pattern comparison, the generated formulas were validated by setting sensible chemical constraints (N rule; O/C ratio ≤ 1; H/C ratio $\leq 2n + 2$; element counts: C $\leq$ 100, H $\leq$ 200, O $\leq$ 80, N $\leq$ 3, S $\leq$ 3) and mass accuracy window (set here at +/- 0.2ppm). Up to several thousand such compositions could be calculated containing C, H, O, N and S elements and could then be represented using two-dimensional van Krevelen diagrams, which sort them onto two axes according, for instance, to H/C and O/C atomic ratios[41,42].

Statistical analyses

Data Normalization: row data (mass spectra) were normalized by log transformation $(x-m) / \Delta m$ in order to stabilize the variance between samples [4,32,43].

Hierarchical Clustering Analysis (HCA) was performed with the Hierarchical clustering explorer 3.5 sofltware (Maryland, USA) on the normalized data. Euclidian distances and average linkages were chosen to measure distance. This method allows samples to be grouped into homogeneous and distinct clusters, without imposing preliminary hypotheses on the data.

Principal Component Analysis (PCA) is another unsupervised method with the capacity to reduce the complexity of a multivariate dataset. Its goal is to extrapolate important information and display it as a set of new independent variables called principal components. This method, like Hierarchical clustering, discloses the similarity pattern of the observations or variables. A 95% cut-off of the frequencies was used to select the optimum number of principal components. Partial least square discriminant analysis (PLS-DA) models were used to extract the most discriminative metabolites, which were further manually checked within the spectra. m/z values with a variable importance in projection (VIP) value >2 and p values <0.05 (Wilcoxon-Mann-Whitney test) were considered as relevant. A model is considered acceptable for biological data if $R^2 > 0.7$ and $Q^2 > 0.4$ [43,56,57]. PCA and PLS-DA models were performed with the SIMCA 9.0 software (Umetrics, Sweden).

Two-dimensional van Krevelen diagrams were constructed using compositional networks (based on elemental compositions) and functional networks based on selected functional group equivalents enabling improved assignment option of elemental composition and classification of organic complexity with tuneable validation windows[42].

RESULTS AND DISCUSSION

A total of thirty-four different samples of Pinot noir from three vintages, and belonging to two areas, Flagey-Echezeaux (GE) and Vosne Romanée (VR), were analyzed. These samples were first analyzed for phenolic compounds using UHPLC. As already shown, phenolic concentration can differ from one local area to the other, and can therefore provide a basis for geographical discrimination [17,44]. As an example, Table 1 shows the concentrations of phenolics (UHPLC) and corresponding intensities (FTICR-MS) for six distinct wines from the 2012 vintage.

Table 1: Comparison of phenolic concentrations between targeted and non-targeted analyses. Phenolics concentration as analyzed with UPLC (mg.L-1) and intensity as analyzed with FTICR-MS,

from two neighboring terroirs (VR = Vosne Romanée and GE = Flagey-Echezeaux) from the 2012 vintage.

Sample	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
Locality	VR	VR	VR	VR	VR	VR	GE	GE	GE	GE	GE	GE
Type of wine	free run	free run	Press	Press	blending	blending	free run	free run	Press	Press	blending	blending
Method	UPLC (mg/L)	FTICR/ MS	UPLC (mg/L)	FTICR/ MS	UPLC (mg/L)	FTICR/ MS	UPLC (mg/L)	FTICR/ MS	UPLC (mg/L)	FTICR/ MS	UPLC (mg/L)	FTICR/ MS
Gallic A. (m/z 169.01425)	29.32	10057193	28.2	8706123	29.03	11085709	26.35	7941212	24.41	5891401	24.72	7184990
Hydroxytyrosol (m/z 153.05572)	17.44	nd.	17.35	nd.	17.04	nd.	13.01	nd.	12.22	nd.	12.4	nd.
Gentisic A. (m/z 153.01933)	0.91	nd.	0.87	nd.	0.71	nd.	0.76	nd.	0.64	nd.	0.72	nd.
(+) Catechin (m/z 289.07176)	127.42	311233664	121.96	277021952	122.28	283116672	118.6	195920048	109.68	142164352	110.36	223117312
Caffeic A. (m/z 179.03495)	2.61	38309168	2.61	33692936	2.61	34495036	2.13	35477540	1.96	23733444	2	34448404
(-) Epicatechin (m/z 289.07176)	71.02	311233664	70.53	277021952	69.94	283116672	72.24	195920048	68.57	142164352	69.43	223117312
Coumaric A. (m/z 163.04007)	0.28	5218280	0.25	4572683	0.28	4767820	0.28	5980091	0.23	3689097	0.22	4459198
Malvidin (m/z 330.0745)	321.31	nd.	287.77	nd.	294.7	nd.	317.72	nd.	265.75	nd.	280.97	nd.
Isoquercitrin (m/z 463.0882)	3.7	5254493	4.32	3922291	3.57	4709192	4.57	3022361	4.61	3043291	4.09	3586106
Trans-resveratrol (m/z 227.07137)	9.53	22897272	8.38	16212247	8.6	17808434	8.29	13690299	6.56	7062201	7.02	13120387
Cis-Piceid (m/z 389.12419)	2.41	11420214	2.46	12907573	2.32	11029681	2.79	10434416	2.64	6120783	2.53	10310404
Quercitrin (m/z 447.09329)	0.49	2517049	0.47	1892392	0.48	3177980	0.7	3475663	0.64	3124468	0.64	3029415
Quercetin (m/z 301.03536)	5.35	89854544	4.2	74599280	2.92	63515860	6.7	70674312	4.2	4168332	4.91	65365708

The concentration of trans-resveratrol, for example, appeared to be high, averaging from 7.29 mg.L-1 (sample GE from 6.56 mg.L-1 to 8.29 mg.L-1) to 8.83 mg.L-1 (samples VR from 8.38 mg.L-1 to 9.53 mg.L-1). The different concentrations measured here agree with previously reported values for wines from several geographical origins, with levels of trans-resveratrol between 5 and 25 mg.L-1 [45,46] and with results for three red wines from Burgundy (Figure S1B) which had levels of trans-resveratrol between 4 and 9 mg.L-1. Figure 1 shows the score and loading plots for the two first principal components (PC1 = 63.3%, PC2 = 26.9% of the total variance, respectively) for the phenolics concentrations of aforementioned six wines. Vosne Romanée wines (samples VR 1, 2 and 3) were clearly separated from Flagey-Echezeaux wines (samples GE 4, 5 and 6), and several compounds were found to be discriminant for this separation. Samples GE 4 and VR 1, which correspond to free run wine, seem to be distinguished from the other wines (press and mix) by higher concentrations of phenolic compounds, particularly in GE 4. By simultaneously considering the score and loading plots it is possible to interpret the variables that influence the positions of the observations in the score plots. VR wines were characterized by higher levels of gallic acid, hydroxytyrosol, gentisic acid, (+) catechin, caffeic acid, (-) epicatechin, coumaric acid, malvidin and resveratrol, whereas for GE wines, isoquercitrin, cis-piceid, quercitrin and quercetin were more abundant (Figure1). These differences in concentrations are clear

indications that, for the 2012 vintage, the accumulation of phenolic compounds in berries must have been influenced by environmental conditions, collectively referred to as terroir conditions, as illustrated for instance by trans-resveratrol[17,29,46]. Higher concentrations of trans-resveratrol in VR wines indeed suggest that vine stress within the last days before harvest was slightly more pronounced in the VR vineyard [47]. Similarly, higher concentrations of the fermentation-related hydroxytyrosol in VR wines indicate that the overall indigenous microbiology must have been different in the two vineyards[48].

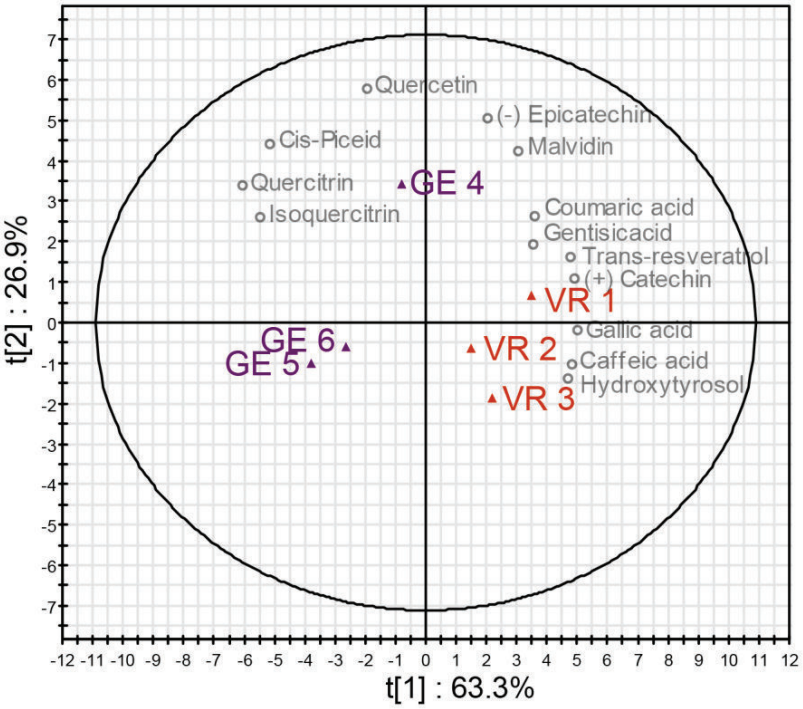


Figure 1: Statistical discrimination of wines according to phenolic concentrations. (A) Scores and loading plot for the PCA of UHPLC analyses. The first two components explain 90.2 % of the variation. Color code: GE (purple), VR (orange), variables (grey).

The phenolic profiles for both geographical areas were found to be quite distinctive within a single vintage. Indeed, the vintage effect on metabolic profiles of grapes and wines has been thoroughly studied[28,49] and its importance is generally accepted. In order to have a more accurate view of the actual terroir-related biochemistry, which could potentially supersede any vintage effects, it is necessary to consider the largest possible number of metabolites. In Figures 2, 3, 4 and 5 we report the non-targeted metabolite analysis of a set of wines and grape extract samples. This approach, which uses multivariate statistics to analyze high-volume data sets, reveals the extremely high chemical diversity of grape and wine

metabolites and offers the possibility to integrate the entire history metabolic changes throughout the elaboration process of wine[4]. We recorded the negative-ion ESI mode ICRFT-MS of each of 12 methanolic extracts from skins and musts (Figure 3A), and of 9 methanol-diluted wines. These samples were from three different vintages (2010, 2011 and 2012, only 2012 for wines) and from two nearby villages in the Côte de Nuits (GE and VR). FTICR-MS data were further statistically processed in order to identify discriminating m/z values. Metabolomics is considered here as the non-targeted metabolite analysis through semi-quantitative description of low molecular weight metabolites in wine and grape samples. The diversity of chemical spaces of wine and grape berries can be observed in the mass distributions within the 200 millimass range of a single nominal mass as illustrated for mass 343.00 (Figure 2A), where up to 16 possible elemental compositions based on C, H, O, N and S could be annotated (at S/N 4) for VR 2012 samples. 9 combinations were related to the must, 11 to grape skins and 8 to wine, with 2 being unique ($[C_{26}H_7N_2O_2]^-$ and $[C_{22}H_{15}O_4]^-$), demonstrating how the fermentation step can add to the biochemical diversity of a wine through the release of either nitrogen-containing or highly oxygenated compounds. The peak abundances and the distributions for CHO, CHOS, CHON and CHONS in these FTICR mass spectra were characteristic of wine- (Figure 2D), grape skin- (Figure 2C) or must- (Figure 2B) metabolites[32].The relative CHO abundance for the grape skins and musts was elevated, whereas it was lower for the wine. In contrast, the wine showed a relatively high abundance of S-containing compounds that could be due either to yeast secondary metabolites or to the addition of sulfites during winemaking. The peak at m/z 227.0713 (Figure 2E), which was significantly more intense in the must, corresponds to the [M-H]- ion with absolute mass formula $[C_{14}H_{11}O_3]^-$ and could most likely be assigned to resveratrol isomers[4]. Such hypotheses could be supported by the comparison of relative peak intensities measured by FTICR-MS and UHPLC (Figure 2F). Indeed, relative intensities of FTICR-MS peaks corresponding to the elemental formulas of gallic acid, resveratrol and quercitrin were good matches to the various concentrations measured by UHPLC for these compounds (Figure 2F). Since such compounds are easily ionized under ESI conditions, Figure 2D confirms that the entire pool of compounds able to potentially be extracted from grapes is not necessarily found in the resulting wine.

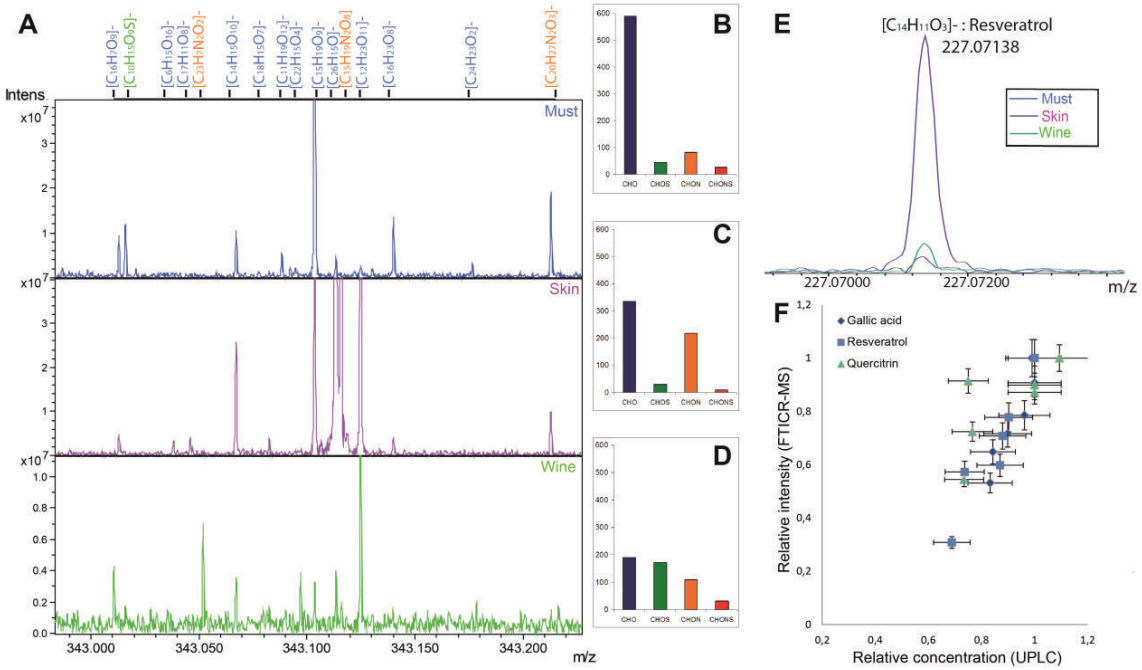


Figure 2: Detailed visualization of wine, must and skin extracts from the VR vineyard for the 2012 vintage, in the ESI(-) FTICR-MS. (A) spectra in the mass range m/z 343.000-343.200 with credible assignment of elemental formulas; Histograms of the relative frequency of (B) must, (C) skin and (D) wine (Color code : CHO, blue; CHOS, green; CHON, yellow and CHONS, red). (E) Zoom on the mass 227.07138 m/z, which corresponds to the [M-H]- ion with absolute mass formula [C14H11O3]- and can most likely be assigned to resveratrol isomers (F) Correlation between normalized concentrations from UHPLC and normalized peak intensities from FTICR-MS for resveratrol (square), gallic acid (diamond) and isoquercitrin (circle).

The diversity of chemical spaces could be observed in the mass distribution and 2-dimentional van Krevelen diagrams (Figure 3A) were used to five an initial interpretation of such compilations of assigned elemental formulas. Using a home-compiled database of compounds that have been observed in wines, van Krevelen diagrams provide a representation of the specific contributions of the various phenolics, peptides, polysaccharides, nucleotides and any other classes of compounds present in wines that could be negatively ionized[4] (Figure 3A).We observe the specific distribution of elemental compositions (CHO, CHOS, CHON and CHONS) according to H/C and O/C atomic ratio. In grapes, chemical spaces from the four vineyards were more similar in composition to one another within a vintage than they were to chemical spaces of another vintage. Thus, as noted in our previous studies [18], only the discrimination based on vintages was clearly distinguished in the PCA scores plot (Figure 3B). This principal component analysis has demonstrated that individual samples corresponding to a given grape extract (skin in this case) could be clustered according to vintages regardless of the grapes' geographic origin,

with the first axis accounting for most of the separation, although the 2012 vintage differentiation appeared to be also explained by the second axis (Figure 3B). This example illustrates that such a protocol can be used to analyse and generate reproducible results from individual grape and wine samples [50]. The projection of masses representing the characteristic chemical diversity associated with each of these three matrices (2010, 2011 and 2012) onto van Krevelen diagrams (Figure 3C-D-E) revealed that vintages were discriminated especially by CHO compounds. However, most interestingly, such CHO compounds appeared to be primarily located in the area containing the free polyphenolics for 2010, whereas they were primarily located in the zone containing glycosides in the 2012 samples. This illustrates how the vintage can impact the grape composition regardless of the geographical area. The discriminant chemical diversity for 2011 appeared to be surprisingly varied (Figure 3D).

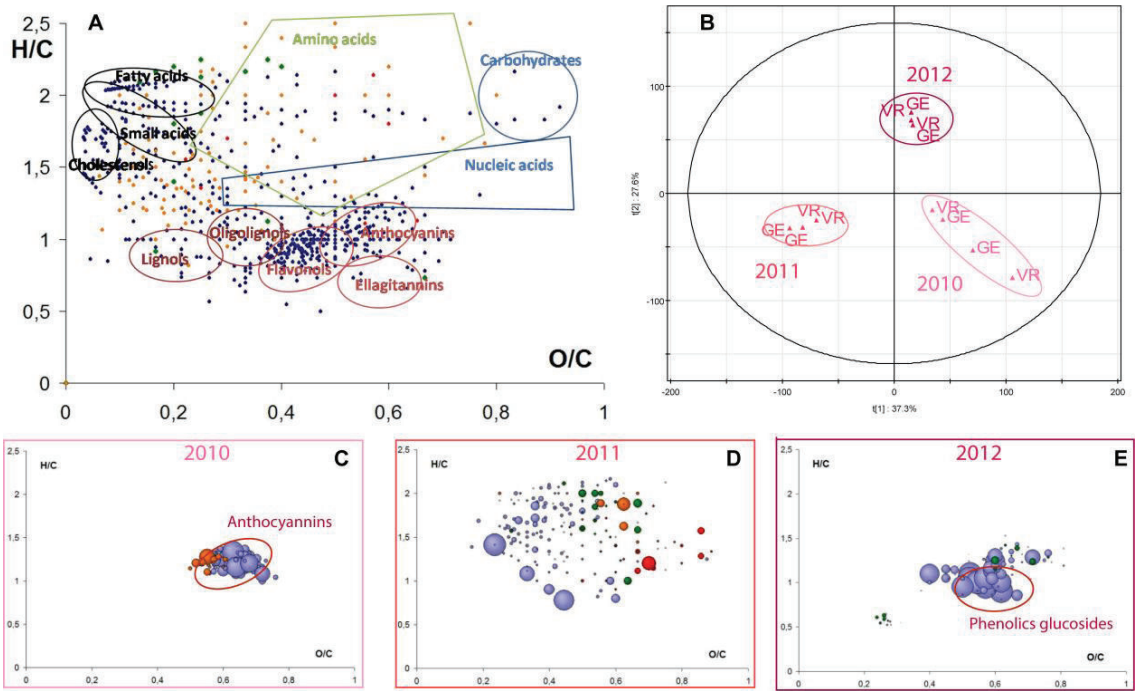


Figure 3: Differentiation of vintages and representations of related characteristic compounds. (A) H/C versus O/C van Krevelen diagram of all of the metabolites from our in-house database (MoG-DB), identifying regions specific to chemical families. (B) Scores plot for the PCA analysis of the negative-ion ESI FTICR-MS skin extracts data from both vineyards VR and GE for three different vintages; 2010 (pale), 2011 (medium) and 2012 (dark); The first two components explain 64.9% of the variation. H/C versus O/C van Krevelen diagrams of specific masses for (C) 2010, (D) 2011 and (E) 2012 vintages; (color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange). Circle areas are proportional to mass peak abundance.

Proposed annotations for the discriminant masses (2010, 2011 and 2012 vintages for skin extracts) could be made using information from the literature and relevant databases. Particularly useful were an in-house database specific to plants and especially to grapes and wine, SciFinder Scholar, and the web server MassTRIX[51] (Table S1), which queries several databases (KEGG, Lipid Maps and HMDB). Annotations of peaks in the 2010 and 2012 samples indeed confirmed a relatively high occurrence of pertinent glycosidic structures in the 2012 vintage compared to 2010. It must be noted though that the hypothetical pelargonidin glucoside proposed for the 2012 vintage is an anthocyanin structure that has already been observed in Vitis Vinifera wines [52], but not from Pinot noir grapes. Metabolite annotations of the 2011 vintage spectra were characterized by pertinent hypothetical structures including sugars, phenolic acids and flavanols (Table S1).

Table S1: Examples of unique skin-specific masses from 2010, 2011 and 2012, number of known structures for each formula found by SciFinder scholar and putative annotations of known grape and wine metabolites.

Detected m/z	Molecular ion formula	Putative annotations for grape and wine
	2010	
169.01424	$[C_7H_5O_5]$-	Gallic acid
483.11455	$[C_{21}H_{23}O_{13}]$-	flavan-diol glucoside
551.01113	$[C_{29}H_{23}O_9]$-	gericudranins
577.13518	$[C_{30}H_{25}O_{12}]$-	Catechin dimer
611.12542	$[C_{26}H_{27}O_{17}]$-	Myricetin-sambubioside
	2011	
185.02205	$[C_5H_9O_5]$-	Ribose
223.06119	$[C_{11}H_{11}O_5]$-	Sinapic acid
241.08299	$[C_{10}H_{13}N_2O_5]$-	Thymidine
300.99900	$[C_{14}H_5O_8]$-	Ellagic acid
367.09537	$[C_{18}H_{19}O_6]$-	Catechin-trimethyl ether
	2012	
243.06629	$[C_{14}H_{11}O_4]$-	Piceatannol
615.09915	$[C_{28}H_{23}O_{16}]$-	Quercetin-galloylglucoside
782.20576	$[C_{38}H_{39}O_{18}]$-	Pelargonidin-coumaroylglucoside-acetylglucoside
501.08040	$[C_{21}H_{21}O_{12}]$-	Quercetin-glucoside
503.09598	$[C_{12}H_{23}O_{12}]$-	Catechin-glucoside

If we consider wines and the distinct contributions from the grape skins and musts, from which they originated for a single vintage (here 2012), a PCA analysis of corresponding

annotated mass peaks from both Flagey-Echezeaux and Vosne-Romanée vineyards clearly showed a distinct separation by the first two principal components, which explained 70.1 % of the total variance (Figure 4A). For both the must and skin extracts, the composition appears to be more similar between the two vineyards than it is to the other extract (must or skin) from the same vineyard (musts in blue and skins in pink in Figure 4A). In agreement with Catharino [53], PCA also clearly separates musts (blue) from wines (green) into two well-defined groups, confirming the suitability of ESI-MS for the characterization of grape and wine chemical spaces. The discrimination between skin extracts and wines was mainly explained by the first component whereas the second component revealed the differentiation between skin extracts, on one hand, and wines and musts, on the other. The projection of specific data (masses as filtered from the PCA in Figure 4A) for the three classes on van Krevelen diagrams (Figure 4B-D), revealed that all three of the compartments: skin extracts, musts and wines, displayed highly rich and specific distributions of discriminant CHONS-containing elemental compositions (CHO, CHOS, CHON and CHONS). Must fingerprints were consistently related to CHO and CHON compounds corresponding to peptides, whereas skin samples were discriminated in particular on the basis of polyphenolic CHO compounds (Figure 4B-C). In contrast, compounds specific for wines appeared to be more diverse in terms of chemical families, including glycosylated CHO compounds, S-containing polyphenolic compounds and various CHON and CHONS compounds (Figure 4C). Two aspects of the van Krevelen signature for wines (Figure 4C) appear to be particularly interesting: the presence of sulfur-containing compounds (CHOS) especially in the aromatic area, and of the CHO compounds appearing in the top right corner of the diagram, indicating that carbohydrate-type compounds were specific for wines, whereas it has been shown that such compounds do not easily ionize under ESI conditions[54]. The former could be easily explained by the formation of S-adducts of polyphenols upon addition of sulfites during the winemaking process or by fermentation secondary metabolites, but an explanation for the latter is less straightforward. Finally, Figure 4A also revealed that each of the two villages (VR in orange and GE in purple) could be partly separated within the wine compartment, thus emphasizing latent terroir contributions in the chemodiversity of grapes and corresponding wines.

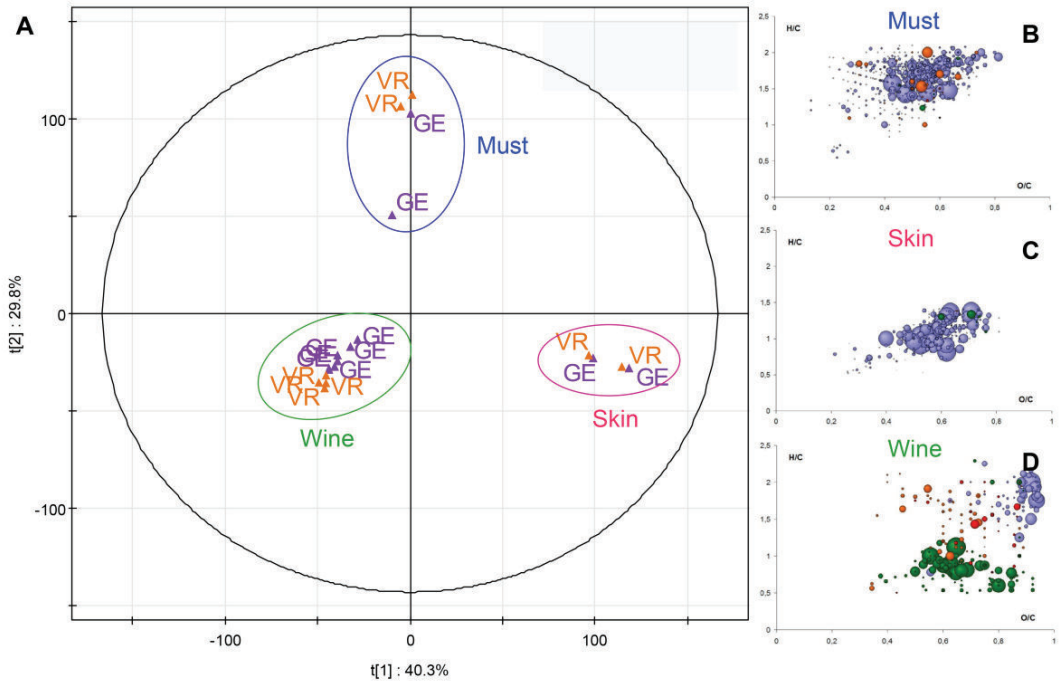


Figure 4: Differentiation of classes and representation of related characteristic compounds. (A) Scores plot for the PCA analysis of the negative-ion ESI FTICR-MS for wine, skin and must extract from the 2012 vintage and for the two villages VR (in orange) and GE (in purple). The first two components explain 70.1% of the variation. H/C versus O/C van Krevelen diagram of specific masses for (B) must, (C) skin and (D) wine. (Color code: CHO, blue; CHOS, green; CHON, red; CHONS, orange). Circle areas are proportional to mass peak abundance.

With such high-resolution mass data, reliable structural assumptions could be drawn by querying topical databases on different annotated Vitis vinifera organism pathways, such as KEGG, accessible with the MassTRIX interface[51,55] (Figure S2). 48 out of the 68 possible wine metabolites identified arise from the flavonoid biosynthesis pathway (see Figure S2A). Many of these metabolites are known to exist in wines and are therefore a reliable validation of such database querying using our raw sets of masses[4]. Applying a similar MassTRIX treatment to must, skin and wine led to the identification of 58, 51 or 48 distinct metabolites from the flavonoid biosynthesis-, fructose and mannose metabolism-, or fatty acid biosynthesis pathways, respectively, as shown in Figure S2B. As a whole, MassTRIX treatment of compounds that discriminate musts, skins and wines not only illustrates the possibility to consistently propose structural identifications for some of the compounds, but also shows that hits can be found for less than 10% of the discriminant masses when compared to the different Vitis vinifera pathways. Moreover, structures from

existing related databases could be assigned to less than 20% of all of the detected signals, attesting to the magnitude of the structurally unresolved chemistry of wine[4].

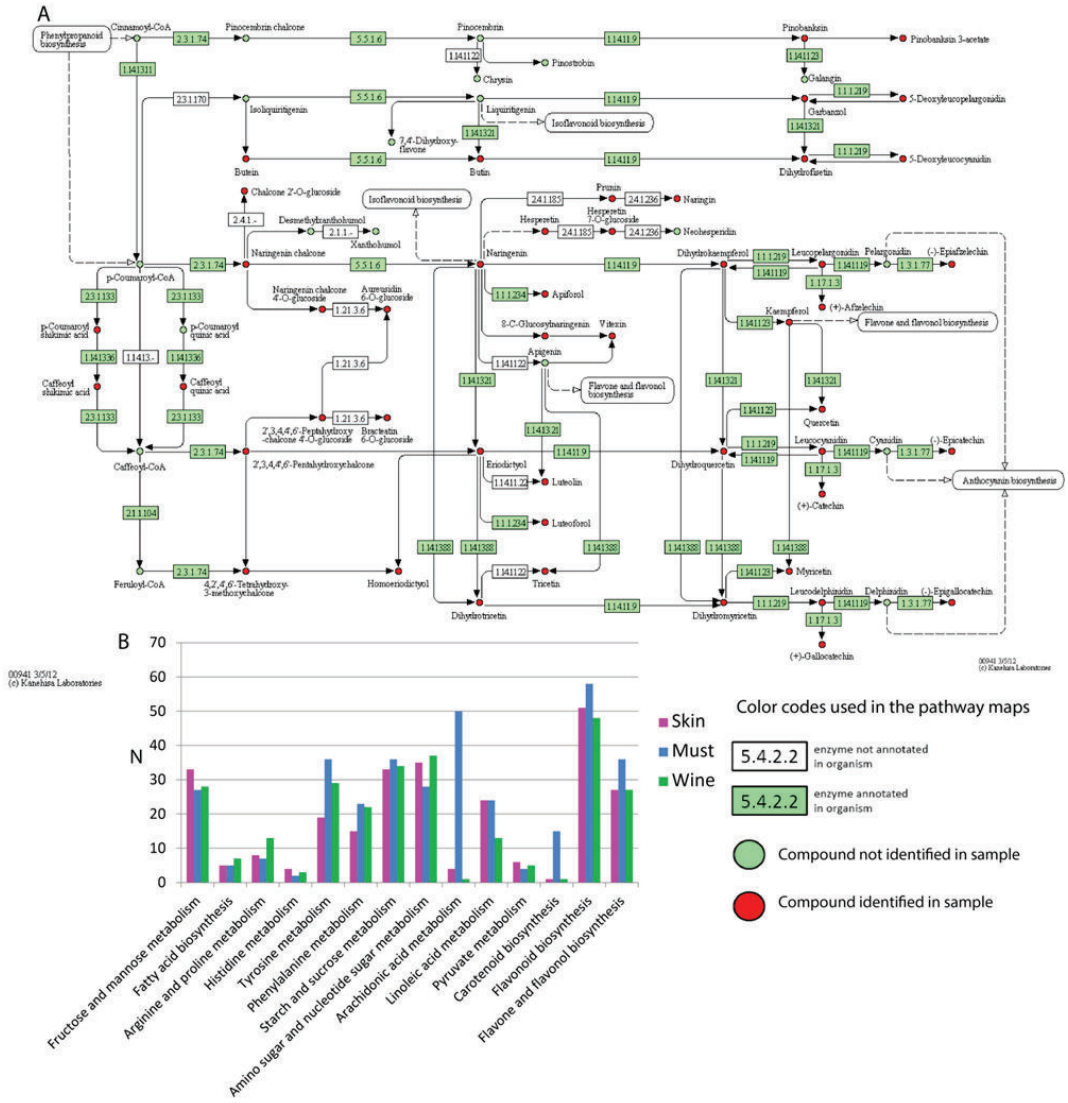


Figure S2: Metabolic pathways of the *Vitis vinifera* organism as annotated from ICR-FT/MS data with the Masstrix translator into pathways for (A) Flavonoid biosynthesis pathway with annotated metabolites present in VR wines (B) Histogram plots of the number of annotations for various pathways (N) of VR skins (in pink), musts (in blue) and wines (in green).

When samples from both villages are considered for a given vintage (2012), terroir discriminations are immediately observed by PCA analysis of corresponding wine chemical spaces (Figure 5A). The first principal component accounts for the discrimination between wines from the two villages. It must be noted though, that the chemical space variability

within GE wines appeared to be significantly higher than that observed for VR wines. Indeed, GE covers a larger vineyard area (2.29 ha) than VR (1.81 ha), which could account for the greater diversity amongst the GE samples. Hypothetical annotations of discriminant masses (VR and GE) could be obtained from the literature and relevant databases (Table S2), revealing characteristic structures as diverse as sugars, phenolic acids or fatty acids (Table S2). Most interestingly, the hierarchical cluster analysis of all the 2012 samples, including musts and skin extracts (Figure 5B) showed the excellent separation of the classes previously shown in Figure 4, and terroir discriminations were visible not only in the wine, but also in the grapes, with a stronger effect seen in musts than in skins and wines. Such results may suggest that winemaking processes could lead to some loss of terroir contributions, at least in young wines. It should be noted, that up to 7850 masses were recorded altogether for the different 2012 samples considered in Figure 5B of which 504 were discriminant for VR differentiation and 207 for GE. However, due to the limitations of current databases, very few relevant masses could be annotated.

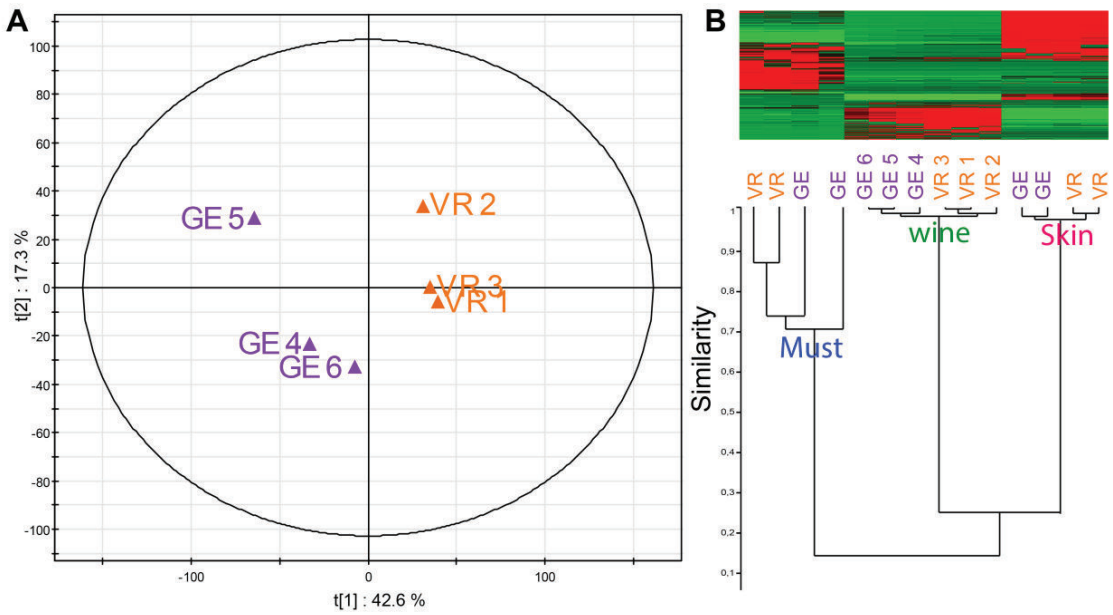


Figure 5: Terroir differentiation for the 2012 vintage. (A) Scores plot of the PCA analysis of the negative-ion ESIFTICR-MS wines data from VR (in orange) and GE (in purple) wines samples. The first two components explain 59.9% of the variation. (B) Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of VR (in orange) and GE (in purple) Skin, wine and must samples are from 2012.

Table S2: Examples of unique wine-specific masses specific from VR and GE, number of known structures for each formula found by SciFinder scholar and putative annotations of known grape and wine metabolites.

Detected m/z	Molecular ion formula	Putative annotation from pertinent grape and wine metabolites
VR		
197.04530	$[C_9H_9O_5]$-	Syringic acid
299.05585	$[C_{16}H_{11}O_6]^-$	Kaempferol-methyl ester
325.09262	$[C_{15}H_{17}O_8]$-	O-Glucopyranosyl-p-coumaric acid
259.12995	$[C_{11}H_{19}N_2O_5]^-$	Glutamyl-isoleucine
464.09645	$[C_{21}H_{21}O_{12}]^-$	Delphinidin-O-glucoside
GE		
447.09330	$[C_{21}H_{19}O_{11}]^-$	Quercitrin
135.04515	$[C_8H_7O_2]^-$	Phenyl acetate
159.06629	$[C_7H_{11}O_4]^-$	Dimethylglutaric acid
221.15468	$[C_{14}H_{21}O_2]^-$	Dodecatrienyl acetate
251.20166	$[C_{16}H_{27}O_2]^-$	hexadecadienoic acid

Based on these results, which show that some terroir impacts could potentially be stronger in grapes than in wines, HCA has been performed for each of the three vintages (Figure 6A) and PLS-DA analyses (Figure 6B-C-D-E) of musts and skin extracts for the two villages are presented. For each vintage, clusters not only clearly separate musts and skins (Figure 6A), but also consistently discriminate between the two villages for the 2011 and 2012 vintages, with a higher efficiency for musts as previously shown in Figure 5B-C-D. Nevertheless, such results clearly attest to significantly different environmental conditions (soil nature and biochemistry, climate, etc.) in VR and GE vines, which can be modulated by vintage effects, as exemplified by the 2010 vintage. This was further confirmed by PLS-DA on the same data sets, which distinctly discriminates between samples of the two villages, regardless of the vintage (Figure 6E), thus providing for the first time a clear representation of how "terroirs", which can be as small as the numerous "climats de Bourgogne", can actually give rise to grapes with significantly different chemical fingerprints. The two valid components of the model were obtained though seven-fold cross-validation with the following values: $R^2X(cum) = 0.91$ and $Q^2(cum) = 0.46$ for 2010, $R^2X(cum) = 0.98$ and $Q^2(cum) = 0.77$ for 2011 and $R^2X(cum) = 0.93$ and $Q^2(cum) = 0.56$ for 2012. These indices reaffirm the goodness of the fit and the prediction capacity of the model. This original result was uniquely confirmed by the PLS-DA taking into account the entire data set (musts and skin extracts) for the three vintages, which also separated the samples into two distinct groups

of chemical fingerprints related to VR (in orange) and GE (in purple) terroirs regardless of the type of extract (musts and skin) or the vintage (Figure 6E).

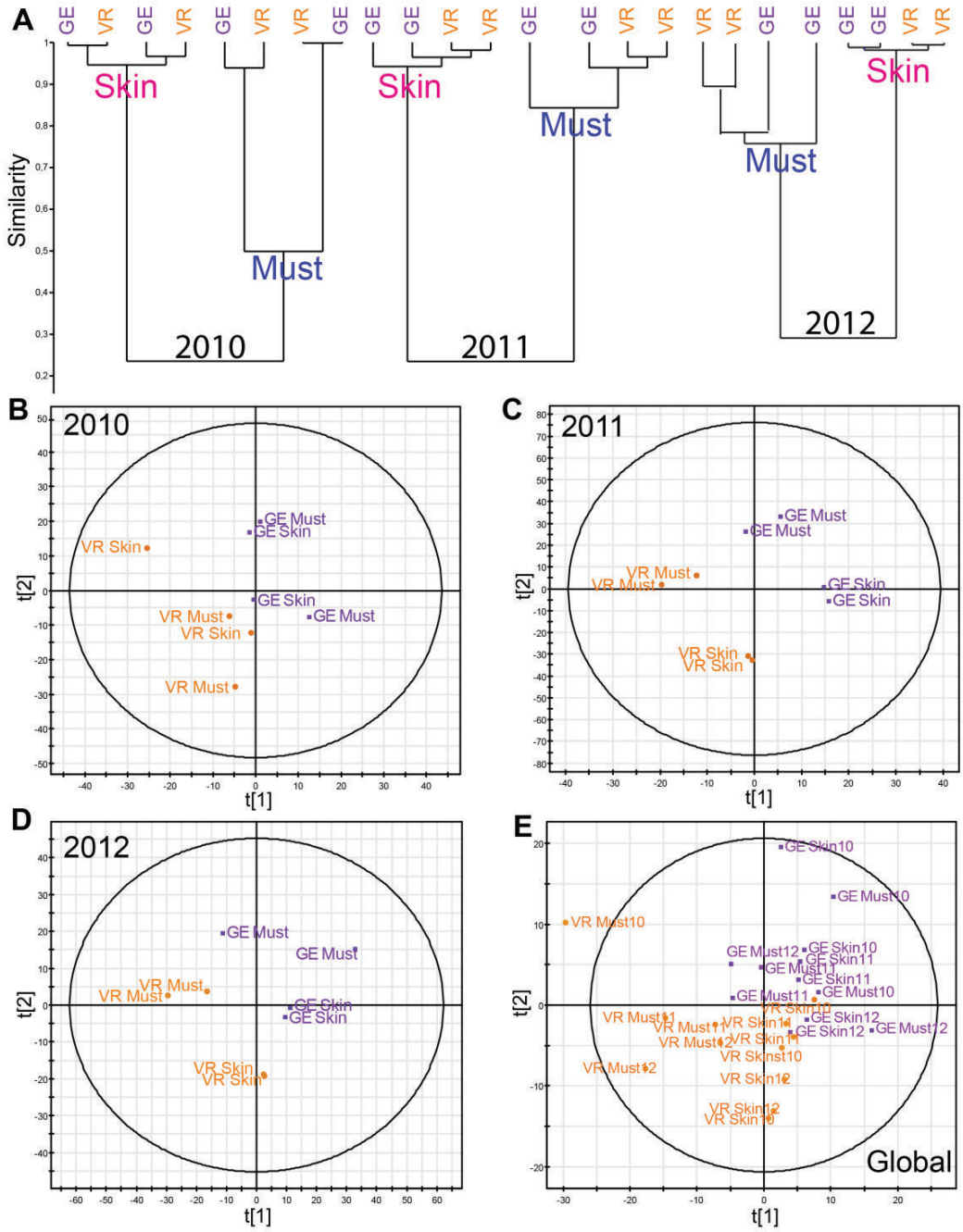


Figure 6: Terroir differentiation for skin and must samples from three different vintages (2010-2011-2012). (A) Hierarchical Cluster Analysis (HCA) of VR (in orange) and GE (in purple). Skin and must samples are from 2010, 2011 and 2012. Scores plot of the PLS-DA analysis of the negative-ion ESI FTICR-MS must and skin data from both vineyards VR and GE wines samples from (B) 2010 (C) 2011 (D) 2012 and (E) 2010-2011 and 2012.

CONCLUSION

This study marks the first implementation of non-targeted analyses of grape extracts and corresponding wines from two neighboring villages in the Côte de Nuits, managed by a same producer, in order to assess discriminations based on terroir and vintage. Our results show that FTICR-MS spectra of grape extracts and wines can be used to compare terroirs as small as the numerous "Climats de Bourgogne" through their wine and grape chemodiversities. Our results therefore demonstrate that Pinot noir grapes grown in two distinct "Grands Crus" appellations separated by less than 2 km, have distinct chemical signatures of environmental conditions related to local climatic, geology, pedology and phenology characteristics, all contributing to the identification of the so-called "terroir". This effect of terroir on metabolites is noticeable in wines, skin berries and especially musts. FTICR-MS allows the highest molecular resolution to date and thus the finest available visualization of the chemical composition that may be responsible for such fine discriminations. The first motivation of this manuscript was to highlight the chemical diversity in the wines, musts, and grape skins. Although we propose chemical structures based on the exact mass analysis, these identifications are only putative; further investigation is ongoing using UPLC-MS and tandem mass spectrometry complementary to the approach shown here to give conclusive structural identification of the metabolites of interest. Although the terroir effect was small compared to the variability induced by berry compartments or vintages, it could be significantly identified within individual vintages. Therefore, our results contribute to the representation of how wines – considered as pieces of art in terms of chemical equilibrium –bring messages from their birthplaces to the glass.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Domaine de la Romanée Conti (Vosne Romanée, France) for providing grape and wine samples and students in the DNO program who participated to the sampling. Alissa Aron is warmly acknowledged for the careful reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Chira K, Pacella N, Jourdes M, Teissedre P-L (2011) Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. Food Chem 126: 1971–1977. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.056.

2. Cuadros-Inostroza A, Giavalisco P, Hummel J, Eckardt A, Willmitzer L, et al. (2010) Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. Anal Chem 82: 3573–3580. doi:10.1021/ac902678t.

3. Lund ST, Bohlmann J (2006) The Molecular Basis for Wine Grape Quality-A Volatile Subject. Science 311: 804–805. doi:10.1126/science.1118962.

4. Gougeon RD, Lucio M, Frommberger M, Peyron D, Chassagne D, et al. (2009) The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 9174–9179. doi:10.1073/pnas.0901100106.

5. Seguin G (1986) "Terroirs" and pedology of wine growing. Experientia 42: 861–873. doi:10.1007/BF01941763.

6. Vaudour E (2003) Approche écophysiologique à la parcelle. Les terroirs viticoles Ed Dunod, Paris 5: 91–101.

7. Riou C, Morlat R, Asselin C (1995) Une approche intégrée des terroirs viticoles: discussions sur les critères de caractérisation accessibles. Bulletin de l'OIV 68: 93–106.

8. Van Leeuwen C, Roby JP, Pernet D, Bois B (2010) Methodology of soil-based zoning for viticultural terroirs. Bulletin de l'OIV 83: 13.

9. Van Leeuwen C, Friant P, Choné X, Tregoat O, Koundouras S, et al. (2004) Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. Am J Enol Vitic 55: 207–217.

10. Morlat R, Bodin F (2006) Characterization of Viticultural Terroirs using a Simple Field Model Based on Soil Depth – II. Validation of the Grape Yield and Berry Quality in the Anjou Vineyard (France). Plant Soil 281: 55–69. doi:10.1007/s11104-005-3769-z.

11. Cortell JM, Halbleib M, Gallagher AV, Righetti TL, Kennedy JA (2005) Influence of Vine Vigor on Grape (Vitis vinifera L. Cv. Pinot Noir) and Wine Proanthocyanidins. J Agric Food Chem 53: 5798–5808. doi:10.1021/jf0504770.

12. Russell K, Zivanovic S, Morris W c., Penfield M, Weiss J (2005) The Effect of Glass Shape on the Concentration of Polyphenolic Compounds and Perception of Merlot Wine. J Food Quality 28: 377–385. doi:10.1111/j.1745-4557.2005.00041.x.

13. Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y, van Leeuwen C (2006) Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated Cv. Agiorgitiko (Vitis vinifera L.). Effects on Wine Phenolic and Aroma Components. J Agric Food Chem 54: 5077–5086. doi:10.1021/jf0605446.

14. Capron X, Smeyers-Verbeke J, Massart DL (2007) Multivariate determination of the geographical origin of wines from four different countries. Food Chem 101: 1585–1597. doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.019.

15. Smeyers-Verbeke J, Jäger H, Lanteri S, Brereton P, Jamin E, et al. (2009) Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part II: descriptive and inductive univariate statistics. Eur Food Res Technol 230: 15–29. doi:10.1007/s00217-009-1142-9.

16. Charlton AJ, Wrobel MS, Stanimirova I, Daszykowski M, Grundy HH, et al. (2010) Multivariate discrimination of wines with respect to their grape varieties and vintages. Eur Food Res Technol 231: 733–743. doi:10.1007/s00217-010-1299-2.

17. Kumsta M, Pavlousek P, Kupsa J (2012) Influence of terroir on the concentration of selected stilbenes in wines of the cv. Riesling in the Czech Republic. Hortic Sci 39: 38–46.

18. Roullier-Gall C, Boutegrabet L, Gougeon RD, Schmitt-Kopplin P (2014) A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. Food Chem 152: 100–107. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.056.

19. Pereira GE, Gaudillere J-P, Leeuwen C van, Hilbert G, Maucourt M, et al. (2006) 1H NMR metabolite fingerprints of grape berry: Comparison of vintage and soil effects in Bordeaux grapevine growing areas. Anal Chim Acta 563: 346–352. doi:10.1016/j.aca.2005.11.007.

20. Fischer U, Roth D, Christmann M (1999) The impact of geographic origin, vintage and wine estate on sensory properties of Vitis vinifera cv. Riesling wines. Food Qual Prefer 10: 281–288. doi:10.1016/S0950-3293(99)00008-7.

21. Pereira GE, Gaudillere J, Van Leeuwen C, Hilbert G, Maucourt M, et al. (2007) 1H-NMR metabolic profiling of wines from three cultivars, three soil types and two contrasting vintages. J Int Sci Vigne Vin 41: 103.

22. Brescia M., Caldarola V, De Giglio A, Benedetti D, Fanizzi F., et al. (2002) Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. Anal Chim Acta 458: 177–186. doi:10.1016/S0003-2670(01)01532-X.

23. Vilanova M, Zamuz S, Vilariño F, Sieiro C (2007) Effect of terroir on the volatiles of Vitis vinifera cv. Albariño. J Sci Food Agric 87: 1252–1256. doi:10.1002/jsfa.2833.

24. Römisch U, Jäger H, Capron X, Lanteri S, Forina M, et al. (2009) Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part III: multivariate discrimination and classification methods. Eur Food Res Technol 230: 31–45.

25. Son H-S, Kim KM, van den Berg F, Hwang G-S, Park W-M, et al. (2008) 1H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. J Agric Food Chem 56: 8007–8016. doi:10.1021/jf801424u.

26. López-Rituerto E, Savorani F, Avenoza A, H. Busto J, Peregrina JM, et al. (2012) Investigations of La Rioja terroir for wine production using 1H NMR metabolomics. J Agric Food Chem 60: 3452–3461.

27. Tarr PT, Dreyer ML, Athanas M, Shahgholi M, Saarloos K, et al. (2013) A metabolomics based approach for understanding the influence of terroir in Vitis Vinifera L. Metabolomics 9: 170–177. doi:10.1007/s11306-013-0497-x.

28. Pereira GE, Gaudillere J-P, Van Leeuwen C, Hilbert G, Lavialle O, et al. (2005) 1H NMR and Chemometrics To Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux, France. J Agric Food Chem 53: 6382–6389. doi:10.1021/jf058058q.

29. Kashif A, Maltese F, Toepfer R, Choi YH, Verpoorte R (2011) Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. J Biomol NMR 49: 255–266. doi:10.1007/s10858-011-9487-3.

30. Godelmann R, Fang F, Humpfer E, Schütz B, Bansbach M, et al. (2013) Targeted and Nontargeted Wine Analysis by 1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. J Agric Food Chem 61: 5610–5619. doi:10.1021/jf400800d.

31. Liger-Belair G, Cilindre C, Gougeon RD, Lucio M, Gebefügi I, et al. (2009) Unraveling different chemical fingerprints between a champagne wine and its aerosols. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 16545–16549. doi:10.1073/pnas.0906483106.

32. Gougeon RD, Lucio M, Boutegrabet L, Peyron D, Feuillat F, et al. (2011) Authentication Approach of the Chemodiversity of Grape and Wine by FTICR-MS. In: Ebeler SE, Takeoka GR, Winterhalter P, editors. Progress in Authentication of Food and Wine. Washington, DC: American Chemical Society, Vol. 1081. pp. 69–88.

33. Forcisi S, Moritz F, Kanawati B, Tziotis D, Lehmann R, et al. (2013) Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. J Chrom A 1292: 51–65. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.017.

34. Theodoridis GA, Gika HG, Want EJ, Wilson ID (2012) Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. Anal Chim Acta 711: 7–16. doi:10.1016/j.aca.2011.09.042.

35. Müller C, Dietz I, Tziotis D, Moritz F, Rupp J, et al. (2013) Molecular cartography in acute Chlamydia pneumoniae infections-a non-targeted metabolomics approach. Anal Bioanal Chem

36. Sawaya ACHF, Catharino RR, Facco EMP, Fogaça A, Godoy HT, et al. (2011) Monitoring of wine aging process by electrospray ionization mass spectrometry. Ciência e Tecnologia de Alimentos 31: 730–734. doi:10.1590/S0101-20612011000300027.

37. Villagra E, Santos LS, Vaz BG, Eberlin MN, Felipe Laurie V (2012) Varietal discrimination of Chilean wines by direct injection mass spectrometry analysis combined with multivariate statistics. Food Chem 131: 692–697. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.078.

38. Cooper HJ, Marshall AG (2001) Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. J Agric Food Chem 49: 5710–5718. doi:10.1021/jf0108516.

39. Schmitt-Kopplin P, Liger-Belair G, Koch BP, Flerus R, Kattner G, et al. (2012) Dissolved organic matter in sea spray: a transfer study from marine surface water to aerosols. Biogeosciences.

40. Schmitt-Kopplin P, Gabelica Z, Gougeon RD, Fekete A, Kanawati B, et al. (2010) High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 2763–2768. doi:10.1073/pnas.0912157107.

41. Hertkorn N, Ruecker C, Meringer M, Gugisch R, Frommberger M, et al. (2007) High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems. Anal Bioanal Chem 389: 1311–1327. doi:10.1007/s00216-007-1577-4.

42. Tziotis D, Hertkorn N, Schmitt-Kopplin P (2010) Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng) 17: 415–421.

43. Datamining metabolomics [Elektronische Ressource] : the convergence point of non-target approach and statistical investigation / Marianna Lucio (2009). Available: http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:91-diss-20080916-673608-1-4.

44. Rodriguez-Delgado MA, González G, Pérez-Trujillo JP, Garcia-Montelongo FJ (2002) Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. Food Chem 76: 371–375. doi:10.1016/S0308-8146(01)00258-8.

45. Goldberg DM, Ng E, Karumanchiri A, Yan J, Diamandis EP, et al. (1995) Assay of resveratrol glucosides and isomers in wine by direct-injection high-performance liquid chromatography. J Chrom A 708: 89–98. doi:10.1016/0021-9673(95)00368-W.

46. Boutegrabet L, Fekete A, Hertkorn N, Papastamoulis Y, Waffo-Téguo P, et al. (2011) Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography. Anal Bioanal Chem 401: 1513–1521. doi:10.1007/s00216-011-4879-5.

47. 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. Am J Enol Vitic 46: 1–4.

48. Piñeiro Z, Cantos-Villar E, Palma M, Puertas B (2011) Direct Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Quantification of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Red Wines. J Agric Food Chem 59: 11683–11689. doi:10.1021/jf202254t.

49. Lee JE-Y, Yan J, Seshia AA (2009) Low loss HF band SOI wine glass bulk mode capacitive square-plate resonator. J Micromech Microeng 19: 074003. doi:10.1088/0960-1317/19/7/074003.

50. Zheng S (2012) QBoost: Predicting quantiles with boosting for regression and binary classification. Expert Syst Appl 39: 1687–1697. doi:10.1016/j.eswa.2011.06.060.

51. Wägele B, Witting M, Schmitt-Kopplin P, Suhre K (2012) MassTRIX Reloaded: Combined Analysis and Visualization of Transcriptome and Metabolome Data. PLoS One 7.

52. 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.). Aust J Grape Wine R 16: 464–468. doi:10.1111/j.1755-0238.2010.00107.x.

53. Catharino RR, Cunha IBS, Fogaça AO, Facco EMP, Godoy HT, et al. (2006) Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom 41: 185–190. doi:10.1002/jms.976.

54. Boutegrabet L, Kanawati B, Gebefügi I, Peyron D, Cayot P, et al. (2012) Attachment of Chloride Anion to Sugars: Mechanistic Investigation and Discovery of a New Dopant for Efficient Sugar Ionization/Detection in Mass Spectrometers. Chem Eur J 18: 13059–13067. doi:10.1002/chem.201103788.

55. Suhre K, Schmitt-Kopplin P (2008) MassTRIX: mass translator into pathways. Nucl Acids Res 36: W481–W484. doi:10.1093/nar/gkn194.

56. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, et al. (1998) Experimental design and optimization. Chemometr Intell Lab Systems 42: 3–40. doi:10.1016/S0169-7439(98)00065-3.

57. Boutegrabet L (2012) Approche métabolomique dans l'analyse de l'évolution oxydative des vins en spectrométrie de masse à très haute résolution. Dijon.

3 Conclusion générale du chapitre 4

Ces deux études ont permis de montrer que le terroir est un concept ambivalent, faisant référence au sol, à l'interaction sol-cépage, au climat, aux savoir-faire des vignerons mais également à la relation entre l'environnement naturel et la vigne, le cépage, et la physiologie de la plante. Ces résultats précisent également le lien entre le terroir, le millésime et la composition du vin. L'explicitation du lien entre terroir et millésime était essentielle pour expliquer l'impact des différents terroirs sur la composition du vin.

Enfin l'analyse FTICR-MS a permis de caractériser cet impact ainsi que l'évaluation des différences de composition induites par celui-ci. Ainsi, si nous supposons qu'au travers de sa composition chimique instantanée, un vin garde une mémoire métabolique des différents facteurs environnementaux à l'œuvre au moment de son élaboration, ces résultats montrent pour la première fois qu'il est possible de lire dans cette mémoire métabolique des signatures spécifiques de terroirs qui peuvent être relatives aux innombrables Climats de Bourgogne.

Mais le résultat le plus surprenant est que ces signatures ont été plus facilement détectées après plusieurs années de vieillissement en bouteille, illustrant ainsi le rôle révélateur de la cave (de vieillissement) et de la dimension temporelle qui lui est associée dans l'identité du vin. Enfin, même si la composition du vin garde en mémoire l'impact très fort du millésime, le terroir module la composition chimique et ce à l'échelle d'une région, ou même d'un village l'intérieur même de chaque millésime.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Ce projet innovant en terme d'analyse des vins a été initié en 2008 avec la thèse de Lemia Boutegrabet réalisée en cotutelle entre l'Université de Bourgogne et l'Université Technique de Munich. L'objectif de la démarche était de développer des approches analytiques non ciblées de la composition moléculaire des vins en ne s'intéressant pas seulement à des vins en cours d'élaboration, mais plutôt à des vins ayant déjà vieilli en

bouteille. L'idée de cartographier l'évolution temporelle des espaces chimiques des vins reposait sur l'hypothèse que même après plusieurs années de vieillissement, les vins embouteillés conservent des signatures chimiques relatives à des paramètres environnementaux à l'œuvre au moment de leur élaboration. Les premiers résultats avaient en effet montré qu'il est possible d'identifier des corrélations entre par exemple des pratiques œnologiques (pouvant contribuer à l'oxydation des vins) et la composition métabolomique des vins, l'étude reposant sur la capacité de la Spectrométrie de Masse à Transformée de Fourier et à Résonance Cyclotronique des Ions à analyser la complexité moléculaire des vins.

Les résultats obtenus depuis permettent d'avancer dans la validation de cette hypothèse de mémoire métabolomique, puisqu'ils nous ont permis de lire des signatures relatives à des pratiques œnologiques telles que le sulfitage au pressurage, le terroir, le millésime, et ils permettraient même de situer l'origine géographique, d'identifier le cépage et de dater des vins pour lesquels ces paramètres sont inconnus.

Dans le but de dépasser les limites de la FTICR-MS, et notamment la différenciation des isomères ainsi que l'incapacité à identifier structuralement des composés marqueurs, la spectrométrie de masse à très haute résolution a été complétée par d'autres techniques non ciblées telles que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS), la spectrométrie de masse en tandem (MS^2) et la spectroscopie de fluorescence (EEMF). Le but ultime en métabolomique – à savoir détecter, identifier et quantifier tous les métabolites d'un échantillon – reste cependant inatteignable à ce jour en ce qui concerne le vin, notamment à cause de l'extrême diversité de composition chimique et de concentrations des métabolites présents.

Cependant, l'utilisation de ces techniques combinées a notamment permis d'aborder avec une puissance d'analyse nouvelle l'étude des processus de vieillissement du vin en bouteille. Pour ce faire, en plus des séries verticales provenant du Domaine de la Velle (une série de Chardonnay et une série de Pinot noir) déjà obtenues précédemment, 5 nouvelles séries verticales ont étés analysées (trois séries de Chardonnay provenant des Domaine Dauvissat, Compte Lafon et Bouchard père et fils ainsi que deux séries de Pinot noir provenant du Domaine de la Romanée Conti). Les résultats obtenus par FTICR-MS et par UPLC-Q-ToF-MS montrent une séparation des vins en deux grands groupes d'âge : les vins jeunes (1991-2012) et les vins plus anciens (1934-1990) avec une séparation au niveau des millésimes 1990 et 1991. L'analyse par spectroscopie de fluorescence a confirmé ce résultat pour la verticale de Corton-Charlemagne notamment avec l'étude du rapport des

composantes C2/C4 qui présente une rupture de pente au niveau des millésimes 1980-1990. La signification de cette rupture reste cependant à explorer.

Le traitement statistique de l'ensemble des données FTICR-MS de vins rouges analysés dans le cadre de cette thèse montre quant à lui de manière remarquable qu'il est possible de classer les vins en fonction de leurs millésimes, indépendamment de leurs origine, avec cette fois 5 grands groupes : les vins jeunes (2012-1990), les vins plus anciens (1991-1956), les vins de pommard 1921, les vins de Romanée Saint Vivant 1915 et de vieux vins (SV1 et SV2) dont le millésime probable (entre 1772 et 1860) a été estimé par datation au carbone-14. Ces résultats nous ont permis de conclure qu'un vin garde une signature métabolique de son millésime.

Parmi les composés qui ont pu être associés aux masses marqueurs de vieillissement du vin à l'aide de traitements statistiques ne considérant que les masses suivant une évolution d'intensité croissante ou décroissante avec le vieillissement, nous trouvons une majorité de composés en CHO décroissant et de composés azotés croissant (CHNO). Un grand nombre de masses évoluant avec l'âge du vin a été trouvé dans les verticales (1691 masses en FTICR-MS, 2288 en RP-UPLC-MS par exemple) cependant l'identification structurale de ces masses reste l'étape limitante. Cette étude illustre parfaitement la difficulté de travailler avec un grand ensemble de données inconnues. En effet, si de façon générale l'annotation de métabolites par les bases de données représente environ 20% des données générées, l'attribution de structures à une formule brute est extrêmement compliquée dans la mesure où il est difficile de vérifier la véracité de cette attribution structurale sans comparaison avec un standard.

Un point primordial pour la poursuite de l'étude métabolomique des vins et principalement pour l'annotation des masses marqueurs réside dans le développement d'une base de données regroupant l'ensemble des métabolites rencontrés dans le vin et le raisin. De telles bases de données sont actuellement en développement, notamment à l'institut de la vigne et du vin (Université de Bourgogne) mais même si celles-ci regroupent l'ensemble des métabolites identifiés dans le vin et le raisin à ce jour, notamment les composés volatils et les composés non volatils les plus concentrés, elles restent incomplètes puisque seule une petite partie de la composition chimique du vin est actuellement identifiée.

Du point de vue contextuel, cette approche innovante de l'analyse des vins s'inscrit dans une volonté de mettre en œuvre des outils originaux et performants, qui permettent d'apporter des réponses à des questions ou problèmes rencontrés par la filière vitivinicole.

Parmi ces problèmes, la stabilité oxydative des vins blancs est clairement identitaire de la Bourgogne ou de la Champagne. Ainsi, afin d'apporter des connaissances sur ce problème souvent présenté comme une oxydation prématurée des vins blancs, l'impact de diverses pratiques œnologiques sur la composition chimique des vins a été évaluée, en s'intéressant à des vins issus d'expérimentations mises en place par les interprofessions de Bourgogne et de Champagne durant la dernière décénie.

Plusieurs niveaux de variabilité pouvant impacter la composition du vin ont été étudiés, notamment la variabilité « œnologique », par l'étude de pratiques viti-vinicole telles que le choix de l'obturateur, le débourbage ou la dose de SO_2 au pressurage. Si l'impact du millésime est présent majoritairement (quel que soit l'analyse statistique, la technique analytique ou encore la série d'échantillons) le choix du type d'obturateur est l'étape finale qui va conditionner la stabilité du vin en bouteille. La comparaison de la composition d'un champagne bouché par des capsules présentant trois niveaux de perméabilité à l'oxygène (faible, moyenne et élevé), pendant la prise de mousse et l'élevage sur lattes, montre clairement le rôle du bouchage et de l'oxygène dans l'équilibre du vin. Cependant, c'est la dose de SO_2 au pressurage qui impacte le plus l'aptitude du vin au vieillissement. Considérés ensemble, ces résultats nous ont permis de montrer qu'il est possible de hiérarchiser les contributions de différents paramètres œnologiques à la stabilité oxydative des vins blancs secs. En outre, des outils accessibles tels que la fluorescence semblent être prometteurs pour la mise en place de méthodes de détection précoce de marqueurs rédox des vins.

En plus du fort impact du millésime, les études de série de vins et notamment des séries verticales montrent une incidence élevée de l'appellation et même du domaine dans l'empreinte métabolomique. En effet, l'analyse statistique simultanée de toutes les verticales a présenté non seulement une séparation des échantillons de vins rouges et de vins blancs, mais également une distinction nette entre les vins par domaine d'origine. Fort de cette constatation, l'hypothèse selon laquelle les vins seraient non seulement impactés par les pratiques viti-vinicoles comme on vient de le montrer, mais également par leurs origines géographiques a été posée. C'est pourquoi une étude sur des séries de vins rouges Bourguignons (Pinot noir) a été réalisée, avec des vins provenant de parcelles différentes d'un même domaine, vinifiés de façon identique. Les résultats ont confirmé l'existence d'une trace de l'origine géographique dans la mémoire métabolomique des vins et ce même à l'échelle des innombrables parcelles Bourguignonnes. Ces différents niveaux d'impact sur la

composition métabolomique interagissent étroitement pour donner des profils uniques à chaque vin.

La limite majeure de ces études, en plus de la difficulté de travailler avec de grands ensembles de données inconnues, est l'absence fréquente de triplicats pour l'échantillonnage. Les études statistiques nécessitent des répétitions, d'autant plus qu'une bouteille de vin n'est pas toujours représentative d'un lot ou d'un millésime comme l'illustre la verticale de Meursault du Domaine des comtes Lafon où 4 bouteilles de l'année 1996 ont été ouvertes, dégustées et analysées. La dégustation a révélé qu'une bouteille était exceptionnelle, deux sans défauts marqués, et la dernière oxydée (annexe 3). Grâce aux études réalisées en triplicat sur des vins issus d'expérimentations au sein des interprofessions de Bourgogne et de Champagne, nous avons cependant prouvé une très bonne répétabilité de ces analyses non ciblées, aussi bien en termes de fréquences de pics détéctés dans une série verticale, qu'en termes de coefficient de variation de l'intensité des milliers de pics détectés pour des répétitions biologiques.

Pour conclure, la métabolomique et notamment l'utilisation des différentes techniques de spectrométrie de masse est clairement une approche puissante et efficace pour l'étude de la complexité du vin. A cet égard, la collaboration entre l'université de Bourgogne – pour laquelle la vigne et le vin est un secteur scientifique d'excellence – et le centre Helmholtz de Munich/université Technique de Munich, qui dispose d'équipements analytiques sans équivalents en France aujourd'hui, représente un atout majeur pour des développements scientifiques au profit de la filière vitivinicole.

Références bibliographiques

1. OIV P (2012) Statistiques vitivinicoles mondiales 2012.

2. Garcia J-P (2011) Les “climats” du vignoble de Bourgogne comme patrimoine mondial de l’humanité. Available at: http://halshs.archives-ouvertes.fr/halshs-00598847 [Accessed February 18, 2014].

3. McGovern PE, Glusker DL, Exner LJ, Voigt MM (1996) Neolithic resinated wine. *Nature* 381(6582):480–481.

4. McGovern PE (2013) *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture* (Princeton University Press).

5. Ribéreau-Gayon P, DUBOURDIEU D, DONÈCHE B (2012) Traité d’oenologie. Tome 2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements (6 Éd.).

6. Ortega-Heras M, González-SanJosé M., Beltrán S (2002) Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Analytica Chimica Acta* 458(1):85–93.

7. Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B (2006) Evolution of the phenolic content of red wines from Vitis vinifera L. during ageing in bottle. *Food Chemistry* 95(3):405–412.

8. Monagas M, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C (2005) Evolution of polyphenols in red wines from Vitis vinifera L. during aging in the bottle. *Eur Food Res Technol* 220(3-4):331–340.

9. Waterhouse AL (2002) Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957(1):21–36.

10. Gougeon RD, et al. (2009) The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. *PNAS* 106(23):9174–9179.

11. Roullier-Gall C, Boutegrabet L, Gougeon RD, Schmitt-Kopplin P (2014) A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. *Food Chemistry* 152:100–107.

12. Roullier-Gall C, Lucio M, Noret L, Schmitt-Kopplin P, Gougeon RD (2014) How Subtle Is the “Terroir” Effect? Chemistry-Related Signatures of Two “Climats de Bourgogne.” *PLoS ONE* 9(5):e97615.

13. Seguin G (1986) “Terroirs” and pedology of wine growing. *Experientia* 42(8):861–873.

14. Vaudour E (2003) Approche écophysiologique à la parcelle. *Les terroirs viticoles Ed Dunod, Paris* 5:91–101.

15. Riou C, Morlat R, Asselin C Une approche intégrée des terroirs viticoles: discussions sur les critères de caractérisation accessibles. *Bulletin de l’OIV* 68(767-68):93–106.

16. Leeuwen C van, et al. (2004) Influence of Climate, Soil, and Cultivar on Terroir. *Am J Enol Vitic* 55(3):207–217.

17. Stern DJ, Guadagni D, Stevens KL (1975) Aging of wine: qualitative changes in the volatiles of Zinfandel wine during two years. *American Journal of Enology and Viticulture* 26(4):208–213.

18. Chin S-T, Eyres GT, Marriott PJ (2011) Identification of potent odourants in wine and brewed coffee using gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1218(42):7487–7498.

19. Marti MP, Mestres M, Sala C, Busto O, Guasch J (2003) Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(27):7861–7865.

20. Chisholm MG, Guiher LA, Vonah TM, Beaumont JL (1994) Comparison of some French-American hybrid wines with White Riesling using gas chromatography-olfactometry. *American journal of enology and viticulture* 45(2):201–212.

21. Cheynier V, et al. (2006) Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *Am J Enol Vitic* 57(3):298–305.

22. Silva Ferreira AC, Hogg T, Guedes de Pinho P (2003) Identification of Key Odorants Related to the Typical Aroma of Oxidation-Spoiled White Wines. *J Agric Food Chem* 51(5):1377–1381.

23. Chira K, Pacella N, Jourdes M, Teissedre P-L (2011) Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry* 126(4):1971–1977.

24. Boutegrabet L, et al. (2011) Determination of stilbene derivatives in Burgundy red wines by ultra-high-pressure liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401(5):1517–1525.

25. Gabrielli M, Fracassetti D, Tirelli AG (2014) UHPLC quantification of sotolon in white wine. *J Agric Food Chem*.

26. Guadalupe Z, Martínez-Pinilla O, Garrido Á, Carrillo JD, Ayestarán B (2012) Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chemistry* 131(1):367–374.

27. Hertkorn N, Harir M, Koch B, Michalke B, Schmitt-Kopplin P (2013) High-field NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry: powerful discovery tools for the molecular level characterization of marine dissolved organic matter. *Biogeosciences* 10:1583–1624.

28. Hertkorn N, et al. (2007) High-precision frequency measurements: indispensable tools at the core of the molecular-level analysis of complex systems. *Anal Bioanal Chem* 389(5):1311–1327.

29. Gougeon RD, et al. (2011) Authentication Approach of the Chemodiversity of Grape and Wine by FTICR-MS. *Progress in Authentication of Food and Wine*, eds Ebeler SE, Takeoka GR, Winterhalter P (American Chemical Society, Washington, DC), pp 69–88.

30. Forcisi S, et al. (2013) Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *Journal of Chromatography A* 1292:51–65.

31. Ribéreau-Gayon P, et al. (2000) *Handbook of Enology, Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications; Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (John Wiley and Sons, New York).

32. Crespy A (2009) *De la vigne à la cave: évaluation de la quantité et de la qualité d'une récolte. Maturation, composition et amélioration des baies* (Œnoplurimédia).

33. Renvoisé G (1996) *Le monde du vin, art ou bluff* (Editions du Rouergue).

34. Atanassov I, Hvarleva T, Rusanov K, Tsvetkov I, Atanassov A (2009) Wine Metabolite Profiling: Possible Application in Winemaking and Grapevine Breading in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23(4):1449–1452.

35. Cuadros-Inostroza A, et al. (2010) Discrimination of Wine Attributes by Metabolome Analysis. *Anal Chem* 82(9):3573–3580.

36. Gómez-Plaza E, Pérez-Prieto LJ, Fernández-Fernández JI, López-Roca JM (2004) The effect of successive uses of oak barrels on the extraction of oak-related volatile compounds from wine. *International journal of food science & technology* 39(10):1069–1078.

37. Puech J-L (1987) Extraction of phenolic compounds from oak wood in model solutions and evolution of aromatic aldehydes in wines aged in oak barrels. *American Journal of Enology and Viticulture* 38(3):236–238.

38. Towey JP, Waterhouse AL (1996) The extraction of volatile compounds from French and American oak barrels in Chardonnay during three successive vintages. *American Journal of Enology and Viticulture* 47(2):163–172.

39. Vivas N, VIVAS DGN, NONIER M-F, Nedjma M (2001) Les phénomènes colloïdaux et l'intérêt des lies dans l'élevage des vins rouges: une nouvelle approche technologique et méthodologique. *Revue française d'oenologie* 189:33–38.

40. Vidal S, et al. (2004) The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry* 85(4):519–525.

41. Vernhet A, Moutounet M (2002) Fouling of organic microfiltration membranes by wine constituents: importance, relative impact of wine polysccharides and polyphenols and incidence of membrane properties. *Journal of Membrane Science* 201(1–2):103–122.

42. Ulbricht M, Ansorge W, Danielzik I, König M, Schuster O (2009) Fouling in microfiltration of wine: The influence of the membrane polymer on adsorption of polyphenols and polysaccharides. *Separation and Purification Technology* 68(3):335–342.

43. James AT, Martin AJP (1952) Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. *Analyst* 77(921):915–932.

44. López R, Aznar M, Cacho J, Ferreira V (2002) Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 966(1):167–177.

45. Gomez E, Martinez A, Laencina J (1995) Changes in volatile compounds during maturation of some grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 67(2):229–233.

46. Van Ruth SM (2001) Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomolecular Engineering* 17(4):121–128.

47. Walker G, Winterlin W, Fouda H, Seiber J (1974) Gas chromatographic analysis of urethane (ethyl carbamate) in wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 22(6):944–947.

48. Slingsby RW, Kepner RE, Muller CJ, Webb AD (1980) Some volatile components of Vitis vinifera variety Cabernet Sauvignon wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 31(4):360–363.

49. Boelens MH, van Gemert LJ (1993) Volatile character-impact sulfur compounds and their sensory properties. *Perfumer & flavorist* 18(3):29–34.

50. Mestres M, Busto O, Guasch J (2000) Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A* 881(1–2):569–581.

51. Tominaga T, Baltenweck-Guyot R, Des Gachons CP, Dubourdieu D (2000) Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several Vitis vinifera grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture* 51(2):178–181.

52. Tominaga T, Murat M-L, Dubourdieu D (1998) Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from Vitis vinifera L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(3):1044–1048.

53. Darriet P, Tominaga T, Lavigne V, Boidron J-N, Dubourdieu D (1995) Identification of a powerful aromatic component of Vitis vinifera L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour and Fragrance Journal* 10(6):385–392.

54. Fang Y, Qian MC (2005) Sensitive quantification of sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction technique. *Journal of Chromatography A* 1080(2):177–185.

55. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW (2011) *Introduction to modern liquid chromatography* (John Wiley & Sons).

56. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (2012) *Practical HPLC method development* (John Wiley & Sons).

57. Colin H, Guiochon G (1977) Introduction to reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 141(3):289–312.

58. YASHIN YI (1993) Scientometric study of the state and developmental tendencies of chromatographic methods and apparatus. *Journal of analytical chemistry* 48(3):290–298.

59. Martin AJP, Synge RM (1941) A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochemical Journal* 35(12):1358.

60. Gruz J, Novák O, Strnad M (2008) Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC–MS/MS. *Food Chemistry* 111(3):789–794.

61. Stalikas CD (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science* 30(18):3268–3295.

62. Fracassetti D, et al. (2011) Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food chemistry* 128(4):1136–1142.

63. Ferreira RB, Piçarra-Pereira MA, Monteiro S, Loureiro VB, Teixeira AR (2001) The wine proteins. *Trends in food science & technology* 12(7):230–239.

64. Tarola AM, Giannetti V (2007) Determination by LC of polyphenols in Italian red wine. *Chromatographia* 65(5-6):367–371.

65. Tarola AM, Milano F, Giannetti V (2007) Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Red Wines by HPLC-UV. *Analytical Letters* 40(12):2433–2445.

66. Kerem Z, Bravdo B, Shoseyov O, Tugendhaft Y (2004) Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography A* 1052(1):211–215.

67. Jeandet P, et al. (1995) Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine. *J Agric Food Chem* 43(2):316–319.

68. Elias RJ, Laurie VF, Ebeler SE, Wong JW, Waterhouse AL (2008) Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica chimica acta* 626(1):104–110.

69. Taylor RF (1983) Chromatography of carotenoids and retinoids. *Advances in chromatography* 22:157–213.

70. Merken HM, Beecher GR (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3):577–599.

71. Mato I, Suárez-Luque S, Huidobro JF (2005) A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International* 38(10):1175–1188.

72. Önal A (2007) A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 103(4):1475–1486.

73. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M de L, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113(4):859–871.

74. Pellegrini N, et al. (2000) Polyphenol content and total antioxidant activity of vini novelli (young red wines). *Journal of agricultural and food chemistry* 48(3):732–735.

75. Guerrero MS, Torres JS, Nuñez MJ (2008) Extraction of polyphenols from white distilled grape pomace: optimization and modelling. *Bioresource technology* 99(5):1311–1318.

76. Puech J-L, Feuillat F, Mosedale JR (1999) The tannins of oak heartwood: Structure, properties, and their influence on wine flavor. *American journal of Enology and Viticulture* 50(4):469–478.

77. Raczkowska J, Mielcarz G, Howard A, Raczkowski M (2011) UPLC and spectrophotometric analysis of polyphenols in wines available in the Polish market. *International Journal of Food Properties* 14(3):514–522.

78. Vitalini S, et al. (2011) From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin and total polyphenol contents and antiradical activity of red wines. *Journal of pineal research* 51(3):278–285.

79. Engström MT, et al. (2014) Rapid qualitative and quantitative analyses of proanthocyanidin oligomers and polymers by UPLC-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry* 62(15):3390–3399.

80. Janeš L, Lisjak K, Vanzo A (2010) Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica chimica acta* 674(2):239–242.

81. Ivanova V, et al. (2010) HPLC analysis of hydroxycinnamic acid derivatives in Smederevka and Chardonnay wines (Ohrid, R. Macedonia), pp 126–126.

82. Müller A, Steinhart H (2007) Recent developments in instrumental analysis for food quality. *Food Chemistry* 102(2):436–444.

83. Gu L, et al. (2003) Screening of Foods Containing Proanthocyanidins and Their Structural Characterization Using LC-MS/MS and Thiolytic Degradation. *J Agric Food Chem* 51(25):7513–7521.

84. Roland A, Schneider R, Guernevé CL, Razungles A, Cavelier F (2010) Identification and quantification by LC–MS/MS of a new precursor of 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) using stable isotope dilution assay: Elements for understanding the 3MH production in wine. *Food Chemistry* 121(3):847–855.

85. Fiehn O, et al. (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology* 18(11):1157–1161.

86. London RE, Houck DR (2004) Introduction to metabolomics and metabolic profiling. *Toxicogenomics: Principles and Applications New York: John Wiley & Sons, Inc*:299–340.

87. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E (1999) “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29(11):1181–1189.

88. Cooper HJ, Marshall AG (2001) Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. *J Agric Food Chem* 49(12):5710–5718.

89. Blow N (2008) Metabolomics: Biochemistry’s new look. *Nature* 455(7213):697–700.

90. Lund ST, Bohlmann J (2006) The Molecular Basis for Wine Grape Quality-A Volatile Subject. *Science* 311(5762):804–805.

91. López-Rituerto E, et al. (2012) Investigations of La Rioja terroir for wine production using 1H NMR metabolomics. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(13):3452–3461.

92. Liger-Belair G, et al. (2009) Unraveling different chemical fingerprints between a champagne wine and its aerosols. *PNAS* 106(39):16545–16549.

93. Boutegrabet L, et al. (2012) Attachment of Chloride Anion to Sugars: Mechanistic Investigation and Discovery of a New Dopant for Efficient Sugar Ionization/Detection in Mass Spectrometers. *Chemistry – A European Journal* 18(41):13059–13067.

94. Lucio M (2009) *Datamining Metabolomics: The Convergence Point of Non-target Approach and Statistical Investigation*.

95. Wilson ID, et al. (2005) High Resolution "Ultra Performance" Liquid Chromatography Coupled to oa-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Differential Metabolic Pathway Profiling in Functional Genomic Studies. *J Proteome Res* 4(2):591–598.

96. Lu X, et al. (2008) LC–MS-based metabonomics analysis. *Journal of Chromatography B* 866(1–2):64–76.

97. Theodoridis G, Gika HG, Wilson ID (2008) LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27(3):251–260.

98. Villas-Bôas SG, Mas S, \AAkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews* 24(5):613–646.

99. Wu Z, Huang NE (2009) Ensemble empirical mode decomposition: a noise-assisted data analysis method. *Advances in adaptive data analysis* 1(01):1–41.

100. Wishart DS (2011) Advances in metabolite identification. *Bioanalysis* 3(15):1769–1782.

101. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK (2007) Metabonomics in pharmaceutical R & D. *Febs Journal* 274(5):1140–1151.

102. Feng X, Liu X, Luo Q, Liu B-F (2008) Mass spectrometry in systems biology: An overview. *Mass Spectrometry Reviews* 27(6):635–660.

103. Goodacre R (2005) Metabolomics – the way forward. *Metabolomics* 1(1):1–2.

104. Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS (1998) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass spectrometry reviews* 17(1):1–35.

105. Ayrton J, Dear GJ, Leavens WJ, Mallett DN, Plumb RS (1998) Optimisation and routine use of generic ultra-high flow-rate liquid chromatography with mass spectrometric detection for the direct on-line analysis of pharmaceuticals in plasma. *Journal of Chromatography A* 828(1):199–207.

106. Cubbon S, Antonio C, Wilson J, Thomas-Oates J (2010) Metabolomic applications of HILIC–LC–MS. *Mass Spectrom Rev* 29(5):671–684.

107. Martin J-C, et al. (2014) Can we trust untargeted metabolomics? Results of the metabo-ring initiative, a large-scale, multi-instrument inter-laboratory study. *Metabolomics*:1–15.

108. Himmelsbach M (2012) 10years of MS instrumental developments–Impact on LC–MS/MS in clinical chemistry. *Journal of Chromatography B* 883:3–17.

109. Chen Q, et al. (2012) Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1β production in macrophages by targeting STAT3. *PloS one* 7(8):e42971.

110. Grata E, et al. (2008) UPLC–TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in Arabidopsis thaliana. *Journal of Chromatography B* 871(2):261–270.

111. Allwood JW, Goodacre R (2010) An introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal* 21(1):33–47.

112. Cevallos-Cevallos JM, Reyes-De-Corcuera JI, Etxeberria E, Danyluk MD, Rodrick GE (2009) Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology* 20(11–12):557–566.

113. Vaclavik L, Lacina O, Hajslova J, Zweigenbaum J (2011) The use of high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Analytica Chimica Acta* 685(1):45–51.

114. Rubert J, Lacina O, Fauhl-Hassek C, Hajslova J (2014) Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: a reliable tool for wine authentication? *Anal Bioanal Chem*.

115. Theodoridis G, et al. (2012) LC-MS based global metabolite profiling of grapes: solvent extraction protocol optimisation. *Metabolomics* 8(2):175–185.

116. Zhang H-M, et al. (2012) Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 62:258–273.

117. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M (2010) MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11(1):395.

118. Lommen A, Kools HJ (2012) MetAlign 3.0: performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware. *Metabolomics* 8(4):719–726.

119. Lommen A (2009) MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing. *Anal Chem* 81(8):3079–3086.

120. Cotugno P, Monopoli A, Nacci A, Zambonin CG, Calvano CD (2014) MALDI-MS and HILIC ESI-MS/MS as Versatile Tools for Detection of Monoethanolamine Degradation Products in a Real Postcombustion Carbon Dioxide Capture Plant. *Energy & Fuels* 28(2):1295–1303.

121. Schmitt-Kopplin P, et al. (2010) High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. *PNAS* 107(7):2763–2768.

122. Heeren RMA, Kleinnijenhuis AJ, McDonnell LA, Mize TH (2004) A mini-review of mass spectrometry using high-performance FTICR-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(4):1048–1058.

123. Aharoni A, et al. (2002) Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *Omics: a journal of integrative biology* 6(3):217–234.

124. Müller C, et al. (2013) Molecular cartography in acute Chlamydia pneumoniae infections-a non-targeted metabolomics approach. *Anal Bioanal Chem*.

125. Lucio M, Fekete A, Frommberger M, Schmitt-Kopplin P (2011) Metabolomics: High-Resolution Tools Offer to Follow Bacterial Growth on a Molecular Level. *Handbook of Molecular Microbial Ecology I*, ed Bruijn FJ de (John Wiley & Sons, Inc.), pp 683–695.

126. Gonsior M, Schmitt-Kopplin P, Bastviken D (2013) Depth-dependent molecular composition and photo-reactivity of dissolved organic matter in a boreal lake under winter and summer conditions. *Biogeosciences* 10(11):6945–6956.

127. Ohta D, Kanaya S, Suzuki H (2010) Application of Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to metabolic profiling and metabolite identification. *Current Opinion in Biotechnology* 21(1):35–44.

128. Becker L, et al. (2013) Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using negative ion electrospray – Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 795:44–51.

129. Arapitsas P, Speri G, Angeli A, Perenzoni D, Mattivi F (2014) The influence of storage on the "chemical age" of red wines. *Metabolomics*:1–17.

130. Gougeon RD, et al. (2009) Expressing Forest Origins in the Chemical Composition of Cooperage Oak Woods and Corresponding Wines by Using FTICR-MS. *Chem Eur J* 15(3):600–611.

131. Chen W, Westerhoff P, Leenheer JA, Booksh K (2003) Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental science & technology* 37(24):5701–5710.

132. Baghoth SA, Sharma SK, Amy GL (2011) Tracking natural organic matter (NOM) in a drinking water treatment plant using fluorescence excitation–emission matrices and PARAFAC. *Water research* 45(2):797–809.

133. He X-S, et al. (2011) Fluorescence excitation–emission matrix spectroscopy with regional integration analysis for characterizing composition and transformation of dissolved organic matter in landfill leachates. *Journal of hazardous materials* 190(1):293–299.

134. Gonsior M, et al. (2014) Photochemical Production of Polyols arising from Significant Photo-transformation of Dissolved Organic Matter in the Oligotrophic Surface Ocean. *Marine Chemistry*.

135. Seredyńska-Sobecka B, Stedmon CA, Boe-Hansen R, Waul CK, Arvin E (2011) Monitoring organic loading to swimming pools by fluorescence excitation–emission matrix with parallel factor analysis (PARAFAC). *Water research* 45(6):2306–2314.

136. Valencia S, Marín JM, Restrepo G, Frimmel FH (2014) Evaluation of natural organic matter changes from Lake Hohloh by three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy during TiO< sub> 2</sub>/UV process. *Water research* 51:124–133.

137. Kowalczuk P, et al. (2010) Characterization of dissolved organic matter fluorescence in the South Atlantic Bight with use of PARAFAC model: Relationships between fluorescence and its components, absorption coefficients and organic carbon concentrations. *Marine Chemistry* 118(1–2):22–36.

138. Herzsprung P, et al. (2012) Variations of DOM quality in inflows of a drinking water reservoir: linking of van Krevelen diagrams with EEMF spectra by rank correlation. *Environmental science & technology* 46(10):5511–5518.

139. Baker A (2002) Fluorescence excitation-emission matrix characterization of river waters impacted by a tissue mill effluent. *Environmental science & technology* 36(7):1377–1382.

140. Strasburg GM, Ludescher RD (1995) Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends in Food Science & Technology* 6(3):69–75.

141. Marhuenda-Egea FC, et al. (2007) Dissolved organic matter fractions formed during composting of winery and distillery residues: evaluation of the process by fluorescence excitation–emission matrix. *Chemosphere* 68(2):301–309.

142. Sádecká J, Tóthová J, Májek P (2009) Classification of brandies and wine distillates using front face fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry* 117(3):491–498.

143. Airado-Rodriguez D, Galeano-Díaz T, Duran-Meras I, Wold JP (2009) Usefulness of Fluorescence Excitation- Emission Matrices in Combination with PARAFAC, as Fingerprints of Red Wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(5):1711–1720.

144. Airado-Rodríguez D, Durán-Merás I, Galeano-Díaz T, Wold JP (2011) Front-face fluorescence spectroscopy: A new tool for control in the wine industry. *Journal of Food Composition and Analysis* 24(2):257–264.

145. Yin C, Li H, Ding C, Wang H (2009) Preliminary investigation on variety, brewery and vintage of wines using three-dimensional fluorescence spectroscopy. *Food science and technology research* 15(1):27–38.

146. Dufour E, Letort A, Laguet A, Lebecque A, Serra JN (2006) Investigation of variety, typicality and vintage of French and German wines using front-face fluorescence spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 563(1):292–299.

147. Schueuermann C, Bremer P, Silcock P, Hayman A (2014) The use of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1H-NMR) and Front-Face Fluorescence Spectroscopy to investigate the factors contributiong to character differences in wines produced from a small geographical region. (South Africa).

148. Cohen JS, Jaroszewski JW, Kaplan O, Ruiz-Cabello J, Collier SW (1995) A history of biological applications of NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 28(1):53–85.

149. Balas L, Vercauteren J, Laguerre M (1995) 2D NMR structure elucidation of proanthocyanidins: The special case of the catechin-(4α-8)-catechin-(4α-8)-catechin trimer. *Magnetic Resonance in Chemistry* 33(2):85–94.

150. Bishop PD, Nagel CW (1984) Characterization of the condensation product of malvidin 3, 5-diglucoside and catechin. *Journal of agricultural and food chemistry* 32(5):1022–1026.

151. Pereira GE, et al. (2006) 1H NMR metabolite fingerprints of grape berry: Comparison of vintage and soil effects in Bordeaux grapevine growing areas. *Analytica Chimica Acta* 563(1–2):346–352.

152. Son H-S, et al. (2008) 1H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *J Agric Food Chem* 56(17):8007–8016.

153. Son H-S, et al. (2009) Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using 1H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *J Agric Food Chem* 57(4):1481–1490.

154. Pereira GE, et al. (2005) 1H NMR and Chemometrics To Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux, France. *J Agric Food Chem* 53(16):6382–6389.

155. Lee J-E, Hwang G-S, Van Den Berg F, Lee C-H, Hong Y-S (2009) Evidence of vintage effects on grape wines using< sup> 1</sup> H NMR-based metabolomic study. *Analytica chimica acta* 648(1):71–76.

156. Hong Y-S, et al. (2011) Metabolic Influence of Botrytis cinerea Infection in Champagne Base Wine. *J Agric Food Chem* 59(13):7237–7245.

157. Styger G, Prior B, Bauer FF (2011) Wine flavor and aroma. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38(9):1145–1159.

158. Reboredo-Rodríguez P, González-Barreiro C, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J Effects of Sugar Concentration Processes in Grapes and Wine Aging on Aroma Compounds of Sweet Wines—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0(ja):null.

159. Pereira AC, Reis MS, Saraiva PM, Marques JC (2010) Aroma ageing trends in GC/MS profiles of liqueur wines. *Analytica chimica acta* 659(1):93–101.

160. Loscos N, Hernández-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2010) Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape flavour precursors from different varietals during accelerated wine ageing. *Food chemistry* 120(1):205–216.

161. Recamales ÁF, Sayago A, González-Miret ML, Hernanz D (2006) The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Research International* 39(2):220–229.

162. Saucier C, Pianet I, Laguerre M, Glories Y (1998) NMR and molecular modeling: application to wine ageing. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique* 95(2):357–365.

163. Saucier C (2010) How do wine polyphenols evolve during wine ageing? *Cerevisia* 35(1):11–15.

164. Arnous A, Makris DP, Kefalas P (2001) Effect of Principal Polyphenolic Components in Relation to Antioxidant Characteristics of Aged Red Wines. *J Agric Food Chem* 49(12):5736–5742.

165. Makris DP, Psarra E, Kallithraka S, Kefalas P (2003) The effect of polyphenolic composition as related to antioxidant capacity in white wines. *Food Research International* 36(8):805–814.

166. Romero C, Bakker J (2000) Effect of Storage Temperature and Pyruvate on Kinetics of Anthocyanin Degradation, Vitisin A Derivative Formation, and Color Characteristics of Model Solutions. *J Agric Food Chem* 48(6):2135–2141.

167. Eiro MJ, Heinonen M (2002) Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *J Agric Food Chem* 50(25):7461–7466.

168. Marquez A, Serratosa MP, Merida J (2014) Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chemistry* 146:507–514.

169. Makhotkina O, Kilmartin PA (2012) Hydrolysis and formation of volatile esters in New Zealand Sauvignon blanc wine. *Food chemistry* 135(2):486–493.

170. Makhotkina O, Pineau B, Kilmartin P a. (2012) Effect of storage temperature on the chemical composition and sensory profile of Sauvignon Blanc wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18(1):91–99.

171. Lequin S, et al. (2010) Adsorption equilibria of water vapor on cork. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(6):3438–3445.

172. Godden P, et al. (2001) Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine 1. Performance up to 20 months post-bottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7(2):64–105.

173. Lopes P, et al. (2009) Impact of Oxygen Dissolved at Bottling and Transmitted through Closures on the Composition and Sensory Properties of a Sauvignon Blanc Wine during Bottle Storage. *J Agric Food Chem* 57(21):10261–10270.

174. Han G, et al. (2014) Influence of closure, phenolic levels and microoxygenation on Cabernet Sauvignon wine composition after 5 years' bottle storage. *J Sci Food Agric*:n/a–n/a.

175. Du Toit WJ, Marais J, Pretorius IS, Du Toit M (2006) Oxygen in must and wine: A review. *S Afr J Enol Vitic* 27(1):76.

176. Liger-Belair G, Villaume S (2011) Losses of Dissolved CO2 Through the Cork Stopper during Champagne Aging: Toward a Multiparameter Modeling. *J Agric Food Chem* 59(8):4051–4056.

177. Antalick G, Perello M-C, Revel G de (2014) Esters in Wines: New Insight through the Establishment of a Database of French Wines. *Am J Enol Vitic*:ajev.2014.13133.

178. Ramey DD, Ough CS (1980) Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28(5):928–934.

179. Moutounet M, Mazauric J-P (2001) L'oxygène dissous dans les vins : Les gaz en oenologie. *Revue française d'oenologie* (186):12–15.

180. Silva Ferreira AC, Guedes de Pinho P, Rodrigues P, Hogg T (2002) Kinetics of Oxidative Degradation of White Wines and How They Are Affected by Selected Technological Parameters. *J Agric Food Chem* 50(21):5919–5924.

181. Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V, Silva AMS (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International* 44(5):1115–1126.

182. Escudero A, Asensio E, Cacho J, Ferreira V (2002) Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food chemistry* 77(3):325–331.

183. Escudero A, Cacho J, Ferreira V (2000) Isolation and identification of odorants generated in wine during its oxidation: a gas chromatography-olfactometric study. *European Food Research and Technology* 211(2):105–110.

184. Simpson RF (1982) Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis* 21(3):233–239.

185. Bessis R (2007) Evolution of the grapevine (Vitis vinifera L.) imprinted by natural and human factorsThis review is one of a selection of papers presented at the symposium on Vitis at the XVII International Botanical Congress held in Vienna, Austria, in 2005. *Can J Bot* 85(8):679–690.

186. Karbowiak T, Mansfield AK, Barrera-García VD, Chassagne D (2010) Sorption and diffusion properties of volatile phenols into cork. *Food Chemistry* 122(4):1089–1094.

187. Skouroumounis GK, et al. (2005) The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11(3):369–377.

188. Ugliano M, et al. (2011) Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. *J Agric Food Chem* 59(6):2564–2572.

189. Valade M, et al. (2006) Les apports d'oxygène en vinification et leur impact sur les vins. *Le Vigneron Champenois* 9(Deuxieme partie):60–95.

190. Danilewicz JC (2003) Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper. *Am J Enol Vitic* 54(2):73–85.

191. Singleton VL (1987) Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *Am J Enol Vitic* 38(1):69–77.

192. Singleton VL, Trousdale E (1983) White Wine Phenolics: Varietal and Processing Differences as Shown by HPLC. *Am J Enol Vitic* 34(1):27–34.

193. 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.

194. Cilliers JJL, Singleton VL (1990) Nonenzymic Autoxidative Reactions of Caffeic Acid in Wine. *Am J Enol Vitic* 41(1):84–86.

195. Singleton VL, Zaya J, Trousdale E, Salgues M (1984) Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis* 23(2):113–120.

196. Waterhouse AL, Laurie VF (2006) Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *Am J Enol Vitic* 57(3):306–313.

197. Danilewicz JC (2014) Role of tartaric and malic acids in wine oxidation. *J Agric Food Chem*. Available at: http://dx.doi.org/10.1021/jf5007402 [Accessed May 13, 2014].

198. Cheynier V, Basire N, Rigaud J (1989) Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37(4):1069–1071.

199. Singleton VL, Timberlake CF, Lea AGH (1978) The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J Sci Food Agric* 29(4):403–410.

200. Cheynier V, Rigaud J, Souquet J-M, Duprat F, Moutounet M (1990) Must Browning in Relation to the Behavior of Phenolic Compounds During Oxidation. *Am J Enol Vitic* 41(4):346–349.

201. Schneider V (1998) Must Hyperoxidation: A Review. *Am J Enol Vitic* 49(1):65–73.

202. Danilewicz JC, Seccombe JT, Whelan J (2008) Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American journal of enology and viticulture* 59(2):128–136.

203. Danilewicz JC (2007) Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper. *Am J Enol Vitic* 58(1):53–60.

204. Brajkovich M, et al. (2005) Effect of screwcap and cork closures on SO2 levels and aromas in a Sauvignon Blanc wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 53(26):10006–10011.

205. Lavigne-Cruège V, Dubourdieu D (2002) Role of glutathione on development of aroma defects in dry white wines. *13th International Enology Symposium* (International Association of Enology: Montpellier, France), pp 331–347.

206. Ugliano M (2013) Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. *J Agric Food Chem* 61(26):6125–6136.

207. Nikolantonaki M, Magiatis P, Waterhouse AL (2014) Measuring protection of aromatic wine thiols from oxidation by competitive reactions vs wine preservatives with ortho-quinones. *Food Chemistry* 163:61–67.

208. Wildenradt HL, Singleton VL (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.

209. Danilewicz JC (2011) Mechanism of autoxidation of polyphenols and participation of sulfite in wine: key role of iron. *American Journal of Enology and Viticulture*:ajev–2011.

210. Makhotkina O, Kilmartin PA (2009) Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 633(1):165–174.

211. Pripis-Nicolau L, de Revel G, Marchand S, Beloqui AA, Bertrand A (2001) Automated HPLC method for the measurement of free amino acids including cysteine in musts and wines; first applications. *J Sci Food Agric* 81(8):731–738.

212. Rapp A, Mandery H (1986) Wine aroma. *Experientia* 42(8):873–884.

213. Goniak OJ, Noble AC (1987) Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *American journal of enology and viticulture* 38(3):223–227.

214. Jocelyn PC (1972) Biochemistry of the SH Group.

215. Kotseridis Y, Baumes R (2000) Identification of impact odorants in Bordeaux red grape juice, in the commercial yeast used for its fermentation, and in the produced wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2):400–406.

216. Cheynier V, Masson G, Rigaud J, Moutounet M (1993) Estimation of must oxidation during pressing in Champagne. *American journal of enology and viticulture* 44(4):393–399.

217. Bouzanquet Q, Barril C, Clark AC, Dias DA, Scollary GR (2012) A novel glutathione-hydroxycinnamic acid product generated in oxidative wine conditions. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(49):12186–12195.

218. Bassil D, Makris DP, Kefalas P (2005) Oxidation of caffeic acid in the presence of l-cysteine: isolation of 2-< i> S</i>-cysteinylcaffeic acid and evaluation of its antioxidant properties. *Food research international* 38(4):395–402.

219. Kritzinger EC, Bauer FF, du Toit WJ (2012) Role of glutathione in winemaking: a review. *Journal of agricultural and food chemistry* 61(2):269–277.

220. Gómez-Plaza E, Cano-López M (2011) A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chemistry* 125(4):1131–1140.

221. Del Carmen Llaudy M, et al. (2006) Influence of micro-oxygenation treatment before oak aging on phenolic compounds composition, astringency, and color of red wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 54(12):4246–4252.

222. Cejudo-Bastante MJ, Pérez-Coello MS, Hermosín-Gutiérrez I (2011) Effect of wine micro-oxygenation treatment and storage period on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. *LWT - Food Science and Technology* 44(4):866–874.

223. Cejudo-Bastante MJ, Hermosín-Gutiérrez I, Castro-Vázquez LI, Pérez-Coello MS (2011) Hyperoxygenation and Bottle Storage of Chardonnay White Wines: Effects on Color-Related Phenolics, Volatile Composition, and Sensory Characteristics. *J Agric Food Chem* 59(8):4171–4182.

224. Cejudo-Bastante MJ, Hermosín-Gutiérrez I, Pérez-Coello MS (2011) Micro-oxygenation and oak chip treatments of red wines: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part II: Merlot wines. *Food chemistry* 124(3):738–748.

225. Cano-López M, Pardo-Minguez F, López-Roca JM, Gómez-Plaza E (2006) Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 57(3):325–331.

226. Cano-López M, Pardo-Minguez F, López-Roca JM, Gómez-Plaza E (2007) Chromatic characteristics and anthocyanin profile of a micro-oxygenated red wine after oak or bottle maturation. *European Food Research and Technology* 225(1):127–132.

227. Cano-López M, et al. (2008) Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents. *Journal of agricultural and food chemistry* 56(14):5932–5941.

228. Pérez-Magariño S, Sánchez-Iglesias M, Ortega-Heras M, González-Huerta C, González-Sanjosé ML (2007) Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chemistry* 101(3):881–893.

229. Arapitsas P, et al. (2012) A Metabolomic Approach to the Study of Wine Micro-Oxygenation. *PLoS ONE* 7(5):e37783.

230. McRae JM, et al. (2012) Phenolic Compositions of 50 and 30 Year Sequences of Australian Red Wines: The Impact of Wine Age. *J Agric Food Chem* 60(40):10093–10102.

231. Monagas M, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C (2006) Statistical interpretation of the color parameters of red wines in function of their phenolic composition during aging in bottle. *Eur Food Res Technol* 222(5-6):702–709.

232. Azzara CD, Campbell LB (1992) Off-flavors of dairy products. *Developments in Food Science (Netherlands)*.

233. Baro AL, Quiros-Carrasco JA (1977) Les conditions de formation des aldéhydes dans les vins. *Bulletin OIV* 554:253–264.

234. Culleré, Cacho J, Ferreira V (2007) An Assessment of the Role Played by Some Oxidation-Related Aldehydes in Wine Aroma. *J Agric Food Chem* 55(3):876–881.

235. Aznar M, López R, Cacho J, Ferreira V (2003) Prediction of Aged Red Wine Aroma Properties from Aroma Chemical Composition. Partial Least Squares Regression Models. *J Agric Food Chem* 51(9):2700–2707.

236. MOUTON GD (2006) TERROIR– THE FOOTPRINT OF GREAT WINES. *Cape Wine Master Diploma*.

237. Jackson RS (2014) *Wine science: principles and applications.* (Elsevier Academic Press, [S.l.]).

238. Rankine BC, Fornachon JCM, Boehm EW, Cellier KM (1971) Influence of grape variety, climate and soil on grape composition and on the composition and quality of table wines. *Vitis* 10:33–50.

239. Wahl K (1988) Climate and soil effects on grapevine and wine: the situation on the northern border of viticulture–the example Franconia. *Proceedings of the Second International Symposium for Cool Climate Viticulture and Oenology. Eds. RE Smart, RJ Thornton, SB Rodriguez, and JE Young*, pp 1–5.

240. Morlat R, et al. (1983) [Integrated characteristics of some Val de Loire wine-producing areas, influence on wine quality [geology, pedology, mesoclimate; France]]. *Connaissance de la Vigne et du Vin (France)*.

241. Pereira GE, et al. (2007) ^ 1H-NMR metabolic profiling of wines from three cultivars, three soil types and two contrasting vintages. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 41(2):103.

242. Wooldridge J (2000) *Geology: A central aspect of terroir* (Wynboer).

243. Carey VA (2001) Spatial characterisation of natural terroir units for viticulture in the Bottelaryberg-Simonsberg-Helderberg winegrowing area. Thesis (Stellenbosch : Stellenbosch University).

244. Lanz S, Strasser RJ, Patzwahl W (2004) STRESS DISPOSITION OF VINES DETECTED AND DESCRIBED BY IN SITU FLUORESCENCE TECHNIQUE. *ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM*

(SPRINGER HEIDELBERG TIERGARTENSTRASSE 17, D-69121 HEIDELBERG, GERMANY), pp 191–191.

245. Bavaresco L, Civardi S, Pezzutto S, Vezzulli S, Ferrari F (2005) Grape production, technological parameters, and stilbenic compounds as affected by lime-induced chlorosis. *Vitis* 44(2):63–65.

246. Bavaresco L, Presutto P, Civardi S (2005) VR O43-43: A lime-susceptible rootstock. *American journal of enology and viticulture* 56(2):192–195.

247. Gladstones J (1992) *Viticulture and environment.*

248. Koundouras S, Marinos V, Gkoulioti A, Kotseridis Y, van Leeuwen C (2006) Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated Cv. Agiorgitiko (Vitis vinifera L.). Effects on Wine Phenolic and Aroma Components. *J Agric Food Chem* 54(14):5077–5086.

249. Bavaresco L, Gatti M, Pezzutto S, Fregoni M, Mattivi F (2008) Effect of Leaf Removal on Grape Yield, Berry Composition, and Stilbene Concentration. *Am J Enol Vitic* 59(3):292–298.

250. Hannah L, et al. (2013) Climate change, wine, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(17):6907–6912.

251. Hannah L, Midgley GF, Millar D (2002) Climate change-integrated conservation strategies. *Global Ecology and Biogeography* 11(6):485–495.

252. Van Leeuwen C, et al. (2013) Why climate change will not dramatically decrease viticultural suitability in main wine-producing areas by 2050. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(33):E3051–E3052.

253. Hannah L, et al. (2013) Reply to van Leeuwen et al.: Planning for agricultural adaptation to climate change and its consequences for conservation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(33):E3053.

254. Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA (2014) Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *PNAS* 111(1):E139–E148.

255. Taylor MW, Tsai P, Anfang N, Ross HA, Goddard MR (2014) Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environmental microbiology*.

256. Van Leeuwen C, Roby JP, Pernet D, Bois B (2010) Methodology of soil-based zoning for viticultural terroirs. *Bulletin de l'OIV* 83(947):13.

257. Gilbert JA, van der Lelie D, Zarraonaindia I (2014) Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(1):5–6.

258. Boccard J, Veuthey J-L, Rudaz S (2010) Knowledge discovery in metabolomics: An overview of MS data handling. *J Sep Science* 33(3):290–304.

259. Tziotis D, Hertkorn N, Schmitt-Kopplin P (2011) Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* 17(4):415–421.

260. Lucio M (2008) Datamining metabolomics: the convergence point of non-target approach and statistical investigation. Dissertation (Technische Universität München).

261. Abdi H, Williams LJ (2010) Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 2(4):433–459.

262. Major HJ, Williams R, Wilson AJ, Wilson ID (2006) A metabonomic analysis of plasma from Zucker rat strains using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(22):3295–3302.

263. Trygg J, Wold S (2002) Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J Chemometrics* 16(3):119–128.

264. Suhre K, Schmitt-Kopplin P (2008) MassTRIX: mass translator into pathways. *Nucl Acids Res* 36(suppl 2):W481–W484.

265. Wägele B, Witting M, Schmitt-Kopplin P, Suhre K (2012) MassTRIX Reloaded: Combined Analysis and Visualization of Transcriptome and Metabolome Data. *PLoS One* 7(7).

266. Sonni F (2010) Study of the components of quality in SO2-free wines obtained by innovative vinification protocols. Evaluation of the pre-fermentative addition of lysozyme and oenological tannins. Available at: http://amsdottorato.unibo.it/2598/ [Accessed October 15, 2014].

267. Sonni F, Cejudo Bastante MJ, Chinnici F, Natali N, Riponi C (2009) Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89(4):688–696.

Annexe 1: Exemple de liste de masses utilisées pour la calibration des spectres FT-ICR-MS en mode d'ionisation négative.

Composés	m/z	charge
$C_{12}H_{23}O_2$	199,17035	-1
$C_{14}H_{27}O_2$	227,20165	-1
$C_{16}H_{31}O_2$	255,23295	-1
$C1_8H_{35}O_2$	283,26425	-1
$C_8H_{11}O_{12}$	299,0256	-1
$C_{11}H_{19}O_{10}$	311,09837	-1
$C_{20}H_{39}O_2$	311,29555	-1
$C_{22}H_{43}O_2$	339,32685	-1
$C_{12}H_{21}O_{14}$	341,10894	-1
$C_{24}H_{47}O_2$	367,35815	-1
$C_{33}H_{11}O_2$	439,07645	-1
$C_{21}H_{21}O_{11}$	449,10894	-1
$C_{22}H_{21}O_{11}$	461,10894	-1
$C_{23}H_{23}O_{12}$	491,1195	-1
$C_{23}H_{23}O_{13}$	507,11442	-1
$C_{23}H_{25}O_{13}$	509,13007	-1
$C_{30}H_{45}O_8$	533,31199	-1
$C_{18}H_{31}O_{18}$	535,15159	-1
$C_{15}H_{23}O_{19}N_6$	591,10235	-1
$C_{22}H_{37}O_{19}$	605,19346	-1
$C_{23}H164O14$	665,21266	-1
$C_{37}H49O11$	669,32804	-1

Annexe 2: Série verticale, Corton-Charlemagne du Domaine Bouchard-père et fils. Dégustation en novembre 2012.

Millésime	Œil	Nez
1934	Or reflets vert	orange confite agrume à l'eau de vie
1955	or pâle	champignons frais
1962	Or	vanillé caramel
1963	Or pâle	truffé, légé sous bois
1969	Or	Champignons sous bois
1970	Or pâle	citron meringué
1972	Or pâle	surprenant épicé muscade légère note animale
1973	Or pâle à reflets verts	frais mineral typé
1978	or pâle vert	miel cire frais
1980	Or pâle vert	ferme un peu sous bois limite poussière
1982	or pâle	soufré légère trace liège
1983	Or	raisins secs liquoreux
1984	or	champignons frais truffe
1987	or pâle à reflet verts	frais eucaustique amande
1988	or pâle vert	fumé grillé eucaustique
1989	or pâle	grillé fumé fruits secs
1991	Or	fruits secs grillés légère note liégeuse
1994	Or pâle	orange confite sucre candi coing
1995	belle robe or pâle	fruits confits
1996	Or pâle à reflet verts	lard fumé thérébentine note soufrée
1997	Evolué or	ethanal
1998	or pâle	coing curry frais fruits à chaires blanches compotée
1999	fraiche	bouchonné
2000	or pâle à reflets verts bel éclat	mineral, frais
2001	or pâle vert	miel bonbon anglais toasté pain d'épice
2002	or pâle frais	liégeux
2003	belle robe or pâle à reflets verts	agrumes confits légèrement acidulé pointe mentholée
2004	belle robe or pâle à reflets verts	végétal persillé typique 2004
2005	belle robe fraiche reflets verts	vervaine tilleul noisettes grillées
2006	belle robe fraiche reflets verts	du fard fruits secs grillés
2006	or pâle reflets verts	citronné mineral
2007	or très pâle	très frais bien plus que la bouteille
2007	or pâle	fruits secs minéral pointe miel
2008	or pâle	légèrement miellé
2008	belle robe or pâle a reflets verts	agrumes citronné tilleuil
2009	belle robe or pâle	fruits secs noisettes grillées un peu cremeux
2010	belle robe or pâle	un peu plus ouvert que la bouteille moins grillé
2010	belle robe or pâle reflet verts	frais grillé fruits secs droit

Millésime	Bouche	Conclusion	remarques
1934	belle bouche du fard	belle bouteille	nat fleur 49 x 24
1955	fard de la suite	Vin riche	nat fleur 49 x 24
1962	truffé du fard de la suite	belle bouteille	1/2 bouteille
1963	Fraiche	Surprenant de fraicheur	1/2 bouteille
1969	fraiche même verte	à sa place	1/2 bouteille
1970	belle bouche du fard vanillée	Bon niveau d'ensemble	nat fleur 49 x 24
1972	note champignon	volume moyen	nat fleur 49 x 24
1973	très frais volume moyen	à sa place dans le millésime	nat fleur 49 x 24
1978	acide manque de fard	bien	nat fleur 49 x 24
1980	trace liégeuse	moyen	nat fleur 49 x 24
1982	champignon volume moyen	moyen	nat fleur 49 x 24
1983	idem	plus avancé que la moyenne	nat fleur 49 x 24
1984	vive mais fraiche acidulée	très 84	nat fleur 49 x 24
1987	fraiche un peu diluée	très 87 manque de maturité	nat fleur 49 x 24
1988	pointe amer manque un peu de fard	très "trop" 88	nat fleur 49 x 24
1989	du fard de la suite finale un peu chaude	à sa place	nat fleur 49 x 24
1991	riche du fard pointe tanique	à sa place	nat fleur 49 x 24
1994	fraiche	agréable	nat fleur 49 x 24
1995	belle bouche note eau de rose fleur d'oranger	très beau vin	nat fleur 49 x 24
1996	acide et gras à la fois	très typé 96	nat fleur 49 x 24
1997	sec et amer	vin oxydé	nat fleur 49 x 24
1998	note épicée	riche du fard	nat fleur 49 x 24
1999	idem	vin frais mais bouchonné	nat fleur 49 x 24
2000	du fard	belle bouteille riche	nat fleur 49 x 24
2001	brioché orange confite fraiche	Bon niveau	nat fleur 49 x 24
2002	idem	frais mais bouchonné	nat fleur 49 x 24
2003	riche pointe miel	à sa place de la tenue	nat fleur 49 x 24
2004	mêmes remarques	limite note asperge	nat fleur 49 x 24
2005	du fard de la suite finale un peu chaude	vin très frais pur a sa place	nat fleur 49 x 24
2006	bien typée belle structure	plus fraiche plus typée	1/2 diams 47 x 24
2006	droit du fard petite touche végétale en final	à sa place	nat fleur 49 x 24
2007	idem	au dessus de la bouteille	1/12 diams 47 x 24
2007	miel beurré	à point	nat fleur 49 x 24
2008	agréable fraiche bonne tension	à sa place	1/2 diams 47 x 24
2008	fraiche bonne tension citronnée	vin très frais	nat fleur 49 x 24
2009	onctueuse fraiche final beurré	bon niveau	Diams 10 47 x 24
2010	idem	idem	1/2 Diams 5 47 x 24
2010	fraiche structurée citronné toasté	bon niveau d'ensemble	Diam 10 54 x 24

Annexe 3: Série verticale, Meursault Clos de la Barre du Domaine Comte Lafon. Dégustation en février 2013.

Millésime	Dégustations	Remarques
2010	note abricot sec, terroir bien equilibré, très fruité	inertage vin soutiré avec CO2, élevage en futs de chène de 1 à 2 ans
2009	arôme pierre a fusil, frais, acidité, équilibré, amande grillé, harmonieux	inertage vin soutiré avec CO2
2008	arôme pierre à fusil, un peu fumé, réduction (cire), décalage entre le nez presque botritis et la bouche très fraiche	
2007	fruit sec, aérien, finesse, énergie	
2006	légère oxydation côté beurre, caramel, limite miel	
2005	très oxydé	
2005	pas un grand millesime, vin massif, coté phénolique	
2004	trace réduction plus en finesse et classique que 2002	
2003	opulent sans être lourd, simple mais bon, vin stable	
2002	bouchoné	
2002	petite note truffée, sous bois, belle complexité belle longueur	belle bouteille
2001	un peu réduit, fruit sec, tension végétale arôme champignon	
2000	très beau comme 2002, frais, élégant, agréable	belle bouteille
1999	très oxydé, foutu	
1999	début oxydation, sans noblesse	
1997	oxydée mais buvable, fruit sec, abricot, évolution	
1996	magnifique	
1996	moyenne	
1996	oxydée	
1996	grillé, pain, levin, moyenne	
1992	bien mature, floral chevreufeuille, miel très fin, un peu champignon, attaque fraiche, fini long complexe	millesime remarquable
1991	oxydée sous bois, austerité,	beaucoup de pluie avant et pendant les vendanges
1990	intense, belle bouteille, équilibré, coté phénolique, tanin, astringeant	
1989	très bonne année, opulent, complexe, longueur,	belle bouteille
1985	bouchoné	
1985	réduit, épicé, truffe, champignon	
1982	phénolé, réduit, grillé, nez fruit sec	
1978	réduit épicé, curry grillé,mentol, croûte de pain, sous bois truffé	
1976	champignon, volatiles, phénols,	grande sécheresse, vendange fin aout, presque 3 ans de fûts, malo pas fini, petite recolte
1969	note grillée, vin ample truffé, sous bois, miel grillé fumé menthol, chevrefeuille	

Annexe 4: Série verticale, Meursault, Domaine de la Velle. Dégustation en 2009.

Millésime	Dégustation
2006	Réduit à l'ouverture. Notes boisées. Rhubarbe. Bouche équilibrée. Très ample. Beaucoup de gras. Grillé
2005	Réduite à l'ouverture. Nez minéral, pierreux, silex. Bouche plus sèche, tendue, plus acide
2004	Nez un peu asperge - butyrique. Végétal et amande grillée en bouche. Court
2003	Caramel brulé - vanillé. Lourd, très gras, très mûr
2002	très légère réduction. Souffré. Sucrosité. Noisette, amande grillée au nez. Amande amère en bouche
2001	Pétrole, Rose, litchi. Vif. Amertume en bouche.
2000	Réduit au nez. Liégeux. Bouche stricte, étroite, courte.
1999	Nez réducteur, grillé. Ample en bouche. Sucrosité, persistant
1998	Notes souffrées, miel, Accacia, compote de rhubarbe
1997	Viande, charcuterie,. Bouche courte, stricte
1996	Nez réducteur. Amandes grillées. Sec, acide
1995	Pâte de coing au nez. Déséquilibré en bouche. Amer et astrigent.
1994	Nez mentholé. Arrière nez presque animal. Bouche végétale. Légère amertume. Légèrement fatigué.
1993	Nez amande grillée, typique vieux chardonnay. Très belle bouche, persistance. Typique vieux chardonnay
1992	Nez "surmaturation" type vin liquoreux. Bouche stricte presque vert. Acidité en final.
1991	Nez herbacé - légume vert. Bouche informe, creuse, sêche en finale, pas de relief
1990	Nez amande grillée, légèrement évolué. Bouche très stricte, nerveuse, acide, serrée.
1989	Nez lente oxydation. Bouche évoluée, curry - épicé
1988	Nez fatigué - légère réduction. Bouche ferme - viandox
1987	Nez fatigué - mielleux. Bonne consistance, assez ample
1986	Couleur ambrée. Nez amande grillée très marqué. Bouche sucrée, vin mûr et finale fatiguée
1985	Couleur ambre marquée. Nez amande grillée, café, moka. Typé vieux chardonnay. Bouche ample, large.
1984	Nez mandarine, écorce d'orange - type liquoreux. Bouche assez stricte légèrement sèche.
1983	Couleur ambrée, nez rose fanée. Bouche vive assez ferme - acide mais ample
1982	Robe pâle - nez bourgeon de cassis très jeune. Bouche fraiche, jeune - liège (?)
1981	Nez bourgeon de cassis, Bouche verte, nerveuse - acide - légèrement végétale.
1980	Nez pétrole, hydrocarbure, Bouche ample, très ferme. Beaucoup de persistance, bonne acidité, nerveux.
1979	2 bouteilles bouchonnées

Résumé

L'objectif premier de ce travail de thèse était de développer des analyses métabolomiques non ciblées de vins en bouteilles afin de déchiffrer les informations chimiques relatives à l'évolution de leurs compositions avec le temps. Cette recherche initiale était fondée sur l'hypothèse que, lors de l'analyse, les vins en bouteilles gardent une mémoire chimique des paramètres environnementaux à l'œuvre au moment de leur élaboration (gestion du vignoble, pratiques œnologiques, climat, terroir). Une seconde hypothèse reposait sur la nécessité d'étudier le passé pour anticiper l'évolution de la qualité du vin du point de vue de sa composition chimique.

À cet effet et pour la première fois dans la science du vin, la Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions et à Transformée de Fourier (FTICR-MS), la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (UPLC-Q-TOF-MS), la spectroscopie de Fluorescence d'Excitation et d'Émission (EEMF) et les statistiques multivariées ont été combinées. Le développement méthodologique a révélé l'avantage de coupler les mesures de masses exactes par FTICR-MS à la discrimination des isomères par UPLC-Q-TOF-MS afin d'étendre la gamme des métabolites détectables. Ces outils ont été appliqués à l'identification de marqueurs de vieillissement sur des séries verticales de vins rouges et blancs de Bourgogne, y compris sur des vins très anciens (millésimes inconnus) considérés comme des points extrêmes d'évolution, introduisant ainsi la notion de verticalomics. La caractérisation d'une série de vins blancs de Bourgogne (Chardonnay) a révélé que les espaces chimiques spécifiquement liés à des pratiques œnologiques (SO_2 ajouté lors du pressurage, niveau de débourbage ou perméabilité du bouchon) pourraient être déchiffrés, bien que les signatures de millésimes étaient les plus significatives. Des expériences similaires sur les vins de Champagne (Chardonnay, et mélanges de Chardonnay, Pinot noir et Pinot Meunier) après la prise de mousse et le vieillissement sur lattes ont mis en évidence l'effet d'hormesis associé à l'oxygénation du vin. Enfin, les analyses non ciblées d'extraits de raisin et des vins correspondants provenant de différentes appellations et élaborés par le même vigneron ont révélé qu'il était possible de lire des signatures liées au terroir, en particulier après quelques années de vieillissement en bouteille. Plus largement, nos résultats fournissent une description globale sans précédent de la composition chimique du vin et de sa modification par le vieillissement.

Mots clés: Chardonnay, Pinot noir, Pinot meunier, vin, vieillissement, oxydation, métabolomique, FTICR-MS et UPLC-Q-ToF-MS, EEMF.

Abstract

The main objective of this work was to develop non-targeted metabolomics analyses of bottled wines in order to decipher chemical informations from the time-related evolution of their composition. This original research was based on the hypothesis that, when analyzed, bottled wines would still hold chemical memories of envionmental parameters (vineyard management, oenological practices, climate, terroir…) at the moment of their elaboration, even after several years of ageing. A second hypothesis was that in order to anticipate the future evolution of the wine quality in terms of chemical composition, it is necessary to know what it was in the past.

To that purpose, and for the first time in wine science, Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – Mass Spectrometry (FTICR-MS), Liquid Chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-Q-ToF-MS), Excitation Emission Matrix Fluorescence (EEMF) and multivariate statistics were used in combination. Methodological develoments revealed the advantage of coupling exact mass measurements by FTICR-MS to isomeric discrimination by UPLC-Q-ToF-MS in order to extend the range of detectable metabolites. Such tools were applied to the identification of ageing markers in vertical series of red and white wines from Burgundy, including very old wines (unknown vintages) considered as evolution end points, thus introducing the concept of verticalomics. The characterization of series of white wines from Burgundy (Chardonnay) revealed that chemical spaces specifically related to eonological practices (SO2 addition at pressing, settling level, and permeability of the stopper) could indeed be deciphered although the vintage signatures were confirmed to be the most significant. Similar experiments on Champagne wines (Chardonnay, and blends of Chardonnay, Pinot noir and Pinot Meunier) after the "prise de mousse" and the ageing "sur lattes" further highlighted the hormesis effect associated with the oxygenation of wine. Finally, non-targeted analyses of series of grape extracts and corresponding wines from different appelations – though elaborated by the same winemaker – revealed that terroir-related signatures could be indeed read in wines, in particular after a few years of bottle ageing. Altogether our results provide an unprecedented comprehensive description of the chemical composition of wine and its modification through ageing.

Key words: Chardonnay, Pinot noir, Pinot meunier, wine, ageing, oxidation, metabolomics, FTICR-MS, UPLC-Q-ToF-MS, EEMF.