



Application de la métabolomique par spectroscopie RMN 1H à l'authentification des vins

Louis Gougeon

► To cite this version:

Louis Gougeon. Application de la métabolomique par spectroscopie RMN 1H à l'authentification des vins. Ingénierie des aliments. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0052 . tel-02426222

HAL Id: tel-02426222

<https://theses.hal.science/tel-02426222>

Submitted on 2 Jan 2020

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

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



THÈSE PRESENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par Louis GOUGEON

-

**APPLICATION DE LA MÉTABOLOMIQUE PAR SPECTROSCOPIE
RMN ^1H À L'AUTHENTIFICATION DES VINS**

-

Sous la direction du Pr. Tristan RICHARD

Soutenue publiquement le 12 avril 2019

Membres du jury

Mme A. MOING	Directrice de recherche, INRA Bordeaux	Présidente
M. F. MESNARD	Professeur, BPI, Université de Picardie	Rapporteur
Mme V. CHEYNIER	Directrice de recherche, INRA Montpellier	Rapporteuse
M. F. GUYON	Responsable du Domaine Isotopie, SCL Pessac	Membre invité
M. T. RICHARD	Professeur, ISVV, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

APPLICATION DE LA MÉTABOLOMIQUE PAR SPECTROSCOPIE RMN ^1H À L'AUTHENTIFICATION DES VINS

Dans un marché globalisé où 40% du vin consommé est importé, le contrôle de la traçabilité est un enjeu majeur de la filière viti-vinicole. L'authentification du vin est le processus pouvant faire appel à différentes méthodes analytiques devant pouvoir contrôler trois paramètres fondamentaux : l'origine géographique, le cépage et le millésime. La spectroscopie RMN ^1H quantitative (RMNq) est aujourd'hui considérée comme un outil très prometteur pour l'étude de l'authenticité des vins. Lors de cette thèse, une technique de dosage de 40 composés majoritaires des vins par RMN ^1H a été développée. Elle permet l'acquisition d'une information riche et complexe en une seule analyse non-spécifique. La capacité de cette technique à authentifier un vin a été démontrée suite à une collaboration avec le Château Mouton-Rothschild, par comparaisons avec des analyses officielles réalisées par la DGDDI et DGCCRF de Pessac (SCL). La détermination d'un seuil de conformité a été établie en prenant en compte l'évolution naturelle des vins en bouteille. Une étude de caractérisation des vins rouges de Bordeaux a été menée. La singularité de ces vins a été observée par comparaison avec d'autres vins français, mettant en évidence des métabolites caractéristiques des vins de Bordeaux. Les résultats fournissent une description globale du potentiel de la RMN ^1H pour l'authentification des vins.

Mots-Clés : Vins ; Authenticité ; RMN ^1H ; RMNq ; Métabolomique ; Chimiométrie ; Bordeaux

APPLICATION OF METABOLOMICS BY ^1H RMN SPECTROSCOPY TO WINE AUTHENTICATION

In a globalized market where 40% of the wine consumed is imported, traceability control is a major challenge for the wine industry. Wine authentication is the process that can use different analytical methods able to control three fundamental parameters: geographical origin, grape variety and vintage. Quantitative ^1H NMR spectroscopy (qNMR) is now considered as a very promising tool for studying wine authenticity. During this thesis, a technique was developed for the determination of 40 major wine compounds by ^1H NMR. It allows the acquisition of rich and complex information in a single non-specific analysis. The ability of this technique to authenticate a wine has been demonstrated following a collaboration with Château Mouton-Rothschild, by comparison with official analyses carried out by the DGDDI and DGCCRF of Pessac (SCL). The determination of a compliance threshold has been established by taking into account the natural evolution of bottled wines. A characterization study of Bordeaux red wines was carried out. The singularity of these wines was observed in comparison with other French wines, highlighting the characteristic metabolites of Bordeaux wines. The results provide a global description of the potential of ^1H NMR for wine authentication.

Keywords : Wine ; Authenticity ; ^1H NMR ; qNMR ; Metabolomics ; Chemometrics ; Bordeaux

Unité de Recherche Œnologie - Axe Molécules d'Intérêt Biologique

(EA 4577, USC 1366 INRA, IPB, 210 Chemin de Leyssotte CS 50008 F-33882 Villenave d'Ornon)

Remerciements

Ces travaux ont été dirigés par le professeur Tristan Richard, directeur de l'axe Molécule d'Intérêt Biologique (MIB), et co-encadrés par François Guyon, responsable du domaine isotopie du Service Commun des Laboratoires (SCL) de Bordeaux-Pessac et Gregory Da Costa, maître de conférence à l'Université de Bordeaux et spécialiste RMN. Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Tristan Richard pour avoir accepté que je sois l'étudiant en charge de ce projet. Merci de m'avoir accordé votre confiance et votre soutien me permettant d'agir dans la plus grande autonomie durant ses deux années. Merci à François Guyon pour l'attention portée à mon travail et pour vos remarques toujours pertinentes, ainsi qu'à Gregory Da Costa pour son aide sur les travaux relatifs à la spectroscopie RMN.

Madame Annick Moing, chercheur INRA et responsable scientifique de la plateforme métabolome du centre génomique fonctionnelle de Bordeaux, qui me fait l'immense honneur de présider le jury de cette thèse. Je lui témoigne ma très respectueuse gratitude. Madame Véronique Cheynier, directrice de recherche INRA et responsable de la plateforme d'analyse des polyphénols de Montpellier, et Monsieur le professeur François Mesnard, directeur du laboratoire Biologie des Plantes et Innovation, qui ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

Les travaux de recherche de cette thèse ont pu être élaborés grâce au soutien financier du Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB), de FranceAgriMer et le GIE Club des 9. Ils ont été réalisés au sein de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) à Villenave d'Ornon, dont je tiens à remercier les deux directeurs qui s'y sont succédés, Messieurs les professeurs Denis Dubourdieu et Alain Blanchard. Monsieur le professeur Philippe Darriet, directeur de l'Unité d'œnologie dans laquelle j'ai réalisé ces travaux, pour m'avoir accordé une place au sein de son équipe, mais aussi pour sa disponibilité, ses conseils, et sa bienveillance. Monsieur le professeur Gilles De Revel et Madame la maître de conférences Stéphanie Marchand, que je tiens à remercier pour le regard précis et objectif qu'ils ont su porter sur mes travaux, ainsi que Madame Céline Franc et Monsieur Laurent Riquier.

Les résultats de ces travaux ne seraient pas ce qu'ils sont sans le Château Mouton-Rothschild et plus particulièrement Monsieur Eric Tourbier, directeur technique du Château, et Madame Magalie Blanc, animatrice Qualité Environnement Pôle d'Activité Châteaux, que je tiens à remercier pour les nombreux échanges partagés pendant ces travaux mais aussi pour leur approbation quant à la diffusion des résultats qui en ont été issus. Également, l'Institut de recherche et de formation agricole d'Andalousie (IFAPA) qui a eu la générosité de partager des échantillons de vins expérimentaux et de communiquer les données analytiques de chacun réalisées dans leur structure.

Mesdames Elodie Guittard, Œnologue Assistante ingénieur en Analyses sensorielles et Caroline Baz, pour m'avoir fourni des centaines d'échantillons de vins. Merci à Mesdames Warren Albertin et

Monsieur Stéphane Bernillon et Daniel Jacob pour leur précieuse aide dans l'analyse statistique. Monsieur Simon Terrasson, ingénieur développeur web et dirigeant de la société MunData, dont l'écoute et la disponibilité ont pu permettre la création d'une base de données fiable et structurée.

Je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe de l'axe Molécule d'Intérêt Biologique, en particulier Stéphanie Cluzet, Stéhanie Krisa, Jean-Michel Mérillon et Pierre Waffo-Teguo pour leur contribution active à la base de données mais aussi Alain Badoc, Benoit Biais, Arno Courtois, Alain Descendit, Gérard Fondeville, Ruth Hornedo, Marie-Laure Iglesias, Antonio Palos Pinto, Eric Pedrot, Elodie Renouf, Caroline Rouger, Josep Valls sans oublier les doctorants et amis de l'axe MIB Iris Aja-Perez, Aleksandra Burdziej, Pauline Beaumont, Toni El Khawand, Julien Gabaston, Cindy Quaglieri, David Taillis.

Je n'oublie pas Delphine Wintsel, Pauline Rousserie et Alicia Jouin avec qui l'organisation de la 2^{ème} journée des doctorants de l'ISVV fût un réel plaisir, mais aussi Alice Cibrario, Justine Laboyrie et Nicolas Le Menn pour le partage de vos échantillons. Merci aux stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer, notamment Pauline Farlet et Grégoire Loupit, mais aussi Alouna Husson-Carpentier, Inès Le Mao et Maël Quelen.

Trois personnes qui ont eu un rôle particulier dans ma scolarité : Madame Sylvie Ducroux, enseignante et auteure en marketing, pour m'avoir encouragé à persévérer dans mes études ; Monsieur Sébastien Martineau, enseignant en œnologie, pour m'avoir transmis sa passion pour la viticulture et l'œnologie et pour sa disponibilité ; et Monsieur ZhanWu Daï, chargé de recherche INRA, pour m'avoir donné le goût du travail de chercheur lors de mon initiation à ses côtés. Je ne vous remercierais jamais assez d'avoir cru en moi.

Enfin, je pense à ma sœur Margaux, mon frère Félix, et mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans les moments les plus troubles de ma scolarité. À mes amis Antoine, Coline, Dorian, Khalil, Maxime, Natasha, Nicolas, Romain, Sara, et Solène. Et merci à toi, Julie, pour tout.

Table des Matières

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	1
INTRODUCTION.....	7
ÉTAT DE L'ART.....	11
1. IMPORTANCE DU TERROIR EN ŒNOLOGIE	13
1.1. Adéquation cépage / terroir	14
1.2. Conditions météorologiques et notion de millésime	14
1.3. Importance de la qualité du sol	15
1.4. Le facteur humain.....	16
1.5. Globalisation, échanges mondiaux et valeur du terroir	17
2. METABOLOME DU RAISIN ET DU VIN	18
2.1. Les acides organiques	20
2.2. Les alcools et autres produits volatils.....	22
2.3. Les glucides.....	24
2.4. Les substances azotées	25
2.5. Les composés phénoliques.....	26
3. AUTHENTICITE DES VINS : CONTREFAÇONS ET METHODES DE DETECTION	28
3.1. Exemple de contrefaçons.....	28
3.1.1. Scandales de la fin du XXe siècle	28
3.1.2. Fraudes plus récentes.....	28
3.1.3. Fraudes aux collectionneurs	29
3.2. Méthodes d'analyses chimiques dans la détection des fraudes	29
3.2.1. Techniques chromatographiques	30
3.2.2. Techniques spectroscopiques	31
3.2.3. Radioactivité	31
3.2.4. Spectrométrie de masse	32
3.2.5. Résonance magnétique nucléaire du deutérium.....	32
4. ANALYSE DES VINS PAR RMN ^1H	32
4.1. Analyses métabolomiques par RMN ^1H	32
4.2. Analyse des vins par RMN ^1H quantitative (RMNq)	34
4.2.1. Préparation de l'échantillon de vin	34
4.2.1.1. Conditionnement de l'échantillon de vin	34
4.2.1.2. Ajout d'une solution tampon	35
4.2.1.3. Référence de calibration et de quantification.....	35
4.2.2. Séquences d'impulsions pour l'analyse RMN ^1H	36
4.2.2.1. Séquences d'impulsions couramment utilisées	36
4.2.2.2. Paramètres d'acquisition.....	37
4.2.3. Traitements post-acquisition	38

4.2.3.1.	Manipulation des spectres.....	38
4.2.3.2.	Intégration des signaux	39
4.3.	<i>Classification des vins par RMN</i>	47
4.3.1.	Classification par origines géographiques	49
4.3.2.	Classification par cépages	49
4.3.3.	Classification par millésimes.....	50
4.3.4.	Classification selon des pratiques viti-vinicoles.....	50
4.3.5.	Notions de chimiométrie	51
OBJECTIFS		53
CHAPITRE I :		59
DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DES VINS PAR RMN ¹H.....		59
1.	STRATEGIE MISE EN PLACE	61
2.	PRESENTATION DES TRAVAUX	61
2.1.	<i>Préparation des échantillons.....</i>	61
2.2.	<i>Choix des séquences et paramètres d'acquisition</i>	62
2.3.	<i>Post-acquisition et quantification.....</i>	63
2.4.	<i>Validation de la méthode.....</i>	65
2.5.	<i>Application à l'analyse de vins chinois</i>	66
3.	PUBLICATION.....	66
4.	PRINCIPAUX RESULTATS	80
CHAPITRE II :		85
COMPARAISON AVEC LES METHODES OFFICIELLES.....		85
1.	STRATEGIE.....	87
2.	PRESENTATION DES TRAVAUX	87
2.1.	<i>Échantillonnage et analyses.....</i>	87
2.2.	<i>Détermination du seuil de conformité</i>	89
3.	PUBLICATION.....	90
4.	PRINCIPAUX RÉSULTATS	107
CHAPITRE III :		111
LA RMN ¹H APPLIQUEE AUX VINS ROUGES DE BORDEAUX		111
1.	STRATEGIE.....	113
2.	PRESENTATION DES TRAVAUX	113
2.1.	<i>Présentation du terroir bordelais.....</i>	113
2.2.	<i>Développement d'une base de données</i>	114
2.3.	<i>Sélection des échantillons</i>	116
3.	PUBLICATION.....	116
4.	PRINCIPAUX RESULTATS	140

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS.....	143
1. AVANTAGES ET LIMITATIONS DE LA RMNQ POUR L'ANALYSE DES VINS	145
2. INTERET DE LA RMNQ POUR LA CLASSIFICATION DES VINS	146
3. METABOLITES ESSENTIELS DANS LA CLASSIFICATION DES VINS	147
4. PLACE DE LA RMN DANS UN PROCESSUS D'AUTHENTIFICATION DES VINS	150
5. ROLE D'UNE BASE DE DONNEES DANS UN PROCESSUS DE CLASSEMENT DES VINS	151
CONCLUSION GENERALE	153
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159
ANNEXES	181
ANNEXE 1. CARTE DE CHALEUR REPRESENTANT LES Z-SCORES OBTENU LORS DE LA COMPARAISON DES DONNEES Q-NMR ET LES DONNEES ANALYTIQUES ISSUES D'ANALYSES OFFICIELLES DE L'IFAPA.....	183
ANNEXE 2. ANALYSE METABOLOMIQUE DE FEUILLES DE VIGNE PAR RMN.....	187

Liste des tableaux

TABLEAU 1. COMPOSITION DES VINS PAR FAMILLE CHIMIQUE ET ORDRE DE GRANDEUR HABITUELLEMENT OBSERVE DANS LES VINS SECS (BLOUIN & CRUEGE, 2013; RIBEREAU-GAYON, GLORIES, ET AL., 2012).	19
TABLEAU 2. PRINCIPAUX ACIDES ORGANIQUES RETROUVES DANS LES VINS ET TENEURS INDICATIVES (BLOUIN & CRUEGE, 2013; RIBEREAU-GAYON, GLORIES, ET AL., 2012).....	21
TABLEAU 3. PRINCIPAUX ALCOOLS ET AUTRES VOLATILS RETROUVES DANS LES VINS ET TENEURS INDICATIVES (BLOUIN & CRUEGE, 2013; RIBEREAU-GAYON, GLORIES, ET AL., 2012).	23
TABLEAU 4. PRINCIPAUX GLUCIDES RETROUVES DANS LES VINS ET TENEURS INDICATIVES (BLOUIN & CRUEGE, 2013; RIBEREAU-GAYON, GLORIES, ET AL., 2012).....	24
TABLEAU 5. PRINCIPAUX ACIDES AMINES RETROUVES DANS LES VINS ET TENEURS INDICATIVES (BLOUIN & CRUEGE, 2013; RIBEREAU-GAYON, GLORIES, ET AL., 2012).....	26
TABLEAU 6. PRINCIPAUX COMPOSES PHENOLIQUES RETROUVES DANS LES VINS ET TENEURS INDICATIVES (BLOUIN & CRUEGE, 2013; RIBEREAU-GAYON, GLORIES, ET AL., 2012).....	27
TABLEAU 7. RECAPITULATIF DES PARAMETRES D’ACQUISITION UTILISES DANS DES DIFFERENTES ETUDES D’ANALYSES METABOLOMIQUES DES VINS PAR RMN ¹ H DEPUIS 2000 (AVEC NS = NOMBRE DE SCANS, SW = TAILLE DE LA FENETRE, D1 = DELAI DE RELAXATION, TD = NOMBRE DE POINTS ACQUIS, LB = LINE BROADENING).	40
TABLEAU 8. METABOLITES OBSERVES COMME DISCRIMINANTS LES VINS SELON LES CEPAGES, ORIGINES, MILLESIMES ET PROCEDES DE FERMENTATION DANS LES DIFFERENTES ETUDES DE METABOLOMIQUE PAR RMN ¹ H.....	47
TABLEAU 9. Z-SCORES OBTENUS POUR LES RESULTATS DE QNMR PAR COMPARAISON AUX RESULTATS D’ANALYSES OFFICIELLES SUR DES ECHANTILLONS DE CHAINE D’ANALYSES.....	65
TABLEAU 10. PARAMETRES DE LA METHODE FINALE DEVELOPPEE POUR L’ANALYSE DES VINS PAR RMN ¹ H.....	80
TABLEAU 11. ANALYSES REALISEES PAR LE SCL DANS LE PROCESSUS D’AUTHENTIFICATION DES VINS ET PRECISIONS SUR LES COMPOSES DOSES, LE VOLUME DE VIN NECESSIRE ET LE TEMPS DE PREPARATION ET D’ANALYSE.	89
TABLEAU 12. REPARTITION DES ECHANTILLONS SELON LEURS ORIGINES ET LEURS MILLESIMES.....	116

Liste des figures

FIGURE 1. ÉVOLUTION DE LA CONSOMMATION MONDIALE DE 1986 A 2016 (A PARTIR DE (OIV, 2018)).	7
FIGURE 2. PRESENTATION DE LA TAILLE ET LA COULEUR RELATIVE DES BAIES A INTERVALLES DE 10 JOURS APRES LA FLORAISON, EN PASSANT PAR LES PRINCIPAUX EVENEMENTS DU DEVELOPPEMENT. LES PERIODES D’ACCUMULATION DES COMPOSES, LES NIVEAUX DE JUS OU DE DEGRES BRIX ET UNE INDICATION DU TAUX D’AFFLUX DES SUCS VASCULAIRES DU XYLEME ET DU PHLOEME DANS LA BAIE SONT EGALEMENT PRESENTES (KENNEDY, 2002).	13
FIGURE 3. SCHEMA DES RELATIONS A L’ORIGINE DE LA QUALITE ET DE LA NOTION DE TERROIR. CHAQUE CEPAGE REAGIT AUX SOLS, AUX CLIMATS, AUX HOMMES. (PEYNAUD & BLOUIN, 2013)	16

FIGURE 4. EXPORTATION DE VINS EN VOLUME ET EN VALEUR DES TROIS PRINCIPAUX PAYS EXPORTATEURS EN 2016 (OIV, 2018).	17
FIGURE 5. NOMBRE DE PUBLICATIONS INCLUANT LES MOTS-CLES <i>FOOD</i> ET <i>NMR</i> » DANS LEUR TITRE, MOTS-CLES OU RESUME, INDEXE DANS SCOPUS (ENCART : RECHERCHE LIMITEE AUX MOTS-CLES <i>FOOD</i> ET <i>NMR</i> ET <i>METABOLOMIC</i>).	33
FIGURE 6. REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'EXPERIENCES RMN <i>ZG</i> , <i>ZGPR</i> ET <i>NOESYGPPS</i> . LES GRADIENTS (<i>Gz1</i> ET <i>Gz2</i>) SONT REPRESENTES SUR LA SEQUENCE <i>NOESYGPPS</i>	37
FIGURE 7. SCHEMA ILLUSTRANT LES DIFFERENTS POINTS CLES DES OBJECTIFS DE THESE.	55
FIGURE 8. SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ANALYSE D'UN ECHANTILLON DE VIN PAR RMN ^1H	64
FIGURE 9. REPRESENTATION DES 19 VINS CHINOIS ISSUS DES REGIONS DE NINGXIA ET SHANXI.....	66
FIGURE 10. SIGNAUX DE L'ACIDE SUCCINIQUE (A GAUCHE) ET DE LA PROLINE (A DROITE) DANS 72 SPECTRES DE VINS ROUGES DONT LES PH ONT ETE AJUSTES A 3,1 AVANT (A) ET APRES (B) REAJUSTEMENT DES SIGNAUX VIA LE LOGICIEL NMRPROCFlow.	81
FIGURE 11. SCHEMA DU PROCESSUS D'AUTHENTIFICATION DES VINS PAR RMN ET PAR LA « MULTI-ANALYSE » REALISEE PAR LE SCL. LES ANALYSES ONT ETE REALISEES SUR TROIS LOTS (A, B, C) COMPRENANT DES VINS AUTHENTIQUES (A_A , B_A , C_A) ET SUSPECTS (A_{s1} , A_{s2} , B_s , C_s).	88
FIGURE 12. DISCRIMINATION CROISEE BASEE SUR LE TOTAL DES S-SCORE DES TREIZE VINS DU CHATEAU MOUTON ROTHSCHILD (TROIS SERIES DE BOUTEILLES AUTHENTIQUES DE DIFFERENTS MILLESIMES ANCIENS : N, N + 2 ET N + 4).	90
FIGURE 13. CARTE DU VIGNOBLE DE BORDEAUX (CIVB).	114
FIGURE 14. ILLUSTRATIONS DE LA BASE DE DONNEES DEVELOPEE : VISUALISATION DES PARAMETRES RENSEIGNES POUR CHAQUE ECHANTILLON ET EXEMPLES D'APPLICATIONS DE L'OUTIL DE COMPARAISON DES VINS.	115
FIGURE 15. REPARTITION DES VINS CONTENUS DANS LA BASE DE DONNEES.	115

Liste des abréviations

AOP	Appellation d'Origine Protégée
CG	chromatographie gazeuse
CIVB	Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux
CLHP	chromatographie liquide haute performance
DGCCRF	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DGDDI	Direction Générale des Douanes et Droits Indirects
DSS	acide 3-triméthylsilylpropane-1-sulfonique
FCa	Formiate de calcium
ICP	Plasma à couplage inductif
IR	infra-rouge
ISVV	Institut des Sciences de la Vigne et du Vin
LOD, LOQ	Limite de détection, limite de quantification
LOOCV	Leave One Out Cross-Validation
MIB	Molécules d'Intérêt Biologique
MS	spectrométrie de masse
OIV	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
OSC	Orthogonal Signal Correction
ppm	parties par million
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMNq	Résonance Magnétique Nucléaire quantitative
SCL	Services Communs des Laboratoires
SMA	Simple Mixture Analysis
SMRI	spectrométrie de masse des rapports isotopiques
SNIF-NMR	Site-Specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance
TSP	acide triméthylsilylpropanoïque
UV	Ultraviolet
δ	Déplacement chimique en ppm

Communications scientifiques

Publications dans des journaux à comité de lecture :

1. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., GUYON F., RICHARD T. – *¹H NMR Metabolomics Applied to Bordeaux Red Wines* (Food Chemistry, Soumis, février 2019).
2. CHAVEZ-DACOSTA E., MORIN A., GAILLARD L., LANDURE M., **GOUGEON L.**, GUYON F. – *Alternative Sample Preparation for ¹H NMR Profiling Applied to Floral Origin Identification of French Honeys Using Chemometric Analysis* (Food Control, Soumis, décembre 2018).
3. BURDZIEJ A., DA COSTA G., **GOUGEON L.**, LE MAO I., CORIO-COSTET M.-F., MERILLON J.-M., SZAKIEL A., RICHARD T., CLUZET A. – *Impact of Methyl Jasmonate, Benzothiadiazole and Potassium Phosphate on Grapevine Leaf Metabolism Monitored by NMR Spectroscopy*, Metabolomics, 2019, 15(5), 67 (doi : 10.1007/s11306-019-1530-5).
4. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., RICHARD T., GUYON F. - *Wine Authenticity by Quantitative ¹H NMR Versus Multitechniques Analysis: a Case Study*, Food Analytical Methods, 2019, 12(4), 956-965 (doi : 10.1007/s12161-018-01425-z).
5. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., LE MAO I., MA W., TESSEDRE P.L., GUYON F., RICHARD T. - *Wine Analysis and Authenticity Using ¹H NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines*, Food Analytical Methods, 2018, 11(12), 3425-3434 (doi : 10.1007/s12161-018-1310-2).

Communications orales:

1. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., GUYON F., RICHARD T. – *q-NMR measurements : quantitative analysis of wine composition and application to authenticity control*, Young Scientist Symposium, Pessac 24-25 mai 2018
2. DA COSTA G., VALLS J., **GOUGEON L.**, PEDROT E., WAFFO TEGUO P., MERILLON J.M., RICHARD T. – *NMR tools for vine and wine analysis*, Nouvelle Aquitaine NMR Workshop, Pessac 16 mai 2017
3. RICHARD T., BADO C., BIAIS B., BURDZIEJ A., CLUZET S., COURTOIS A., DA COSTA G., DECENDIT A., EL KHAWAND T., GABASTON J., **GOUGEON L.**, KRISA S., VALLS J., WAFFO TEGUO P., MERILLON J.M. – *Caractérisation des polyphénols de la vigne et du vin*. Journées Concorde 2017, Lille 8-9 juin 2017
4. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., GUYON F., RICHARD T. - *Wine authenticity by ¹H NMR*. Journée des Doctorants et Post-Doctorants de l'ISVV, Villenave d'Ornon 07 novembre 2016
5. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., RICHARD T., GUYON F. - *¹H NMR versus usual multi-technical analyses. Application to authentic wines and suspicious wines comparison: A case study*. Congrès OIV, Punta Del Este Uruguay 19-23 novembre 2018

Communications affichées :

1. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., LE MAO I., PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. - *La RMN : un outil pour l'authenticité des vins*, Journée Technique du CIVB, Bordeaux 14 février 2017
2. **GOUGEON L.**, VALLS J., LE MAO I., BIAIS B., DA COSTA G., MERILLON J.M., RICHARD T. - *Quantitative analysis of complex stilbenes in wine*, Wine Active Compounds, Beaune 29 mars 2017
3. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., LE MAO I., PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. – *Wine authenticity using ¹H-NMR spectroscopy*, Journée de l'Ecole Doctorale, Talence 12 avril 2017
4. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., LE MAO I., PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. – *NMR and Wine authenticity*, Nouvelle Aquitaine workshop, Pessac 16 mai 2017
5. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., LE MAO I., PEDROT E., GUYON F., RICHARD T., DECENDIT A. - *La RMN : un outil pour l'authenticité des vins*, Journée Scientifique STOLON, Dijon 28-30 novembre 2017
6. **GOUGEON L.**, VALLS J., LE MAO I., BIAIS B., DA COSTA G., MERILLON J.M., RICHARD T., DECENDIT A. – *Quantitative analysis of complex stilbenes in wine*, Journée Scientifique STOLON, Dijon 28-30 novembre 2017
7. **GOUGEON L.**, DA COSTA G., LE MAO I., PEDROT E., GUYON F., RICHARD T. - *Wine authenticity using ¹H-NMR spectroscopy*, Journée Scientifique de la Chimie du Vin, Villenave d'Ornon 24 novembre 2017
8. **GOUGEON L.**, VALLS J., LE MAO I., BIAIS B., DA COSTA G., MERILLON J.M., RICHARD T. - *Quantitative analysis of complex stilbenes in wine*, Journée Scientifique de la Chimie du Vin, Villenave d'Ornon 24 novembre 2017

Introduction

Le vin est une boisson consommée depuis des millénaires, en témoignent les résidus retrouvés à Hajji Firuz Tepe, dans les Montagnes Zagros au nord de l'Iran, provenant du début du cinquième millénaire av. J.-C. (Bouvier, 2009). Aujourd'hui, la culture de la vigne domestique (*Vitis vinifera* L.) constitue la base de production de raisins de table, de cuve, ainsi que celle destinée au séchage. Avec 7,5 millions d'hectares de superficie en 2016, c'est une des cultures fruitières les plus importantes au niveau mondial (OIV, 2018). La production européenne représente presque 60% de la production mondiale de vin, en particulier grâce à la France, l'Italie, et l'Espagne, mais elle ne cesse de se mondialiser, notamment grâce à l'émergence de pays comme la Chine, les Etats-Unis, les pays Sud-Américains ou d'Océanie. Cette évolution peut être expliquée par la hausse de la consommation mondiale de vin observée depuis les années 1990 jusqu'à la fin des années 2000 (Figure 1). La consommation de vin devient de plus en plus globalisée, avec un déplacement de l'Europe vers d'autres pays consommateurs, en particulier les Etats-Unis et la Chine (OIV, 2018), pays devenu le premier consommateur mondial de vin rouge depuis 2013 (AFP, 2014).

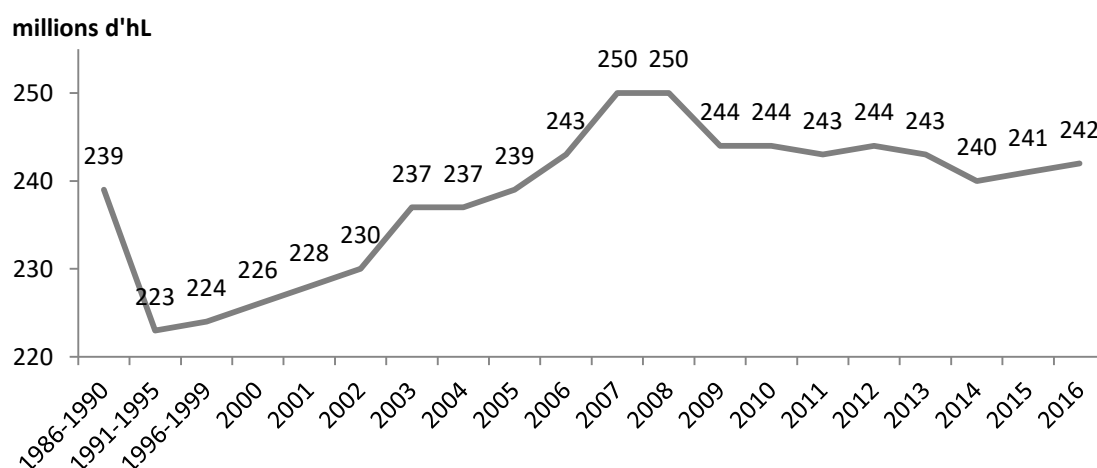


Figure 1. Évolution de la consommation mondiale de 1986 à 2016 (OIV, 2018).

Les flux commerciaux ont profondément évolué, en témoigne le développement régulier des échanges internationaux depuis les années 2000. En 2017, la France était le premier pays exportateur de vin dans le monde en terme de valeur (FranceAgriMer, 2018). De plus, les consommateurs, mieux informés et davantage connaisseurs, ont de nouvelles préoccupations concernant leurs habitudes d'achat. Ils ont de nouvelles exigences de qualité et de traçabilité tant au niveau des produits que des conditions de production.

Dans ce contexte, il est d'une importance cruciale de développer des méthodes fiables permettant de garantir la traçabilité des vins, aussi bien pour les producteurs que pour les consommateurs. D'un

point de vue purement chimique, le vin est un mélange complexe d'un grand nombre de composés dont les principaux sont l'eau, à environ 80%, et l'éthanol, entre 10 et 15%. Ce sont cependant les quelques 5% restant qui vont conditionner l'identité et la spécificité d'un vin. En 1975, 235 constituants du vin avaient déjà été isolés et identifiés (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean, & Dubourdieu, 2012), mais depuis ce sont plus de mille autres composés qui ont été identifiés avec l'aide de nouvelles techniques analytiques.

La signature chimique d'un vin dépend fortement de son terroir. Le climat, la géologie des sols, mais également les pratiques viti-vinicoles et les savoir-faire collectifs sont des facteurs déterminants de cette diversité de composition (Van Leeuwen & Seguin, 2006). Cette signature peut alors être utilisée pour assurer la traçabilité des vins (Médina et al., 2013).

Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour doser les composés du vin. En général, elles sont basées sur une séparation par chromatographie liquide (CL) ou gazeuse (CG) suivie d'une détection des composés par spectroscopie (tel que l'UV-visible) ou spectrométrie (telle que la spectrométrie de masse) (Vasquez-Villanueva, Dominguez-Vega, Montealegre, Garcia, & Marina, 2015). Ces techniques s'avèrent utiles au vu de l'information qu'elles apportent, mais il n'existe pas de détecteur de chromatographie universel. Parmi ces techniques, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) présente l'avantage de permettre l'analyse directe et simultanée de différentes familles chimiques.

Mes travaux de thèse ont été conduits au sein de l'équipe Molécules d'Intérêt Biologique (MIB) de l'Unité d'Œnologie à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) de Bordeaux. Ces travaux sont inscrits dans le cadre de la création de la plateforme VRAI (Vin-Recherche-Authenticité-Identité) au sein de l'ISVV. Cette plateforme est dédiée à l'authenticité des vins et vise deux objectifs majeurs : i) garantir l'authenticité des vins et ii) développer de nouveaux outils analytiques pour garantir cette authenticité.

L'hypothèse sur laquelle repose ce travail est que la composition métabolique d'un vin, observée par RMN du proton (RMN ^1H), permet de déceler des différences ou des similitudes relatives aux caractéristiques propres d'un vin. Ainsi, la démarche vise à identifier des signatures singulières de vins issus des diverses régions productrices, de millésimes différents, produits à partir de cépages et de pratiques viti-vinicoles multiples et variés. Dans ce sens, le concept de la démarche pourrait être : « analyser le métabolome du vin afin de confirmer ce qu'il prétend être ».

Les travaux présentés dans ce manuscrit se distinguent en cinq parties majeures. Dans la première partie, un état de l'art est présenté. Plusieurs points y sont abordés concernant l'influence du terroir sur le métabolome du vin, sa composition chimique et les techniques analytiques habituellement utilisées

pour les identifier. Les principes de la quantification par RMN (RMNq) sont abordés, ainsi qu'un récapitulatif des études qui se sont déjà intéressées à la classification des vins par RMN ^1H .

Ensuite, mes travaux de thèse sont exposés dans trois Chapitres, correspondant chacun à un article écrit pendant mon doctorat. Le premier Chapitre est consacré au développement et à l'optimisation de la méthode d'analyse quantitative des composés majoritaires des vins par RMN ^1H et à la validation de cette méthode (Gougeon et al., 2018).

Le second Chapitre expose un travail collaboratif effectué avec le Service Commun des Laboratoire de Pessac (SCL, 33) et le Château Mouton-Rothschild, visant à étudier le potentiel de la RMN à authentifier un vin par comparaison avec une bouteille originale (Gougeon, da Costa, Richard, & Guyon, 2019).

Une seconde approche plus globale de l'authenticité des vins est décrite dans le troisième Chapitre. La singularité du métabolome des vins est étudiée à partir d'une classification des vins de Bordeaux en comparaison avec d'autres vins français. Les influences du cépage, du millésime, et de l'évolution naturelle du vin en bouteille y sont observées.

Enfin, les résultats de cette thèse sont discutés dans la dernière partie de ce manuscrit. Les points critiques de la méthode de dosage sont passés en revue, ainsi que sa place dans un processus d'authenticité des vins. Le rôle d'une base de données au service de l'authenticité est analysé tout comme l'influence de certains métabolites dans la classification des vins.

État de l'art

1. Importance du terroir en œnologie

Le raisin constitue la matière première de l'élaboration des vins, la base de la typicité et de l'authenticité des vins. Son état de maturité (Figure 2) est le premier facteur qui conditionne la qualité et donc la composition du vin, reflétant sa typicité (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Lonvaud, 2012). La maturité du raisin ne constitue pas un stade physiologique précis, il est au contraire possible de distinguer plusieurs degrés de maturité d'un point de vue œnologique. La maturité de la pulpe, dite « technologique », correspondant à un rapport sucres/acides optimal ; la maturité « phénolique », liée à la pellicule et aux pépins, stade auquel les composés phénoliques ont atteint un maximum de concentration ; et enfin la maturité « aromatique », lorsque les composés aromatiques de la baie de raisin ont atteint une qualité et une concentration maximale.

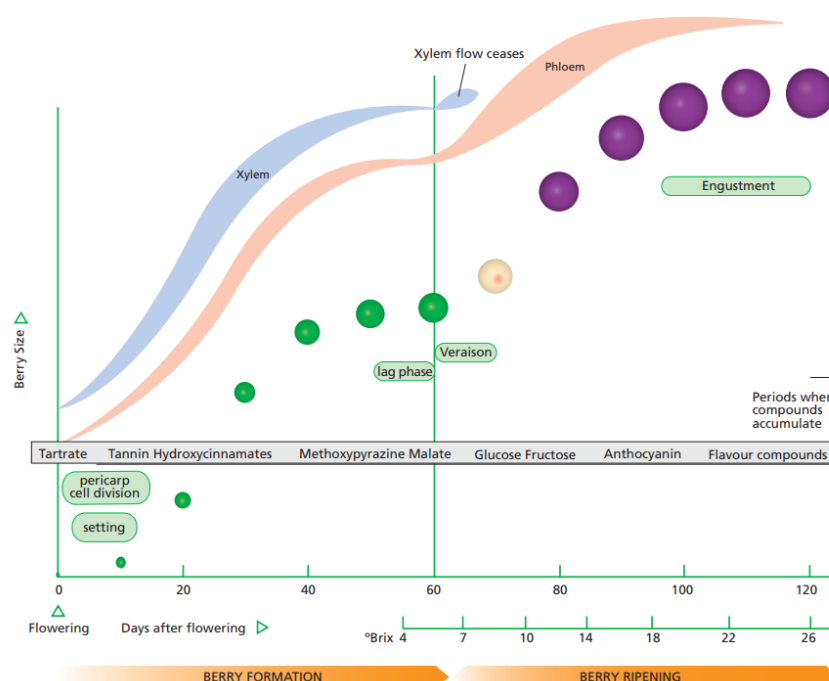


Figure 2. Présentation de la taille et la couleur relative des baies à intervalles de 10 jours après la floraison, en passant par les principaux stades de développement. Les périodes d'accumulation des composés sont présentées (Kennedy, 2002).

Une maturité optimale résulte alors d'un ensemble de phénomènes physiologiques et biochimiques complexes étroitement liés aux conditions du milieu. On parle alors de terroir, défini par l'Organisation Internationale de la vigne et du vin (OIV), comme étant « un concept qui se réfère à un espace sur lequel se développe un savoir collectif des interactions entre un milieu physique et biologique identifiable et les pratiques vitivinicoles appliquées, qui confèrent des caractéristiques

distinctives aux produits originaires de cet espace. Le terroir inclut des caractéristiques spécifiques du sol, de la topographie, du climat, du paysage et de la biodiversité » (OIV, 2010).

1.1. Adéquation cépage / terroir

Le raisin utilisé pour la production de vin est issu de nombreux cépages provenant de l'espèce *Vitis vinifera*, plante de la famille des Vitacées, du genre *Vitis*, et du sous-genre *Euvitis*. Même s'il est difficile d'estimer avec justesse le nombre de cépages cultivés souvent connus sous des noms multiples, l'apparition du génotypage et de l'analyse d'ADN a permis de préciser ce que l'ampélographie peine à résoudre : entre 7000 et 10 000 variétés de vigne seraient cultivées dans le monde. Cependant, seulement douze cépages représentaient 30% des surfaces plantées en 2009. En France, 210 cépages sont autorisés, mais onze d'entre eux représentent à eux seuls plus de 70% de la surface plantée. Les cépages blancs les plus plantés sont le Sauvignon, le Chardonnay et l'Ugni blanc. En rouge, ce sont le Merlot, le Grenache, la Syrah, le Cabernet sauvignon, le Carignan, le Cabernet franc, le Pinot noir, et le Gamay (FranceAgriMer & CNIV, 2016).

Le choix du cépage est essentiellement dû à une notion de précocité, car il est important que le processus de maturation ne se déroule pas de façon rapide et trop brutale. Une maturation trop rapide nuit à la complexité aromatique des vins et, plus généralement, à leur finesse (Drappier, Thibon, Rabot, & Geny-Denis, 2017). Par exemple, des cépages tels que le Cabernet Sauvignon et le Pinot noir perdent beaucoup de finesses aromatiques et phénoliques sous des climats trop chauds où la durée du développement, notamment la maturité, est particulièrement courte (Jackson & Lombard, 1993). La précocité de la maturation des fruits est une propriété génétiquement déterminée très variable d'un cépage à l'autre, dont le besoin en chaleur a été calculé par Huglin et Schneider (Huglin & Schneider, 1998). Les cépages précoces comme le Pinot ou le Gewurztraminer ont un besoin de température moindre pour arriver à maturité. En général, ils sont cultivés dans des zones plus septentrionales, où les climats sont relativement froids. Au contraire, les cépages tardifs, comme le Carignan ou le Grenache sont cultivés dans les régions viticoles bénéficiant de chaleurs plus importantes permettant une bonne maturité.

1.2. Conditions météorologiques et notion de millésime

Le millésime est une notion très œnologique qui prend en compte l'influence de trois facteurs climatiques fondamentaux sur la maturation du raisin : la lumière, la chaleur et l'humidité. Ces trois principaux paramètres varient considérablement selon les années et conduisent à une importante variabilité de la composition du raisin à maturité. En climat trop froid, la maturation ne peut pas être satisfaisante, mais en climat trop chaud, l'accroissement du taux de sucre peut entraîner une récolte

prématurée alors que les autres éléments tels que les composés phénoliques ou les arômes ne sont pas à parfaite maturité. Les conditions climatiques du millésime influent donc sur l'ensemble des constituants du raisin, les métabolites primaires tels que les sucres et les acides mais également les métabolites secondaires tels que les composés phénoliques et les substances aromatiques (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2012).

1.3. Importance de la qualité du sol

Les vignes peuvent être cultivées sur une grande variété de sols. Dans les sols profonds et riches, elles sont vigoureuses et très productives, mais les meilleurs vins sont généralement produits lorsque celles-ci sont cultivées sur des sols pauvres. L'effet du sol sur le comportement de la vigne et la composition du raisin est complexe, car le sol, par sa structure physique et sa composition chimique, influence la nutrition minérale de la vigne et les conditions d'absorption de l'eau, mais aussi la profondeur de l'enracinement et la température dans la zone racinaire. Aussi, il exerce une action indirecte sur le microclimat, par sa couleur et sa richesse en cailloux, qui peuvent profondément modifier les températures maximales et minimales de l'atmosphère entourant les grappes.

Parmi les composés organiques apportés à la vigne, l'azote est celui qui influence le plus la vigueur, le rendement et la maturation des raisins. De nombreuses études portent sur l'influence de différents niveaux de fertilisation azotée sur ces paramètres (Bell, Ough, & Kliewer, 1979; Spayd et al., 1994; Spayd, Wample, Stevens, Evans, & Kawakami, 1993). L'absorption de l'azote par la vigne est susceptible de varier considérablement en fonction des paramètres du sol, comme la teneur en matière organique du sol et son taux de renouvellement, par exemple. De ce fait, le niveau d'apport naturel d'azote dans les vignes peut être considéré comme une composante du terroir et il est très variable en fonction du type de sol (Van Leeuwen et al., 2000). Choné et al. ont montré qu'un apport limité d'azote aux vignes en raison des paramètres du sol augmente la qualité des vins rouges, car il réduit la vigueur de la vigne et augmente la concentration en phénols des baies et du vin (Choné, Van Leeuwen, Chéry, & Ribéreau-Gayon, 2001). Ce n'est pas vrai dans la production de vin blanc, où l'apport en azote de la vigne doit être au moins modéré pour obtenir un fort potentiel aromatique dans les raisins (Peyrot des Gachons et al., 2005).

Le statut de l'eau de la vigne dépend du climat (précipitations et évapotranspiration potentielle), du sol (capacité de rétention de l'eau) et du système d'entraînement (architecture de la canopée et zone foliaire). Les conditions d'absorption de l'eau de la vigne sont un facteur clé pour comprendre l'effet du terroir sur le potentiel de qualité du raisin, car les principaux facteurs du terroir (climat, sol et vigne) sont impliqués et interagissent entre eux (Van Leeuwen et al., 2009).

1.4. Le facteur humain

Il est important de considérer le facteur humain dans le terroir car aucun vignoble n'existe sans l'intervention de l'Homme (Figure 3). Parce que les vignes ont de faibles besoins agronomiques en minéraux et en eau, les agriculteurs avaient l'habitude de réserver les sols plus « riches » pour la culture des céréales ou le pâturage et de planter les vignes sur des sols « pauvres », peu profonds, pierreux et/ou en pentes raides. L'Humanité a également joué un rôle essentiel dans l'évolution de la sélection des variétés de vigne afin d'accroître leur capacité à produire des vins de qualité (Galet, 2000).

Aujourd'hui, le viticulteur tente d'adapter ses choix en matériel végétal et ses pratiques culturales aux différentes parcelles cultivées. Ainsi, il choisira un porte-greffe adapté au sol en fonction de la vigueur qu'il souhaite obtenir. Il adaptera la taille à l'objectif de production. Il pourra retarder plus ou moins la date de récolte. Quand un cépage a des difficultés à mûrir dans des conditions climatiques données, une conduite basse de la vigne peut contribuer à améliorer la qualité. Le microclimat au niveau des grappes peut également être amélioré grâce à une gestion spécifique de la canopée (Smart, Dick, Gravett, & Fisher, 1990). Par un apport de fertilisant, le viticulteur cherchera à compenser les pertes de matières organiques. Il choisira ou non d'enherber tout ou partie du sol, ou encore de travailler ou non le sol (Guerra & Steenwerth, 2012).

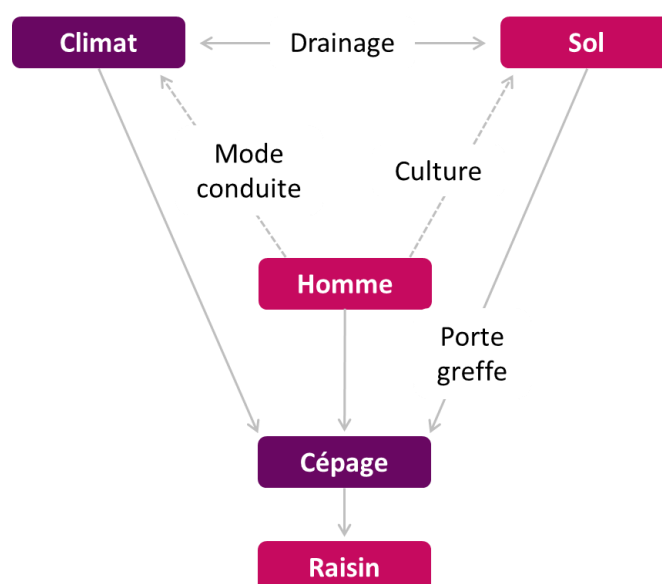


Figure 3. Schéma des relations à l'origine de la qualité et de la notion de terroir. Chaque cépage réagit aux sols, aux climats, aux hommes. (Peynaud & Blouin, 2013)

Au chai, l'œnologue peut utiliser des levures sèches actives ou laisser une flore indigène se développer, il adaptera une technique particulière d'extraction des arômes ou des polyphénols. Il choisira ou non un élevage en fût plus ou moins neuf et avec une chauffe plus ou moins importante. Dans certain cas, pour produire des vins aromatiques, la technologie viticole peut compenser la neutralité des raisins, comme c'est le cas de la macération carbonique utilisée pour favoriser la production d'esters aromatiques tel que l'acétate d'isoamyle (odeur de banane), ou l'utilisation de bois par le biais de tonneaux ou copeaux pour augmenter le bouquet aromatique.

1.5. Globalisation, échanges mondiaux et valeur du terroir

La qualité du vin est directement reliée à la qualité de la matière première, le raisin. Le terroir, qui a une influence extrêmement importante dans la qualité de la baie, joue alors un rôle déterminant dans l'appréciation et la notoriété des vins d'une appellation d'origine. La qualité de ces vins se traduit par des prix plus élevés et sont soumis à une forte demande, surtout dans le contexte économique actuel favorisant la multiplicité des échanges mondiaux.

Dans le secteur du vin, les volumes échangés représentaient jusqu'à 104 millions d'hectolitres en 2016, contre 60 millions en 2000, avec une stabilisation observée depuis 2011. En revanche, en valeur, la progression du marché mondial se poursuit et atteint 29 milliards d'euros en 2016 contre seulement 12 milliards en 2000, soit une augmentation de près de 75% (OIV, 2018).

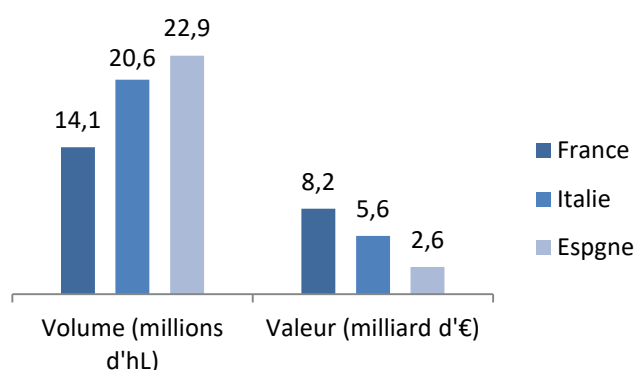


Figure 4. Exportations de vins en volume et en valeur des trois principaux pays exportateurs en 2016 (OIV, 2018).

La France exporte à l'étranger sur des marchés haut de gamme, dont la qualité reste le principal critère d'achat (SOPEXA, 2018). Comme présenté dans la Figure 4, le vin français est vendu à plus de 580 €/hL, alors que les vins italiens et espagnols le sont à 271,8 et 113,5 €/hL, respectivement. La notion de terroir et de typicité n'est pas étrangère à ce constat économique, la viticulture française étant reconnue mondialement pour son savoir-faire.

Un bon exemple est celui des vins de Bordeaux, où la qualité et le prestige ont laissé place à la notion de classification dès 1855, sous Napoléon III. Le principe des crus classés illustre parfaitement la synthèse de la typicité d'un terroir au service de la qualité. Mais ce terroir a aujourd'hui un coût, un hectare de vigne à Pauillac pouvant atteindre la somme de 2,5 millions d'euros, ou encore 4,4 millions d'euros en Appellation d'Origine Protégée (AOP) Pomerol (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2018). A l'export, les vins de Bordeaux représentent une majorité des vins AOP, tant en valeur qu'en volume (FranceAgriMer, 2018).

Cependant, la forte valeur ajoutée, que confère la renommée et le savoir-faire de la viticulture française, se traduit par l'existence de contrefaçons comme le montre l'actualité récente (AFP, 2018a, 2018b; Brenot, 2016; Rothwell & Atlas, 2016). L'Office de l'union européenne pour la propriété intellectuelle (EUIPO) présente quelques chiffres pour illustrer l'ampleur de la fraude. Pour l'Europe dans son ensemble, le total de contrefaçon est estimé à 4,4% de la consommation de spiritueux (740 million €) et 2,3% de la consommation de vins (530 millions €). En considérant les deux produits, le total des pertes représente 3,3% de la consommation dans l'Union Européenne pour un total de 1,3 milliard € (EUIPO, 2016).

Il est donc nécessaire de sauvegarder ce savoir-faire en garantissant aux consommateurs des produits authentiques. L'authenticité des vins pour prouver la marque d'un terroir et donc d'une appellation d'origine est primordiale dans une viticulture devenue mondiale. Si le terroir affecte les caractéristiques physico-chimiques du vin, il est légitime de penser que la composition du vin peut refléter ce terroir.

2. Métabolome du raisin et du vin

Selon l'OIV, le vin est « exclusivement la boisson résultant de la fermentation alcoolique complète ou partielle du raisin frais, foulés ou non, ou du moût de raisin. Son titre alcoométrique acquis ne peut être inférieur à 8,5% vol. » (OIV, 2015). Le Tableau 1 référence de façon non exhaustive les différents composés ou familles de composés retrouvés dans les vins selon leurs teneurs moyennes : acides organiques, alcools et autres produits volatils, glucides, substances azotées et composés phénoliques.

Tableau 1. Composition des vins par famille chimique et ordre de grandeur habituellement observé dans les vins secs (Blouin & Cruège, 2013; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

Teneurs	Familles	Composés
plusieurs g/L	Eau	
	Alcools	éthanol
	Polyalcools	glycérol
	Composés azotés	proline
ordre du g/L	Acides organiques	tartrique, malique, gluconique
	Polyalcools	butane-2,3-diol
de l'ordre de la centaine de mg/L	Acides organiques	glucoronique, succinique, lactique, acétique, galacturonique
	Alcools	méthanol, 3-méthylbutan-1-ol, 2-méthylbutan-1-ol
	Polyalcools	méso-inositol
	Glucides	L-arabinose, D-ribose, D-xylose, L-rhamnose (pentoses) ; D-glucose, D-fructose (hexoses)
	Composés azotés	alanine, arginine, acide glutamique, histidine, leucine, lysine, phénylalanine, sérine, thréonine, tyrosine, glutamine
	Acides organiques	citrique, pyruvique, oxaloacétique, α -cétoglutarique, diméthylglycérique, citramalique
	Composés phénoliques	dérivés de l'acide benzoïque (acide gallique, acide syringique...), dérivés de l'acide cinnamique (acide p-coumarique, acide caféique...), anthocyanes
de l'ordre de la dizaine de mg/L	Composés aromatiques	acétate d'éthyle, aldéhydes (acétaldéhyde...)
	Alcools	propan-1-ol, 2-méthylpropan-1-ol
	Polyalcools	érythriol (diol); arabitol, xylitol (pentols); mannitol, sorbitol (hexols)
	Glucides	D-galactose
	Composés azotés	acide aspartique, cystine, glycine, isoleucine, méthionine, tryptophane, valine, acide γ -aminobutyrique
	Acides organiques	oxalique, fumarique, shikimique
	Composés phénoliques	flavonols (kaempférol, quercétine, myricétine, isorhamnétine), flavanols (catéchine, épicatechine...)
de l'ordre du mg/L	Composés aromatiques	lactate d'éthyle, cétones (acétoïne, diacétyl...)
	Composés azotés	asparagine, cystéine, hydroxyproline, ornithine, tyramine, amines biogènes
	Oligoéléments	bore, silicium, manganèse, zinc, aluminium, rubidium, strontium
	Composés phénoliques	flavanonols, stilbènes (resvératrol, picéide...)
de l'ordre du μ g/L	Composés aromatiques	acétate d'isoamyle, acétate de 2-phényléthanol
	Alcools	linalol, géraniol, nérol, terpinéol
	Oligoéléments	brome, fluor, iode, plomb, arsenic, titane, baryum, étain
ng/L	Composés aromatiques	fermentaires (phénols volatils, lactones) ; tertiaires (diméthylsulfure, sotolon)
	Polyalcools	propane-1,3-diol (diols), ribitol (pentol)
	Composés aromatiques	méthoxyypyrazines, thiols

2.1. Les acides organiques

Les acides organiques du vin proviennent directement du raisin ou sont d'origine fermentaire (Blouin & Cruège, 2013). Ils participent largement à la constitution, à la stabilité et aux qualités organoleptiques des vins, en particulier des vins blancs qui, contrairement aux vins rouges, ne possèdent pas ou peu de composés phénoliques. Une acidité élevée est généralement le signe d'un potentiel de vieillissement plus important, grâce aux propriétés de conservation conférées aux vins par une meilleure stabilité microbiologique et physico-chimique.

Les principaux acides organiques du raisin sain sont l'acide tartrique, l'acide malique et l'acide citrique (Tableau 2). L'acide tartrique est peu répandu dans la nature. C'est un acide relativement fort, spécifique du raisin, un des plus importants dans les moûts, surtout dans les régions septentrionales (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012). L'acide malique se rencontre chez tous les organismes vivants. Sa concentration dans la baie se réduit vite après véraison, par un phénomène de dilution mais aussi par sa combustion, ce qui implique que ses teneurs sont potentiellement moins élevées dans les climats les plus chauds (Jackson & Lombard, 1993). L'acide citrique est très répandu dans la nature, notamment pour son implication dans le cycle de Krebs.

Les principaux acides de fermentation sont l'acide lactique, l'acide succinique et l'acide acétique. La production d'acide lactique est principalement d'origine bactérienne. Lors de la fermentation malolactique, les bactéries lactiques du vin transforment l'acide L-malique exclusivement en acide L-lactique (Blouin & Cruège, 2013). L'acide succinique est lui d'origine levurienne. Il intervient dans le métabolisme des lipides et le cycle de Krebs. Il est connu pour son goût intense, à la fois amer et salé faisant saliver, et il confère de la sapidité et de la vinosité (Peynaud & Blouin, 2013). L'acide acétique peut être produit par les levures au cours de la fermentation alcoolique, par les bactéries lactiques après transformation de l'acide citrique et des sucres résiduels, ou encore par les bactéries acétiques par oxydation de l'éthanol (Zoecklein, Fugelsang, Gump, & Nury, 2014).

L'acide shikimique est présent dans la pellicule des baies de raisin et est toujours présent dans les mouts et les vins (Tusseau & Benoit, 1987), mais ne présente pas de propriété organoleptique importante (Mardones et al., 2005). Cependant, il est utile comme marqueur spécifique des cépages, ses teneurs étant variables en fonction des variétés (Chabreyrie et al., 2008; Román et al., 2018). Il a été démontré que les vins de Cabernet Sauvignon présentaient des concentrations plus élevées d'acide shikimique par rapport aux vins de Merlot ou de Carmenère après analyse par chromatographie liquide (Mardones et al., 2005).

Tableau 2. Principaux acides organiques retrouvés dans les vins et teneurs indicatives (Blouin & Cruège, 2013; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

	Composés	Teneurs	Unité
issus de raisins sains	tartrique	2 - 5	g/L
	malique	<5	g/L
	citrique	<0,5	g/L
	oxalique	<30	mg/L
	ascorbique	1 à 10	mg/L
	shikimique	<100	mg/L
issus de raisins altérés	gluconique	2 à 5 (vins liquoreux)	g/L
	glucoronique	<3	g/L
matières pectiques	galacturonique	1 à 2	g/L
	mucique	100 à 500 (2000 si pourris)	mg/L
issus des moûts et levures	acides gras supérieurs à moyenne et longue chaîne	<10	mg/L
	fumarique	<30	mg/L
origine fermentaire	pyruvique	100	mg/L
	oxaloacétique et α -cétooglutarique	<200	mg/L
	succinique	0,5 - 1,5	g/L
	diméthylglycérique	<600	mg/L
	citramalique	100 à 300	mg/L
	glyoxylique	<1	mg/L
	glycérique	traces	
	lactique	0,1 - 2	g/L
	acétique	0,3 - 1,1	g/L
	propionique	0,5 - 2	mg/L
	butyrique	0,5 - 1	mg/L
	isobutyrique	1 - 2	mg/L
	isovalérique	<2	mg/L

Les acides organiques du vin peuvent être séparés et dosés simultanément par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (OIV, n.d.-g). Pour le dosage des acides tartrique et malique, il est préférable d'utiliser la séparation sur silice greffée octyl (OIV, 2011) et pour les acides citrique et lactique, la séparation sur échangeur d'ions (OIV, 2004). Cette méthode permet aussi une évaluation

des teneurs en acides acétique et succinique. Des méthodes enzymatiques (OIV, 2002, n.d.-e, n.d.-d), chimique (OIV, n.d.-c) ou par gravimétrie (OIV, n.d.-f) permettent également de doser les acides lactique, malique et citrique. Enfin, les acides tartrique, malique, lactique peuvent être séparés et dosés par électrophorèse capillaire (OIV, n.d.-j).

2.2. Les alcools et autres produits volatils

Après l'eau, l'éthanol (ou alcool éthylique) est le constituant le plus abondant dans le vin. Il provient essentiellement de la fermentation alcoolique du sucre du moût, une infime partie de la fermentation pouvant avoir lieu au sein de la baie. La richesse alcoolique du vin est exprimée par le degré alcoolique volumique qui représente le pourcentage d'alcool dans le vin en volume. Son dosage est réalisé par distillation, selon la méthode OIV-MA-AS312-01A (OIV, n.d.-l).

Le méthanol est un composé toxique naturellement présent dans les vins en faibles doses, qui n'a pas d'incidence organoleptique. Il provient essentiellement de l'hydrolyse enzymatique des pectines dans le moût, sa teneur est donc directement liée à l'importance de la macération des parties solides de la vendange (Cabaroğlu, 2005; Revilla & González-SanJosé, 1998).

On observe également dans le vin la présence d'alcools supérieurs, possédant plus de deux atomes de carbone. Ils sont synthétisés par les levures, directement à partir des sucres ou à partir des acides aminés. Les principaux sont l'alcool isobutylique, l'alcool isoamylique ou encore le phényl-2-éthanol (Rankine, 1967). À faible dose, ils participent à la complexité aromatique des vins, mais ils peuvent masquer la finesse aromatique à des concentrations trop importantes (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

Les polyols se caractérisent par la présence de plusieurs radicaux « hydroxyles ». Le glycérol est le constituant le plus important du vin après l'eau et l'éthanol. Il est formé par les levures en début de fermentation alcoolique. Contrairement à une idée reçue, il n'intervient pas ou peu dans la sensation de gras et de moelleux des vins (Gawel, Smith, Cicerali, & Keast, 2017). D'autres polyols sont observés dans les vins, comme le butane-2,3-diol, produit secondaire de la fermentation alcoolique, ou encore le mésoinositol, pour lesquels il est difficile d'attribuer un rôle organoleptique (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

Les esters résultent de la réaction d'une fonction alcool sur une fonction acide, avec élimination d'une molécule d'eau. Le vin contient un grand nombre d'alcools et d'acides différents, le nombre d'esters possible est par conséquent très important. Ils ont deux origines distinctes : les processus fermentaires et la conservation du vin, qui peuvent intervenir dans la synthèse d'un même ester (Sumby, Grbin, & Jiranek, 2010). Dans le vin, l'acétate d'éthyle est l'ester le plus important, dont la majeure partie est

produite pendant l'élevage en fût de chêne suite à l'intervention des bactéries acétiques aérobies. Il est responsable des caractéristiques olfactives des vins atteints d'acescence. On retrouve également des esters éthyliques d'acide gras, formés par la levure pendant la fermentation, et des esters d'origine chimique, dont les quantités dans les vins augmentent avec l'âge, comme le lactate d'éthyle.

Tableau 3. Principaux alcools et autres volatils retrouvés dans les vins et teneurs indicatives (Blouin & Cruège, 2013; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

	Composés	Teneurs	Unités
	éthanol	8 - 15	%.alc.vol
	méthanol	150 - 300	mg/L
alcools supérieurs	propan-1-ol	30	mg/L
	2-méthylpropan-1-ol	80	mg/L
	3-méthylbutan-1-ol	400	mg/L
	2-méthylbutan-1-ol	150	mg/L
alcools terpéniques	linalol	0 - 0,8	mg/L
	géraniol	0 - 1	mg/L
	nérol	0 - 0,25	mg/L
	terpinéol	0 - 0,1	mg/L
diols	glycerol	6 - 10	g/L
	butane-2,3-diol	0,3 - 1,4	g/L
	propane-1,3-diol	traces	
	érythriol	10 - 200	mg/L
pentols	arabitol	20 - 50 (<700 : vins liquoreux)	mg/L
	xylitol	15 - 35 (<100 : vins liquoreux)	mg/L
	ribitol	Traces	
hexols	méso-inositol	0,2 - 0,8 (<1,2 : vins liquoreux)	g/L
	mannitol	<100 (<1,5 : vins liquoreux)	mg/L
	sorbitol	<100 (<600 : vins liquoreux)	mg/L
esters éthyliques	acétate d'éthyle	100 - 150	mg/L
	lactate d'éthyle	5 - 60	mg/L
aldéhydes	acétaldéhyde, propanal, etc.	<200	mg/L
cétones	acétoïne, diacétyl, etc.	<50	mg/L

Enfin, l'éthanal est un aldéhyde produit de l'oxydation de l'éthanol. Dans son état libre, son odeur évoque la pomme oxydée, caractéristique des vins éventés (Schreier & Jennings, 1979). Aussi, l'acétoïne est une cétone formée lors de la fermentation par des bactéries lactiques et des levures (Romano & Suzzi, 1996). Elle est produite à partir de l'éthanal et possède une odeur lactée.

Tous ces composés volatils peuvent être dosés par chromatographie en phase gazeuse après injection directe dans une colonne capillaire et détectés par ionisation de flamme (OIV, n.d.-h) ou par spectrométrie de masse.

2.3. Les glucides

Les glucides sont des produits de la photosynthèse de la vigne. En œnologie, il est fréquemment utilisé le terme de sucres fermentescibles. Au cours de la fermentation alcoolique, le glucose et le fructose, deux hexoses, sont dégradés en éthanol et autres produits secondaires par les levures. Les vins secs, résultant d'une fermentation complète des sucres, renferment tout de même des petites quantités d'hexoses (Tableau 4), principalement du fructose car le glucose est fermenté en priorité par la majorité des levures (Berthels, Cordero, Bauer, Thevelein, & Pretorius, 2004). Ils peuvent être dosés dans les vins par HPLC (OIV, n.d.-k) ou par une méthode enzymatique en vue du calcul de rapport glucose/fructose (Kliewer, 1967).

Tableau 4. Principaux glucides retrouvés dans les vins et teneurs indicatives (Blouin & Cruège, 2013; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

	Composés	Teneurs en g/L
pentoses	L-arabinose	0,2 - 1,5
	D-ribose	0,1
	D-xylose	<0,4
	L-rhamnose	0,1
hexoses	D-glucose	0,1 - 0,8 (<30 dans vins liquoreux)
	D-fructose	0,5 - 1,5 (<55 dans vins liquoreux)
	D-galactose	<0,1

Les pentoses ne sont pas fermentescibles par les levures utilisées en œnologie. Aussi bien dans les moûts que dans les vins, les quantités de pentoses sont limitées (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012). On y retrouve surtout l'arabinose et le xylose, et dans une moindre mesure le ribose et le rhamnose (Tableau 4). Ils entrent dans la composition des pectines (arabinose), ou des nucléotides et

acides nucléiques (ribose). Les sucres résiduels des vins secs peuvent être dosés par CG après formation de leurs dérivés triméthylsilylés (OIV, n.d.-b). Le dosage des sucres par CG est relativement long et compliqué. Il est réservé à la détermination de traces de sucres et en particulier de ceux pour lesquels il n'existe pas de méthode enzymatique utilisée en routine, mais il est également applicable au glucose et fructose.

D'autres polysaccharides composent les pectines et vont être retrouvés dans le vin en fonction de l'importance de la dégradation des pellicules lors de la macération. En particulier, l'acide galacturonique, qui forme les chaînes d'homogalacturonanes dégradées par des pectinases lors des premières étapes de la vinification (Vidal, Williams, Doco, Moutounet, & Pellerin, 2003).

2.4. Les substances azotées

Par son rôle majeur sur la croissance des levures et bactéries, l'azote a une importance fondamentale dans la cinétique de fermentation et par conséquent sur la qualité du vin. L'azote total dans un moût ou dans un vin comprend une forme minérale et différentes formes organiques, essentiellement des acides aminés. On distingue de l'azote total la forme assimilable par les levures, qui comprend la teneur en ions ammonium et les acides aminés, sauf la proline (très peu assimilable en absence d'oxygène) (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

Les acides aminés participent à l'importance de la capacité tampon des vins (Dartiguenave, Jeandet, & Maujean, 2000). Au cours du vieillissement, ils sont susceptibles de réagir avec d'autres composés pour former des composés odorants. Ils peuvent alors participer à la complexité du bouquet de vieillissement (Marchand, de Revel, & Bertrand, 2000). Dans les vins, certains acides aminés prédominent, en particulier la proline (Tableau 5). La chromatographie liquide haute performance est le plus généralement utilisée pour l'analyse des acides aminés du vin après détection par dérivation (Sanders, 1985).

L'arginine et la proline sont caractéristiques des cépages, dont certains sont à dominante proline, comme le Chardonnay, le Cabernet sauvignon et le Merlot, d'autres à dominante arginine comme le Pinot noir (Huang, 1989).

Une autre classe de composés faisant partie de la famille des composés azotés sont les amines biogènes. Ce sont des composés toxiques, même si aucune réglementation concernant leurs teneurs n'est fixée. Les principaux retrouvés dans les vins sont l'histamine, la tyramine, la putrescine et la cadavérine. Ils sont formés par décarboxylation des acides aminés par des microorganismes sous l'action d'enzymes décarboxylases lors du processus de vinification ou d'élevage (Beneduce et al.,

2010). Ils sont dosés par chromatographie liquide à l'aide d'une colonne C18 après dérivation à l'O-phthalaldéhyde et détectés par fluorimétrie (OIV, n.d.-a).

Tableau 5. Principaux acides aminés retrouvés dans les vins et teneurs indicatives (Blouin & Cruège, 2013; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

	Composés	Teneurs	Unité
acides aminés	azote ammoniacal	20	mg/L
	alanine	<300	mg/L
	arginine	<200	mg/L
	acide aspartique	<150	mg/L
	acide glutamique	<400	mg/L
	cystine	<100	mg/L
	glycine	<100	mg/L
	histidine	<200	mg/L
	isoleucine	<100	mg/L
	leucine	<200	mg/L
	lysine	<300	mg/L
	méthionine	<50	mg/L
	phénylalanine	<200	mg/L
	proline	<3,5	g/L
	sérine	<400	mg/L
	thréonine	<400	mg/L
	tryptophane	<20	mg/L
	tyrosine	<200	mg/L
	valine	<200	mg/L
	acide γ -aminobutyrique	<100	mg/L
amines biogènes	asparagine	<100	mg/L
	cystéine	<10	mg/L
	glutamine	<10	mg/L
	tyramine	<5	mg/L
	histamine	3,9 (blancs) - 6,4 (rouges)	mg/L
	cadavérine	5	mg/L
	putrescine	5	mg/L

2.5. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des substances qui jouent un rôle important en œnologie. Ils sont responsables d'une grande majorité des différences entre les vins blancs et rouges, en particulier de la couleur et de la saveur. Ils proviennent des différentes parties de la grappe et sont extraits dans le vin pendant la vinification, mais également du bois utilisé lors de l'élevage en tonneau ou suite à l'utilisation de copeaux. Leur structure évoluera tout au cours de l'élevage et du vieillissement du vin.

Tout d'abord, les acides phénols sont des composés phénoliques contenant au moins une fonction carboxylique. Dans les vins, sept dérivés de l'acide benzoïque sont connus. Notamment, l'acide gallique et l'acide syringique sont retrouvés en priorité dans les vins rouges. Plusieurs dérivés de l'acide cinnamique sont présents dans le vin, comme l'acide caféique ou l'acide p-coumarique, souvent estérifiés essentiellement avec l'acide tartrique. Ces constituants sont incolores sauf après oxydation où ils peuvent être responsables du brunissement du vin. Ils ne présentent ni saveur ni odeur particulières, mais peuvent être précurseurs d'arômes inintéressants et sont principalement dosés par HPLC-UV (Lorrain, Ky, Pechamat, & Teissedre, 2013).

Ensuite, les flavonoïdes font partie d'une famille très vaste et importante en œnologie puisqu'ils regroupent entre autres les anthocyanes, les flavonols et les flavan-3-ols (composés à l'origine des tanins condensés). Les anthocyanes sont les pigments responsables de la couleur rouge des raisins et des vins. Dans les vins, neuf anthocyanes les plus abondantes peuvent être dosées par CLHP-DAD ou UV-VIS (OIV, 2007). Le profil anthocyanique peut être d'une importance particulière pour la discrimination des vins. Le dosage des anthocyanes permet la détection de cépages hybrides, dans lesquels des anthocyanes diglucosides ont été détectées par HPLC-MS, alors que de telles formes ne sont pas présentes dans les cépages issus de *V. vinifera* (Baldi, Romani, Mulinacci, Vincieri, & Casetta, 1995). Il a également été rapporté que les quantités relatives d'anthocyanes diffèrent entre cépages, comme, par exemple, l'absence d'anthocyanes acétylées dans les raisins de Pinot Noir (Médina et al., 2013).

Tableau 6. Principaux composés phénoliques retrouvés dans les vins et teneurs indicatives (Blouin & Cruège, 2013; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2012).

	Composés	Teneurs	unité
acides phénols et dérivés	dérivés de l'acide benzoïque (acide gallique, acide syringique...)	100 - 200 (rouges);	mg/L
	dérivés de l'acide cinnamique (acide p-coumarique, acide caféique...)	1 à 10 (blancs)	
flavonoïdes	flavonols	20 - 100 (rouges); 1 - 3 (blancs)	mg/L
	anthocyanes	200 – 500 (rouges)	mg/L
	flavan-3-ols et tanins condensés	50 - 100 (rouges)	mg/L
stilbènes	resvératrol, picéide et dérivés	<20	mg/L

Enfin, les tanins condensés résultent majoritairement de la polymérisation des flavan-3-ols : catéchine et épicatechine. De leur polymérisation résulte des procyanidines, pouvant compter jusqu'à 30 unités monomériques. Ce sont les composés responsables de la structure et de l'astringence des vins. Les capacités discriminantes des flavanols ont déjà été mises en évidence pour la classification des cépages (Mattivi, Guzzon, Vrhovsek, Stefanini, & Velasco, 2006) ou des origines (Makris, Kallithraka, & Mamalos, 2006 ; Pavloušek & Kumšta, 2013).

3. Authenticité des vins : contrefaçons et méthodes de détection

3.1. Exemple de contrefaçons

3.1.1. Scandales de la fin du XXe siècle

En juin 1973, un scandale sur les vins de Bordeaux connu sous le nom de *Winegate* a éclaté. La fraude, commise par la maison Cruse, l'une des maisons viticoles les plus respectées et les plus prospères de Bordeaux, visait à acheter du vin bon marché de la région du Languedoc, à le falsifier avec des produits chimiques et à le vendre comme étant des AOC Bordeaux. La fraude concernait deux millions de bouteilles totalisant un bénéfice de quatre millions de francs français (Lecat, Brouard, & Chapuis, 2017). La même année, les propriétaires de Château Pontet-Canet ont été accusés de mélanger du vin espagnol (Rioja) avec le leur, en faisant passer le mélange comme du Bordeaux de qualité.

Des scandales très médiatisés ont été aussi révélés sur des vins produits dans d'autres pays européens. En 1985, il a été révélé qu'environ soixante-dix producteurs de vin autrichien avaient ajouté du diéthylène glycol à leurs vins, dans le but de masquer l'addition de sucre au vin effectuée suite à une succession de millésimes de mauvaise qualité (Holmberg, 2010). L'adultération ne présentait aucun danger pour la santé, contrairement à un autre scandale en Italie un an plus tard, où certains producteurs avaient ajouté du méthanol à leurs vins, provoquant plusieurs décès parmi les consommateurs (Barbera & Audifredi, 2012). Certains vignobles « inventifs » ont même créé des vins sans raisin. La confession d'un accusé a énuméré les ingrédients utilisés pour produire un « vin » parfait (Stöckl, 2006), comprenant de l'eau sucrée à laquelle sont introduits divers acides, sels et autres produits chimiques.

3.1.2. Fraudes plus récentes

À Bordeaux, 45 ans après l'affaire du *Winegate*, une société de négoce a été condamnée pour tromperie sur la nature, la qualité, l'origine ou la quantité d'une marchandise. La fraude avait pour

objectif de mélanger des vins languedociens avec des assemblages d'appellations bordelaises vendus sous des étiquettes Pomerol, Margaux ou Saint-Julien. Au total, plus de 6000 hL de vin d'une valeur de 1,2 millions d'euros ont été déclarés comme étant frauduleux. En Bourgogne, autre région productrice renommée en France, deux sociétés ont été jugées pour fraudes à la coupe, tromperie à l'étiquetage ou encore usurpation d'appellation d'origine, après avoir mélangé du vin de table ou d'autres appellations avec leur AOC Bourgogne ou crus prestigieux (Brenot, 2016; Mansson, 2004).

Les contrefaçons peuvent aussi porter sur des vins importés ou exportés. Il a été découvert que plus de 120 000 hL de Pinot noir faussement étiquetés ont été frauduleusement exportés du Languedoc vers les Etats-Unis (Styles, 2009). En juillet 2018, ce sont 70 000 hL de vin rosé espagnol qui ont été importés et vendus en tant que vins français (AFP, 2018b).

3.1.3. Fraudes aux collectionneurs

Au cours des trente dernières années, le marché des vins anciens et rares s'est fortement développé. Le vin est devenu un investissement. Ainsi, le marché en expansion et la hausse des prix ont fait de la falsification des bouteilles individuelles une entreprise lucrative. Ce type de fraude peut être nommé fraude aux collectionneurs, au contraire de la fraude à la consommation impliquant une plus grande quantité de vin (Holmberg, 2010).

Là-encore, les vins de Bordeaux et de Bourgogne, par leur forte valeur, sont touchés par les falsifications. En 1988, un collectionneur avait acheté quatre bouteilles de Château Lafite 1784 et Brenne-Mouton 1787 portant les initiales « Th.J » gravées sur la bouteille, indiquant qu'elles avaient appartenu à Thomas Jefferson, mais visiblement frauduleuses (Radden Keefe, 2007). Ce même collectionneur avait aussi fait l'acquisition aux enchères de vins de Bordeaux prestigieux, qui se sont avérées être frauduleux suite à l'examen visuel des bouchons, étiquettes, formes des bouteilles, et à la datation au carbone 14 (Jacobs, 2013). Un autre scandale très largement médiatisé est lié à Rudy Kurniawan, condamné pour avoir produit à grande échelle de faux vins majoritairement bourguignons (Rothwell & Atlas, 2016).

3.2. Méthodes d'analyses chimiques dans la détection des fraudes

L'authentification des aliments implique des préoccupations techniques, structurelles et juridiques (Cubero-Leon, Peñalver, & Maquet, 2014). Les méthodes et les résultats doivent être:

- Précis pour fournir une interprétation correcte des données. Ceci est principalement réalisé en utilisant des matériaux de référence certifiés pour assurer la précision des mesures.

- Robustes pour prendre soin de la variabilité naturelle du contenu de l'échantillon, des erreurs de mesure et des effets du traitement, du stockage et de la manipulation.
- Comparables entre les différentes études pour s'assurer qu'elles peuvent être comparées de manière significative aux références d'une base de données.

En Europe, le contrôle officiel du vin comprend i) le contrôle de la qualité du vin loyal et marchand (sensorielle et goûts indésirables), ii) le contrôle des déclarations sur l'étiquette (teneur en alcool, qualité, cépage/assemblage, origine géographique, millésime) et iii) les adultérations chimiques comme l'acidification illégale, l'addition d'eau, d'alcool, de sucre, de colorants, d'édulcorants, de conservateurs ou d'arômes (Riedl, Esslinger, & Fauhl-Hassek, 2015).

Il n'est pas toujours nécessaire de faire appel à des méthodes d'analyses modernes pour résoudre les problèmes d'authentification. Des méthodes simples peuvent être utiles, comme la dégustation des vins. Bien qu'en principe très subjectives, les techniques actuelles permettent d'utiliser l'évaluation sensorielle de manière objective (Médina et al., 2013). Le test triangulaire permet de comparer un échantillon de référence à un vin suspect, ce qui peut être un moyen très efficace de détecter le vin contrefait de l'original.

Compte tenu de ces objectifs, l'évaluation classique de l'authenticité du vin repose généralement sur l'analyse de marqueurs spécifiques, qui sont indicatifs d'une certaine propriété du produit. Dans le contrôle officiel des aliments, l'authentification du vin est donc effectuée de manière routinière par une analyse ciblée utilisant les approches chimiques classiques.

3.2.1. Techniques chromatographiques

La chromatographie liquide est la technique de séparation la plus utilisée dans les laboratoires d'analyse et également dans le domaine des adultérations alimentaires. En général, une bonne sélectivité et une bonne sensibilité peuvent être obtenues pour divers métabolites. Les principaux inconvénients en LC sont les temps d'analyse relativement longs et le plus souvent l'exigence d'un traitement préalable des échantillons (Vasquez-Villanueva et al., 2015). Les analyses des polyphénols ont été largement utilisées pour différencier les vins en fonction de la présence, de l'intensité ou des proportions de certains de ces composés.

Des études sur les anthocyanes ont démontré leur potentiel pour discriminer les cépages rouges (González-Neves et al., 2007; Médina et al., 2013), même si leurs teneurs peuvent être affectées par les méthodes de production (Holmberg, 2010; Takeoka & Ebeler, 2011). Les cépages peuvent également être caractérisés par le profil en flavonols (Castillo-Muñoz, Gómez-Alonso, García-Romero, & Hermosín-Gutiérrez, 2007; Mattivi et al., 2006) ou en fonction de leur teneur en acide shikimique (Mardones et al., 2005; Médina et al., 2013). Le dosage combiné de composés phénoliques

appartenant à différentes classes a été proposé pour l'authentification des vins, permettant de les différencier selon leur origine géographique (Bellomarino, Conlan, Parker, Barnett, & Adams, 2009; Serrano-Lourido, Saurina, Hernández-Cassou, & Checa, 2012), cépage ou millésime (Jaitz et al., 2010).

La chromatographie gazeuse est la principale technique pour la séparation et la détermination des composés volatils. Cette technique a permis d'étudier le potentiel des composés volatils à classifier les vins selon leurs cépages (Gómez-Meire, Campos, Falqué, Díaz, & Fdez-Riverola, 2014; Weldegergis, de Villiers, & Crouch, 2011), leurs origines (Green, Parr, Breitmeyer, Valentin, & Sherlock, 2011), ou le millésime (Kruzlicova et al., 2009).

3.2.2. Techniques spectroscopiques

La spectroscopie infra-rouge (IR) est une technique couramment utilisée pour l'identification des fraudes alimentaires. Lorsqu'un échantillon complexe tel qu'un produit alimentaire est analysé par spectroscopie IR, le spectre obtenu peut être utilisé comme une empreinte car il est caractéristique de l'aliment. Les principales études d'authentification par spectroscopie IR portent sur la classification des vins appartenant à différentes origines (Ioannou-Papayianni, Kokkinofa, & Theocharis, 2011; Liu et al., 2008), mais elle a aussi été utilisée pour la classification des cépages (Bevin, Damberg, Fergusson, & Cozzolino, 2008; Cozzolino, Smyth, & Gishen, 2003).

La spectroscopie Raman est une technique analytique rapide, polyvalente et non destructive qui convient à l'analyse de nombreux composants alimentaires. En comparaison avec la spectroscopie IR, la spectroscopie Raman présente une sensibilité plus faible, ce qui entraîne une utilisation moins étendue dans le domaine alimentaire (Vasquez-Villanueva et al., 2015). Des études ont montré la faisabilité de cette technique pour l'analyse des vins blancs (Magdas, Guyon, Feher, & Pinzaru, 2018; Martin et al., 2015). En particulier, Magdas et al. ont démontré que la spectroscopie Raman était efficace pour classifier les vins de différents cépages, origines géographiques, et millésimes.

3.2.3. Radioactivité

Basée sur l'utilisation de cristaux de germanium à haute performance, la spectrométrie gamma à faible bruit de fond a montré que le vin contient des traces de Césium 137 (moins de 1 Bq/L) en fonction du millésime (Hubert, Perrot, Gaye, Médina, & Pravikoff, 2009). Le Césium 137 résulte uniquement de l'activité humaine, les vins produits avant 1945 ne doivent alors pas en contenir. Cette technique analytique non invasive s'est ainsi avérée très utile pour détecter des vins contrefaits du XIXe siècle et de la première moitié du XXe siècle (Médina et al., 2013). Elle a permis de résoudre l'énigme

historique sur des vins très anciens, datant de l'époque de la révolution française, qui auraient pu appartenir à Thomas Jefferson (Médina et al., 2013).

3.2.4. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet une sensibilité et une sélectivité élevées et son utilisation a considérablement augmenté au cours des dernières années. L'empreinte de la teneur en métaux dans les vins, réalisée par spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS), est une méthode précieuse pour authentifier l'origine géographique des vins. La présence et la concentration des oligo-éléments reflètent la géochimie du sol dans lequel les vignes ont été cultivées, et ont servi à identifier des vins de différentes régions (Angus, O'Keeffe, Stuart, & Miskelly, 2006; Galgano, Favati, Caruso, Scarpa, & Palma, 2008) et de différents pays (Serapinas et al., 2008).

La spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI) est l'une des techniques utilisées pour obtenir des informations sur les origines géographiques des aliments (Luykx & van Ruth, 2008). La détection d'isotopes légers a été étudiée pour la caractérisation de l'origine géographique de vins rouges (Di Paola-Naranjo et al., 2011; Ogrinc, Košir, Kocjančič, & Kidrič, 2001). Les données isotopiques de ces études ont toutes été couplées à des données issues d'autres techniques analytiques, en particulier les teneurs en minéraux ou le profil phénolique.

3.2.5. Résonance magnétique nucléaire du deutérium

L'authenticité d'un moût ou d'un vin peut être contrôlée en mesurant le rapport deutérium/hydrogène par RMN-FINS (Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique par Résonance Magnétique Nucléaire). Cette technique est utilisée pour la détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés rectifiés et des vins (OIV, n.d.-i).

4. Analyse des vins par RMN ^1H

4.1. Analyses métabolomiques par RMN ^1H

L'analyse chimique d'une matrice couplée à une analyse de données multivariée est basée sur le principe dit de la métabolomique. Ce terme a été défini à la fin des années 1990, par Oliver *et al.* (Oliver, Winson, Kell & Baganz 1998), qui ont utilisé l'expression métabolome pour la première fois. Par définition, la métabolomique décrit l'étude scientifique de petites molécules, les métabolites, d'un système biologique basée sur une analyse chimique complète (technologies omiques) dans le but de détecter autant de substances que possible (Esslinger, Riedl, & Fauth-Hasek, 2014).

La RMN est une technique analytique utilisée dans l'analyse des aliments depuis plusieurs décennies. La première application de la RMN en sciences des aliments remonte à 1957, pour la mesure de l'humidité dans les aliments par RMN à bas champ (Spyros & Dais, 2012a). L'utilisation de la RMN dans l'analyse des aliments a réellement commencé dans les années 80 (Figure 5). Ce développement est en partie lié à la nécessité de mettre au point de nouvelles techniques analytiques plus efficaces pour le contrôle de la qualité (Hong et al., 2017; Minoja & Napoli, 2014) et de l'authenticité des aliments (Danezis, Tsagkaris, Camin, Brusic, & Georgiou, 2016; Kamal & Karoui, 2015).

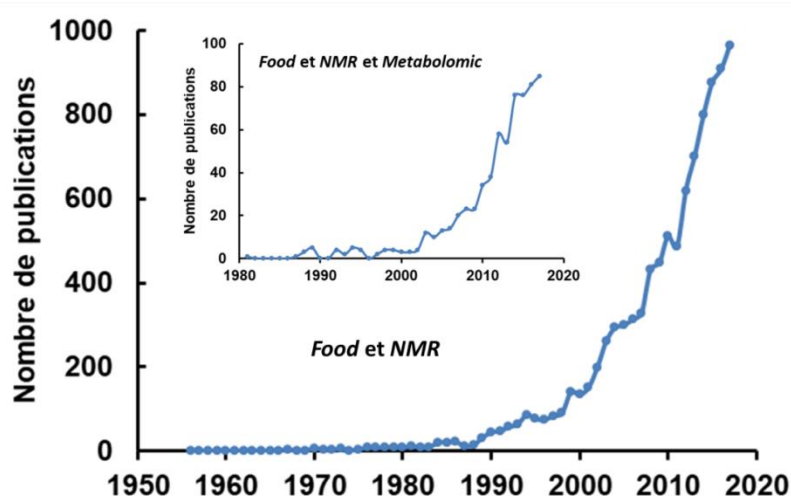


Figure 5. Nombre de publications incluant les mots-clés *food* et *NMR* dans leur titre, mots-clés ou résumé, indexé dans Scopus (encart : recherche limitée aux mots-clés *food* et *NMR* et *metabolomic*).

Le vin n'échappe pas à cette technique (Amargianitaki & Spyros, 2017; Fotakis, Kokkotou, Zoumpoulakis, & Zervou, 2013). Par rapport à d'autres produits alimentaires, l'analyse chimique du vin constitue un véritable défi : composition chimique complexe et évolution au cours du temps notamment. Le principal avantage de la RMN en solution est qu'elle permet de doser en une seule expérience une grande variété de composés chimiques, comme des acides aminés, des acides organiques, des alcools, des sucres, ou des composés phénoliques (Anastasiadi et al., 2009; Consonni, Cagliani, Guantieri, & Simonato, 2011; Du, Bai, Zhang, & Liu, 2007; Košir & Kidrič, 2001). La pertinence de l'analyse par RMN ^1H en tant que méthodologie pour la détermination quantitative des composants du vin a été récemment démontrée dans un essai collaboratif international (Godelmann, Kost, Patz, Ristow, & Wachter, 2016).

Le spectre RMN ^1H d'un échantillon de vin peut être considéré comme une empreinte moléculaire de celui-ci. Cette information chimique constitue le métabolome du vin, qui est affecté par une multitude

de facteurs, incluant l'origine géographique, le cépage, les conditions pédoclimatiques, les pratiques agronomiques et les procédés de vinification. La signature RMN d'un vin peut refléter le terroir à partir duquel il a été produit (cf. paragraphe 4.4).

4.2. Analyse des vins par RMN ^1H quantitative (RMNq)

Initialement, la RMN est utilisée comme outil pour l'élucidation structurale de composés en chimie organique. Elle est devenue un outil intéressant en métabolomique notamment en raison de ses propriétés quantitatives uniques. De la préparation de l'échantillon au traitement des données, plusieurs approches ont été décrites, comme en témoigne le Tableau 7 dans lequel ces différentes approches sont compilées.

4.2.1. Préparation de l'échantillon de vin

La préparation de l'échantillon est une étape clé pour l'analyse par RMNq d'un vin. Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature la concernant. L'échantillon de vin peut être analysé directement ou après une étape de séchage. Le pH peut être ajusté par ajout d'un tampon ou non. Une ou plusieurs références internes peuvent être ajoutées pour calibrer le spectre RMN et réaliser la quantification. Enfin, lorsqu'un grand ensemble d'échantillons doit être analysé à des fins de comparaison, la variation du diamètre des tubes RMN contribue également à une erreur lors de l'analyse par RMNq (Burton, Quilliam, & Walter, 2005; Wider & Dreier, 2006). Il convient donc d'utiliser des tubes RMN de qualité supérieure.

4.2.1.1. Conditionnement de l'échantillon de vin

Dans la plupart des études, le vin est analysé directement suite à une éventuelle étape de filtration ou de centrifugation pour éliminer les résidus solides (Tableau 7). Cependant, il est également possible de préconcentrer l'échantillon par lyophilisation ou à l'aide du flux d'un gaz inerte (azote, argon) pour éliminer physiquement l'eau et l'éthanol (Spyros & Dais, 2012b). Cette opération améliore la détection des signaux de faible intensité issus des composés peu concentrés présents dans le vin. Les mérites des différentes méthodes de préconcentration ont été discutés en détail par Amaral et Caro (Amaral & Caro, 2005) et plus récemment par Aru et al. (Aru, Sørensen, Khakimov, Toldam-Andersen, & Balling Engelsen, 2018). Dans les échantillons préconcentrés par séchage, le composé majoritaire est le glycérol. Le processus de séchage permet d'augmenter le rapport signal sur bruit (S/N) du spectre RMN. Cependant, il induit également une perte d'information suite à la disparition de nombreux composés, tout particulièrement les alcools.

4.2.1.2. Ajout d'une solution tampon

Le vin est une boisson acide dont le pH varie généralement entre 2,8 et 4,0. Les vins blancs sont en général plus acides que les vins rouges. En RMN, la modification du pH de l'échantillon induit une variation des déplacements chimiques de certains composés, notamment les acides organiques. Dans la pratique, le pH est contrôlé par ajout d'une solution constituée généralement d'un tampon non protoné (Tableau 7). Différents tampons, de pH et de force ionique variables, ont été utilisés pour l'analyse RMN ^1H . Cependant, la force ionique affecte les performances de la sonde (accord de sonde, homogénéité du champ magnétique, etc.) (Bharti & Roy, 2012). Pour ajuster finement le pH, certaines méthodes procèdent par ajout de faibles quantités d'un acide et/ou d'une base forte concentrés à l'aide d'un robot de titration (Godelmann et al., 2016).

4.2.1.3. Référence de calibration et de quantification

Standard interne

Les analyses par RMNq peuvent nécessiter l'ajout d'un composé de référence pour calibrer le spectre (Tableau 7). L'acide triméthylsilylpropanoïque (TSP- d_4) et le 3-triméthylsilyl-1-propanesulfonate de sodium deutérés (DSS- d_4) sont les composés de référence les plus utilisés pour ajuster le déplacement chimique (Bharti & Roy, 2012). De façon générale, le standard interne utilisé pour réaliser la quantification des composés majoritaires d'un vin doit posséder les propriétés suivantes : (i) facilement disponible sous une forme hautement purifiée, peu coûteux, stable, chimiquement inerte, non volatil, non hygroscopique et soluble dans une solution hydro-alcoolique ; (ii) le signal de référence doit être bien isolé des métabolites d'intérêts pour éviter tous chevauchements avec d'autres signaux ; (iii) Le temps de relaxation du composé de référence doit être compatible avec la RMNq. Idéalement, il devrait se situer dans la plage du temps de relaxation des analytes afin d'éviter une augmentation inutile du temps d'acquisition, ce qui est difficilement réalisable dans le cadre de l'analyse d'un mélange complexe (Bharti & Roy, 2012).

Méthode de références électroniques

Pour s'affranchir des problèmes liés à l'ajout d'un signal interne pour la quantification, des méthodes de références électroniques ont été élaborées et appliquées dans certains cas au vin (Tableau 7). Elles consistent en un signal électronique généré comme référence de quantification. Parmi celles mises au point, la méthode ERETIC[™] (Electronic REference To access In-vivo Concentration) est l'une des premières à avoir été développée (Akoka, Barantin, & Trierweiler, 1999). D'autres méthodes ont suivi : une version améliorée d'ERETIC[™] appelée ARTSI (Amplitude-corrected Referencing Through Signal Injection) (Mehr, John, Russell, & Avizonis, 2008), QUANTAS (QUANTification by Artificial

Signal) (Farrant et al., 2010) ou PIG (Pulse Into Gradient) (Ziarelli, Viel, Caldarelli, Sobieski, & Augustine, 2008). Enfin, Wider & Dreier ont développé une méthode d'analyse quantitative en fonction de l'évolution de la longueur des impulsions appelée PULCON (Wider & Dreier, 2006). Des étalonnages périodiques sont nécessaires pour garder un signal stable et reproductible. Ces méthodes sont très sensibles aux variations des propriétés physico-chimiques des échantillons à analyser (concentrations en sels, concentrations des analytes, etc.) (Bharti & Roy, 2012).

4.2.2. Séquences d'impulsions pour l'analyse RMN ^1H

L'étape suivante dans l'analyse du vin par spectroscopie RMN ^1H est l'acquisition du spectre. En raison de la composition du vin, un spectre RMN ^1H est dominé par le signal de l'eau (4,8 ppm) et par ceux de l'éthanol, un quadruplet à 3,6 ppm (CH_2) et un triplet à 1,2 ppm (CH_3). La concentration des composés d'intérêts est faible par rapport à ces deux composés majoritaires, il est alors impossible de les détecter et de les doser avec précision. Dans ces conditions, des techniques de suppression des solvants sont utilisées pour augmenter le rapport signal/bruit des composés d'intérêt.

4.2.2.1. Séquences d'impulsions couramment utilisées

Des expériences de RMN ^1H à impulsion unique ont été largement utilisées pour l'analyse quantitative de petites molécules. Une séquence à une impulsion comprend une impulsion radiofréquence (RF) de 90° suivie d'un temps d'acquisition du signal (Acq), puis d'un délai de relaxation (d_1) (Figure 6).

Concernant la suppression des solvants, plusieurs méthodes peuvent être utilisées : présaturation du ou des solvants, séquence WATERGATE, séquence WET, séquence NOESY présaturation, etc. (Maiwald, Steinhof, Sleight, Bernstein, & Hasse, 2008). La méthode la plus simple de suppression des solvants est la pré-saturation du solvant avant l'impulsion à 90° avec une irradiation continue (cw) pendant le délai de relaxation (séquence *zgpr*). Cette méthode n'est pas recommandée pour réaliser des analyses quantitatives car elle n'est pas suffisamment sélective en fréquence et elle peut induire une saturation des signaux de certains composés. Parmi les autres séquences d'impulsions disponibles, la *noesygpps* (Yousf, Hussain, Sharma, & Chugh, 2017), séquence monodimensionnelle permettant de supprimer les signaux intenses de solvants, est très souvent utilisée pour l'analyse des vins. Cette séquence permet d'augmenter de manière significative le gain de récepteur (rg), et donc d'augmenter la sensibilité de l'analyse (Bharti & Roy, 2012). Une suppression sélective des signaux de l'eau et de l'éthanol est réalisée à partir de séquences d'impulsions spécifiques (*shaped pulse*) pendant le délai de relaxation mais également pendant le temps de mélange.

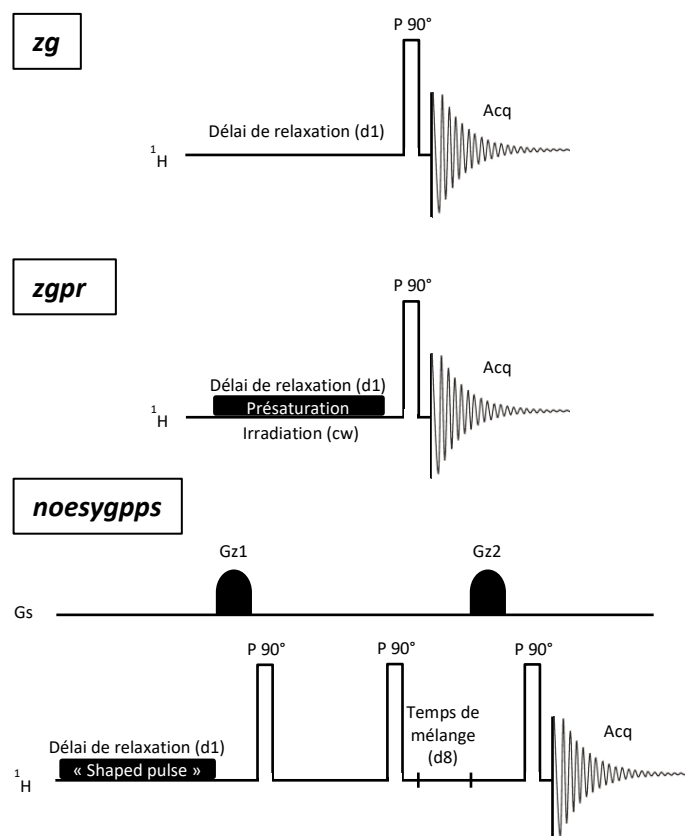


Figure 6. Représentation schématique d'expériences RMN *zg*, *zgpr* et *noesygpps*. Les gradients (Gz1 et Gz2) sont représentés sur la séquence *noesygpps*.

4.2.2.2. Paramètres d'acquisition

Les paramètres d'acquisition dépendront de la méthode de préparation (concentration de l'échantillon, analyse directe ou séchage, référence interne ou externe, etc.) et de la séquence choisie. Cependant, l'analyse du Tableau 7 permet de tirer un certain nombre de caractéristiques générales concernant ces paramètres pour l'analyse des vins.

La largeur spectrale analysée (sw) est, en général, comprise entre 10 et 20 ppm. Le nombre d'itérations de l'expérience (nombre de scans, ns) est compris entre 16 et 128. Il doit être ajusté pour avoir un rapport S/N suffisant pour réaliser une analyse quantitative. Pour obtenir des résultats quantitatifs précis, le rapport S/N devrait être dans un rapport de 250: 1 (Larive, Jayawickrama, & Orfi, 1997). Dans les analyses en RMN métabolomique, un rapport S/N minimal de 20: 1 pour les composés les moins abondants est recommandé (Yousf et al., 2017).

Le délai de relaxation (d_1) est compris entre 1 s et 6 s. En effet, entre deux itérations, il faut laisser aux noyaux atomiques le temps retourner à leur état d'origine. Pour une analyse quantitative, le délai de relaxation devrait être égal à au moins $5 \times T_1$ (Bharti et al., 2008), où T_1 est le temps de relaxation longitudinale. Le nombre de points acquis dans le domaine temporel (t_d) est souvent compris entre 32K et 64K. Un nombre de points trop faible ne fournit pas une résolution suffisante pour la quantification des signaux, en particulier ceux qui sont partiellement superposés. Enfin, la température est également un facteur important qui affecte la reproductibilité des résultats (variations de déplacements chimiques). Elle doit être maintenue constante tout au long de l'étude. Elle est globalement fixée entre 295 et 305 K (Tableau 7).

4.2.3. Traitements post-acquisition

4.2.3.1. Manipulation des spectres

Le signal de précession libre (FID) acquis subit ensuite une transformée de Fourier. Pour augmenter la résolution, un *zerofilling* est appliqué. Celui-ci consiste à augmenter le nombre de points, qui sont en général doublés. Enfin, une fonction de fenêtre exponentielle est souvent appliquée (*Exponential Multiplication*, EM). Cette fonction permet d'atténuer le bruit de fond et donc d'améliorer le rapport S/N mais au détriment de la résolution. Cet effet est contrôlé par un seul paramètre appelé *line broadening* (lb), généralement ajusté entre 0,3 et 1,0 Hz (Bharti & Roy, 2012).

Après la transformée de Fourier, la phase du spectre est corrigée pour obtenir un profil positif avec des signaux symétriques. L'erreur de phase peut entraîner une erreur significative de l'intégration et, par conséquent, dans la mesure de la concentration des composés. Une correction de phase manuelle est préférable à la correction de phase automatique dans les études métabolomiques car les petits signaux sont déformés lors de la correction automatique de phase (Bharti & Roy, 2012).

Une correction de la ligne de base est souvent nécessaire pour prendre en compte correctement l'aire du pic intégré. Cette correction est faite automatiquement par différentes fonctions mathématiques (fonctions spline, polynomiale, etc.) à l'aide du logiciel de traitement utilisé (Wishart et al., 1995).

Enfin, le déplacement chimique du spectre est calibré pour permettre un traitement et une comparaison des différents spectres RMN ^1H acquis. En général, la calibration consiste à ajuster à δ 0,00 ppm le signal de référence du standard de calibration interne (DSS, TSP).

4.2.3.2. Intégration des signaux

Analyses ciblées

Un spectre est constitué d'un grand nombre de signaux. Chacun d'eux correspond aux déplacements chimiques des différents protons non-échangeables présents dans l'extrait analysé. L'aire sous chaque signal est directement proportionnelle à la concentration et aux nombres de protons du composé correspondant (Spyros & Dais, 2012c). La concentration relative ou absolue d'un composé peut être obtenue en comparant l'aire du pic correspondant à celle du composé ou signal de référence (cf. § 4.2.1.3).

L'intégration de l'aire du signal est une des étapes cruciales de l'analyse par RMNq. La détermination de l'aire des signaux qui se chevauchent ne peut pas être obtenue avec précision en utilisant des méthodes d'intégration globale. Une déconvolution du signal doit être effectuée pour déterminer la contribution d'un pic individuel à l'aire totale (Cobas, Seoane, & Domínguez, 2011). Des logiciels de RMN ont implanté des algorithmes permettant de résoudre les problèmes de chevauchement par déconvolution des signaux. Bien qu'elle soit utile dans certaines circonstances, cette méthode ne peut pas être utilisée pour résoudre tous les chevauchements aperçus sur l'ensemble du spectre. De plus, elle ne permet pas de prédire le nombre de composants cachés sous une série de signaux superposés (Monakhova, Tsikin, Kuballa, Lachenmeier, & Mushtakova, 2014).

Analyses non ciblées

Des approches non ciblées ont également été développées. Elles sont basées sur la comparaison d'une empreinte spectrale à une multitude d'autres. L'évaluation non ciblée des données spectrales acquises nécessite, dans la plupart des cas, un traitement des spectres pour compenser les différences dues aux propriétés de la matrice (variation des déplacements chimiques, déformation locale de la ligne de base, etc.). L'approche mathématique la plus largement utilisée pour réduire le nombre de données et minimiser les effets du décalage de signaux est appelée le *bucketing* (ou *binning*). Cette approche est basée sur la segmentation d'un spectre en petites zones (*buckets*) permettant d'aboutir à un nombre significativement réduit de variables par rapport au spectre d'origine. Une des principales limitations de cette procédure est l'intégration de *buckets* fixes, appliqués indépendamment des déviations potentielles. Ainsi, des variations du pH ou de la concentration en sel de la matrice par exemple, peuvent fausser l'interprétation finale (S. Esslinger et al., 2014).

Tableau 7. Récapitulatif des paramètres d'acquisition utilisés dans des différentes études d'analyses métabolomiques des vins par RMN ^1H depuis 2000 (avec ns = nombre de scans, sw = taille de la fenêtre, d1 = délai de relaxation, td = nombre de points acquis, lb = line broadening).

Références	Échantillonnage (origines, millésimes)	Préparation	Tampon	Référence de quantification	Paramètres RMN
(Zhu, Hu, Lu, & Xu, 2018)	16 vins rouges expérimentaux (Chine)	3 mL lyophilisés + 0,14 mL D_2O + 0,4 mL tampon	oxalate pH 4,0	0,06 mL DSS 0,5%	NMR 600 MHz à 298°K ; <i>noesygppr1d</i> (ns=256; sw=10 ppm; d1=2s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Fan et al., 2018)	170 échantillons rouges et blancs prélevés à la cuve (Chine, 2010 à 2014)	0,9 mL + 0,1 mL tampon + ajusté pH 3,0	phosphate pH 2,0	0,1 % TSP dans tampon	NMR 400 MHz à 300°K ; <i>noesygppr1d.comp1</i> (ns=16; sw=15,1 ppm; d1=4s; td=64k; lb=0,3Hz)
(Aru et al., 2018)	26 vins expérimentaux de 22 cépages (Danemark, 2016)	(a) 0,7 mL + 0,3 mL tampon; (b) 1 mL évaporé au speed- vac + 0,6 mL tampon	phosphate 1M pH 3,5	TSP	NMR 600 MHz à 298°K ; <i>zgcppr</i> (ns=256; sw=12,6 ppm; d1=4s; td=64k)
(Martin-Pastor, Guitian, & Riguera, 2016)	271 vins blancs commerciaux dont 171 monovariétaux (Espagne, 2011/2012)	0,5 mL + 0,1 mL tampon pH 4,5 + TSP 0,5 mM	acétate pH 4,5	TSP	NMR 500 MHz à 300°K ; <i>noesy</i> (ns=256; sw=10 ppm; d1=2s; td=16k)
(Godelmann et al., 2016)	-	90% vin + 10 % tampon dans D_2O avec TSP + ajust. pH final 3,1	KH_2PO_4 1M pH 2,9 - 3,3	0,1 % TSP ou PULCON	NMR 400 MHz à 300°K ; <i>noesygppr1d.comp1</i> (ns=16; sw=18 ppm; d1=6s; ds=4; rg=16)
(Geana et al., 2016)	62 vins expérimentaux (Roumanie, 2009 à 2014)	0,72 mL + ajusté pH 3,1 (HCl 5M) + 0,08 mL D_2O	-	-	NMR 400 MHz à 300°K ; <i>zgpr</i> (ns=16; sw=20 ppm; d1=1s; td=64k; lb=1Hz)
(Hu et al., 2015)	vins expérimentaux (Chine, 2010)	3 mL lyophilisés + 0,63 mL D_2O + 0,07 mL DSS	-	0,75 % DSS	NMR 600 MHz à 298°K ; <i>noesy-presat</i> (ns=256; sw=11,9 ppm; d1=2s; td=32k; lb=0,3Hz)

(Ragone et al., 2015)	vins monocépages blancs et rouges expérimentaux (Italie, 2011)	0,9 mL + 0,1 mL D ₂ O/TSP 10mM + ajusté pH 3,2 (HCl 1N ou NaOH 1N)	-	TSP	NMR 400 MHz à 298°K ; <i>zgpr</i> (ns=8; sw=20 ppm; td=65k; lb=2Hz) ; <i>noesygpps</i> (ns=32; lb=0,3Hz)
(Laghi, Versari, Marcolini, & Parpinello, 2014)	Sangiovese (Italie, 2010 à 2012)	0,8 mL + 0,16 mL tampon + TSP 10 mM	phosphate 1M dans D ₂ O	-	NMR 600 MHz à 298°K ; <i>noesy</i>
(De Pascali et al., 2014)	32 vins expérimentaux de Negroamro (Italie, 2010)	1 mL évaporé + 0,5 mL D ₂ O + TSP 1,2 mM	-	-	NMR 400 MHz à 298°K; <i>noesygpps1d</i> (ns=64; sw=10 ppm; d1=5s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Chang et al., 2014)	Vins expérimentaux de Cheongsoo (2011)	2 mL évaporés par azote + ajust. pH6 avec KOD dans 400mM tampon dans D ₂ O + lyophilisation + 1mL D ₂ O + 0,75% TSP	phosphate	-	NMR 600 MHz; (ns=128; sw=20 ppm; d1=1s; td=64k)
(Mazzei, Spaccini, Francesca, Moschetti, & Piccolo, 2013)	40 vins expérimentaux de 8 vignobles de "Fiano di Avellino" (Italie, 2009)	0,25 ml vin + 0,75 ml D ₂ O contenant 2% d'acide formique	-	TSP 0,2 mg/mL	NMR 400 MHz à 298°K ; <i>zgesgp/mt1ir</i> (ns=96; sw=16 ppm; d1=3,5s; td=32k; lb=0,2 Hz)
(Godelmann et al., 2013)	600 vins authentiques monocépages prélevé dans les domaines (Allemagne, 2008/2009)	0,9 mL vin + 0,1 mL tampon deutéré / TSP	phosphate 1M	PULCON	NMR 400 MHz à 300°K ; <i>zgpr</i> (ns=8; sw=20,5 ppm; d1=4s; td=64k; lb=1Hz); <i>noesygpps</i> (ns=32; lb=0,3Hz); QUANT (ns=8; d1=5s; td=64k; lb=0,3Hz)
(López-Rituerto, Avenoza, Busto, & Peregrina, 2013)	Tempranillo expérimentaux (Espagne)	0,45 mL ajustés pH 3,0 (HCl 1M) + 0,05 mL D ₂ O avec TSP à 0,01%	-	acide succinique (externe)	NMR 400 MHz à 298°K; <i>zgpr</i> (ns=128; sw=10 ppm; d1=60s; td=64k)
(López-Rituerto et al., 2012)	11 ech. à différents temps de fermentation (Espagne, 2006 à 2008)	0,54 mL ajustés pH 3,0 (HCl 0,1 N) + 0,06 mL D ₂ O avec TSP (concentration finale 0,58 mM)	-	-	NMR 600 MHz à 298°K; <i>zgcpr</i> (ns=64; sw=20,5 ppm; d1=10s; td=64k)

(Baiano et al., 2012)	12 vins expérimentaux de sauvignon blanc (Italie, 2010)	0,6 mL + 0,6 mL tampon contenant 1 mM TSP dans D ₂ O	80 mM oxalate pH 4.2	-	NMR 700 MHz à 300°K ; <i>noesygpps</i> (ns=128; sw=30 ppm; d1=10s; td=64k; lb=0,3Hz)
(Papotti et al., 2013)	110 Lambrusco (Italie, 2009)	ajust. pH 2,00 (HCl 1M) puis dilué à 1:10 avant lyophilisation + 0,6 mL D ₂ O avec TSP	-	-	NMR 400 MHz à 300°K ; <i>cpmgpr.fb</i> (ns=64; sw=14 ppm; d1=3s; td=32k)
(Monakhova et al., 2011)	304 échantillons (de 5 à 81 %vol.)	-	-	-	NMR 400 MHz à 300°K ; <i>zgpr</i> (ns=8; sw=20 ppm; d1=4s; td=64k; lb=1Hz); NOESYGPPS1D (ns=32)
(Caruso et al., 2012)	40 vins blancs commerciaux de Greco bianco (Italie, 2007/2008)	0,6 mL + 0,09 mL D ₂ O + 0,01 mL D ₂ O/TSP 1,76 %	-	TSP	NMR 400 MHz à 298°K ; <i>wet1D</i> (ns=128; sw=12 ppm; td=32k; lb=0,2Hz)
(Todasca, Fotescu, Chira, Deleanu, & Rosca, 2011)	5 vins expérimentaux de cabernet sauvignon (Roumanie)	0,9 mL + 0,1 mL D ₂ O/TSP	-	TSP	NMR 400 MHz; suppression d'eau (ns=32; sw=16 ppm; d1=3s; td=52k; lb=0,3Hz)
(Imparato, Paolo, Braca, & Lamanna, 2011)	8 vins rouges expérimentaux (Italie, 2007)	0,9mL + 0,1mL D ₂ O + 10 µL DSS 0,06 M + ajusté pH 4,0 (tampon)	phosphate 1M pD 6,5	-	NMR 600 MHz à 298°K ; suppression d'eau par présaturation (ns=256; d1=1,5s)
(Hong et al., 2011)	vins expérimentaux Chardonnay (France, 2008 à 2010)	1 mL de vin lyophilisé dissous avec 0,4 mL D ₂ O + 0,14 mL tampon pH 2,5 + 0,06 mL TSP	oxalate 400 mM pH 2,5	-	NMR 800 MHz à 300°K; <i>zgpr</i> (ns=64; sw=16 ppm; d1=5s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Hanganu, Todasca, Chira, & Rosca, 2011)	vins expérimentaux (Roumanie, 2009)	vin/D ₂ O = 9/1 + TSP 10mM/L	-	-	NMR 400 MHz; (sw=16 ppm; td=52k)

(Consonni et al., 2011)	46 vins d'Amarone (Italie, 2005 à 2007)	0,5mL vin + 0,05 mL D ₂ O	-	-	NMR 500 MHz à 300°K; <i>noesy</i> (sw=14 ppm; td = 32k)
(Ali, Maltese, Toepfer, Choi, & Verpoorte, 2011)	40 rielsing et 19 muller-thurgau (Allemagne, 2006/2007)	20 mL extraits 3 fois à l'acétate d'éthyle et évaporés + 1 mL éthanol deutéré	-	-	NMR 500 MHz à 298°K; suppression d'eau par présaturation (ns=128; d1=1,5s; lb=0,3Hz)
(Mazzei, Francesca, Moschetti, & Piccolo, 2010)	16 vins expérimentaux (Italie, 2005)	0,25 ml + 0,75 ml D ₂ O contenant 2% d'acide formique	-	-	NMR 400 MHz à 298°K; <i>zgesgp/mt1ir</i> (ns=200; sw=12 ppm; d1=2s; td=32k; lb=0,5Hz)
(Rochfort, Ezernieks, Bastian, & Downey, 2010)	12 vins expérimentaux Cabernet Sauvignon et Syrah (Australie, 2003/2004)	0,45 mL + 0,05 mL D ₂ O	-	-	NMR 800 MHz à 300°K; <i>zgpr</i> (ns=64; d1=2s; lb=0,3Hz)
(López-Rituerto, Avenzoza, Busto, & Peregrina, 2010)	vins rouges expérimentaux (Espagne, 2006)	0,45 mL ajust. pH 3,0 (HCl 1M) + 0,05 mL D ₂ O/TSP à 0,01%	-	-	NMR 400 MHz à 298°K; <i>zgpr</i> (ns=128; sw=10 ppm; d1=60s; td=64k)
(Son, Hwang, Ahn, et al., 2009)	17 vins expérimentaux (Corée du Sud, 2006)	1 mL lyophilisé + 0,4 mL D ₂ O + 0,14 mL tampon + 0,06 mL DSS 5mM	oxalate 400 mM pH 4,0	DSS	NMR 600 MHz à 298°K; <i>noesypresat</i> (ns=16; sw=16 ppm; d1=1,5s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Son, Hwang, Kim, Ahn, et al., 2009)	10 Muscat de Bailey expérimentaux (Corée du Sud, 2007)	1 mL lyophilisé + 0,4 mL D ₂ O + 0,14 mL tampon + 0,06 mL DSS 5mM	oxalate 400 mM pH 4,0	-	NMR 600 MHz à 298°K; <i>noesypresat</i> (ns=16; sw=16 ppm; d1=1,5s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Son, Hwang, Kim, Kim, et al., 2009)	15 Muscat de Bailey expérimentaux analysés à différents temps de fermentation (2007)	1 mL lyophilisé + 0,4 mL D ₂ O + 0,14 mL tampon + 0,06 mL DSS 5mM	oxalate 400 mM pH 4,0	-	NMR 600 MHz à 298°K; <i>noesypresat</i> (ns=16; sw=16 ppm; d1=1,5s; td=32k; lb=0,3Hz)

(Lee, Hong, & Lee, 2009)	18 vins expérimentaux de Meoru (Corée du Sud, 2007)	1 mL lyophilisé + 0,4 mL D ₂ O + 0,14 mL tampon + 0,06 mL DSS 5mM	oxalate 400 mM pH 4,0	-	NMR 600 MHz à 298°K; <i>noesyprsat</i> (ns=16; sw=16 ppm; d1=1,5s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Da Silva Neto, da Silva, Pereira, & Hallwass, 2009)	9 vins commerciaux rouges et blancs (Brésil, 2007)	20 mL évaporés et lyophilisés + D ₂ O + TSP + ajusté pH 4,0	-	-	NMR 300 MHz à 293°K; (ns=32; sw=15 ppm; d1=3s; td=32k)
(Anastasiadi et al., 2009)	63 vins commerciaux rouges et blancs (Grèce, 2005/2006)	150 mL dilués avec eau qsp % alc.vol.= 6% + passés sur 15g XAD et évaporés + 0,7 mL de MeOD.	-	-	NMR 400 MHz; (ns=64; sw=30 ppm; d1=5s; td = 64k; lb = 1Hz)
(Skogerson et al., 2009)	17 vins blancs commerciaux (USA/Italie, 2001/2003/2004)	1 mL évaporé à moitié + 0,5 mL de D ₂ O + 2ème évaporation (au moins 25% H ₂ O en concentration finale) + ajust. pH 6,0 (NaOH 1M) + TSP 1mM	-	-	NMR 600 MHz à 298°K; suppression d'eau par présaturation (ns=64; sw=16 ppm; d1=3,7s; td=32k; lb=0,3Hz)
(López-Rituerto et al., 2009)	28 échantillons sur 207 jours prélevés sur une cuve de Tempranillo (Espagne, 2006)	0,45 mL ajustés pH 3,0 (HCl 1M) + 0,05 mL D ₂ O / TSP à 0,01%	-	acide succinique (externe)	NMR 400 MHz à 298°K; <i>zgpr</i> (ns=128; sw=10 ppm; d1=60s; td=64k)
(Lee, Hwang, Van Den Berg, Lee, & Hong, 2009)	Meoru expérimentaux (Corée du Sud, 2006 /2007)	1 mL lyophilisé + 0,4 mL D ₂ O + 0,14 mL tampon + 0,06 mL TSP	oxalate 400 mM pH 4.0	-	NMR 600 MHz à 298°K; <i>noesyprsat</i> (ns=16; sw=16 ppm; d1=1,5s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Viggiani & Morelli, 2008)	20 vins commerciaux (Italie, 2002 à 2007)	a) 0,5 mL + 0,05mL D ₂ O/DSS 1,5% ; b) 1mL lyophilisé + 0,5 mL D ₂ O + 0,05 mL D ₂ O/DSS 1,5%	-	DSS	NMR 400 MHz à 298°K; suppression d'eau par présaturation (ns=64; sw=10,5 ppm; d1=5s; lb=0,2Hz)
(Son et al., 2008)	Vins du marché Coréen et de producteurs (France/Corée du	1 mL lyophilisé + 0,4 mL D ₂ O + 0,14 mL tampon + 0,06 mL DSS 5mM	oxalate 400 mM pH 4,0	-	NMR 600 MHz à 298°K; <i>noesyprsat</i> (ns=16; sw=16 ppm; d1=1,5s; td=32k; lb=0,3Hz)

	Sud/USA/Australie, 2004 à 2007)				
(Pereira et al., 2007)	54 vins expérimentaux (France, 2002/2003)	1 mL lyophilisé + 0,5mL D ₂ O/TSP 0,01%	-	-	NMR 500 MHz à 300°K; (ns=64; sw=12 ppm; d1=5s; td=32k; lb=0,3Hz)
(Du et al., 2007)	21 vins commerciaux rouges et blancs de Chine	0,4 mL + 0,1 mL D ₂ O	-	-	NMR 600 MHz à 298°K; suppression d'eau par présaturation (ns=1024; sw=10,5 ppm; d1=2,5s; td=32k; lb=0,5Hz)
(Avenoz, Busto, Canal, & Peregrina, 2006)	6 cuves d'une exploitation (Espagne)	0,6 mL ajustés pH 3,0 (HCl 1M) + 0,1 mL D ₂ O	-	acide succinique (externe)	NMR 400 MHz à 298°K; <i>zgpr</i> (ns=128; sw=10 ppm; d1=60s; td=64k; lb=0,01Hz)
(Clark et al., 2006)	Syrah (Australie)	0,95 mL + 0,05 mL D ₂ O	-	-	NMR 400 MHz à 298°K ; (ns=64; td=16k)
(Amaral & Caro, 2005)	Chardonnay (Brésil, 2000 et 2003)	(a) 0.4 mL + 0,1 mL D ₂ O ; (b) 4 mL lyophilisés + 0,4 mL D ₂ O ; (c) 4 mL concentrés sous flux d'azote + 0,4 mL D ₂ O	-	TSP	NMR 200 MHz à 298°K ; suppression d'eau par présaturation (ns=160 ; td=16k ; sw=25 ppm)
(Nilsson et al., 2004)	3 Porto commerciaux (Portugal)	10% D ₂ O + 0,0465% TSP	-	-	NMR 500 MHz à 303°K; <i>noesygpp1d</i> (ns=128; sw=16,3 ppm; d1=4s; lb=0,3Hz)
(Brescia, Košir, Caldarola, Kidrič, & Sacco, 2003)	32 vins rouges et blancs (Slovénie et d'Italie, 1998)	0,5 mL + 0,1 mL D ₂ O + DSS	-	DSS	NMR 600 MHz à 298°K ; suppression d'eau par présaturation (ns=64; sw=13,3 ppm; td=32k; lb=1Hz)

(Brescia et al., 2002)		2 g lyophilisés + 0,6 mL de D ₂ O + 0,3 mL DCl 0,01 M + 0,1 mL TSP en sol.	DCl	-	NMR 500 MHz à 300°K ; (ns=512; td=32k)
(Košir & Kidrič, 2002)	10 vins blancs (Slovénie)	0,5 mL + 0,1 mL D ₂ O + DSS	-	DSS	NMR 600 MHz à 298°K ; suppression d'eau par présaturation (ns=64; sw=13,3 ppm; td=32k; lb=1Hz)
(Košir & Kidrič, 2001)	1 Sauvignon blanc (Slovénie, 1994)	2 mL lyophilisés + 0,7 mL de D ₂ O	-	-	NMR 600 MHz; wet (ns=128; sw=11,6 ppm; td=40k)

4.3. Classification des vins par RMN

La RMN a été appliquée aux défis classiques de l'analyse du vin que sont la détermination de l'origine géographique, du cépage et du millésime. Ces attributs sont toujours d'un grand intérêt pour le contrôle de l'authenticité d'un vin. Aussi, quelques travaux ont étudié l'influence des pratiques viti-vinicoles sur le métabolome des vins. Le Tableau 8 résume les principaux travaux réalisés sur le vin.

Tableau 8. Métabolites observés comme discriminant les vins selon les cépages, origines, millésimes et pratiques viti-vinicoles dans les différentes études de métabolomique par RMN ^1H .

Référence	Acide organique	Alcool et produit volatil	Glucide	Acide aminé	Composé phénolique
(Zhu et al., 2018)	tartrique, citrique, malique, succinique, glucuronique	acétate d'éthyle, butane-2,3-diol, glycérol,	glucose	proline, valine, alanine, choline	gallique
(Hu et al., 2015)	tartrique, succinique, lactique, acétique	glycérol, butane-2,3-diol	glucose	proline, valine	gallique
(Papotti et al., 2013)	lactique, succinique, malique	butane-2,3-diol		thréonine	
(Rochfort et al., 2010)	succinique, acétique	méthanol	glucose, fructose	proline	
(Son, Hwang, Ahn, et al., 2009)	malique, citrique, lactique, succinique, tartrique	butane-2,3-idol, glycérol,		proline, alanine, GABA, leucine, isoleucine, valine, choline	composés phénoliques
(Son et al., 2008)	lactique, acétique, succinique, malique, tartrique	butane-2,3-diol, glycérol	glucose	proline	composés phénoliques
(Godelmann et al., 2013)	lactique, citrique, malique, succinique, acétique, fumarique, tartrique, shikimique	butane-2,3-diol, méthanol, 3-méthylbutandiol, acétone, glycérol, butylène glycol		alanine	
(Geana et al., 2016)	lactique, acétique, citrique, succinique, tartrique, malique, fumarique				

(Ali et al., 2011)	malique, citrique, succinique, lactique			valine, proline, leucine, thréonine, phénylalanine, alanine	catéchine, acide caftarique, quercétine, resvératrol, gallique, composés phénoliques
(Consonni et al., 2011)	lactique		glucose, tréhalose, xylose	thréonine	composés phénoliques
(Lee, Hwang, et al., 2009)	lactique	butane-2,3-diol		alanine, proline, GABA, choline	composés phénoliques
(Anastasiadi et al., 2009)					catéchine, gallique, syringique, épicatechine, quercétine, resvératrol, coumarique, caféique
(Viggiani & Morelli, 2008)	lactique, succinique	butane-2,3-diol		proline	
(López-Rituerto et al., 2012)		isobutanol, isopentanol			
(Caruso et al., 2012)	succinique, citrique			proline	
(Mazzei et al., 2010)	lactique, succinique, glucoronique	glycérol	fructose		
(Son, Hwang, Kim, Ahn, et al., 2009)	malique, citrique		sucres	thréonine, alanine, proline	
(Pereira et al., 2007)	lactique, pyruvique, succinique	glycérol		proline et autres	composés phénoliques
(Du et al., 2007)	succinique, malique, citrique, lactique, sorbique, acétique	butane-2,3-diol, glycérol		proline	
(Brescia et al., 2003)				isoleucine, proline, citrulline	
(Brescia et al., 2002)				proline, valine, isoleucine	
(Mazzei et al., 2013)	acide succinique	glycérol	α -glucose, fructose	leucine, isoleucine	
(Baiano et al., 2012)	tartrique, malique	glycérol, butane-2,3-diol			composés phénoliques

(Son, Hwang, Kim, Kim, et al., 2009)	citrique, succinique, malique, tartrique, pyruvique	butane-2,3-diol, glycérol	glucose	valine, proline	composés phénoliques
(Lee, Hong, et al., 2009)		phényléthanol, isopentanol			

4.3.1. Classification par origines géographiques

La métabolomique par RMN a été utilisée avec succès pour la classification des vins en fonction de leur origine géographique (Brescia et al., 2002; Da Silva Neto et al., 2009; Du et al., 2007; Godelmann et al., 2013; Viggiani & Morelli, 2008). Des études ont démontré le potentiel de la RMN ^1H pour la classification des vins de différents pays (Brescia et al., 2003; Son et al., 2008). Au sein d'un même pays, plusieurs études ont montré une différenciation claire entre des vins produits avec le même cépage mais récoltés dans différentes régions (Caruso et al., 2012; Son, Hwang, Kim, Ahn, et al., 2009) ou dans différents terroirs d'une même région (López-Rituerto et al., 2012; Mazzei et al., 2010).

En ce qui concerne les vins produits dans la région de Bordeaux, Pereira et al. ont montré que le métabolome des vins était affecté à l'intérieur d'un même cépage par le type de sol (graveleux, sableux ou argileux), en particulier les acides aminés, les composés phénoliques, le glycérol, et certains acides organiques. Néanmoins, ils précisent que les effets du millésime et des cépages étaient plus dominants que celui des sols (Pereira et al., 2007). Une étude sur baies de raisin à maturité produites dans quatre régions différentes de Bordeaux (AOP Bordeaux, Saint-Emilion, Buzet et Pessac-Léognan) a aussi été réalisée. Elle a permis de discriminer des extraits de baies (pulpe et pellicule) en fonction de leur zone de production (Pereira et al., 2005).

Les principaux composés reliés à la discrimination géographique des vins sont listés dans le Tableau 8. Tout d'abord la proline, dont on connaît le rôle pour distinguer les vins en fonction de leur origine géographique (Viggiani & Morelli, 2008), ainsi que d'autres acides aminés comme l'alanine ou la thréonine. Interviennent également dans ces discriminations des acides provenant du raisin comme l'acide malique ou citrique, mais aussi des acides issus des fermentations, comme l'acide lactique ou succinique. D'autres métabolites issus des fermentations sont régulièrement impliqués dans les discriminations faites selon l'origine géographique, comme le butane-2,3-diol et le glycérol.

4.3.2. Classification par cépages

La RMN ^1H , associée à des analyses statistiques multivariées a été appliquée avec succès pour la classification des cépages. Les comparaisons ont été réalisées sur des vins monocépages de variétés rouges (Anastasiadi et al., 2009; Fan et al., 2018; Geana et al., 2016; Godelmann et al., 2013; Rochfort

et al., 2010; Son, Hwang, Ahn, et al., 2009; Son et al., 2008; Zhu et al., 2018), mais aussi sur des vins monocépages blancs (Ali et al., 2011; Anastasiadi et al., 2009; Fan et al., 2018; Godelmann et al., 2013). L'analyse de vins rouges d'assemblage binaire a également été rapportée avec la capacité du modèle à évaluer la proportion des deux cépages contenue dans un vin (Imparato et al., 2011).

Dans la majeure partie de ces études, la proline est, comme attendu, un composé permettant la discrimination des vins selon le cépage utilisé (Tableau 8), tout comme d'autres acides aminés comme la valine ou l'alanine. D'autres composés provenant du raisin ont été jugés discriminants dans la quasi-totalité des études, comme les acides organiques (malique, tartrique, citrique). Plus surprenant, des composés issus des processus de fermentations sont couramment retrouvés comme ayant une importance dans les classifications, comme c'est le cas de certains acides (succinique, acétique, lactique) et alcools (butane-2,3-diol, glycérol).

4.3.3. Classification par millésimes

Selon les années, les changements macro et microclimatiques peuvent affecter la composition chimique des raisins. Le millésime joue alors un rôle important dans l'évaluation de l'information du profil métabolique des vins obtenu suite à l'analyse par spectroscopie RMN ^1H . Plusieurs publications ont montré des différences dans les profils métaboliques des vins selon l'année de récolte (Ali et al., 2011; Anastasiadi et al., 2009; Consonni et al., 2011; Geana et al., 2016; Godelmann et al., 2013; Lee, Hwang, et al., 2009; Pereira et al., 2007).

Les molécules discriminantes varient selon les études. Cependant, les acides malique et lactique sont régulièrement cités, tout comme certains acides aminés.

4.3.4. Classification selon des pratiques viti-vinicoles

Les effets de différentes pratiques viticoles (Chang et al., 2014; De Pascali et al., 2014; Picone et al., 2016; Todasca et al., 2011) et vinicoles (Baiano et al., 2012; De Pascali et al., 2014) ont été étudiés par RMN.

Concernant la production du vin, la métabolomique par RMN ^1H a été utilisée pour discriminer des processus fermentaires et évaluer les caractéristiques de fermentation de différentes souches de levure (Hanganu et al., 2011; Mazzei et al., 2013; Son, Hwang, Kim, Kim, et al., 2009) ou de bactérie (Lee, Hong, et al., 2009), l'influence de l'attaque par *Botrytis cinerea* des baies de raisin utilisées dans la confection des vins de Champagne (Hong et al., 2011), ou les techniques de macération (Baiano et al., 2012; De Pascali et al., 2014).

4.3.5. Notions de chimiométrie

Toutes les techniques de métabolomiques, que l'analyse soit ciblée ou non, produisent un volume de données très important. Les outils de chimiométrie deviennent alors fondamentaux, en particulier pour les études d'authentification des aliments (Borràs et al., 2015). Le plus souvent utilisées dans les études par RMN, les analyses multivariées traitent simultanément plusieurs variables et montrent les relations qu'il peut exister entre elles. Il est possible de distinguer les analyses multivariées non-supervisées, telle que l'analyse en composantes principales (ACP), des analyses multivariées supervisées, telles que la méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS-DA).

Les modèles non supervisés sont d'abord utilisés pour obtenir un aperçu de la variance métabolique d'un ensemble de données complexes. L'ACP est une technique de réduction de variables initialement corrélées en un nouveau jeu de données à nombre réduit de variables non corrélées appelées composantes principales (Spyros & Dais, 2012c). Par ailleurs, l'ACP permet de regrouper les échantillons présentant des similitudes mais aussi d'éloigner les échantillons différents, ce qui en fait une technique de discrimination sans attribution préalable des échantillons à un groupe d'appartenance.

Tout comme l'ACP, la PLS-DA permet de réduire et simplifier le jeu de données, mais diffère par son caractère supervisé. Cette méthode utilise des ensembles d'apprentissage avec une information connue a priori (par exemple sur le cépage ou l'origine géographique) pour construire un modèle de classification (Amargianitaki & Spyros, 2017). La PLS-DA est caractérisée par une forte puissance discriminatoire, mais peut avoir des problèmes pour traiter le bruit de fond. Des filtres de correction du signal orthogonal (CSO) peuvent être utilisés y remédier.

Une procédure de validation des modèles est d'une importance cruciale afin d'éviter les résultats de classification trop optimistes (Kjeldahl & Bro, 2010), représentant actuellement l'un des pièges des études d'authenticité. Cette procédure est commune aux méthodes non supervisées et supervisées. Les plus couramment utilisées sont le «leave one out cross validation» (LOOCV) et le «k-fold cross validation». La procédure LOOCV consiste à exclure seulement un objet à la fois, les autres étant utilisés pour construire le modèle qui est par la suite appliqué à l'échantillon écarté. Dans le cas du «k-fold», c'est une partie du jeu de données qui est exclue et utilisée comme jeu test pour le reste des données. Le choix de la méthode dépend principalement de la taille du jeu de données, la procédure LOOCV étant privilégiée pour des jeux de données peu importants.

Objectifs

Le contrôle de l'authenticité des vins est un objectif majeur de la filière viti-vinicole. La spectroscopie RMN ^1H permet un accès facile au métabolome du vin. Elle a été utilisée avec succès pour discriminer différents facteurs tels que le cépage, l'origine géographique, le millésime et les pratiques viti-vinicoles. Cependant, la majeure partie des études se sont intéressées à l'influence d'un paramètre dans un cadre expérimental contrôlé. La capacité de la RMNq pour discriminer les vins commerciaux, dont les conditions de productions sont spécifiques à chaque domaine, reste encore un sujet d'étude. Le but global de mon travail de thèse a donc été de déterminer si la RMNq peut être un outil pertinent pour garantir l'authenticité d'un vin, et plus particulièrement pour les vins de Bordeaux.

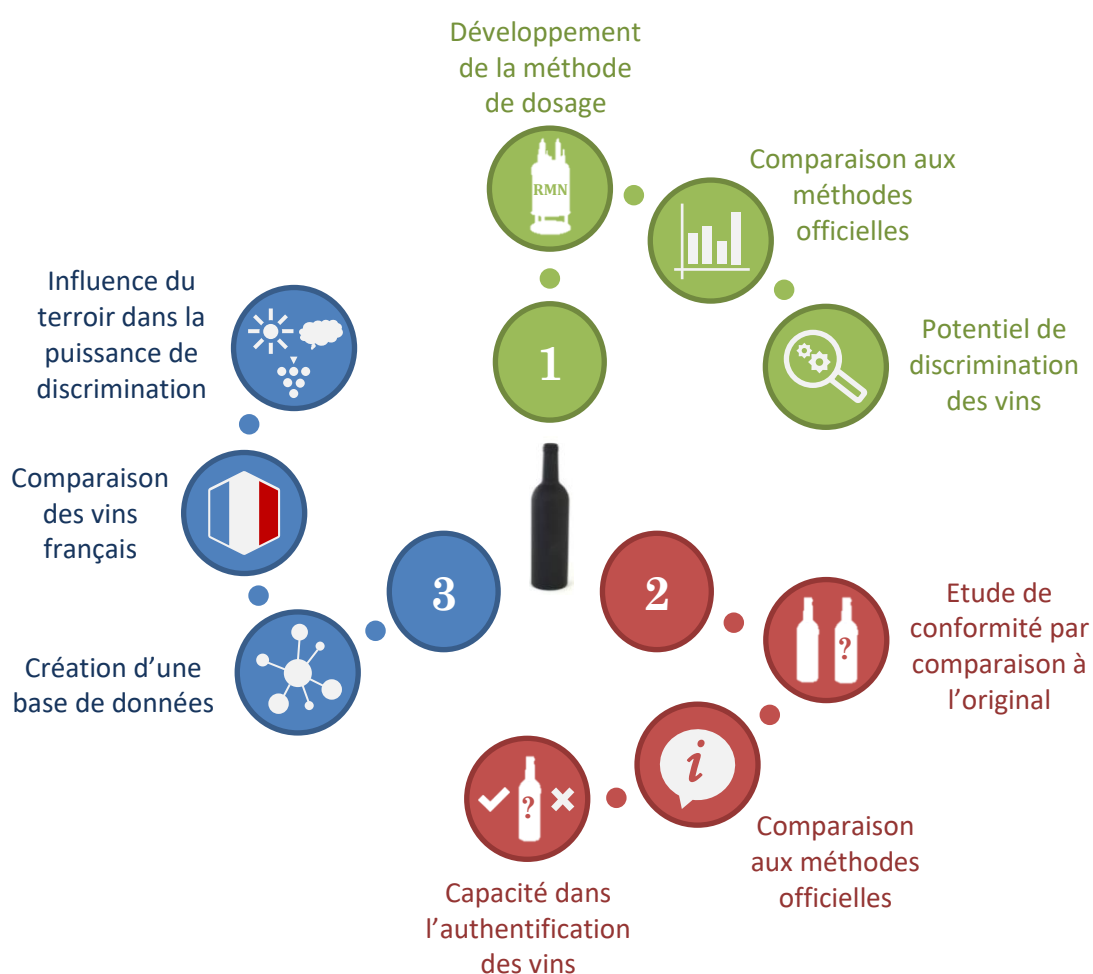


Figure 7. Schéma illustrant les différents points clés des objectifs de thèse.

Pour atteindre ce but, trois objectifs ont été poursuivis :

- Développer et valider une méthode de dosage absolue par RMNq des composés majoritaires du vin et étudier le potentiel et les limitations de la méthode appliquée à l'analyse de vins commerciaux monovariétaux ;
- Comparer cette méthode aux méthodes officielles couramment utilisées pour garantir l'authenticité d'un vin au travers d'un cas d'étude réel ;
- Appliquer cette méthode pour discriminer un ensemble de vins commerciaux français à partir de la création d'une base de données.

Les trois objectifs visés et les principaux points ciblés sont schématisés dans la Figure 7.

Chapitre I :

Développement d'une

méthode de dosage des vins

par RMN ^1H

1. Stratégie mise en place

Les méthodes d'analyses des vins par RMN ^1H sont aussi nombreuses que les laboratoires qui les mettent en application. La préparation des échantillons, le traitement des spectres, et l'interprétation des données ciblées ou non-ciblées, ont été traités suivant différentes approches. Considérant la nécessité de mettre au point une méthode permettant le dosage des composés majoritaires des vins, le premier objectif de ce travail de thèse a été de développer une technique d'analyse par RMN ^1H sur le spectromètre 600 MHz du laboratoire, dans le but de proposer une méthode fiable, simple, rapide, et quantitative, ne nécessitant pas de matériel ou de consommable particuliers.

La préparation des échantillons, le choix des séquences, les paramètres d'acquisition, de post-acquisition, et de quantification ont été étudiés. Les limitations de la méthode sont discutées.

Enfin pour présenter le potentiel de la méthode, une étude sur des vins commerciaux chinois a été réalisée. Ces vins sont issus de différents cépages, origines géographiques et millésimes.

2. Présentation des travaux

2.1. Préparation des échantillons

Le but était de permettre l'acquisition rapide des spectres afin de pouvoir quantifier les différents métabolites préalablement identifiés. Le choix de la lyophilisation des échantillons a été écarté pour deux raisons : i) un gain de temps en n'ajoutant pas de traitement préalable de l'échantillon et ii) ne pas influencer sur la composition du vin.

Le point critique dans la préparation de l'échantillon est surtout lié à la stabilisation du pH, et donc dans la confection d'un tampon. L'objectif était de réduire l'écart de pH entre les différents vins, sans entacher la bonne acquisition des spectres, afin de faciliter l'identification et la quantification des signaux. En effet, une force ionique trop importante et/ou une acidité trop importante auraient rendu l'homogénéité du champ impossible. Les tampons trop acides (pH proche de 1) et/ou trop concentrés (5M) ont été écartés. Les tampons utilisant un acide ou base présent dans le vin ont aussi été écartés pour ne pas interférer dans la quantification de ces composés (acides tartrique, citrique ou malique). Enfin, le déplacement chimique de certains composés sur le spectre est fortement affecté par le pH (particulièrement les acides), le pH final de l'échantillon devait permettre la visibilité de tous les signaux d'intérêt. Par exemple, à pH trop faible ($\text{pH} < 2,6$), le signal de l'acide shikimique (δ 6,88 ppm) se superpose à un autre signal. Du fait de toutes ces contraintes, le choix du couple acide base a été restreint, et s'est porté sur le couple acide phosphorique (H_3PO_4) / phosphate monopotassique (KH_2PO_4) à pH 2,8 concentré à 1M. A hauteur de 20% dans l'échantillon, ce tampon permet de limiter les écarts de variations de pH à 0,25 unité (Figure 8), et ainsi minimiser drastiquement les variations

de déplacement chimique des acides organiques, en particulier. Cette méthode permet une quantification semi-automatisée de ces métabolites sans ajustement précis du pH.

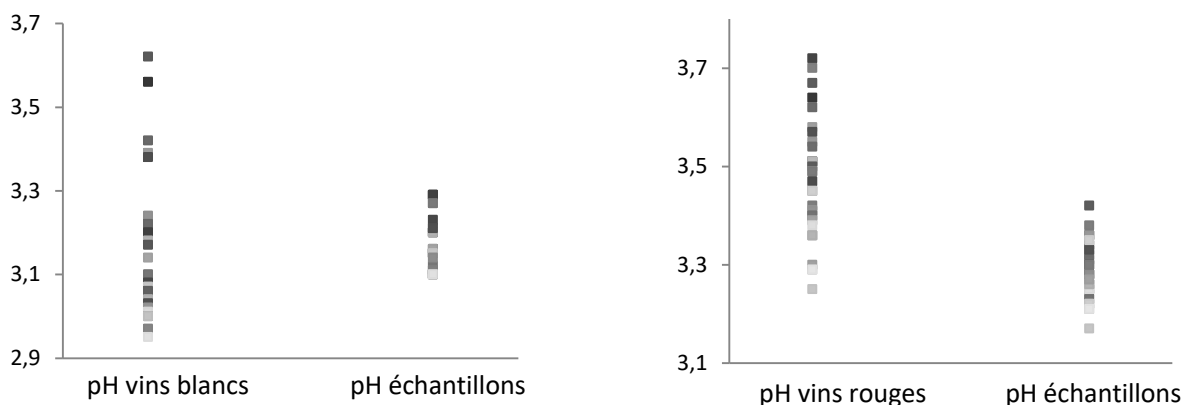


Figure 8. Effet du tampon phosphate 1M pH 2,8 sur la réduction des écarts de variations de pH des échantillons préparés pour l'analyse RMN.

En plus du tampon est ajoutée dans l'échantillon de l'eau deutérée dans laquelle ont été préalablement solubilisés de l'acide triméthylsilylpropanoïque deutéré (TSP-*d4*) et du formiate de calcium. Ces composés sont essentiels pour calibrer le spectre RMN dans les étapes de post-acquisition et de quantification. Le TSP est utilisé comme référence interne de calibration (δ 0,00 ppm). Il permet le bon alignement des spectres. Le formiate de calcium a été choisi comme référence interne servant à la quantification des composés identifiés. Sa solubilité dans les solutions hydro alcooliques, sa zone d'observation (δ 8,3 ppm), la forme de son signal (un singulet) et sa certification pour la RMNq ont été les quatre critères de sélection (Sigma, n.d.).

2.2. Choix des séquences et paramètres d'acquisition

Le choix des séquences est directement lié à la préparation de l'échantillon. Le souhait d'analyser le vin sans lyophilisation préalable oblige à utiliser des séquences permettant la suppression du signal de l'eau (δ 4,8 ppm) et de ceux de l'éthanol (δ 3,66 et 1,18 ppm) afin de gagner en sensibilité et pouvoir identifier des molécules d'intérêts en plus faibles concentrations.

Trois séquences sont réalisées pour l'analyse quantitative d'un échantillon de vin : *zg*, *zgpr* et *noesygpps1d*. Premièrement, une séquence proton est acquise permettant de déterminer précisément la fréquence de l'eau sur l'échantillon analysé. Elle est suivie par une séquence *zgpr* permettant la suppression du signal de l'eau par pré-saturation. Sur le spectre RMN ^1H obtenu sont dosés l'éthanol et les composés dont les signaux peuvent être affectés par la séquence de suppressions multiples des

solvants (glycérol, butane-2,3-diol, acide lactique). Enfin, une expérience de suppressions multiples des solvants est acquise (séquence *noesygppr1d*). Cette ultime séquence permet, en plus de la suppression du signal de l'eau par pré-saturation, la suppression des deux signaux correspond aux groupes éthyl et méthyl de l'éthanol. C'est grâce au spectre acquis par cette séquence que sont quantifiées la majeure partie des molécules identifiées.

Les paramètres d'acquisition sont pour la plupart communs aux trois expériences, et ont essentiellement été établis grâce à la littérature. La température est fixée à 293K, afin de ne pas avoir un gradient de température trop important entre la préparation du tube et le départ de l'analyse. Les autres paramètres sont discutés en détail dans l'article suivant.

2.3. Post-acquisition et quantification

Les revues scientifiques liées à la métabolomique par RMN ^1H du vin ont permis l'identification d'un nombre important de molécules (De Pascali et al., 2014; Hu et al., 2015; Laghi et al., 2014; López-Rituerto et al., 2012). L'ajout de standards dans les vins a permis la validation de ces identifications.

Comme indiqué dans plusieurs travaux, le phasage du spectre est opéré manuellement pour une plus grande reproductibilité (Bharti & Roy, 2012; Spyros & Dais, 2012c). La correction de ligne de base est quant à elle réalisée automatiquement grâce au logiciel MestReNova® (Mestrelab Research Inc., Espagne). Ce logiciel est conçu pour le traitement et l'analyse de spectres RMN. Il permet de réaliser une analyse quantitative avec déconvolution des spectres par l'intermédiaire du module *Simple Mixture Analysis* (SMA, Mestrelab Research Inc., Espagne). Cette analyse est semi-automatisée, suite à l'enregistrement de toutes les caractéristiques permettant l'identification et l'intégration automatique des signaux du spectre (masse molaire, déplacement chimique, multiplicité, constante de couplage, nombre de protons). Le protocole suivi pour analyser un échantillon est synthétisé dans la Figure 8.

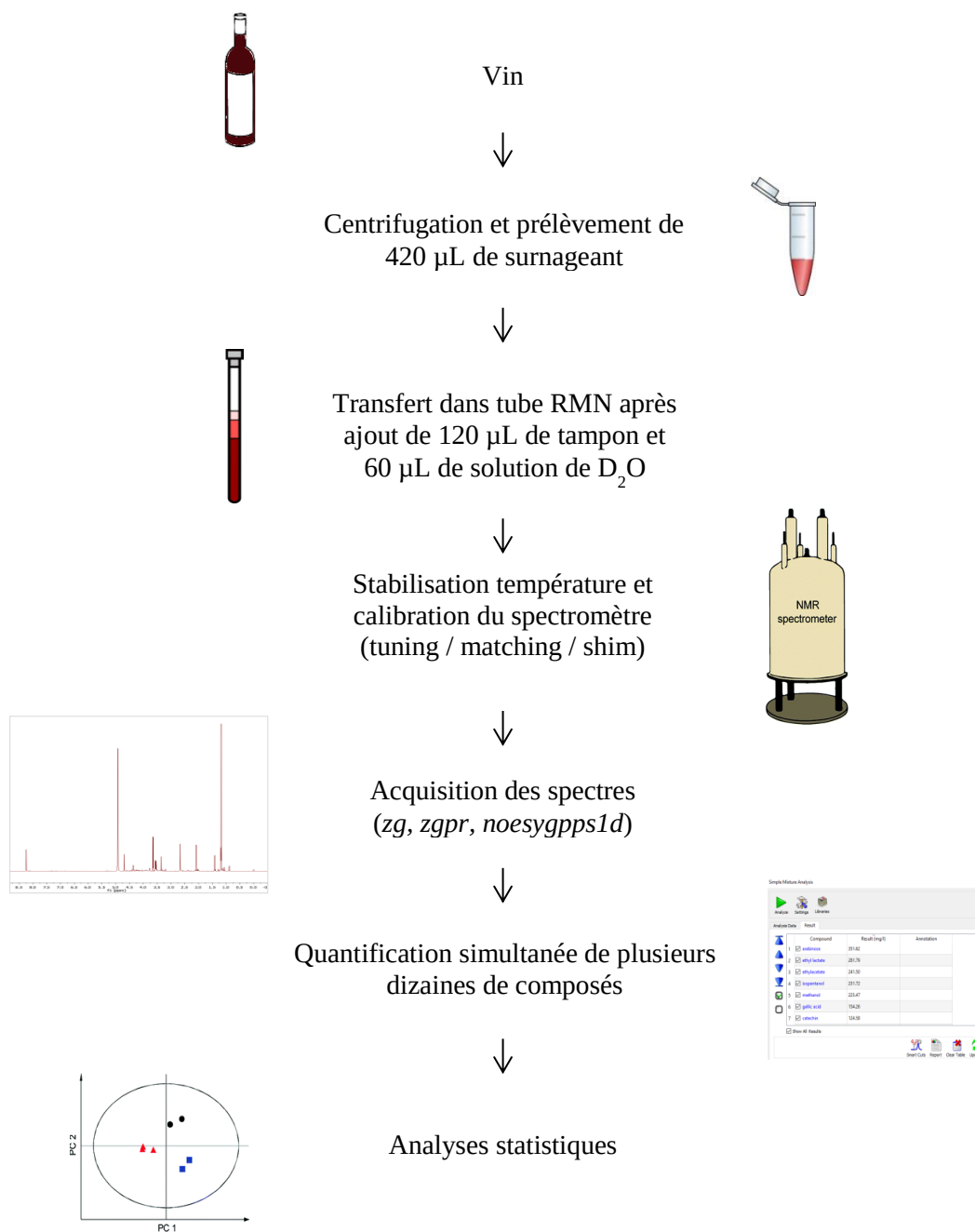


Figure 8. Schéma récapitulatif de l'analyse d'un échantillon de vin par RMN ^1H .

2.4. Validation de la méthode

La validation de la méthode d'analyse des vins par RMN ^1H développée dans ce projet a été réalisée par comparaison avec les échantillons Titrivin®, commercialisés par la Chambre d'Agriculture de la Gironde (www.titrivin.com). Ces six échantillons sont utilisés pour la calibration des instruments de mesure analytique.

En complément, dans le cadre d'une collaboration avec l'IFAPA (*Instituto de Investigacion y Formacion Agraria y Pesquera*, Andalousie, Espagne), 138 vins rouges, blancs et rosés ont été analysés conjointement par les méthodes officielles et par la technique de RMNq développée. Les dosages de quatorze métabolites ont pu être ainsi comparés. La performance de la méthode a été évaluée par calcul du z-scores. Ce paramètre est couramment utilisé pour l'estimation de la performance des résultats quantitatifs (Gallo et al., 2015). Il est défini comme suit :

$$z - score = \frac{Ci - \bar{C}}{\sigma}$$

avec Ci la concentration déterminée par les analyses officielles, $\bar{C}$ la concentration déterminée par RMNq, et σ l'erreur standard des mesures officielles. Des performances acceptables sont indiquées par $z\text{-score} \leq 2$, une performance douteuse si $-3 \leq z \leq -2$ et $2 \leq z \leq 3$, tandis que $-3 \geq z \geq 3$ indique une variation trop importante.

Les taux de performances obtenus suite aux analyses réalisées sont présentés dans le Tableau 9, et sont détaillés sur la carte de chaleur présentée en Annexe 1.

Tableau 9. z-scores obtenus pour les résultats de RMNq par comparaison aux résultats de méthodes officielles sur des échantillons de chaine d'analyses.

	n	% satisfaisantes	% douteuses	% incorrectes
acide succinique	138	99%	0%	1%
acétate d'éthyle	137	99%	1%	1%
méthanol	137	96%	2%	2%
glycérol	138	95%	1%	4%
acide tartrique	138	93%	5%	1%
acide citrique	112	90%	5%	4%
acide malique	99	89%	4%	7%
acide lactique	138	87%	6%	7%
isopentanol	137	84%	11%	5%
isobutanol	137	82%	11%	7%
propanol	137	80%	14%	7%
éthanal	102	73%	7%	21%
acide acétique	138	71%	10%	19%
degré alcoolique	137	31%	21%	47%

Mis à part trois composés (éthanal, acide acétique et éthanol), on observe une bonne concordance entre les valeurs obtenues par les analyses classiques et celles obtenues par RMNq, avec un maximum de 7% de valeurs incorrectes. Concernant le degré alcoolique, il semblerait que l'erreur observée soit inhérente à la méthode. Enfin, l'acide acétique et l'éthanal étant des composés de dégradation, les erreurs sont probablement dues à une mauvaise conservation du vin entre les analyses réalisées à l'IFAPA et celles par RMN.

2.5. Application à l'analyse de vins chinois

Afin d'illustrer la méthode développée, une analyse métabolomique par RMN ^1H réalisée sur dix-neuf vins produits en Chine est présentée dans cet article. Comme le montre la Figure 9, ces vins sont issus de six propriétés différentes, sont de cépage Cabernet Sauvignon pour dix-huit d'entre eux et de cépage BeiHong pour un dernier, répartis sur deux régions chinoises, et appartiennent à six millésimes différents.

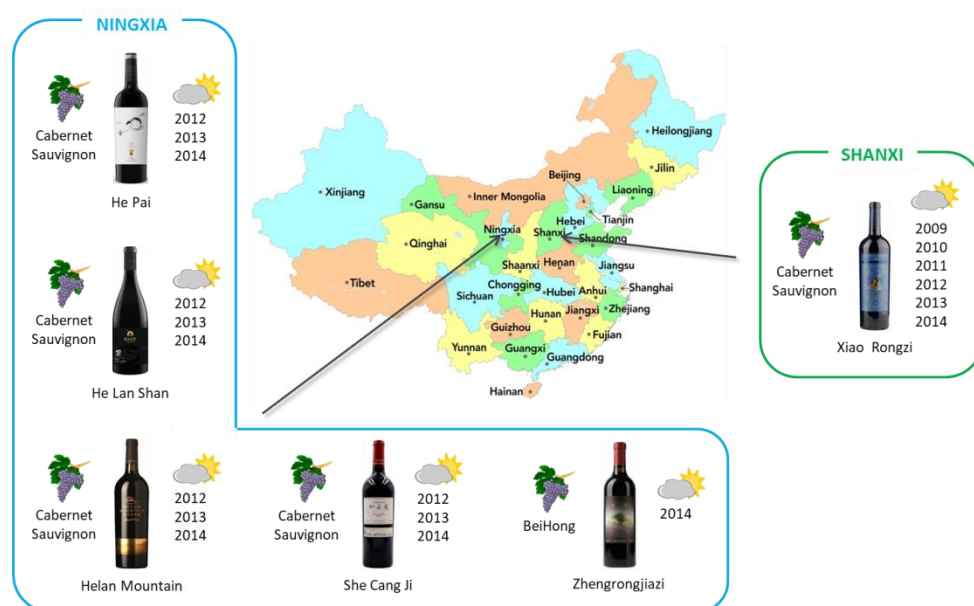


Figure 9. Représentation des dix-neuf vins chinois issus des régions de Ningxia et Shanxi

3. Publication

La méthode développée pour réaliser ces analyses et son application à l'analyse de vins chinois a fait l'objet de l'article suivant : *Wine Analysis and Authenticity Using ^1H -NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines*, paru dans le journal *Food Analytical Methods* le 10 juillet 2018.

Wine Analysis and Authenticity Using ^1H -NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines

Louis Gougeon¹, Gregory Da Costa¹, Inès Le Mao¹, Wen Ma¹, Pierre-Louis Teissedre¹, François Guyon², Tristan Richard^{1,*}

¹*Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, USC 1366 INRA, Unité de Recherche Œnologie, 210 Chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon, France*

²*Service Commun des Laboratoires, 3 avenue du Dr. Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France*

* Corresponding author: T. Richard, (+33)557575957, tristan.richard@u-bordeaux.fr

Abstract

A NMR-based metabolomics method was developed to semiautomatically quantify the main components of wine. The method was applied to discriminate wines from two regions of China, Shanxi and Ningxia that were produced by 6 wineries and for 6 vintages. Two different cultivars, Cabernet Sauvignon and Beihong, were used for winemaking. The method allowed the quantification of 33 metabolites including sugars, amino acids, organic acids, alcohols and phenolic compounds. Depending on the compounds, the LODs values were in the range of 0.6 mg/L to 116 mg/L. The results showed that NMR-based metabolomics combined with multivariate statistical analysis allowed wine separation as a function of terroir and cultivar. Nevertheless, wine differentiation as a function of wineries and ageing would need to be examined more carefully.

Keywords Wine composition; Wine analysis; qNMR; Authenticity; Traceability; NMR-based metabolomics

Introduction

Food fraud is a critical issue that affects health and the economy. According to the Grocery Manufacturers Association, about 10% of the food sold in commerce would be counterfeit. Alimentary fraud would affect various foods such as milk, olive oil, fish and alcohols. In this context new approaches such as metabolomics are increasingly used to analyse food composition, quality and adulterations. The recent technological advances in various analytical chemistry systems together with the implementation of powerful data processing software have allowed the development of metabolomics studies. According to the desired objective, metabolomics has the advantage of giving access to different information that can be quantitative, discriminant, or predictive (Cubero-Leon et al. 2014).

Interest for NMR-based metabolomics grew rapidly since 2000, reflected by the increasing number of publications on this subject (Larive et al. 2015; Pauli 2012). NMR is a fast and highly reproducible spectrometric tool allowing the acquisition of spectra containing a rich amount of information concerning the analysed sample. This technique allows the identification of major components in complex mixtures in a single analysis. Quantitative information is obtained by a simple rule: the signal intensity is directly proportional to the number of nuclei. NMR has several advantages compared to usual methods of metabolomics: easy sample preparation, relatively short analysis times, great reproducibility and adequate specificity (Simmler et al. 2014).

The control of wine traceability is a major objective of the vine-growing sector (OIV Strategic Plan 2015-2019). NMR spectrometry have found applications in quality control and authentication of wine (Amargianitaki and Spyros 2017). The quantitation of multiple components or a metabolite fingerprinting approach allowed controlling terroir impact (López-Rituerto et al. 2012; Son et al. 2009), grape variety (Ali et al. 2011; Godelmann et al. 2013), vintage (Lee et al. 2009), or wine-making processes (Anastasiadi et al. 2009; De Pascali et al. 2014; López-Rituerto et al. 2009).

The global aim of our current research is to propose a universal, fast and simple method to quantify a large number of compounds in wine semi-automatically. The quantitative NMR (qNMR) method was developed and validated in terms of limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs), and coefficients of variation (CVs) for replicated measurements. In order to check the validity of the method comparisons with

TITRIVIN reference material were performed. The described method has been applied to carry out the metabolomics characterization of Chinese wines from different regions, vintages, and grape varieties.

Materials and Methods

Wine Samples

A total of 19 Chinese commercial red wines were analysed (Table 1). These wines were produced in two different regions of China: Shanxi, in northwestern China, and Ningxia, one of the youngest vine growing regions in China. Eighteen wines were produced with the Cabernet Sauvignon variety. Six were produced in Shanxi region by Château Rongzi. Twelve wines were produced in Ningxia region and provided by 4 producers for 3 vintages. A single sample, from Ningxia region (vintage 2014), was produced with the Beihong variety, a interbreeding between Muscat Hamburg (*V. vinifera* L.) and wild *V. amurensis* Rupr. generated by the Institute of Botany (Chinese Academy of Sciences) and approved as a new grape cultivar in China in 2008. This variety is resistant to cold and diseases.

Validation of the NMR quantitation method was performed by comparison with 6 TITRIVIN samples (AA1, AA2, AA3, AA4, AA5, and BTA). These wines are products marketed by the service Vine and Wine of the Chamber of Agriculture of the Gironde. Contents of alcohol, acetic acid, malic acid, lactic acid, and sugars have been measured by 40 laboratories using methods accredited by OIV.

Table 1 List of wines.

Name	Winery	Brand	Vintage	Variety	Region
HLS12	Helanshan	He Lan Shan	2012	Cabernet sauvignon	Ningxia
HLS13	Helanshan	He Lan Shan	2013	Cabernet sauvignon	Ningxia
HLS14	Helanshan	He Lan Shan	2014	Cabernet sauvignon	Ningxia
YY12	Yangyang	He Pai	2012	Cabernet sauvignon	Ningxia
YY13	Yangyang	He Pai	2013	Cabernet sauvignon	Ningxia
YY14	Yangyang	He Pai	2014	Cabernet sauvignon	Ningxia
PR12	Pernod Ricard	Helan Mountain	2012	Cabernet sauvignon	Ningxia
PR13	Pernod Ricard	Helan Mountain	2013	Cabernet sauvignon	Ningxia
PR14	Pernod Ricard	Helan Mountain	2014	Cabernet sauvignon	Ningxia
XXW12	Xixiawang	She Cang Ji	2012	Cabernet sauvignon	Ningxia
XXW13	Xixiawang	She Cang Ji	2013	Cabernet sauvignon	Ningxia
XXW14	Xixiawang	She Cang Ji	2014	Cabernet sauvignon	Ningxia
RZ09	Rongzi	Xiao Rongzi	2009	Cabernet sauvignon	Shanxi
RZ10	Rongzi	Xiao Rongzi	2010	Cabernet sauvignon	Shanxi
RZ11	Rongzi	Xiao Rongzi	2011	Cabernet sauvignon	Shanxi
RZ12	Rongzi	Xiao Rongzi	2012	Cabernet sauvignon	Shanxi
RZ13	Rongzi	Xiao Rongzi	2013	Cabernet sauvignon	Shanxi
RZ14	Rongzi	Xiao Rongzi	2014	Cabernet sauvignon	Shanxi
ZK14	Zhongke	Zhengrongjiazi	2014	Beihong	Ningxia

NMR Spectroscopic Analysis of Wines

For NMR sample preparation, 120 μL of 1 M phosphate buffer (pH 2.6), 60 μL of 80 mM calcium formate and 5 mM of trimethylsilylpropanoic acid sodium salt (TSP) were added to 420 μL of centrifuged wine. After solution mixing, 550 μL of the preparation were transferred in a 5 mm NMR tube. Deuterated water provided a field frequency lock and TSP was used as a chemical shift reference (^1H , δ 0.00 ppm).

^1H -NMR spectra were manually recorded at 293 K on a 600 MHz AVANCE III spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 600.27 MHz using a 5 mm TXI probe with Z-gradient coils. Three successive ^1H -NMR experiments were used for the acquisition, carried out a time domain (TD) of 65536 real data point (64 k) using a 20.0229 ppm (12019.23 Hz) spectral width (SW), a relaxation delay (RD) set to 5 s, and an acquisition time (AQ) requirement of 2.726 s. Firstly, Bruker sequence ZG was used to calibrate the suppression of water and ethanol signals. Water signal was suppressed with an integration of 50 Hz (25 Hz on both sides of the signal center). Each ethanol signals were suppress with an integration of 6 Hz (3 Hz on both sides of the signal center). These integrations were fixed to improve baseline and avoid deformations due to excessive suppression. Secondly, classical water suppression pulse program using presaturation (ZGPR) was used to suppress water signal. Eight free induction delay (FIDs) were collected. Thirdly, one dimensional ^1H -NMR pulse sequence with suppression of the water and ethanol signals was used (NOESYGPPS1D). For this experiment, NS = 8 was used. When necessary, classical 2D-NMR experiments including COSY, TOCSY, ROESY, HSQC and HMBC were used for compounds identification.

^1H -NMR Spectra were processed using both Topspin software version 3.2 (Bruker Biospin, Germany) and MestReNova NMR software version 11.0.3 (Mestrelab Research, Spain). FIDs were multiplied by an exponential function corresponding to a line broadening (LB) of 0.3 Hz prior to the Fourier transformation. All spectra were manually phased and baseline was corrected automatically using the MestReNova software. Each spectrum was aligned by shifting the TSP signal to zero to perform by MestReNova a semi-automatic quantification with Simple Mixture Analysis (SMA) plugin. The spectral peaks were assigned by comparing chemical shift and multiplicity with the literature and by metered addition in wine of the various standards. Peak deconvolutions were performed using the Global Spectral Deconvolution (GSD) method (Cobas et al. 2011; Schoenberger et al. 2016). For quantification, appropriate analyte signals were evaluated according to the following formula (Godelmann et al. 2016):

$$m_x = \frac{MW_x}{MW_{std}} \times \frac{n_{std}}{n_x} \times \frac{A_x}{A_{std}} \times m_{std} \times CF$$

where m_x and m_{std} are the masses (g), MW_x and MW_{std} , the molecular weights (g/mol), n_x and n_{std} , the numbers of protons, A_x and A_{std} , the integral values of the analyte and the standard, respectively.

The signal-to-noise ratio (SNR) was estimated, for each quantified compound, with the Mnova script SNR Peak Calculation according to : $\text{SNR} = Y / \text{noise}$, where “Y” is the amplitude of the peak and “noise” is the root-mean square deviation calculated in a signal free area of the spectrum. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were obtained by multiplying the SNR by 3 or 10 respectively. The confidence interval was ascertained using two wines. Each wine sample was prepared and analysed once a day for eight days to obtain interday coefficients of variation (CVs).

Statistical Analysis

Statistical analyses resulting from the quantifying data obtained from ^1H -NMR spectra were carried out using the R software and Simca 15.0 (Umetrics, Sweden). Unsupervised principal components analysis (PCA) was carried out using the FactoMineR and Factoextra plugin. PCA was used to separate useful information from noise and to try to discriminate wines of different geographical origin, grape varieties, or vintage. The quality of the models was estimated by R^2 and Q^2 values (Lee et al. 2009). R^2 is defined as the proportion of variance in the data explained by the models and indicates goodness of fit, and Q^2 is defined as the proportion of variance in the data predictable by the model and indicates predictability. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to determine which molecules were responsible of the differences or similarities observed between each compared wines group (by analysing the calculated Fisher's F).

Results and discussion

Method Development

NMR based-metabolomics is a useful technique for metabolite quantification in complex mixtures (Simmmler et al. 2014). In wine, several publications report the use of qNMR for wine authentication (Amargianitaki and Spyros 2017; Fotakis et al. 2013). One major problem is the pH adjustment, because pH variation induces chemical shift modifications. Chemical shift variations preclude automatic analysis of NMR spectra. The most common solution consists to adjust the pH using automated titration and specific solvents (Godelmann et al. 2013; Godelmann et al. 2016). One of the main goals of this study has been to develop a simple and direct method to perform a semi-automatized qNMR analysis of wines.

Method Description

Wines were directly analysed after addition of deuterated water, the chemical shift reference (TSP), the quantification reference (calcium formate) and phosphate buffer. Calcium formate was used as internal standard for absolute quantification because it is compatible for qNMR experiments, water soluble and gives a typical chemical shift at δ_H 8.30 ppm, a region of the wine spectrum relatively empty of proton signals (Ando et al. 2010). The signals of water and ethanol were suppressed by a shape pulse specifically designed for a multiple solvent suppression (Godelmann et al. 2013). To avoid the effects of wine pH variations on the chemical shifts of compound signals, different processes can be applied: (i) masking the pH effect by using an exponential function with a high value of line broadening prior to the Fourier transformation (Duarte et al. 2004); (ii) processing the data with specific methodologies such as spectral alignment (Stoyanova et al. 2004); or (iii) controlling the pH using buffered solutions and/or pH adjustment (Godelmann et al. 2013; Lee et al. 2009). In this study, the pH was stabilised using a phosphate buffer (pH 2.6) without adjustment. The molar concentration of the buffer was selected to reduce the wine pH variation with a weak spectral broadening effect (width at half height under 2 Hz for TSP signal). In preliminary assays (data not shown), whatever the wine, the pH variation was less than 0.2 inducing a chemical shift variation under 0.01 ppm. This approach combined with the global deconvolution method (Cobas et al. 2011; Schoenberger et al. 2016) allows the semiautomatic quantification of the main individual metabolites in each wine spectrum.

Identification of Wine Compounds

Figure 1 presents the typical ^1H -NMR spectrum obtained for a wine. Structural assignments of the main wine compounds were conducted following this global process: in a first approach the spectra were compared to literature data allowing a preliminary screening (Fotakis et al. 2013) and application of 2D-NMR experiments to avoid the signal overlapping observed in wine spectra (Hu et al. 2015; Lee et al. 2009); secondly, because experimental conditions (solvent, pH, concentration, ionic strength, temperature, etc.) induced some chemical shift variations, pure chemical standards were added directly to the wine in an appropriate amount to confirm the identification. Using this procedure thirty-three metabolites were identified in different wines. ^1H -NMR data (chemical shift, proton multiplicity and coupling constant) for each compound are listed in Table 2.

Assessment of the Method

The accuracy of the qNMR method is illustrated in Fig. 2. This figure shows the comparison between the NMR measurements and the reference values of TITRIVIN samples. The TITRIVIN AA series supplies a range of ordinate values for the most common parameters of wines. The obtained results show a good convergence between the NMR measurements and the official methods for acids and sugars. However divergences appear for some compounds such as for the alcohol content. The quantification using qNMR experiments leads to coefficients of variation (CVs) values ranged from 2% to 16% (Table 3). The lowest value was found for acetic and lactic acids, glycerol, proline and tyrosine. The highest values were obtained for ethyl acetate, fructose, epicatechin, pyruvic acid and alcohol content (16, 13, 12 and 11%, respectively). These high relative values could be related to the signal acquisition, treatment and deconvolution in the regions presenting numerous resonances.

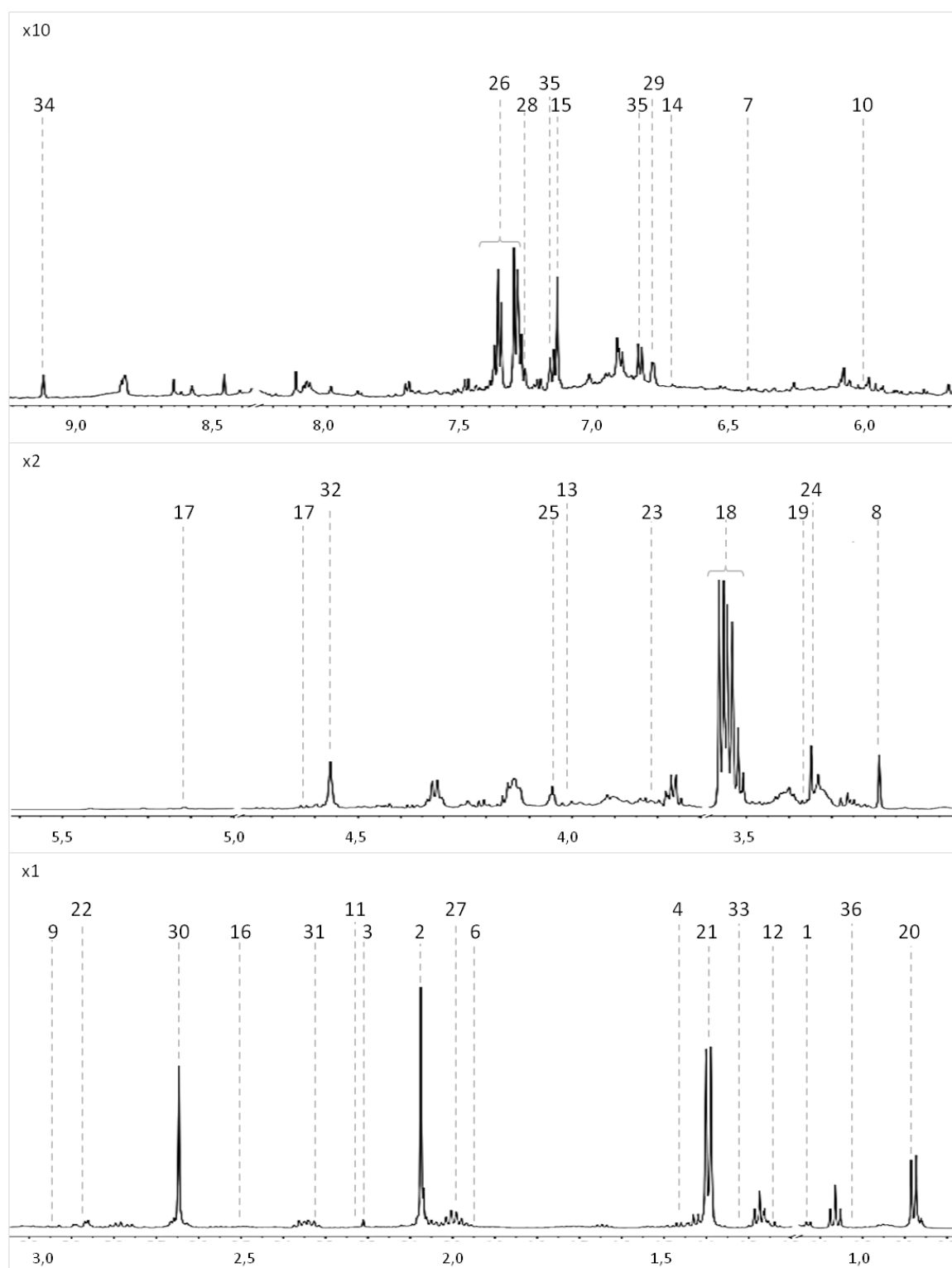


Fig 1 Typical wine ^1H -NMR spectrum including the selected signals for quantification listed in table 2.

Table 2 ^1H -NMR chemical shifts used for organic compound identification in wine. The signals chosen for quantitation are underlined.

	Compound	$\delta^1\text{H}$ in ppm (multiplicity, J in Hz, assignment)
1	2,3-Butanediol	<u>1,13</u> (d, 6.2, 2CH_3) ; <u>3,61</u> (m, 2CH)
2	Acetic acid	<u>2,06</u> (s, CH_3)
3	Acetoin	<u>1,37</u> (d, 7.0, CH_3) ; <u>2,21</u> (s, CH_3) ; <u>4,42</u> (m, CH)
4	Alanine	<u>1,48</u> (d, 7.2, CH_3) ; <u>3,76</u> (q, CH)
5	Alcohol content	<u>1,17</u> (t, 7.2, CH_3), <u>3,65</u> (q, CH_2)
6	Arginine	<u>1,70</u> (m, CH_2); <u>1,89</u> (m, CH_2); <u>3,23</u> (q, CH_2); <u>3,75</u> (t, 6.5, CH)
7	Caffeic acid	<u>6,43</u> (d, 16.0, CH), <u>7,69</u> (d, 16.0, CH)
8	Choline	<u>3,19</u> (s, 3CH_3) ; <u>3,51</u> (dd, CH_2) ; <u>4,05</u> (m, CH_2)
9	Citric acid	<u>2,53</u> (d, 15.6, CH) ; <u>2,65</u> (d, 15.6, CH)
10	Epicatechin	<u>6,07</u> (d, 2.2, CH), <u>6,10</u> (d, 2.2, CH)
11	Ethanal	<u>2,23</u> (d, 3.0, CH_3) ; <u>9,67</u> (q, CH)
12	Ethyl acetate	<u>1,26</u> (t, 7.2, CH_3) ; <u>4,12</u> (q, CH_2)
13	Fructose	<u>4,11</u> (m, 2CH_2); <u>4,00</u> (dd, 12.8 and 0.8, CH_2)
14	Fumaric acid	<u>6,71</u> (s, 2CH)
15	Gallic acid	<u>7,13</u> (s, 2CH)
16	γ -Aminobutyric acid	<u>2,50</u> (t, 7.3, CH_2)
17	Glucose	<u>5,22</u> (d, 3.7, CH); <u>4,61</u> (d, 7.9, CH)
18	Glycerol	<u>3,55</u> (dd, 11.8 and 6.5, CH_2)
19	Isobutanol	<u>0,87</u> (d, 6.7, CH_3); <u>1,73</u> (m, CH); <u>3,36</u> (d, 6.7, CH_2OH)
20	Isopentanol	<u>0,88</u> (d, 6.7, CH_3); <u>1,43</u> (q, CH); 1,64 (m, CH_2); <u>3,61</u> (t, 6.7, CH_2OH)
21	Lactic acid	<u>1,38</u> (d, 7.0, CH_3); <u>4,31</u> (q, CH)
22	Malic acid	<u>2,71</u> (dd, 16.3 and 7.0, CH); <u>2,82</u> (dd, 16.3 and 4.5, CH); <u>4,45</u> (s, CH)
23	Mannitol	<u>3,75</u> (m, CH); <u>3,79</u> (d, 9.0, CH_2); <u>3,83</u> (dd, 11.9 and 2.6, CH_2)
24	Methanol	<u>3,35</u> (s, CH_3)
25	Myo-inositol	<u>3,27</u> (t, 9.7, CH); <u>3,52</u> (dd, 10.0 and 2.8, 2CH); <u>3,61</u> (t, 2.8, 2CH); <u>4,05</u> (t, 2.8, CH)
26	Phenethyl alcohol	<u>2,76</u> (CH_2); <u>3,74</u> (CH_2OH); <u>7,28</u> (m, CH); <u>7,34</u> (m, CH)
27	Proline	<u>1,99</u> (m, CH_2); <u>2,06</u> (m, CH); <u>2,33</u> (m, CH); <u>3,32</u> (dt, 14.0 and 7.1, CH); <u>3,42</u> (dt, 11.6 and 7.0, CH); <u>4,11</u> (dd, 8.6 and 6.4, CH)
28	Pyruvic acid	<u>2,35</u> (s, CH_3)
29	Shikimic acid	<u>6,81</u> (m, CH)
30	Succinic acid	<u>2,62</u> (s, $\alpha, \beta\text{CH}_2$)
31	Syringic acid	<u>3,84</u> (s, 2CH_3); <u>7,24</u> (s, 2CH)
32	Tartaric acid	<u>4,41</u> (s, CH)
33	Threonine	<u>1,33</u> (d, 6.7, CH_3)
34	Trigonelline	<u>8,07</u> (m, CH); <u>8,82</u> (m, 2CH); <u>9,11</u> (s, CH)
35	Tyrosine	<u>6,89</u> (m, 2CH); <u>7,17</u> (m, 2CH)
36	Valine	<u>0,99</u> (d, 7.3, CH_3); <u>1,03</u> (d, 7.3, CH_3)

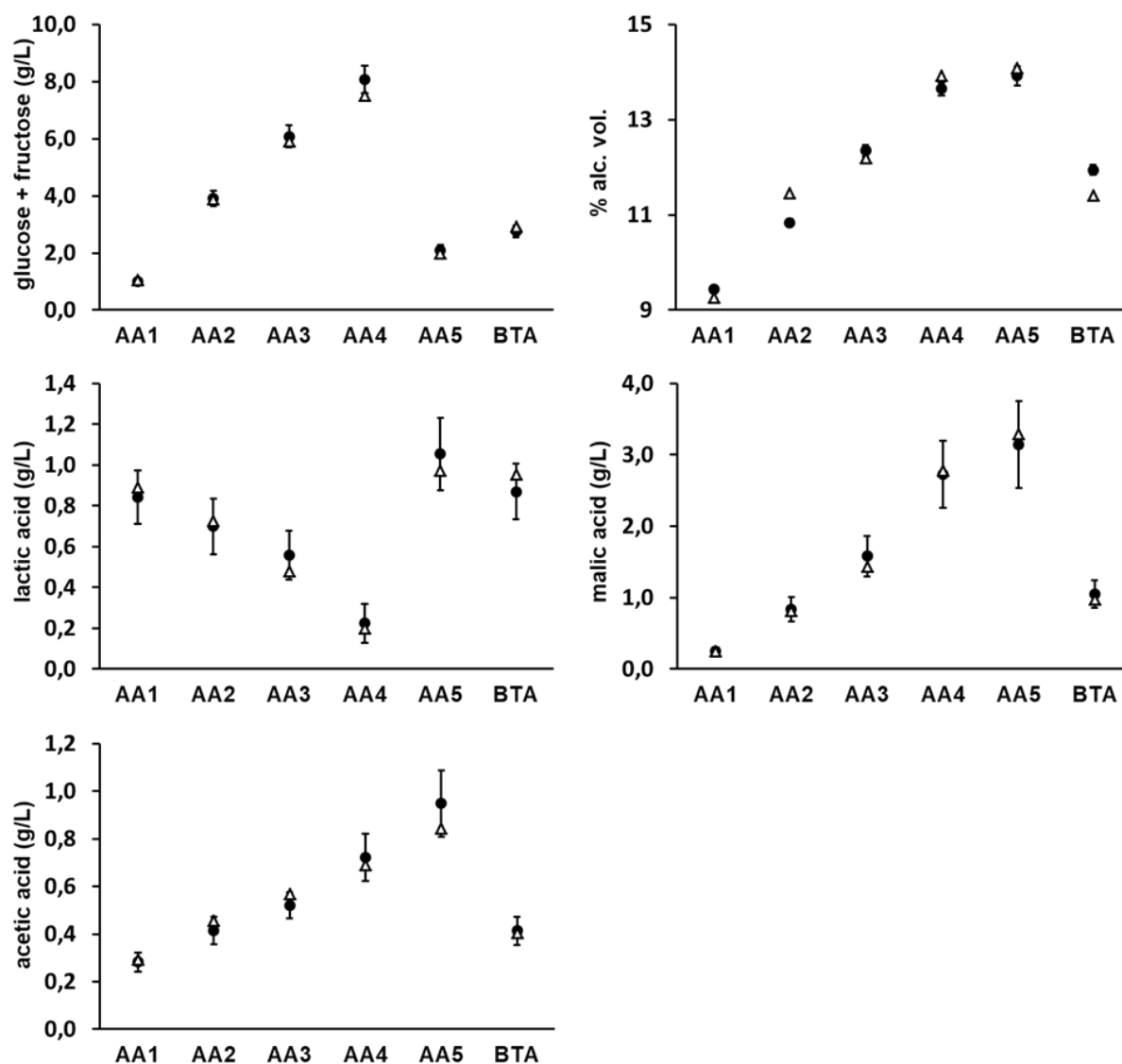


Fig 2 Comparison between qNMR data (empty circle) and reference values (filled circle) of the TITRIVIN wines (AA1 to AA5, and BTA) for acetic acid, malic acid, lactic acid, alcohol content and sugars. Acceptance intervals correspond to the maximal value that a laboratory can accept for the reference value when it analyses TITRIVIN for the first time.

Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were evaluated according to the instructions of OIV resolution OENO 7/2000 (Estimation of the detection and quantification limits of a method of analysis. OIV resolution OENO 7/2000). The results are reported in Table 3. The LODs values were in the range of 0.6 mg/L to 116 mg/L, the lowest values being found for trigonelline and syringic acid (0.6 and 0.7 mg/L, respectively), and the highest value being determined for malic acid and proline (116 and 62 mg/L, respectively). The LOQs values were in the range between 2 mg/L (trigonelline) and 384 mg/L (malic acid). These orders of magnitude are comparable to those obtained by Godelmann *et al.* (Godelmann *et al.* 2016) in their collaborative study.

Table 3 Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and coefficients of variation (CV) in wines.

Compound	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	CV (%)
2,3-Butanediol	1	3	7
Acetic acid	2	5	2
Acetoin	2	4	5
Alanine	3	10	7
Alcohol content (% alc.vol.)	2 (0.2)	7 (0.8)	11
Arginine	6	18	6
Caffeic acid	1	3	8
Choline	5	17	5
Citric acid	21	68	3
Epicatechin	3	10	12
Ethanal	0.6	2	4
Ethyl acetate	1	3	16
Fructose	34	112	13
Fumaric acid	1	3	6
Gallic acid	4	14	5
γ -Aminobutyric acid	1	3	7
Glucose	38	126	6
Glycerol	17	42	2
Isobutanol	14	46	8
Isopentanol	24	80	7
Lactic acid	33	110	2
Malic acid	116	384	3
Mannitol	15	48	10
Methanol	16	54	3
Myo-inositol	60	197	4
Phenethyl alcohol	3	9	3
Proline	62	205	2
Pyruvic acid	2	5	12
Shikimic acid	6	20	6
Succinic acid	55	181	7
Syringic acid	0.7	3	8
Tartaric acid	35	117	4
Threonine	2	5	6
Trigonelline	0.6	2	3
Tyrosine	4	13	2
V aline	0.7	3	6

Case Study

Nineteen wines from China (listed in Table 1) were studied to evaluate the potential of NMR to discriminate wines from: (i) different origins (Shanxi and Ningxia regions); (ii) different grape varieties (Cabernet Sauvignon and Beihong); (iii) and different vintages. Each of them were analysed in triplicate and the thirty-three metabolites listed in Table 2 were quantified. Principal Component Analysis (PCA) was used to obtain an overview on the present data set and influential variables. PCA was successfully employed for NMR metabolite fingerprinting in grape derived products (Fotakis et al. 2013). PCA score and loading plots of the variables associated with the first two principal components based on NMR data are shown in Fig. 3. In addition, one-way analysis of variance ANOVA was performed in order to highlight which compounds allow the discrimination of sample groups.

Terroir and Vineyard Impact

The classification of wines according to their *terroir* was presented in Fig. 3a. Only the wines produced with grape variety Cabernet Sauvignon were analysed to discriminate the geographical origin. The PCA score plot derived from compound quantification using ^1H -NMR data indicates a clear separation between the two regions. These results indicate that NMR-based metabolomics are able to separate wine *terroir* within the same country. Several compounds were pointed out to explain this observation. ANOVA statistical test allowed highlighting the compounds making possible to discriminate both regions, even if the wines come from different producers and vintages. The main discriminating factors in this study were proline, tyrosine, choline and gallic acid. In agreement with our results, a study on Italian wines indicated that the area of production could be discriminated on the basis of the contents in proline, but also succinic acid, 2,3-butanediol and glycerol (Viggiani and Morelli 2008). In another study on Cabernet Sauvignon wines from different countries (California, Australia, and France), data showed that among the compounds responsible for the separation, such as glycerol, 2,3-butanediol and proline are the most important (Son et al. 2008). In this study, 2,3-butanediol and glycerol are also found as minor discriminating factors. However, the relevance of including them seems unjustified because their concentrations depend mainly on fermentations and not on *terroir*. Nevertheless, these results suggest that wine origin could be discriminated by NMR analysis by measuring a combination of viticultural and winemaking parameters.

To observe if NMR-based metabolomics is able to separate wines from the same area, the Cabernet Sauvignon wines from Ningxia were analysed alone. These samples represent four different wineries from the same region, and 3 vintages of the same wine (2012, 2013 and 2014) per winery. The attempted discrimination of the four wineries is unsuccessful by PCA (results not shown). Concerning ANOVA analysis, differences were found between concentrations of many compounds such as amino acids (proline, alanine), 2,3-butanediol, ethyl acetate, organic acids (acetic, lactic, and syringic), acetoin, isobutanol, isopentanol or phenylethyl alcohol. However, these significant differences do not allow discrimination of the wines of the four studied wineries. The discrimination between nearby wineries seems to be delicate using only NMR-based metabolomics. It could be useful to add other data coming from different techniques such as Inductively coupled plasma mass spectrometry for the measurement of rare earth elements (Šelih et al. 2014) or isotope ratio mass spectrometry (Guyon et al. 2011).

Classification of Grape Varieties

The influence of the grape variety on wine metabolome was carried out on the different wines from Ningxia stemming from two varieties: Beihong, a local grape variety, and Cabernet Sauvignon. PCA results were shown in Fig. 3b. This analysis clearly separates the Beihong wine and the Cabernet Sauvignon wine group even if these wines are neither of the same vintage nor of the same winery. In agreement with the studies on white wines using high-performance capillary electrophoresis (Chabreyrie et al. 2008), grape varieties could be differentiated on the basis of the contents in proline and shikimic acid. In addition to these two metabolites, compounds which bear grape variety were amino acids (proline, alanine, threonine, tyrosine and valine), organic acids (shikimic, succinic and fumaric acids), methanol, and phenylethyl alcohol. In international wines obtained from three grape varieties (Cabernet Sauvignon, Shiraz and Campbell Early), the compounds contributing to the separation were assigned to be 2,3-butanediol, lactate, acetate, proline, succinate, malate, glycerol, tartrate, glucose, and phenolic

compounds (Son et al. 2008). These results indicate that NMR spectra analysis gives a good prediction of grape varieties based on various parameters depending on the studied varieties and growth conditions.

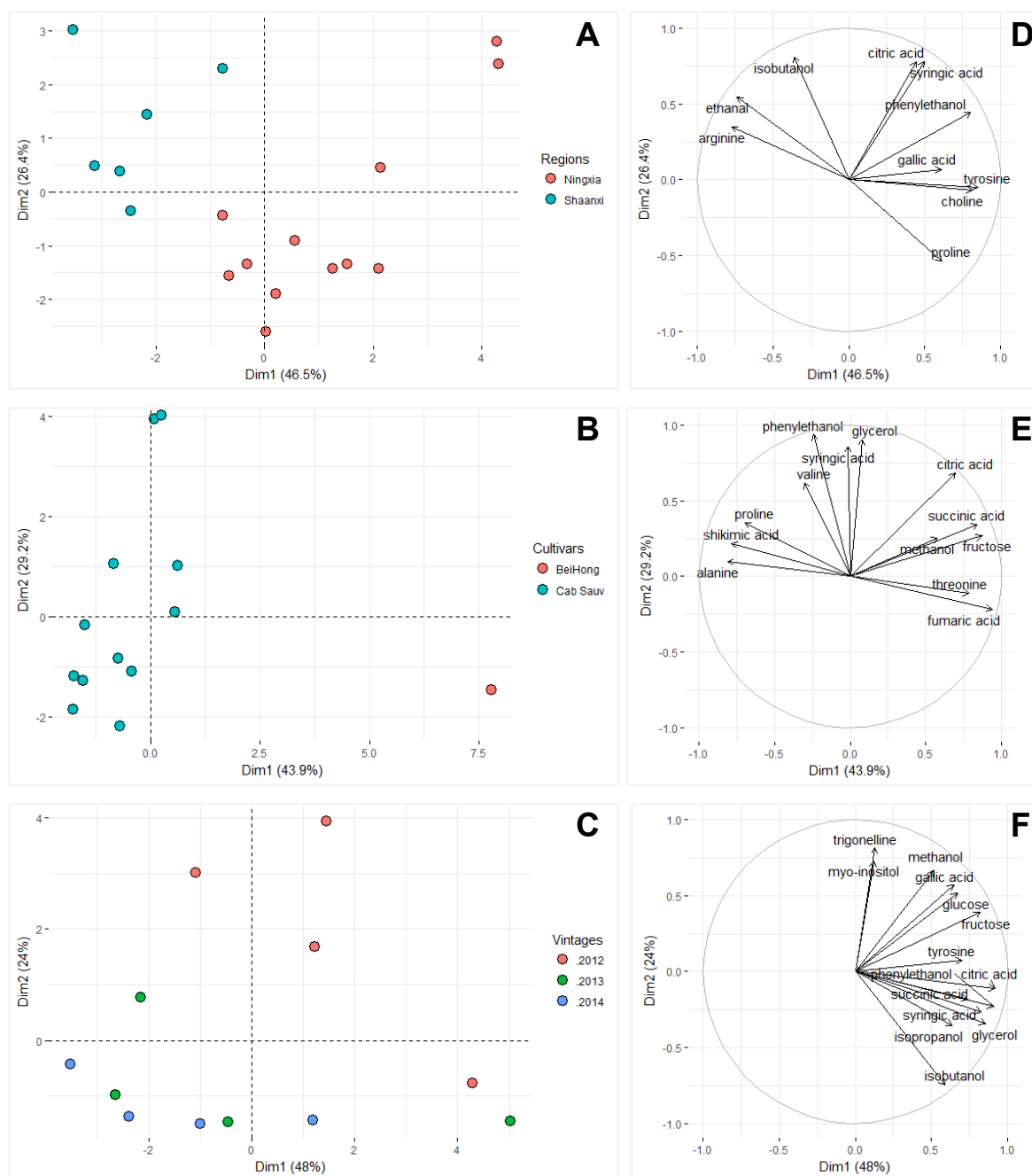


Fig. 3 PCA score and loading plots of the variables associated with the first two principal components derived from qNMR analysis of wines: comparison between Ningxia and Shanxi wines (A, D); comparison between the grape varieties (B, E); comparison between the three vintages (2012, 2013, and 2014) of Ningxia wineries (C, F).

Influence from Vintages

Growth conditions, including weather, climate and viticultural practices, affect wine quality. So, vintage is crucial both for trading and customers. Fig. 3c presents PCA score plots based on NMR extracted data of Cabernet Sauvignon wines from Ningxia from three vintages (2012, 2013, and 2014). All the wines were analysed by NMR in 2017. In this region, the 2012 vintage was a bad year for grape growing, with heavy rainfall and significant disease pressure. On the contrary, 2013 and 2014 were considered as good years, with little rainfall and a favourable climate. Whereas a statistically significative separation was observed between wines produced in 2012 and 2014 no difference was observed concerning metabolite levels between 2013 and 2014. The wines produced in 2013 do not constitute an isolated group. The main discriminant factors were methanol, gallic acid, glucose, fructose, myoinositol, and tyrosine levels. These results indicate that NMR-based metabolomics ability to separate wines from different vintages seems to be influenced by growth conditions. In a NMR analysis of Amarone wines produced in Italia (Consonni et al. 2011), NMR-based metabolomics combined to multivariate analysis clearly separated wines obtained from three years of harvesting (2005, 2006, and 2007). Close to our data, the main metabolites involved for wine separation were amino acids, sugars, and aromatic compounds. Similar results were obtained between the 2006 and 2007 vintage on grape wines from a Korean region (Lee et al. 2009). These results indicate that NMR-based metabolomics allows the separation of wine profiles according to the vintage year. Nevertheless, the vineyard growth conditions need to be taken into account to separate vintages.

Conclusion

¹H-NMR based metabolomics is effective to quantify diverse metabolites from several families of compounds in a complex mixture such as wine. The method proposed in this study is relatively fast, without extraction or pre-processing methods, and with good reproducibility. Targeted NMR spectrometry along with multivariate statistical analysis can discriminate wines from different regions, grape varieties and vintages. Different chemical markers such as alcohols, organic and amino acids are effective in these cases. Nevertheless, wine is a living matrix continuously evolving. It would be relevant to ensure that the analyses made today will still be valid tomorrow regarding the same wines.

Acknowledgements The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

Funding This study was funded by the *Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux* (CIVB), and FranceAgriMer program (grant number 2014-0785).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed Consent Not applicable.

References

Ali K, 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.

- Amargianitaki M, Spyros A (2017) NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chem biol technol agric* 4:9. doi:10.1186/s40538-017-0092-x
- Anastasiadi M, Zira A, Magiatis P, Haroutounian SA, Skaltsounis AL, Mikros E (2009) ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *J Agric Food Chem* 57:11067-11074.
- Ando I, Hirose T, Nemoto T, Totsune K, Imai Y, Takeuchi K, Fujiwara M (2010) Quantification of molecules in ¹H-NMR metabolomics with formate as a concentration standard. *J Toxicol Sci* 35:253-256.
- Chabreyrie D, Chauvet S, Guyon F, Salagoity M-H, Antinelli J-F, Medina B (2008) Characterization and Quantification of Grape Variety by Means of Shikimic Acid Concentration and Protein Fingerprint in Still White Wines. *J Agric Food Chem* 56:6785-6790.
- Cobas C, Seoane F, Domínguez S, Sykora S, Davies AN (2011) A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). *Spectrosc Eur* 23:26-30.
- Consonni R, Cagliani LR, Guantieri V, Simonato B (2011) Identification of metabolic content of selected Amarone wine. *Food Chem* 129:693-699.
- Cubero-Leon E, Peñalver R, Maquet A (2014) Review on metabolomics for food authentication. *Food Res Int* 60:95-107.
- De Pascali SA, Coletta A, Del Coco L, Basile T, Gambacorta G, Fanizzi FP (2014) Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chem* 161:112-119.
- Duarte IF, Barros A, Almeida C, Spraul M, Gil AM (2004) Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data as a Potential Tool for the Quality Control of Beer. *J Agric Food Chem* 52:1031-1038.
- Fotakis C, Kokkottou K, Zoumpoulakis P, Zervou M (2013) NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Res Int* 54:1184-1194.
- Godelmann R, Fang F, Humpfer E, Schütz B, Bansbach M, Schäfer H, 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.
- Godelmann R, Kost C, Patz C-D, Ristow R, Wachter H (2016) Quantitation of Compounds in Wine Using ¹H NMR Spectroscopy: Description of the Method and Collaborative Study. *J AOAC Int* 99:1295-1304.
- Guyon F, Gaillard L, Salagoity M-H, Médina B (2011) Intrinsic ratios of glucose, fructose, glycerol and ethanol ¹³C/¹²C isotopic ratio determined by HPLC-co-IRMS: toward determining constants for wine authentication. *Anal Bioanal Chem* 401:1551. doi:10.1007/s00216-011-5012-5
- Hu B, Yue Y, Zhu Y, Wen W, Zhang F, Hardie JW (2015) Proton Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopic Discrimination of Wines Reflects Genetic Homology of Several Different Grape (*V. vinifera* L.) Cultivars. *PLoS One* 10:e0142840. doi:10.1371/journal.pone.0142840
- International Organisation of Vine and Wine (2017). OIV Strategic Plan 2015-2019. Retrieved October 17, 2017 from: <http://www.oiv.int/public/medias/3345/ps-2015-2019-en.pdf>.
- Larive CK, Barding GA, Dinges MM (2015) NMR Spectroscopy for Metabolomics and Metabolic Profiling. *Anal Chem* 87:133-146.
- 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 ¹H NMR-based metabolomic study. *Anal Chim Acta* 648:71-76.
- López-Rituerto E, Cabredo S, López M, Avenzoza A, Busto JH, Peregrina JM (2009) A thorough study on the use of quantitative ¹H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *J Agric Food Chem* 57:2112-2118.
- López-Rituerto E, Savorani F, Avenzoza A, Busto JH, Peregrina JM, Engelsen SB (2012) Investigations of la Rioja terroir for wine production using ¹H NMR metabolomics. *J Agric Food Chem* 60:3452-3461.
- Pauli GF, Gödecke T, Jaki B, Lankin D (2012) Quantitative ¹H NMR. Development and Potential of an Analytical Method: An Update. *J Nat Prod* 75:834-851.
- Schoenberger T, Menges S, Bernstein MA, Pérez M, Seoane F, Sýkora S, Cobas C (2016) Improving the Performance of High-Precision qNMR Measurements by a Double Integration Procedure in Practical Cases. *Anal Chem* 88:3836-3843.
- Šelih VS, Šala M, Drgan V (2014) Multi-element analysis of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia. *Food Chem* 153:414-423.

- Simmler C, Napolitano JG, McAlpine JB, Chen S-N, Pauli GF (2014) Universal Quantitative NMR Analysis of Complex Natural Samples. *Curr Opin Biotechnol* 0:51-59. doi:10.1016/j.copbio.2013.08.004
- 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* 57:1481-1490.
- Son H-S, Kim KM, van den Berg F, Hwang G-S, Park W-M, Lee C-H, Hong Y-S (2008) ¹H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *J Agric Food Chem* 56:8007-8016.
- Stoyanova R, Nicholls AW, Nicholson JK, Lindon JC, Brown TR (2004) Automatic alignment of individual peaks in large high-resolution spectral data sets. *J Magn Reson* 170:329-335.
- Viggiani L, Morelli MAC (2008) Characterization of wines by nuclear magnetic resonance: A work study on wines from the Basilicata region in Italy. *J Agric Food Chem* 56:8273-8279.

4. Principaux résultats

Dans cette première partie du projet, la méthode d'analyse des vins par RMN ^1H répondant aux critères fixés a été développée. La préparation des échantillons est simple et rapide, nécessite un faible volume de vin, avec une action minimale sur son métabolome. L'acquisition des spectres est réalisée dans un temps relativement court : environ dix minutes sont nécessaires afin de calibrer le spectromètre et acquérir les trois spectres des séquences *zg*, *zgpr* et *noesygpps1d*. La méthode développée a permis l'identification de trente-six métabolites du vin de familles chimiques différentes, ainsi que leur quantification absolue en une seule analyse. La capacité de cette technique à discriminer des vins selon des critères de cépage, d'origine et de millésime, a pu être observée sur le cas d'étude portant sur des vins d'origine chinoise.

Tableau 10. Paramètres de la méthode finale développée pour l'analyse des vins par RMN ^1H .

Préparation d'échantillon	Volume de vin : 420 μL
	Volume de tampon phosphate 1M pH 2,8 : 120 μL
	Volume de D_2O : 60 μL (contenant 10g/L de FCa et 5 mM de TSP)
	Ajustement pH échantillon : 3,1 avec HCl 1N
Paramètres d'acquisition	Séquence : <i>noesygpps1d</i>
	Nombre de points du domaine temporel (td) : 64k
	Largeur spectrale (sw) : 20 ppm
	Temps d'acquisition (aq) : 2,726 s
	Délai de relaxation (d1) : 5 s
	Nombre de scans : 32
	Dummy scans (ds) : 4
	Température de l'échantillon : 293 K
Paramètres de traitement	Gain du récepteur (rg) : 64
	Correction de phase : manuelle
	Correction de ligne de base : automatique
	Line broadening (lb) : 0,3 Hz

Un des points essentiels reste le choix du tampon pour limiter les variations de déplacement chimique dans l'analyse des vins. Les paramètres étudiés ont été focalisés sur le couple acide / base, la force ionique du tampon, son pH, et sa quantité dans l'échantillon. Il a été conclu que malgré une forte limitation des écarts de pH entre échantillons (figure 8), l'ajout de tampon ne permettait pas un alignement parfait des signaux sur les spectres, particulièrement en ce qui concerne les acides organiques. Néanmoins, dans le cadre d'une analyse ciblée, la méthode développée permet de

quantifier de manière semi-automatique les métabolites identifiés. Suite à ce constat, un robot de titration (unité BTpH, Brucker®) permettant l'ajustement précis des pH de chaque échantillon ($\pm 0,02$ pH) a été acquis, avec l'objectif de développer des analyses non-ciblées et de faciliter l'automatisation des dosages. La méthode utilisée dans la suite des travaux est décrite dans le Tableau 10, où le pH a été fixé à 3,1 à l'aide d'un robot de titration BTpH.

Le robot de titration permet de réduire les variations de déplacement chimique mais pas de les supprimer (Figure 10). Même infimes, ces décalages pourraient provoquer des biais dans l'interprétation des résultats lors d'une analyse non-ciblée. Il est alors nécessaire de procéder à un réajustement des spectres, avec l'aide par exemple d'un logiciel comme NMRProcFlow® (<http://nmrprocflow.org>), permettant le réaligement des spectres sur des zones précises.

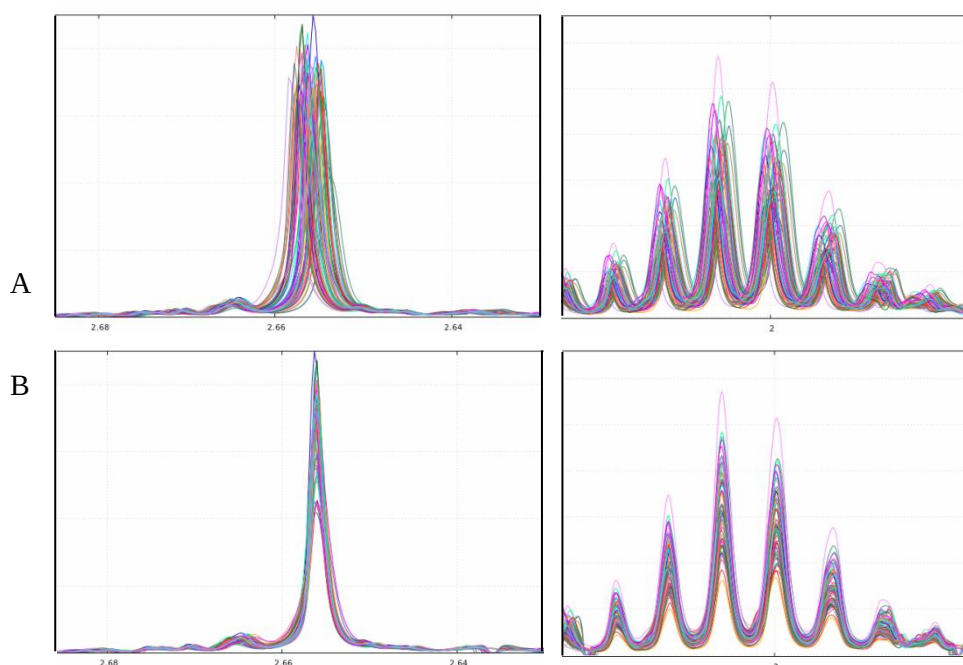


Figure 10. Signaux de l'acide succinique (à gauche) et de la proline (à droite) dans soixante-douze spectres de vins rouges dont les pH ont été ajustés à 3,1 avant (A) et après (B) réajustement des signaux via le logiciel NMRProcFlow.

Comme évoqué dans ce Chapitre, trente-six composés présents dans les vins ont pu être identifiés et quantifiés. Des disparités importantes ont été observées entre les limites de détection et de quantification des métabolites. Ces disparités peuvent avoir plusieurs origines : complexité de la zone observée, nature et forme du signal, etc.. De même, la précision du dosage dépend du composé observé.

En plus de permettre une quantification juste et précise, la technique RMN semble être un outil capable de discriminer les vins ayant des caractéristiques singulières. Les travaux réalisés montrent

que la quantification des composés majoritaires identifiés par RMN ^1H permet la distinction entre vins commerciaux monocépages de terroirs différents. Néanmoins, la distinction entre millésime où domaine de production s'est avérée plus délicate alors que certaines études y sont parvenues (Lee, Hwang, et al., 2009; López-Rituerto et al., 2012; Mazzei et al., 2010).

Finalement, la technique d'analyse des vins par RMN ^1H semble être un outil de dosage des composés majoritaires avec une justesse comparable à celle des méthodes officielles. Elle a pour avantage de ne nécessiter qu'une seule analyse pour doser un grand nombre de composés de familles différentes, mais ne peut doser tous les composés d'une même famille (sucres non identifiables, trop peu sensible pour tous les acides aminés, chevauchements). Dans le but de développer cette méthode dans un processus d'authentification des vins, il est nécessaire d'étudier sa capacité à observer des différences ou des similitudes en comparaison avec ce qui est fait par les laboratoires agréés pour la détection des fraudes.

Chapitre II :

*Comparaison avec les
méthodes officielles*

1. Stratégie

La technique de dosage des composés majoritaires des vins par RMN ^1H présente des avantages certains évoqués dans le premier Chapitre. Couplée à la chimiométrie, elle semble être capable de faire des discriminations entre des ensembles de vins ayant des caractéristiques distinctives propres en termes de cépage et d'origine.

Aujourd'hui, la détection des fraudes est principalement pratiquée par comparaison de l'empreinte chimique d'une bouteille à authentifier et celle authentique. Les laboratoires de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) effectuent alors une batterie d'analyses, tant sur des paramètres standards du vin, tels que le taux d'alcool, l'extrait sec, les sucres ou acides organiques, que sur des paramètres plus fins comme les teneurs en minéraux, les isotopes stables, ou encore la radioactivité à faible rayonnement gamma. L'analyse complète de ces paramètres nécessite un volume de vin important, de l'ordre de 250 mL, et un temps d'analyse relativement long. Dans ce contexte, la RMN ^1H pourrait être une alternative aux techniques habituellement utilisées par les services officiels de détection des fraudes.

Dans le but de démontrer la capacité de la RMN ^1H à authentifier un vin en complémentarité avec des méthodes officielles, une comparaison entre les résultats d'authentification réalisés par le Service Commun des Laboratoires DGDDI et DGCCRF – Douanes (SCL) et ceux issus de l'analyse par RMNq a été réalisée à partir de cas réels proposés par le Château Mouton Rothschild.

Un seuil de conformité a été établi afin de pouvoir juger objectivement des similitudes ou des différences observées suite aux analyses chimiques. Le vin étant une matrice vivante, il a été nécessaire d'estimer les incertitudes de mesure liées à cette évolution naturelle et pouvant entraîner des erreurs de jugement lors de l'authentification.

2. Présentation des travaux

2.1. Échantillonnage et analyses

Comme les vins de Bourgogne ou de Champagne, les vins de Bordeaux ont la particularité de jouir d'une réputation mondiale. Certaines appellations, comme Pauillac ou Saint-Émilion, voient leurs vins se vendre avec une forte valeur ajoutée. C'est aussi le cas de châteaux bien particuliers, notamment les premiers grands crus classés, dont les flacons font l'objet de spéculations sur les places de vente aux enchères.

L'étude présentée dans ce Chapitre a été réalisée en étroite collaboration avec le SCL et le Château Mouton-Rothschild, 1^{er} grand cru classé en 1855, situé dans le vignoble du Médoc en appellation

Pauillac. Le but de cette étude a été de confronter les conclusions obtenues par les analyses classiques et celles obtenues par RMNq. Ces résultats sont basés sur la comparaison entre des vins suspects et des vins authentiques fournis par le Château.

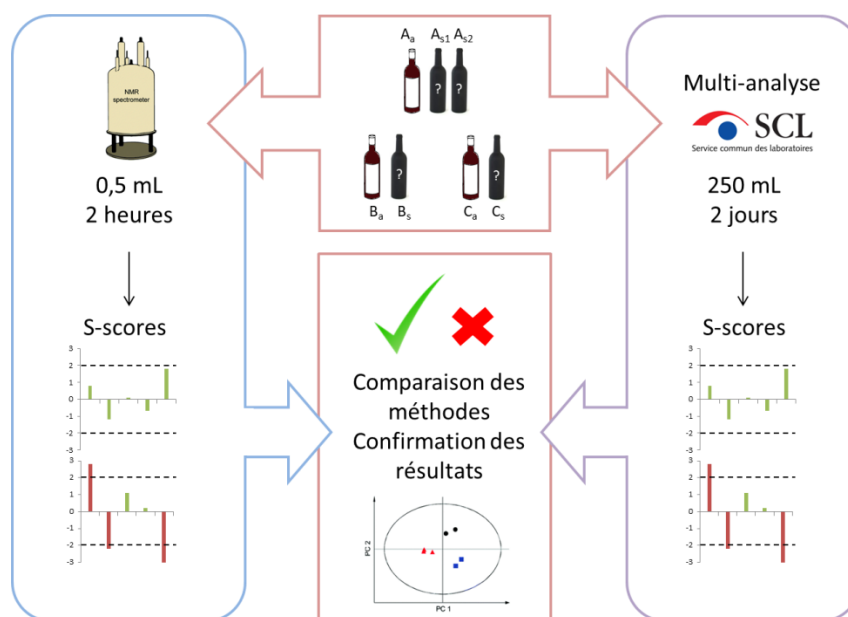


Figure 11. Schéma du processus d'authentification des vins par RMN et par la multi-analyse réalisée par le SCL. Les analyses ont été réalisées sur trois lots (A, B, C) comprenant des vins authentiques (A_a, B_a, C_a) et suspects (A_{s1}, A_{s2}, B_s, C_s).

Les analyses de quatre cas réels ont été réalisées. Deux premières bouteilles d'un millésime de plus de trente ans ont été confiées par le Château pour une remise à niveau (nommé lot A). La législation permet l'ajout de 15% maximum en volume d'un millésime récent pour la remise à niveau d'un vieux millésime. Les deux autres bouteilles étaient de millésimes plus récents (moins de 10 ans) vendues à l'étranger (nommés lots B et C). Les bouteilles authentiques de ces trois millésimes ont été fournies par le Château afin de pouvoir effectuer les comparaisons. Chaque échantillon a été analysé par RMNq selon la méthode détaillée au Chapitre I ainsi que selon les analyses standards officielles habituellement réalisées par le SCL (Figure 11). Ces analyses comprennent la détermination du titre alcoométrique (éthanol), le dosage des sucres (glucose, fructose, saccharose, glycérol), de l'acidité (totale et acidité volatile), des composés volatils (éthanal, éthyl acétate, méthanol, butanol 2, propanol 1), des acides organiques (tartrique, malique, succinique, lactique et gluconique), l'analyse des éléments minéraux, l'analyse du deutérium et du carbone-13 de l'éthanol, ainsi que de l'oxygène-18 de l'eau dans le vin (Tableau 11). Les deux méthodes ont été comparées afin de pouvoir juger avec précision de la conformité ou non des échantillons suspects.

Tableau 11. Analyses réalisées par le SCL dans le processus d'authentification des vins et précisions sur les composés dosés, le volume de vin nécessaire ainsi que le temps de préparation et d'analyse.

Méthode	Composé(s) dosé(s)	Volume de vin nécessaire	Temps de préparation et d'analyse
OIV-MA-AS312-01A	degré alcoolique	200 mL	35 min
OIV-MA-AS311-03	fructose, glucose, saccharose, glycérol	2 mL	20 min
OIV-MA-AS313-02	acides appartenant à la série acétique	20 mL	15 min
OIV-MA-AS315-27	composés volatils	10 mL	1h
OIV-MA-AS313-19	acides tartrique, malique et lactique et gluconique	2 mL	15 min
OIV-MA-AS322-13	éléments minéraux majeurs et mineurs	10 mL	10 min
OIV-MA-AS311-05	rapports isotopiques du deutérium (D/H)	5 mL	4h
OIV-MA-AS312-06	rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol	1 à 10 μL	10 min
OIV-MA-AS2-12	rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau dans le vin	2 x 0,2 mL	6h

2.2. Détermination du seuil de conformité

La difficulté dans un examen d'authenticité est de déterminer le seuil à partir duquel un vin est jugé conforme ou non. Dans ce but, une adaptation du z-score nommée s-score (*similarity score*) a permis une comparaison fiable des mesures, quelle que soit la technique analytique employée. Pour un métabolite étudié dans deux échantillons, un s-score compris entre -2 et 2 indique que les valeurs mesurées ne sont pas significativement différentes.

$$s - score^A = \frac{C_{Suspect}^A - C_{Authentique}^A}{\sigma^A \times (\max[C_{Suspect}^A ; C_{Authentique}^A])}$$

avec A l'analyte étudié, C les concentrations du vin suspect et authentique, et σ l'incertitude de la mesure appliquée à la plus forte concentration.

Une des difficultés pour définir le seuil de conformité provient du vieillissement du vin en bouteille. Des vins âgés ayant vieilli dans des conditions de stockage différentes pourraient voir leur empreinte métabolique être modifiée sensiblement. Pour pallier à cette inexactitude, le calcul de nouvelles incertitudes a été évalué grâce à l'analyse de plusieurs vins âgés de mêmes millésimes, dont l'élevage s'est déroulé dans les mêmes conditions de conservation. Le Château Mouton Rothschild a fourni trois lots de vins de sa propre cave (n = 4 ou 5) de millésimes différents (plus de soixante ans, deux ans d'écart entre chaque lot) afin de calculer les incertitudes plus proches de la réalité, non pas dues à la technique RMN ^1H mais à l'évolution naturelle d'un vin.

Enfin, pour valider cette approche, un ensemble d'une vingtaine de vins commerciaux des millésimes 2011 et 2012 a été analysé. La méthode des s-score a été appliquée pour chaque métabolite dosé dans ces vins. À l'exception de deux vins du Libournais et de deux vins du Médoc, tous les vins font l'objet d'une discrimination adéquate. En effet, le total du nombre de s-scores incorrects ($s < -2$ et $s > 2$) est toujours supérieurs à cinq. Aussi, s'il est possible de distinguer les vins d'une même région dans la plupart des cas, les vins d'un même terroir peuvent avoir des signatures chimiques similaires. Cette observation est illustrée dans la Figure 12 qui représente les s-scores calculés entre treize vins du Château Mouton-Rothschild. Des similitudes sont observées entre les vins du même millésime, mais des distinctions sont faites entre les vins de différents millésimes ayant un écart de deux ans.

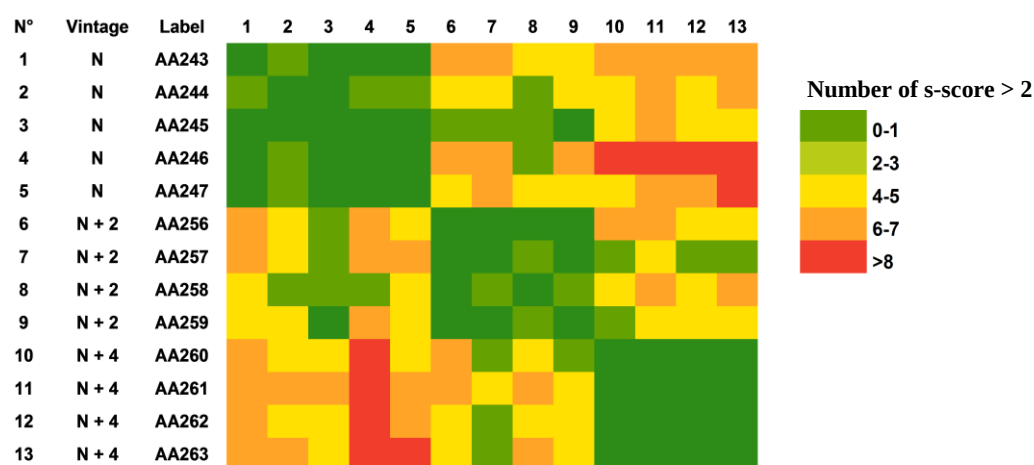


Figure 12. Discrimination croisée basée sur le total des s-score des treize vins du Château Mouton-Rothschild (trois séries de bouteilles authentiques de différents millésimes anciens : N, N + 2 et N + 4).

3. Publication

Les résultats obtenus suite aux analyses de conformité et à la comparaison entre les deux techniques ont fait l'objet de l'article suivant : *Wine authenticity by quantitative 1H-NMR versus multi-techniques analysis : A case study*, paru dans le journal *Food Analytical Methods* le 15 janvier 2019.

Wine Authenticity by Quantitative ^1H NMR Versus Multitechniques Analysis: a Case Study

Louis Gougeon,¹ Gregory da Costa,¹ Tristan Richard,¹ François Guyon^{2,*}

1. Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, USC 1366 INRA, Unité de Recherche Œnologie, 210 chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon, France
2. Service Commun des Laboratoires, 3 avenue du Dr. Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France

* Corresponding author:

Email address: guyonfra@gmail.com

Abstract

Food counterfeit is a major issue for food industries. In the case of wines, there can be multiple forgeries such as geographical, vintage or varietal mislabeling. For the last ten years, the use of quantitative ^1H NMR (q-NMR) for food authentication has experienced an enormous increase. This study was based on a comparative evaluation of the results obtained for 3 sets of authentic high-valued wines and suspected wines. Two methodologies have been followed: i) the usual wine analysis, based on the utilization of multiple techniques, which is the traditional way of analysis for wine authentication and ii) q-NMR profiling, the alternative proposed method. For wine comparison, an original approach based on similarity score, S-score, by analogy to the Z-score calculation was developed. A limit of 4 S-scores outside the range -2/2 has been, arbitrary, defined to reveals that wines are different using q-NMR analysis. Data treatments allowed the extraction of discriminating parameters, some of which were common to both approaches while others could be linked to the techniques capabilities showing the complementarity of the two approaches. This study demonstrated the potential of q-NMR in wine authentication by comparative analysis with authentic samples. The q-NMR alternative method has also the advantages of rapidity (around 20 minutes including sample preparation, analysis and data treatment) and low volume (0.5 mL), which is a prerequisite for analyzing priceless wines.

Keywords Food authenticity; Food quality control; Wine; Classical wine analysis, ^1H NMR, q-NMR; Chemometric

Introduction

Food authenticity is a major concern in the global food system for many reasons such as safety, consumer trust and producers concurrency. Falsifications occurring in wine can belong to multiple types including geographical, vintage and varietal mislabeling. The detection of such falsifications is usually performed using the confrontation of analytical results between authentic and suspicious wines using various analytical (Médina et al., 2013; Schlesier et al., 2009) and statistical methods (Smeyers-Verbeke et al., 2009). Multi-instrumental approaches have been used including liquid and gas chromatography, UV-visible spectrometry, near-infrared spectrometry, NMR, mass spectrometry (MS), Isotope-ratio mass spectrometry (IRMS) and coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS). All these technics are widely employed in the investigation of wine authenticity allowing the measurement of several wine parameters such as ethanol and alcohols, sulphur dioxide, reducing sugars, polyphenols, organic acids, total and volatile acidity, minerals, metals and isotopic ratios (D/H , $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Until now, all these multidisciplinary approaches are necessary to obtain discriminant results (so called in this paper “usual wine analysis”) (Médina et al., 2013). As a result, wine authenticity study requires highly skilled technicians, numerous analytical systems and a large volume of wine. The overall analysis can take time and is costly. The NMR quantitative analysis (qNMR) could be a complementary alternative to the usual wine analysis because it can be considered as a universal method that allows the measurement of several parameters on a small volume of wine without specific sample preparation procedure (Pauli, Gödecke, Jaki, & Lankin, 2012).

Since ten years, ^1H NMR analysis has been more and more widely applied to food control and, as a result, to wine (Amargianitaki & Spyros, 2017; Larive, Barding, & Dinges, 2015; Simmler, Napolitano, McAlpine, Chen, & Pauli, 2014). The application of proton profiling or compound quantification obtained by q-NMR along with chemometrics has been successfully used for recognizing grape varieties (Anastasiadi et al., 2009; Godelmann et al., 2013; Son, Hwang, Ahn, et al., 2009; Son, Hwang, Kim, Ahn, et al., 2009), geographical origin (Caruso et al., 2012; Giuliano Elias Pereira et al., 2007; Son et al., 2008; Viggiani & Morelli, 2008) and vintage (Consonni et al., 2011). The q-NMR interest comes from the global analysis of the food matrix, the repeatability and reproducibility of the measurements as well as its rapidity in comparison to classical methods (Godelmann et al., 2016).

High-value wines are to be kept for aging and, sometimes, some of them become wines of collection. Authenticity assessment and good conservation of these wines are thus critical questions. On one hand, greed and profit could lead unscrupulous resellers to practice wine forgeries (geographical, vintage or varietal mislabeling) on such priceless wines. On the other hand, during long aging period, corks can dry out due to a lack of humidity which, in addition to wine leak, induces oxygen exchanges causing wine spoilage or oxidation. As a result, these two aspects become critical for driving an early wine degradation. The unique solution is to replace the cork and to top the bottle up with a similar wine, i.e., same vintage and same production estate. The wine producer is the only one licensed to perform this top-up level step which is realized after a control of wine authenticity. For both applications, vineyard estates are searching for reliable authentication techniques requiring the lowest sample volume to be used for analysis. Among q-NMR advantages, a valuable one is the low quantity of sample required for the analysis (Gougeon et al., 2018). As a result, this tool can be interesting in old vintage wines authentication using proton profile comparison between the authentic estate wine and the commercial one. But until now, q-NMR has not been applied for authentication applications using the wine proton profiles comparison.

Recently, in collaboration with Château Mouton Rothschild, a prestigious winemaker, the authenticity of different wines samples was checked using the q-NMR method and the usual analysis (multi-techniques approach) applied for wine authentication (Médina et al., 2013). The first case was on the authentication of the wine contained in two bottles, half filled, that would be used to top-up the level of one bottle. The second case concerned two suspected bottles of different vintages, fully filled and sampled on foreign market. Château Mouton Rothschild's requested the authentication of the wine contained in the four bottles by comparative analysis with authentic samples coming from their own cellar. This work presents the results obtained by the two methods. Data treatment will compare analytical information provided by these two different approaches in order to evaluate q-NMR potential in wine authentication by comparative data analysis of suspicious and authentic wines.

Material and Methods

Samples

In order to respect the anonymity, 3 sets of samples were identified as A, B and C, corresponding to three different vintages, one old (A, prior to the 2000 vintage) and two younger ones (B and C). The first set of samples was composed of 2 bottles (A_{s1} and A_{s2}) which are expected to be used for top up leveling. The second set of samples, corresponding to suspicious bottles found on the market, was based on a single bottle for each of the two vintages (B_s and C_s). For each vintage, Château Mouton Rothschild provided a bottle of the authentic wine of their own cellar identified as A_a , B_a and C_a . In addition, Château Mouton Rothschild provided 3 sets of authentic bottles from different old vintages (prior to the 1980 vintage) identified as vintages N, N + 2 and N + 4 (5, 4 and 4 bottles, respectively).

To validate the ^1H NMR wine analysis method, twenty French wines were purchased commercially: a set of thirteen wines from South-West region (6 Médoc, 6 Libournais, and 1 Gascogne), a set of 4 wines from Burgundy region (2 Burgundy and 2 Beaujolais), 2 Loire Valley wines, and 1 Roussillon wine (Table S-1, supplementary data).

Usual Wine Analysis Methods

All these analysis were performed strictly following the official methods internationally recognized and referenced in the Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) compendium: alcoholic strength (ethanol) (OIV a), sugars (glucose, fructose, sucrose, glycerol) (OIV b), acidity (total and volatile acidity) (OIV c), volatile compounds (ethanal, ethyl acetate, methanol, butanol 2, propanol 1) (OIV d), organic acid concentration (tartaric, malic, succinic, lactic and gluconic acids) by high pressure capillary electrophoresis (HPCE) (OIV e), metal and trace metal analysis by inductive plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) (OIV f), ethanol deuterium analysis by ^2H NMR ((D/H)1 and (D/H)2) (OIV g), ethanol and wine carbone-13 (written, respectively, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{13}\text{C}$ wine) (OIV h) and wine oxygen-18 ($\delta^{18}\text{O}$) (OIV i) by isotope ratio mass spectrometry (IRMS). This isotope value corresponds to the ratio heavy/light element against an international standard computed according to $\delta^{A/A'}\text{X} = ([({}^{A/A'}\text{X})_{\text{sample}} / ({}^{A/A'}\text{X})_{\text{reference}}] - 1)$ where X is the studied element, A & A' denote higher and lower atomic mass number, respectively, of element X. Stable isotope ratios are expressed as multiple of 1000 (unit per mil ‰) because of the smallness of the measured values. Total and free sulphur dioxide (respectively SO_2T and SO_2L) (OIV j). These analyses were performed following quality control requirement (control cards, analytical standards and reference samples) to ensure the results accuracy.

^1H NMR Experiments

The method used for ^1H NMR analysis was reported in a previous article (Gougeon et al., 2018), with a slight modification concerning pH adjustment. Briefly, for each sample 120 μL of phosphate solution (1M, pH 2.6), 60 μL calibration solution (77 mM calcium formate, and 5 mM trimethylsilylpropanoic acid in D_2O) were added to 420 μL of previously centrifuged wine. The pH was fine-adjusted to 3.1 using a semi-automatic small scale system (BTpH, Bruker BioSpin, Germany) using a 1 M HCl solution. Finally, 550 μL of the solution were transferred in a 5 mm NMR tube.

^1H NMR spectra were manually recorded at 293 K on a 600 MHz Advance spectrometer (Bruker Biospin, France) operating at 600.27 MHz using a 5 mm TXI probe with Z-gradient coils. Two successive ^1H NMR experiments were used for the acquisition, the first one was a classical pulse program using pre-saturation to suppress water signal (ZGPR, TD = 65536, SW = 12019.23 Hz, RD = 5 s, AQ = 2.726 s, NS = 8, RG = 5.6, DS = 2). The second one was a ^1H NMR pulse sequence with water and ethanol signals suppression (NOESYGPPS1D, TD = 65536, SW = 12019.23 Hz, RD = 5 s, AQ = 2.726 s, NS = 32, RG = 64, DS = 4). NMR spectra were processed by using both Topspin® software (version 3.2, Bruker Biospin, Germany) and MestReNova® NMR software (version 11.0.3, Mestrelab Research, Spain). FIDs were multiplied with an exponential function (LB = 0.3 Hz) followed by Fourier transformation. Spectra were manually phased, aligned with the TSP signal shift to zero, and baselines were corrected automatically using MestReNova®. Semi-automatic quantification of thirty-eight molecules was performed with MestReNova® Simple Mixture Analysis (SMA) plugin. Global Spectral Deconvolution (GSD) (Cobas et al., 2011) was applied for peak deconvolution to ensure a good integration in a complex mixture.

Data Treatment

Comparisons between authentic and suspicious wines were performed using an adapted Z-score value approach, and a similarity score (S-score) was computed, for each analyte, according to:

$$S - \text{score} = \frac{C_S - C_A}{\sigma} \quad \text{Eq.1}$$

where C_S and C_A are, respectively, the concentration of a specific analyte of the suspicious sample and the authentic sample. σ , the measurement uncertainty, is computed applying the method uncertainty to the highest analyte concentration, C_A and C_S .

Unsupervised principal components analysis (PCA) was carried out using the FactoMineR plugin of R® software (version 3.5.0). The matrix was created with the normalized quantified data. The centered-reduced data were obtained in order to make the variables comparable.

Results and Discussion

As an introduction of this results and discussion part, a brief synopsis of the context of this study needs to be provided for the reader-comprehension: Château Mouton Rothschild requested usual wine analysis for the authentication of four wines of their estate. Additionally, all these samples were analyzed using ^1H NMR experiments. Face to the interest of this study, Château Mouton Rothschild gave us its authorization to publish this work with the restriction of vintage anonymity and analytical data confidentiality. For this reason, statistical data treatments have been presented for each set of sample identified as wine sets A, B and C (3 different vintages).

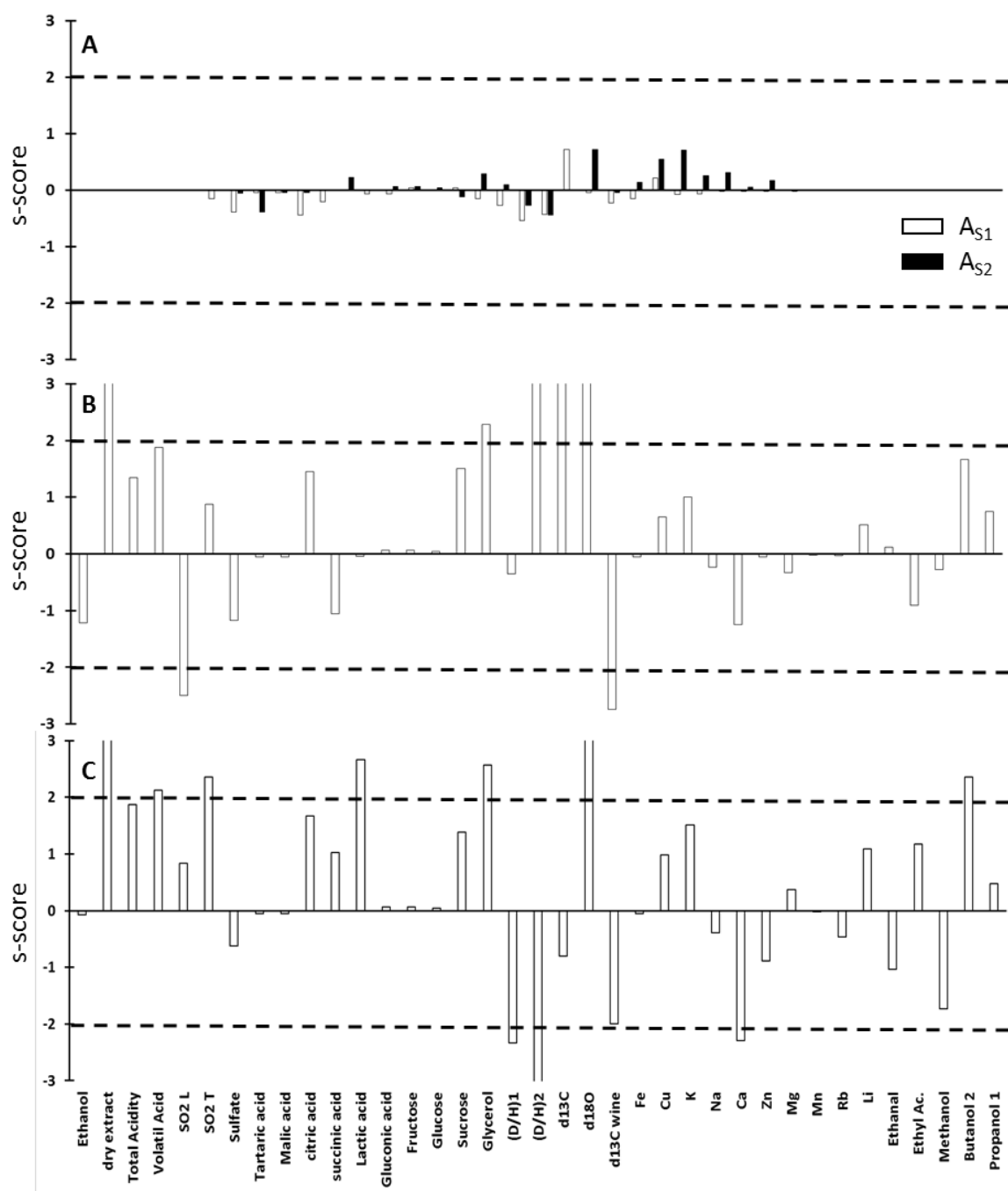


Fig 1 Graphical representation of the similarity score (S-score) values for the three wine sets calculated using usual analysis. Dashed lines correspond to the limit used for a discriminating factor. The ordinate scale has been voluntary limited to 3 and for this reason, open bars results of higher S-score values.

Usual Wine Analysis

The usual wine analyses were performed according to OIV official methods to measure the following parameters: alcoholic strength, sugars, volatile acidity, volatile compounds, organic acids, metals concentration, deuterium, carbone-13 and oxygen-18 stable isotope ratios. All these analyses were performed under quality control conditions and all the compounds were analyzed in a row with duplicates. Beside the accuracy of the measurements, the critical step is the comparison between two measurements and the limit to establish that two samples are different. In order to define a rational decision that can be used in any condition, a similarity score (S-score) computation (Eq. 1) was envisaged: the analytical results of the authentic wine are considered as the target value and the suspected wine as the variable; finally the analytical uncertainty applied to the higher concentration among authentic and suspected analytical measurements provided a value assimilated to the laboratories standard deviation. A S-score value higher than 2, which corresponds to a confidence interval of 95%, indicates a significant difference between the authentic and suspected wine. The graphical representations of these data treatments are grouped in Fig. 1.

The results concerning the wines planned for top up leveling (A_{s1} and A_{s2} samples) are presented in Fig. 1A. For the analyses, only 30 mL of each wine were provided by the estate. Because usual analyses require large volume of wines, only a limited number of parameters were determined for these samples: organic acids, sugars, metals concentration, deuterium, carbone-13, and oxygen-18 stable isotope ratios. No significant differences were detected between suspicious and authentic wines. All the S-scores appeared to be lower than 1 indicating that the suspicious wines were effectively from the estate and the announced vintage.

The data treatments of samples B and C are presented on Fig. 1B and 1C, respectively. One bottle of each wine was provided allowing a full analysis using these usual methods. For both samples, significant differences were observed for dry extract values, sulphur dioxide concentrations (SO_2L for B and SO_2T for C), ethanol $\delta^{13}C$ and (D/H)I ratios, total wine $\delta^{13}C$, and Fe contents. Additionally, oxygen-18 ratios were significantly different for B samples, just as (D/H)II ratio, Zn, gluconic acid, and methyl-2-butan-1-ol contents were for C samples. Some of these discriminant parameters can be directly related to aging process (volatile compounds, sulphite concentration) but others, like stable isotope ratios, organic acid (Suarez, Polo, & Llugano, 1979) and metal concentration do not evolve significantly with wine aging. Thus, it appears that suspicious wines do not correspond to the authentic samples provided by the vineyard estate.

1H NMR Wine Analysis

Usual wine analysis can often be time consuming, laborious and require a large volume of wine. Therefore, q-NMR method was applied to evaluate its ability to distinguish between authentic and counterfeit wines. The three wine sets were analyzed by q-NMR (Gougeon et al., 2018). The pH of the analyzed solution has a key role in 1H NMR as it can be source of chemical shift variation (Bharti & Roy, 2012). When the quantification is performed manually, fixing the pH is not a prerequisite; but, as far as the quantification is automatized, a chemical shift could make the quantification not be accurate. In this study, the pH was adjusted to 3.1 ± 0.1 using a semi-automatized system. After 10 min of acquisition, the 1H NMR spectra were obtained corresponding to the proton fingerprint of each wine sample. To illustrate the comparison between wine samples, a stack of the two 1H -NMR spectra of B samples is presented in Figure 2. The analysis of 1H NMR spectra allows the identification of many metabolites from different families such sugars, organic acids, amino acids, higher alcohols, or polyphenols (Consonni et al., 2011; Fotakis et al., 2013; Godelmann et al., 2016; López-Rituerto et al., 2012; Son, Hwang, Ahn, et al., 2009; Son, Hwang, Kim, Ahn, et al., 2009). For quantification the 1H NMR spectra were directly inserted in the data treatment software (MestReNova®) for molecules identification and quantification using Global Spectral Deconvolution method (GSD) (Cobas et al., 2011), allowing the semi-automatized quantification of 38 molecules listed in Table 1 (Gougeon et al., 2018). In Fig. 2, zooms on six particular proton resonances are shown highlighting possible discriminant signals between the both B wines: proline (δ_H 1.99 ppm), succinic acid (δ_H 2.62 ppm), myo-inositol (δ_H 4.05 ppm), shikimic acid (δ_H 6.81 ppm), and ethanal (δ_H 9.7 ppm).

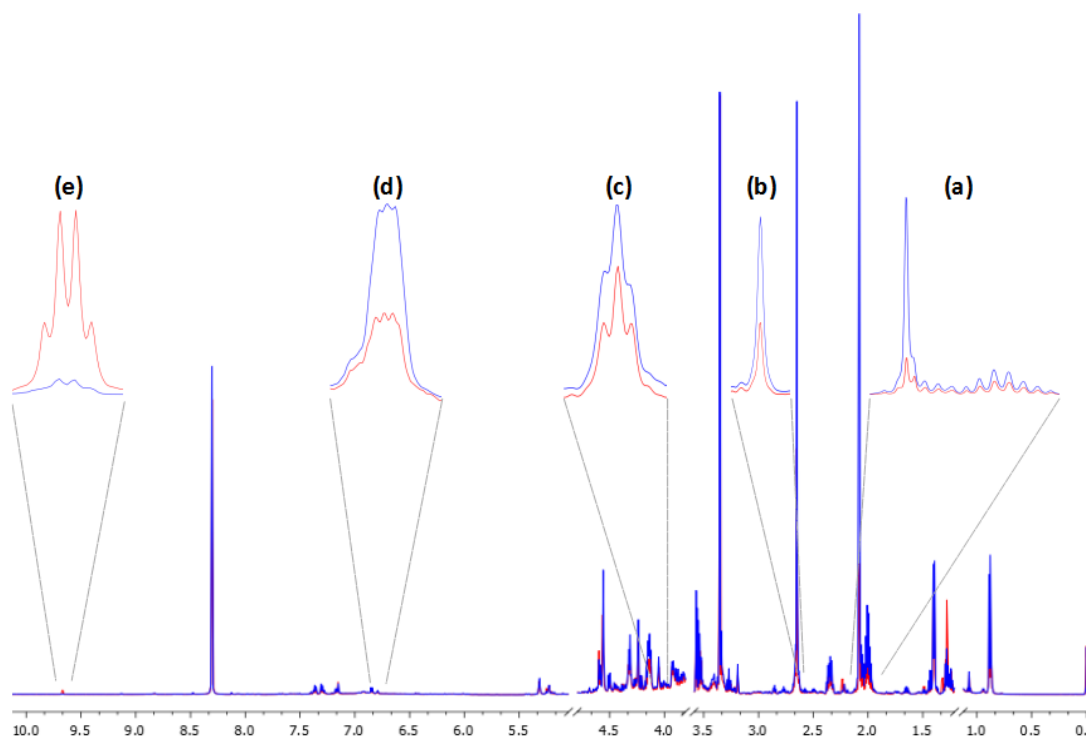


Fig 2 Differences observed in ^1H NMR spectra between suspicious (red) and authentic (blue) B wines. proline (a), succinic acid (b), myo-inositol (c), shikimic acid (d) and acetaldehyde (e). Water and ethanol regions were masked.

Because of the high sensitivity of ^1H NMR analysis (Gougeon et al., 2018), the question of wine evolution in bottle, particularly for old wines, is critical as two wines coming from the same production batch can evolve slightly differently even in similar conditions of aging. However, the precision of ^1H NMR measurements, along with the S-score criteria, can lead to consider significantly different two similar wines using only the measurement uncertainty. In order to consider a global aging uncertainty, Château Mouton Rothschild provided samples from the same batch and for three different old vintages allowing the estimation of aging impact on wine parameters. For each vintage the uncertainties were calculated for all the quantified compounds. The highest value for each molecule was considered as the uncertainty value due to wine evolution during aging. The results, listed on Table 1, show that the uncertainty among similar wines is way higher than the measurement uncertainty (Gougeon et al., 2018). This uncertainty can be as high as 30% for the so called “degradation products” such as ethyl acetate. These values have been considered as the method uncertainty values in the S-score computation.

The S-score values using q-NMR results of the three sets of suspicious wines are presented on Figure 3. Concerning the wines planned for top up leveling (A_{s1} and A_{s2} samples), the spread of the S-score obtained by q-NMR method (Fig. 3A) is greater than that observed in usual wine analysis even for similar compounds such as organic acids (Fig. 1A). This observation indicates that q-NMR is, in a way, too sensitive for wine comparison. Moreover, it could be also estimated that the proposed uncertainties (Table 1) are still too low to compensate q-NMR precision. Nonetheless, it appears that the S-scores of most of the quantified molecules are lower than 2, except for acetoin and acetic acid which are aging markers with an important variability. These results are in agreement with the previous conclusion established from classical analysis, i.e. that the two suspected wines are similar to the authentic wine. Comparison between S-score values obtained by usual methods and q-NMR shows some differences for some compounds quantified by the two methods. These differences are only due to the method sensitivity, particularly when the concentration are at the limit of quantification: as an example for glucose, the HPLC quantification limit is 0.5 g/L while for q-NMR, it is 0.1 g/L (Gougeon et al., 2018). Figure 4 presents the cross validation analysis based on the total number of S-scores higher than 2 between each analyzed wines. Only the similar wines, i.e. A sample ones, exhibit a total S-score lower than 4.

Table 1 Computed uncertainty applied to q-NMR results to determine the S-score between an authentic and a suspected wine.

	Compound*	Uncertainty (%)
1	2,3-butanediol	20
2	acetic acid	20
3	acetoin	20
4	alanine	20
5	ethanol	15
6	arabinose	20
7	arginine	15
8	catechin	20
9	choline	10
10	citric acid	10
11	epicatechin	20
12	ethanal	30
13	ethyl acetate	30
14	ethyl lactate	20
15	fructose	15
16	gallic acid	20
17	γ -aminobutyric acid	30
18	galacturonic acid	10
19	glucose	15
20	glycerol	15
21	Methyl-2 propanol 1	15
22	Methyl-3 butanol-1	20
23	lactic acid	30
24	malic acid	20
25	methanol	20
26	myo-inositol	10
27	phenylethyl alcohol	15
28	proline	15
29	shikimic acid	15
30	succinic acid	10
31	syringic acid	20
32	tartaric acid	20
33	Trans-caffeic acid	20
34	threonine	20
35	trigonelline	20
36	tyrosine	30
37	valine	30
38	xylose	30

* Abbreviation used in the publication: **Met2Prop1** for Methyl-2 Propanol-1; *Met3but 1* for Methyl-3 Butanol-1; GABA for γ -aminobutyric acid

Figure 3B and C present the S-scores for the wine sample sets B and C. In contrast to the A wine samples, many molecules (13 and 10 molecules for wine B and C, respectively) present a S-score higher than 2, which represents around 30% of the molecules identified. On this basis, the two suspected wines cannot be considered as authentic, which is in a good agreement with the interpretation based on the classical analysis. More specifically, contents in succinic acid, ethanal, myo-inositol, and isopentanol were found to be different in the B samples, whereas methanol, gallic acid, glucose, and threonine were found as different in the C samples. Additionally, proline, shikimic and succinic acids, and phenyl ethanol showed different values in the two wine sets. Shikimic acid and proline are well known as compounds whose contents are specific to each grape variety (Huang & Ough, 1989; Mardones et al., 2005). In this study, their concentrations are quite similar in the two authentic wines of lot B and C, and in the two suspect wines of these two lots. It would seem that fraudulent wines and authentic wines are not from the same grape variety.

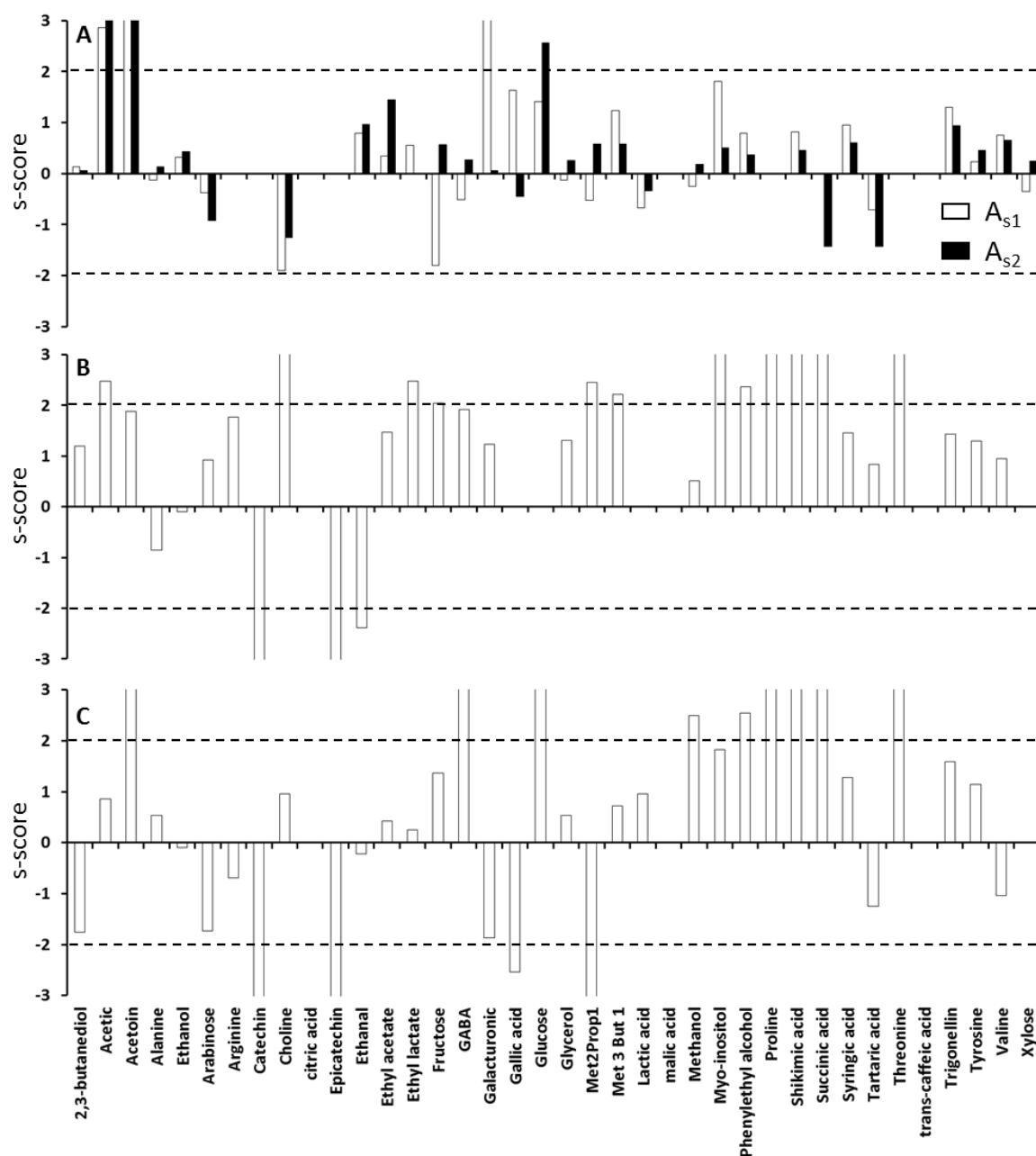


Fig 3 Graphical representation of the S-score values for the three wine sets calculated using q-NMR analysis. Dashed lines correspond to the limit used for a discriminating factor.

As a result and for coherence between data interpretation of usual wine analysis results and q-NMR results, a 4 S-score output has been arbitrary fixed as the limit indicating that 2 wines are significantly different in term of q-NMR analyzes.

In order to validate this S-score assumption, associated to q-NMR analysis for wines discrimination, twenty commercial wines (12 Bordeaux, 2 Burgundy, 2 Beaujolais, 2 Loire Valley, 1 Gascogne, 1 Roussillon) were analyzed using the q-NMR method. A validation analysis based on the total number of S-scores higher than 2 between these twenty wines was realized. The results are reported in the Figure 4. First of all, aside from two noted exceptions, all the wines are properly discriminated. The total S-scores were higher than five except for two Médoc wines (Medoc 5 and 6) and two Libournais ones (Libourne 1 and 2). It is not surprising that in the same vineyard some wines bear similar chemical profiles. These wines (the two Médoc and the two Libournais, respectively) were produced by close wineries from the same terroir and the same vintage (Table S-1). These

results illustrate the potential and the limitations of the q-NMR method combined to the total S-score calculation. Secondly, the total S-scores between wines from the same region (Bordeaux, Burgundy or Beaujolais) appear lower than those between wines from different area. Even if it is possible to distinguish wines from the same area in most cases, the wines from the same terroir have similar chemical signatures. This observation is illustrated in Fig. S-1 which represents the S-score values computed between the thirteen Château Mouton Rothschild's wines used for the uncertainty estimation taking into account the wine aging. The vintage interval between the three sets of samples is 2 years. Similarities are observable in-between the samples coming from the same vineyard but discrimination occurs for vintage gaps of 4 years.

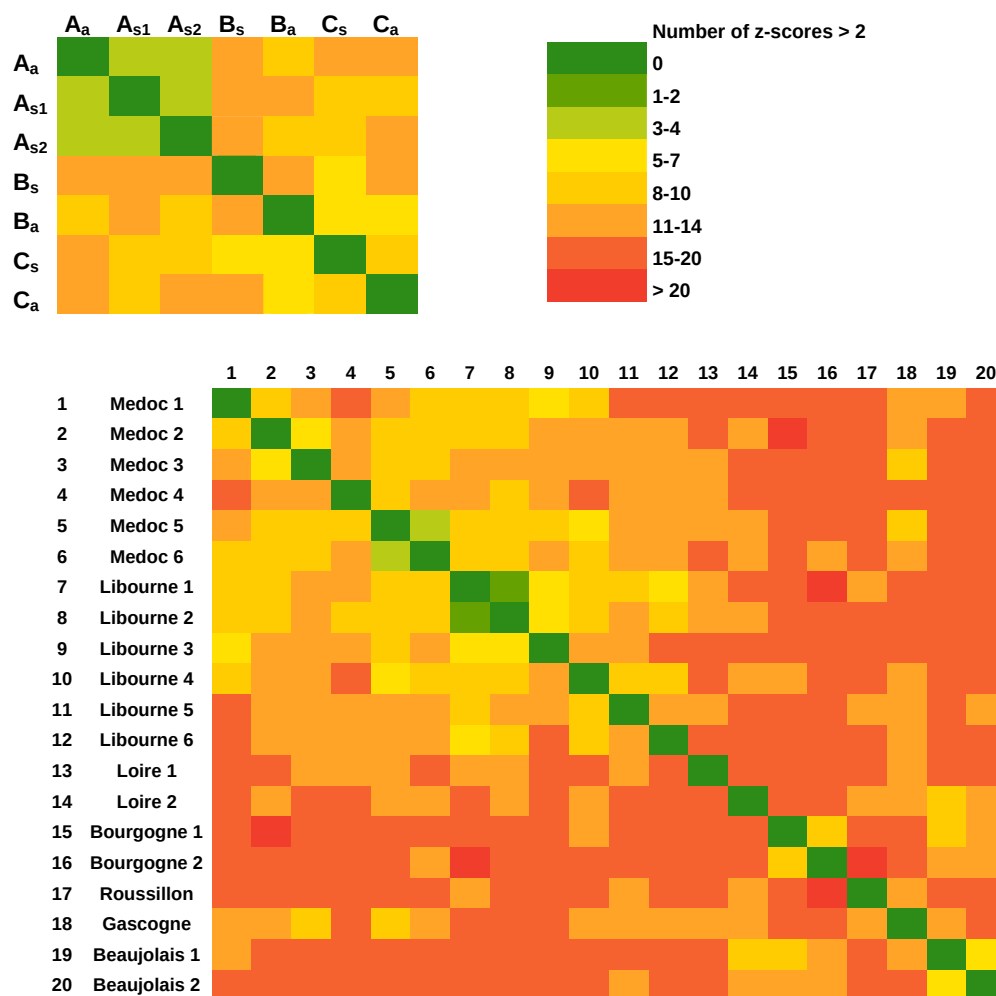


Fig 4 Cross validation of q-NMR method for wine discrimination based on total S-score. Top: Château Mouton Rothschild's wines; bottom: set of twenty commercial wines (6 Medoc, 6 Libournais, 1 Gascogne, 2 Burgundy, 2 Beaujolais, 2 Loire Valley, and 1 Roussillon).

Complementarity of Techniques

From these results, the two ways to approach the wine authenticity appear to be complementary: q-NMR bringing results on various polyols, polyphenols and protein fraction and usual analyses provide information on stable isotope, minerals concentration. The main advantages of q-NMR reside in the low volume required to perform the analysis (0.5 mL is needed for the analysis), and the easiness-of-processing.

In order to study the global information brought by the analysis, a principal component analysis (PCA) was performed on the 2 approaches results for the three sets of Château Mouton Rothschild's wines. The principal component analysis is presented on Figure 5. The data treatment provides a spatial representation which is similar for the 2 approaches. Moreover this representation confirms the conclusions presented before,

i.e. for A samples, a good correspondence between authentic wine (A_a) and suspicious ones (A_{s1} , A_{s2}), and significant differences between authentic and suspicious wines for sets B and C. The interest of PCA representation comes from the close positioning of authentic wines B_a and C_a . This observation is really interesting as it shows that an estate terroir and wine process provide wines with similar characteristics as far as the difference of vintage is not too important (in this case 2 years) because of aging affects wine components modifying the analytical characteristics of wines. As a result, wine A_a , that comes from a distinct year, is significantly different from wines B and C. The positioning of suspicious wines, B_s and C_s , seems to indicate that the same wine base has been used to elaborate them.

Conclusion

This real case study on wine authentication was performed using a multi-technique approach (so called usual wine analysis) and a q-NMR method. A similarity score, S-score, was developed in order to compare two wines, the authentic and the suspected one. This study showed that, using q-NMR results, four values of S-score higher than the absolute value of 2 indicate that the wines are significantly different. This limit was confirmed by the comparison among twenty commercial wines. When the comparison with authentic wine is not possible, q-NMR results can be difficultly exploitable for the authentication of a specific wine estate. Nonetheless, this study showed the complementarity of the information provided by the two approaches.

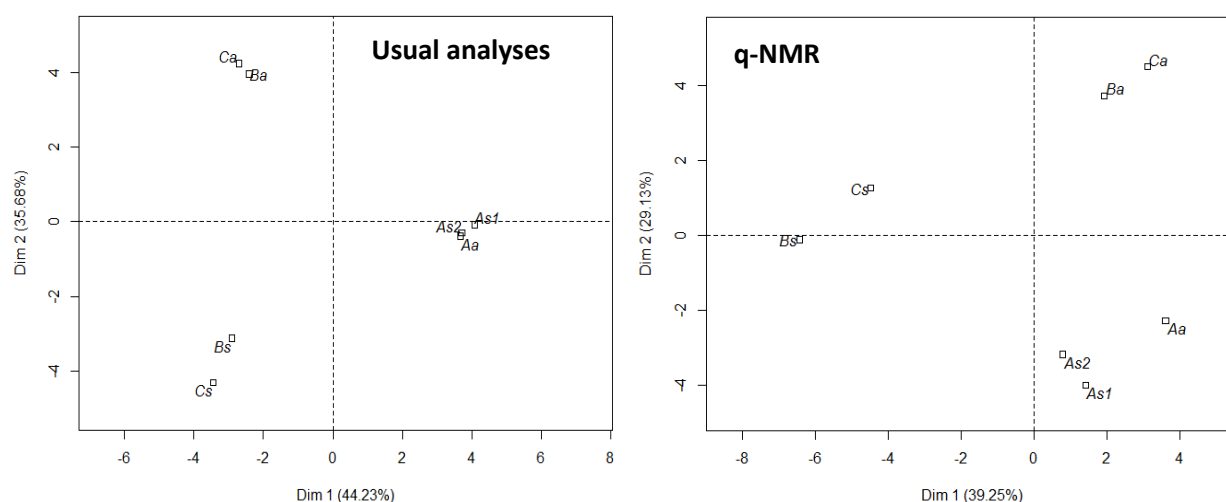


Fig 5 Scatter-plot of the scores generated from the two principal components, PC1 and PC2, obtained using analytical data from usual analysis in the left side and ^1H NMR wine spectra in the right side for the three wines set A, B and C.

Acknowledgments Château Mouton Rothschild is warmly thanked for their authorization to publish these results. The authors thanks the SCL's team of Bordeaux-Pessac for performing usual analysis: Laetitia Gaillard for stable isotope analyses, Ludovic Pottier, François Auger, Claude Roux, Nathalie Diet for ICP-AES, Carole Lagrèze and André Domez for HPCE, Rodolphe Robin, Maryse Viateau and Sebastien Raud for GC and standard wine analysis. Josep Valls-Fonayet (ISVV) is greatly acknowledge for his comments and advises.

Funding Information The authors thank the *Conseil Régional d'Aquitaine*, the *Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux* (CIVB), and FranceAgriMer program for their financial support in this research. The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest Louis Gougeon declares that he has no conflict of interest. Gregory Da Costa declares that he has no conflict of interest. Tristan Richard declares that he has no conflict of interest. François Guyon declares that he has no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed Consent Not applicable.

References

- Amargianitaki M, Spyros A (2017) NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4:. doi: 10.1186/s40538-017-0092-x
- Anastasiadi M, Zira A, Magiatis P, et al (2009) ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:11067–11074. doi: 10.1021/jf902137e
- Bharti SK, Roy R (2012) Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 35:5–26. doi: 10.1016/j.trac.2012.02.007
- Caruso M, Galgano F, Castiglione Morelli MA, et al (2012) Chemical Profile of White Wines Produced from ‘Greco bianco’ Grape Variety in Different Italian Areas by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Conventional Physicochemical Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:7–15. doi: 10.1021/jf204289u
- Cobas C, Seoane F, Domínguez S (2011) A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). 23:5
- Consonni R, Cagliani LR, Guantieri V, Simonato B (2011) Identification of metabolic content of selected Amarone wine. *Food Chemistry* 129:693–699. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.05.008
- Fotakis C, Kokkotou K, Zoumpoulakis P, Zervou M (2013) NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Research International* 54:1184–1194. doi: 10.1016/j.foodres.2013.03.032
- Godelmann R, Fang F, Humpfer E, 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:5610–5619. doi: 10.1021/jf400800d
- Godelmann R, Kost C, Patz C-D, et al (2016) Quantitation of Compounds in Wine Using ¹H NMR Spectroscopy: Description of the Method and Collaborative Study. *Journal of AOAC International* 99:1295–1304. doi: 10.5740/jaoacint.15-0318
- Gougeon L, Da Costa G, Ma W, et al (2018) Wine Analysis and Authenticity Using ¹H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. *Food Analytical Methods*. doi: 10.1007/s12161-018-1310-2
- Huang Z, Ough CS (1989) Effect of Vineyard Locations, Varieties, and Rootstocks on the Juice Amino Acid Composition of Several Cultivars. *Am J Enol Vitic* 40:135
- Larive CK, Barding GA, Dinges MM (2015) NMR Spectroscopy for Metabolomics and Metabolic Profiling. *Analytical Chemistry* 87:133–146. doi: 10.1021/ac504075g
- López-Rituerto E, Savorani F, Avenzoza A, et al (2012) Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using ¹H NMR Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:3452–3461. doi: 10.1021/jf204361d
- Mardones C, Hitschfeld A, Contreras A, et al (2005) Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. *Journal of Chromatography A* 1085:285–292. doi: 10.1016/j.chroma.2005.06.022
- Médina B, Salagoity MH, Guyon F, et al (2013) Using new analytical approaches to verify the origin of wine. In: *New Analytical Approaches for Verifying the Origin of Food*. Elsevier, pp 149–188

- OIV Compendium of international analysis of method: Alcoholic strength by volume. OIV-MA-AS312-01A. In: [www.oiv.int](http://www.oiv.int/public/medias/5158/oiv-ma-as312-01a.pdf). <http://www.oiv.int/public/medias/5158/oiv-ma-as312-01a.pdf>
- OIV Compendium of international analysis of method: Dosage of sugars in wine by HPLC. OIV-MA-AS311-03. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Volatile Acidity. OIV-MA-AS313-02. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Analysis of volatile compounds in wines by gas chromatography. OIV-MA-AS315-27. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Determination of the principal organic acids of wines and sulphates by capillary electrophoresis. OIV-MA-AS313-19. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Analysis of mineral elements in wines using ICP-AES (inductively coupled plasma / atomic emission spectrometry). OIV-MA-AS322-13. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Determination of the deuterium distribution in ethanol derived from fermentation of grape musts, concentrated grape musts, grape sugar (rectified concentrated grape musts) and wines by application of nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR/ RMN-FINS). OIV-MA-AS311-05. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Determination by isotope ratio mass spectrometry $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of wine ethanol or that obtained through the fermentation of musts, concentrated musts or grape sugar. OIV-MA-AS312-06. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Method for $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ isotope ratio determination of water in wines and must. OIV-MA-AS2-12. In: www.oiv.int
- OIV Compendium of international analysis of method: Sulfur dioxide. OIV-MA-AS323-04A. In: www.oiv.int
- Pauli GF, Gödecke T, Jaki BU, Lankin DC (2012) Quantitative ^1H NMR. Development and Potential of an Analytical Method: An Update. *Journal of Natural Products* 75:834–851. doi: 10.1021/np200993k
- Pereira GE, Gaudillere J, Van Leeuwen C, 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* 41:103
- Schlesier K, Faulstich C, Forina M, et al (2009) Characterisation and determination of the geographical origin of wines. Part I: overview. *European Food Research and Technology* 230:1–13. doi: 10.1007/s00217-009-1140-y
- Simmler C, Napolitano JG, McAlpine JB, et al (2014) Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current Opinion in Biotechnology* 25:51–59. doi: 10.1016/j.copbio.2013.08.004
- Smeyers-Verbeke J, Jäger H, Lanteri S, et al (2009) Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part II: descriptive and inductive univariate statistics. *European Food Research and Technology* 230:15–29. doi: 10.1007/s00217-009-1142-9
- Son H-S, Hwang G-S, Ahn H-J, et al (2009a) Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ^1H NMR spectroscopic data. *Food Research International* 42:1483–1491. doi: 10.1016/j.foodres.2009.08.006
- Son H-S, Hwang G-S, Kim KM, et al (2009b) Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using ^1H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1481–1490. doi: 10.1021/jf803388w
- Son H-S, Kim KM, van den Berg F, et al (2008) ^1H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8007–8016. doi: 10.1021/jf801424u
- Suarez M, Polo M, Llugano C (1979) Etude de la composition de vins mousseux pendant la prise de mousse au cours du vieillissement en bouteilles. I. Etude des acides amines libres, du glycerol, des sucres et des acides organiques. *Connaissance Vigne Vin* 199–217
- Viggiani L, Morelli MAC (2008) Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance: A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:8273–8279. doi: 10.1021/jf801513u

Supplementary material

Wine Authenticity by Quantitative ^1H NMR Versus Multitechniques Analysis: a Case Study

Louis Gougeon,¹ Gregory da Costa,¹ Tristan Richard,¹ François Guyon^{2,*}

1. Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, USC 1366 INRA, Unité de Recherche Œnologie, 210
chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon, France
2. Service Commun des Laboratoires, 3 avenue du Dr. Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France

* Corresponding author: guyonfra@gmail.com

List of Supplementary Material

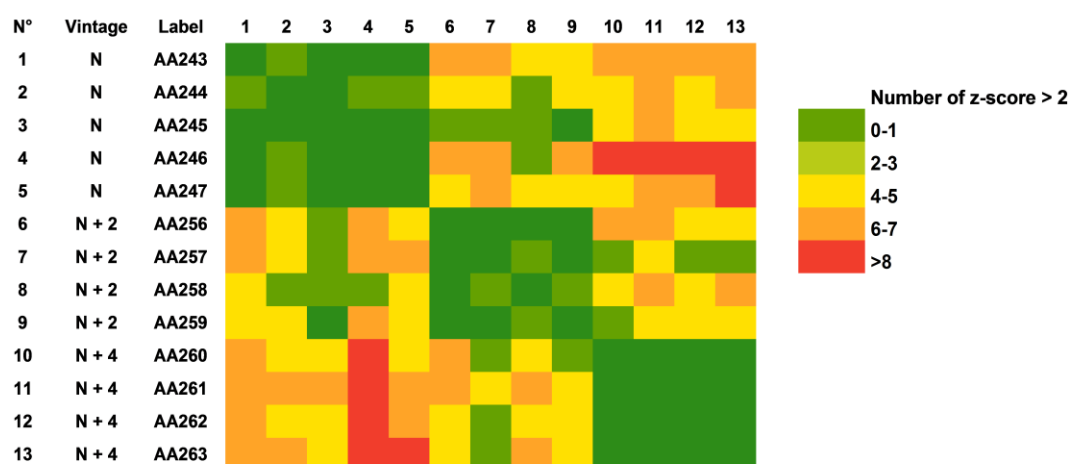
Table S1 Information related to the samples analyzed by q-NMR and used to validate the S-score level describing a significant difference between two wines.

Figure S1 Cross discrimination based on total s-score of the thirteen Château Mouton Rothschild's wines (3 sets of authentic bottles from different old vintages: N, N + 2 and N + 4) provided to determinate the uncertainty value due to wine evolution during aging.

Table S1 Information related to the samples analyzed by q-NMR and used to validate the S-score level describing a significant difference between two wines.

	Sample	PDO	Vintage
1	Médoc 1	Médoc	2011
2	Médoc 2	Haut-Médoc	2011
3	Médoc 3	St Estèphe	2011
4	Médoc 4	Haut-Médoc	2012
5	Médoc 5	Haut-Médoc	2012
6	Médoc 6	Haut-Médoc	2012
7	Libournais 1	Pomerol	2011
8	Libournais 2	Saint-Émilion grand cru	2011
9	Libournais 3	Pomerol	2011
10	Libournais 4	Saint-Émilion	2012
11	Libournais 5	Montagne Saint-Émilion	2012
12	Libournais 6	Pomerol	2012
13	Loire 1	Chinon	2011
14	Loire 2	Touraine	2012
15	Bourgogne 1	Pernand-Vergelesses 1er cru	2012
16	Bourgogne 2	Beaune Grèves 1er cru	2011
17	Roussillon	Côtes du Roussillon Villages	2012
18	Gascogne	Côtes de Gascogne	2012
19	Beaujolais 1	Moulin-à-Vent	2011
20	Beaujolais 2	Moulin-à-Vent	2011

Fig. S1 Cross discrimination based on total s-score of the thirteen Château Mouton Rothschild's wines (3 sets of authentic bottles from different old vintages: N, N + 2 and N + 4) provided to determinate the uncertainty value due to wine evolution during aging.



4. Principaux résultats

Dans ce Chapitre, il a été démontré que la technique d'analyse des vins par RMN ^1H permet d'émettre un jugement de valeur concernant leur authenticité. L'étude démontre que l'empreinte chimique obtenue suite à l'analyse par RMN ^1H peut permettre l'observation de différences ou de similitudes entre deux vins aussi bien que les méthodes officielles, malgré la diversité des composés dosés par les deux approches. Cette méthode pourrait s'insérer dans un processus officiel d'authentification des vins, permettant de juger rapidement et de manière fiable si l'échantillon analysé est suspicieux ou non. En tant que méthode d'analyse préliminaire, elle pourrait orienter le jugement sur la nécessité de réaliser des analyses supplémentaires, plus coûteuses en volume et en temps.

La difficulté dans l'interprétation des résultats d'un test de conformité est due à la matrice vin et à la stabilité des composés analysés. Un même vin, dont les conditions de stockage ont été différentes, peut voir sa signature chimique être modifiée, dans une proportion telle que l'interprétation des résultats s'en trouve biaisée. C'est dans ce but que de nouvelles incertitudes ont été calculées, non pas liées à la technique, mais aux modifications naturellement observables dans plusieurs bouteilles d'un même vin relativement âgé. Malgré l'estimation de nouvelles incertitudes correspondant mieux à l'évolution naturelle d'un vin, les résultats de s-score de quatre métabolites des vins du lot A ont vu leur valeur être supérieure à 2, indiquant des différences significatives entre les vins suspects et authentiques. Pour définir le nombre de déviations acceptables entre deux vins identiques, un ensemble de vins commerciaux a été analysé. Ces travaux montrent que deux vins pourront être considérés comme authentiques si le nombre de déviations est inférieur ou égal à quatre.

Il y a néanmoins une nécessité de déterminer quelles molécules sont stables dans le temps, et ce peu importe les conditions de stockages, pour ainsi pouvoir émettre un jugement fiable et robuste. Dans ce sens, l'authentification des vins par RMN ^1H se doit d'être complémentaire des analyses officielles, dont l'examen d'authenticité se base sur des paramètres jugés comme étant très stables, et donc très fiables. Des paramètres tels que l'oxygène 18 ou le carbone 13 sont par exemple très représentatifs d'une cuvée, et leur interprétation ne laisse que peu de place au doute. Néanmoins, dans le cas de millésimes très âgés, il peut se poser le problème de l'homogénéité des lots. En effet, avant 1973, la mise en bouteille des vins n'était pas faite par les propriétaires vigneron mais par les négociants, avant que n'éclate le scandale du *Winegate* (Lecat et al., 2017). Pis, l'embouteillage était même parfois réalisé à même la barrique. La possibilité de juger de manière erronée un vin non-conforme par comparaison avec une bouteille authentique est réelle, et ce même suite aux analyses officielles.

La réalisation des deux techniques, RMN ^1H et la série d'analyses officielles, permet tout de même d'augmenter la fiabilité et de confirmer le résultat observé suite à une analyse unique, que ce soit celle par RMN ^1H ou celles effectuées par le SCL. Il y a donc une vraie complémentarité entre les deux méthodes, la RMN pouvant rapidement donner un aperçu des similitudes ou des différences entre deux

échantillons. Les autres analyses viennent confirmer ou infirmer ces premières tendances si le doute est encore présent.

A notre connaissance, aucune étude n'avait auparavant réalisé ce genre de comparaison. L'authenticité des vins par RMN ^1H à la suite de la comparaison entre une bouteille suspecte et celle authentique semble pouvoir être une réalité dans un cadre de détection des contrefaçons. Les contrefaçons sont aussi commises à plus grande ampleur en termes de volume, et la comparaison avec une bouteille authentique n'est pas toujours possible. Dans ce sens, la confection d'une base de données couplée à des analyses statistiques semble indispensable afin de déterminer si l'empreinte spectrale d'un ensemble de vins présente des spécificités communes. Ceci rendrait possible l'authentification d'un vin grâce à la comparaison de son spectre à un ensemble de spectres de vins de la même origine, du même cépage ou du même millésime.

Chapitre III :

*La RMN ^1H appliquée aux vins
rouges de Bordeaux*

1. Stratégie

La capacité de la méthode d'analyse des composés majoritaires du vin développée lors de cette thèse à pouvoir juger de la conformité d'un vin a été démontrée dans le second Chapitre. Par comparaison avec la bouteille authentique, elle permet de donner une conclusion similaire à celle rendue à la suite des analyses officielles classiques. Cependant, en cas d'absence de la bouteille originale, il est nécessaire d'étudier le potentiel de la technique à authentifier un vin suspicieux à l'aide d'une base de données. Dans le premier Chapitre, une première approche de classification des vins a été exposée. Des vins commerciaux chinois ont été classés avec succès en fonction de leurs cépages, de leurs origines, mais plus difficilement selon le millésime ou le domaine de production.

Plusieurs études ont montré que la RMN ^1H était capable de distinguer des vins. Ces études ont été menées partout dans le monde, plus particulièrement en Europe et en Asie, mais aucune n'a porté sur le cas particulier des vins français, et très peu sur des vins issus du commerce, dont les paramètres de production ne sont pas connus.

Dans ce troisième Chapitre, une étude permettant de caractériser les vins français, et plus particulièrement les vins de Bordeaux a été menée. Si par le passé le vignoble bordelais était surtout connu pour la qualité de ses vins blancs, c'est bien pour la typicité de ses vins rouges qu'il est aujourd'hui mondialement reconnu. L'étude présentée dans ce Chapitre s'inscrit dans une démarche de compréhension du terroir bordelais et de la notion de qualité des vins de Bordeaux. L'objectif est de déterminer à quel point la technique RMN ^1H peut permettre de discriminer des vins commerciaux dont les conditions de production seront propres à chacune des unités de production, et si les vins d'une même région de production présentent un métabolome suffisamment homogène leur permettant de se différencier les uns des autres. L'influence du cépage est discutée, pour l'ensemble des vignobles français mais aussi au sein du vignoble bordelais, tout comme la classification des vins par millésimes.

2. Présentation des travaux

2.1. Présentation du terroir bordelais

Le vignoble Bordelais s'étend sur 111 000 ha répartis de part et d'autre de l'estuaire de la Gironde, de la Garonne, et de la Dordogne. On y distingue les régions du Médoc, du Blayais-Bourgeais, des Graves, du Sauternais, de l'Entre-Deux-Mers, et du Libournais (Figure 13). Les sols qui les composent sont variés, pouvant être calcaires, argileux ou graveleux selon les caractéristiques des sous-sols dont ils sont issus. Le macroclimat bordelais est qualifié de tempéré océanique et influe sur le mésoclimat qui varie dans les différentes régions selon l'altitude du vignoble, son exposition, l'inclinaison de sa pente, ou encore la présence de grandes étendues d'eau. Ce terroir est propice à la culture de raisins rouges et blancs, dont la répartition varie selon les caractéristiques de chaque appellation. Aujourd'hui,

le vignoble est destiné majoritairement à la production de raisins rouges, qui couvrent 88% de la surface (Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux, n.d.), dont l'encépagement est majoritairement composé de Merlot (66%), Cabernet sauvignon (22,5%), et Cabernet franc (9,5%).

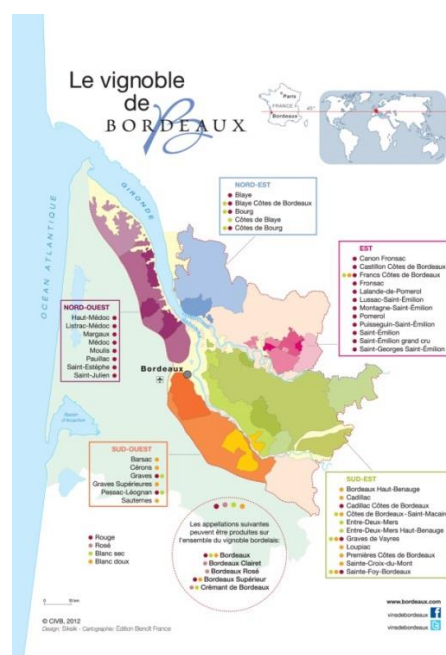


Figure 13. Carte du vignoble de Bordeaux (CIVB).

2.2. Développement d'une base de données

Les résultats présentés dans ce Chapitre s'inscrivent dans un projet plus large pour lequel nous avons développé une base de données vins (Figure 14). L'application permettant de gérer la base a été développée avec la société MunData®. L'intérêt de cette base de données est double : i) le stockage des données quantitatives obtenues par diverses techniques analytiques et ii) la comparaison des vins enregistrés dans la base. Pour chaque vin, toutes les indications qualitatives relatives à son origine, son assemblage, son millésime sont renseignées, ainsi que toutes les données quantitatives recueillies par RMNq. L'intégration de données issues d'autres techniques analytiques est également possible. Au sein de cette base de données, un outil a été développé (Figure 14), permettant la comparaison rapide d'un vin avec un autre vin ou un ensemble de vins aux caractéristiques spécifiques contenus dans la base (par exemple, tous les vins rouges du Médoc de 2012). Actuellement, elle contient 819 vins, majoritairement rouges, français et relativement jeunes (Figure 15). Elle est sécurisée, interne au laboratoire, et les données ne peuvent en aucun cas être diffusées à l'extérieur du laboratoire sans être préalablement codées.

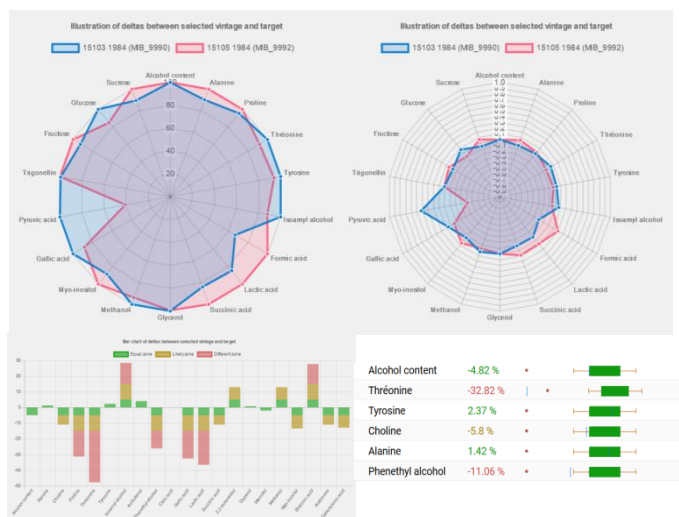
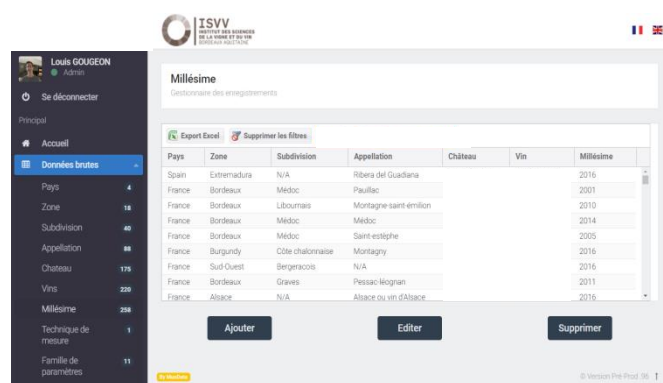


Figure 14. Illustrations de la base de données développée : visualisation des paramètres renseignés pour chaque échantillon et exemples d'applications de l'outil de comparaison des vins.

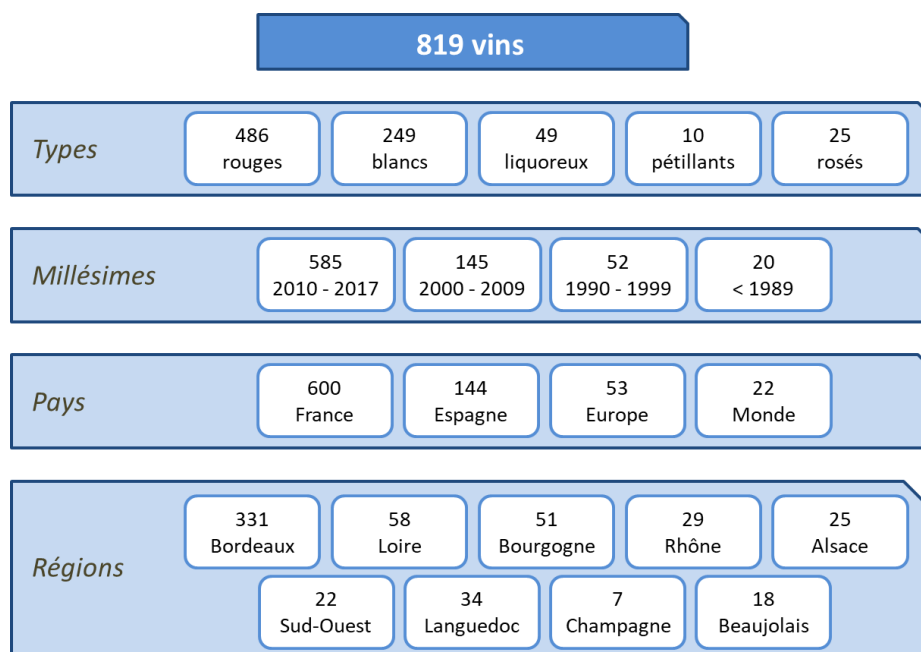


Figure 15. Répartition des vins contenus dans la base de données.

2.3. Sélection des échantillons

Dans l'étude présentée dans le premier Chapitre, les conditions peuvent être décrites comme semi-contrôlées, les vins étant tous monocépages et de mêmes domaines de production, mais les pratiques viti-vinicoles restent propres à chaque domaine. Dans la présente étude, ce sont deux cent vingt-quatre vins rouges commerciaux qui ont été analysés (Tableau 12), avec comme seuls a priori l'indication géographique et le millésime. Les six grandes régions productrices françaises sont représentées : Bordeaux (n=127), Beaujolais (n=15), Bourgogne (n=20), Côtes du Rhône (n=20), Languedoc-Roussillon (n=24), et Vallée de la Loire (n=18).

Tableau 12. Répartition des échantillons selon leurs origines et leurs millésimes.

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
Bordeaux	8	10	7	12	8	6	10	15	23	10	7	7	4		127
<i>Génériques</i>						1	1	1	3	1		4	4		15
<i>Blaye - Bourg</i>		1									2	2			5
<i>Entre-deux-Mers</i>				1		1	2	1	1		1	1			8
<i>Graves</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	3	1				16
<i>Libournais</i>	2	3	2	6	2		3	4	10	3	1				36
<i>Médoc</i>	5	5	4	4	4	2	2	8	8	3	2				47
Beaujolais								3		3	2	1	2	4	15
Bourgogne	1		1	2		1	1	2	4	1	5	1	1		20
Côtes du Rhône				1	2		2			3	9	2	1		20
Languedoc-Roussillon							2		6	4		4	8		24
Vallée de la Loire							1	2	2	3	6	3	1		18
Total	9	10	8	15	10	7	16	22	35	24	29	18	17	4	224

3. Publication

Ces résultats ont fait l'objet de l'article suivant : *¹H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines*, soumis dans le journal *Food Chemistry* le 18 février 2019.

¹H NMR Metabolomics Applied to Bordeaux Red Wines

Louis GOUGEON¹, Gregory DA COSTA¹, François GUYON², Tristan RICHARD^{1,*}

1. Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, USC 1366 INRA, Unité de Recherche Œnologie, 210 chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon, France.
2. Service Commun des Laboratoires, 3 avenue du Dr. Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France.

* Corresponding author:

Phone: (+33)5557575957

Email address: tristan.richard@u-bordeaux.fr

Abstract

Bordeaux wines are unchallenged leaders of overall exports of French Protected Designation of Origin, and therefore they are subjected to counterfeiting. q-NMR metabolomics has already demonstrated its potential for classifying wines of different geographical origins, grape varieties, or vintages. This study focuses on the characterisation of Bordeaux red wines, seeking to discriminate them from others produced in the major French wine regions. A sampling of 224 commercial French wines was analysed by ¹H NMR and forty compounds were quantified. Non-supervised and supervised statistical analyses revealed a singular imprint of Bordeaux wines in comparison with other French wines, with classification rates ranging from 71% to 100%. Within the Bordeaux vineyards, red wines from the different Bordeaux subdivisions were analysed from different vintages. Our results indicate that q-NMR metabolomics enables the differentiation of Médoc and Libournais vineyard highlighting the most discriminant constituents. In addition, the effects of wine evolution during bottle aging and vintage on Bordeaux red wines were pointed out and discussed.

Keywords Wine classification; red wines; Bordeaux wines; q-NMR; multivariate statistics

Highlights

- 224 French red wines were analysed by ¹H NMR and 40 metabolites were quantified.
- Non-supervised and supervised statistical analyses were performed.
- Classification of wines from six French Protected Designation of Origin were obtained.
- Classification of Bordeaux subdivisions was investigated.
- The effects of aging were pointed out and discussed.

Introduction

According to the Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB), Bordeaux wines are unchallenged leaders of overall exports of French Protected Designation of Origin (PDO) in 2016, representing 39% of the total volume and 46% of the total value. In total, there are nearly sixty PDO in Bordeaux, distributed in five main subdivisions: Médoc, Graves, Libournais, Entre-deux-Mers, and Blaye-Bourg. Three-quarters of the vineyard are destined for the cultivation of red grapes. Merlot is the main red cultivar followed by Cabernet Sauvignon and Cabernet Franc, to which minor red grape varieties such as Malbec, Petit Verdot or Carmenere are added. The goal of this work is to identify specific chemical markers allowing to characterize Bordeaux red wines. Specific fingerprintings of Bordeaux red wines were investigated by comparison with wines from others French regions, and classification was refined in order to establish distinctions also among Bordeaux wines.

With the rise of metabolomics, many studies have been focussed on wine classification combining quantitative analytical data with advanced mathematical and statistical techniques (Geana, Popescu, Costinel,

Dinca, Ionete, Stefanescu, et al., 2016). To achieve this goal different instrumental approaches could be used including liquid and gas chromatographies coupled with different type of detectors such as infrared spectroscopy, mass spectroscopy, Raman spectroscopy, ultra-low radioactivity or NMR (Médina, Salagoity, Guyon, Gaye, Hubert, & Guillaume, 2013). For over ten years now, quantitative ^1H NMR spectrometry (q-NMR) has been the object of numerous developments concerning foods and beverages analysis (Bharti & Roy, 2012; Pauli, Gödecke, Jaki, & Lankin, 2012), and enological practices in particular (Amargianitaki & Spyros, 2017; Hong, 2011). Depending on the objectives, the classifications focused on grape varieties, geographic origin, vintage (Anastasiadi, Zira, Magiatis, Haroutounian, Skaltsounis, & Mikros, 2009; Godelmann, Fang, Humpfer, Schütz, Bansbach, Schäfer, et al., 2013) or winemaking techniques (López-Rituerto, Cabredo, López, Avenzoza, Busto, & Peregrina, 2009; Mazzei, Spaccini, Francesca, Moschetti, & Piccolo, 2013). This versatile and high resolution technic provides quickly access to the simultaneous determination of several wine constituents without pretreatment. Together with multivariate statistical techniques, q-NMR has become a recognized technique for wine traceability whose effectiveness has been confirmed by several scientific publications (Godelmann, et al., 2013; Gougeon, Da Costa, Le Mao, Ma, Teissedre, Guyon, et al., 2018; Gougeon, Da Costa, Richard, & Guyon, 2019; López-Rituerto, Savorani, Avenzoza, Busto, Peregrina, & Engelsen, 2012; Papotti, et al., 2013; Son, Hwang, Kim, Ahn, Park, Van Den Berg, et al., 2009).

In the present study, red wines from main French DPO (Bordeaux, Beaujolais, Burgundy, Côtes du Rhône, Languedoc-Roussillon and Loire Valley) and different vintages (2004 to 2017) were investigated by q-NMR spectroscopy coupled to multivariate statistical analysis. In the context of blended wines such Bordeaux wines, we evaluated the ability of q-NMR to discriminate: (i) Bordeaux wines from the other French PDO, (ii) Bordeaux appellations. In addition, the effects of wine evolution during bottle aging and vintage on Bordeaux red wines were investigated.

Material and Methods

Sample collection

A total of 224 commercial French red wines from 2004 to 2017 vintages were collected. Their classification is shown on Table S1. Six french wine-producing regions are represented: Bordeaux (n=127), Beaujolais (n=15), Burgundy (n=20), Côtes du Rhône (n=20), Languedoc-Roussillon (n=24) and Loire Valley (n=18). Inside Bordeaux sampling, six subdivisions are distinguished: Generic (n=15), Blaye-Bourg (n=5), Entre-deux-Mers (n=8), Graves (n=16), Libournais (n=36) and Médoc (n=47). Wines were stored at 4°C and analysed under a week after bottle opening.

Sample preparation

Wine samples were prepared according to our previous work (Gougeon, et al., 2018). Briefly, after centrifugation, 420 μL of wine were directly mixed with 120 μL of phosphate solution (1M, pH 2.6), and 60 μL of a D_2O solution containing trimethylsilylpropanoic acid sodium salt (TSP) were used as the frequency reference and calcium formate was used as internal standard for quantitation. The pH was fine-adjusted to 3.1 using a semi-automatic small scale system (BTpH, Bruker BioSpin, Germany) using a 1M HCl solution.

^1H NMR spectra acquisition

^1H NMR spectra acquisitions were performed on a 600 MHz spectrometer (Bruker BioSpin). NMR analysis was carried out at a constant temperature of 293°K. Three pulse sequences were used to collect the spectra, as described in a previous study (Gougeon, et al., 2018). The number of sampling points was 64 K using a 20.0229 ppm spectral width. The relaxation delay was set to 5 s and the sampling time was set to 2.726 s.

^1H NMR spectra post-acquisition treatments

All ^1H NMR spectra were aligned thanks to TMPS signal ($\delta = 0$ ppm). An exponential weighting function corresponding to 0.3 Hz line broadening was applied before applying Fourier transformation using Topspin® software (version 3.2, Bruker Biospin, Germany). Phase correction was performed manually to have the greatest

reproducibility (Bharti & Roy, 2012). Baseline correction was performed automatically with MestReNova® NMR software (version 11.0.3, Mestrelab Research, Spain)

Compound quantification

Forty compounds were identified on the ^1H NMR spectra (Table S2). Quantitation was performed semi-automatically on the MestReNova using the plugin Simple Mixture Analysis (SMA). Validation method, LOD, LOQ, CV was described in our previous study (Gougeon, et al., 2018).

Chemometrics

For statistical analysis, the data were normalized and then introduced into RStudio 1.1.447 and BioStatFlow 2.8.3 for pattern recognition. Principal components analysis (PCA) was performed to visualize the acquired data and observe the discrete trend between samples. To create a more reasonable model, partial least squares discriminant analysis combined to orthogonal signal correction filters (OSC-PLS-DA) was performed to sharpen the separation between observations groups (Wehrens, 2011). OSC-PLS-DA is also helpful to understand which component carries the class separating information, in addition with one-way ANOVA. The quality of the OSC-PLS-DA model was indicated by R^2Y and Q^2 metrics. The R^2Y describes the percentage of variation explained by the model and Q^2 indicates the predictive ability of the model (Worley & Powers, 2013). The performance of models was evaluated by internal leave one-out cross validation (LOOCV) (Riedl, Esslinger, & Fauhl-Hassek, 2015).

Results and discussion

French wines are the products of different terroirs, grape varieties and viti-vinicultural practices. In this study, 224 French commercial wine samples mainly from Bordeaux area ($n=127$) and from others French wine-producing regions ($n=97$) were analysed by ^1H NMR metabolomics. ^1H NMR spectra were acquired similarly to our previous article with only a slight adjustment concerning pH control (Gougeon, et al., 2018). Compounds were quantified by targeted analysis using the Global Spectral Deconvolution method (GSD) (Cobas, Seoane, Domínguez, Sykora, & Davies, 2011), allowing the semi-automatized quantification of forty molecules listed in Table S2. Multivariate analyses were used to discriminate the wine key features concerning their geographical origins, grape varieties or vintages. For wine separation, PCA was performed and followed by OSC-PLS-DA to create a more reasonable regression model. Orthogonal signal correction is a PLS-based data filtering technique that removes the uncorrelated information, and consequently it is more exclusively focussed on the variables of interest (Gavaghan, Wilson, & Nicholson, 2002). In addition, the model predictivity was evaluated by internal leave one-out cross validation (LOOCV). In the LOOCV procedure, each training set is created by randomly taking all the samples except one and the test set is the sample left out. Thus, for N samples, N different training sets and N different test sets are created. Each sample is predicted once, which provides a conservative estimate of the prediction ability of the PCA model (Forina, Lanteri, Casolino, & Oliveri, 2004).

Classification of Bordeaux versus French wines

The 127 Bordeaux wine samples from six different appellations (Bordeaux generic, Blaye and Bourg, Entre-deux-Mers, Graves, Libournais, and Médoc) and from thirteen different vintages (ranged from 2004 to 2016) were compared to the 97 wines from other French geographic areas (Beaujolais, 15; Burgundy, 20; Côtes du Rhône, 20; Languedoc-Roussillon, 24; Loire Valley, 18) from different vintages (ranged from 2004 to 2017) by OCS-PLS-DA (Figure 1). A tendency to discriminate Bordeaux wines from other French wines is clearly observed (R^2Y and Q^2 value of 0.75 and 0.82, respectively) despite the wide range of vintages analysed. Most Bordeaux red wines are located in negative PC1 values, whereas others French wines are placed in positive PC1 values (Figure 1A). To quantify the predictive ability of the model, the leave one-out cross validation (LOOCV) was used. The overall correct classification of the wine origin for Bordeaux wines versus French wines is near 95% (Table S3). This highlights the specificity of Bordeaux red wines in comparison to all other French wines. As shown in Figure 1C, Bordeaux red wines contain more proline (mean, 1.4; range, 0.5–4.1 g/L), phenethyl alcohol (mean, 98; range, 58–143 mg/L), succinic acid (mean, 1.8; range, 1.3–2.7 g/L), gallic acid (mean, 125; range, 69–182 mg/L), arabinose (mean, 0.3; range, 0.0–0.6 g/L), galacturonic acid (mean, 1.8; range, 0.4–3.1

g/L), methanol (mean, 181; range, 54–365 mg/L) and isopentanol (mean, 242; range, 132–366 mg/L). On the contrary, they contain less lactic acid (mean, 0.7; range, 0.4–1.0 g/L), caffeic acid (mean, 3; range, 0.0–22 mg/L), ethyl lactate (mean, 85; range, 16–183 mg/L) and 2,3-butanediol (mean, 363; range, 217–655 mg/L) than others French wines.

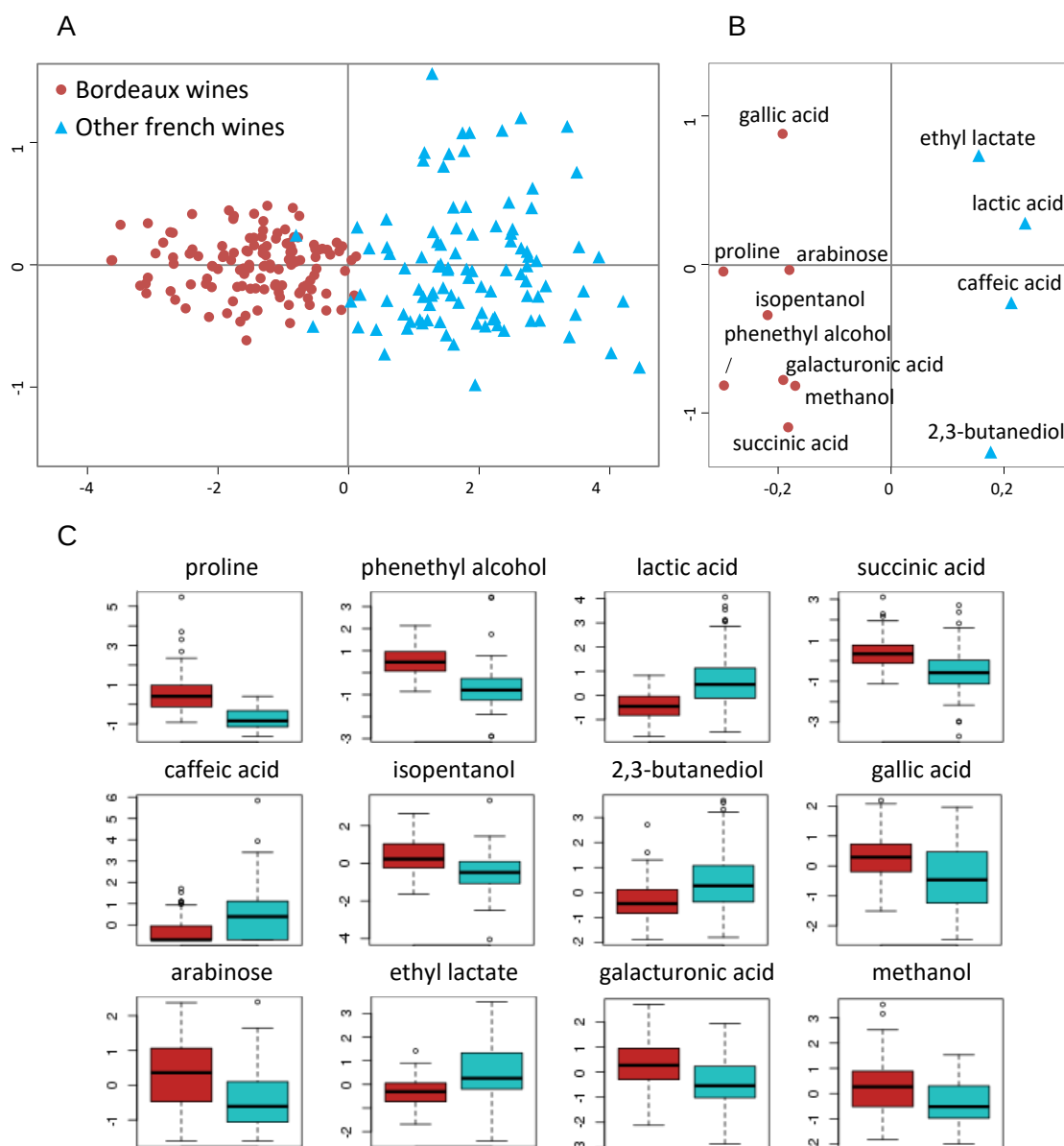


Fig. 1 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 12 most discriminant parameters based on q-NMR normalized data from Bordeaux (red, n=127) versus other French regions (blue, n=97) red wines (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.82$ and $R^2Y = 0.75$).

Many of these compounds, such as proline, phenethyl alcohol, gallic acid or succinic acid could be directly or indirectly associated to grape variety. Proline is one of the most abundant amino acid in grape and wine. Its content in wine was correlated to grape varieties (Son, Kim, van den Berg, Hwang, Park, Lee, et al., 2008). Cabernet Sauvignon and Merlot, which are the main varieties of Bordeaux region, are known to be rich in proline (Huang & Ough, 1991). Phenethyl alcohol is a highly aromatic alcohol synthesized by bacteria, fungi, and yeasts from L-phenylalanine (Etschmann, Sell, & Schrader, 2003). Its content in wines depends of alcoholic fermentation but also on L-phenylalanine level in grapes. Son et al. already highlighted that phenethyl alcohol

could be a chemical marker of grape variety (Son, et al., 2008). They found higher contents in Cabernet Sauvignon wines than in Shiraz wines. But not only the grape variety influences the content of phenethyl alcohol, the same authors also observed significantly higher phenethyl alcohol levels in Cabernet Sauvignon wines produced in Australia than in those produced in France or in South Korea. Gallic acid has been observed to discriminate against wines grape variety (Hu, Yue, Zhu, Wen, Zhang, & Hardie, 2015). In particular, in agreement with our results, it has been shown that Cabernet Sauvignon wines contain high levels of gallic acid (Zhu, Hu, Lu, & Xu, 2018). Succinic acid is produced by yeasts during fermentation from sugar or amino acids (Coulter, Godden, & Pretorius, 2004). It was pointed out as a discriminant factor of grape variety (Hu, Yue, Zhu, Wen, Zhang, & Hardie, 2015).

As for succinic acid, the contents of some compounds could be associated to the influence of different factors. Low lactic acid levels observed on Bordeaux wine suggest an indirect climate influence. Lactic acid is produced by malolactic fermentation from malic acid which is directly linked to the ripeness of the grape berry, so to climate (Lonvaud-Funel, 1999). Caffeic acid has already been identified as a discriminative factor for wines made from vines treated by different cultural processes (De Pascali, Coletta, Del Coco, Basile, Gambacorta, & Fanizzi, 2014). Wines from cover crop vines had higher levels of caffeic acid than vines that had undergone soil tillage. It would seem that cultural practices are potentially responsible for the differences observed in our case. Finally, methanol, galacturonic acid, and arabinose are present in high levels specifically in Bordeaux wines (Figure 1C). These three compounds are connected with skin degradation on the must. Indeed, galacturonic acid and arabinose are two of the building blocks of pectins, which form the skin berry (Müller-Maatsch, Bencivenni, Caligiani, Tedeschi, Bruggeman, Bosch, et al., 2016). Methanol is produced through pectin hydrolysis by enzymes (Revilla & González-SanJosé, 1998). This observation suggests a pre-fermentation process effect on Bordeaux red wines. A possible explanation can be the will of produce long-keeping wines, which means an extended maceration to extract the maximum content of polyphenols. So there is a set of factors that configure the specificity of Bordeaux red wines including grape varieties, climate and winemaking practices.

To confirm that Bordeaux wines have a singular fingerprinting, pairwise comparisons between Bordeaux wines and those of the others French wine-producing regions were performed by unsupervised statistical analysis (PCA) as shown on Figure 2. Biplots indicate separation and the overall correct prediction rates for Bordeaux wines were ranged between 71 to 100%, for Languedoc and Burgundy wines, respectively (Table S3). These estimates are comparable with those observed by Godelmann et al. (2013), where geographical origin of wines from five German production areas could be predicted 89% correctly in average, with rates ranging from 59 to 100% (Godelmann, et al., 2013).

The grape variety, independently from vintage, seems to be one of the main discriminative factors between Bordeaux wines and those of other French wine-producing regions. Bordeaux wines were produced with major parts of Cabernet Sauvignon and Merlot, whereas wines from other French regions were produced with different varieties: Pinot noir for Burgundy, Gamay for Beaujolais, and Cabernet Franc for Loire Valley wines. Role of grape varieties in wine discrimination was already proved in several studies (Anastasiadi, Zira, Magiatis, Haroutounian, Skaltsounis, & Mikros, 2009; Fan, Zhong, Fauhl-Hassek, Pfister, Horn, & Huang, 2018; Son, et al., 2008). Nevertheless, wines from regions using the same varieties than Bordeaux, such as Languedoc, were discriminated. Cultural and fermentation practices seem to have also an important role concerning wine classification. As previously mentioned, some discriminant compounds could be directly or indirectly linked to these practices such as caffeic acid, methanol, galacturonic acid, and arabinose.

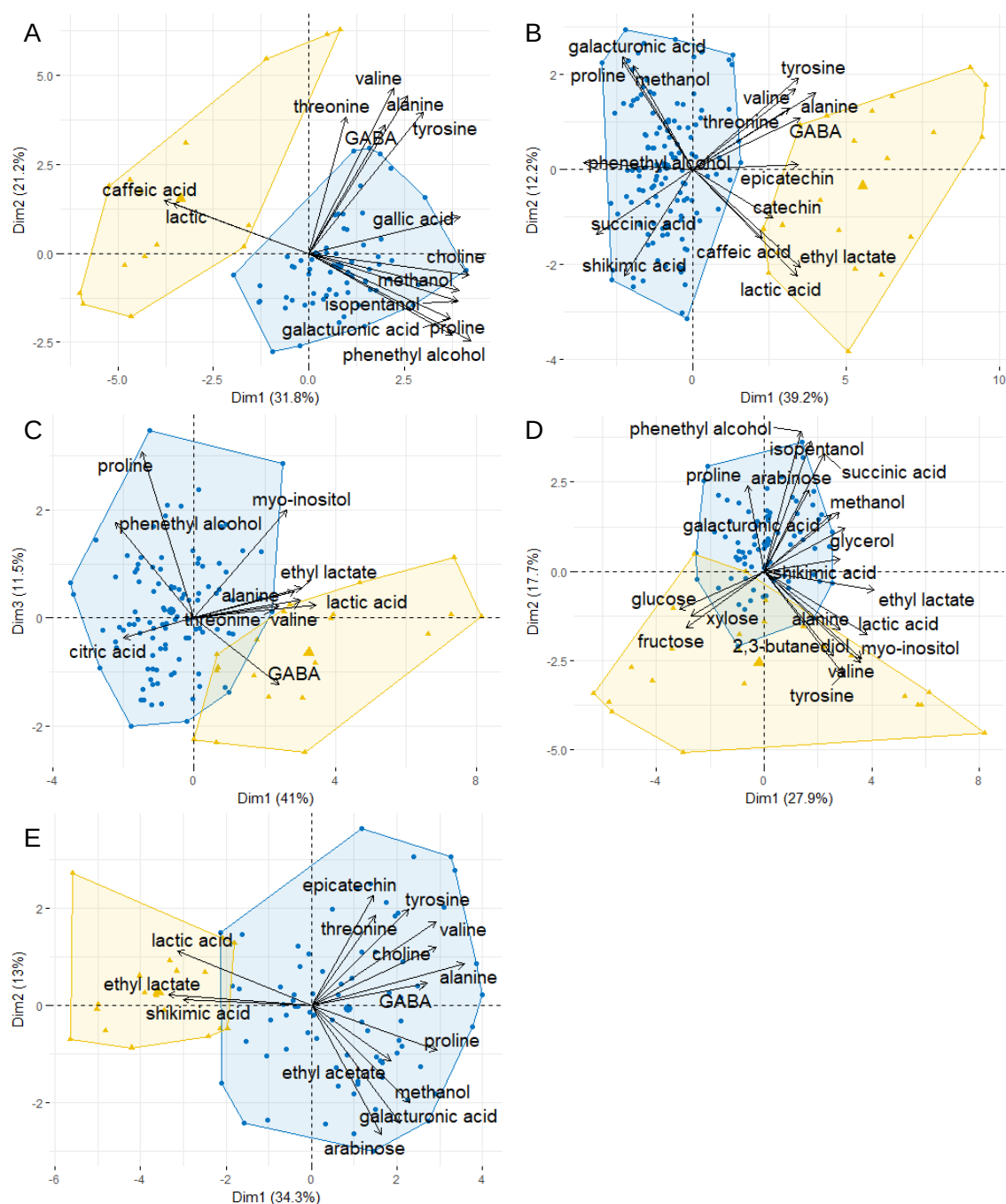


Fig. 2 Principal component analysis (PCA) score-plot based on q-NMR data of Bordeaux red wines (blue, n=127) and versus those from (A) Beaujolais (n=15), (B) Burgundy (n=20), (C) Côtes du Rhône (n=20), (D) Languedoc-Roussillon (n=24), and (E) Loire Valley (n=18).

Comparison of Bordeaux appellations

In order to investigate Bordeaux wines, NMR metabolomics was used to discriminate wines from different subdivisions of Bordeaux (Graves, Libournais and Médoc). In addition, the effect of wine aging in bottle and vintage were investigated on these 127 Bordeaux wine samples.

Geographic origin Bordeaux vineyard can be expanded in five main subdivisions: Blaye and Bourg, Entre-deux-Mers, Graves, Libournais and Médoc. These areas differ with respect to their soil, mesoclimate and grape varieties. To examine the capacity of NMR combined to multivariate statistical analysis to distinguish subdivisions, the Bordeaux wine samples from Graves (n=16), Libournais (n=36) and Médoc (n=47) areas and different vintages (ranged from 2004 to 2014) were compared.

Initially, PCA was performed over all of the wines from the three appellations (Figure S1). On one hand, the PCA score plot between the three appellations showed separation by the first principal component, with overlapping of the Graves samples, resulting in low predictability. The statistical analysis revealed that Graves wines are not discriminated neither from Libournais nor Médoc wines. These data seem to preclude the discrimination of Graves wines from the two others Bordeaux appellations. On the other hand, unsupervised classification suggests a trend to distinguish between Libournais and Médoc. To confirm this observation, an OSC-PLS-DA was performed only with data created with Libournais and Médoc wines. Results are shown in Figure 3. The OSC-PLS-DA score plots revealed clear separation between Libournais and Médoc wines with high values of R^2Y and Q^2 , of 0.77 and 0.68, respectively. The model was further validated using LOOCV. The mean overall correct classification of Médoc versus Libournais wines was 85% (83 and 87% for Médoc and Libournais, respectively) (Table S4). Among the discriminant parameters Médoc wines contained more shikimic and lactic acids but less proline and ethanol (Figure 3).

Average concentration of shikimic acid was 69 mg/L (range 23-95 mg/L) in Médoc wines whereas, in Libournais wines, average concentration was 20 mg/L (range 0-55 mg/L). Shikimic acid is a phenolic compound identified as a chemical marker of grape varieties (Godelmann, et al., 2013). Even if the Bordeaux wines are blended from different grape varieties, Cabernet Sauvignon is the dominant variety in Médoc PDO's and Merlot Libournais appellation. It has been reported that shikimic acid levels in Cabernet Sauvignon wines are higher than in Merlot wines (Mardones, Hitschfeld, Contreras, Lepe, Gutiérrez, & von Baer, 2005). Our results are in agreement with this observation. Concerning the proline contents, they reached 2.0 g/L on average (range 1.1-4.1 g/L) in the Libournais wines against 1.3 g/L (range 0.5-1.9 g/L) in the Médoc ones. Huang et al. have shown that Merlot contained more proline than Cabernet Sauvignon, with 1.4 and 0.8 g/L in a Merlot and Cabernet Sauvignon grape juice, respectively (Huang & Ough, 1991). This result is also in agreement with the distribution of grape varieties in the two areas. Both shikimic acid and proline levels suggest a grape variety effect on the observed wines discrimination. Concerning lactic acid, our results indicate that Médoc wine contain more lactic acid (mean, 0.73; range, 0.55–1.02 g/L) than Libournais ones (mean, 0.57; range, 0.39–0.77 g/L). As mentioned previously, lactic acid contents can be linked to malic acid levels in grapes, so indirectly linked with grape ripeness. The ethanol contents observed are consistent with this hypothesis. Ethanol levels are significantly lower in Médoc wines (mean 12.6, range 11.2-13.6%) than in Libournais wines (mean 13.4, range 12.3-14.4%). Therefore, it would seem that the combination of grape varieties, climate and cultural practices contributed to discriminate these close geographical designations.

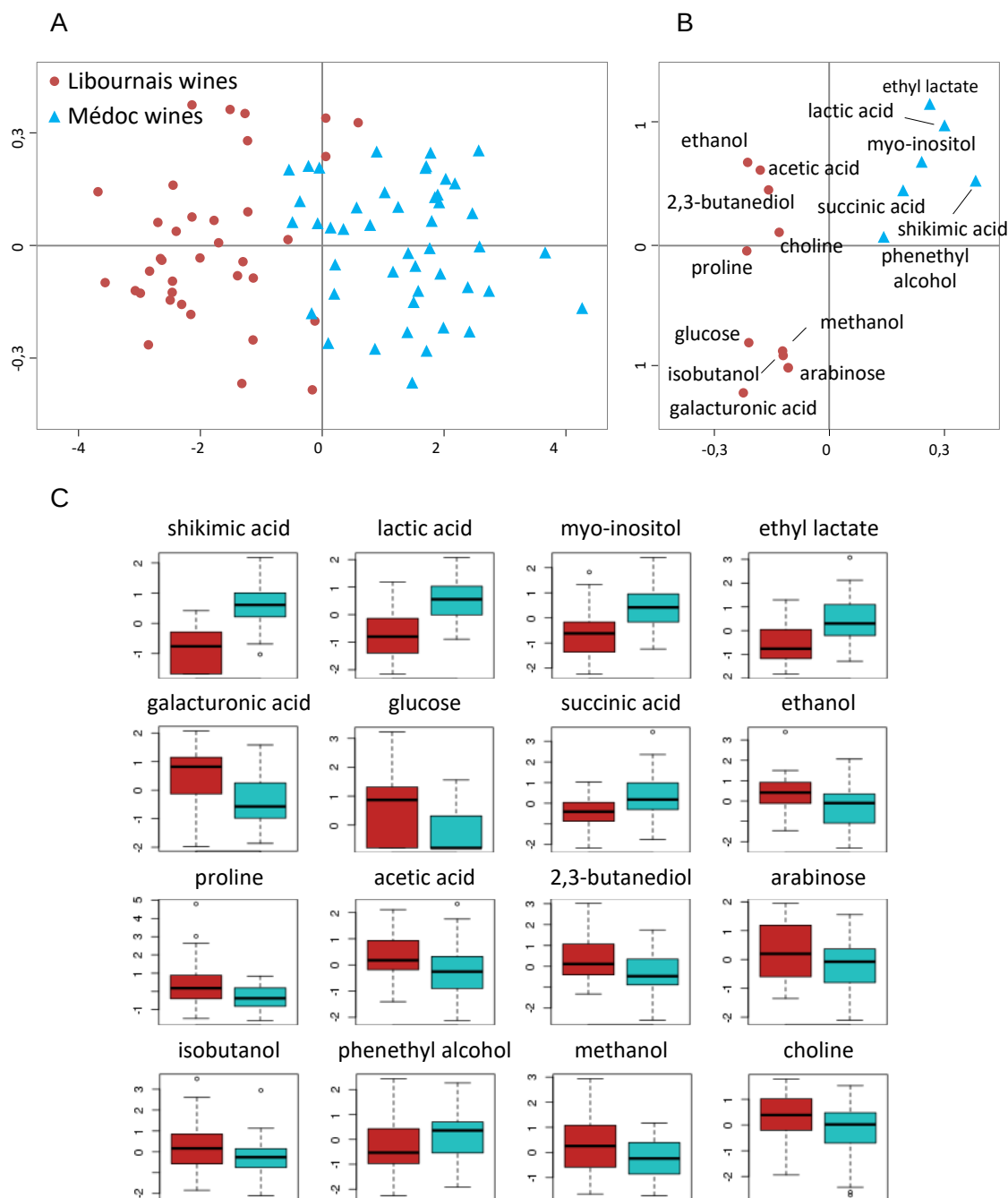


Fig. 3 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 16 most discriminant parameters based on normalized q-NMR data from Libournais (red, n=36) versus Médoc (blue, n=47) samples (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.68$ and $R^2Y = 0.77$).

Wine aging and vintages To observe the effects of vintage and wine evolution during bottle aging, the NMR-data of the Bordeaux red wines (n=127) obtained from thirteen different vintages (2004 to 2016) were analysed. First, to observe the influence of wine aging independently of vintage, the youngest wines (n=28, vintages 2013 to 2016) were compared to the oldest wines (n=37, vintages 2004 to 2007) by OSC-PLS-DA (Figure 4). The analysis revealed a clear separation among the two groups with R^2Y and Q^2 values of 0.75 and 0.78, respectively. The main compounds responsible for these differences are xylose, epicatechin, catechin, tyrosine and citric acid which are more present in young wines, and ethyl acetate, ethyl lactate, fructose, caffeic acid, syringic acid,

succinic acid and shikimic acid which are more present in older wines (Figure 4C). Among the compounds responsible for the discrimination of the wines some could be directly connected to wine evolution during aging in bottle. Catechin and epicatechin are involved in a series of polymerization reactions with different compounds inducing a decrease of the free-compounds during aging due to precipitation. Similarly to our results, Cassino et al. observed the same pattern for xylose with a decrease during wine aging in bottles and an increase of esters (ethyl acetate and ethyl lactate) (Cassino, Tsolakis, Bonello, Gianotti, & Osella, 2018). These results indicate a clear evolution during bottle aging that will influence the discrimination between wines at a given point in time in addition to the differences between vintages.

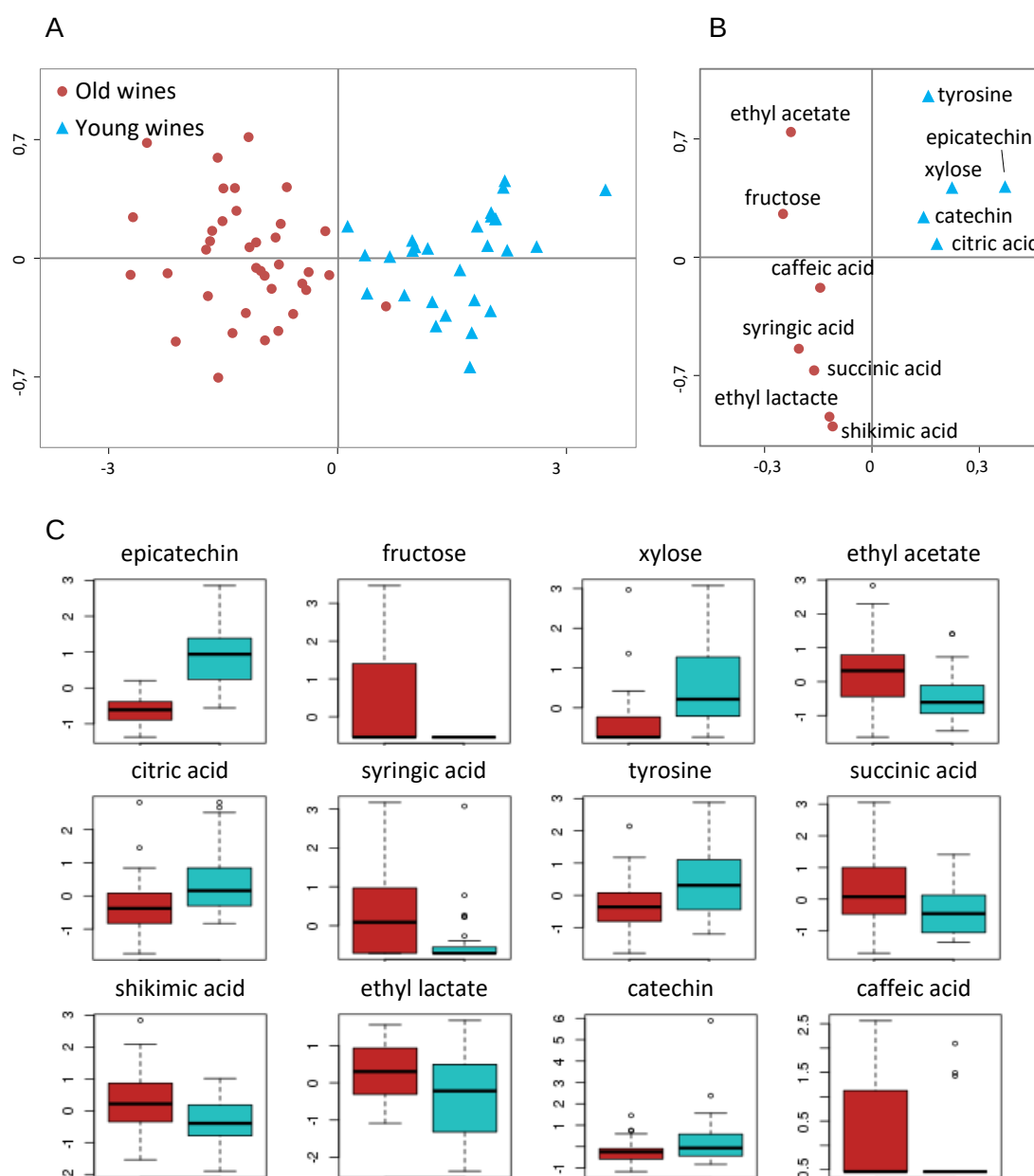


Fig. 4 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 12 most discriminant parameters based on q-NMR normalized data from young vintages (red, 2013 to 2016, n=28) versus old ones (blue, 2004 to 2007, n=37) of Bordeaux red wines (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.75$ and $R^2Y = 0.78$).

In order to observe the specific effects of wine evolution and vintage, the six different vintages with more than ten wine samples were submitted to multiple statistical approaches (2005, $n=10$; 2007, $n=12$; 2010, $n=10$; 2011, $n=15$; 2012, $n=23$ and 2013, $n=10$). Vintages were pairwise compared by OSC-PLS-DA to sharpen the observed separations and followed by cross-validations using LOOCV. Figure 5 shows the comparison between 2010 and 2011 vintages. OSC-PLS-DA was able to separate these vintages ($R^2Y = 0.81$ and $Q^2 = 0.83$) giving a mean overall correct classification of 75% (70 and 80% for 2010 and 2011, respectively (Table S5)). The same procedure was applied to compare one vintage to another (Table S5) giving overall correct classifications ranging from 59% (2012 versus 2013) to 100% (2005 versus 2010). Overall, it could be noted that the more vintages are distinct the higher are the classification scores. The average correct classification percentages of 2005 and 2007 vintages versus the other ones (2010 to 2013) are 87 and 90%, respectively. In contrast, these percentages are reduced to 61 and 59% for comparisons between 2010 versus 2011 and 2012 versus 2013, respectively. This could be due to the wine evolution during bottle aging at a given point in time, as previously mentioned. A wide span of time between vintages facilitates their distinction.

To reduce the effect of wine aging in bottle and investigate the specific effect of vintage, the four successive vintages 2010 to 2013 were analysed. Compared to 2011, 2010 vintages presented more sugars and 2,3-butanediol, but less tyrosine, threonine, alanine, catechin, xylose and lactic acid (Figure 5). In Bordeaux, 2010 was a good year for viticulture, with a weather allowing good grape ripeness, which could be an explanation for upper level of sugars and lower level of lactic acid compared to wines from 2011. High levels of amino acids on 2011 could be explained by more rainfall inducing greatest roots absorption. In the same manners levels of amino acids and xylose in 2011 wines were increased in comparison to those of 2012 (Figure S2). Moreover, glycerol, isobutanol and ethyl acetate are negatively correlated to wines from 2012 vintage, but lactic acid, catechin, epicatechin and 2,3-butanediol are positively correlated. Finally, 2013 was a bad vintage in Bordeaux inducing grape ripeness difficulties highlighted by low values of technologic ripeness parameters such as sugars to acids ratio. Discriminative variables of 2013 wines compared to wines from 2012 are low levels of ethanol, which confirm low sugars levels, and myo-inositol (Figure S3). In addition, high malic acid levels confirm the bad technological ripeness. All these observations confirm the climatic influence on wine discrimination between successive vintages.

Conclusion

In this study, 224 commercial wines produced in the six major French wine regions were analysed using ^1H NMR experiments and multivariate analysis. Forty compounds were quantified by conventional targeted analysis. Advanced data analysis and chemometrics allowed the discrimination of wines on different levels. Bordeaux wines present a singular brand in comparison to the five other major French producing areas. Despite the differences within each geographical designation, NMR spectrometric analyses coupled to multivariate approaches allow the discrimination of a specific area. In addition, the analysis shows that it is possible to discriminate the two major Bordeaux sub-regions Libournais and Médoc. The grape variety composition alone does not explain all the differences observed. Soil and viticultural practices also have a significant influence, as evidenced by the chemical diversity of the molecular markers that discriminate these wines. Moreover, the differentiation of wines from different vintages is made possible in a relatively limited geographical area such as Bordeaux wines by combination of different factors including wine aging and climatic influences. Two successive vintages could be distinguished using specific markers of vitivinicultural conditions. In addition, the wine evolution during bottle aging induces the variation of some specific markers such as polyphenolic compounds. Nevertheless, the analysis during aging merit further study to monitor the wine evolution over time.

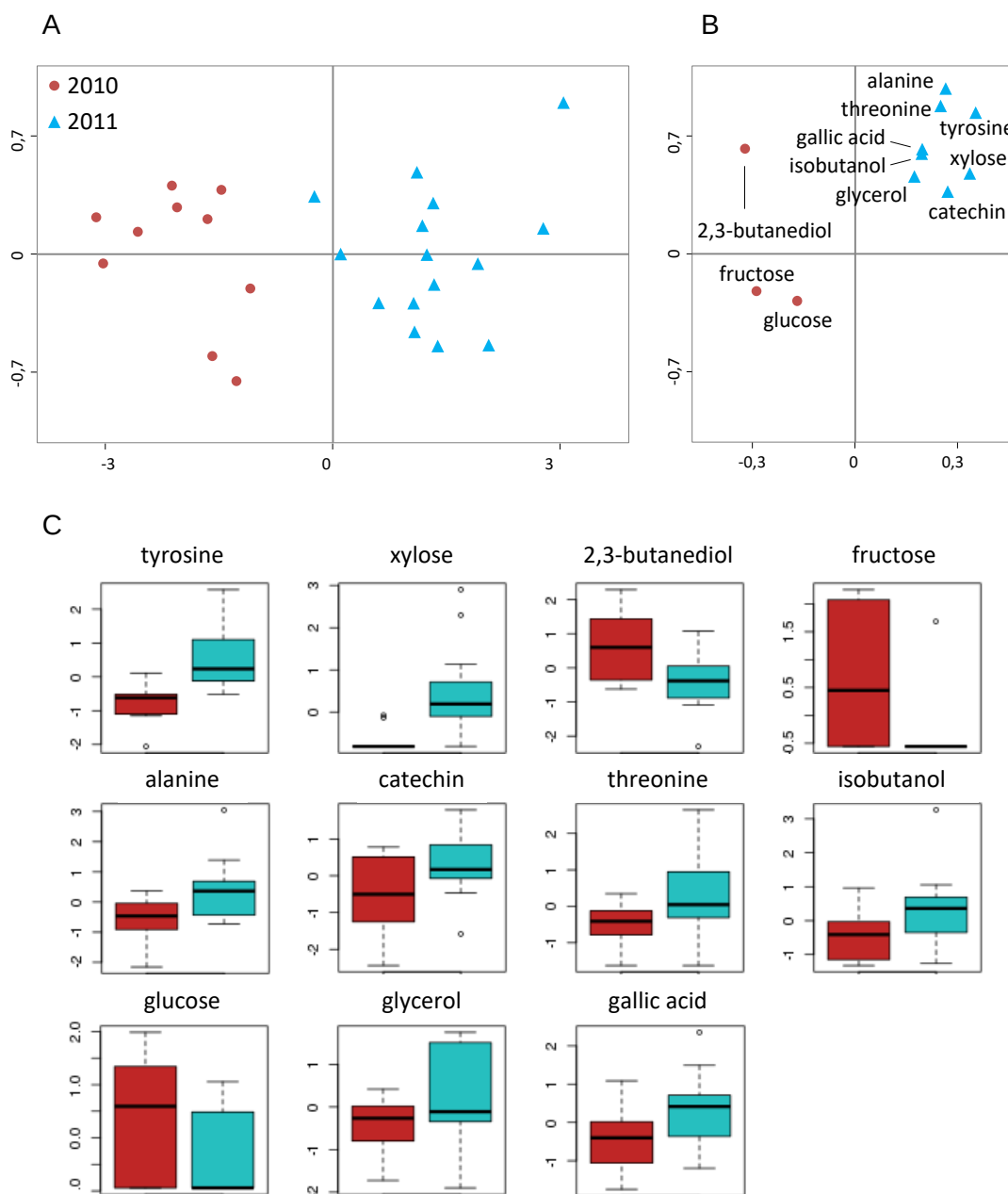


Fig. 5 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 11 most discriminant parameters based on qNMR normalized data from 2010 (red, n=10) versus 2011 vintage (blue, n=15) of Bordeaux red wines (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.83$ and $R^2Y = 0.81$).

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

The authors thank Annick Moing for their scientific advices concerning statistical analysis. Elodie Guittard and Caroline Baz are warmly thanked for their collaboration in the sample collection. This work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project), the Conseil Régional d'Aquitaine, Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB) and FranceAgriMer program (grant number 2014-0785).

Appendix A. Supplementary data

References

- Ali, K., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *Journal of Biomolecular NMR*, 49(3-4), 255-266.
- Amargianitaki, M., & Spyros, A. (2017). NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 9.
- Anastasiadi, M., Zira, A., Magiatis, P., Haroutounian, S. A., Skaltsounis, A. L., & Mikros, E. (2009). ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11067-11074.
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5-26.
- Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. (2018). Wine evolution during bottle aging, studied by ¹H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2018.1008.1075.
- Cobas, C., Seoane, F., Domínguez, S., Sykora, S., & Davies, A. N. (2011). A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD). *Spectroscopy Europe*, 23(1), 26-30.
- Coulter, A. D., Godden, P. W., & Pretorius, I. S. (2004). Succinic acid-how is it formed, what is its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 19, 16-25.
- De Pascali, S. A., Coletta, A., Del Coco, L., Basile, T., Gambacorta, G., & Fanizzi, F. P. (2014). Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chemistry*, 161(Supplement C), 112-119.
- Etschmann, M. M. W., Sell, D., & Schrader, J. (2003). Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnology Letters*, 25(7), 531-536.
- Fan, S., Zhong, Q., Fahl-Hassek, C., Pfister, M. K. H., Horn, B., & Huang, Z. (2018). Classification of Chinese wine varieties using ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food Control*, 88, 113-122.
- Forina, M., Lanteri, S., Casolino, C., & Oliveri, P. C. I. H. o. F. A. e. e., pp. 429–457). Leo M.L. Nollert. (2004). Chemometrics. In L. M. L. Nollert (Ed.), *Handbook of Food Analysis (2e ed.)*, vol. 3 (pp. 1757-1804). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Gavaghan, C. L., Wilson, I. D., & Nicholson, J. K. (2002). Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA. *FEBS Letters*, 530(1-3), 191-196.
- Geana, E. I., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O. R., Ionete, R. E., Stefanescu, I., Artem, V., & Bala, C. (2016). Classification of red wines using suitable markers coupled with multivariate statistic analysis. *Food Chemistry*, 192, 1015-1024.
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610-5619.
- Gougeon, L., Da Costa, G., Le Mao, I., Ma, W., Teissedre, P.-L., Guyon, F., & Richard, T. (2018). Wine Analysis and Authenticity Using ¹H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3425-3434.
- Gougeon, L., Da Costa, G., Richard, T., & Guyon, F. (2019). Wine Authenticity by Quantitative ¹H NMR Versus Multitechnique Analysis: a Case Study. *Food Analytical Methods*, doi: 10.1007/s12161-12018-01425-z.
- Hong, Y.-S. (2011). NMR-based metabolomics in wine science. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49(S1), S13-S21.

- Hu, B., Yue, Y., Zhu, Y., Wen, W., Zhang, F., & Hardie, J. W. (2015). Proton Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopic Discrimination of Wines Reflects Genetic Homology of Several Different Grape (*V. vinifera* L.) Cultivars. *PloS One*, 10(12), e0142840.
- Huang, Z., & Ough, C. S. (1991). Amino Acid Profiles of Commercial Grape Juices and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42(3), 261-267.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1-4), 317-331.
- López-Rituerto, E., Cabredo, S., López, M., Avenzoza, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. (2009). A thorough study on the use of quantitative ¹H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2112-2118.
- López-Rituerto, E., Savorani, F., Avenzoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M., & Engelsen, S. B. (2012). Investigations of la Rioja terroir for wine production using ¹H NMR metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3452-3461.
- Mardones, C., Hirschfeld, A., Contreras, A., Lepe, K., Gutiérrez, L., & von Baer, D. (2005). Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. *Journal of Chromatography A*, 1085(2), 285-292.
- Mazzei, P., Spaccini, R., Francesca, N., Moschetti, G., & Piccolo, A. (2013). Metabolomic by ¹H NMR Spectroscopy Differentiates “Fiano Di Avellino” White Wines Obtained with Different Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10816-10822.
- Médina, B., Salagoity, M. H., Guyon, F., Gaye, J., Hubert, P., & Guillaume, F. (2013). 8 - Using new analytical approaches to verify the origin of wine. In P. Brereton (Ed.), *New Analytical Approaches for Verifying the Origin of Food*, (pp. 149-188): Woodhead Publishing.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., Bruggeman, G., Bosch, M., Petrusan, J., Van Droogenbroeck, B., Elst, K., & Sforza, S. (2016). Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry*, 201, 37-45.
- Papotti, G., Bertelli, D., Graziosi, R., Silvestri, M., Bertacchini, L., Durante, C., & Plessi, M. (2013). Application of One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy for the Characterization of Protected Designation of Origin Lambrusco Wines of Modena. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1741-1746.
- Pauli, G. F., Gödecke, T., Jaki, B. U., & Lankin, D. C. (2012). Quantitative ¹H NMR. Development and potential of an analytical method: an update. *Journal of Natural Products*, 75(4), 834-851.
- Revilla, I., & González-SanJosé, M. L. (1998). Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. *Food Chemistry*, 63(3), 307-312.
- Riedl, J., Esslinger, S., & Fauth-Hasek, C. (2015). Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication. *Analytica Chimica Acta*, 885, 17-32.
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Kim, K. M., Ahn, H.-J., Park, W.-M., Van Den Berg, F., Hong, Y.-S., & Lee, C.-H. (2009). Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using ¹H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1481-1490.
- Son, H.-S., Kim, K. M., van den Berg, F., Hwang, G.-S., Park, W.-M., Lee, C.-H., & Hong, Y.-S. (2008). ¹H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8007-8016.
- Wehrens, R. (2011). Multivariate Regression. In *Chemometrics with R*, (pp. 103-144). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107.
- Zhu, J., Hu, B., Lu, J., & Xu, S. (2018). Analysis of Metabolites in Cabernet Sauvignon and Shiraz Dry Red Wines from Shanxi by ¹H NMR Spectroscopy Combined with Pattern Recognition Analysis. In *Open Chemistry*, vol. 16 (pp. 446).

Supplementary materials

¹H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines

Louis GOUGEON¹, Gregory DA COSTA¹, François GUYON², Tristan RICHARD^{1,*}

1. Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, USC 1366 INRA, Unité de Recherche Œnologie, 210 chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon, France.
2. Service Commun des Laboratoires, 3 avenue du Dr. Albert Schweitzer, 33600 Pessac, France.

* Corresponding author:

Phone: (+33)5557575957

Email address: tristan.richard@u-bordeaux.fr

List of Supplementary Material

Table S1 French red wines samples collection

Table S2 ^1H -NMR chemical shifts used for organic compound identification in wine. The signals chosen for quantitation are underlined.

Table S3 Confusion matrix associated with the predictive results of the Leave One Out cross-validation (LOOCV) analysis for the discrimination of wine origins: classification results for origins when using quantification results of most discrimination compounds.

Table S4 Confusion matrix associated with the predictive results of the Leave One Out cross-validation (LOOCV) analysis for the discrimination of Medoc and Libournais wines: classification results for origins when using quantification results of most discrimination compounds.

Table S5 Confusion matrix associated with the predictive results of the Leave One Out cross-validation (LOOCV) analysis for the discrimination of vintages: classification results for origins when using quantification results of most discrimination compounds.

Figure S1 Comparison between Bordeaux wines from Medoc (grey), Libournais (yellow), and Graves (blue) from 2004 and 2016 vintages by PCA.

Figure S2 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 13 most discriminant parameters based on q-NMR normalized data from 2011 (red, $n=15$) versus 2012 vintage (blue, $n=23$) of Bordeaux red wines (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.62$ and $R^2Y = 0.63$).

Figure S3 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 12 most discriminant parameters based on qNMR normalized data from 2012 (red, $n=23$) versus 2013 vintage (blue, $n=10$) of Bordeaux red wines (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.56$ and $R^2Y = 0.72$).

Table S1 French red wines samples collection

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	TOTAL
Bordeaux	8	10	7	12	8	6	10	15	23	10	7	7	4		127
<i>Generic</i>						1	1	1	3	1		4	4		15
<i>Blaye - Bourg</i>		1									2	2			5
<i>Entre-deux-Mers</i>				1		1	2	1	1		1	1			8
<i>Graves</i>	1	1	1	1	2	2	2	1	1	3	1				16
<i>Libournais</i>	2	3	2	6	2		3	4	10	3	1				36
<i>Medoc</i>	5	5	4	4	4	2	2	8	8	3	2				47
Beaujolais								3		3	2	1	2	4	15
Burgundy	1		1	2		1	1	2	4	1	5	1	1		20
Côtes du Rhône				1	2		2			3	9	2	1		20
Languedoc- Roussillon							2		6	4		4	8		24
Loire Valley							1	2	2	3	6	3	1		18
TOTAL	9	10	8	15	10	7	16	22	35	24	29	18	17	4	224

Table S2 ^1H -NMR chemical shifts used for organic compound identification in wine. The signals chosen for quantitation are underlined.

Compound	$\delta^1\text{H}$ in ppm (multiplicity, J in Hz, assignment)
2,3-butanediol	1,13 (<i>d</i> , 6.2, 2CH ₃) ; 3,61 (<i>m</i> , 2CH)
acetic acid	2,06 (<i>s</i> , CH ₃)
acetoin	1,37 (<i>d</i> , 7.0, CH ₃) ; 2,21 (<i>s</i> , CH ₃) ; 4,42 (<i>m</i> , CH)
alanine	1,48 (<i>d</i> , 7.2, CH ₃) ; 3,76 (<i>q</i> , CH)
alcohol content	1,17 (<i>t</i> , 7.2, CH ₃), 3,65 (<i>q</i> , CH ₂)
arginine	1,70 (<i>m</i> , CH ₂); 1,89 (<i>m</i> , CH ₂); 3,23 (<i>q</i> , CH ₂); 3,75 (<i>t</i> , 6.5, CH)
caffeic acid	6,43 (<i>d</i> , 16.0, CH), 7,69 (<i>d</i> , 16.0, CH)
catechin	6,00 (<i>d</i> , 2.3, CH), 6,09 (<i>d</i> , 2.3, CH)
choline	3,19 (<i>s</i> , 3CH ₃) ; 3,51 (<i>dd</i> , CH ₂) ; 4,05 (<i>m</i> , CH ₂)
citric acid	2,53 (<i>d</i> , 15.6, CH) ; 2,65 (<i>d</i> , 15.6, CH)
epicatechin	5,99 (<i>d</i> , 2.2, CH), 6,07 (<i>d</i> , 2.2, CH)
ethanal	2,23 (<i>d</i> , 3.0, CH ₃) ; 9,67 (<i>q</i> , CH)
ethyl acetate	1,26 (<i>t</i> , 7.2, CH ₃) ; 4,12 (<i>q</i> , CH ₂)
ethyl lactate	4,22 (<i>q</i> , 7.2, CH ₂)
fructose	4,11 (<i>m</i> , 2CH ₂); 4,00 (<i>dd</i> , 12.8 and 0.8, CH ₂)
fumaric acid	6,71 (<i>s</i> , 2CH)
gallic acid	7,13 (<i>s</i> , 2CH)
galacturonic acid	5,32 (<i>d</i> , 3.7, CH)
γ -aminobutyric acid	2,50 (<i>t</i> , 7.3, CH ₂)
glucose	5,22 (<i>d</i> , 3.7, CH); 4,61 (<i>d</i> , 7.9, CH)
glycerol	3,55 (<i>dd</i> , 11.8 and 6.5, CH ₂)
isobutanol	0,87 (<i>d</i> , 6.7, CH ₃); 1,73 (<i>m</i> , CH); 3,36 (<i>d</i> , 6.7, CH ₂ OH)
isopentanol	0,88 (<i>d</i> , 6.7, CH ₃); 1,43 (<i>q</i> , CH); 1,64 (<i>m</i> , CH ₂); 3,61 (<i>t</i> , 6.7, CH ₂ OH)
lactic acid	1,38 (<i>d</i> , 7.0, CH ₃); 4,31 (<i>q</i> , CH)
malic acid	2,71 (<i>dd</i> , 16.3 and 7.0, CH); 2,82 (<i>dd</i> , 16.3 and 4.5, CH); 4,45 (<i>s</i> , CH)
mannitol	3,75 (<i>m</i> , CH); 3,79 (<i>d</i> , 9.0, CH ₂); 3,83 (<i>dd</i> , 11.9 and 2.6, CH ₂)
methanol	3,35 (<i>s</i> , CH ₃)
myo-inositol	3,27 (<i>t</i> , 9.7, CH); 3,52 (<i>dd</i> , 10.0 and 2.8, 2CH); 3,61 (<i>t</i> , 2.8, 2CH); 4,05 (<i>t</i> , 2.8, CH)
phenethyl alcohol	2,76 (CH ₂); 3,74 (CH ₂ OH); 7,28 (<i>m</i> , CH); 7,34 (<i>m</i> , CH)
proline	1,99 (<i>m</i> , CH ₂); 2,06 (<i>m</i> , CH); 2,33 (<i>m</i> , CH); 3,32 (<i>dt</i> , 14.0 and 7.1, CH); 3,42 (<i>dt</i> , 11.6 and 7.0, CH); 4,11 (<i>dd</i> , 8.6 and 6.4, CH)
pyruvic acid	2,35 (<i>s</i> , CH ₃)
shikimic acid	6,81 (<i>m</i> , CH)
succinic acid	2,62 (<i>s</i> , α,β CH ₂)
syringic acid	3,84 (<i>s</i> , 2CH ₃); 7,24 (<i>s</i> , 2CH)
tartaric acid	4,41 (<i>s</i> , CH)
threonine	1,33 (<i>d</i> , 6.7, CH ₃)
trigonelline	8,07 (<i>m</i> , CH); 8,82 (<i>m</i> , 2CH); 9,11 (<i>s</i> , CH)
tyrosine	6,89 (<i>m</i> , 2CH); 7,17 (<i>m</i> , 2CH)
valine	0,99 (<i>d</i> , 7.3, CH ₃); 1,03 (<i>d</i> , 7.3, CH ₃)
xylose	5,17 (<i>d</i> , 3.7, CH)

Table S3 Confusion matrix associated with the predictive results of the Leave One Out cross-validation (LOOCV) analysis for the discrimination of wine origins: classification results for origins when using quantification results of most discrimination compounds.

	Bordeaux	France
Bordeaux	124	9
France	3	88
total	127	97
correct	124	88
% correct	98%	91%

	Bordeaux	Bourgogne
Bordeaux	127	0
Bourgogne	0	20
total	127	20
correct	127	20
% correct	100%	100%

	Bordeaux	Beaujolais
Bordeaux	127	1
Beaujolais	0	14
total	127	15
correct	127	14
% correct	100%	93%

	Bordeaux	Rhône
Bordeaux	123	2
Rhône	4	18
total	127	20
correct	123	18
% correct	97%	90%

	Bordeaux	Loire Valley
Bordeaux	126	4
Loire Valley	1	14
total	127	18
correct	126	14
% correct	99%	78%

	Bordeaux	Languedoc
Bordeaux	125	7
Languedoc	2	17
total	127	24
correct	125	17
% correct	98%	71%

Table S4 Confusion matrix associated with the predictive results of the Leave One Out cross-validation (LOOCV) analysis for the discrimination of Medoc and Libournais wines: classification results for origins when using quantification results of most discrimination compounds.

	Libournais	Medoc
Libournais	30	6
Medoc	6	41
total	36	47
correct	30	41
% correct	83	87

Table S5 Confusion matrix associated with the predictive results of the Leave One Out cross-validation (LOOCV) analysis for the discrimination of vintages: classification results for origins when using quantification results of most discrimination compounds.

2005 2007			2005 2010			2005 2011		
2005	10	3	2005	10	0	2005	7	2
2007	0	9	2010	0	10	2011	3	13
total	10	12	total	10	10	total	10	15
correct	10	9	correct	10	10	correct	7	13
% correct	100%	75%	% correct	100%	100%	% correct	70%	87%
2005 2012			2005 2013			2007 2010		
2005	8	1	2005	7	1	2007	11	1
2012	2	22	2013	3	9	2010	1	9
total	10	23	total	10	10	total	12	10
correct	8	22	correct	7	9	correct	11	9
% correct	80%	96%	% correct	70%	90%	% correct	92%	90%
2007 2011			2007 2012			2007 2013		
2007	10	2	2007	10	1	2007	12	1
2011	2	13	2012	2	22	2013	0	9
total	12	15	total	12	23	total	12	10
correct	10	13	correct	10	22	correct	12	9
% correct	83%	87%	% correct	83%	96%	% correct	100%	90%
2010 2011			2010 2012			2010 2013		
2010	7	3	2010	7	0	2010	9	0
2011	3	12	2012	3	23	2013	1	10
total	10	15	total	10	23	total	10	10
correct	7	12	correct	7	23	correct	9	10
% correct	70%	80%	% correct	70%	100%	% correct	90%	100%
2011 2012			2011 2013			2012 2013		
2011	8	7	2011	13	3	2012	18	6
2012	7	16	2013	2	7	2013	5	4
total	15	23	total	15	10	total	23	10
correct	8	16	correct	13	7	correct	18	4
% correct	53%	70%	% correct	87%	70%	% correct	78%	40%

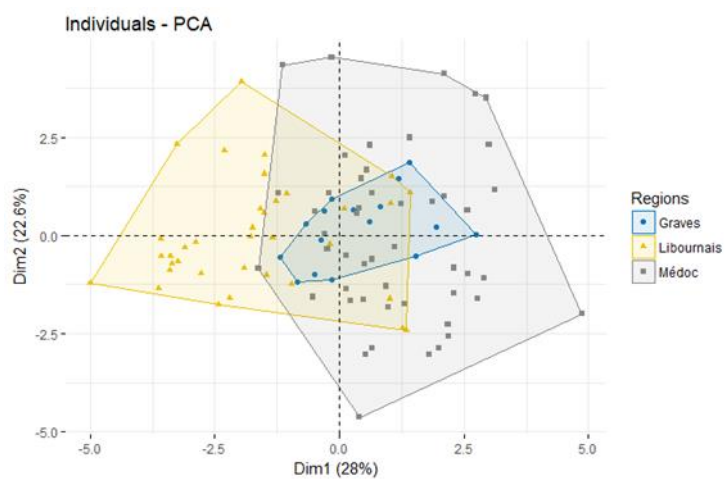


Fig. S1 Comparison between Bordeaux wines from Medoc (grey), Libournais (yellow), and Graves (blue) from 2004 and 2016 vintages by PCA.

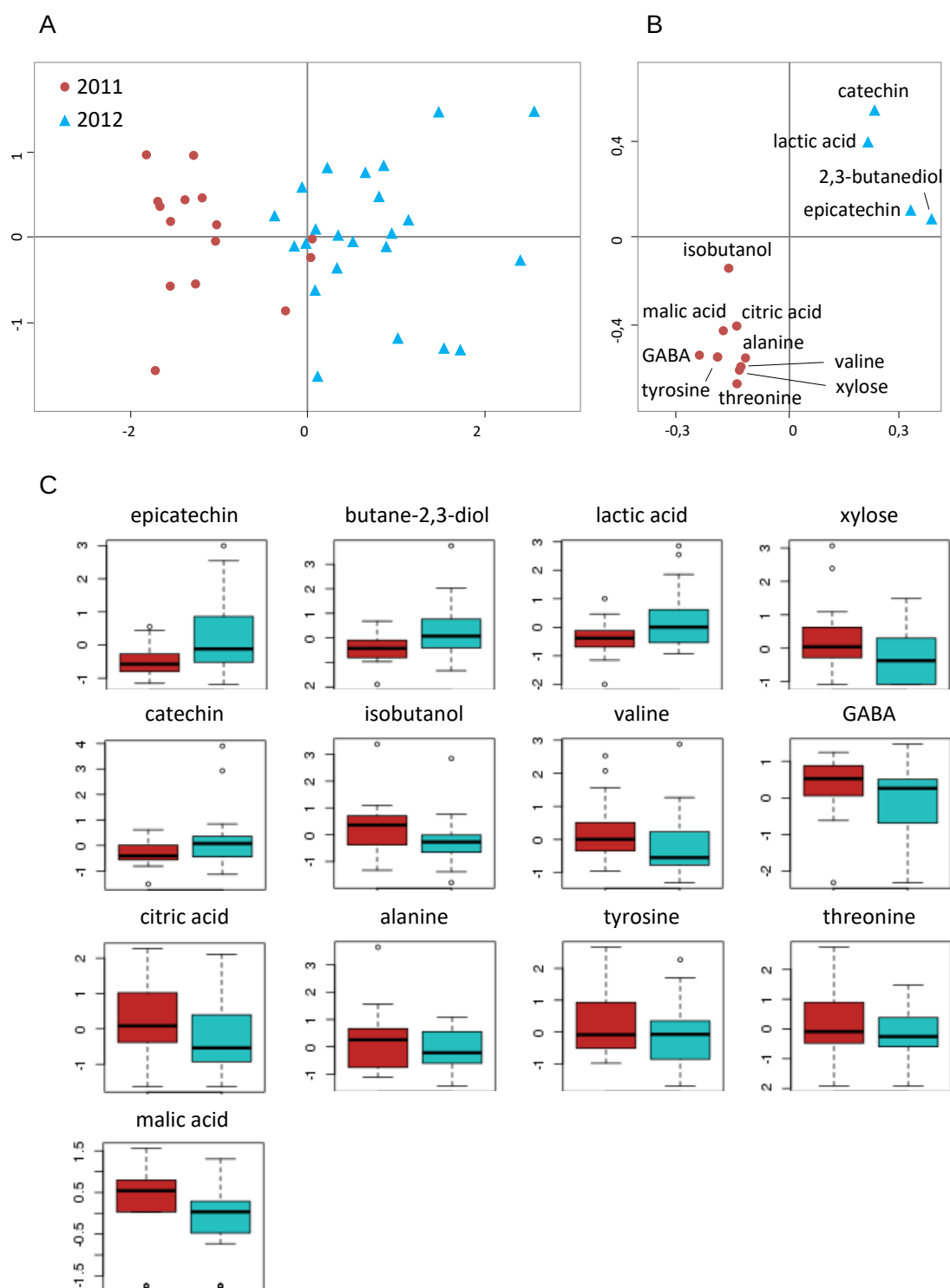


Fig. S2 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 13 most discriminant parameters based on q-NMR normalized data from 2011 (red, n=15) versus 2012 vintage (blue, n=23) of Bordeaux red wines (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.62$ and $R^2Y = 0.63$).

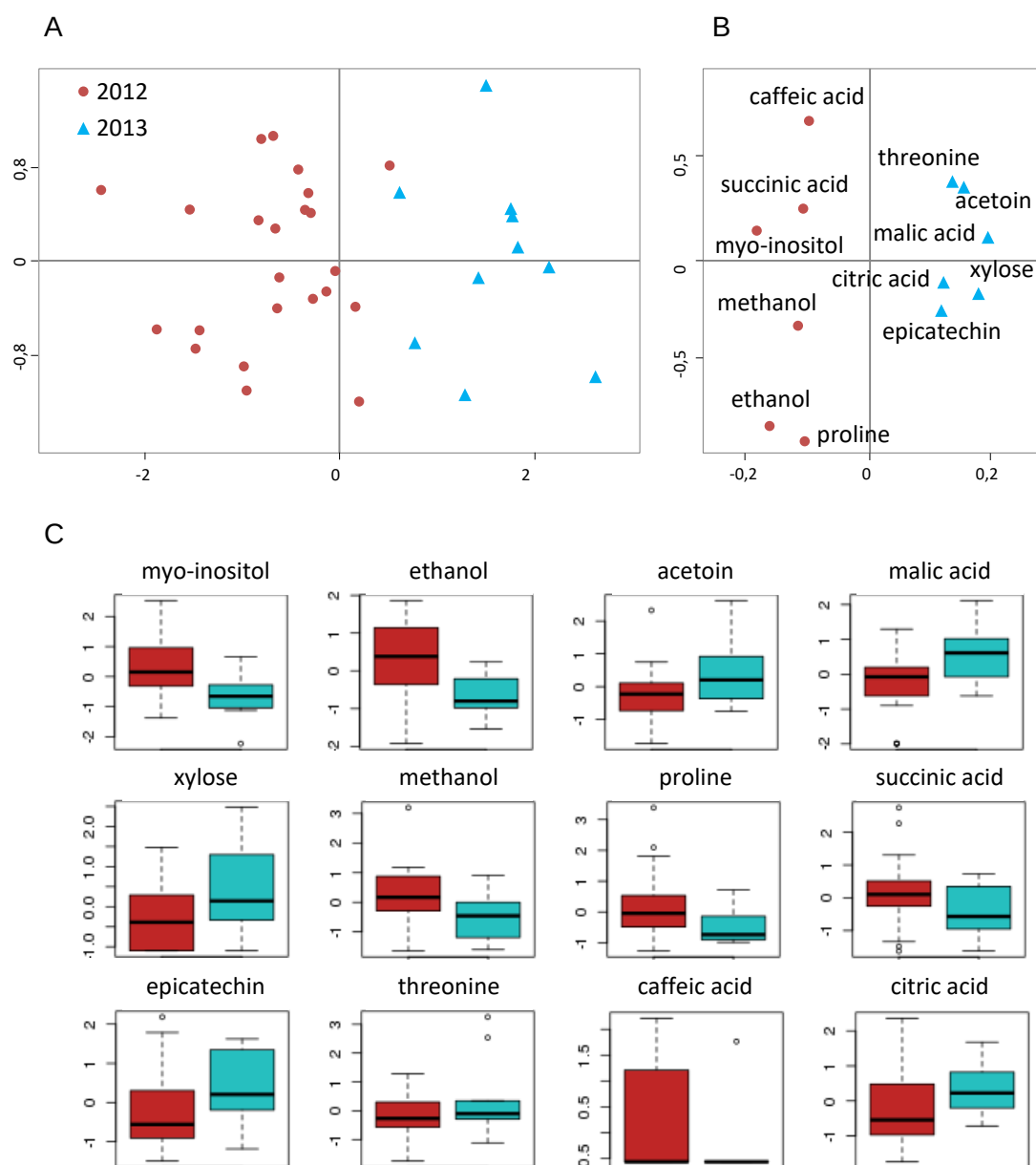


Fig. S3 OSC-PLS-DA (A) score plot, (B) loading plot, and (C) one way ANOVA performed with normalised data on 12 most discriminant parameters based on qNMR normalized data from 2012 (red, n=23) versus 2013 vintage (blue, n=10) of Bordeaux red wines (validation parameters of the model: $Q^2 = 0.56$ and $R^2Y = 0.72$).

4. Principaux résultats

La base de données développée lors de ce projet et exposée dans ce troisième Chapitre a démontré la capacité de la RMNq à pouvoir classer les vins selon leurs origines et millésimes, grâce aux dosages de leurs métabolites. À l'échelle nationale, les vins de Bordeaux se distinguent de ceux produits dans cinq des grandes régions viticoles françaises, à savoir le Beaujolais, la Bourgogne, les Côtes du Rhône, le Languedoc-Roussillon et la Vallée de la Loire. L'étape de validation croisée effectuée par LOOCV donne des taux prédictions correctes compris entre 71 et 100% selon les régions comparées. Des comparaisons par paire ont aussi permis de mettre en lumière certains métabolites discriminants spécifiques à la région bordelaise. La proline et certains composés issus des fermentations alcoolique et malolactique sont majoritairement discriminants dans ces analyses. Aussi, les teneurs en méthanol, acide galacturonique et arabinose, semblent être caractéristiques des vins de Bordeaux. Même si les cépages ont certainement une part importante dans les différenciations observées, c'est bien l'ensemble des composantes du terroir qui affecte le métabolome des vins, comme en atteste la diversité des métabolites discriminants dans ces distinctions.

À l'échelle du vignoble bordelais, une distinction a aussi été observée entre les vins du Libournais et ceux du Médoc, avec une classification correcte moyenne de 85% par LOOCV. Les vins des Graves ne semblent pas avoir une empreinte chimique particulière leur permettant de se distinguer des autres régions. L'échantillonnage des vins de l'Entre-deux-Mers (n=8) et de Blaye-Bourg (n=5) n'est pas suffisant pour permettre une étude statistique. Concernant les métabolites responsables des différences observées entre les vins du Médoc et du Libournais, l'acide shikimique et la proline sont les deux composés les plus discriminants, ce qui laisse envisager un effet cépage important. En effet, les vins du Médoc sont majoritairement constitués de Cabernet sauvignon, à l'inverse des vins du Libournais majoritairement assemblés à partir de Merlot.

Toujours à l'échelle du vignoble bordelais, il a été possible de faire la distinction entre les vins de différents millésimes. Premièrement, une distinction entre vins jeunes et âgés a été observée (vins jeunes : millésimes 2004 à 2007 et vins âgés : millésimes 2013 à 2016). Parmi les composés responsables de cette différence, certains sont directement liés à l'évolution du vin en bouteille et non à des conditions climatiques particulières. Les flavanols (catéchine et épicatechine) ont des teneurs plus élevées dans les vins jeunes, tandis que les esters (éthyle acétate et éthyle lactate) sont particulièrement présents dans les vins plus âgés. Afin de véritablement observer l'influence spécifique du millésime et de minimiser l'effet de l'évolution naturelle d'un vin en bouteille, les vins de quatre millésimes successifs ont été analysés par paire (2010/2011, 2011/2012 et 2012/2013). Ces analyses suggèrent que la RMNq est capable d'identifier un vin selon son millésime, même si son potentiel semble intimement lié à l'importance des différences de conditions climatiques entre les années étudiées.

Pour mieux appréhender l'influence du cépage dans les différences observées, il serait intéressant d'analyser des vins monocépages (1) produits dans des régions françaises différentes, et (2) d'une même région mais issus de méthodes de vinification différentes. Cela pourrait permettre de mieux comprendre l'influence des techniques viti-vinicoles employées sur les changements métaboliques des vins.

Discussion générale des résultats

1. Avantages et limitations de la RMNq pour l'analyse des vins

Lors de cette thèse, une méthode de dosage des composés majoritaires des vins a été mise en place sur un spectromètre RMN 600 MHz. Cette méthode a pour principal avantage d'être universelle. Elle ne demande pas d'équipement spécifique autre que la RMN, les consommables ont un coût abordable, et est relativement simple à mettre en œuvre. Le tampon utilisé dans cette méthode est simple à réaliser et permet de réduire très fortement les écarts de pH entre échantillons sans perte d'information. Si l'ajustement précis du pH est souhaité, un robot de titration peut être utilisé. De ce fait, la méthode développée peut être utile tant pour des études ciblées et quantitatives avec un ajout du tampon seul, que pour des études métabolomiques non-ciblées.

La préparation de l'échantillon est un des avantages de la méthode. Aucun prétraitement n'est nécessaire pour préparer l'échantillon, et à partir d'un faible volume de vin (< 1 mL) la quantité d'informations révélées par les spectres est importante. Avec des systèmes commerciaux comme le Coravin[®], les bouteilles n'ont pas à être débouchées. Elles restent presque intactes, puisque seul le volume nécessaire est prélevé, avec en compensation une libération contrôlée de gaz inerte pour protéger le reste de vin contenu dans la bouteille. Dans le cas de recherches scientifiques, où les volumes de vins expérimentaux produits peuvent être limités (micro-vinifications, par exemple), la métabolomique par RMN ¹H est un moyen d'obtenir une information de qualité sans utiliser un volume de vin important, nécessaire pour les analyses chimiques et les dégustations supplémentaires.

La performance de la technique a été démontrée dans les trois Chapitres précédents. Sa principale qualité réside dans le fait qu'elle permet la visualisation des tous les groupements protonés non-échangeables de la matrice, ce qui rend possible l'identification et la quantification d'un grand nombre de composés de familles chimiques différentes, donnant alors accès à une information moléculaire riche et complexe. Les composés majoritaires du vin, tels que des acides organiques, des alcools, des glucides, des acides aminés, ou encore des composés phénoliques, sont identifiables et quantifiables suite à l'acquisition d'un seul spectre, obtenu en un temps relativement court.

Cette méthode présente, cependant certaines limites. La faible sensibilité de la RMN est une des limitations de la technique dans l'analyse métabolomique. Pour les composés identifiés, la limite de détection d'un signal ne sera que rarement située en dessous du mg/L, et peut se situer au-delà de la centaine de mg/L, notamment dans les zones très denses en signaux (par exemple celle des glucides). Les composés présents en faible concentration ne sont pas observables. Ainsi, des éléments tels que les arômes ou les minéraux ne seront pas visibles.

Le manque de sélectivité de l'analyse métabolomique par RMN du proton est également une limitation de la méthode. Même si des logiciels donnent accès à des outils de déconvolution performants, la superposition de signaux peut entraîner des complications au moment de la quantification.

Enfin, bien que cette technique permette d'accéder à un grand nombre de composés de familles différentes, au sein d'une famille donnée la liste des composés dosés n'est pas exhaustive. La RMN ne peut donc pas remplacer une méthode de dosage spécifique d'une famille de composés donnée.

2. Intérêt de la RMNq pour la classification des vins

Discrimination des cépages

Plusieurs études ont classé par RMN ^1H différentes variétés de *Vitis vinifera* L. ayant été cultivées sur une même aire géographique. Il s'avère même que la détermination du pourcentage de chaque cépage dans l'assemblage de deux cépages soit également envisageable, en référence aux travaux réalisés par Imparato et al. (Imparato et al., 2011).

Les résultats présentés dans ce manuscrit semblent indiquer que le cépage est un des critères principaux dans les discriminations observées par RMNq. Dans le premier article présenté en Chapitre I, le vin de cépage Beihong se distingue très clairement des vins de Cabernet Sauvignon produit dans la même région chinoise. Deux composés caractéristiques des cépages, l'acide shikimique et la proline, ont été identifiés et quantifiés. Les observations faites lors des comparaisons entre les vins rouges français indiquent également un effet du cépage. Enfin, les analyses des vins de Bordeaux permettent de distinguer les vins du Libournais et du Médoc, fruits d'un assemblage de Cabernet sauvignon et de Merlot mais dans différentes proportions.

Cas particulier du millésime

Parce que le vin est une matrice vivante, la notion du millésime est délicate à appréhender. Chaque année, les conditions météorologiques déterminent la qualité du vin et peuvent modifier significativement son métabolome. Mais, le vieillissement du vin en bouteille va aussi modifier le métabolome du vin. Il est alors primordial de prendre en compte ces particularités afin de garder un regard objectif sur les résultats observés lors de la classification des millésimes. Les études qui s'y sont intéressées par RMN ^1H ont majoritairement étudié des millésimes successifs et relativement jeunes, tous analysés sur une courte période (Anastasiadi et al., 2009; Consonni et al., 2011; Lee, Hwang, et al., 2009).

Nos premiers résultats montrent que les vins chinois présentés dans le Chapitre I se distinguent par régions et non par millésimes. Dans le Chapitre III de cette thèse, des vins de 2004 à 2017 ont été analysés dans un laps de temps de moins d'un an (septembre 2017 – mai 2018). Nos résultats montrent qu'à l'échelle nationale, le millésime / vieillissement du vin importe peu sur les discriminations faites suite aux analyses par RMNq. Malgré un écart d'âge important (de quelques mois pour les plus jeunes à quatorze ans pour les vins les plus âgés), la classification des vins des grandes régions viticoles

françaises a été observée. Cette observation suggère un effet millésime / vieillissement moindre que les effets cépage / conditions de production. Néanmoins, à une échelle territoriale plus restreinte (région de Bordeaux), l'influence du millésime devient plus importante. Cet effet, lié aux conditions spécifiques de l'année de production, est combiné à celui du vieillissement des vins en bouteille. Ces deux effets permettent de classer les vins en fonction de leur millésime. Cependant, concernant l'observation de deux millésimes proches dont les conditions climatiques auraient été semblables, la RMNq ne semble pas être en complète mesure d'assurer une discrimination satisfaisante.

Influence du terroir

L'effet du terroir dans sa globalité semble jouer un rôle prépondérant. Il semble délicat de vouloir dissocier les différentes caractéristiques du terroir puisque comme le définit l'OIV, le terroir est un ensemble de paramètres qui interagissent entre eux, permettant la production de vins typiques. Le porte-greffe utilisé, la conduite du vignoble en termes de gestion de la vigueur, la topographie du vignoble, vont influencer la qualité de la baie de manière notable. L'influence de ces paramètres est pourtant peu discutée dans les études de classification et il serait intéressant de comprendre leurs rôles dans des possibles modifications du métabolisme des vins observées lors d'une analyse par RMN ^1H .

La notion de terroir semble prendre un sens particulier dans l'étude de caractérisation des vins présentée dans le Chapitre III. Les plantations de cépages sont mûrement réfléchies pour être en adéquation avec un climat, et le porte-greffe qui lui est associé est adapté au type de sol de la parcelle à planter. Les pratiques, tant au vignoble qu'au chai, sont effectuées en adéquation avec les conditions particulières de chaque millésime. Il peut donc paraître trop restrictif de vouloir étudier l'influence d'un seul paramètre sur l'interprétation des analyses RMN ^1H , tant le terroir est un concept résultant des interactions entre une multitude de facteurs dépendant les uns des autres. La caractérisation des vins de Bordeaux par RMNq présentée au Chapitre III confirme cette observation. C'est en ce sens que les études sur des vins commerciaux, ont une importance primordiale dans les essais d'authentification des vins. Cette notion de terroir permet ainsi de remonter à l'origine géographique des vins.

3. Métabolites essentiels dans la classification des vins

Nos résultats montrent que la classification des vins est le résultat des effets conjugués de différents paramètres. Cependant, similairement à d'autres travaux sur le classement des vins par RMN (cf. Tableau 8), certains composés semblent avoir un effet prépondérant dans les discriminations observées. Tel est le cas de la proline, de l'acide shikimique et de produits secondaires de fermentations comme le butane-2,3-diol, le glycérol, les acides lactique et succinique.

Glycérol et butane-2,3-diol

Le glycérol et le butane-2,3-diol sont deux composés issus du métabolisme des levures *Saccharomyces cerevisiae*. Ce sont deux sous-produits de la fermentation alcoolique, dont les teneurs peuvent être partiellement influencées par les concentrations initiales en glucose dans le moût. Dans les études menées par RMN ^1H (cf. Tableau 8), ces deux composés ont été observés dans la grande majorité des cas comme étant en partie responsable des discriminations des vins de différents cépages, origines, millésimes et pratiques viti-vinicoles.

Le glycérol est le sous-produit le plus abondant de la fermentation alcoolique. De nombreux paramètres environnementaux ont été rapportés pour influencer les teneurs finales de glycérol dans le vin, comme le cépage, la flore microbienne sur les baies de raisin, la concentration en sulfite, le pH, de la température de fermentation, la source d'azote et la souche de levure (Gardner, Rodrigue, & Champagne, 1993; Radler & Schtitz, 1982; Rankine & Bridson, 1971). Les résultats obtenus dans le chapitre III (comparaison des vins français) n'indiquent pas que ce composé soit un des marqueurs prépondérants dans les discriminations des vins selon leurs origines géographiques ou leurs cépages. Concernant les millésimes, seuls les vins de 2010 et 2011 ont été en partie distingués par le glycérol, dont les teneurs sont plus importantes dans les vins de 2011.

Le butane-2,3-diol est le principal dialcool que l'on retrouve dans les vins. Dans l'étude présentée dans le Chapitre III, le butane-2,3-diol a permis, avec d'autres métabolites, de discriminer les vins de différentes origines géographiques et millésimes. À l'échelle nationale, les vins de Bordeaux présentent des teneurs moins importantes en butane-2,3-diol. À l'échelle régionale, il a été observé que les teneurs dans les vins du Médoc sont moins importantes que dans ceux du Libournais. Dans l'étude visant à comparer les vins par millésimes, les teneurs de butane-2,3-diol sont plus faibles dans les vins de Bordeaux de 2011 comparées à ceux de 2010 et de 2012.

Proline

Les teneurs en acides aminés dans les vins dépendent de nombreux facteurs : nature du cépage (Huang, 1989; Stines et al., 2000), teneur en azote des sols (Holzapfel & Treeby, 2007), température et exposition des baies (Buttrose, Hale, & Kliwer, 1971), ou encore régime hydrique des sols (Matthews & Anderson, 1988). Les acides aminés peuvent être libérés par protéolyse lors de l'autolyse des levures mortes, mais peuvent également être produits par dégradation enzymatique des protéines du raisin. En général, la proline n'est pas métabolisée par les levures pendant la fermentation alcoolique contrairement aux autres acides aminés. La proline est donc considérée comme l'un des composés permettant de classer les vins (cf. Tableau 8).

Nos travaux, présentés dans le Chapitre I, montrent que la proline est à la fois un facteur de discrimination du cépage (distinction entre cépages Cabernet Sauvignon et Beihong) et de l'origine géographique. Dans le Chapitre II, les teneurs en proline sont différentes entre les vins non-conformes

et les originaux. Enfin, il a été mis en évidence, dans le Chapitre III, que les vins de Bordeaux contiennent plus de proline que les autres vins français. Par ailleurs, à l'échelle régionale, sa concentration est plus importante dans les vins du Libournais que dans ceux du Médoc. Ce composé est donc un facteur clé de la classification des vins et peut être relié au cépage mais également à l'origine géographique.

Acides lactique, succinique et shikimique

L'acide lactique est le principal produit de la transformation de l'acide malique par les bactéries lactiques au cours de la fermentation malolactique. Ce composé est cité de manière récurrente comme un des métabolites responsables des discriminations entre vins de différents cépages et millésimes (cf. Tableau 8). Dans les travaux présentés dans cette thèse, l'importance de l'acide lactique a été confirmée. Dans le Chapitre III, il a été observé que les vins rouges de Bordeaux présentaient des teneurs en acide lactique plus faibles que ceux des autres régions françaises. Au niveau de la région bordelaise, les Médoc contiennent plus d'acide lactique que les vins du Libournais. L'acide lactique a également permis de discriminer les vins de différents millésimes. Dans les vins de Bordeaux du millésime 2012, ses teneurs sont plus élevées que celles dosées dans les vins de Bordeaux de 2011.

L'acide succinique est l'acide organique prédominant formé pendant la fermentation alcoolique. Il pourrait provenir du catabolisme des sucres ou des acides aminés par la levure, en fonction des conditions de croissance et de l'azote disponible (Coulter, Godden, & Pretorius, 2004). Ce métabolite a été observé comme un facteur de discrimination des cépages (cf. Tableau 8). Pourtant, Coulter et al. affirment qu'il n'y a pas de lien entre les teneurs en acide succinique et les différents cépages. Il fait également partie des composés discriminants des vins de différentes origines géographiques, de différents millésimes, et de différentes pratiques viti-vinicoles (cf. Tableau 8). Nos travaux confirment que ce composé est un facteur de discrimination des cépages. En effet, les cépages BeiHong et Cabernet Sauvignon sont distingués en partie grâce aux teneurs en acide succinique. Ce composé est également un marqueur de l'origine géographique. Les vins de bordeaux présentent des teneurs plus élevées que les autres vins français. Il en va de même pour les Médoc par rapport aux vins du Libournais. D'un point de vue du millésime, les vins de Bordeaux produits en 2012 présentent des teneurs plus importantes que ceux de 2013. Les caractéristiques du terroir (climat, sol, etc.) conduisant à une teneur relativement élevée en azote ou en sucre du raisin pourraient induire une augmentation de sa production. Aussi, cet acide est un des facteurs de discrimination des vins jugés non-conformes dans le chapitre II.

L'acide shikimique a été identifié comme étant un marqueur des cépages (cf. Tableau 8). Nos travaux confirment cette observation. Il apparaît, dans le Chapitre I, que ce composé permet de distinguer les cépages Cabernet Sauvignon et BeiHong. Dans le cas des vins français, présenté dans le Chapitre III, il permet également de discriminer les vins de différentes origines géographiques. Ainsi, les vins de

Bordeaux contiennent plus d'acide shikimique que les vins de Bourgogne, mais moins que les vins de Loire. Au sein de la région bordelaise, c'est un marqueur prépondérant dans la discrimination Médoc / Libournais. Dans le chapitre II, il est, au même titre que l'acide succinique et la proline, discriminant des vins jugés non-conformes.

En conclusion, il apparaît que la proline et l'acide shikimique semblent être de bons marqueurs de l'authenticité d'un vin. En ce qui concerne, le glycérol, le butane-2,3-diol, les acides lactique et succinique, ceux-ci étant directement liés aux fermentations alcoolique ou malolactique, il peut être délicat de les utiliser pour caractériser une origine ou un cépage. Au contraire, ces métabolites étant en partie liés à l'avancement de la maturité du raisin, il pourrait s'agir de bons marqueurs pour caractériser des millésimes.

4. Place de la RMN dans un processus d'authentification des vins

Actuellement, la méthode d'analyse des composés majoritaires du vin par RMN ^1H n'est pas reconnue officiellement par l'OIV en tant que technique d'analyse des vins. Des études collaboratives travaillent pour cette reconnaissance (Godelmann et al., 2016), mais de nombreux essais doivent encore être réalisés pour que l'officialisation de la technique soit effective.

L'étude menée dans le cadre de cette thèse et présentée dans le Chapitre II, réalisée en collaboration avec le SCL et le Château Mouton-Rothschild, ouvre la voie à une potentielle place de la RMN ^1H dans le processus officiel d'authentification des vins. Nos travaux montrent que les analyses effectuées par RMN ^1H ont abouti aux mêmes conclusions que celles observées par le SCL, via les méthodes officielles habituellement utilisées pour le contrôle de l'authenticité des vins. La technique a pour principal avantage de n'utiliser qu'un faible volume de vin, ce qui peut s'avérer très intéressant tant les prix pratiqués pour les flacons les plus prestigieux à expertiser sont élevés.

Il est possible d'imaginer, qu'à l'avenir, le processus d'authentification d'un vin pourrait commencer par une analyse par RMNq. Cette analyse rapide et d'un coût relativement faible permettrait une première évaluation de l'origine du vin. En complément, d'autres analyses pourraient être réalisées pour confirmer ces conclusions. Ces analyses permettraient d'apporter un complément d'informations en cas de suspicion de falsification. Avec un tel processus, une des limitations de la méthode RMN pourrait être contournée. En effet, se baser sur la comparaison de deux signatures chimiques peut s'avérer trompeur si les deux bouteilles en question ont vieilli dans des conditions de stockage complètement différentes. Des composés sensibles à l'oxydation, à la lumière, ou encore à la température pourraient voir leurs concentrations évoluées au cours du temps. Le jugement de conformité pourrait alors être biaisé, ces deux bouteilles étant perçues comme différentes alors qu'elles sont authentiques. Dans ce sens, une étude de la stabilité dans le temps des composés dosés par RMN pour l'authenticité des vins reste à réaliser.

De plus, une des limites observées lors de ces travaux dans la méthode d'authentification des vins par comparaison avec l'original se situe dans la preuve de conformité de millésimes anciens. Aujourd'hui, la mise en bouteille des vins est réalisée à partir de lots homogènes, la signature chimique de deux bouteilles du même millésime d'un château est donc tout à fait identique. Jusqu'en 1973, la mise en bouteille était effectuée par les négociants et non par les producteurs, et se faisait directement à partir des barriques (Lecat et al., 2017). De ce fait, deux bouteilles du même millésime d'un même château peuvent présenter des signatures chimiques relativement différentes si les deux bouteilles ne sont pas issues de la même barrique. Pour ces cas bien précis, les résultats obtenus par RMN ^1H doivent être utilisés avec beaucoup de précautions.

5. Rôle d'une base de données dans un processus de classement des vins

Lors de cette thèse, il a semblé judicieux de créer une base de données dans l'objectif d'authentifier des vins. Les vins issus d'une même région de production semblent bien avoir une signature chimique commune singulière permettant de les différencier les uns des autres, et ce, quelles que soient leurs années de production. Ainsi, la RMNq permettrait d'évaluer l'authenticité d'un vin grâce à une multitude de marqueurs appartenant à des familles chimiques différentes. La mise en commun de toutes ces analyses dans une seule et même base de données pourrait alors permettre la comparaison d'un vin avec un ensemble de vins aux caractéristiques précises en termes d'origine, de composition ou de millésime.

L'utilisation de cette base de données implique par contre une mise à jour régulière des vins analysés afin de pallier aux biais que pourraient engendrer les modifications du métabolome d'un vin pendant son vieillissement en bouteille. Sa validité dans le temps devrait être étudiée, pour éviter des jugements erronés dépendant de la date d'analyse. Pour pallier à cette éventualité, la détermination de composés stables dans le temps, comme évoqué précédemment, est primordiale afin de juger convenablement de l'authenticité d'un vin.

Dans une optique de détection des fraudes, la base de données pourrait indiquer une non-conformité du vin analysé et donner des informations sur son origine. Cependant, pour qu'une base de données soit utile aux juristes et aux experts affectés à ces affaires, elle doit absolument leur être accessible. Ce point peut faire l'objet de discussions tant les informations contenues dans la base peuvent être jugées sensibles par les professionnels.

Conclusion générale

Les travaux réalisés lors de cette thèse ont montré que la technique de RMNq permet de déterminer si un vin est authentique par comparaison avec une bouteille originale, comme en sont capables les analyses officielles. Le faible volume nécessaire pour réaliser ces dosages est un atout considérable pour l'authentification de vins suspects de valeurs potentiellement inestimables. Un des atouts de cette méthode est de pouvoir doser simultanément plusieurs dizaines de composés de familles chimiques différentes lors d'une seule acquisition relativement rapide.

Au cours de ces études une méthode de dosage des métabolites du vin par RMN ^1H a été mise au point. Les paramètres de préparation des échantillons, d'acquisition des spectres, et de post-acquisition ont été définis et fixés pour permettre une quantification reproductible. La précision des dosages a été validée par comparaison avec des résultats issus de méthodes analytiques classiques.

Cette méthode d'analyse métabolomique quantitative a été appliquée sur des vins français et chinois. L'obtention de ces données, en combinaison avec des analyses statistiques appropriées, ont permis de juger du potentiel et des limitations de la méthode à pouvoir authentifier des vins selon leurs caractéristiques propres. Les résultats ont mis en évidence l'influence de l'origine, du cépage, et du millésime sur le métabolome des vins. L'effet terroir a été observé comme en témoigne la diversité des marqueurs chimiques permettant la discrimination des vins.

Afin d'essayer de modéliser les données quantitatives obtenues après analyse des vins par RMN ^1H , une base de données a été créée. Elle présente un double intérêt, puisqu'en complément du stockage des données, un outil de comparaison des vins a été développé. A partir des données quantitatives, il est possible de comparer un vin avec un autre vin ou avec un ensemble de vins aux caractéristiques communes bien précises.

Enfin, la technique de RMN ^1H a démontré sa puissance dans sa capacité à authentifier un vin par comparaison avec un vin authentique. Les analyses par RMN ont été réalisées grâce à une collaboration avec le Château Mouton-Rothschild et les résultats ont été comparés par rapports aux méthodes officielles définies dans le recueil de l'OIV. La similitude des conclusions obtenues laisse entrevoir que la métabolomique par RMN pourrait se faire une place dans les organes de contrôles et de détection des fraudes.

Malgré les résultats probants de cette technique sur la classification des vins décrits dans de nombreux articles, certains points critiques n'avaient jamais été discutés jusque-là. La reconnaissance du millésime en est un : dans la majorité des études, les vins de différents millésimes sont analysés sur une courte période ce qui peut générer un biais dans l'interprétation des données. L'étude de l'effet du vieillissement sur le métabolome du vin sur une période relativement longue devient alors essentielle pour définir des marqueurs permettant la datation. En outre, cette étude permettra de déterminer une gamme de métabolites qui n'évolue pas au cours du temps et qui pourront donc servir

à l'authentification de vieux millésimes à partir de leur profil de vin jeune présent dans la base de données.

La suite de ce travail effectué uniquement sur vins rouges devra être étendue à la classification et au potentiel d'authentification de la RMN ^1H des vins blancs secs et liquoreux, effervescents et spiritueux. Les vins blancs monocépages produits dans les différentes régions françaises devront être étudiés (sauvignon du Bordelais et de Loire par exemple). Dans le cas des vins liquoreux, l'influence de *Botrytis cinerea* sur les données obtenues par RMNq pourra être étudiée. De la même façon, les travaux pourront se poursuivre sur les vins de Champagne et les spiritueux, produits à forte valeur ajoutée, faisant d'eux une cible de choix de contrefacteurs. L'augmentation du nombre d'échantillons contenu dans la base de données sera primordiale pour initier ces travaux, mais également pour confirmer les résultats présentés en chapitre III de cette thèse à l'échelle nationale, et pour permettre de remonter à l'origine d'un vin de n'importe quel pays viticole à l'échelle internationale. Tous les travaux présentés se sont focalisés sur la discrimination des vins par analyses ciblées. La mise en place d'outils fiables permettant le développement d'analyses non-ciblées devra être étudiée afin de déterminer si les parties du spectre non prises en compte par RMNq peuvent être discriminantes dans ces analyses. La base de donnée devra alors être adaptée afin que les données issues des analyses non-ciblées puissent y être incluses. Enfin, la transposition de cette méthode développée sur les vins à d'autres parties de la vigne telles que les baies, les moûts, les feuilles ou les sarments est engagée, comme en attestent les travaux réalisés au laboratoire et présentés en Annexe 2.

Références bibliographiques

- AFP. (2014, January 29). La Chine devient premier consommateur de vin rouge du monde. Retrieved October 1, 2018, from <https://www.sudouest.fr/2014/01/29/la-chine-devient-premier-consommateur-de-vin-rouge-du-monde-1445019-789.php>
- AFP. (2018a, April 5). 400 000 euros d’amende pour la société qui avait fait passer des vins du Languedoc pour des Bordeaux. Retrieved October 1, 2018, from https://www.lemonde.fr/police-justice/article/2018/04/05/400-000-euros-d-amende-pour-la-societe-qui-avait-fait-passer-des-vins-du-languedoc-pour-des-bordeaux_5281209_1653578.html
- AFP. (2018b, July 9). Des millions de litres de rosé espagnol vendus pour du vin français. Retrieved October 1, 2018, from https://www.challenges.fr/economie/des-millions-de-litres-de-rose-espagnol-vendus-pour-du-vin-francais_600015
- Akoka, S., Barantin, L., & Trierweiler, M. (1999). Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Analytical Chemistry*, 71(13), 2554–2557. <https://doi.org/10.1021/ac981422i>
- Ali, K., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *Journal of Biomolecular NMR*, 49(3–4), 255–266. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9487-3>
- Amaral, F. M., & Caro, M. S. B. (2005). Investigation of different pre-concentration methods for NMR analyses of Brazilian white wine. *Food Chemistry*, 93(3), 507–510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.039>
- Amargianitaki, M., & Spyros, A. (2017). NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0092-x>
- Anastasiadi, M., Zira, A., Magiatis, P., Haroutounian, S. A., Skaltsounis, A. L., & Mikros, E. (2009). 1H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(23), 11067–11074. <https://doi.org/10.1021/jf902137e>
- Angus, N. S., O’Keeffe, T. J., Stuart, K. R., & Miskelly, G. M. (2006). Regional classification of New Zealand red wines using inductively-coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00057.x>
- Aru, V., Sørensen, K., Khakimov, B., Toldam-Andersen, T., & Balling Engelsen, S. (2018). Cool-Climate Red Wines—Chemical Composition and Comparison of Two Protocols for 1H–NMR Analysis. *Molecules*, 23(1), 160. <https://doi.org/10.3390/molecules23010160>
- Avenoz, A., Busto, J. H., Canal, N., & Peregrina, J. M. (2006). Time Course of the Evolution of Malic and Lactic Acids in the Alcoholic and Malolactic Fermentation of Grape Must by

- Quantitative ¹ H NMR (qHNMR) Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4715–4720. <https://doi.org/10.1021/jf060778p>
- Baiano, A., Terracone, C., Longobardi, F., Ventrella, A., Agostiano, A., & Del Nobile, M. A. (2012). Effects of different vinification technologies on physical and chemical characteristics of Sauvignon blanc wines. *Food Chemistry*, 135(4), 2694–2701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.075>
- Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., & Casetta, B. (1995). HPLC/MS Application to Anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(8), 2104–2109. <https://doi.org/10.1021/jf00056a027>
- Barbera, F., & Audifredi, S. (2012). In Pursuit of Quality. The Institutional Change of Wine Production Market in Piedmont: In pursuit of quality. *Sociologia Ruralis*, 52(3), 311–331. <https://doi.org/10.1111/j.1467-9523.2012.00567.x>
- Bell, A. A., Ough, C. S., & Kliwer, W. M. (1979). Fermentation and wine quality of nitrogen fertilization of *Vitis vinifera* var. Thompson seedless grapevines, 30(2), 6.
- Bellomarino, S. A., Conlan, X. A., Parker, R. M., Barnett, N. W., & Adams, M. J. (2009). Geographical classification of some Australian wines by discriminant analysis using HPLC with UV and chemiluminescence detection. *Talanta*, 80(2), 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.08.001>
- Beneduce, L., Romano, A., Capozzi, V., Lucas, P., Barnavon, L., Bach, B., ... Spano, G. (2010). Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology*, 60(4), 573–578. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0094-4>
- Berthels, N., Cordero, R., Bauer, F., Thevelein, J., & Pretorius, I. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.02.005>
- Bevin, C. J., Damberg, R. G., Fergusson, A. J., & Cozzolino, D. (2008). Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, 621(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.042>
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>
- Bharti, S. K., Sinha, N., Joshi, B. S., Mandal, S. K., Roy, R., & Khetrapal, C. L. (2008). Improved quantification from ¹H-NMR spectra using reduced repetition times. *Metabolomics*, 4(4), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s11306-008-0130-6>
- Blouin, J., & Cruège, J. (2013). *Analyse et composition des vins. Comprendre le vin*. (2e éd.). Dunod.
- Borràs, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Aceña, L., & Busto, O. (2015). Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment – A review. *Analytica Chimica Acta*, 891, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.042>
- Bouvier, M. (2009). *Le vin, c'est toute une histoire*. Jean-Paul Rocher Editeur.

- Brenot, J.-L. (2016, March 23). Nuits-Saint-Georges : affaire Cottin Frères, un goût d'inachevé. Retrieved October 1, 2018, from <https://www.bienpublic.com/edition-cote-de-nuits/2016/03/22/affaire-laboure-roi-un-arriere-gout-d-inacheve>
- Brescia, M. A., Caldarola, V., De Giglio, A., Benedetti, D., Fanizzi, F. P., & 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.
- Brescia, M. A., Košir, I. J., Caldarola, V., Kidrič, J., & Sacco, A. (2003). Chemometric Classification of Apulian and Slovenian Wines Using ^1H NMR and ICP-OES Together with HPICE Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 21–26. <https://doi.org/10.1021/jf0206015>
- Burton, I. W., Quilliam, M. A., & Walter, J. A. (2005). Quantitative ^1H NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and Other Natural Products. *Analytical Chemistry*, 77(10), 3123–3131. <https://doi.org/10.1021/ac048385h>
- Buttrose, M. S., Hale, C. R., & Kliewer, W. M. (n.d.). Effect of temperature on the composition of “Cabernet sauvignon” berries, 5.
- Cabaroglu, T. (2005). Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. *Food Control*, 16(2), 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.01.008>
- Caruso, M., Galgano, F., Castiglione Morelli, M. A., Viggiani, L., Lencioni, L., Giussani, B., & Favati, F. (2012). Chemical Profile of White Wines Produced from ‘Greco bianco’ Grape Variety in Different Italian Areas by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Conventional Physicochemical Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 7–15. <https://doi.org/10.1021/jf204289u>
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol Profiles of *Vitis vinifera* Red Grapes and Their Single-Cultivar Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 992–1002. <https://doi.org/10.1021/jf062800k>
- Chabreyrie, D., Chauvet, S., Guyon, F., Salagoity, M.-H., Antinelli, J.-F., & Medina, B. (2008). Characterization and Quantification of Grape Variety by Means of Shikimic Acid Concentration and Protein Fingerprint in Still White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 6785–6790. <https://doi.org/10.1021/jf800117k>
- Chang, E.-H., Jung, S.-M., Park, S.-J., Noh, J.-H., Hur, Y.-Y., Nam, J. C., & Park, K. S. (2014). Wine quality of grapevine ‘Cheongsoo’ and the relevant metabolites on proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy at the different harvest times., 8.
- Choné, X., Van Leeuwen, C., Chéry, P. H., & Ribéreau-Gayon, P. (2001). Terroir influence on water status and nitrogen status of non-irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*): vegetative development, must and wine composition. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 22(1), 8–15.

- Clark, S., Barnett, N. W., Adams, M., Cook, I. B., Dyson, G. A., & Johnston, G. (2006). Monitoring a commercial fermentation with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy with the aid of chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 338–345.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.033>
- Cobas, C., Seoane, F., & Domínguez, S. (2011). A new approach to improving automated analysis of proton NMR spectra through Global Spectral Deconvolution (GSD), 23(1), 5.
- Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux. (n.d.). Répartition des cépages rouges. Retrieved August 16, 2018, from www.bordeaux.com/fr/Notre-Terroir/Cepages
- Consonni, R., Cagliani, L. R., Guantieri, V., & Simonato, B. (2011). Identification of metabolic content of selected Amarone wine. *Food Chemistry*, 129(2), 693–699.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.008>
- Coulter, A. D., Godden, P. W., & Pretorius, I. S. (2004). How is it formed, what is its effect on titratable acidity, and what factors influence its concentration in wine? *Wine Industry Journal*, 19(6), 10.
- Cozzolino, D., Smyth, H. E., & Gishen, M. (2003). Feasibility Study on the Use of Visible and Near-Infrared Spectroscopy Together with Chemometrics To Discriminate between Commercial White Wines of Different Varietal Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7703–7708. <https://doi.org/10.1021/jf034959s>
- Cubero-Leon, E., Peñalver, R., & Maquet, A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95–107.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.041>
- Da Silva Neto, H. G., da Silva, J. B. P., Pereira, G. E., & Hallwass, F. (2009). Determination of metabolite profiles in tropical wines by ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 47(S1), S127–S129. <https://doi.org/10.1002/mrc.2520>
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026>
- Dartiguenave, C., Jeandet, P., & Maujean, A. (2000). Changes in the Buffering Capacity of Model Solutions of 40 mM Tartaric or Malic Acids in Relation to Amino Acids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(4), 347.
- De Pascali, S. A., Coletta, A., Del Coco, L., Basile, T., Gambacorta, G., & Fanizzi, F. P. (2014). Viticultural practice and winemaking effects on metabolic profile of Negroamaro. *Food Chemistry*, 161, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.128>
- Di Paola-Naranjo, R. D., Baroni, M. V., Podio, N. S., Rubinstein, H. R., Fabani, M. P., Badini, R. G., ... Wunderlin, D. A. (2011). Fingerprints for Main Varieties of Argentinean Wines: Terroir Differentiation by Inorganic, Organic, and Stable Isotopic Analyses Coupled to

- Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7854–7865.
<https://doi.org/10.1021/jf2007419>
- Drappier, J., Thibon, C., Rabot, A., & Geny-Denis, L. (2017). Relationship between wine composition and temperature: Impact on Bordeaux wine typicity in the context of global warming—Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1355776>
- Du, Y.-Y., Bai, G.-Y., Zhang, X., & Liu, M.-L. (2007). Classification of wines based on combination of ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chinese Journal of Chemistry*, 25(7), 930–936.
- Esslinger, S., Riedl, J., & Fauhl-Hassek, C. (2014). Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.015>
- Esslinger, Susanne, Fauhl-Hassek, C., & Wittkowski, R. (2015). Authentication of Wine by ¹H-NMR Spectroscopy: Opportunities and Challenges. In S. B. Ebeler, G. Sacks, S. Vidal, & P. Winterhalter (Eds.), *Advances in Wine Research* (Vol. 1203, pp. 85–108). Washington, DC: American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1203.ch006>
- EUIPO. (2016). The economic cost of IPR infringement in spirits and wine. Retrieved from https://euipo.europa.eu/tunnel-web/secure/webdav/guest/document_library/observatory/resources/research-and-studies/ip_infringement/study8/wines_and_spirits_en.pdf
- Fan, S., Zhong, Q., Fauhl-Hassek, C., Pfister, M. K.-H., Horn, B., & Huang, Z. (2018). Classification of Chinese wine varieties using ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food Control*, 88, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.002>
- Farrant, R. D., Hollerton, J. C., Lynn, S. M., Provera, S., Sidebottom, P. J., & Upton, R. J. (2010). NMR quantification using an artificial signal. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(10), 753–762. <https://doi.org/10.1002/mrc.2647>
- Fotakis, C., Kokkotou, K., Zoumpoulakis, P., & Zervou, M. (2013). NMR metabolite fingerprinting in grape derived products: An overview. *Food Research International*, 54(1), 1184–1194.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.032>
- FranceAgriMer. (2018, March). Les synthèses de FranceAgriMer - Vins et spiritueux: Commerce extérieur Bilan 2017. Retrieved October 1, 2018, from <http://www.franceagrimer.fr/content/download/55986/541637/file/SYN-VIN-2018-Commerce-exterieur-bilan%202017-A18M03.pdf>
- FranceAgriMer, & CNIV. (2016). Analyse des filières vitivinicoles des principaux pays producteurs dans le monde - France. Retrieved July 7, 2018, from <http://www.franceagrimer.fr/content/download/48451/464791/file/SYNTHESE%20FILIERE%20FRANCE.pdf>

- Galet, P. (2000). *Précis de viticulture* (7e éd.).
- Galgano, F., Favati, F., Caruso, M., Scarpa, T., & Palma, A. (2008). Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to provenance. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1808–1815. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.01.015>
- Gallo, V., Intini, N., Mastrorilli, P., Latronico, M., Scapicchio, P., Triggiani, M., ... Valerio, M. (2015). Performance Assessment in Fingerprinting and Multi Component Quantitative NMR Analyses. *Analytical Chemistry*, 87(13), 6709–6717. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00919>
- Gardner, N., Rodrigue, N., & Champagne, C. P. (1993). Combined Effects of Sulfites, Temperature, and Agitation Time on Production of Glycerol in Grape Juice by *Saccharomyces cerevisiae*, 59, 7.
- Gawel, R., Smith, P. A., Cicerale, S., & Keast, R. (2017). The mouthfeel of white wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–18. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1346584>
- Geana, E. I., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O. R., Ionete, R. E., Stefanescu, I., ... Bala, C. (2016). Classification of red wines using suitable markers coupled with multivariate statistic analysis. *Food Chemistry*, 192, 1015–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.112>
- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23), 5610–5619. <https://doi.org/10.1021/jf400800d>
- Godelmann, R., Kost, C., Patz, C.-D., Ristow, R., & Wachter, H. (2016). Quantitation of Compounds in Wine Using ¹H NMR Spectroscopy: Description of the Method and Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 99(5), 1295–1304. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0318>
- Gómez-Meire, S., Campos, C., Falqué, E., Díaz, F., & Fdez-Riverola, F. (2014). Assuring the authenticity of northwest Spain white wine varieties using machine learning techniques. *Food Research International*, 60, 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.032>
- González-Neves, G., Franco, J., Barreiro, L., Gil, G., Moutounet, M., & Carbonneau, A. (2007). Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *European Food Research and Technology*, 225(1), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0388-8>
- Gougeon, L., Da Costa, G., Ma, W., Teissedre, P.-L., Guyon, F., & Richard, T. (2018). Wine Analysis and Authenticity Using ¹H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines. *Food Analytical Methods*. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1310-2>

- Gougeon, L., da Costa, G., Richard, T., & Guyon, F. (2019). Wine Authenticity by Quantitative ^1H NMR Versus Multitechnique Analysis: a Case Study. *Food Analytical Methods*.
<https://doi.org/10.1007/s12161-018-01425-z>
- Green, J. A., Parr, W. V., Breitmeyer, J., Valentin, D., & Sherlock, R. (2011). Sensory and chemical characterisation of Sauvignon blanc wine: Influence of source of origin. *Food Research International*, 44(9), 2788–2797. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.005>
- Guerra, B., & Steenwerth, K. (2012). Influence of Floor Management Technique on Grapevine Growth, Disease Pressure, and Juice and Wine Composition: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(2), 149–164. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10001>
- Hanganu, A., Todasca, M.-C., Chira, N.-A., & Rosca, S. (2011). Influence of Common and Selected Yeasts on Wine Composition Studied Using ^1H -NMR Spectroscopy. *REV. CHIM.*, (7), 4.
- Holmberg. (2010). Wine fraud. *International Journal of Wine Research*, 105.
<https://doi.org/10.2147/IJWR.S14102>
- Holzapfel, B. P., & Treeby, M. T. (2007). Effects of timing and rate of N supply on leaf nitrogen status, grape yield and juice composition from Shiraz grapevines grafted to one of three different rootstocks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(1), 14–22.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2007.tb00067.x>
- Hong, E., Lee, S. Y., Jeong, J. Y., Park, J. M., Kim, B. H., Kwon, K., & Chun, H. S. (2017). Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category: Adulterated food categories and their analytical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 3877–3896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8364>
- Hong, Y.-S., Cilindre, C., Liger-Belair, G., Jeandet, P., Hertkorn, N., & Schmitt-Kopplin, P. (2011). Metabolic Influence of Botrytis cinerea Infection in Champagne Base Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7237–7245. <https://doi.org/10.1021/jf200664t>
- Hu, B., Yue, Y., Zhu, Y., Wen, W., Zhang, F., & Hardie, J. W. (2015). Proton Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopic Discrimination of Wines Reflects Genetic Homology of Several Different Grape (*V. vinifera* L.) Cultivars. *PLOS ONE*, 10(12), e0142840.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142840>
- Huang, Z., & Ough, C. S. (1989). Effect of Vineyard Locations, Varieties, and Rootstocks on the Juice Amino Acid Composition of Several Cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(2), 135.
- Hubert, P., Perrot, F., Gaye, J., Médina, B., & Pravikoff, M. S. (2009). Radioactivity measurements applied to the dating and authentication of old wines. *Comptes Rendus Physique*, 10(7), 622–629. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2009.08.007>
- Huglin, P., & Schneider, C. (1998). *Biologie et écologie de la vigne* (Lavoisier). Paris.

- Imparato, G., Paolo, E. D., Braca, A., & Lamanna, R. (2011). Nuclear Magnetic Resonance Profiling of Wine Blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4429–4434.
<https://doi.org/10.1021/jf200587n>
- Ioannou-Papayianni, E., Kokkinofta, R. I., & Theocharis, C. R. (2011). Authenticity of Cypriot Sweet Wine Commandaria Using FT-IR and Chemometrics. *Journal of Food Science*, 76(3), C420–C427. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02048.x>
- Jackson, D. I., & Lombard, P. B. (1993). Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality - A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409.
- Jacobs, D. L. (2013, April 11). \$12 Million Punitive Damages Award For Bill Koch Will Prolong His Wine Fraud Case. Retrieved October 1, 2018, from
<https://www.forbes.com/sites/deborahljacobs/2013/04/11/billionaire-scores-victory-in-battle-against-counterfeit-trophy-wines/#756d40f91e9d>
- Jaitz, L., Siegl, K., Eder, R., Rak, G., Abranko, L., Koellensperger, G., & Hann, S. (2010). LC–MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry*, 122(1), 366–372.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.053>
- Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 27–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007>
- Kennedy, J. (2002). Understanding grape berry development, 6.
- Kjeldahl, K., & Bro, R. (2010). Some common misunderstandings in chemometrics. *Journal of Chemometrics*, 24(7–8), 558–564. <https://doi.org/10.1002/cem.1346>
- Kliewer, W. M. (1967). The Glucose-Fructose Ratio of *Vitis Vinifera* Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18(1), 33.
- Košir, Iztok J., & Kidrič, J. (2001). Identification of Amino Acids in Wines by One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 50–56. <https://doi.org/10.1021/jf0008137>
- Košir, Iztok Jože, & Kidrič, J. (2002). Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 77–84.
- Kruzlicova, D., Mocak, J., Balla, B., Petka, J., Farkova, M., & Havel, J. (2009). Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Food Chemistry*, 112(4), 1046–1052. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.047>
- Laghi, L., Versari, A., Marcolini, E., & Parpinello, G. P. (2014). Metabonomic Investigation by ¹H-NMR to Discriminate between Red Wines from Organic and Biodynamic Grapes. *Food and Nutrition Sciences*, 05(01), 52–59. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.51007>

- Larive, C. K., Jayawickrama, D., & Orfi, L. (1997). Quantitative Analysis of Peptides with NMR Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 51(10), 1531–1536.
<https://doi.org/10.1366/0003702971939055>
- Lecat, B., Brouard, J., & Chapuis, C. (2017). Fraud and counterfeit wines in France: an overview and perspectives. *British Food Journal*, 119(1), 84–104. <https://doi.org/10.1108/BFJ-09-2016-0398>
- Lee, J.-E., Hong, Y.-S., & Lee, C.-H. (2009). Characterization of Fermentative Behaviors of Lactic Acid Bacteria in Grape Wines through ¹H NMR- and GC-Based Metabolic Profiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4810–4817. <https://doi.org/10.1021/jf900502a>
- 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 1H NMR-based metabolomic study. *Analytica Chimica Acta*, 648(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.039>
- Liu, L., Cozzolino, D., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Janik, L., O'Neill, B. K., ... Gishen, M. (2008). Preliminary study on the application of visible–near infrared spectroscopy and chemometrics to classify Riesling wines from different countries. *Food Chemistry*, 106(2), 781–786. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.015>
- López-Rituerto, E., Avenzoza, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. (2010). Evidence of Metabolic Transformations of Amino Acids into Higher Alcohols through ¹³C NMR Studies of Wine Alcoholic Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4923–4927.
<https://doi.org/10.1021/jf904442d>
- López-Rituerto, E., Avenzoza, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. (2013). NMR Study of Histidine Metabolism during Alcoholic and Malolactic Fermentations of Wine and Their Influence on Histamine Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(39), 9464–9469.
<https://doi.org/10.1021/jf402489g>
- López-Rituerto, E., Cabredo, S., Lopez, M., Avenzoza, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. (2009). A thorough study on the use of quantitative 1H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2112–2118.
- López-Rituerto, E., Savorani, F., Avenzoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M., & Engelsen, S. B. (2012). Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using 1H NMR Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(13), 3452–3461.
<https://doi.org/10.1021/jf204361d>
- Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., & Teissedre, P.-L. (2013). Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules*, 18(1), 1076–1100.
<https://doi.org/10.3390/molecules18011076>
- Luykx, D. M. A. M., & van Ruth, S. M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897–911.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.038>

- Magdas, D. A., Guyon, F., Feher, I., & Pinzaru, S. C. (2018). Wine discrimination based on chemometric analysis of untargeted markers using FT-Raman spectroscopy. *Food Control*, 85, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.024>
- Maiwald, M., Steinhof, O., Sleight, C., Bernstein, M., & Hasse, H. (2008). Quantitative High-Resolution Online NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Reaction and Process Monitoring. In *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis* (pp. 471–491). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53173-5.00020-2>
- Makris, D. P., Kallithraka, S., & Mamalos, A. (2006). Differentiation of young red wines based on cultivar and geographical origin with application of chemometrics of principal polyphenolic constituents. *Talanta*, 70(5), 1143–1152. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.024>
- Mansson, P.-H. (2004, December 10). Judges Issue Verdict in Burgundy Fraud Case. Retrieved October 1, 2018, from https://www.winespectator.com/webfeature/show/id/Judges-Issue-Verdict-in-Burgundy-Fraud-Case_2311
- Marchand, S., de Revel, G., & Bertrand, A. (2000). Approaches to Wine Aroma: Release of Aroma Compounds from Reactions between Cysteine and Carbonyl Compounds in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4890–4895. <https://doi.org/10.1021/jf000149u>
- Mardones, C., Hitschfeld, A., Contreras, A., Lepe, K., Gutiérrez, L., & von Baer, D. (2005). Comparison of shikimic acid determination by capillary zone electrophoresis with direct and indirect detection with liquid chromatography for varietal differentiation of red wines. *Journal of Chromatography A*, 1085(2), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.022>
- Martin, C., Bruneel, J.-L., Guyon, F., Médina, B., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., & Guillaume, F. (2015). Raman spectroscopy of white wines. *Food Chemistry*, 181, 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.076>
- Martin-Pastor, M., Guitian, E., & Riguera, R. (2016). Joint NMR and Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography Chemometric Approach for Very Complex Mixtures: Grape and Zone Identification in Wines. *Analytical Chemistry*, 88(12), 6239–6246. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04505>
- Matthews, M. A., & Anderson, M. M. (1988). Fruit Ripening in *Vitis vinifera* L.: Responses to Seasonal Water Deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(4).
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7692–7702. <https://doi.org/10.1021/jf061538c>
- Mazzei, P., Francesca, N., Moschetti, G., & Piccolo, A. (2010). NMR spectroscopy evaluation of direct relationship between soils and molecular composition of red wines from Aglianico grapes. *Analytica Chimica Acta*, 673(2), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.003>
- Mazzei, P., Spaccini, R., Francesca, N., Moschetti, G., & Piccolo, A. (2013). Metabolomic by 1H NMR Spectroscopy Differentiates “Fiano Di Avellino” White Wines Obtained with Different

- Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(45), 10816–10822.
<https://doi.org/10.1021/jf403567x>
- Médina, B., Salagoity, M. H., Guyon, F., Gaye, J., Hubert, P., & Guillaume, F. (2013). Using new analytical approaches to verify the origin of wine. In *New Analytical Approaches for Verifying the Origin of Food* (pp. 149–188). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857097590.3.149>
- Mehr, K., John, B., Russell, D., & Avizonis, D. (2008). Electronic Referencing Techniques for Quantitative NMR: Pitfalls and How To Avoid Them Using Amplitude-Corrected Referencing through Signal Injection. *Analytical Chemistry*, 80(21), 8320–8323.
<https://doi.org/10.1021/ac800865c>
- Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation. (2018). Arrêté du 28 juin 2018 portant fixation du barème indicatif de la valeur vénale moyenne des terres agricoles en 2017. Retrieved September 28, 2018, from
<http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/venale2018baremebsva.pdf>
- Minoja, A. P., & Napoli, C. (2014). NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. *Food Research International*, 63, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.056>
- Monakhova, Y. B., Schäfer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Kuballa, T., & Lachenmeier, D. W. (2011). Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ^1H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages: Eightfold suppression of water and ethanol signals in ^1H NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49(11), 734–739.
<https://doi.org/10.1002/mrc.2823>
- Monakhova, Y. B., Tsikin, A. M., Kuballa, T., Lachenmeier, D. W., & Mushtakova, S. P. (2014). Independent component analysis (ICA) algorithms for improved spectral deconvolution of overlapped signals in ^1H NMR analysis: application to foods and related products: ICA deconvolution of overlapped NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 52(5), 231–240. <https://doi.org/10.1002/mrc.4059>
- Nilsson, M., Duarte, I. F., Almeida, C., Delgadillo, I., Goodfellow, B. J., Gil, A. M., & Morris, G. A. (2004). High-Resolution NMR and Diffusion-Ordered Spectroscopy of Port Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3736–3743. <https://doi.org/10.1021/jf049797u>
- Ogrinc, N., Košir, I. J., Kocjančič, M., & Kidrič, J. (2001). Determination of Authenticity, Regional Origin, and Vintage of Slovenian Wines Using a Combination of IRMS and SNIF-NMR Analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1432–1440.
<https://doi.org/10.1021/jf000911s>
- OIV. (2002). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D’ANALYSES – OIV : Acide D-malique – Méthode enzymatique. OIV-MA-AS313-12B. Retrieved September 17, 2018, from
<http://www.oiv.int/public/medias/2358/oiv-ma-as313-12b.pdf>
- OIV. (2004). RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D’ANALYSES – OIV : Dosage des acides organiques et anions minéraux dans les vins par chromatographie ionique. Méthode

- OIV-MA-AS313-16. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2364/oiv-ma-as313-16.pdf>
- OIV. (2007). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Détermination par CLHP de neuf anthocyanes principales dans le vin rouge et rosé. Méthode OIV-MA-AS315-11. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2389/oiv-ma-as315-11.pdf>
- OIV. (2010). RESOLUTION OIV/VITI 333/2010 - DEFINITION DU « TERROIR » VITIVINICOLE. Retrieved June 12, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/382/viti-2010-1-fr.pdf>
- OIV. (2011). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Méthode pour le dosage de sulfate dans le vin par électrophorèse capillaire. Méthode OIV-MA-AS313-19. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2367/oiv-ma-as313-19.pdf>
- OIV. (2015). Définition de base (18/73). Retrieved June 12, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/3961/f-code-i-31.pdf>
- OIV. (2018). 2017 World Vitiviniculture Situation - OIV Statistical Report on World Viticulture. Retrieved May 31, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>
- OIV. (n.d.-a). RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV : Amines biogènes par HPLC. Méthode OIV-MA-AS315-18. Retrieved October 9, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2395/oiv-ma-as315-18.pdf>
- OIV. (n.d.-b). RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV : Polyols dérivant des sucres. Méthode OIV-MA-AS311-06. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2335/oiv-ma-as311-06.pdf>
- OIV. (n.d.-c). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Acide citrique - Méthode chimique. Méthode OIV-MA-AS313-08. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2353/oiv-ma-as313-08.pdf>
- OIV. (n.d.-d). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Acide citrique – Mode enzymatique. Méthode OIV-MA-AS313-09. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2354/oiv-ma-as313-09.pdf>
- OIV. (n.d.-e). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Acide lactique – Méthode enzymatique. Méthode OIV-MA-AS313-07. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2352/oiv-ma-as313-07.pdf>
- OIV. (n.d.-f). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Acide tartrique. Méthode OIV-MA-AS313-05A. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2351/oiv-ma-as313-05a.pdf>

- OIV. (n.d.-g). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES - OIV : Acides organiques. Méthode OIV-MA-AS313-04. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2501/oiv-ma-as313-04.pdf>
- OIV. (n.d.-h). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Analyse des composés volatils des vins par chromatographie en phase gazeuse. Méthode OIV-MA-AS315-27. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/5155/oiv-ma-as315-27.pdf>
- OIV. (n.d.-i). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Détermination de la répartition du deutérium dans l'éthanol. Méthode OIV-MA-AS311-05. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/2334/oiv-ma-as311-05.pdf>
- OIV. (n.d.-j). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Méthode pour le dosage de sulfate dans le vin par électrophorèse capillaire. Méthode OIV-MA-AS313-19. Retrieved January 7, 2019, from <http://www.oiv.int/public/medias/2367/oiv-ma-as313-19.pdf>
- OIV. (n.d.-k). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Sucres. Méthode OIV-MA-AS311-03. Retrieved January 7, 2019, from <http://www.oiv.int/public/medias/2332/oiv-ma-as311-03.pdf>
- OIV. (n.d.-l). RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV : Titre alcoométrique volumique – Méthode OIV-MA-AS312-01A. Retrieved September 17, 2018, from <http://www.oiv.int/public/medias/5154/oiv-ma-as312-01a.pdf>
- Oliver, S., Winson M., Kell D., Banganz F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 373–378. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1)
- Papotti, G., Bertelli, D., Graziosi, R., Silvestri, M., Bertacchini, L., Durante, C., & Plessi, M. (2013). Application of One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy for the Characterization of Protected Designation of Origin Lambrusco Wines of Modena. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1741–1746. <https://doi.org/10.1021/jf302728b>
- Pavloušek, P., & Kumšta, M. (2013). Authentication of Riesling wines from the Czech Republic on the basis of the non-flavonoid phenolic compounds. *Czech Journal of Food Sciences*, 31(No. 5), 474–482. <https://doi.org/10.17221/40/2013-CJFS>
- Pereira, Giuliano E., Gaudillere, J.-P., Van Leeuwen, C., Hilbert, G., Lavialle, O., Maucourt, M., ... Rolin, D. (2005). ¹H NMR and Chemometrics To Characterize Mature Grape Berries in Four Wine-Growing Areas in Bordeaux, France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6382–6389. <https://doi.org/10.1021/jf058058q>
- Pereira, Giuliano Elias, Gaudillere, J., Van Leeuwen, C., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., ... Rolin, D. (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.
- Peynaud, E., & Blouin, J. (2013). *Le Goût du Vin* (5e édition). Dunod.
- Peyrot des Gachons, C., Van Leeuwen, C., Tominaga, T., Soyer, J.-P., Gaudillère, J.-P., & Dubourdieu, D. (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions: Influence of water and nitrogen deficit on grape aroma potential. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 73–85. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1919>
- Picone, G., Trimigno, A., Tessarin, P., Donnini, S., Rombolà, A. D., & Capozzi, F. (2016). 1H NMR foodomics reveals that the biodynamic and the organic cultivation managements produce different grape berries (*Vitis vinifera* L. cv. Sangiovese). *Food Chemistry*, 213, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.077>
- Radden Keefe, P. (2007, September 3). The Jefferson Bottles : How could one collector find so much rare fine wine? Retrieved October 1, 2018, from <https://www.newyorker.com/magazine/2007/09/03/the-jefferson-bottles>
- Radler, F., & Schtitz, H. (1982). GLYCEROL PRODUCTION OF VARIOUS STRAINS OF, 33(1), 5.
- Ragone, R., Crupi, P., Piccinonna, S., Bergamini, C., Mazzone, F., Fanizzi, F. P., ... Antonacci, D. (2015). Classification and chemometric study of Southern Italy monovarietal wines based on NMR and HPLC-DAD-MS. *Food Science and Biotechnology*, 24(3), 817–826. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0106-z>
- Rankine, B. C. (1967). Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18(12), 583–589. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740181208>
- Rankine, B. C., & Bridson, D. A. (n.d.). GLYCEROL IN AUSTRALIAN WINES AND FACTORS INFLUENCING ITS FORMATION, 7.
- Revilla, I., & González-SanJosé, M. L. (1998). Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. *Food Chemistry*, 63(3), 307–312. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00049-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00049-1)
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2012). *Traité d'Oenologie - Tome 1 - 6e éd. - Microbiologie du vin, Vinifications* (6e ed.). Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2012). *Traité d'Oenologie - Tome 2 - 6e éd. - Chimie du vin, Stabilisation et traitements* (6e ed.). Dunod.
- Riedl, J., Esslinger, S., & Fahl-Hassek, C. (2015). Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication. *Analytica Chimica Acta*, 885, 17–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.003>

- Rochfort, S., Ezernieks, V., Bastian, S. E. P., & Downey, M. O. (2010). Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chemistry*, 121(4), 1296–1304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.067>
- Román, T., Nicolini, G., Barp, L., Malacarne, M., Tait, F., & Larcher, R. (2018). Shikimic acid concentration in white wines produced with different processing protocols from fungus-resistant grapes growing in the Alps. *VITIS - Journal of Grapevine Research*, Vol 57 No 2 (2018): Vitis. <https://doi.org/10.5073/vitis.2018.57.41-46>
- Romano, P., & Suzzi, G. (1996). Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.*, 62, 7.
- Rothwell, J., & Atlas, R. (2016). *Sour Grapes*. Dogwoof, London.
- Sanders, E. M. (1985). Determination of Free Amino Acids in Wine by HPLC, 36(1), 4.
- Schreier, P., & Jennings, W. G. (1979). Flavor composition of wines: A review. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12(1), 59–111. <https://doi.org/10.1080/10408397909527273>
- Serapinas, P., Venskutonis, P. R., Aninkevičius, V., Ežerinskis, Ž., Galdikas, A., & Juzikienė, V. (2008). Step by step approach to multi-element data analysis in testing the provenance of wines. *Food Chemistry*, 107(4), 1652–1660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.003>
- Serrano-Lourido, D., Saurina, J., Hernández-Cassou, S., & Checa, A. (2012). Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis. *Food Chemistry*, 135(3), 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.010>
- Sigma. (n.d.). Quantitative NMR - Technical Details and TraceCERT® Certified Reference Materials. Retrieved October 9, 2018, from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Brochure/1/qnmr-brochure-rjo.pdf>
- Skogerson, K., Runnebaum, R., Wohlgemuth, G., de Ropp, J., Heymann, H., & Fiehn, O. (2009). Comparison of Gas Chromatography-Coupled Time-of-Flight Mass Spectrometry and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Metabolite Identification in White Wines from a Sensory Study Investigating Wine Body. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6899–6907. <https://doi.org/10.1021/jf9019322>
- Smart, R. E., Dick, J. K., Gravett, I. M., & Fisher, B. M. (1990). Canopy Management to Improve Grape Yield and Wine Quality - Principles and Practices. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 11(1). <https://doi.org/10.21548/11-1-2232>
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Ahn, H.-J., Park, W.-M., Lee, C.-H., & Hong, Y.-S. (2009). Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ¹H NMR spectroscopic data. *Food Research International*, 42(10), 1483–1491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.08.006>

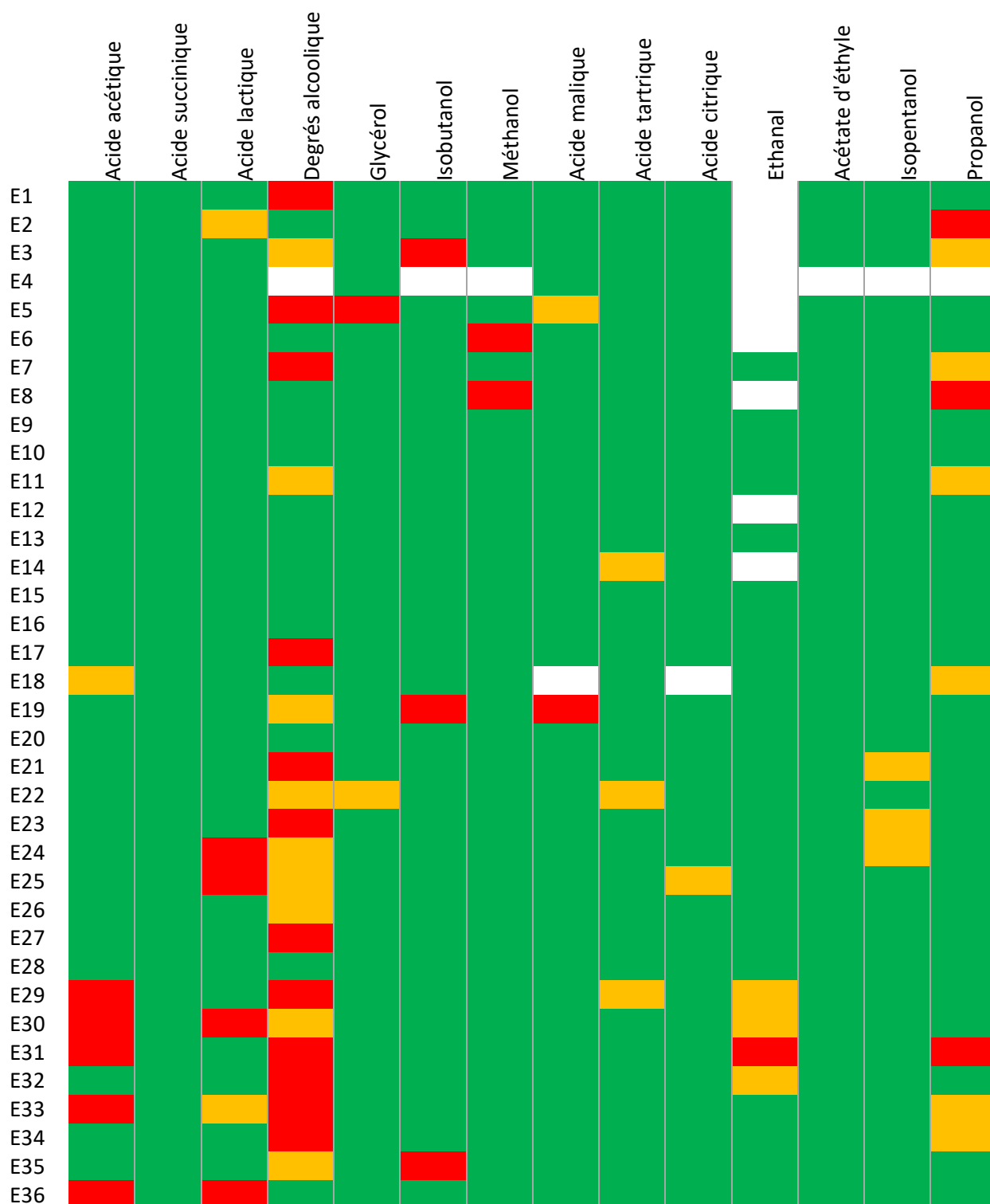
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Kim, K. M., Ahn, H.-J., Park, W.-M., Van Den Berg, F., ... Lee, C.-H. (2009). Metabolomic Studies on Geographical Grapes and Their Wines Using ¹H NMR Analysis Coupled with Multivariate Statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1481–1490. <https://doi.org/10.1021/jf803388w>
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Kim, K. M., Kim, E.-Y., van den Berg, F., Park, W.-M., ... Hong, Y.-S. (2009). ¹H NMR-Based Metabolomic Approach for Understanding the Fermentation Behaviors of Wine Yeast Strains. *Analytical Chemistry*, 81(3), 1137–1145. <https://doi.org/10.1021/ac802305c>
- Son, H.-S., Kim, K. M., van den Berg, F., Hwang, G.-S., Park, W.-M., Lee, C.-H., & Hong, Y.-S. (2008). ¹H Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomic Characterization of Wines by Grape Varieties and Production Areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8007–8016. <https://doi.org/10.1021/jf801424u>
- SOPEXA. (2018). Wine Trade Monitor. Retrieved September 19, 2018, from <http://www.go-sopexa.com/l/436772/2018-04-12/5973rh>
- Spayd, S. E., Wample, R. L., Evans, R. G., Stevens, R. G., Seymour, B. J., & Nagel, C. W. (1994). Nitrogen Fertilization of White Riesling Grapes in Washington. Must and Wine Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 34.
- Spayd, S. E., Wample, R. L., Stevens, R. G., Evans, R. G., & Kawakami, A. K. (1993). Nitrogen Fertilization of White Riesling in Washington: Effects on Petiole Nutrient Concentration, Yield, Yield Components, and Vegetative Growth. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 378.
- Spyros, A., & Dais, P. (2012a). NMR Spectroscopy in Food Analysis - Chapter 1. Introduction. In *RSC Food Analysis Monographs* (pp. 1–4). Cambridge: Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849735339-00001>
- Spyros, A., & Dais, P. (2012b). NMR Spectroscopy in Food Analysis - Chapter 4. Sample Preparation. In *RSC Food Analysis Monographs* (pp. 84–95). Cambridge: Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849735339-00084>
- Spyros, A., & Dais, P. (2012c). NMR Spectroscopy in Food Analysis - Chapter 5. Experimental Conditions and Processing. In *RSC Food Analysis Monographs* (pp. 96–125). Cambridge: Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849735339-00096>
- Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., & Heeswijck, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 150–158. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00174.x>
- Stöckl, A. (2006). Austrian Wine: Developments After the Wine Scandal of 1985 and its Current Situation, 17.

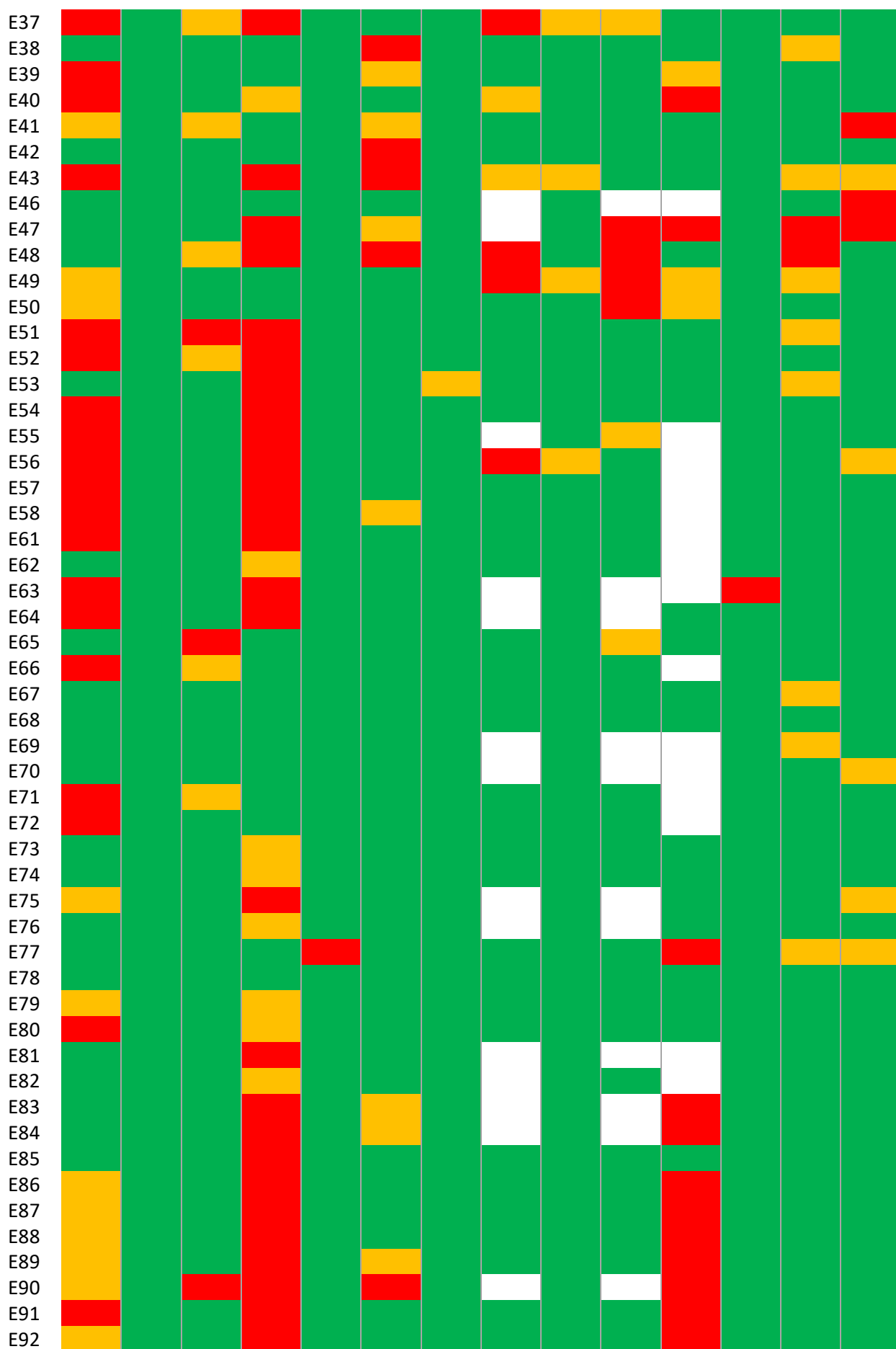
- Styles, O. (2009, February 9). Vin de Pays d'Oc in massive US fraud scandal. Retrieved October 1, 2018, from <https://www.decanter.com/wine-news/vin-de-pays-doc-in-massive-us-fraud-scandal-73856/>
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.004>
- Takeoka, G. R., & Ebeler, S. E. (2011). Progress in Authentication of Food and Wine. In S. E. Ebeler, G. R. Takeoka, & P. Winterhalter (Eds.), *Progress in Authentication of Food and Wine* (Vol. 1081, pp. 3–11). Washington, DC: American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1081.ch001>
- Todasca, M.-C., Fotescu, L., Chira, N.-A., Deleanu, C., & Rosca, S. (2011). Composition Changes in Wines Produced by Different Growing Techniques Examined Through ¹H-NMR Spectroscopy. *REV. CHIM.*, (2), 4.
- Tusseau, D., & Benoit, C. (1987). Routine high-performance liquid chromatographic determination of carboxylic acids in wines and Champagne. *Journal of Chromatography*, (395), 323–333.
- Van Leeuwen, Cornelis, Friant, P., Soyer, J.-P., Molot, C., Choné, X., & Dubourdieu, D. (2000). Measurement of total nitrogen and assimilable nitrogen in grape juice to assess vine nitrogen status. *OENO One*, 34(2), 75. <https://doi.org/10.20870/oenone.2000.34.2.1010>
- Van Leeuwen, Cornelis, & Seguin, G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/09571260600633135>
- Van Leeuwen, Cornelius, Trégoat, O., Choné, X., Bois, B., Pernet, D., & Gaudillère, J.-P. (2009). Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? *OENO One*, 43(3), 121.
<https://doi.org/10.20870/oenone.2009.43.3.798>
- Vasquez-Villanueva, R., Dominguez-Vega, E., Montealegre, C., Garcia, M. C., & Marina, M. L. (2015). Food Adulteration. In *Handbook of Food Analysis-Two Volume Set* (3e éd., pp. 233–264). CRC Press.
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439–447.
[https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00152-8)
- Viggiani, L., & Morelli, M. A. C. (2008). Characterization of Wines by Nuclear Magnetic Resonance: A Work Study on Wines from the Basilicata Region in Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8273–8279. <https://doi.org/10.1021/jf801513u>
- Weldegergis, B. T., de Villiers, A., & Crouch, A. M. (2011). Chemometric investigation of the volatile content of young South African wines. *Food Chemistry*, 128(4), 1100–1109.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.100>

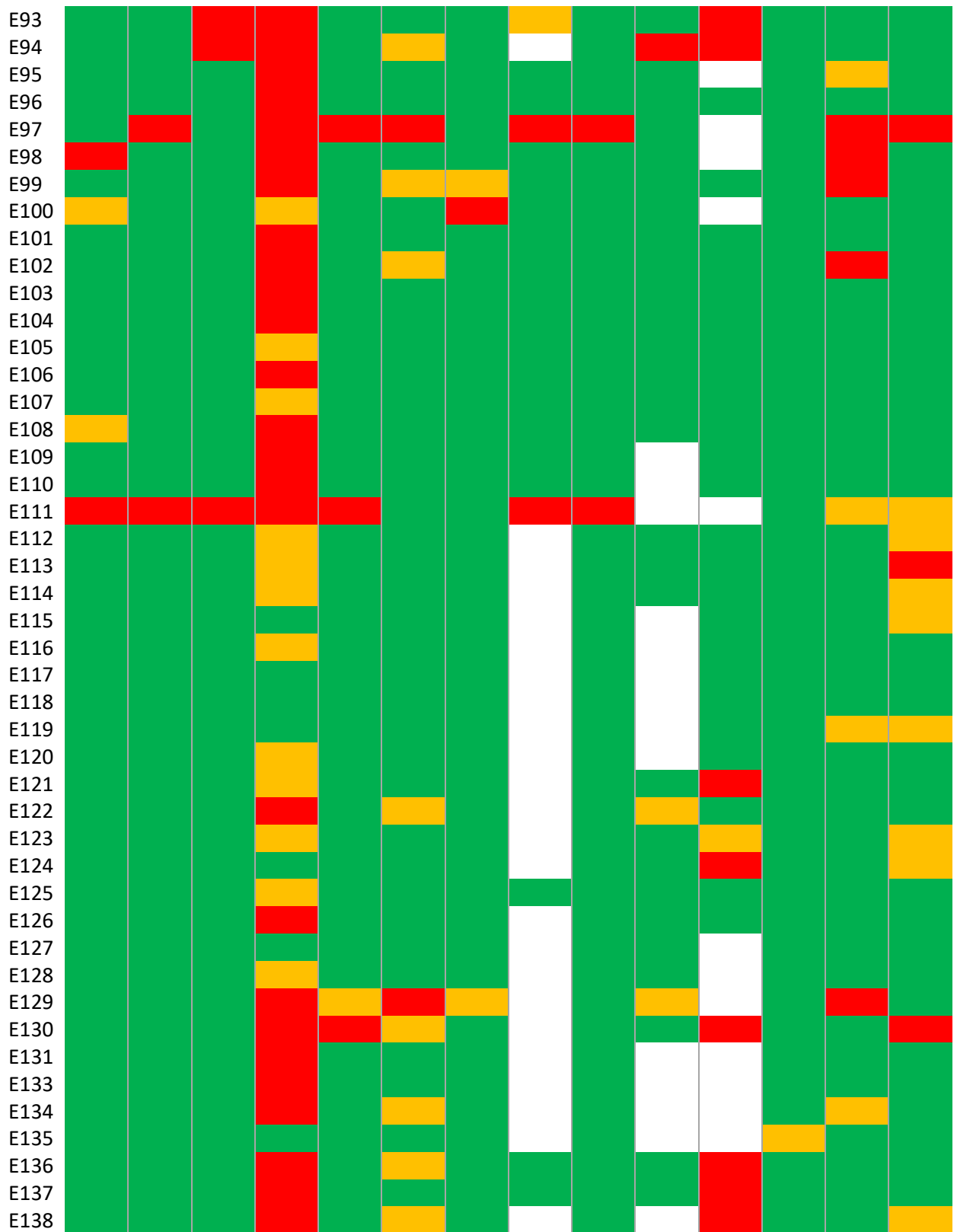
- Wider, G., & Dreier, L. (2006). Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 128(8), 2571–2576. <https://doi.org/10.1021/ja055336t>
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., Oldfield, E., ... Sykes, B. D. (1995). ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(2), 135–140. <https://doi.org/10.1007/BF00211777>
- Yousf, S., Hussain, N., Sharma, S., & Chugh, J. (2017). *Identification & Characterization of Secondary Metabolites in the Biological Soup by NMR Spectroscopy* (Bentham Science Publishers, Vol. 6). Atta-ur-Rahman and M. Iqbal Choudhary.
- Zhu, J., Hu, B., Lu, J., & Xu, S. (2018). Analysis of Metabolites in Cabernet Sauvignon and Shiraz Dry Red Wines from Shanxi by ¹H NMR Spectroscopy Combined with Pattern Recognition Analysis. *Open Chemistry*, 16(1), 446–452. <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0052>
- Ziarelli, F., Viel, S., Caldarelli, S., Sobieski, D. N., & Augustine, M. P. (2008). General implementation of the ERETICTM method for pulsed field gradient probe heads. *Journal of Magnetic Resonance*, 194(2), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.07.013>
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (2014). *Wine Analysis and Production*. Springer Verlag.

Annexes

Annexe 1. Carte de chaleur représentant les Z-scores obtenu lors de la comparaison des données q-NMR et les données analytiques issues d'analyses officielles de l'IFAPA sur 138 vins rouges, blancs et rosés et pour quatorze paramètres. En vert la performance est estimée satisfaisante ($-2 < Z < 2$), en orange elle est estimée douteuse ($-3 < Z < -2$ et $2 > Z > 3$), et en rouge elle est estimée incorrecte ($-3 > Z > 3$).







Annexe 2. Analyse métabolomique de feuilles de vigne par RMN.

En marge du sujet sur l'authenticité des vins, j'ai pu participer au développement de la méthode de RMNq pour l'étude d'autres matrices en lien avec la vigne et le vin. Ainsi, dans le cadre de la thèse d'Aleksandra Burdziej, doctorante en cotutelle entre l'Université de Bordeaux et l'Université de Varsovie, sous la direction des Dr. Stéphanie Cluzet et Anna Szakiel, j'ai participé à la transposition de la technique RMNq développée lors de ma thèse sur les vins pour l'analyse de métabolites depuis des feuilles de vigne. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication intitulée *Impact of different elicitors on grapevine leaf metabolism monitored by 1H NMR spectroscopy*, acceptée avec révisions mineures dans le journal *Metabolomics* le 2 février 2019.

La réduction de l'utilisation de produits phytosanitaires est un enjeu majeur en viticulture. Dans ce contexte, une méthode pouvant être proposée consiste en la stimulation des défenses naturelles de la vigne par différents éliciteurs. Les éliciteurs d'intérêt doivent être testés non seulement pour leur capacité à induire des réactions de défense de la plante, mais également pour leur influence sur sa vigueur globale. L'objectif était de caractériser les effets de ces éliciteurs sur le métabolisme primaire de la vigne par une approche métabolomique. Pour ce faire, les feuilles de boutures foliaires de vigne ont été traitées avec trois molécules élicitrices aux modes d'action différents : méthyle de jasmonate molécule impliquée dans la voie de signalisation de l'acide jasmonique, l'acibenzolar-S-méthyle, un analogue fonctionnel de l'acide salicylique, et des phosphonates de potassium, composés connus pour sa double action en tant que fongicide-stimulateur.

Grâce à cette méthode, vingt-neuf métabolites ont été identifiés puis quantifiés dans les extraits foliaires, notamment des glucides, des acides aminés, des acides organiques, des acides phénoliques et des amines. Des analyses statistiques multivariées sous forme d'ACP et PLS-DA ont permis d'observer des différences entre les échantillons. Les trois éliciteurs entraînent des modifications au niveau du métabolisme primaire similaires et/ou spécifiques selon l'éliciteur appliqué et, par conséquent, de la voie de signalisation de défense utilisée.

Finalement, la technique d'analyse métabolomique par RMN ^1H couplée à la chimiométrie s'est avérée utile pour la détermination rapide et la caractérisation de l'influence de ces éliciteurs sur la plante. Cette étude montre la capacité de la méthode développée lors de cette thèse sur le vin à être transposée à d'autres matrices biologiques telles que les feuilles de vigne. On peut supposer qu'il en sera de même sur les bois, les baies de raisin et les moûts.

Impact of different elicitors on grapevine leaf metabolism monitored by ^1H NMR spectroscopy

Aleksandra Burdziej^{1,2}. Grégory Da Costa¹. Louis Gougeon¹. Inès Le Mao¹. Anthony Bellée³. Marie-France Corio-Costet³. Jean-Michel Mérillon¹. Tristan Richard¹. Anna Szakiel². Stéphanie Cluzet¹

¹ Univ. Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (GESVAB), ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

² Department of Plant Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warsaw, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Poland

³ INRA, UMR Santé et Agroécologie du Vignoble (1065), ISVV, Labex Cote, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France

Corresponding author: Stéphanie Cluzet

stephanie.cluzet@u-bordeaux.fr

ORCID

Stéphanie Cluzet: 0000-0002-1653-4539

Marie-France Corio-Costet: 0000-0003-2206-9482

Jean-Michel Mérillon: 0000-0002-9626-2149

Tristan Richard : 0000-0002-5308-8697

Aleksandra Burdziej: 0000-0003-0634-8692

Anna Szakiel 0000-0001-6963-0666

Abstract

Introduction Grapevine protection is an important issue in viticulture, and to reduce pesticide use, sustainable disease control strategies are proposed, including a promising alternative method based on the elicitor-triggered stimulation of the grapevine natural defense responses. However, detailed investigations are necessary to characterize the impact of such defense induction on primary metabolism.

Objectives Our aim was to use a metabolomics approach to assess the impact of different elicitors dependent of salicylic acid (SA) and/or jasmonic acid (JA) pathway on grapevine. For this purpose, leaves of grapevine foliar cuttings were treated with methyl jasmonate, acibenzolar-S-methyl or phosphonates.

Methods Common and discriminating metabolites according to the applied elicitor were elucidated using ^1H NMR measurements and principal component analysis.

Results A wide range of compounds including carbohydrates, amino acids, organic acids, phenolics and amines were identified. The score plots by the combining PC1 versus PC2 and PC1 versus PC3 allowed a clear separation of samples, thus metabolite fingerprinting showed an extensive reprogramming of primary metabolic pathways after elicitation.

Conclusion The applied methods were found to be accurate for the rapid determination and differential characterization of plant samples based on their metabolic composition. These investigations can be very useful because the application of plant defense stimulators is gaining higher importance as an alternative strategy to pesticides in vineyard.

Keywords Metabolomic analysis, *Vitis vinifera*, MeJA, ASM, phosphonates, nuclear magnetic resonance spectroscopy

Introduction

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is considered to be one of the major fruit crop worldwide. As all cultivated plants, due to its uniform background, grapevine susceptibility to diseases is high. The most important yield losses are the consequences of damages caused by microbial agents as *Plasmopara viticola* (downy mildew), *Erysiphe*

necator (powdery mildew) or *Botrytis cinerea* (gray mold), and phylloxera (Armijo et al. 2016). Therefore, pest control represents a predominant issue of viticulture and it is currently achieved by use of synthetic fungicides. Despite their relatively high efficacy against numerous pathogens, these chemicals contribute significantly to environmental pollution and pose a threat to human health. Among the alternative strategies of plant protection, induced natural resistance has become one of the most promising strategies since this approach is based on the use of substances less toxic for environment and human health, and provides relative long-lasting and wide-spectrum resistance. During the past decade, more and more elicitors-like products have been introduced to viticulture (Delaunoy et al. 2014). These naturally derived or synthetic molecules stimulate the plant immune system by mimicking a pathogen attack and thus triggering several chemical defenses strategies such as the accumulation of secondary metabolites. Elicitors, also called plant defense stimulators (PDS) act mainly through pathways mediated by salicylic acid (SA) or jasmonic acid (JA) with ethylene (ET), which are regarded as the critical defense phytohormones. These latter molecules can lead to basal resistance against multiple pathogens (Robert-Seilanianantz et al. 2011; Pieterse et al. 2012), and thanks to subtle interactions between these two pathways, the plant is also able to fine-tune its defense responses against specific pathogens (Beckers and Spoel 2006; Figueiredo et al. 2015). Both SA- and JA-mediated defense responses occur not only locally at the recognition site of a microbe or pest but also in distal plant parts, thus allowing the protection of undamaged tissues against subsequent pathogen invasion (Pieterse et al. 2012).

Hence, plants treated by SA or its functional analogs as β -aminobutyric acid (BABA), 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA), acibenzolar-S-methyl (ASM) or benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (benzothiadiazole, BTH), respond by the onset of systemic acquired resistance (SAR) with the up-regulation of typical SA defense reactions (Cao et al. 1994). The stimulation of these defense responses lead to a correlated broad-spectrum resistance. For example, BTH or ASM have been used to control gray mold and *Phytophthora* in strawberry (Terry et al. 2000; Eikemo et al. 2003), and to fight against powdery mildew in wheat and *Arabidopsis* (Görlach et al. 1996; Lawton et al. 1996). The performance of ASM in combination with a soft fungicide management program has been revealed by Marolleau and his colleagues (2017) as an effective control of natural apple scab infection in orchard. In grapevine, BTH treatment triggers the up-regulation of many PR-protein genes, especially those coding for glucanases and chitinases, as well as genes encoding VvSTS (stilbene synthase) and VvROMT (resveratrol O-methyl transferase), two enzymes implicated in the stilbene biosynthesis (Bellée et al. 2018). Overall, BTH induces resistance of grapevine to downy and powdery mildews (Dufour et al. 2013), and gray mold (Iriti et al. 2005; Bellée et al. 2018).

Exogenous application of methyl jasmonate (MeJA), the methyl ester of JA, induced a large number of defense responses. In grapevine this molecule up-regulated transcript levels and/or proteins as PR-proteins (e.g. chitinase, β -1,3-glucanase), peroxidase and enzymes involved in the phytoalexin pathway such as phenylalanine ammonia lyase (PAL) and stilbene synthase (STS) (Repka et al. 2004; Belhadj et al. 2006). PAL and STS induction correlated with the accumulation of stilbenes, the grapevine phytoalexins, thus conferring an enhanced tolerance, for instance against powdery mildew (Belhadj et al. 2006).

Contrarily, phosphonates display a complex mode of action: (i) direct inhibition of pathogen development, mainly against oomycetes, (ii) indirect action as inducers of the release of stress metabolites from the pathogen to elicit defense responses, and (iii) direct stimulation of plant defense responses (Lobato et al. 2010). They have been used for the control of *Phytophthora* diseases in several plants for more than 30 years (Hardy et al. 2001). About the phytohormones mediating the phosphite resistance, its effectiveness was proposed to be dependent or not to SA and/or JA/ET pathways (Eshraghi et al. 2011; Massoud et al. 2012; Burra et al. 2014). Consequently, a wide range of host defenses were activated by phosphite treatment. It is worth mentioning that ASM and phosphonates act as priming compounds, i.e. allowing a more rapid, efficient, and/or intense activation of defense responses upon secondary biotic or abiotic stresses (Conrath 2009).

To sum up, elicitor treatments trigger many plant defense responses and, as tight interconnections exist between primary and secondary metabolism, changes in primary metabolism can occur following elicitation. Indeed, it was often reported that stresses alter plant growth and development, due to the energy drained from growth toward defensive metabolite production (Heil 2002; Dietrich et al. 2005). There is little information about the influence of common elicitors on grapevine primary metabolism and it is important whether they do not heavily affect the plant vigor, ergo the quality of grapes and wine.

Thus, the aim of this study was to evaluate the precocious effect of different types of elicitors (SA and/or JA dependent) by measuring metabolomic responses in grapevine leaves after 24 h of treatment. The leaves of

Vitis vinifera L. cuttings were treated with MeJA, ASM or a mix of potassium phosphonates (PHOS). To assess and compare global changes of metabolite pool under each condition, we have chosen proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) as this technology affords reproducibility, convenience for quantification, and straightforward metabolite identification (Kim et al. 2010). In grapevine, at least three studies using NMR have reported alterations in grapevine leaf metabolism: in esca disease-affected leaves (Lima et al. 2010), in leaves inoculated with *Plasmopara viticola* (Ali et al. 2012), and after infection with Flavescence Dorée Phytoplasma (Prezelj et al. 2016). NMR analysis has also been performed to investigate metabolic changes in grapes during *B. cinerea* infection (Hong et al. 2012). However, to our knowledge no research has been carried out to examine impact of elicitors in grapevine and experimental evidence is needed. In order to detect differences in metabolism of treated leaves, principal component analysis (PCA) was employed on NMR quantified data as this method allows to reveal variables involved in differentiating the samples.

Materials and Methods

Plant material

Grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) were propagated from wood cuttings in a greenhouse (INRA, Villenave d'Ornon, France). Wood cuttings were provided by Château Couhins (Gironde, France) clone 191. After 3 weeks, rooted cuttings were potted in sandy soil and were grown with 16h light per day. Foliar cuttings were grown under controlled conditions at +/- 25/20°C day/night air temperature, 75% relative humidity and a 16-h photoperiod (350 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Two-month-old plants with 10-12 leaves were used for the experiments.

Elicitation

Preparation of MeJA, ASM and PHOS solutions Methyl jasmonate (MeJA, 95%, Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) was dissolved in 100% EtOH to a final concentration of 5 mM and added to an aqueous solution containing Triton X-100 (Sigma-Aldrich) at 0.1% (v/v). Formulated acibenzolar-S-methyl (S-methyl benzo[1,2,3]thiadiazole-7-carbothioate, ASM, Bion 50% WG, Syngenta) was dissolved in water and added at 2 g/L final concentration. A mix of potassium phosphonates (PHOS, LBG-01F34, De Sangosse, 730 g/L) was dissolved in water and added at 1.5 g/L final concentration. Control plants received distilled water ("untreated") or Triton (0.1%, v/v).

Treatments Fourteen plants per condition were entirely sprayed using a micro-diffuser with a pressure reserve (Ecospray®). At least 1 mL of solutions was sprayed on each leaf, on adaxial and abaxial face. The third and fourth leaves below the apex were harvested after 24 h post-treatment, thoroughly rinsed with tap water, dried then lyophilized before extraction.

Extraction of plant material

Extraction buffer was made up of 750 μL methanol- d_4 (99.80% D, Euriso-Top, St-Aubin and Gif-sur-Yvette, France) plus 750 μL of pH 6.0 KH_2PO_4 buffer (0.1 M), in D_2O (99.90% D, Euriso-Top) containing 0.3 mM 3-(Trimethylsilyl) propanoic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt (TMSP, 98% D, Euriso-Top), as NMR chemical shift reference, and 4 mM calcium formate (Sigma-Aldrich), as a reference (internal standard) in the quantitation of metabolites. The freeze-dried plant material (50 mg) was grounded to a fine powder and extracted by adding extraction buffer (1000 μL). Samples were vortexed at room temperature for 1 min, ultrasonicated for 20 min and centrifuged at 17 500 rpm for 10 min. Then 600 μL of the supernatant was transferred in a 5 mm NMR tube and analyzed by NMR the same day.

NMR spectroscopy

All ^1H -NMR spectra were recorded on a 600 MHz AVANCE III spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at a proton frequency of 600.27 MHz using a 5 mm TXI probe with Z-gradient coils. Methanol- d_4 was used as the internal lock. The samples were analyzed using zgpg30 pulse sequence (Bruker, Biospin, Germany) at 293 K with 32 scans, a time domain (TD) of 65536 real data points and a spectral width (SW) of 16.0183 ppm (9615.385 Hz). The acquisition time (AQ) and the relaxation delay (RD) were 3.4 s and 5 s, respectively. The free induction decays (FIDs) were multiplied by an exponential function corresponding to line broadening (LB)

of 0.3 Hz. NMR spectra were calibrated to trimethylsilane propionic acid sodium salt (TMSP) at 0.0 ppm using Topspin software version 3.2 (Bruker Biospin, Germany). The resulting spectra were manually phased and baseline corrected using Whittaker Smoother method in MestReNova NMR software version 11.0.3 (Mestrelab Research, Spain). The spectral peaks were assigned by comparing chemical shift and multiplicity with the literature and by metered addition in leaf extracts of the various standards (the list of used standards is specified in Table S1). Classical 2D-NMR experiments including COSY, TOCSY, ROESY, HSQC and HMBC were used for identification of phenolic compounds (quercetin-3-O-glucoside and *trans*-feruloyl acid derivative). Then, a semi-automatic quantification with Simple Mixture Analysis plugin (SMA, MestReNova) was performed. Peak deconvolutions were performed using the Global Spectral Deconvolution (GSD) method. As example, a result of applying GSD function is presented in Figure S1. Semi-quantification of metabolites was effectuated by utilizing the internal standard (calcium formate) added at a known concentration. Compounds were quantified by the relative ratio of the intensities of their peak-integrals and the ones of internal standard. Appropriate analyte signals were evaluated according to the formula developed by Godelmann et al. (2016) presented below, where m_x and m_{std} are the masses (g) of the analyte and the standard, MW_x and MW_{std} , the molecular weights (g/mol) of the analyte and the standard, n_x and n_{std} , the numbers of protons of the analyte and the standard, A_x and A_{std} , the integral values of the analyte and the standard, respectively.

$$m_x = \frac{MW_x}{MW_{std}} \times \frac{n_{std}}{n_x} \times \frac{A_x}{A_{std}} \times m_{std} \times CF$$

Multivariate and statistical analysis

The data presented consists of the results obtained from samples analyzed in triplicates. Error bars of graphs show the standard deviation (SD) of mean values.

Principal component analyses (PCA) with unit variance scaling, hierarchical clustering on principal components (HCPC) with Manhattan distance measure and 3D partial least squares regression-discriminant analysis (3D PLS-DA) were performed in R software version 3.4.3 using the FactoMineR plugin or Simca 15.0 (Umetrics, Sweden). The quality of the 3D PCA model was estimated by R^2 and Q^2 values. R^2 is defined as the proportion of variance in the data explained by the models and indicates goodness of fit, and Q^2 is defined as the proportion of variance in the data predictable by the model and indicates predictability. PCA score plot with high statistical values of $R^2 > 0.5$ and $Q^2 > 0.5$ was obtained.

Statistical analysis was carried out in Prism® 7.04 (GraphPad software, Inc.). Radar charts were made in Excel 2007. In order to identify significant differences between elicitor-treated leaves and control leaves, one-way analysis of variance (ANOVA) was applied ($p < 0.05$). Tukey's multiple comparisons test was performed to compare simultaneously the means of every sample.

Results

Identification of metabolites in differently elicited leaves

Extracts of grapevine leaves treated with MeJA, ASM or PHOS along with the ones of control leaves (Untreated and Triton) were subjected to ^1H NMR analysis. According to NMR (1D and 2D) experiments and by comparison with reference data from literature we have identified 30 metabolites including amino acids, organic acids, carbohydrates, phenolics and amines (Fig. 1, Table S2). The amino acids valine, threonine, alanine, γ -aminobutyric acid (GABA), proline, glutamine and glutamic acid were recognized in the area between δ 0.8-4.0 which corresponds also to the one of some organic compounds as acetic, pyruvic, succinic, malic and ascorbic acids. However, tyrosine was identified at δ 6.85 and 7.16, while fumaric acid at δ 6.65. The area of aliphatic region showed also the signals of choline, *myo*-inositol, syringic and shikimic acids. Despite the high overlapping of the signals in the carbohydrate region (δ 4.0-5.5 ppm), we could recognize the signals of the anomeric protons of fructose, sucrose, β - and α -glucose, as well as the third signal of malic acid (δ 4.38) and the one of tartaric acid (δ 4.41). The remaining region, i.e. δ 5.5–8.5, being known as the phenolic region, showed the signals of (+)-catechin, quercetin-3-O-glucoside (Q3OG), *trans*-feruloyl acid derivative, gallic and shikimic acids. Two amines were also found in this zone: adenine at δ 8.13 and trigonelline at δ 8.85 and 9.14.

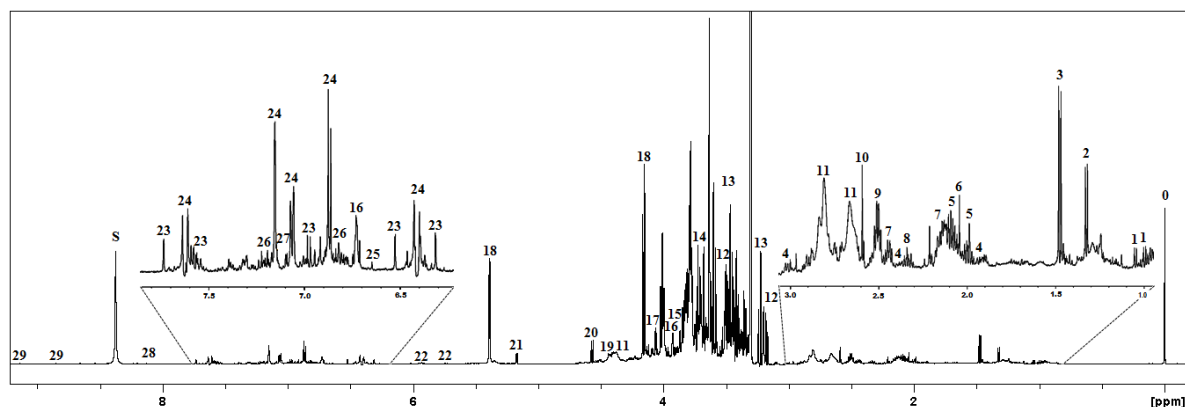


Fig. 1 Representative ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon ('Untreated') leaf extract in CD_3OD_3 in D_2O (KH_2PO_4 buffer, pH 6.0). 0, chemical shift reference standard (TMSP); S, standard for quantification (calcium formate); 1, valine; 2, threonine; 3, alanine; 4, γ -aminobutyric acid (GABA); 5, proline; 6, acetic acid; 7, glutamine; 8, pyruvic acid; 9, glutamic acid; 10, succinic acid; 11, malic acid; 12, choline; 13, *myo*-inositol; 14, ascorbic acid; 15, syringic acid; 16, shikimic acid; 17, fructose; 18, sucrose; 19, tartaric acid; 20, β -glucose; 21, α -glucose; 22, (+)-catechin; 23, quercetin-3-*O*-glucoside; 24, *trans*-feruloyl derivative; 25, fumaric acid; 26, tyrosine; 27, gallic acid; 28, adenine; 29, trigonelline.

Global view of the impact of elicitor treatment on grapevine leaves

To provide comparative interpretations of the changes in metabolism of leaves challenged by different elicitors, a series of chemometric methods were employed. A principal component analysis (PCA) was performed in order to initiate a first exploration of the whole data set obtained from relative quantification of all identified metabolites measured in control leaves (Untreated and Triton) and elicitor-treated leaves (MeJA, ASM and PHOS). The PCA enabled a clear discrimination of the samples by the first three principal components (PC1, PC2 and PC3) which cumulatively accounted for 81.93% of the variation in all variables (Fig. 2a). PC1 explained 46.24% of the variation and separated the elicitor samples from controls, while PC2 which accounted for 26.33% allowed to note that MeJA sample was apart from controls, ASM and PHOS treatments. Moreover, we could observe that Untreated and Triton, the two controls, tended to be grouped together as it similarly occurred for the three elicitor conditions (ASM, PHOS and MeJA). Although PC3 represented only 9.36% contribution ratio, it facilitated a slight separation of ASM and PHOS samples from both each other and controls (Fig. 2a, Fig. S2a).

In order to gain more insight into the metabolic differences among control and elicitor-treated leaves, for each PC, the correlation coefficient of the factor loadings and the square of the cosine of the variables were calculated (Figure S2 and Table S3). This approach allowed to identify compound that mostly contributed to the separation of all the samples and to establish how significantly each metabolite was correlated to the axis of PC1, PC2 and PC3. Consequently, syringic acid (correlation coefficient of 0.972), threonine (0.968) and (+)-catechin (0.750)) showed the greatest influence on the scores for three initial components respectively (Table S3). Furthermore, the PCA factor loadings analysis indicates that control conditions (Untreated and Triton), and mainly the Untreated one, were concentrated by the majority of the identified metabolites, and particularly sugars (*myo*-inositol, fructose, α -glucose, β -glucose and sucrose), some organic acids (malic, pyruvic, tartaric, ascorbic and fumaric acids), and some phenolics (quercetin-3-*O*-glucoside, syringic, gallic and shikimic acids) (Fig. S2). The combination of PC1 and PC3 confirmed this accuracy grouping ASM-, MeJA-, and PHOS-treated leaves all together (Fig. S2). The level of fumaric acid was the highest in Untreated leaves. Some specificity according to the type of applied elicitor was also noted, for instance glutamine, valine and acetic acid seemed to be more strongly present in MeJA sample. Both ASM and PHOS samples displayed higher amount of choline, when comparing to remaining conditions, despite its small contribution to the construction of the main components.

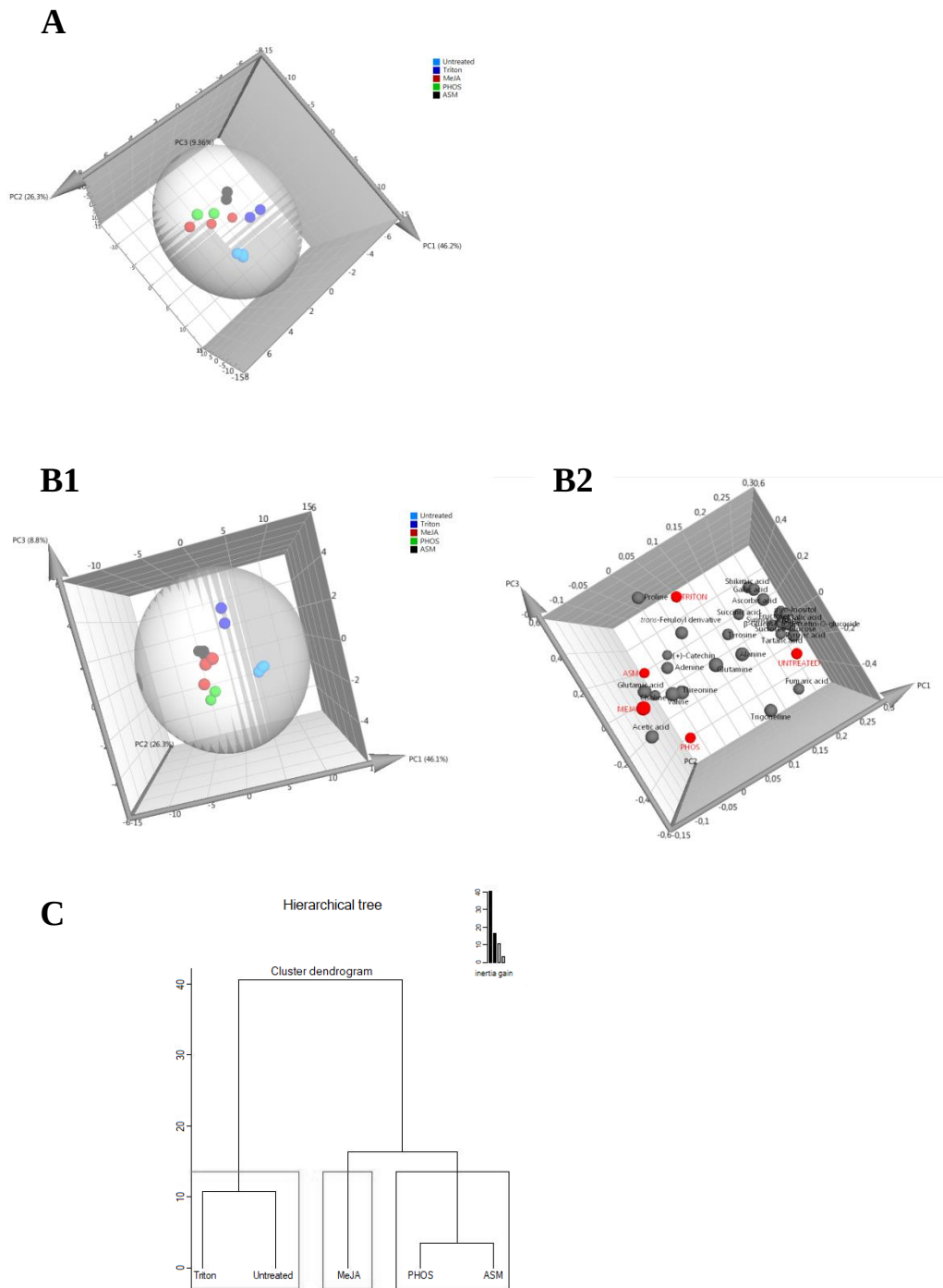


Fig.2 Score plot (A) of principal component analysis (PCA) on quantifications of all identified metabolites in grapevine leaves discriminating each condition at 24 h after elicitation: ‘Untreated’ – control leaves treated with distilled water; ‘Triton’ – control leaves treated with Triton X-100; ‘MeJA’ – leaves elicited with methyl jasmonate; ‘PHOS’ – leaves elicited with phosphonates (LBG-01F34); ‘ASM’ – leaves elicited with acibenzolar-S-methyl. The combination of PC1 and PC2, PC1 and PC3, and PC2 and PC3 is presented. Score (B1) and corresponding loading plot (B2) of partial least squares-discriminant (PLS-DA; model diagnostics were $R^2X=0.954$; $R^2Y=0.989$ and $Q^2=0.946$). The sphere indicates Hotelling T2 (0.95) for these models. Cluster dendrogram (C) performed by hierarchical clustering on principal components (HCPC).

The PCA was followed by partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) as the next step for the analysis of obtained multivariate data (Fig. 2b1). Similarly, all samples were clearly differentiated in the PLS-DA score plots (Fig. 2b2).

Finally, the dendrogram of hierarchical clustering on principal components (HCPC) (Fig. 2c) confirmed the results obtained from the PCA and PLS-DA. The three elicitor conditions were clustered together showing relative similarities. Especially PHOS and ASM treated leaves shared a similar metabolic profile.

Relative quantification of metabolites

In order to confirm the statistical significance of the results obtained from multivariate data analysis, we performed an one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test. Relative quantification of identified compounds was based on measurement of the average peak areas of the characteristic signals in comparison with the internal reference (calcium formate). The relative abundance of studied compounds, as well as the significance levels of differences among all experimental conditions ($p < 0.05$) were reported in supplementary materials (Fig. S3 and Table S4). To compare multiple variables and illustrate the comprehensive performance of the five different conditions, a radar chart method was applied by normalizing the data (Fig. 3, mean values in Table S4).

Some distinct metabolomic alterations were observed across the different classes of compounds. Changes were particularly apparent in metabolism of sugars and organic acids. Two characteristic patterns of sugars can be observed. The first one grouped sucrose, β -glucose and α -glucose all together. Their relative quantity decreased after treatment of all elicitors. Triton, the co-formulant of MeJA, affected these three sugars the least, whereas MeJA impacted them more drastically (around 2.5 fold). Contrarily, MeJA, PHOS and ASM affected negatively fructose at the same level. Myo-inositol followed the same pattern – its amount decreased significantly after all elicitor treatments. However, Triton also caused a decrease of the amount of this molecule.

All the identified organic acids were impacted (Fig. 3 and Fig. S3). Contrarily to sugars, we cannot establish a shared pattern as positive or negative changes occurred in function to the applied treatment. Acetic acid remained at a basal level in all conditions, except in response to MeJA where its relative content was above. The relative quantity of succinic acid was lower in response to Triton, MeJA and PHOS, more particularly, compared to 'untreated'. A decline of fumaric and pyruvic acids was observed after all treatments, even Triton. It has to be noted that the reduction of these two acids by MeJA could be partially due to Triton, its co-formulant. All elicitors along with Triton reduced the content of malic acid, whereas the levels of tartaric and ascorbic acids significantly decreased in leaves treated with MeJA, PHOS and ASM in comparison to both controls.

Among the identified amino acids, the relative content of glutamic acid, tyrosine and threonine did not change regardless the treatment (Fig. S3b). However, all elicitors significantly reduced the quantity of GABA compared to the untreated condition about 2.5 fold. Alanine was found nearly in equal amounts in all conditions except ASM where this amino acid slightly decreased. The relative content of proline augmented after Triton. MeJA was the only elicitor which boosted the accumulation of valine and glutamine. On the contrary, PHOS and ASM considerably inhibited glutamine relative content while valine was not affected.

Contrarily to amino acids and organic acids, the profile of relative quantity of the following phenolics, gallic, shikimic and syringic acids, and Q3OG, was quite similar with a reduction of these compounds by elicitors compared to the two controls. Nevertheless, in the case of Q3OG, Triton acted as the elicitors did. The relative quantity of gallic acid was affected neither by MeJA nor its co-formulant, but was very strongly impacted by ASM (5-fold) and even more by PHOS (10-fold). *trans*-Feruloyl derivative and (+)-catechin showed a similar level in all tested conditions.

Among the three identified amines, adenine was unaffected. The level of choline slightly increased in PHOS and ASM conditions, whereas the amount of trigonelline drastically decreased in ASM sample and a little bit after Triton.

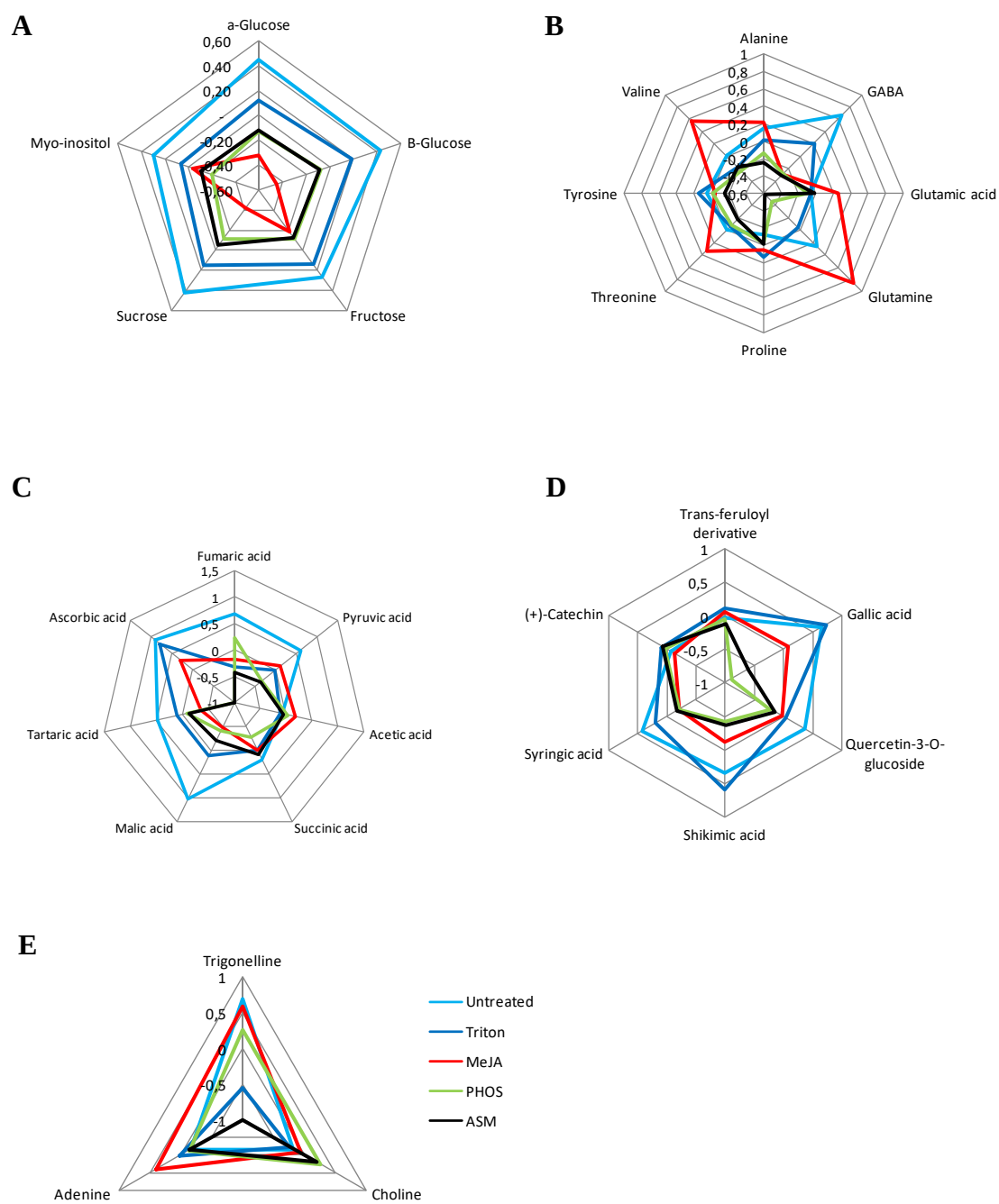


Fig.3 Radar charts comparing changes within classes of compounds identified in grapevine leaves differently elicited. Sugars (A), amino acids (B), organic acids (C), polyphenols (D) and amines (E).

Discussion

For successful development of natural defense stimulation strategy by elicitors use as an alternative to pesticides in vineyard, metabolic profiling of plants treated with such compounds is required. Indeed, it is generally reported that the induction of plant defensive traits by PDS causes costly metabolic changes. This approach forces plants to optimally allocate their resources to various competing demands and pathways, creating trade-offs, i.e. promoting some functions and neglecting others as an inverse relationship (Caretto et al. 2015).

In our study, we investigated the impact of three elicitors, MeJA, PHOS and ASM on foliar metabolism of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon cuttings during the first hours post-treatment (24 hpt). The changes in metabolic profile of elicited leaves were monitored by ^1H NMR spectroscopy and compared to control samples, i.e. untreated leaves or sprayed with Triton, the MeJA co-formulant. Figure 4 shows the most likely metabolic interconnections of the compounds identified in this study.

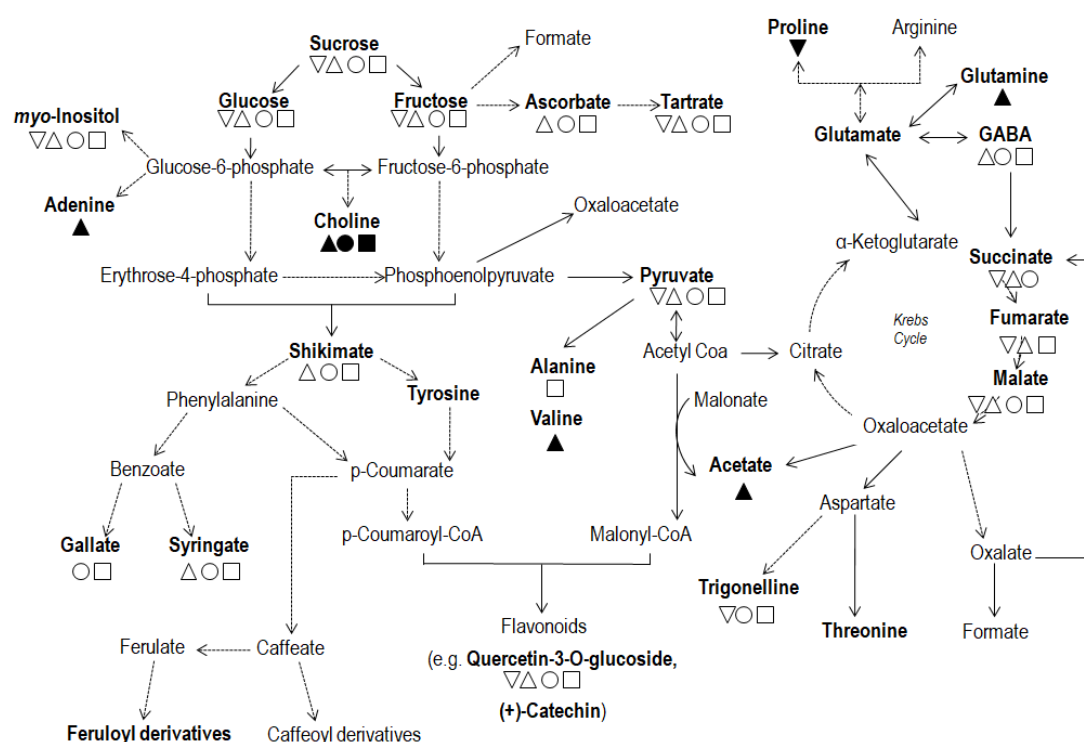


Fig.4 Simplified metabolic pathways influenced by different elicitors in *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon leaves at 24 h after treatment. Compounds identified in the experiment by ^1H NMR are shown in bold. Symbols associated with each metabolite show the significant changes with comparison to control leaves assessed at $p < 0.05$ through one-way ANOVA test. Metabolites that are set with empty symbols are significantly decreased after elicitation with respect to control leaves whilst those set with filled symbols are significantly increased. Lack of symbol indicates metabolites unaffected by elicitation. Reversed triangle – ‘Triton’, triangle – ‘MeJA’, circle – ‘PHOS’, square – ‘ASM’. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG database was used to elucidate metabolic networks (<http://www.genome.jp/kegg/>).

The choice between growing and defending is a key point for plant survival, thus diverting carbon skeletons from the primary to secondary metabolism. To establish a favorable energy balance for defense, the increase of defense-associated pathways is compensated by a reduction of other metabolic pathways: photosynthesis-related genes and chlorophyll biosynthesis have been reported to be down-regulated following pathogen attack or elicitor treatment (Bolton 2009), leading to a reduction of the plant fitness (growth and yield).

In our study, this effect is reflected by an evident decrease of carbohydrates in all elicitor-treated leaves. A decrease of level of sugars as a result of elicitation is known especially for MeJA (Liang et al. 2006). As expected, myo-inositol was affected by all treatments since it is involved in the biogenesis of the cell wall, phospholipid signaling pathway and regulation of cytoskeletal structure. Its reduction as a result of a stress response is not clear but was already reported in *Nicotiana tabacum* leaves infected with tobacco mosaic virus (Choi et al. 2006).

Similarly, most of the identified phenolics were significantly declined after elicitor treatments. A reduction of the levels of phenolic metabolites as a result of ASM application was observed in *Arabidopsis thaliana* (Hien Dao et al. 2009). The decrease of shikimic acid which is the crucial molecule in phenylpropanoid pathway may indicate an enhanced biosynthesis of following phenolic derivatives involved in defense responses. We hypothesize that it could be also the case of the remaining phenolics, i.e. Q3OG, gallic and syringic acids, being the precursors of phenylpropanoid metabolism.

Contrarily to sugars and phenolics, amino acids were characterized by different patterns according to the considered condition. Some changes within this class of molecules were linked to nitrogen signaling, more precisely to GABA and glutamine metabolism. Although the mode of action of GABA in plant defense is not evident, its catalyzed production by mechanisms being known to accompany biotic and abiotic stress was described (Lima et al. 2010). The accumulation of glutamine is considered as the one of evidence for an activation of PAL pathway (Figueiredo et al. 2008). Increase of glutamine was noted in a wheat resistant cultivar upon infection (Hamzehzarghani et al. 2005). Indeed, glutamine content increased in MeJA-treated leaves, but surprisingly significantly decreased in PHOS and ASM samples. Besides, MeJA triggered an accumulation of valine. To our knowledge, the role of this amino acid in plant stress has never been reported. The pool of amino acids was prominently changed in phosphite-treated *Arabidopsis* plants, in accordance to literature (Berkowitz et al. 2013).

Important perturbations in the metabolism of organic acids occurred in the treated leaves. A remarkable decrease of pyruvic, fumaric and malic acids, and a moderated one of succinic acid were noted. The simultaneous reduction of succinic, fumaric and malic acids content may either result from the stronger demand for the Krebs cycle intermediates required for the biosynthesis of other metabolites, including those implicated in defense, or from an increased consumption of pyruvic acid. This latter point can be due to the allocation of pyruvic acid in polyphenol biosynthetic pathway in a context of elicitation/defense. A decline of pyruvic acid and 2-oxoglutarate was also observed in *V. vinifera* cv. Gamay *in vitro* cultures elicited with oligogalacturonide (Krzyzaniak et al. 2018). Modifications of the concentration in the organic acids mentioned above were followed in opium poppy (*Papaver somniferum*) cell cultures treated with a fungal elicitor (Zulak et al. 2008). The levels of malate, succinate and fumarate were generally stable, reduced or even increased after treatment, depending on the time-point of harvest (Zulak et al. 2008). Regarding all these data, kinetics should be performed in order to follow the evolution of the organic acids content according to the used elicitor and the considered plant model. The biosynthesis of tartaric acid was inhibited by all treatments, mainly elicitors, and it was accompanied by a reduced level of its precursor – ascorbic acid which plays roles in plant stress and physiology (growth and development). A possible stress generated by elicitations could contribute to a degradation of this antioxidant compound. Such phenomenon was already observed in different salad leaves and broccoli as an effect of harvest and treatments with hormones as MeJA (Dewhirst et al. 2017, Nishikawa et al. 2003). Acetic acid was the only organic acid which level did not change, or even increased after MeJA application. It has been reported that acetic acid can inhibit some plant pathogenic fungi (Sehirli and Saydam 2016).

Finally, elevated content of choline was observed in PHOS and ASM conditions. The accumulation of this molecule as a defense response was expected since its role in plant stress was elucidated (Mou et al. 2002, Zhang et al. 2010).

Taken together, our observations are in accordance to results already described in literature, but sometimes the direction of changes is different which may be due to the investigated plant species as well as the experimental model, used elicitors and their concentration and/or time of incubation. Broadly, we have shown that, in a precocious time (24 hpt) after PDS treatments, grapevine plants were able to significantly shift major metabolites, as it occurred in response to pathogen infection (Parvaiz et al. 2018).

Conclusion

To maintain plant fitness, advances in understanding global metabolic changes occurring under specific PDS conditions are fundamental. Our findings provided valuable preliminary insights into primary metabolism switches of grapevine triggered by three elicitors (MeJA, ASM, and PHOS). This study has put in evidence similar and/or specific metabolite modifications depending on the applied elicitor and in consequence to the utilized defense signaling pathway. It is hypothesized that the induction of plant pathogen resistance correlating to primary metabolite perturbations in primary metabolism could negatively impact an overall plant fitness, so in the case of grapevine, to influence grapes and wine quality. Therefore, elucidation of the metabolic responses after elicitation can be helpful for developing strategies based on natural defense stimulation. Finally, the NMR technique applied in this study was found to be highly reproducible and to cover a wide range of the metabolome. In future experiments, the long-term consequences of these three elicitors on grapevine metabolome would be studied.

Acknowledgments

We want to thank Sébastien Gambier for taking care of the plants, Annick Moing and Catherine Deborde for their pertinent advises on NMR protocol extraction method. The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project). The study was performed owing to the financial support of the French Government and the French Embassy in Poland.

Author Contributions

SC and MFCC conceived and designed research. AlB, AnB, SC and MFCC conducted experiments. AlB, GDC, LG, ILM and TR performed metabolomics study and data analysis. AlB, JMM, AS and SC wrote and/or revised the manuscript. All authors read and accepted the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Bibliography

- Ali, K., Maltese, F., Figueiredo, A., Rex, M., Fortes, A. M., Zyprian, E., et al. (2012). Alterations in grapevine leaf metabolism upon inoculation with *Plasmopara viticola* in different time-points. *Plant Science*, 191–192, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.04.014>.
- Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., & Arce-Johnson, P. (2016). Grapevine pathogenic microorganisms: Understanding infection strategies and host response scenarios. *Frontiers in Plant Science*, 7, 382. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>.
- Beckers, G. J. M., & Spoel, S. H. (2006). Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1055/s-2005-872705>.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M. F., et al. (2006). Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9119–9125. <https://doi.org/10.1021/jf0618022>.
- Bellée, A., Cluzet, S., Dufour, M. C., Mérillon, J. M., & Corio-Costet, M. F. (2018). Comparison of the impact of two molecules on plant defense and on efficacy against *Botrytis cinerea* in the vineyard: A plant defense inducer (Benzothiadiazole) and a fungicide (Pyrimethanil). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3338–3350. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05725>.
- Berkowitz, O., Jost, R., Kollehn, D. O., Fenske, R., Finnegan, P. M., O'Brien, P. A., et al. (2013). Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1731–1743. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert037>.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—Fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 487–497. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0487>.

- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., & Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 6(11), 1583–1592. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.11.1583>.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., & Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. Iriti M., ed. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26378–26394. <https://doi.org/10.3390/ijms161125967>.
- Choi, Y. H., Kim, H. K., Linthorst, H. J., Hollander, J. G., Lefeber, A. W., Erkelens, C., et al. (2006) NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *Journal of Natural Products*, 69 (5), 742–748. <https://doi.org/10.1021/np050535b>.
- Conrath, U. (2009). Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, 51, 361–395. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51009-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51009-9).
- Delaunois, B., Farace G., Jeandet P., Clément C., Baillieul, F., Dorey, S., et al. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21 (7), 4837–4846. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1841-4>.
- Dewhurst, R. A., Clarkson, G. J. J., Rothwell, S. D., Fry, S. C., (2017). Novel insights into ascorbate retention and degradation during the washing and post-harvest storage of spinach and other salad leaves, *Food Chemistry*, 233, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.082>.
- Burra, D. D., Berkowitz, O., Hedley, P. E., Morris, J., Resjö, S., Levander, F., et al. (2014). Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. *BMC Plant Biology*, 14, 254. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0254-y>.
- Dietrich, R., Ploss, K., & Heil, M., (2005). Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions, *Plant, Cell and Environment*, 28, 211–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01265.x>.
- Dufour, M. C., Lambert, C., Bouscalt, J., Méridon, J. M., & Corio-Costet, M. F. (2013). Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*: Elicitation and grapevine responses to mildews. *Plant Pathology*, 62(2), 370–382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02628.x>.
- Eikemo, H., Stensvand, A., & Tronsmo, A. M. (2003). Induced resistance as a possible means to control diseases of strawberry caused by *Phytophthora* spp. *Plant Disease*, 87(4), 345–350. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.345>.
- Eshraghi, L., Anderson, J., Aryamanesh, N., Shearer, B., McComb, J., Hardy, G. E. St J., et al. (2011). Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology*, 60(6), 1086–1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02471.x>.
- Figueiredo, A., Fortes, A. M., Ferreira, S., Sebastiana, M., Choi, Y. H., Sousa, L., et al. (2008). Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. *Journal of Experimental Botany*, 59 (12), 3371–3381. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern187>.
- Figueiredo, A., Monteiro, F., & Sebastiana, M. (2015). First clues on a jasmonic acid role in grapevine resistance against the biotrophic fungus *Plasmopara viticola*. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3), 645–652. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0634-7>.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., et al. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, 8(4), 629–643. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.4.629>.
- Hamzehzarghani, H., Kushalappa, A. C., Dion, Y., Rioux, S., Comeau, A., Yaylayan, V., et al. (2005). Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(4), 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2005.05.005>.
- Hardy, G. E. St J., Barrett, S., & Shearer, B. L. (2001). The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems. *Australasian Plant Pathology*, 30(2), 133–139. <https://doi.org/10.1071/AP01012>.
- Heil, M. (2002). Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 345–350.

- Hien Dao, T. T., Puig, R. C., Kim, H. K., Erkelens, C., Lefeber, A.W., Linthorst, H. J., et al. (2009). Effect of benzothiadiazole on the metabolome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.001>.
- Hong, Y. S., Martinez, A., Liger-Belair, G., Jeandet, P., Nuzillard, J. M., & Cilindre, C. (2012). Metabolomics reveals simultaneous influences of plant defence system and fungal growth in *Botrytis cinerea*-infected *Vitis vinifera* cv. Chardonnay berries. *Journal of Experimental Botany*, 63(16), 5773–5785. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers228>.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Ferrara, L., & Faoro, F. (2005). Induction of resistance to gray mold with benzothiadiazole modifies amino acid profile and increases proanthocyanidins in grape: primary versus secondary metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9133–9139. <https://doi.org/10.1021/jf050853g>.
- Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5(3), 536–549. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.237>.
- Krzyzaniak, Y., Negrel, J., Lemaitre-Guillier, C., Clément, G., Mouille, G., Klinguer, A., Trouvelot, S., Héloir, M. C., & Adrian M. (2018). Combined enzymatic and metabolic analysis of grapevine cell responses to elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.013>.
- Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., et al. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, 10(1), 71–82. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010071.x>.
- Liang, Y. S., Choi, Y. H., Kim, H. K., Linthorst, H. J., & Verpoorte, R. (2006). Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, 67(22), 2503–2511. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.018>.
- Lima, M. R., Felgueiras, M. L., Graça, G., Rodrigues, J. E., Barros, A., Gil, A. M., et al. (2010). NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 4033–4042. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq214>.
- Lobato, M. C., Olivieri, F. P., Daleo, G. R., & Andreu, A. B. (2010). Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117(3), 102–109. <https://doi.org/10.1007/BF03356343>.
- Marolleau, B., Gaucher, M., Heintz, C., Degrave, A., Warneys, R., Orain, G., et al. (2017). When a plant resistance inducer leaves the lab for the field: Integrating ASM into routine apple protection practices. *Frontiers in Plant Science*, 4(8), 1938. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01938>.
- Massoud, K., Barchietto, T., Le Rudulier, T., Pallandre, L., Didierlaurent, L., Garmier, M., et al. (2012). Dissecting phosphite-induced priming in *Arabidopsis* infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Physiology*, 159(1), 286–298. <https://doi.org/10.1104/pp.112>.
- Mou, Z., Wang, X., Fu, Z., Dai, Y., Han, C., Ouyang, J., et al. (2002). Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14 (9), 2031–2043.
- Nishikawa, F., Kato, M., Hyodo, H., Ikoma, Y., Suigiura, M. (2003) Ascorbate metabolism in harvested broccoli. *Journal of Experimental Botany*, 392 (54), 2439–2448.
- Parvaiz, A., AbassAhanger, M., Pratap Singh, V., Tripathi, D. K., Alam, P., & Alyemeni, M. N. (Eds.). (2018). *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Academic Press.
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>.
- Prezelj, N., Covington, E., Roitsch, T., Gruden, K., Fragner, L., Weckwerth, W., et al. (2016). Metabolic consequences of infection of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. "Modra frankinja" with *Flavescence Dorée* phytoplasma. *Frontiers in Plant Science*, 7, 711. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00711>.
- Repka, V., Fischerová, I., & Silhárová, K. (2004). Methyljasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologica Plantarum*, 48(2), 273–283. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033456.27521.e5>.
- Robert-Seilantantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>.

- Terry, L. A., & Joyce, D. C. (2000). Suppression of grey mold on strawberry fruit with the chemical plant activator acibenzolar. *Pest Management Science*, 56(11), 989-992. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200011\)56:11<989::AID-PS229>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200011)56:11<989::AID-PS229>3.0.CO;2-A).
- Zhang, H., Murzello, C., Sun, Y., Kim, M. S., Xie, X., Jeter, R. M., et al. (2010). Choline and osmotic-stress tolerance induced in *Arabidopsis* by the soil microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (8), 1097–1104. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-8-1097>.
- Zulak, K. G., Weljie, A. M., Vogel, H. J., Facchini, P. J. (2008) Quantitative ¹H NMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures. *BMC Plant Biology*, 8, 5. <https://doi: 10.1186/1471-2229-8-5>.

Supplementary materials

Impact of different elicitors on grapevine leaf metabolism monitored by ¹H NMR spectroscopy

Aleksandra Burdziej^{1,2}. Grégory Da Costa¹. Louis Gougeon¹. Inès Le Mao¹. Anthony Bellée³. Marie-France Corio-Costet³. Jean-Michel Mérillon¹. Tristan Richard¹. Anna Szakiel². Stéphanie Cluzet¹

¹ Univ. Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (GESVAB), ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

² Department of Plant Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warsaw, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, Poland

³ INRA, UMR Santé et Agroécologie du Vignoble (1065), ISVV, Labex Cote, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France

Corresponding author: Stéphanie Cluzet

stephanie.cluzet@u-bordeaux.fr

List of Supplementary Material

Table S1 Standards used for assessment of spectral peaks by metered additions in grapevine leaves extracts.

Table S2 ^1H NMR chemical shifts (δ) and coupling constants (Hz) of metabolites identified in grapevine leaf extracts ($\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ in D_2O , pH 6.0) by using 1D NMR and 2D NMR spectra.

Table S3 Factor analysis for metabolites of grapevine leaves differently elicited. Correlation coefficient of the factor loadings calculated for PC1, PC2 and PC3. Values in bold indicate significance of correlation coefficient set at threshold of 0.7 and metabolites that most significantly correlated to the PC, as indicated by the square of the cosine ($\cos^2$).

Table S4 Identified and semi-quantified metabolites by ^1H NMR in grapevine leaves differently elicited 24 h post-treatment ('Untreated' – control leaves treated with distilled water; 'Triton' – control leaves treated with Triton X-100; 'MeJA' – leaves elicited with methyl jasmonate; 'PHOS' – leaves elicited with phosphonates (LBG-01F34); 'ASM' – leaves elicited with acibenzolar-S-methyl). Values are expressed as means of three (except Triton and PHOS, two) replicates with standard deviations (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was applied ($p < 0.05$) in order to establish the significant differences between elicitor-treated and control leaves.

Figure S1. Example of the resolution power of Global Spectral Deconvolution (GSD). Deconvolved GSD peaks in the region of interest are shown in blue and the original raw spectrum in red.

Figure S2 Score (A) and distribution of variables on loading plot (B) of principal component analysis (PCA) on quantifications of all identified metabolites in grapevine leaves discriminating each condition at 24 h after elicitation: 'Untreated' – control leaves treated with distilled water; 'Triton' – control leaves treated with Triton X-100; 'MeJA' – leaves elicited with methyl jasmonate; 'PHOS' – leaves elicited with phosphonates (LBG-01F34); 'ASM' – leaves elicited with acibenzolar-S-methyl. The combination of PC1 and PC2, PC1 and PC3, and PC2 and PC3 is presented. Ellipses represent the 95% confidence intervals calculated for each modality.

Figure S3 Relative quantification of compounds determined from integrals of the ^1H NMR associated signals. Values are expressed as means of three (except Triton and PHOS, two) replicates with standard deviations. Tukey's honesty significance test was applied to compare simultaneously the means of every treatment against control and establish their significance. The same alphabet letters represent no significant differences between every treatment (even Triton) and control ('Untreated') and among treatments. Different alphabets indicate significant differences among these groups ($P < 0.05$). A – sugars; B – amino acids; C – organic acids; D – phenolic compounds; E – amines.

Table S1 Standards used for assessment of spectral peaks by metered additions in grapevine leaves extracts.

Compound	CAS Number	Supplier
Acetic acid	64-19-7	Fisher Scientific, UK
Adenine	73-24-5	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Alanine	56-41-7	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
γ -Aminobutyric acid (GABA)	56-12-2	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Ascorbic acid	50-81-7	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
(+)-Catechin	225937-10-0	Sigma-Aldrich, China
Choline	67-48-1	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Fumaric acid	110-17-8	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Gallic acid	149-91-7	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Glutamic acid	56-86-0	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Glutamine	56-85-9	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
<i>myo</i> -Inositol	87-89-8	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Malic acid	97-67-6	Aldrich Chemical Co., Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Proline	147-85-3	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Pyruvic acid	127-17-3	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	482-35-9	BioChemika, Sigma-Aldrich, Germany
Succinic acid	110-15-6	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Syringic acid	530-57-4	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Tartaric acid	133-37-9	Fluka, Sigma-Aldrich, Germany
Threonine	72-19-5	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Trigonelline	535-83-1	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Tyrosine	60-18-4	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
Valine	72-18-4	Sigma-Aldrich, St Louis, USA

Table S2 ^1H NMR chemical shifts (δ) and coupling constants (Hz) of metabolites identified in grapevine leaf extracts ($\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ in D_2O , pH 6.0) by using 1D NMR and 2D NMR spectra.

Compound	Chemical shifts (δ), Multiplicity, Coupling constants (Hz) and Number of protons
Valine	0.99 (d, $J=7.0$, 3H), 1.05 (d, $J=7.2$, 3H)
Threonine	1.33 (d, $J=6.8$, 3H)
Alanine	1.48 (d, $J=7.3$, 3H)
γ -Aminobutyric acid (GABA)	1.92 (m, 2H), 2.42 (t, $J=7.4$, 2H), 3.01 (t, $J=7.8$, 2H)
Proline	2.0 (m, 3H), 2.08 (m, 1H)
Acetic acid	2.05 (s, 3H)
Glutamine	2.12 (m, 2H), 2.44 (m, 2H)
Pyruvic acid	2.34 (s, 3H)
Glutamic acid	2.50 (m, 2H)
Succinic acid	2.59 (s, 4H)
Malic acid	2.65 (dd, $J=7.8$, 17.0, 1H), 2.81 (dd, $J=4.7$, 17.0, 1H), 4.38 (dd, $J=4.6$, 8.0, 1H)
Choline	3.20 (s, 9H), 3.50 (dd, $J=5.82$, 4.16, 2H)
<i>myo</i> -Inositol	3.22 (t, $J=9.5$, 1H), 3.46 (dd, $J=2.9$, 10.0, 2H), 3.60 (t, $J=9.9$, 2H)
Ascorbic acid	3.70 (d, $J=7.0$, 1H)
Syringic acid	3.90 (s, 6H)
Shikimic acid	3.93 (m, 1H), 6.75 (m, 1H)
Fructose	4.07 (d, $J=3.8$, 5H)
Sucrose	4.16 (d, $J=5.5$, 1H), 5.39 (d, $J=4.0$, 1H)
Tartaric acid	4.41 (s, 1H)
β -Glucose	4.57 (d, $J=7.9$, 1H)
α -Glucose	5.18 (d, $J=3.8$, 1H)
(+)-Catechin	5.96 (d, $J=2.3$, 1H), 6.05 (d, $J=2.3$, 1H)
Quercetin-3-O-glucoside	6.265 (d, $J=2.2$, 1H), 6.53 (d, $J=2.2$, 1H), 6.98 (d, $J=8.8$, 1H), 7.57 (dd, $J=8.5$, 2.0, 1H), 7.74 (d, $J=2.2$, 1H)
<i>trans</i> -Feruloyl derivative	6.41 (d, $J=16.6$, H), 6.87 (d, $J=8.2$, H), 7.07 (dd, $J=2.0$, 8.3, H), 7.16 (d, $J=1.8$, H), 7.62 (d, $J=16.7$, H)
Fumaric acid	6.65 (s, 2H)
Tyrosine	6.85 (d, $J=8.3$, 2H), 7.16 (d, $J=9.0$, 2H)
Gallic acid	7.10 (s, 2H)
Adenine	8.13 (s, 1H)
Trigonelline	8.85 (m, 2H), 9.14 (s, 1H)

s singlet, *d* doublet, *dd* double doublet, *t* triplet, *m* multiplet

Table S3 Factor analysis for metabolites of grapevine leaves differently elicited. Correlation coefficient of the factor loadings calculated for PC1, PC2 and PC3. Values in bold indicate significance of correlation coefficient set at threshold of 0.7 and metabolites that most significantly correlated to the PC, as indicated by the square of the cosine ($\cos^2$).

Metabolite	Correlation coefficient		
	PC1	PC2	PC3
Amino acids			
Alanine	0.578	0.803	-0.076
GABA	0.898	-0.145	-0.072
Glutamic acid	-0.106	0.885	0.222
Glutamine	0.360	0.893	-0.189
Proline	0.109	0.478	0.731
Threonine	0.123	0.968	-0.006
Tyrosine	0.599	0.283	0.461
Valine	0.021	0.938	-0.084
Sugars			
α -Glucose	0.888	-0.439	-0.050
β -Glucose	0.788	-0.590	0.064
Fructose	0.916	-0.289	0.052
Sucrose	0.805	-0.581	0.038
<i>myo</i> -Inositol	0.974	0.066	0.007
Organic acids			
Fumaric acid	0.691	-0.077	-0.572
Pyruvic acid	0.889	0.290	-0.265
Acetic acid	-0.281	0.839	-0.047
Succinic acid	0.667	0.048	0.243
Malic acid	0.919	-0.314	-0.114
Tartaric acid	0.847	-0.389	0.030
Ascorbic acid	0.848	0.394	0.032
Phenolics			
<i>trans</i> -Feruloyl derivative	0.328	0.641	0.494
Gallic acid	0.876	0.317	0.261
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	0.956	0.125	-0.036
Shikimic acid	0.789	0.058	0.229
Syringic acid	0.972	-0.161	0.132
(+)-Catechin	-0.063	-0.345	0.750
Amines			
Trigonelline	0.455	0.546	-0.590
Choline	-0.480	-0.302	0.212
Adenine	-0.149	0.184	-0.198
Percent total variance	26.33%	46.24%	9.36%
Cumulative percent variance			81.93%

Table S4 Identified and semi-quantified metabolites by ^1H NMR in grapevine leaves differently elicited 24 h post-treatment ('Untreated' – control leaves treated with distilled water; 'Triton' – control leaves treated with Triton X-100; 'MeJA' – leaves elicited with methyl jasmonate; 'PHOS' – leaves elicited with phosphonates (LBG-01F34); 'ASM' – leaves elicited with acibenzolar-S-methyl). Values are expressed as means of three (except Triton and PHOS, two) replicates with standard deviations (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) was applied ($p < 0.05$) in order to establish the significant differences between elicitor-treated and control leaves. Asterisks denote the significance levels as compared to control samples: $p \geq 0.05$ (ns), 0.01 to 0.05 (*), 0.001 to 0.01 (**), 0.0001 to 0.001 (***), <0.0001 (****).

Metabolite	Elicitor	Mean	SD	p-value
Alanine	Untreated	36.67	0.64	**
	Triton	32.66	0.10	
	MeJA	39.10	3.06	
	PHOS	27.80	4.01	
	ASM	24.22	0.74	
GABA	Untreated	9.55	1.52	*
	Triton	6.98	1.28	
	MeJA	4.06	0.58	
	PHOS	4.14	0.03	
	ASM	3.97	0.38	
Glutamic acid	Untreated	123.37	0.80	
	Triton	122.43	2.55	
	MeJA	164.44	19.08	
	PHOS	118.25	12.43	
	ASM	129.24	3.43	
Glutamine	Untreated	53.71	2.81	***
	Triton	40.28	2.29	
	MeJA	78.88	4.79	
	PHOS	22.50	4.36	
	ASM	17.42	1.64	
Proline	Untreated	187.27	0.67	*
	Triton	241.99	5.73	
	MeJA	225.47	14.63	
	PHOS	145.20	12.84	
	ASM	208.87	10.38	
Threonine	Untreated	30.45	0.85	
	Triton	28.78	0.87	
	MeJA	40.71	3.98	
	PHOS	28.13	4.13	
	ASM	24.99	0.44	

Table S4 (continued)

Metabolite	Elicitor	Mean	SD	p-value
Tyrosine	Untreated	5.23	0.24	
	Triton	5.69	0.28	
	MeJA	4.82	0.76	
	PHOS	4.92	0.50	
	ASM	4.23	0.09	
Valine	Untreated	4.48	0.34	
	Triton	3.69	0.02	
	MeJA	7.04	0.53	**
	PHOS	3.43	0.65	
	ASM	3.66	0.30	
α -Glucose	Untreated	82.16	0.65	
	Triton	63.53	0.37	***
	MeJA	38.62	1.36	*****
	PHOS	49.29	3.03	*****
	ASM	49.97	1.33	*****
β -Glucose	Untreated	169.05	0.67	
	Triton	140.44	2.10	*
	MeJA	64.38	7.83	*****
	PHOS	108.87	8.55	***
	ASM	108.53	2.79	***
Fructose	Untreated	51.53	0.24	
	Triton	46.53	0.36	
	MeJA	33.16	1.62	***
	PHOS	36.09	4.30	**
	ASM	35.74	0.17	***
Sucrose	Untreated	1837.83	1.54	
	Triton	1487.63	21.30	***
	MeJA	749.45	14.19	*****
	PHOS	339.50	28.58	*****
	ASM	1222.85	36.09	*****
<i>myo</i> -Inositol	Untreated	552.35	1.50	
	Triton	453.69	6.60	*
	MeJA	408.20	19.04	***
	PHOS	339.50	28.58	*****
	ASM	377.12	8.31	***
Fumaric acid	Untreated	1.08	0.06	
	Triton	0.44	0.01	***
	MeJA	0.53	0.05	***
	PHOS	0.80	0.05	
	ASM	0.37	0.06	*****
Pyruvic acid	Untreated	1.93	0.03	
	Triton	1.18	0.09	*****
	MeJA	1.34	0.06	***
	PHOS	0.80	0.03	*****
	ASM	0.78	0.03	*****

Table S4 (continued)

Metabolite	Elicitor	Mean	SD	p-value
Acetic acid	Untreated	4.23	0.04	
	Triton	4.03	0.12	
	MeJA	5.35	0.39	*
	PHOS	4.69	0.13	
	ASM	4.27	0.16	
Succinic acid	Untreated	11.09	0.16	
	Triton	9.25	0.13	*
	MeJA	9.24	0.53	*
	PHOS	6.73	0.41	***
	ASM	9.96	0.15	
Malic acid	Untreated	643.10	2.26	
	Triton	353.82	9.69	
	MeJA	164.50	9.69	
	PHOS	185.54	17.19	
	ASM	251.83	16.53	
Tartaric acid	Untreated	455.77	6.96	
	Triton	336.38	11.87	
	MeJA	197.24	50.50	
	PHOS	279.83	21.74	
	ASM	264.69	14.53	
Ascorbic acid	Untreated	202.29	3.11	
	Triton	190.94	0.37	
	MeJA	138.68	10.48	
	PHOS	0		
	ASM	0		
<i>trans</i> -Feruloyl derivative	Untreated	168.16	2.40	
	Triton	195.35	0.36	
	MeJA	184.62	14.55	
	PHOS	167.01	15.76	
	ASM	153.65	3.11	
Gallic acid	Untreated	3.67	0.21	
	Triton	3.82	0.07	
	MeJA	2.39	0.55	
	PHOS	0.27	0.04	***
	ASM	0.88	0.06	**
Quercetin-3-O-glucoside	Untreated	59.55	1.69	
	Triton	44.67	0.35	*
	MeJA	42.11	4.16	**
	PHOS	33.44	1.91	***
	ASM	37.04	0.77	***

Table S4 (continued)

Metabolite	Elicitor	Mean	SD	p-value
Shikimic acid	Untreated	43.49	0.48	
	Triton	51.83	3.92	
	MeJA	28.57	3.43	*
	PHOS	18.55	7.44	**
	ASM	20.33	0.60	**
Syringic acid	Untreated	11.15	0.05	
	Triton	9.37	0.01	
	MeJA	6.16	0.78	****
	PHOS	6.15	0.85	****
	ASM	6.50	0.13	****
(+) -Catechin	Untreated	10.29	0.27	
	Triton	12.02	0.60	
	MeJA	9.61	1.10	
	PHOS	11.48	1.35	
	ASM	11.99	0.28	
Trigonelline	Untreated	2.74	0.03	
	Triton	0.72	0.71	
	MeJA	2.56	0.19	
	PHOS	0.05	0.36	
	ASM	0		
Choline	Untreated	16.37	0.61	
	Triton	15.19	0.38	
	MeJA	18.48	1.46	
	PHOS	24.91	2.23	*
	ASM	23.92	0.47	*
Adenine	Untreated	0.48	0.08	
	Triton	0.59	0.00	
	MeJA	0.82	0.02	
	PHOS	0.50	0.14	
	ASM	0.50	0.03	

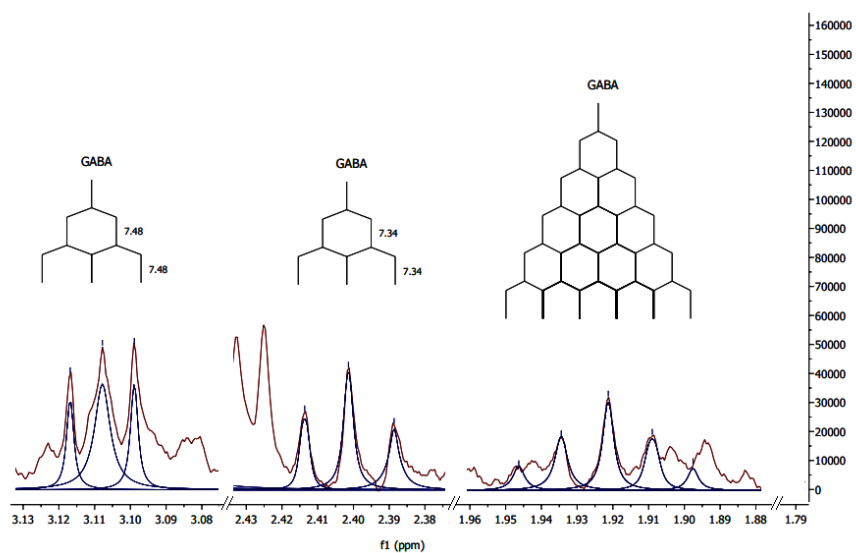


Fig.S1 Example of the resolution power of Global Spectral Deconvolution (GSD). Deconvolved GSD peaks in the region of interest are shown in blue and the original raw spectrum in red.

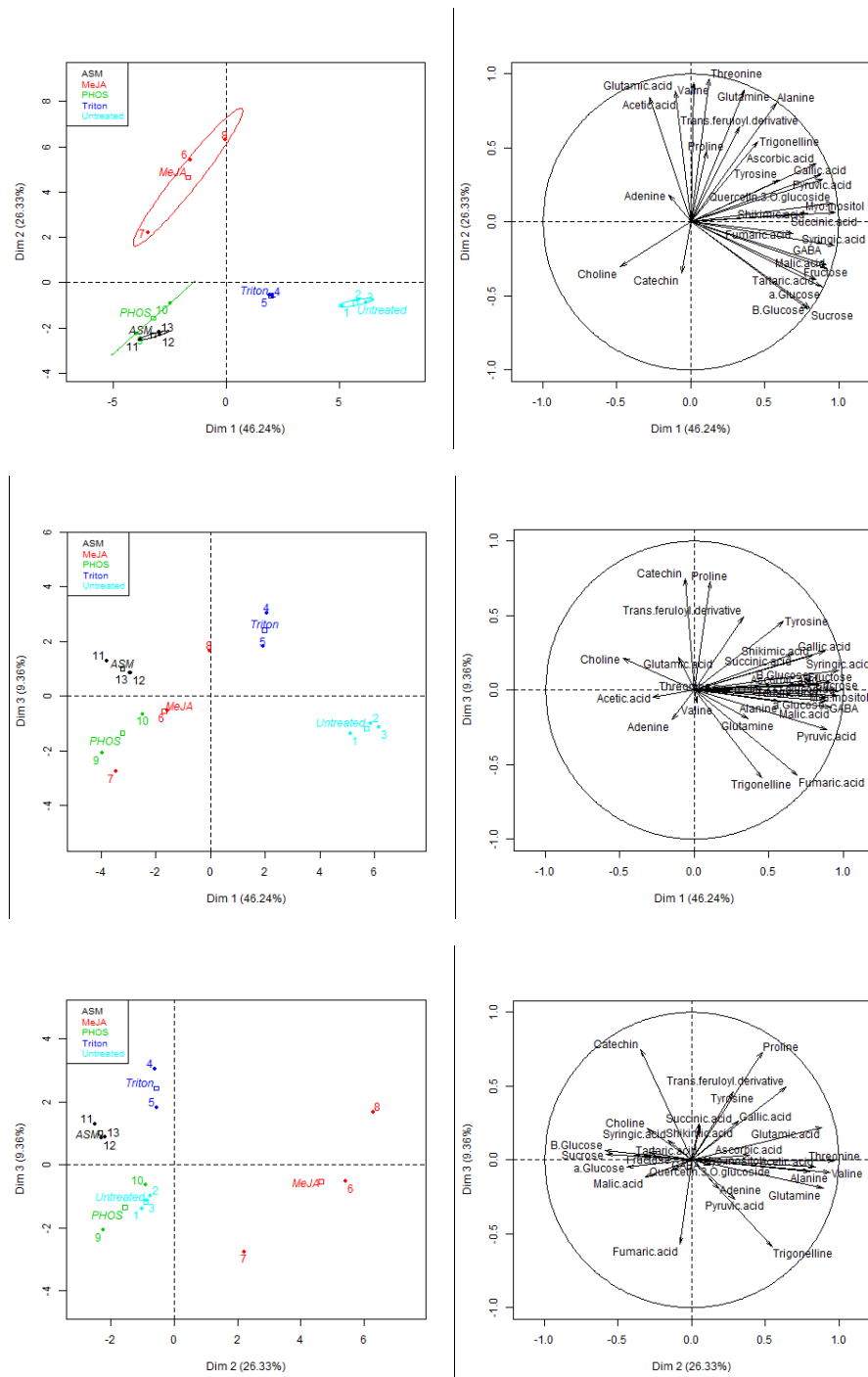
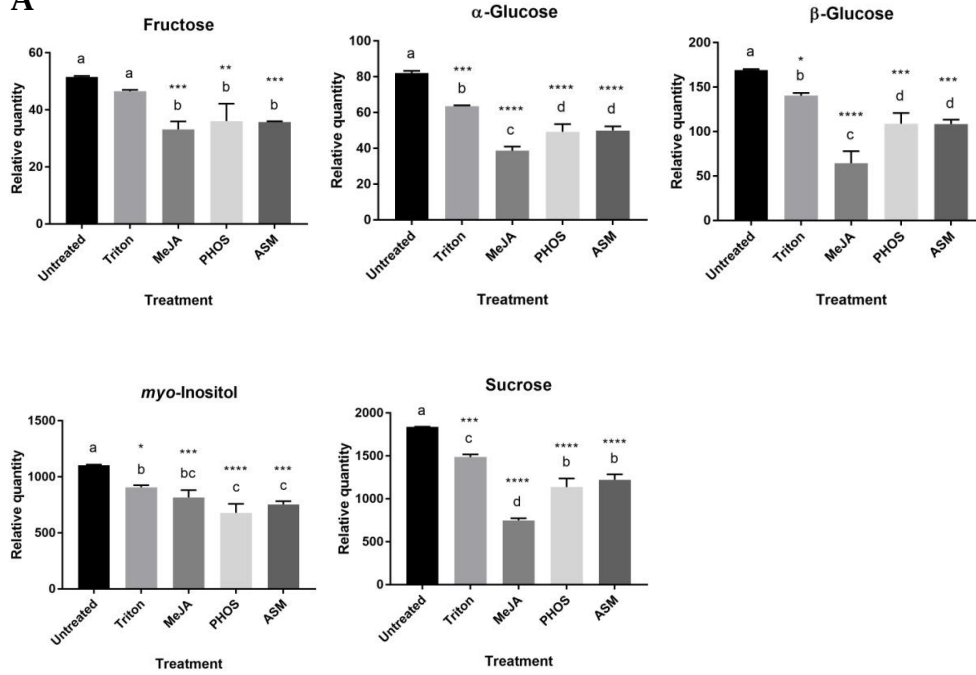
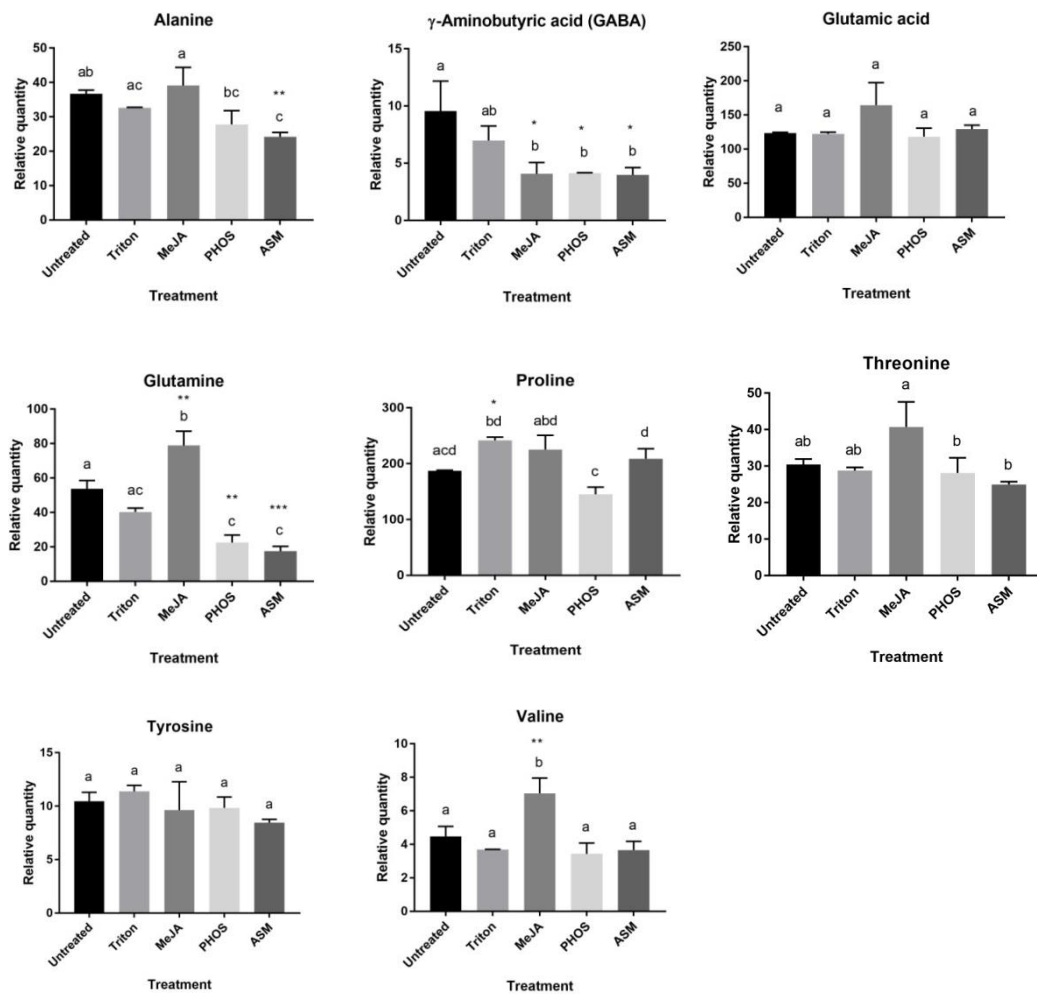


Fig. S2 Score (A) and distribution of variables on loading plot (B) of principal component analysis (PCA) on quantifications of all identified metabolites in grapevine leaves discriminating each condition at 24 h after elicitation: ‘Untreated’ – control leaves treated with distilled water; ‘Triton’ – control leaves treated with Triton X-100; ‘MeJA’ – leaves elicited with methyl jasmonate; ‘PHOS’ – leaves elicited with phosphonates (LBG-01F34); ‘ASM’ – leaves elicited with acibenzolar-S-methyl. The combination of PC1 and PC2, PC1 and PC3, and PC2 and PC3 is presented. Ellipses represent the 95% confidence intervals calculated for each modality.

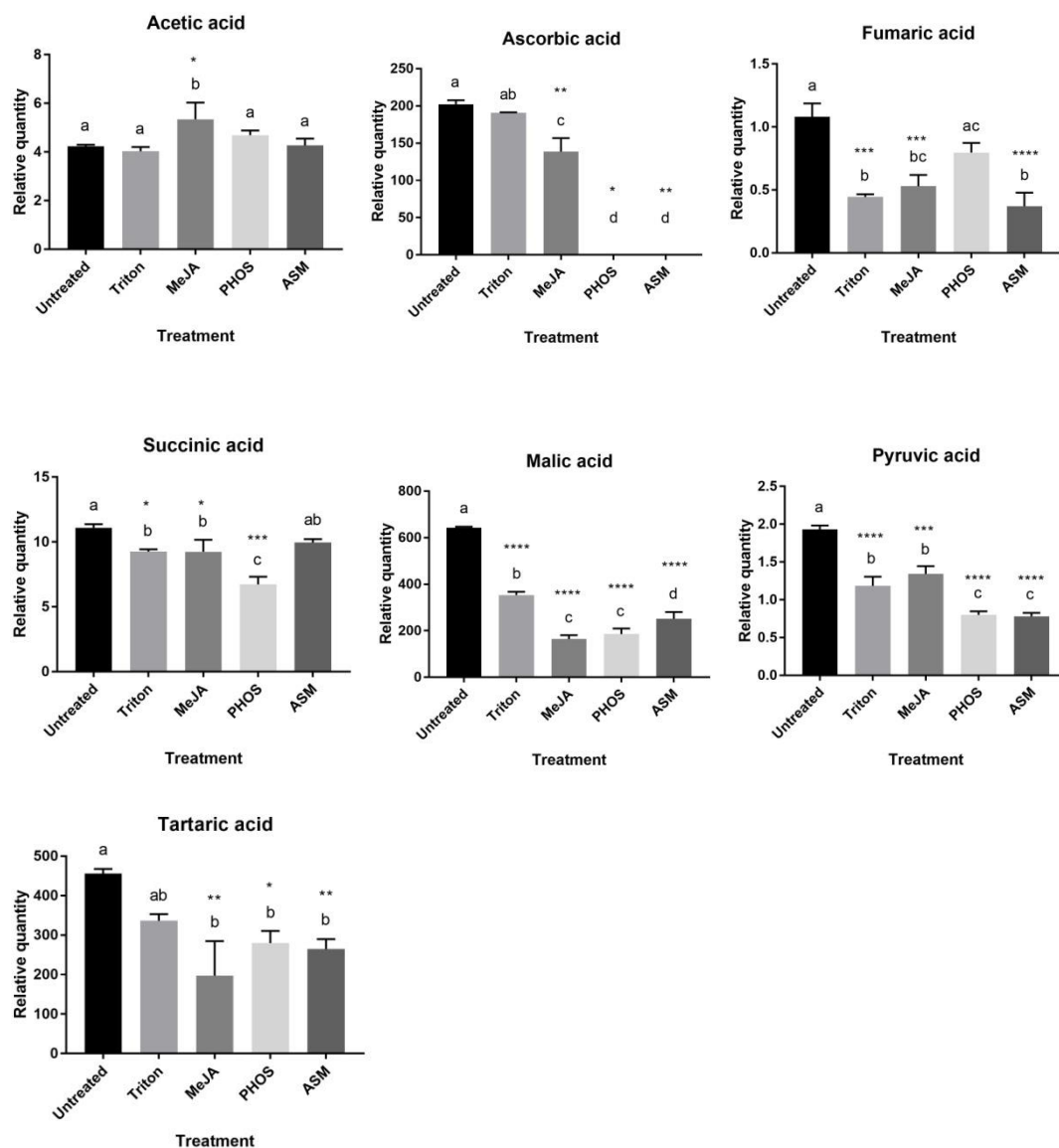
A



B



C



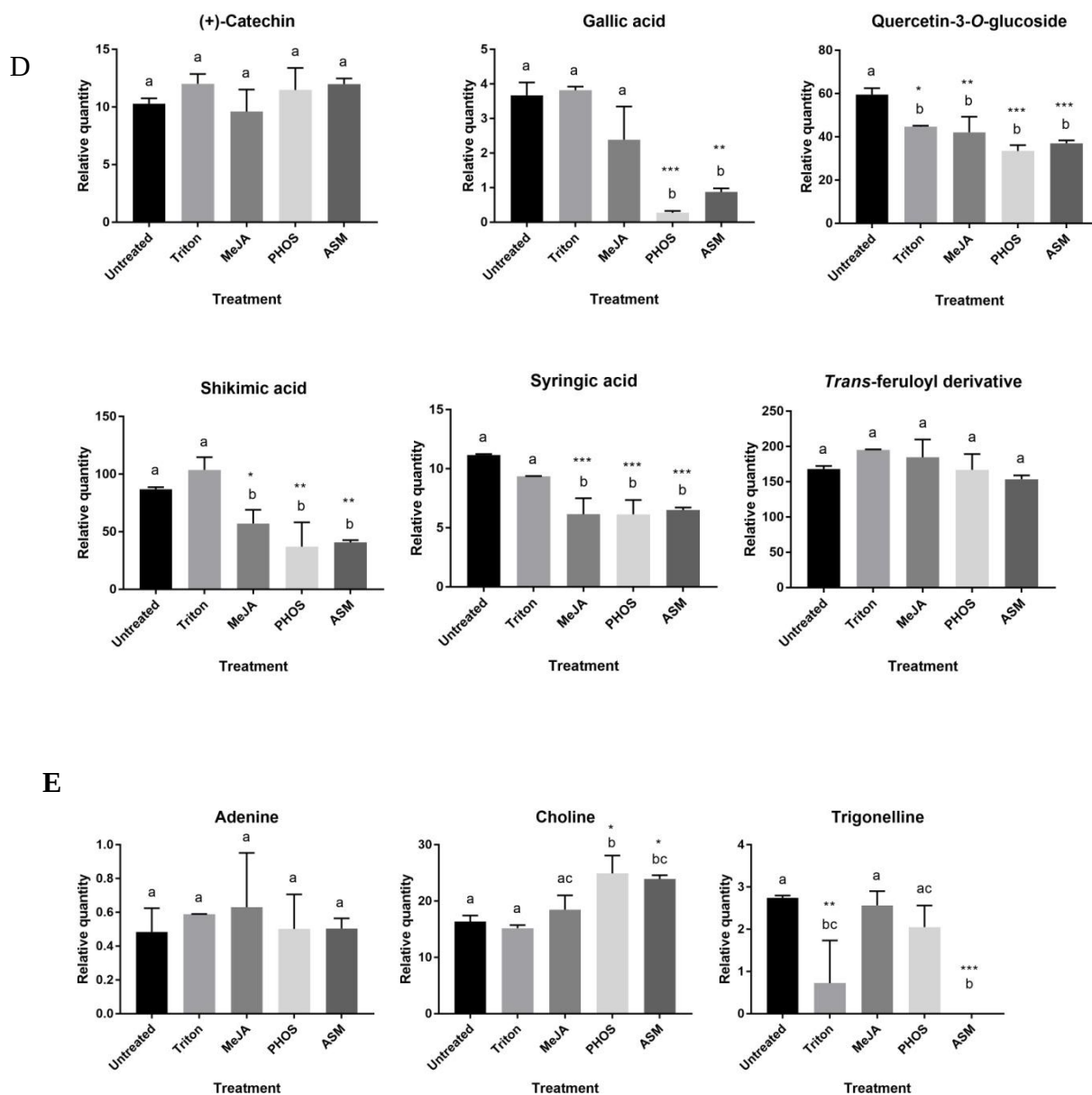


Fig.S3 Relative quantification of compounds determined from integrals of the ^1H NMR associated signals. Values are expressed as means of three (except Triton and PHOS, two) replicates with standard deviations. Tukey's honesty significance test was applied to compare simultaneously the means of every treatment against control and establish their significance. The same alphabet letters represent no significant differences between every treatment (even Triton) and control ('Untreated') and among treatments. Different alphabets indicate significant differences among these groups ($P < 0.05$). Asterisks denote the significance levels as compared to control samples: $p \geq 0.05$ (ns), 0.01 to 0.05 (*), 0.001 to 0.01 (**), 0.0001 to 0.001 (***), <0.0001 (****). A – sugars; B – amino acids; C – organic acids; D – phenolic compounds; E – amines.