Etude des impacts à long terme du changement climatique et de l'adaptation de la filière viti-vinicole française : projet Laccave

Nathalie Ollat, Jean-Marc Touzard

▶ **To cite this version:**

Nathalie Ollat, Jean-Marc Touzard. Etude des impacts à long terme du changement climatique et de l'adaptation de la filière viti-vinicole française : projet Laccave. 11. Journée technique du CIVB : S'adapter aux défis de demain et garantir la qualité de nos vins, de la pratique à l'innovation, Conseil interprofessionnel des Vins de Bordeaux (CIVB). Bordeaux, FRA., Feb 2013, Bordeaux, France. 160 p. hal-02750093

HAL Id: hal-02750093
https://hal.inrae.fr/hal-02750093

Submitted on 3 Jun 2020

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

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

Mardi 5 février 2013
Palais des Congrès
de Bordeaux

11e JOURNÉE TECHNIQUE DU CIVB

"S'adapter
aux défis de demain
et garantir la
qualité de nos vins,
de la pratique
à l'innovation"

LES ACTES DU COLLOQUE

BORDEAUX

Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux

La loi du 1er juillet 1992 interdit, sous réserve des dispositions de l'article L 122-5
"toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants-droits ou ayants-cause…"

"Le non-respect de cette disposition constitue une contrefaçon, délit réprimé
par l'article L 335-2 du Code de la Propriété Intellectuelle."

Conception couverture Agence 2 Com - Crédits photos : Photothèque du CIVB, Ph. ROY, Tainguy
Imprimerie Laplante, Mérignac

PROGRAMME

Introduction
Georges Haushalter, Président du CIVB 5

Les actions techniques du CIVB
Philippe Bardet, Didier de Couesbouc
Co-Présidents de la Commission technique du CIVB 6

INNOVATIONS TECHNIQUES ET ANALYTIQUES

Développement de sondes fluorescentes pour l'analyse simultanée des acides du vin
Guillaume Lautrette, Yann Ferrand, Ivan Huc 13

Mise au point d'une méthode simple, peu coûteuse et haut débit, pour le dosage des amines biogènes dans les vins
Andrea Romano, Patrick Lucas 19

Méthodes et recherches applicables pour la détection des contrefaçons : applications à quelques cas concrets
Bernard Médina ..... *(document joint)*

Nouvelle directive réglementaire en matière d'étiquetage des vins, comment s'adapter ?
Charlotte Anneraud 29

DÉCRYPTAGE ET PRÉSERVATION DE LA QUALITÉ AROMATIQUE ET GUSTATIVE DES VINS DE BORDEAUX

Caractérisation des composés impliqués par des phénomènes d'interactions perceptives dans les nuances fruitées de l'arôme des vins liquoreux
Panagiotis Stamatopoulos et Philippe Darriet 41

Interactions tanins-lipides : quel impact sur le goût des vins ?
Aurélien Furlan, Axelle Grélard, Isabelle Pianet, Erick J. Dufourc, Julie Géan 49

Etude qualité bouchon : période analysée janvier 2008 - décembre 2011
Eva Mondini 56

Observatoire des matières sèches : bilan intermédiaire après 2 ans d'expérimentation
Catherine Chassagnou, Jean-Christophe Crachereau, Véronique Raffestin-Tort 67

Les capacités de segmentation olfactive des dégustateurs professionnels
Sophie Tempère, Marie-Hélène Schaaper, Eléonore Cuzange,
Régis de Lescar, Gilles Sicard, Gilles de Revel 78

ADAPTATION AU CHANGEMENT CLIMATIQUE

S'adapter au changement climatique : les conséquences du changement climatique nous amène(ro)nt à adapter nos itinéraires et choix techniques. Tour d'horizon des pistes à l'étude.
Vincent Viguié *87*

Etude des impacts à long terme du changement climatique et de l'adaptation de la filière viti-vinicole française - Projet LACCAVE
Nathalie Ollat, Jean Marc Touzard *92*

La modélisation de la phénologie comme outil pour choisir le matériel végétal dans un climat changeant
Cornelis (Kees) van Leeuwen, Amber Parker, Agnès Destrac, Laure de Rességuier, Inaki García de Cortázar-Atauri et Isabelle Chuine *100*

Terroirs viticoles et changement climatique
Hervé Quénol *110*

Adaptation de la vinification en rouge aux conditions de changement climatique
Fernando Zamora *117*

MANAGEMENT DE LA PROTECTION DU VIGNOBLE ET DE L'ENVIRONNEMENT

Dix années de recherches sur la Flavescence dorée de la vigne
Sylvie Malembic-Maher, Nathalie Arricau-Bouvery, Patricia Carle, Jean-Luc Danet, Delphine Desqué, Kaelig Guionnaud, Brigitte Batailler, Pascal Salar, Sandrine Eveillard et Xavier Foissac *127*

Les Stimulateurs de défense de la vigne, mythe ou réalité ? Quelle efficacité et quel avenir en protection de la vigne : du gène au champ ?
Marie-France Corio-Costet et Marie-Cécile Dufour *135*

Développements analytiques pour l'identification et le suivi in situ de composés phénoliques dans la défense des feuilles de vignes caractérisées pour leur niveau de résistance au Mildiou
Loïc Becker, Vincent Carré, Anne Poutaraud, Didier merdinoglu, Patrick Chaimbault *143*

La communauté microbienne de la baie de raisin ; impact des facteurs environnementaux
Guilherme Martins, Cécile Miot-Sertier, Béatrice Lauga, Olivier Claisse, Aline Lonvaud, Guy Soulas, Isabelle Masneuf-Pomarède *151*

INTRODUCTION

Georges HAUSHALTER
Président du CIVB

Chers collègues,

Cette 11ème Journée technique du CIVB est l'occasion de vous présenter les résultats de travaux originaux et novateurs, soutenus par l'interprofession, dans des domaines variés, comme l'analyse des vins, la compréhension de la typicité des vins ou la protection du vignoble et de l'environnement.

Le fil conducteur de cette journée est celui de l'innovation transversale : comment aller de l'émergence d'une idée chez un professionnel dans son travail quotidien jusqu'à la construction d'une recherche de qualité par des scientifiques intéressés.

Ces innovations s'inscrivent dans une politique à long terme, poursuivie par la filière des vins de Bordeaux. En effet, seule la durée permet aux équipes d'innover et de proposer des réponses aux multiples enjeux auxquels notre filière est confrontée et la liste est longue, citons en quelques-uns sans épuiser le sujet : qualité de nos vins, adaptation aux évolutions du climat, sécurité alimentaire, développement durable, lutte contre la contrefaçon, etc….

Avec du temps et des moyens, avec aussi la volonté de regrouper les forces de la recherche, à commencer par la recherche locale, il est envisageable de relever de nombreux défis. C'est une occasion de dire à quel point nous soutenons le projet de nouvelle université bordelaise malgré les réticences de certains. Nous soutenons aussi et au sein de cette nouvelle université à dimension internationale, l'émergence d'un grand pôle viti-oeno à Bordeaux.

N'oublions pas que l'image de notre filière et de nos produits a toujours bénéficié des recherches et acquis de l'école bordelaise. C'est une caractéristique majeure de notre vignoble et qui renforce sa réputation.

Merci donc aux chercheurs de toutes les disciplines que nous soutenons résolument depuis des décennies.

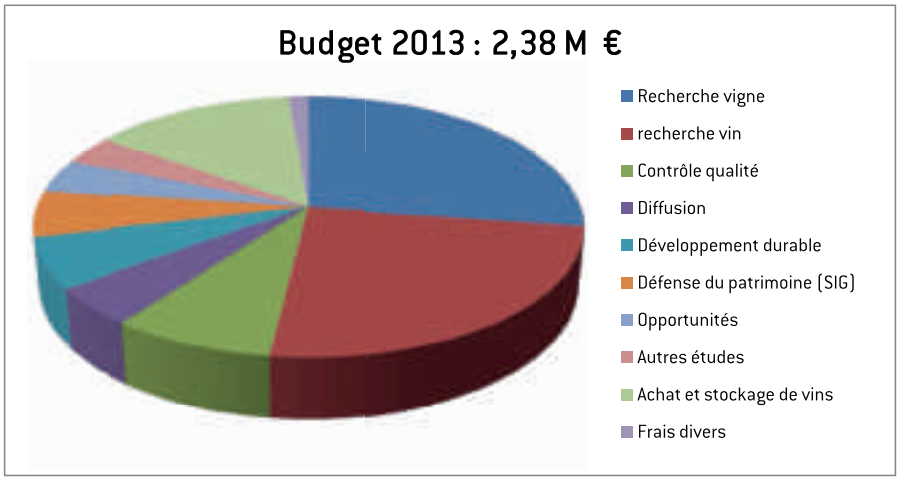
Je vous souhaite une agréable participation aux travaux de cette journée.

LES ACTIONS TECHNIQUES DU CIVB

Didier de COUESBOUC, Philippe BARDET
Co-Présidents de la Commission technique du CIVB

Faire avancer la connaissance pour permettre à tous les opérateurs de produire un raisin de qualité sans cesse améliorée, devenir la référence en matière de développement durable sont les ambitions poursuivies par la Commission technique du CIVB. Celle-ci est composée de 9 viticulteurs et 9 négociants. Elle définit les orientations de l'action interprofessionnelle et veille à leur suivi. Elle dispose d'un budget annuel de 2,4 millions d'euros (voir graphe) pour les actions suivantes :

- la recherche, le transfert et le développement (vigne et vin),
- l'information et la diffusion,
- le suivi aval de la qualité,
- le développement durable,
- le SIG (système d'informations géographiques) du Vin de Bordeaux.



Ces deux dernières années ont été marquées parmi de nombreuses évolutions et innovations :

- Démarrage de la mise sous management environnemental de la filière avec l'obtention de la certification collective ISO 14001,
- Accession à la reconnaissance « certification environnementale de niveau 2 » pour les entreprises du SME certifiées,
- Mise en place d'une nouvelle version du SIG plus ergonomique, rapide et disponible en version nomade.

L'année 2013 sera marquée par la mise en place du nouveau programme de recherche 2013/2015, la mise à jour du bilan carbone établi en 2008, la définition d'une stratégie pour le suivi et l'entretien de la biodiversité en Gironde viticole, la mise en place d'une plateforme d'authentification des vins,…

Toutes ces avancées ont pu se faire grâce aux actions développées les années antérieures via le travail de R&D.

RECHERCHE ET EXPÉRIMENTATION

Préparer l'avenir et anticiper les problèmes par la mise en place de travaux qui porteront leurs fruits d'ici quelques années est la première mission dévolue à la Commission technique du CIVB.

Le CIVB soutient ainsi un important programme d'études (1,2 millions d'euros par an, pour le programme 2010/2013), qui comporte une trentaine de contrats de recherche et d'expérimentation, contribuant au soutien financier de 17 thèses de doctorat et 7 emplois de « post-doctorant » au cours de cette période. Les axes prioritaires poursuivis en 2010/13 concernent l'adaptation au changement climatique, le développement durable, œnologie et produit, les techniques d'analyses et dégustations (détails, voir tableau 1).

L'essentiel des travaux présentés lors de cette journée technique provient de ce programme de recherche. Beaucoup de travaux n'auraient jamais été initiés sans un partenariat constant entre la recherche et les acteurs de terrain et une volonté permanente d'innover pour répondre aux très nombreuses attentes techniques de la filière. Nous avons donc fait de l'innovation le fil rouge de cette 11ème journée technique du CIVB.

Le service technique intervient également au niveau national aux travaux et réflexions de la filière :

- Participation aux orientations R & D du fonds viticole FranceAgriMer (et obtention de crédits en 2011 et 2012 sur cette ligne pour le CIVB, l'INRA et l'ISVV),
- Co-financement dans le cadre du CNIV de travaux sur le génome de la vigne,
- Participation au CST (conseil scientifique et technique) de la filière, aux groupes de travail « contaminants » et « guide de bonnes pratiques d'hygiène »,
- Réflexion sur la constitution d'un GIS (groupement d'intérêt scientifique) Vigne.

Le CIVB est membre et soutien du Cluster Inno'vin. Ce cluster regroupe 65 adhérents dont 50 entreprises de la filière vitivinicole. Depuis sa création en 2010, il a permis la labellisation et le co-financement d'une dizaine de projets d'innovation. En développant des innovations des entreprises de la filière, il contribue au développement économique de notre filière et complète les actions du CIVB en matière de recherche et d'expérimentation, en assurant un relais complémentaire entre les organismes de recherche et de développement et les industries de la filière.

Lutte contre la contrefaçon

Le développement considérable de l'exportation expose d'avantage les vins de Bordeaux à des contrefaçons, plus ou moins grossières. Elle fait l'objet de la mesure 5 du plan Bordeaux Demain (mesure 5) qui comporte plusieurs pistes de travail : demande d'enregistrement de l'IG Bordeaux auprès des autorités chinoises, prélèvement sur linéaires, développement des formations de l'Ecole du Vin de Bordeaux à l'international, application Smart Bordeaux,…
En matière technique, le CIVB souhaite mettre en place avec ses partenaires une plateforme d'authentification des vins qui s'appuiera sur les équipes scientifiques compétences. L'objectif à court terme est de disposer d'un dispositif d'analyses complet du vin et des éléments de la bouteille (verre, étiquette, capsule) afin d'établir rapidement l'authenticité d'une bouteille suspecte de Bordeaux prélevée sur les marchés, pour répondre à la demande des marchés et valoriser les travaux de recherche menés depuis longtemps sur cette thématique. A plus long terme, il s'agira de développer de nouvelles techniques et bases de données permettant d'établir les caractères analytiques spécifiques aux vins de Bordeaux. Dans ce cadre, un programme de recherche exploratoire est en cours avec le laboratoire SCL et le laboratoire ISM.

Tableau 1 : programmes de recherche et d'expérimentation 2010/2013

ANALYSES ET DÉGUSTATIONS

- Sondes fluorescentes pour l'analyse simultanée des acides du vin (IECB)
- Etude de la Biogenèse des Anthocyanes et des Tannins Condensés (IECB)
- Développement d'une méthode de dosage de l'histamine des vins par chromatographie sur couche mince (Université de Bordeaux 2 Faculté œnologie ISVV)
- Contribution à la mise en place, au suivi et au contrôle d'un jury professionnel de dégustation des vins. Etude des performances de segmentation sensorielle (Université de Bordeaux 2 Faculté œnologie ISVV)
- Dosage de résidus de pesticides dans les vins, les raisins et les effluents viti-vinicoles - développement de la technique de LC-MS/MS (Université de Bordeaux 2 Faculté œnologie, ISVV)
- Développement d'un passeport analytique pour le vin par spectrométries Raman et résonance magnétique nucléaire (SCL, ISM Université de Bordeaux 1)

CHANGEMENT CLIMATIQUE

- Interactions porte-greffe/greffon chez la vigne sous contraintes abiotiques (INRA Bordeaux, UMR EGFV, ISVV)
- Etude de la réponse d'une large gamme de cépages aux évolutions climatiques en Bordelais - Phénotypage et mise en place d'une base de données (ENITAB, ISVV)
- Bases agronomiques, trophiques et génétiques du rapport sucres/polyphénols dans les baies (INRA Bordeaux, UMR, EGFV, ISVV)
- Méthodologie d'étude de la variabilité climatique à méso-échelle - Application à la région du Libournais (INRA Bordeaux, UMR, EGFV, ISVV)

DEVELOPPEMENT DURABLE

- Conservation du patrimoine génétique des cépages bordelais : transfert des connaissances ; Caractérisation et conservation de la biodiversité du matériel végétal ; Alternatives au désherbage chimique pour l'entretien des sols viticoles : évaluation de l'influence sur la production d'itinéraires techniques de gestion intégrée des adventices et de la fertilité des sols (Chambre d'agriculture, service vigne et vin)
- Apports de la protéomique d'expression différentielle dans la lutte contre Esca et Eutypa lata (IECB)
  Flavan-3-ols : Stéréochimie et Phytotoxicité chez la vigne (Université de Bordeaux 1, UMR CBMN)
- Identification et suivi in situ de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées pour leur niveau de résistance au mildiou (Université de Metz, LSMCL ; INRA centre de Colmar)
- Méthode alternative ou complémentaire de protection du vignoble : Efficacité de stimulateurs de défenses sur Oïdium et Mildiou et optimisation en conditions contrôlées et au vignoble (INRA Bordeaux, ISVV, UMR Santé végétale)
- Impact de systèmes de cultures à bas niveaux d'intrants sur la qualité microbiologique de la baie de raisin et sur la microflore des processus fermentaires (Université de Bordeaux 2 Faculté d'œnologie ENITA ISVV)
- Approche pluridisciplinaire pour la gestion de la maladie du court-noué au vignoble (INRA Colmar)
- Flavescence dorée de la vigne : évaluation des sources de risque épidémique et étude des interactions avec les hôtes (INRA Bordeaux, ISVV, UMR GDPP)
- Etude du comportement de la cicadelle de la Flavescence dorée par une triple approche (INRA Bordeaux, ISVV, UMR Santé végétale)
- Recherche d'indicateurs afin de piloter la protection de la grappe de raisin contre les tordeuses et le Botrytis (INRA Bordeaux, ISVV, UMR Santé végétale)

OENOLOGIE ET PRODUIT

- Améliorer la préparation des vins de Bordeaux à la mise en bouteilles pour préserver les qualités obtenues en vinification ; Evaluation de colles non allergènes ; Acquisition de références sur les équipements vinicoles et œnologie raisonnée (Chambre d'agriculture, service vigne et vin – IFVV Bordeaux-Aquitaine)
- Caractérisation et développement de la typicité aromatique des vins de Bordeaux (Université de Bordeaux 2, Faculté œnologie, ISVV)
- Précurseurs d'arômes glycosylés du bois de chêne (Université de Bordeaux 2, Faculté œnologie, ISVV)
- Maîtrise du niveau d'oxygénation des vins et de l'élevage à l'aide de bois de chêne. Recherche de l'optimum de la qualité tannique des vins (IECB - Université de Bordeaux 2, Faculté œnologie, ISVV)
- Interactions perceptives et expression de l'arôme fruité typique des vins rouges (ENITA ISVV)
- Bases moléculaires de la saveur sucrée des vins (Université de Bordeaux 2, Faculté œnologie, ISVV)
- Lipides et tannins : modifications des perceptions organoleptiques produites par les tannins du vin en présence de lipides des membranes tapissant la bouche ou de ceux du bol alimentaire (IECB)
- Les Sucres et l'Astringence : effet des polysaccharides sur les interactions tanins – protéines (IECB)
- Procédé de réduction du pouvoir combinant des vins blancs liquoreux (Université de Bordeaux 1, ISM - Université de Bordeaux 2 Faculté œnologie ISVV)
- Traitements par champs électriques pulsés en OEnologie (Université de Bordeaux 2 Faculté œnologie ISVV – Université technologique de Compiègne)

DIFFUSION D'INFORMATIONS TECHNIQUES

Afin que tous les résultats diffusent au plus vite vers les opérateurs de la filière, différentes actions sont réalisées :

- Journée technique du CIVB, 11ème édition,
- Edition des cahiers techniques du CIVB : plus de 13.000 exemplaires sont envoyés aux opérateurs de la filière (viticulteurs, négociants et courtiers). Le dernier numéro était consacré aux maladies du bois,
- Nouvelle série de cahiers consacrée à l'environnement et au système de management d'environnement avec, en 2012, un nouveau numéro consacré à la biodiversité en Gironde viticole,
- Edition en 2011 d'une plaquette sur le transport des vins (versions française et anglaise disponibles),
- Nouvelle version du site www.bordeauxprof.com, lancée en 2013, permettant d'accéder à toute la documentation technique du CIVB, aux prévisions météorologiques et, en saison, à des informations comme par exemple sur le suivi de la maturité technologique.

Biodiversité

L'activité viticole est une source de biodiversité, souvent mal connue. En concertation avec différents interlocuteurs (associations, collectivités, chercheurs,…), le CIVB a engagé en 2012 une réflexion pour la mise au point et le suivi d'indicateurs de biodiversité adaptés aux spécificités du vignoble de Bordeaux. Dans un premier temps, une étude sur les différentes méthodes d'analyse de la biodiversité a été réalisée par Lucile Chedorge. Elle contribuera à la mise en place en 2013 d'une stratégie pour la connaissance et le maintien de la biodiversité dans le vignoble bordelais.

SYSTEME D'INFORMATION GEOGRAPHIQUE (SIG) DU VIN DE BORDEAUX

Le SIG du Vin de Bordeaux est une application cartographique de suivi du vignoble accessible sur le portail Bordeauxprof.com. Pour l'ensemble des professionnels de la filière, le SIG du Vin de Bordeaux permet de consulter, organiser et diffuser différentes données viticoles spatialisées en vue de produire des cartes et plans d'analyse pour des usages individuels ou collectifs comme la gestion du patrimoine ou la protection des terroirs.

Depuis novembre 2012, une version "nomade" pour smartphones et tablettes Apple et Android est disponible. Elle permet la consultation des principaux fonds cartographiques du SIG sur le terrain. Pour pallier le problème des "zones blanches" (absence de connexion 3G), l'application conserve en mémoire les fonds d'images pré consultés (via 3G ou Wifi) pour les rendre disponibles en mode déconnecté.

Pour faciliter le diagnostic environnemental des viticulteurs engagés dans le SME, un "atlas en un clic" a été développé. Il permet d'éditer très rapidement des cartes des parcelles avec les zones environnementales (Natura 2000, ZNIEFF), points / cours d'eau et voisinage à proximité. Cet atlas permet d'avoir connaissance de zones sensibles à proximité des parcelles pour mieux prendre en compte ces éléments dans l'activité viticole. Il est naturellement accessible à tout viticulteur, à l'aide de ses identifiants et mots de passe CIVB sécurisés.

SUIVI AVAL DE LA QUALITE

Parce que le consommateur est au centre de nos préoccupations et que la mauvaise qualité d'un vin porte préjudice à tous les viticulteurs, le CIVB a développé depuis 1983 ce qui est devenu le Suivi aval de la qualité (SAQ). Des centaines d'échantillons sont prélevés chaque mois en France et à l'étranger et dégustés.

Le SAQ fait l'objet d'un accord interprofessionnel adopté le 14 décembre 1998. En 2012, 6 collectes en France et 3 à l'étranger (Chine, Allemagne, Royaume-Uni) ont été réalisés, soit plus de 2000 échantillons dégustés.

Le dispositif mis en place au CIVB a évolué pour intégrer la montée en puissance du dispositif de contrôle issu de la réforme de l'agrément. Ses dispositifs sont complémentaires.

Le SAQ fait tous les mois le constat de la qualité des vins présents sur les marchés en France et à l'étranger. Au-delà du contrôle qualitatif direct, le SAQ est un formidable outil de progrès pour la filière. L'analyse des résultats obtenus permet des observations et études utiles : sur les bouchons et sur les bouchonniers ; sur la variabilité des résultats selon les AOC ; sur l'analyse des défauts (problèmes d'évolution sur les blancs secs et de structure sur les vins rouges). Il permet aussi d'analyser les types de mise (en ou hors Gironde) ou le type de distribution (cavistes ou hard discount).

L'action « Suivi aval de la qualité » est certifiée depuis 2003 (ISO 9001 :2008). Le dernier audit de certification date de septembre 2012.

SYSTEME DE MANAGEMENT ENVIRONNEMENTAL DU VIN DE BORDEAUX

Dans la continuité de sa démarche environnementale (Bilan carbone ®, plan climat), le CIVB a initié en 2010 une nouvelle action d'ampleur : la mise en place du Système de management environnemental du Vin de Bordeaux.

Un premier groupe représentant plus de 2000 ha, 28 entreprises, 3 centres embouteillage, 1 cave coopérative a ouvert la voie en 2010. Il a pleinement rempli sa mission et cheminé en un an vers la certification environnementale ISO 14001 dont le certificat a été remis à l'occasion de Vinexpo 2011.

Collecte EVPOH

Le CIVB a lancé des campagnes de collecte des EVPOH (Emballages Vides de Produits OEnologiques et d'Hygiène) en 2010. Une collecte a été organisée en 2011 et deux en 2012 (mai et novembre) sur 19 sites de collecte répartis sur le département. Cette action a permis en 2012 de récolter plus de 17 Tonnes d'emballages vides en vue de leur valorisation.

2012 a vu la mise en place du déploiement du dispositif avec le relai de certains ODG. Ce sont à présent 175 entreprises sur 200 sites de production et représentant plus de 9000 ha qui sont engagés dans cette démarche. 2012 marque également l'obtention du SME du Vin de Bordeaux avec la certification environnementale « niveau 2 » (issue du Grenelle 2).

Le CIVB organise le 5ème forum de la démarche environnemental des vins de Bordeaux le 29 mars 2013 au Palais des Congrès de Bordeaux.
Programme : bilan de la démarche SME (déploiement), restitution de l'enquête « parties prenantes », Innovations techniques et environnementales des entreprises engagées dans le SME, démarche « Biodiversité », Bilan carbone (lancement de la mise à jour),…

Venez nombreux !!

Mardi 5 février 2013
Palais des Congrès
de Bordeaux

11e JOURNÉE TECHNIQUE DU CIVB

Innovations techniques et analytiques

LES ACTES DU COLLOQUE

BORDEAUX

Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux

DÉVELOPPEMENT DE SONDES FLUORESCENTES POUR L'ANALYSE SIMULTANÉE DES ACIDES DU VIN

Guillaume Lautrette, Yann Ferrand, Ivan Huc

Univ. Bordeaux 1 – CNRS, UMR 5248 (CBMN), Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Robert Escarpit, 33600 Pessac

A. CONTEXTE ET POSITIONNEMENT DU PROJET

La connaissance de la composition et de la teneur des vins en acides organiques constitue un paramètre essentiel en ce qui concerne le contrôle de la maturation et la qualité finale des vins. De nombreuses méthodes analytiques (e.g. HPLC, chromatographie échangeuse d'ions, kits enzymatiques, électrophorèse par capillaire…) ont été développées.[1] Cependant, ces techniques d'analyse lourdes et pour certaines coûteuses sont pratiquées en laboratoire et ne permettent pas de contrôle rapide et complet de la composition en acide d'un vin. A titre d'exemple, le contrôle en fin de la fermentation malo-lactique est représentatif de l'importance de la connaissance des teneurs en acides des vendanges.[2] Cette fermentation est pratiquée sur de nombreux vins rouges et blancs afin de leur conférer gras, rondeur et souplesse en bouche, via une baisse de l'acidité totale. La détection instantanée et précise de la composition des vins en leurs différents acides volatiles ou non (tartrique, malique, citrique, succinique, lactique et acétique) pourrait également s'avérer utile pour la répression des contrefaçons vinicoles.[3] Dans ce projet, nous proposons d'évaluer le développement d'un lecteur de fluorescence portatif pour la quantification immédiate et simultanée des acides dans le vin. Le principe d'un tel appareil basé sur l'encapsulation sélective des différents acides dans des récepteurs synthétiques fluorescents est représenté dans la Figure 1.

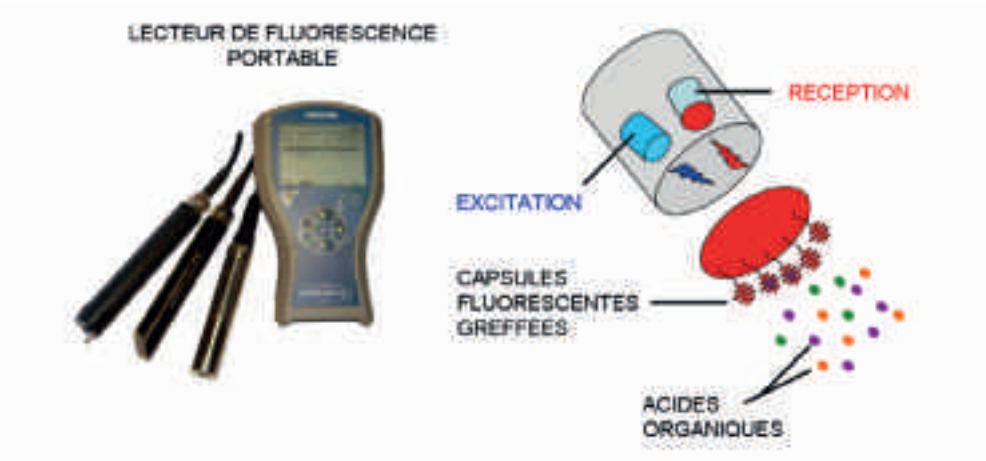


Figure 1. Gauche : photographie d'un lecteur de fluorescence couplé à une fibre optique ; droite : schéma du dispositif de dosage d'un acide par une capsule moléculaire sélective greffée à l'extrémité de la fibre optique. Chaque fibre peut être équipée d'une sonde différente sélective d'un acide donné afin d'effectuer un dosage en parallèle des acides.

B. ETAT DE L'ART

Principe des capsules moléculaires hélicoïdales : Peler une pomme en une seule pelure hélicoïdale produit une sorte de ruban qui peut être ré-enroulé autour de la pomme. Ce principe a été appliqué par notre laboratoire à l'échelle moléculaire en concevant et caractérisant une capsule formée par un brin moléculaire (une séquence oligomérique) replié en une hélice possédant un large diamètre en son centre et un diamètre réduit à ses extrémités. La cavité définie au sein de cette hélice peut accueillir une molécule invitée (analyte) qui se retrouve complètement isolée du milieu environnant (Figure 2). Les contacts de toutes parts entre la paroi intérieure de la capsule et la molécule invitée confèrent des niveaux d'affinité et de sélectivité exceptionnels. Le concept de ces capsules hélicoïdales est directement dérivé de celui des récepteurs biologiques, qui sont également issus du repliement de séquences oligomériques complexes (peptide ou nucléotide) en une structure tridimensionnelle bien définie. L'auto-organisation par repliement offre une très grande modularité : chaque monomère dans une séquence peut être échangé pour un autre pour faire varier subtilement la structure, la dynamique et les propriétés de reconnaissance du motif replié. Cette modularité est mise directement à profit dans le projet.

Figure 2. Gauche : Représentation schématique de la capture et du relargage d'une molécule invitée par une capsule consistant en une hélice dont le diamètre est plus large au centre qu'aux extrémités. Analogie entre ce type de capsule et une pelure de pomme moléculaire. Droite : Principe de repliement des foldamères aza-aromatiques. Conjugaison, liaisons hydrogènes (pointillés) et répulsions électrostatiques (flèches) concourent à la stabilisation d'une conformation préférentielle de chaque liaison aryl-amide, ceci résultant dans une conformation courbée d'un oligomère qui donne lieu à une hélice. L'empilement aromatique intramoléculaire dépendant du solvant s'ajoute comme une force additionnelle stabilisant l'hélice.

En plus de la modularité, la prévisibilité de la structure tridimensionnelle de la capsule hélicoïdale est indispensable à la conception et au développement d'un récepteur efficace. Dans ce projet, nous utilisons des foldamères d'oligoamides aromatiques (AOFs) dont les conformations sont aisément prévisibles. La structure des AOFs est contrôlée par des conformations préférentielles locales sur chaque liaison aryl-amide, du fait des effets conjoints de la conjugaison, de répulsions électrostatiques et de liaisons hydrogènes (Figure 2, droite).

Ces principes de repliement ont permis le développement de plusieurs designs de capsules issues d'acides aminés aromatiques qui se replient en hélices ou brins linéaires extrêmement stables. La démonstration du concept d'encapsulation a récemment été faite à travers la complexation de molécules polaires et/ou chirales telles que les polyacides carboxyliques (*e.g.* acide tartrique et citrique) dans la cavité d'une hélice. En effet, la dernière génération de capsule développée au sein du groupe, constituée de quatre types de monomères différents, (Q3PN2pyr-pyz-pyrN_2PQ_3, Figure 3 droite) a permis de franchir un palier dans la complexité et la sélectivité.

Tandis que les premières générations de capsules ne pouvaient accueillir que des molécules linéaires de taille modeste (*e.g.* butanediol), la cavité de cette nouvelle capsule s'est montrée complémentaire d'une cible plus volumineuse et complexe, l'acide tartrique. Les constantes d'associations se sont révélées beaucoup plus élevées que celles des récepteurs de l'acide tartrique décrits précédemment (trop haute pour être mesurée en milieu apolaire). La reconnaissance est exceptionnellement sélective : l'acide tartrique est préféré à l'acide malique par un facteur de l'ordre de 100 en dépit de la faible différence structurale (un groupe hydroxy) entre ces deux acides. La préférence vis-à-vis des acides lactiques et citrique est supérieure à 5000. De plus, la complexation est diastéréosélective : l'acide tartrique naturel (série L) n'est reconnu que par l'hélice de chiralité gauche, et pas par la droite. L'analyse détaillée de la structure du complexe entre capsule et acide tartrique par cristallographie des rayons X à l'état solide et par résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution a permis d'identifier les interactions privilégiées, notamment des liaisons hydrogène, conduisant à cette sélectivité. Ces récents travaux ont récemment fait l'objet d'une publication dans une revue de tout premier plan international à haut facteur d'impact (Journal of the American Chemical Society 2010).

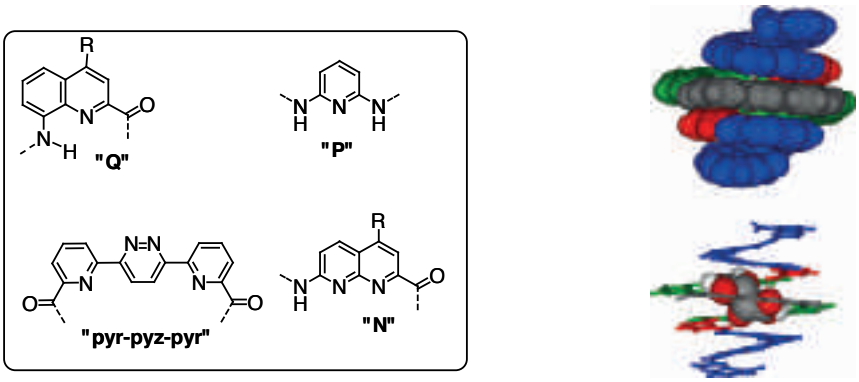


Figure 3. Gauche : Structures des monomères Q, P, pyr-pyz-pyr et N utilisés dans les AOFs. Les groupements R divergent de la structure hélicoïdale ceux qui permet un contrôle de la solubilité pour des solvants protiques (y compris les alcools et l'eau) ou non protiques. Droite : Représentations de la structure RX de Q_3PN_2pyr-pyz-pyrN_2PQ_3. Les monomères Q et P sont montrés en en bleu et rouge, respectivement. Il est possible de voir clairement la variation du diamètre de l'hélice. Une molécule d'acide L-tartrique encapsulée est visible en représentation tube mais reste occultée en représentation CPK. Les chaînes solubilisantes ne sont pas représentées pour des raisons de clarté.

Etant acquis 1°) la maîtrise de la préparation de ces oligomères amides aromatiques ; 2°) les très hautes affinités et sélectivités des capsules hélicoïdales pour certains acides du vin (tartrique et citrique) ; 3°) les règles qui permettent de concevoir de modifier la sélectivité en faveur d'autres acides (malique et lactique notamment), nous avons envisagé d'utiliser ces objets moléculaires en tant que sondes des acides du vin pour leur analyse rapide et simple.

C. ORIGINALITÉ

L'objectif premier est d'élaborer une nouvelle approche rapide pour l'analyse des différents acides du vin. Notre démarche est centrée sur l'utilisation de capsules synthétiques greffées sur des fibres optiques capables de transmettre un signal fluorescent en réponse à la reconnaissance spécifique d'un ou plusieurs acides organiques. Ce concept de sondes fluorescentes et de microdosage des acides « sur site » n'a pas d'équivalent actuellement.

Le premier avantage de cette technique novatrice est la rapidité d'analyse : la mesure est « instantanée » et pourra a priori être effectuée directement dans le chais. Le second point fort réside dans la répétitivité des mesures (stabilité des capsules, plus longue durée de vie des lecteurs). Les lecteurs cibleront la majeure partie des acides, volatils ou non, présents dans le vin. Seront concernés potentiellement : acide tartrique, acide malique, acide lactique, acide citrique, acide ascorbique, acide succinique, acide sorbique (conservateur), acide butyrique, acide acétique. Un autre point critique de l'appareillage sera sa sensibilité. Du fait de la technique de mesure, la fluorimétrie, et du fait des sélectivités et des affinités des capsules moléculaires, les concentrations critiques détectables et la précision des mesures pourront être de l'ordre de 1µM.

Enfin, le dernier aspect non négligeable de ce projet réside dans les évolutions possibles qui pourront en découler. Si le principe est validé pour les acides du vin, la détection par encapsulation pourra être étendue au dosage d'autres analytes plus complexes du vin (tanins, polyphénols, sucres…).

FINALITES APPLIQUEES DU PROJET

La liste des objectifs prioritaires que nous proposons d'atteindre à travers ce projet est la suivante :

- Développer des récepteurs moléculaires sélectifs de chacun des acides du vin
- Coupler la reconnaissance moléculaire de chacun de ces acides à un changement de fluorescence du récepteur.
- Calibrer le dosage des acides directement dans le vin par ces récepteurs fluorescents, greffés sur des fibres optiques
- Evaluer la faisabilité technique et le coût de développement d'un appareil portatif utilisable par le vigneron pour une analyse simple rapide, fiable, des acides simultanément.

D. RÉSULTATS

Le premier travail effectué est le développement d'un récepteur sélectif de l'acide malique, très important en vue de l'optimisation de la seconde fermentation du vin. Le point de départ de ce développement est la séquence Q_3PN_2Pyr-Pyz-PyrN_2PQ_3 citée précédemment où Q, P, N, Pyr-Pyz-Pyr codent respectivement pour les monomères Quinoline, Pyridine, Naphtyridine, et le motif central Pyridine-Pyridazine-Pyridine. La constante d'association de celle-ci pour l'acide malique est de 70 M^{-1} dans un mélange 90 : 10 (v/v) de $CDCl_3$/DMSO-d_6. Cette séquence étant sélective de l'acide tartrique (constante d'association de 5300 M^{-1} dans un mélange 90 : 10 (v/v) de $CDCl_3$/DMSO-d_6), il consiste en l'amélioration de la reconnaissance de l'acide malique ainsi que de la dégradation de celle de l'acide tartrique. La synthèse au laboratoire de nouveaux monomères ouvre la voie à de nombreuses séquences et à un nouveau projet innovant s'intitulant : « molecular fine tuning ». En effet, la fine modification de séquences oligomériques à l'aide de différents monomères induit un changement important sur l'encapsulation d'invités tant au niveau des constantes d'association que de la sélectivité. Après six évolutions itératives de la séquence

de départ nous avons obtenu une capsule reconnaissant l'acide malique avec une constante d'association pour celui-ci de 20000 M^{-1} dans le mélange de solvants évoqué précédemment (Figure 4). De plus, celle-ci est sélective due à une plus faible constante d'association pour l'acide tartrique : 2100 M^{-1}, et il est encore possible de modifier finement cette dernière séquence afin d'augmenter cette sélectivité.

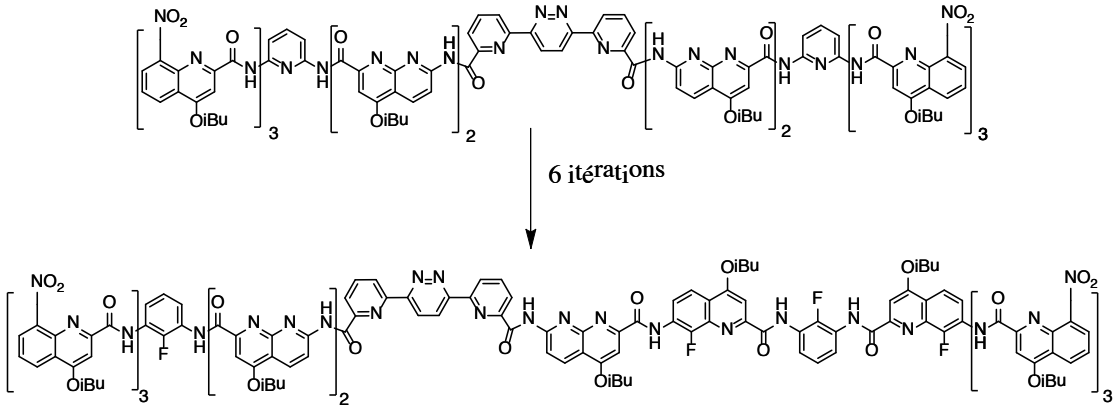


Figure 4. Haut : Structure de la séquence $Q_3PN_2Pyr\text{-}Pyz\text{-}PyrN_2PQ_3$. Bas : Structure de la nouvelle séquence sélective de l'acide malique $Q_3FN_2Pyr\text{-}Pyz\text{-}PyrNQ^FFQ^FQ_3$.

En parallèle de ce développement de récepteurs sélectifs, nous avons travaillé sur la détection de l'encapsulation à l'aide d'un changement de fluorescence. Pour cela nous avons utilisé la séquence de départ $Q_3PN_2Pyr\text{-}Pyz\text{-}PyrN_2PQ_3$ comme récepteur et l'acide tartrique comme analyte. Des expériences d'émission de fluorescence de la capsule en l'absence et en présence d'acide tartrique ont montré des résultats intéressants. Effectivement, une diminution de l'intensité de fluorescence est observée lorsque nous ajoutons l'acide tartrique (Fig. 5). A ce jour, nous ne pouvons pas expliquer très clairement ce phénomène mais ces résultats sont très encourageants pour la suite du projet. Afin d'aboutir à un dispositif très efficace, il est nécessaire de greffer des molécules fluorescentes sur les fibres optiques, c'est pourquoi nous avons besoin d'optimiser les capsules en terme d'intensité de fluorescence émise. Une méthode de greffage de fluorophores a donc été mise au point pour mener à une séquence possédant un fluorophore à chaque extrémité (Figure 5).

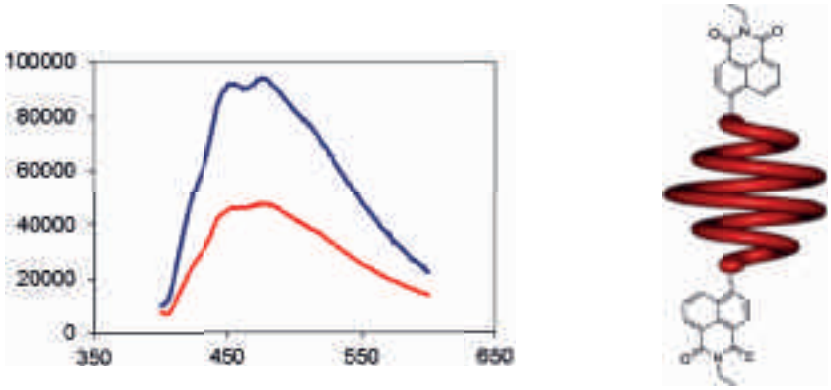


Figure 5. Gauche : Spectre d'émission de fluorescence. (Bleu) Capsule vide (C = 5 M) ; (Rouge) Capsule (C = 5 M) + 10 équivalents d'acide tartrique. Droite : Image de la nouvelle séquence possédant un fluorophore à chaque extrémité.

Actuellement nous concentrons nos efforts sur la fonctionnalisation des récepteurs en vue du greffage de ces derniers sur des fibres optiques. Le motif choisi est une molécule possédant une fonction triéthoxysilane pouvant être greffé sur les surfaces composant les fibres optiques (Figure 6).

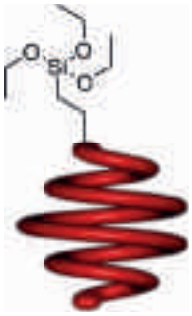


Figure 6. Image d'une capsule fonctionnalisée par un groupement triéthoxysilane à une extrémité.

Nous effectuons tout d'abord des essais de greffage avec une capsule fonctionnalisée seulement à cette fin. Cependant, à court terme nous suivrons une méthode mis au point au laboratoire qui consiste à synthétiser une capsule possédant à une extrémité le fluorophore présenté précédemment et à l'autre extrémité une amine libre. Effectivement, cette dernière servira à fonctionnaliser à notre guise le récepteur suivant le type de surface choisit.

Pour conclure, nous avons obtenu un récepteur (capsule) qui reconnaît sélectivement l'acide malique des autres acides du vin et il est possible d'améliorer rapidement et significativement cette sélectivité grâce à la méthode que nous avons développée. Les premiers résultats de reconnaissance par émission de fluorescence sont très encourageants. De nouvelles expériences quantitatives vont être effectuées avec l'acide malique et le récepteur optimal. A court terme, il s'agira de coupler cette fonction de fluorescence avec la fonction de greffage sur surface, actuellement en cours d'optimisation.

REFERENCES

(1) a.) M. Gilis, H. Durliat, M. Comtat *Am. J. Enol. Vitic.* **1996** *47 : 1:*11-16 ; b) M. Arellano, J. Andrianary, F. Dedieu, F. Couderc, Ph. Puig, *Journal of Chromatography A*, 765, **1997**, 321 ; c) I. Mato, S. Suarez-Luque, J. F. Huidobro, *Food Chemistry* **2007**, *102,* 104 ; d) R.G. Peres, E.P. Moraes, G.A. Micke, F.G. Tonin, M.F.M. Tavares, D.B. Rodriguez-Amaya, *Food Control* 20 **2009**, 548 ; e) S. Rovioa, A. Kalliola, H. Siréna, T. Tamminen, *Journal of Chromatography A*, 1217, **2010**, 1407.

(2) http://www.vignevin-sudouest.com/publications/fiches-pratiques/maitrise-fermentation-malolactique.php.

(3) http://www.viti-net.com/article-11-26399.html.

(4) a) I. Huc, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 17 ; c) B. Gong, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 10, 1376 ; c) Z.-T. Li, J.-L. Hou, C. Li *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 10, 1343 ; c) I. Huc, L. Cuccia, *Foldamers based on Local Preferences Conformations* in Foldamers : Structure, Properties and Applications *(Eds. : S. Hecht, I. Huc)*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, 3.

(5) Y. Ferrand, A. M. Kendhale, B. Kauffmann, A. Grélard, C. Marie, V. Blot, M. Pipelier, D. Dubreuil, I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 7858.

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE SIMPLE, PEU COÛTEUSE ET HAUT DÉBIT, POUR LE DOSAGE DES AMINES BIOGÈNES DANS LES VINS

Andrea Romano[1,2], Patrick Lucas[1]

[1] USC Oenologie- INRA, Université Bordeaux Segalen, ISVV, Villenave d'Ornon, France

[2] post-doctorant financé par le CIVB.

Travail réalisé en collaboration avec le groupe SARCO (Laffort œnologie) et Giuseppe Spano (Université de Foggia, Italie)

1. CONTEXTE

Amines biogènes et santé. Les amines biogènes, et notamment l'histamine, sont des molécules indésirables dans les vins, car elles sont suspectées d'avoir des effets nuisibles sur la santé des consommateurs (Spano *et al.*, 2010 ; Ladero *et al.*, 2011). L'ingestion de vin contenant de fortes teneurs en histamine peut provoquer des réactions de type « fausse allergie alimentaire », dont les symptômes sont des rougeurs, maux de tête, démangeaisons, palpitations cardiaques, etc. Les autres amines biogènes telles que la tyramine, la putrescine et la cadavérine, ne semblent pas avoir d'impact majeur sur la santé des consommateurs, mais elles peuvent stimuler l'effet néfaste de l'histamine en inhibant les enzymes de détoxification (amines oxydases) du système sanguin. Par ailleurs, la putrescine et la cadavérine pourraient modifier la qualité aromatique des vins par un effet masquant.

Limites tolérées dans les vins. Chacune de ces amines peut être présente dans les vins à des teneurs de l'ordre de 0 à 25 mg/L ou plus. A l'heure actuelle, il n'existe aucune limite légale concernant l'histamine ou d'autres amines biogènes dans les vins. Seule la Suisse a imposé une teneur limite de 10 mg/L d'histamine jusqu'en 2012. Néanmoins, certains acheteurs, tels que des centrales d'achats de la grande distribution, imposent toujours leurs propres limites, qui sont de l'ordre de 2,5 à 10 mg/L d'histamine.

Méthodes de dosage. La méthode utilisée à l'heure actuelle pour le dosage des amines biogènes dans les vins est basée sur l'HPLC (chromatographie liquide à haute performance), ce qui la rend coûteuse et limite son utilisation à quelques laboratoires d'analyses, en raison de l'appareillage lourd et du personnel formé qu'elle nécessite. Par ailleurs, un appareil d'HPLC ne peut analyser qu'une ou deux dizaines d'échantillons par jour, ce qui exclue la possibilité de réaliser cette analyse en routine sur les vins. Dans le cadre de recherches menées sur les bactéries du vin productrices d'amines biogènes, l'Unité de recherche OEnologie de l'ISVV a mis au point une méthode de chromatographie sur couche mince (CCM), qui permet de détecter et de quantifier plusieurs amines biogènes, dont l'histamine, dans des milieux de culture bactériens. La CCM est une méthode très avantageuse pour la réalisation de dosages de routine, car elle ne nécessite aucun équipement particulier, elle est simple d'utilisation, peu coûteuse et permet de

traiter un grand nombre d'échantillons rapidement. La figure 1A montre des résultats obtenus par cette méthode en analysant des milieux de culture bactérien contenant 1, 5 ou 10 mg/L d'histamine, tyramine, putrescine et cadavérine. Chacune des 4 amines est clairement détectée par CCM à ces concentrations et, en utilisant un logiciel d'analyse d'image, il est possible de déterminer précisément leurs concentrations. Testée sur des vins, la méthode de CCM de dosage des amines biogènes a permis de détecter jusqu'à 5-10 mg/L d'histamine (Figure 1B). Ce résultat était encourageants, mais atténués de trop mauvaise qualité et trop peu reproductibles pour proposer son utilisation en routine dans les vins.

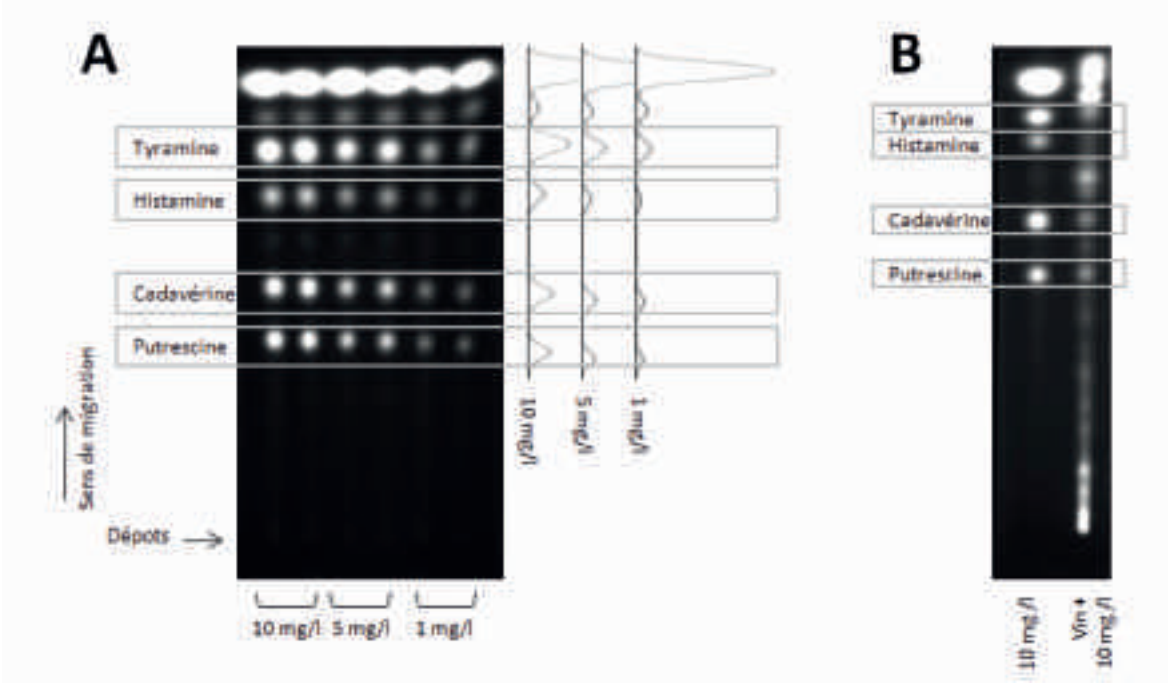


Figure 1. (A) Photographie d'une plaque de CCM obtenue en analysant des milieux de culture bactériens supplémentés avec 1, 5 ou 10 mg/L d'histamine, tyramine, putrescine et cadavérine. Les courbes montrent l'intégration des spots obtenus pour chaque amine par un logiciel d'analyse d'image. **(B)** Photographie d'une plaque CCM obtenue en utilisant la même méthode pour un mélange de 4 amines biogènes dissoutes dans de l'eau (10 mg/L) ou dans un vin (vin+ 10mg/l).

Objectif du projet. Avec le soutien du CIVB et en collaboration avec le Groupe SARCO, l'Unité de recherche OEnologie s'est engagée dans l'optimisation de la méthode de dosage des amines biogènes par CCM afin qu'elle puisse être appliquée aux vins. Il a fallu mettre au point des conditions de traitement du vin qui permettent d'éliminer les constituants responsables d'interférences, puis optimiser les conditions de chromatographie, afin de pouvoir doser l'histamine et les principales amines biogènes du vin dans les teneurs rencontrées dans le vin, c'est-à-dire de 1 mg/L à plus de 20 mg/L.

2. TRAVAUX ET RÉSULTATS

2.1. MISE AU POINT DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE

Dansylation. La CCM nécessite une étape de dansylation qui permet de visualiser les spots correspondants aux amines biogènes sous une lumière ultraviolette. Cette étape est généralement réalisée à l'aide d'un tampon phosphate, mais nous l'avons modifiée en utilisant une solution saturée de $NaHCO_3$ saturé qui a permis d'abaisser le seuil de détection des amines par CCM de 1000 mg/L à 5-10 mg/L.

Extraction. Une étape d'extraction par utilisation de solvants a été ajoutée, dans le but d'améliorer la sensibilité de la méthode. Éthyl-acétate, diéthyl-éther, méthyl-isobutylketone, dichlorométhane et iso-hexane ont été testés. Finalement, une étape d'extraction avec 200 µL d'iso-hexane a été adoptée. Dans ces conditions, les spots correspondant aux amines biogènes apparaissent sur la plaque de chromatographie avec une intensité et une définition nettement améliorées (figure 2, piste 2).

Traitement des vins. Le charbon actif et le poly-vinylpolypyrrolidone (PVPP) ont été testés dans le but de réduire les interférences dues à certains constituants du vin. Le charbon actif est efficace pour le nettoyage de l'échantillon, mais il élimine une partie des amines biogènes, car les spots de l'histamine et de la tyramine ont presque disparu après traitement (figure 2, piste 3). Le PVPP a permis d'éliminer la plupart des interférences, alors que les signaux relatifs aux amines biogènes ont conservé une bonne intensité (figure 2, piste 4). Différentes quantités de charbon actif ou PVPP ont été testées. Un vin rouge enrichi avec environ 5 mg/L de chacune des quatre amines a été analysé. L'ajout de 10 mg de PVPP a donné les meilleurs résultats en termes d'intensité relative pour les quatre amines. Dans la figure 2, la comparaison entre les pistes 4 et 6 montre que le vin rouge et la solution modèle supplémentée avec les mêmes quantités d'amines donnent des réponses visuellement indiscernables. L'analyse de vin rouge non enrichi avec la même procédure (figure 2, piste 5) démontre l'absence d'interférences analytiques. Ainsi, le traitement avec 10 mg de PVPP a été intégré dans le protocole de traitement de l'échantillon.

Etalon interne. La dernière optimisation a consisté à inclure un étalon interne. Le 1,3-diaminopropane a été choisi. À notre connaissance, ce composé n'est pas rencontré dans le vin. En outre, lorsque le vin rouge enrichi en diaminopropane a été analysé, un spot, bien séparé des autres, pouvait facilement être détecté sur la plaque de CCM (figure 2, pistes 4 et 6).

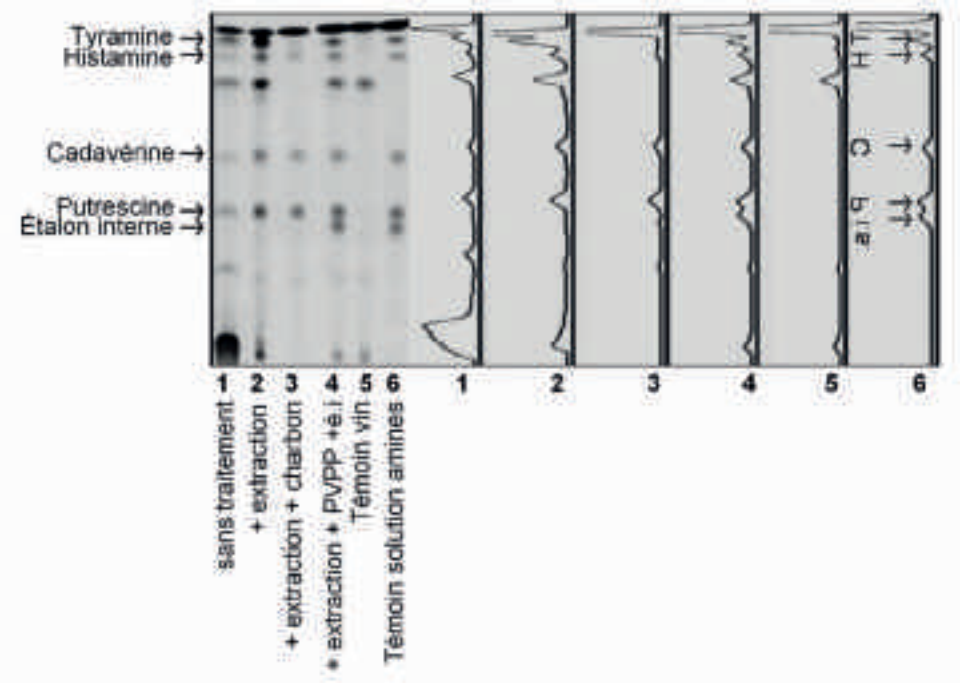


Figure 2. Plaque CCM représentant les résultats des différents traitements d'un vin rouge enrichi avec les quatre amines biogènes et les chromatogrammes obtenus après analyse densitométrique des spots. 1 = pas de traitement ; 2 = extraction avec iso-hexane ; 3 = traitement avec charbon actif et extraction à l'iso-hexane ; 4 = traitement avec PVPP et extraction à l'iso-hexane ; 5 = échantillon non dopé, même traitement que (4) ; 6 = solution modèle traitée comme dans (4). Les échantillons (4) et (6) ont été supplémentés avec étalon interne.

Protocole complet. Le protocole obtenu suite à ces optimisations est le suivant :

- Le volume de vin utilisé pour une analyse est de 200 µl.

Étape de traitement du vin
- Une solution de traitement contenant l'étalon interne (1,3-diaminopropane 10 mg/L) et 10 % PVPP est préparée.
- 100 µl de solution de traitement sont mélangés aux 200 µl de vin à analyser en utilisant un vortex pendant quelques secondes.
- L'échantillon est centrifugé 5 minutes à 10,000 g.
- 200 µl de surnageant sont transférés dans un nouveau tube Eppendorf

Étape de dérivatisation au dansyl-chloride
- 200 µl de solution saturée de NaHCO3 sont ajoutés
- 400µl d'une solution de dansyl-chloride (5 mg/ml dissouts dans de l'acétone) sont ajoutés.
- L'échantillon est mélangé au vortex quelques secondes
- Puis il est incubé à 55°C pendant 1 heure et à l'abri de la lumière.
- L'échantillon est ensuite froidi à température ambiante pendant quelques minutes

Étape d'extraction des amines
- 100 µl d'une solution saturée de NaCl sont ajoutés
- 200 µl d'une solution d'isohexane sont ajoutés
- L'échantillon est vortexé pendant 5 minutes, puis laissé au repos quelques secondes

Étape de chromatographie
- 20 µl de phase organique sont déposés sur une plaque de CCM de type Silicagel 60TLC glass plate without fluorescent indicator (Merck, Darmstadt, Germany). Le dépôt est réalisé à 15 mm du bas de la plaque et à une distance d'au moins 14 mm de l'échantillon suivant. (Typiquement, 13 échantillons peuvent être analysés sur une plaque de 20 cm x 20 cm)
- La plaque de CCM est déposée dans une chambre de chromatographie préalablement saturée pendant au moins une heure avec l'éluant (chloroforme/triéthanolamine 4/1). Le volume d'éluant présent dans la chambre doit couvrir 5 à 10 mm du bas de la plaque de CCM.
- La migration est réalisée jusqu'à ce que le front de migration de l'éluant arrive à 2 cm du haut de la plaque de CCM.

Étape de lecture
- La plaque de CCM est retirée de la chambre et séchée sous une hotte aspirante
- L'observation est réalisée en exposant la plaque sous une lumière UV de 312 nm.
- Pour une observation semi-quantitative, l'échantillon analysé est comparé visuellement avec des étalons de concentrations connues de chaque amine biogène (typiquement 2, 5 et 10 mg/L).
- Pour une observation quantitative, la plaque est photographiée et l'image obtenue est analysée par un logiciel d'analyse comme BIO-1D software (Vilber-Lourmat). La quantification est réalisée par comparaison avec des gammes étalon de chaque amine biogène préparées au préalable.

2.2 VALIDATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE

Linéarité, limites de détection et de quantification, répétitivité et précision. Un vin rouge qui ne contenait pas d'amines a été enrichi avec cinq concentrations différentes d'amines biogènes et chaque échantillon a été analysé en triplicatas. Les paramètres de la courbe de calibration ont été calculés par régression linéaire. Ils sont indiqués dans le tableau 1. L'évaluation visuelle des résidus standardisés n'a montré aucun écart uniforme de la linéarité et la distribution normale des données expérimentales a été confirmée par un test de Shapiro-Wilk. Les limites de détection et de quantification ont été fixées en fonction d'un rapport signal sur bruit de fond de 3:1 et 5:1 respectivement.

Amine Biogène	Pente (ET)[a]	Intercepte (ET)[a]	Coefficient de corrélation	Intervalle de linéarité (mg/L)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Putrescine	0,262(0,006)	0,038(0,064)	0,991	2,0 - 19	0,7	1,2
Cadavérine	0,217(0,006)	0,203(0,052)	0,992	1,5 - 15	0,6	1,0
Histamine	0,185(0,006)	0,302(0,058)	0,987	1,1 - 18	0,7	1,1
Tyramine	0,171(0,007)	0,557(0,065)	0,985	1,2 - 24	0,7	1,2

L,D,: limite de détection; L,Q,: limite de quantification,

[a] les écarts types (ET) sont signalés entre parenthèses,

Tableau 1. Paramètres de la courbe d'étalonnage calculés dans le vin rouge. Les limites de détection et de quantification ont été fixées à une valeur de signal sur bruit de 5:1 et 3:1 respectivement.

Dans une autre série d'essais le vin rouge a été supplémenté avec des quantités connues des quatre amines, Trois niveaux de concentration ont été choisis, L'analyse a été répétée dix fois (en double sur cinq jours différents) pour chaque niveau de concentration. La répétitivité a été évaluée (exprimé en écart-type relatif, voir tableau 2) et les pourcentages de récupération ont été obtenus sur la base du rapport entre les concentrations calculées et réelles. Les paramètres ainsi obtenus respectent les limites proposées par l'Union Européenne pour la répétitivité et la précision des méthodes analytiques quantitatives (EU, 2002).

Tableau 2. Valeurs de répétitivité et de récupération obtenues pour un vin rouge enrichi avec trois quantités différentes des quatre amines.

E.T.R. : écart-type relatif.
[a] n = 10.

Amine biogène	Q.te ajoutée (mg/L)	Quantité détectée		Récupération (%)
		Moyenne[a] (mg/L)	ETR (%)	
Putrescine	19,5	17,9	3	92
	10,3	9,2	5	89
	2,0	2,2	12	110
Cadavérine	7,6	6,9	4	91
	3,8	3,9	7	102
	1,5	1,4	19	95
Histamine	16,4	16,3	3	99
	9,7	9,9	5	102
	2,0	2,1	18	105
Tyramine	16,9	16,4	3	97
	7,3	7,4	5	109
	1,2	1,3	22	108

Comparaison des lectures de plaque CCM par utilisation d'un logiciel d'analyse d'image (méthode quantitative) et observation visuelle (méthode semi-quantitative). La méthode de CCM a été appliquée à l'analyse de sept échantillons (six vins rouges et un vin blanc). Une comparaison entre l'évaluation densitométrique (quantitative) et visuelle (semi-quantitative) des teneurs en histamine est présentée dans la figure 3. Les résultats montrent une très bonne corrélation pour l'histamine entre les méthodes d'évaluation.

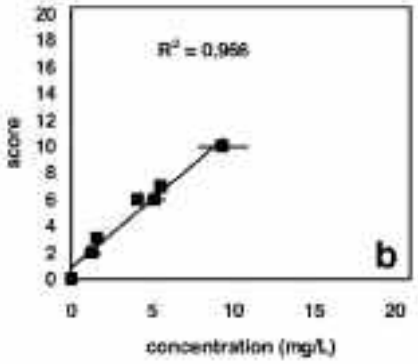


Figure 3. Comparaison entre l'analyse densitométrique (logiciel BIO-1D) et l'analyse visuelle des spots d'histamine mesurés par CCM obtenu pour 7 vins rouges. Les résultats sont des moyennes d'essais réalisés en duplicatas. Les barres d'erreur représentent les écarts types.

Comparaison de la méthode de CCM, de la méthode de HPLC et d'une méthode immunologique (ELISA). En ce qui concerne l'histamine, les résultats obtenus par CCM/densitométrie ont également été comparés avec ceux fournis par deux méthodes validées et actuellement appliquées au vin (ELISA et HPLC). Toutes les déterminations ont été effectuées en double et les valeurs ont été comparées au moyen d'un test *t* de Student (⇨ = 0,05). Aucune différence significative n'a pu être détectée entre la CCM/densitométrie et l'une des deux autres méthodes (tableau 3).

Tableau 3. Détermination de l'histamine dans des vins différents au moyen de trois techniques analytiques (CCM, ELISA et HPLC). Les résultats des moyennes de mesures effectuées en duplicata sont indiqués, de même que les écarts-types (entre parenthèses).
n.d. : non détectable ; d.n.q. : détectable non quantifiable.

Wine	Histamine (mg/L)		
	TLC	ELISA	HPLC
5171	9,4 (1,5)	11,6 (0,2)	10,5 (1,0)
7087	5,2 (0,5)	6,2 (0,3)	5,4 (0,5)
7195	5,6 (0,1)	5,2 (0,7)	6,3 (0,6)
7312	4,1 (0,1)	3,9 (0,9)	5,5 (0,5)
7319	1,6 (0,1)	1,5 (0,1)	2,0 (0,2)
7463	1,3 (0,5)	0,9 (0,1)	d.n.q. (<1)
7090	n.d.	0,4 (0,0)	n.d.

2.3. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE SIMPLIFIÉE POUR LE DOSAGE DE L'HISTAMINE

Objectif. La méthode CCM décrite ci-dessus permet une analyse rapide et peu coûteuse des vins. Il est possible d'analyser jusqu'à 78 échantillons en deux heures pour un coût d'environ 0,50 € par échantillon. Cependant certains équipements lourds (tels qu'une hotte aspirante) sont encore nécessaires pour la mise en place de la méthode, notamment à cause de la toxicité de l'éluant utilisé pour la séparation chromatographique. Une méthode « sans solvant » de CCM a été développée spécifiquement pour le dosage de l'histamine.

Travaux. Après de multiples essais, l'utilisation d'une phase stationnaire du type : plaque de CCM RP-18 W (Merck) s'est avérée hautement compatible avec les solvants aqueux. Ceci a permis de mettre au point une étape de double développement. Le nouveau protocole inclus donc une première migration de 3,5 cm avec 100 % d'éthanol, suivie par une deuxième de 6 cm avec un mélange 60 : 40 d'éthanol et dans un tampon borate pH 10,4. Ceci a permis de détecter l'histamine dans le vin rouge à des concentrations inférieures à 1 mg/L (figure 4), avec un temps total de développement de 30 minutes, mais surtout d'éliminer les solvants toxiques.

La version simplifiée « sans solvant » du protocole d'analyse CCM est schématisée dans la figure 5. Dans une série d'essais, six vins rouges ont été analysés par les deux méthodes CCM, l'une quantitative, l'autre semi-quantitative. On a encore observé une très bonne corrélation entre analyse densitométrique et visuelle (figure 6). Il est donc maintenant possible de mettre en place l'analyse semi-quantitative de l'histamine dans un laboratoire équipé avec très peu d'appareillages.

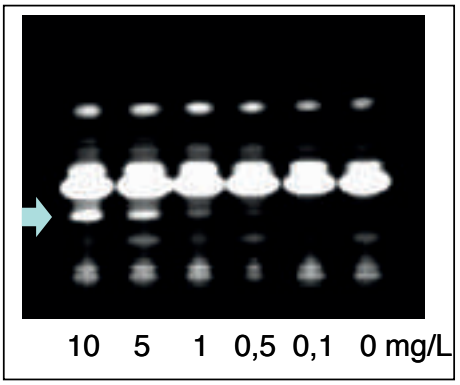


Figure 4. Résultat d'une analyse CCM obtenue avec un vin rouge supplémenté avec des quantités différentes d'histamine. La flèche indique la position du spot de l'histamine.

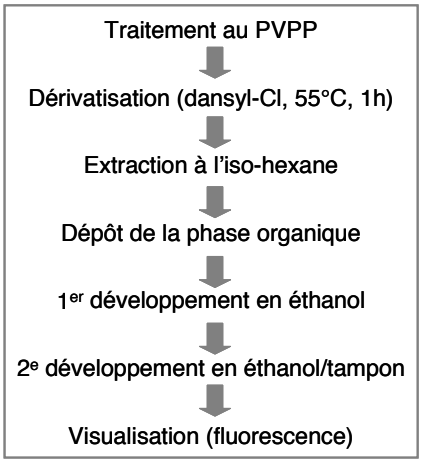


Figure 5. Représentation schématique du protocole de traitement de l'échantillon et analyse CCM. Méthode simplifiée « sans solvant » pour l'histamine.

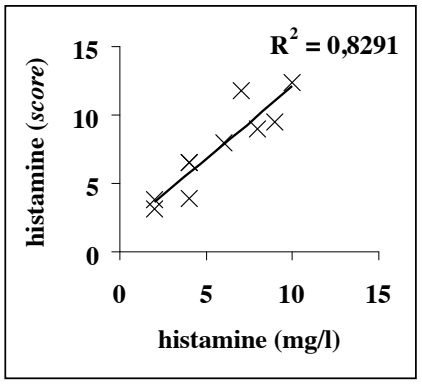


Figure 6. Analyse CCM de l'histamine dans différents vins. Une comparaison entre l'analyse densitométrique et visuelle est présentée

3. CONCLUSIONS

Méthode de CCM avec solvants

Au cours de ce projet, une nouvelle méthode d'analyse, basée sur la CCM / densitométrie, a été développée et validée. À notre connaissance, c'est la première fois que la CCM est appliquée avec succès à l'analyse quantitative des amines biogènes du vin. Elle permet de doser l'histamine, la putrescine, la tyramine et la cadavérine des vins, dans les gammes de concentrations qui y sont classiquement retrouvées. La méthode bénéficie de tous les avantages de la CCM, c'est-à-dire un débit élevé, un faible coût et une simplicité de mise œuvre. En outre, elle propose des niveaux de performance comparables à ceux de l'HPLC. La robustesse de la méthode a été confirmée par l'analyse de plus de 100 vins.

De très bonnes corrélations ont été observées entre les concentrations d'histamine mesurées par analyse densitométrique et les résultats semi-quantitatifs proposés par une simple observation visuelle. Cela indique que la méthode pourrait être employée pour une estimation fiable de la teneur en histamine du vin dans toutes les installations qui ne sont pas équipées pour l'analyse instrumentale.

Méthode de CCM sans solvants

Une version « sans solvant » de cette méthode CCM a été mise au point pour le dosage spécifique de l'histamine. Cette méthode pourra être utilisée sans recourir à un équipement de laboratoire du type « hotte aspirante ». Par ailleurs, la lecture des plaques CCM par observation visuelle permet d'estimer les concentrations en histamine avec une très bonne précision. La méthode pourra donc être utilisée sans besoin d'équipement de prise de vue et d'analyse d'image. Son utilisation pourra se faire avec un minimum d'équipement (pipetmans, cuve de migration, bain chauffant). Le seul produit dangereux dans cette méthode est le chlorure de dansyl utilisé pour la dérivation des amines. Il devra être manipulé avec des gants et des lunettes de protection et évacué avec les produits toxiques.

La première méthode pourrait être utilisée en routine par les laboratoires d'analyse car elle a l'avantage de permettre la quantification des 4 amines majeures des vins. La seconde méthode s'adresse plus particulièrement aux sites non pourvus d'équipements de laboratoire. A ce jour, seule la première méthode a fait l'objet de communications dans des congrès ou d'une publication scientifique (Romano et al. 2012).

4. PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Romano, A., Klebanowski, H., La Guerche, S., Beneduce, L., Spano, G., Murat, M.L, Lucas, P.M. High-throughput and inexpensive method for routine analysis of biogenic amines in wine. Poster présenté au 9e Symposium International d'OEnologie, Bordeaux 15-17 juin 2011.

Romano, A., Klebanowski, H., La Guerche, S., Beneduce, L., Spano, G., Murat, M.L, Lucas, P.M. Determination of biogenic amines in wine by TLC-densitometry. Poster présenté au International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography, Bale 6-8 juillet 2011.

Romano, A., Klebanowski, H., La Guerche, S., Beneduce, L., Spano, G., Murat, M.L, Lucas, P.M. Determination of biogenic amines in wine by TLC-densitometry. Food Chemistry. 135 : 1392-1396.

5. BIBLIOGRAPHIE

EU (2002). Performance criteria, other requirements and procedures for analytical methods. Official Journal of the European Communities, L221, 8-36.

Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., & Alvarez., M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. Current Nutrition and Food Science, 6, 145-156.

Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Férnandez, M., Lopez, M., de Palencia, P.F., Corbi, A., Trip, H., & Lolkema, J.S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. European Journal of Clinical Nutrition, 64, 95-100.

Romano, A., Klebanowski, H., La Guerche, S., Beneduce, L., Spano, G., Murat, M.L, Lucas, P.M. Determination of biogenic amines in wine by TLC-densitometry. Food Chemistry. 135 : 1392-1396.

NOUVELLE DIRECTIVE RÉGLEMENTAIRE EN MATIÈRE D'ÉTIQUETAGE DES VINS, COMMENT S'ADAPTER ?

Charlotte ANNERAUD - IFV pôle Bordeaux - Aquitaine

39 rue Michel Montaigne - 33290 Blanquefort

Depuis près d'une dizaine d'années, la législation en matière d'étiquetage des denrées alimentaires évolue régulièrement. La Directive CE 2000/13 a été la pionnière et les allergènes, les premiers ingrédients impliqués. Après de nombreux reports, le règlement UE n°579/2012 impose désormais, et ce depuis le 01 juillet 2012, l'étiquetage des vins en matière d'allergènes. La caséine ainsi que l'albumine d'œuf, qui peuvent être apportées par des colles utilisées traditionnellement en œnologie, sont donc visées par ce nouveau règlement.

Les vins concernés sont ceux élaborés à partir de la récolte 2012 et ceux non étiquetés après le 30 juin 2012.

Dans ce contexte, afin de s'affranchir de cette contrainte, les fabricants de produits œnologiques développent et mettent en marché des produits "alternatifs", exempts d'allergène. De nouvelles préparations sont proposées, elles sont de composition très variable (nouvelles protéines, mélange de différents composants, extraits de levures…). Le choix est large.

L'Institut Français de la Vigne et du vin pôle Bordeaux-Aquitaine en collaboration avec la Chambre d'Agriculture de la Gironde a mis en œuvre, à la demande du CIVB, des expérimentations visant à évaluer l'efficacité de différents produits de substitution proposés actuellement sur le marché.

La question posée est simple : existe-t-il aujourd'hui des produits pouvant remplacer efficacement la caséine ou l'albumine d'œuf ?

LE COLLAGE DES VINS

Le collage consiste à incorporer dans un vin plus ou moins trouble, ou plus ou moins instable, des "substances capables de floculer et de sédimenter en entraînant des particules en suspension (Caillet, 1994)".

Les objectifs du collage diffèrent selon la qualité de la matière première et en fonction de son origine. Il peut s'agir de clarifier le vin en faisant floculer le trouble existant (Razungles et al., 1992), de le stabiliser en favorisant ou en inhibant la précipitation de certaines substances colloïdales, d'améliorer ses caractéristiques organoleptiques en éliminant, par exemple, des arômes d'oxydation ou en assouplissant certains tanins (amers, astringents ; ICV, 1995), ou encore de renforcer l'efficacité des filtrations et des traitements ultérieurs comme le passage au froid ou l'addition de gomme arabique (Cros et Liberto, 1996).

Le produit de collage est, de ce fait, variable. Il est souvent constitué d'un mélange de protéines mais peut-être également d'origine minérale.

La caséine et l'albumine d'œuf, colles d'origine protéique, sont couramment utilisées pour le collage des vins.

L'utilisation de la caséine est spécifique aux vins blancs et rosés. Le principal objectif d'un tel collage est l'amélioration de la couleur et de la saveur des vins avec notamment, l'élimination des composés phénoliques oxydés ou oxydables. Son action peut donc être aussi bien préventive que curative.

L'albumine d'œuf est la colle protéique la plus ancienne, elle est utilisée pour les vins rouges de garde principalement. Elle permet l'assouplissement des vins riches en tanins, présentant éventuellement un excès d'astringence.

VINIFICATION EN BLANC ET EN ROSÉ : PEUT-ON REMPLACER LA CASÉINE ?

Afin d'évaluer la possibilité de remplacer la caséine par des produits de substitution, des essais ont été réalisés sur trois matières premières différentes : un moût de sauvignon blanc issu de fin de pressée, un moût de sémillon à tendance oxydative et un moût de cabernet franc vinifié en rosé. Les moûts sont répartis de manière homogène dans des contenants de 2 litres pour les blancs et de 5L pour le rosé (photo 1), et les différentes colles ont été incorporées au moment du débourbage et remplissage des lots. Elles ont été au préalable réhydratées en suivant les instructions du fabricant. Les moûts sont ensuite levurés et le suivi des densités et températures se fait quotidiennement. Les vins sont aérés au cours de la fermentation alcoolique afin d'en garantir son bon déroulement. Une fois la fermentation alcoolique terminée, les vins sont soutirés et sulfités.

Photo 1 : Vins des essais mis en œuvre sur sauvignon blanc - source IFV 33

Différentes colles ont ainsi été évaluées. Elles ont été comparées à une modalité Témoin sans traitement et une modalité traitée à la caséine.

La dose de traitement est identique pour chaque colle (30 g/hL) et se situe, quel que soit le produit considéré, dans l'intervalle d'utilisation préconisé par le fabricant.

Les produits alternatifs testés pour les moûts de sauvignon blanc et de sémillon sont les suivants :

- Produit 1 : mélange pvpp, bentonite et colle de poisson
- Produit 2 : mélange bentonite, pvpp, cellulose, protéine de pois
- Produit 3 : mélange pvpp et bentonite
- Produit 4 : mélange de protéine de pois, silicates, pvpp et cellulose
- Produit 5 : mélange de gélatine, pvpp, bentonite et cellulose
- Produit 6 : mélange de pvpp, bentonite et écorces de levures
- produit 7 : mélange de bentonite, pvpp et gélatine

Les produits alternatifs testés pour le moût de cabernet franc sont les suivants :

- Produit 1 : mélange pvpp, bentonite et colle de poisson
- Produit 2 : mélange bentonite, pvpp, cellulose, protéine de pois
- Produit 3 : mélange de gélatine, pvpp, bentonite et cellulose
- Produit 4 : mélange de pvpp, bentonite et écorces de levures
- Produit 5 : mélange de bentonite + pvpp

NB : l'ordre des composants cités par produit est fonction de leur importance dans la formulation en terme de proportion.

Différentes analyses physico-chimiques sont réalisées avant et après traitement afin d'étudier l'impact du traitement avec les différentes colles sur la qualité du produit fini. Au niveau sensoriel, les vins sont dégustés par un jury de professionnels et comparés entre eux, afin de caractériser les différences et de juger de l'impact de chaque traitement.

Pour chacun des essais, les différentes modalités ont fermenté de manière strictement identique (température et cinétique de fermentation). Par ailleurs, les paramètres analytiques classiques sont peu ou pas modifiés par l'ajout des différentes colles. Le niveau de turbidité est variable après soutirage mais inférieur ou égal à la turbidité mesurée sur la modalité Témoin ou sur la modalité "Caséine".

Pour les deux essais menés sur sauvignon blanc et sémillon, l'Indice de Polyphénols Totaux n'est pas modifié par le traitement, que ce soit avec la caséine ou toute autre colle exempt d'allergène.

En ce qui concerne la couleur des vins, sur sauvignon blanc, l'effet protecteur vis-à-vis de l'oxydation du collage est comparable voire supérieur à celle du traitement à la caséine (figure 1) pour cinq des sept produits testés, seuls les produits 5 et 6 permettent une diminution de la couleur jaune un peu moins importante que celle obtenue avec la caséine. Il apparaît, dans les conditions de cet essai, que les produits comportant de la protéine de pois, en proportion plus ou moins importante, dans leur formulation obtiennent de bons résultats tout comme le produit associant bentonite, pvpp et cellulose.

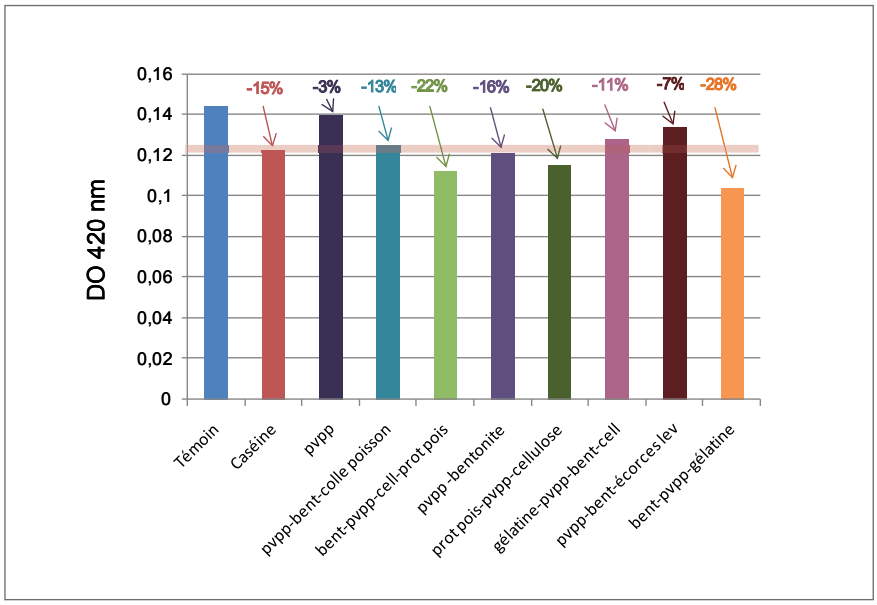


Figure 1 : DO 420 nm en fonction du produit de collage utilis
Moût de sauvignon blanc issu de fin de pressée - Millésime 2010

Pour l'essai mené sur le moût de sémillon étudié (figure 2), quel que soit le produit de collage considéré, l'effet protecteur vis-à-vis de l'oxydation (représenté par la mesure de la DO 420nm - couleur jaune) s'avère presque systématiquement aussi efficace que celui obtenu avec la caséine. De plus, les différentes modalités correspondantes aux colles sans allergène présentent toutes des valeurs de DO 320nm (richesse en acides phénols des vins) plus faibles. La meilleure efficacité est obtenue avec le produit associant pvpp, bentonite et colle de poisson et tout comme pour l'essai sur sauvignon blanc, avec le produit associant bentonite, pvpp et cellulose.

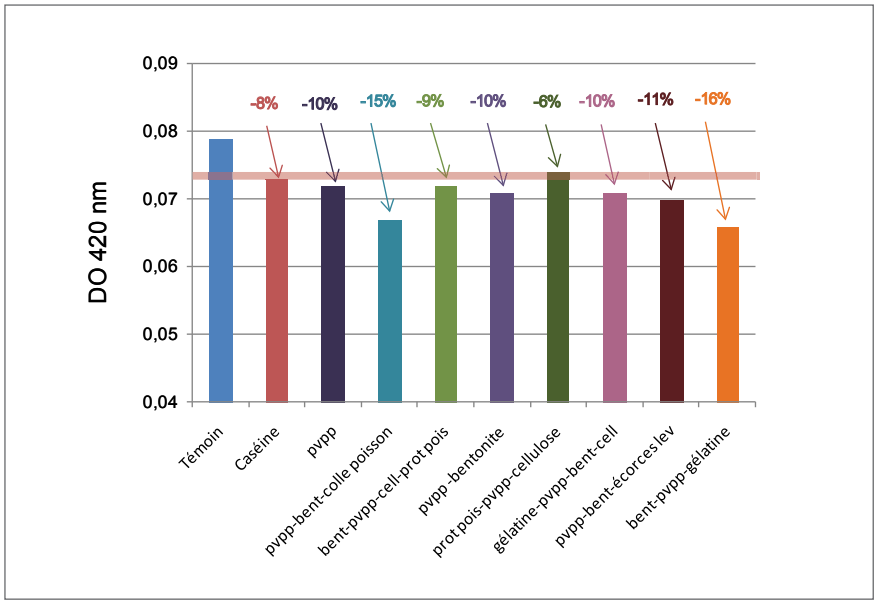


Figure 2 : DO 420 nm en fonction du produit de collage utilisé
Moût de sémillon - Millésime 2010

La dégustation réalisée en vin jeune montre que de nombreuses préparations donnent des résultats souvent équivalents à ceux obtenus avec la caséine. Les performances relatives de ces différents produits et leurs effets secondaires éventuels (principalement en terme de perte aromatique) sont variables en fonction des moûts étudiés et aucun vin ne présente de déviation organoleptique.

Sur sauvignon blanc, les différences entre les vins sont très faibles, aucune modalité ne présente de différences significatives par rapport au témoin. Les vins sont jugés de qualité proche et ne présentent pas de défaut olfactif ou gustatif.

Sur sémillon, des différences apparaissent sur les critères "Fruité" et "Qualité globale du nez". Ainsi, les vins des modalités traitées avec les formulations sans allergène sont jugés au minimum aussi fruités que le vin traité à la caséine et de qualité olfactive supérieure à celle de la caséine (figure 3).

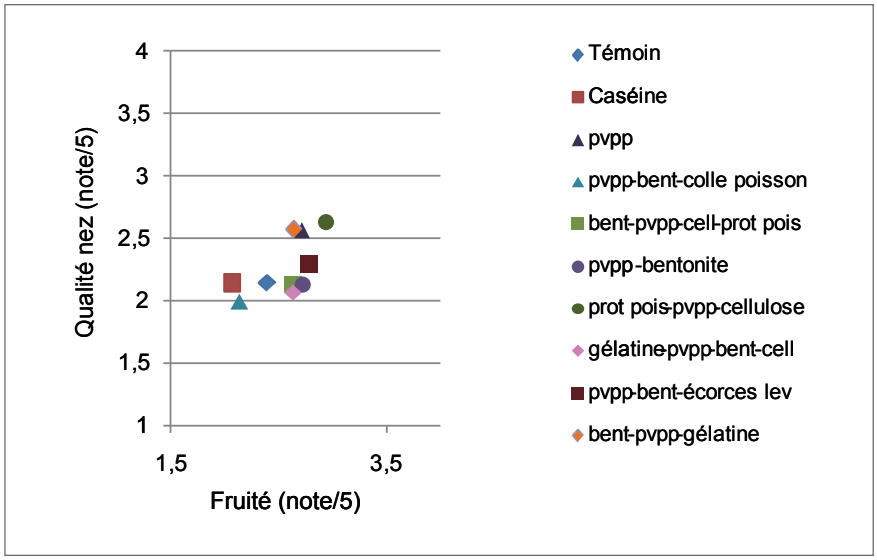


Figure 3 : profil des vins sur les variables
Qualité nez/fruité - Sémilllon 2010

En vinification en rosé, quel que soit le produit de collage utilisé, l'effet protecteur vis-à-vis de l'oxydation est aussi efficace que celui de la caséine (figure 4). Les vins traités avec les produits de collage exempts d'allergène s'avèrent tous moins jaunes (valeurs de b - coordonnées tristimulaires - et d'absorbance à 420 nm plus faibles) et moins rouges (valeur de a plus faible).

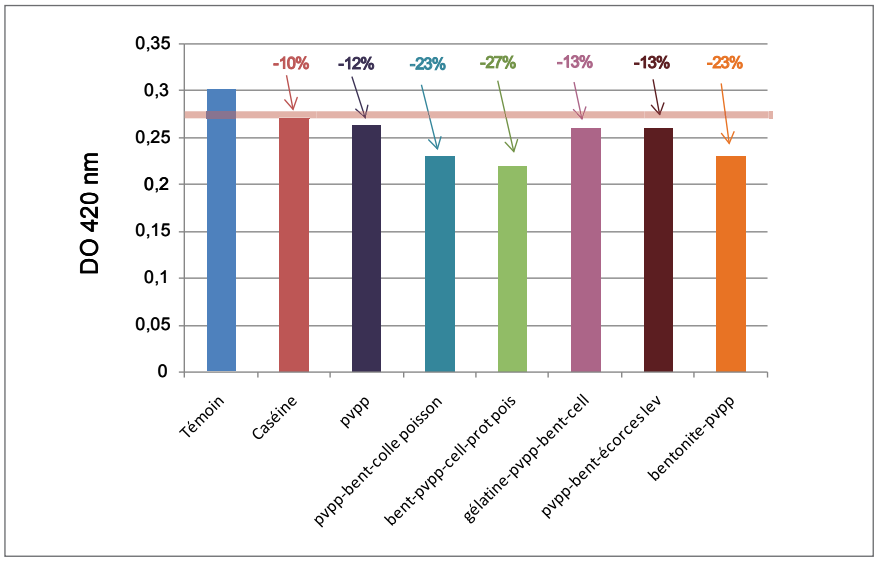


Figure 4 : DO 420 nm en fonction du produit de collage utilisé
Moût de cabernet franc - AOC Bordeaux rosé - Millésime 2010

Même si les résultats sont proches entre les différentes modalités, les vins traités présentent tous des valeurs en polyphénols totaux inférieures au vin Témoin et inférieures ou égales au vin traité à la caséine (figure 5).

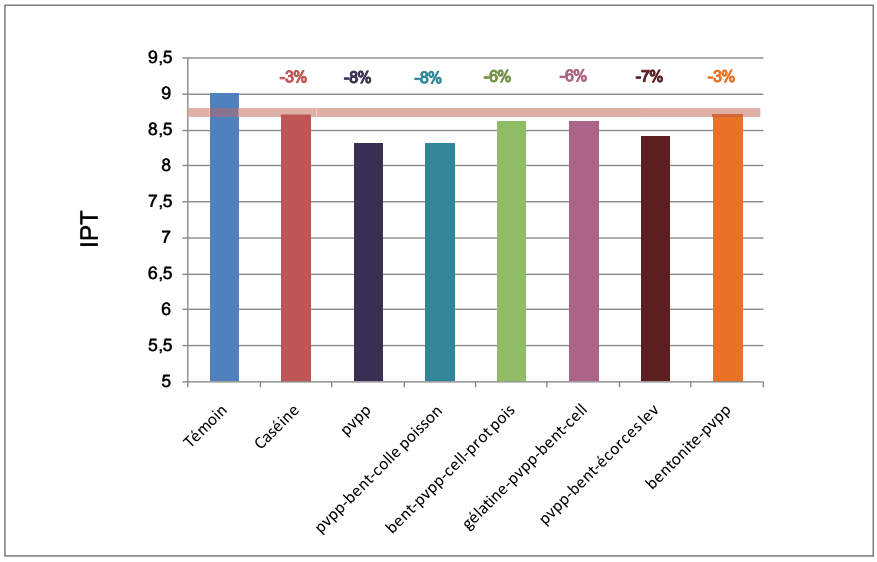


Figure 5 : IPT en fonction du produit de collage utilisé
Moût de cabernet franc - AOC Bordeaux rosé - Millésime 2010

Enfin, la dégustation des vins rosés ne met pas en évidence de différence significative entre les différents vins. Les vins sont une nouvelle fois jugés de qualité proche à la fois au niveau olfactif et au niveau gustatif.

VINIFICATION EN ROUGE : QUELLE ALTERNATIVE À L'ALBUMINE D'ŒUF ?

Les essais ont été réalisés sur un vin d'assemblage (55 % merlot - 30 % cabernet sauvignon - 15 % petit verdot) élevé 12 mois en barriques (millésime 2010 traité début 2012) afin d'évaluer des produits proposés comme substituants à l'albumine d'œuf. Le vin est réparti de manière homogène dans des contenants en inox de 10L. Les différentes colles sont incorporées au moment du remplissage des fûts. Elles ont été au préalable réhydratées (le cas échéant) en fonction des préconisations du fabricant. Afin de déterminer quel produit employé et surtout à quelle dose l'utiliser, chaque fabricant a reçu un échantillon de vin avant la mise en place de l'essai afin qu'ils réalisent des tests de collage. Ainsi chaque colle a été employée en fonction des recommandations du fabricant/distributeur comme cela peut être le cas en pratique sur le terrain.

Voici les produits alternatifs à l'albumine d'œuf testés lors de cet essai :

- Produit 1 : gélatine de poisson
- Produit 2 : gélatines alimentaires
- Produit 3 : écorces de levures et enzymes pectolytiques
- Produit 4 : gélatine porcine
- Produit 5 : enveloppes cellulaires de levures
- Produit 6 : chitosane, chitine glucane

Le collage avec les différents produits testés n'a pas induit de modifications des paramètres analytiques classiques. Le niveau de turbidité varie en fonction des modalités, les meilleurs résultats étant obtenus avec la gélatine de poisson ainsi qu'avec la gélatine porcine. Par ailleurs, dans le cas de cet essai, la composition phénolique du vin est peu modifiée par le traitement.

L'analyse sensorielle fait apparaître des différences significatives pour les critères "épicé" et "note globale". Ainsi, hormis le produit formulé à base d'écorces de levures, l'ensemble des vins traités avec les produits alternatifs sont jugés plus épicés que le vin témoin et globalement mieux notés. Ces vins sont appréciés de manière comparable au vin traité à l'albumine d'œuf (figure 6).

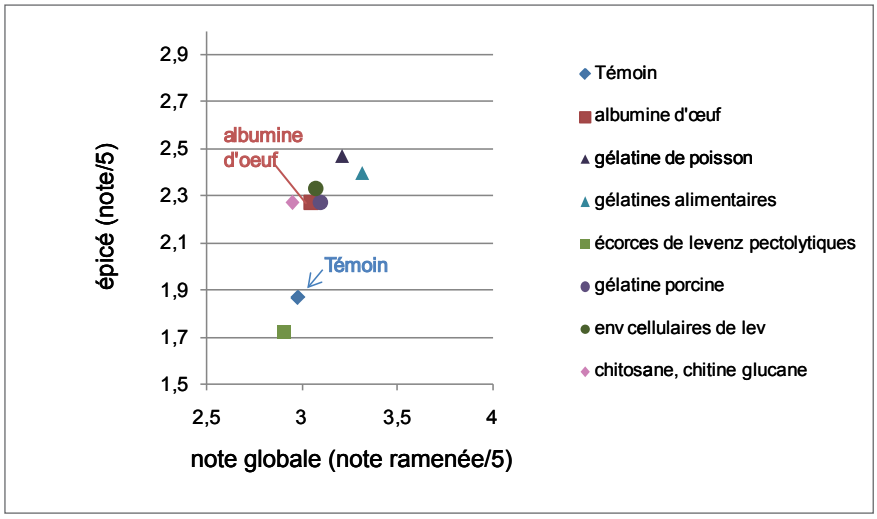


Figure 6 : profil des vins sur les variables épicé/note globale
vin rouge de garde 2010

EN RÉSUMÉ

Les essais menés en 2010 sur sauvignon blanc, sémillon et rosé de cabernet franc montrent la possibilité d'utiliser des colles exemptes d'allergène en remplacement de la caséine. En effet, les résultats analytiques mettent en évidence un effet protecteur de ces produits vis-à-vis de l'oxydation proche, voire dans certains cas, supérieur à celui de la caséine. De plus, les dégustations réalisées en vins jeunes montrent que de nombreuses préparations donnent des résultats qualitatifs équivalents à ceux obtenus avec le traitement à la caséine, avec les effets attendus de ces produits.

De plus, il est à noter que le coût d'un traitement avec l'un ou l'autre de ces produits alternatifs est soit équivalent à un traitement avec la caséine soit plus faible. Seul le produit comprenant des écorces de levures dans sa formulation a un coût de revient à l'hectolitre plus élevé comparativement à la caséine (+0,10€/hl).

Ces essais ont été reconduits en 2011 sur deux moûts de sauvignon blanc ; l'un issu de raisins récoltés en tout début de maturité et le second issu de raisins récoltés à maturité aromatique. Dans les conditions de ces essais, l'effet des colles testées, caséine comprise, est peu marqué. L'efficacité des produits de substitution reste cependant comparable à celle obtenue avec la caséine. L'analyse sensorielle a toutefois mis en évidence l'intérêt du collage pour la préservation de la fraîcheur dans le cas de la matière première récoltée en début de maturité.

Sur vin rouge, les résultats montrent que les produits de substitution à l'albumine d'œuf ont une efficacité comparable à celle-ci. Si les résultats analytiques sont proches, il apparaît à la dégustation que les vins traités présentent des notes épicées un peu plus marquées et sont globalement mieux appréciés. De même que pour la caséine, les produits de substitution à l'albumine d'œuf ont un coût de revient à l'hectolitre de vin similaire voire inférieur à celui du produit allergène sauf pour les produits à base de dérivés de levures (entre + 0,15 et +0,38€/hl).

POUR CONCLURE

Aujourd'hui, face à cette nouvelle réglementation sur l'étiquetage des allergènes, tout viticulteur qui souhaite s'affranchir de cette contrainte a la possibilité d'utiliser des produits alternatifs.

Toutefois, l'étiquetage est obligatoire uniquement lorsque la présence d'allergène peut être détectée dans le produit final, les produits utilisés (à base d'œuf ou de lait) sont alors considérés comme des ingrédients. La limite de détection par la méthode immunologique Elisa a été fixée par l'OIV à 0,25mg/l.

Ainsi, tout vinificateur ayant employé un des produits cités (albumine d'œuf ou caséine) a le choix de mentionner ou non la présence du produit allergène. Mais, s'il choisit de ne pas le mentionner, il sera dans l'obligation de réaliser un contrôle de détection validant l'absence de résidu.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Caillet MM. (2012). Allergènes et vins, 11 ans d'histoire et d'histoires. Conférence Vinitech 28 novembre 2012 - Bordeaux.

Cayla L., 2006. Les collages : un large choix à raisonner. Rosé.com n°9, 10-13.

Cayla L., Chauffour E. (2012). Adaptation des produits de collage. Les alternatives à la caséine sur moûts rosés. Conférence Vinitech 28 novembre 2012 - Bordeaux.

Flanzy et al., 1998. OEnologie. Fondements scientifiques et technologiques. Paris, Lavoisier, coll."Sciences et techniques agroalimentaires", 1311 p.

Martin A. et al, 2007. Les protéines végétales : une nouvelle technique approuvée pour la clarification et le collage des moûts et des vins. RDO n°123 Avril 2007, 48-51.

Moine V. (2012). Les allergènes dans le vin : obligations réglementaires et conséquences techniques. Statégie d'adaptation de la gamme de produits de collage en réponse à ce nouveau contexte. Conférence Vinitech 28 novembre 2012 - Bordeaux.

Pic-Blateyron L., 2009. Les « allergènes » en œnologie et leurs alternatives. Rapport annuel ICV 2009, 26-27.

Poinsaut P., Martin A., 2008. De nouvelles alternatives « Allergen free » pour traiter l'oxydation des moûts et vins sans caséine. RDO n°127 mars 2008, 14-17.

Reynou G., Arfeuillere C., Rivel S., Delaherche, 2009. Alternatives aux produits allergènes : des solutions tout au long de la vinification. RDO n°132 juin 2009, 38-41.

Mardi 5 février 2013
Palais des Congrès
de Bordeaux

11e JOURNÉE TECHNIQUE DU CIVB

Décryptage et préservation de la qualité aromatique et gustative des vins de Bordeaux

LES ACTES DU COLLOQUE

BORDEAUX

Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux

CARACTÉRISATION DES COMPOSES IMPLIQUES PAR DES PHÉNOMÈNES D'INTERACTIONS PERCEPTIVES DANS LES NUANCES FRUITÉES DE L'ARÔME DES VINS LIQUOREUX

Panagiotis STAMATOPOULOS[1,2] et Philippe DARRIET[1,2]

[1.] Université de Bordeaux, ISVV, EA4577 OEnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

[2.] INRA, ISVV, USC 1366 OEnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

Thèse en cours (2010/2013) de Panagiotis Stamatopoulos, financée par le CIVB et le Conseil Régional d'Aquitaine, dirigée par Philippe Darriet.

INTRODUCTION

Les vins liquoreux sont élaborés selon un procédé de vinification singulier à partir des raisins surmûris sous l'action du champignon *Botrytis cinerea*. De cette alliance, sont produits des vins aux nuances aromatiques exceptionnelles, qui évoquent notamment les agrumes confits, les fruits secs ou le miel. Cependant, jusqu'à une période récente, les composés à l'origine de leur arôme typique étaient mal connus.

La thèse d'Elise Sarrazin, menée au sein de laboratoire et soutenue en 2007, a permis de démontrer le rôle clé de certains thiols volatils (notes zestées), de certaines furanones (nuances de sucre cuit), et du phenylacétaldéhyde (note de miel, florale) dans l'expression aromatique des vins liquoreux de pourriture noble. Le développement de la pourriture noble sur les cépages de Sémillon et du Sauvignon Blanc, contribue beaucoup à l'accroissement des teneurs de ces composés. Ces résultats vérifient les pratiques empiriques et confirment l'intérêt de la botrytisation pour amplifier la palette aromatique des vins liquoreux. Il apparaît que le champignon agit à plusieurs niveaux pour accroître la concentration des composes clés. Tout d'abord, *Botrytis cinerea* accélère le phénomène de passerillage. Il modifie aussi la composition des baies en produisant à la fois des composés odorants, dont le phenylacétaldéhyde et les lactones et en induisant une augmentation de précurseurs d'arômes de nuances zestées, comme les précurseurs cystéinylés et glutathionylés (Sarrazin *et al.* 2007 ; Thibon *et al.* 2009, 2011). En outre, le développement de Botrytis cinerea conduit à l'oxydation des composés phénoliques des raisins (acide phénols, monomères de flavan-3-ols), un mécanisme favorable pour les vins liquoreux, à une moindre réactivité des thiols responsables de nuances zestées (Nikolantonaki *et al.* 2012 ; Sarrazin *et al.* 2010).

Dans le cadre de la thèse, l'objectif est de progresser dans la connaissance des composés impliqués dans les notes d'« agrumes confits », typiques des vins liquoreux de pourriture noble. Ces travaux sont conduits grâce à des approches analytiques (identification de composés volatils par couplage chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse) et sensorielles (analyse par GC-olfactométrie, tests d'omission, de catégorisation et reconstitution

aromatique). Ils visent à caractériser de nouveaux marqueurs de l'arôme des vins de pourriture noble. Compte tenu de la complexité de la construction des images sensorielles, l'accent a été mis sur l'étude des phénomènes d'interactions perceptives (phénomènes d'antagonisme, de synergie voire d'élaboration de nouveaux accords). La reconstitution aromatique a représenté, en particulier, une voie importante de recherche pour progresser dans la compréhension des phénomènes impliqués dans la construction de ces odeurs complexes.

I. UNE NOUVELLE APPROCHE POUR ETUDIER LA CONTRIBUTION DE COMPOSES VOLATILS DANS UN MELANGE

Le vin est une matrice aromatique extrêmement complexe. Plus de mille composés ont été identifiés dans le vin, à des teneurs pouvant aller de quelques centaines de mg/L, à quelques µg/L, voire ng/L. Dans l'espace de tête au-dessus d'un verre de vin, au moins une centaine de composés volatils sont présents. Compte tenu de possibles phénomènes d'interactions perceptives entre eux, il est d'abord nécessaire de réaliser des tests d'omission pour étudier l'impact réel d'un composé ou mélange de composés sur l'arôme du vin. Le principe des tests d'omission est basé sur l'analyse des conséquences au niveau sensoriel liées à l'élimination d'une ou plusieurs zones odorantes.

Le premier objectif a été de mettre en œuvre une nouvelle méthodologie pour réaliser ces tests. Un système de chromatographie en phase gazeuse préparatif (PFC), a été développé pour collecter par voie cryogénique certaines fractions d'intérêt, notées par GC-olfactométrie afin de juger leur impact olfactif dans le mélange. Cette approche a déjà été employée par Hasselbath *et al.* 2007 pour étudier des composés de l'arôme du café.

Système de GC-préparatif

Concrètement, l'analyse d'extraits brut de vins (vin liquoreux présentant des notes typiques et vins blancs secs) effectuée par GC-olfactométrie a permis de souligner la présence de certaines zones odorantes d'intérêt, autour de 38 minutes, rappelant des notes d'orange confite, zones odorantes qui ne sont pas présentes dans les extraits de vins blancs secs (Tableau 1). Avec le système de GC-préparatif (PFC), on a ainsi récupéré trois types d'échantillons par piégeage cryogénique avec de l'azote liquide (- 40 °C) en sortie de la colonne chromatographique : un piège avec l'arôme global de notre extrait de vin, un deuxième comprenant tous des composés volatils, à l'exception de zones odorantes d'intérêt et enfin un troisième piège ne comprenant que les zones odorantes d'intérêt (Tableau 2).

Temps (min)	VIN LIQUOREUX	VIN BLANC SEC
31.4	Floral -fruité (intense)	Poire
34.7	Floral (intense)	Agrumes
35.3	Agrumes	Agrumes intense
38.3	Orange confite	Fruité/floral
38.9	Orange confite	Floral léger
41.4	Plastique	Lacté

Tableau 1 : Aromagrammes partiels d'extrait de vin liquoreux et de vin blanc sec par GC-Olfactométrie (3 sujets).

Les trois types d'échantillons obtenus par piégeage cryogénique ont été présentés à un jury pour évaluer leur différence et préciser leurs caractéristiques olfactives. Les tests olfactifs étaient effectués sur petites bandes en papier cellulose avec un dépôt de 1 µL d'échantillon.

Les résultats ont permis d'établir très clairement les caractéristiques sensorielles des pièges 1, 2, 3 avec un jury de 15 personnes. Il apparaît que les composés piégés entre 36 et 40 minutes (piège 3) présentent des notes aromatiques de fruits confits, d'orange qui ne sont pas perçues dans le piège 2. (Tableau 2).

Temps de piégeage cryogénique (min)	Piège	Description
0-82,67	1	Fruits surmuris, Agrumes, Floral, Cire, Miel, Sucre cuit
0-36,00 et 40,00 -82,67	2	Miel, Fromage, Levure, Lourde, Epicée
36,00-40,00	3	Fruits confits, Orangée, Abricot sec

Tableau 2 : Test descriptif pour les différents pièges obtenus.

Ensuite, il a été décidé de poursuivre la caractérisation des composés associés aux notes aromatiques du piège 3. Pour cela, suivant l'exemple des thèses de Bénédicte Pineau et de Georgia Lytra concernant certaines notes fruitées de l'arôme des vins rouges, l'extrait brut de vin liquoreux a été fractionné par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en 50 fractions. Une tonalité aromatique évoquant les notes orangées a été notée dans les fractions 37 et 38. Aussi, ces fractions ont été soumises au même protocole de PFC et il a été possible de confirmer après piégeage cryogénique sur les fractions 37 et 38, l'impact des composés responsables des zones odorantes d'orange confite entre 36 et 40 minutes.

II. IDENTIFICATION D'UNE MOLECULE SPECIFIQUE DE VINS LIQUOREUX DE POURRITURE NOBLE IMPLIQUEE DANS LES NUANCES ORANGEES.

A l'aide de la technique de Chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle, déjà utilisée au sein du laboratoire pour identifier des composés à l'état de traces, les fractions 37-38 ont été analysées et il a été possible de repérer plusieurs zones odorantes, rappelant respectivement la noix de coco due à la whiskey lactone, le clou de girofle du à l'eugénol, la pêche due à la ^{3}-nonalactone et en particulier, une zone correspondant à un composé inconnu présentant une odeur fruitée/mentholée. Nous avons acquis la conviction que l'ensemble des composés responsables de ces zones odorantes jouaient un rôle déterminant dans les tonalités orangées des fractions 37-38. Il restait à identifier le composé inconnu, ce qui a été possible par analyse des extraits en couplage de GC-bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution. Il s'agit d'une pentyl furanone qui fait partie de la famille chimique des lactones. Ce composé bien détecté dans certains vins liquoreux de pourriture noble ne l'a pas été dans des extraits de vins blancs secs (Figure 1).

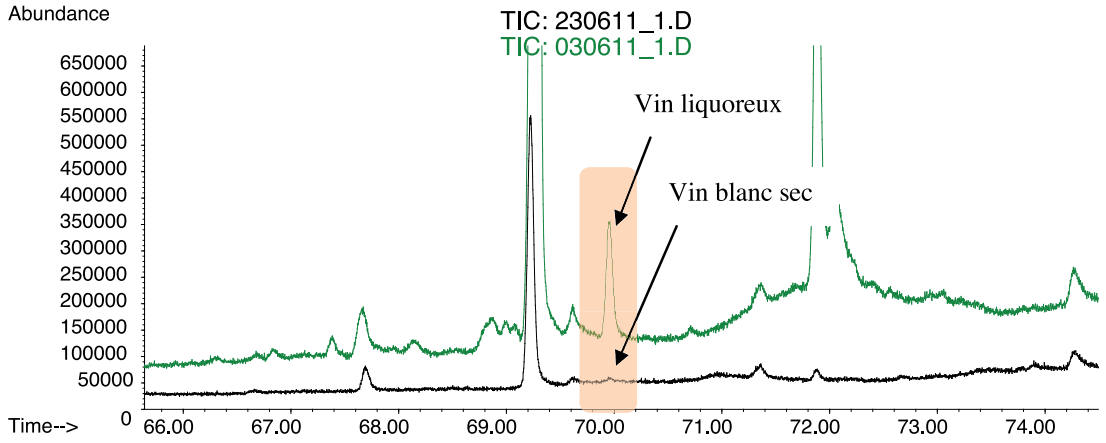


Figure 1 : Chromatogrammes obtenus par GC bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse de la fraction 37, pour un vin Liquoreux de pourriture noble (vert) et un vin Blanc sec (noir). Pic chromatographique de la pentylfuranone indiqué.

Apres avoir développé et validé une méthode de quantification de cette molécule, son dosage a été effectué dans différents vins et son seuil de détection olfactive déterminé. Des concentrations situées entre 2 µg/L et 18 µg/L ont été mesurées pour cette lactone dans des vins liquoreux de pourriture noble (Tableau 3). En outre, cette molécule semble bien spécifique des vins liquoreux de pourriture noble dans la mesure où elle n'est pas détectée dans les vins secs de différents cépages. La concentration moyenne de cette molécule dans les vins analysés est de 6,1 µg/L.

Millésime	Vins	Appellation	concentrations (µg/L)
2009	Liq-Sg	Sauternes	4,1 ± 0,3
2010	Liq-Sg	Sauternes	5 ± 0,22
2006	Liq-Cds	Sauternes	11,6 ± 0,1
2006	Liq-Phd	Loupiac	5,2 ± 0,7
2007	Liq-Phd	Loupiac	4 ± 0,69
2008	Liq-Phd	Loupiac	4,5 ± 0,05
2010	Liq-Phdnt	Loupiac	2 ± 0,09
2002	Liq-Tb	Sauternes	18 ± 0,39
2005	Liq-Tb	Sauternes	5,5 ± 0,28
2001	Liq-La	Sauternes	3,7 ± 0,21
2001	Liq-Mal	Sauternes	2,6 ± 0,46
2003	Liq-Jcb	Sauternes	3,6 ± 0,13
2005	Liq-Jcb	Sauternes	6,5 ± 0,2
2007	Liq-Jcb	Sauternes	7,7 ± 0,28
2005	Liq-Ml	Sauternes	7,7 ± 0,17
2007	Sec-Lar	Chablis	non détecté
2008	Sec-Tey	Bordeaux	non détecté
2008	Sec-Bon	Entre Deux Mers	non détecté
2008	Sec-Ann	Alsace	non détecté

Tableau 3 : Concentrations de la nouvelle lactone dans différents vins

Il est intéressant de noter que les descripteurs sensoriels pour cette lactone changent selon les concentrations. Pour des concentrations faibles (2,5-20 µg/L), le descripteur principal est fruité et mentholé, tandis que pour les teneurs élevées (± 100 µg/L), comme avec beaucoup de lactone, les descripteurs rappellent la noix de coco et le beurre. Le seuil de perception est autour de 2,5 µg/L en solution hydro-alcoolique (pH 3,5). Il faut noter que la molécule possède un carbone asymétrique et le seuil de perception pourrait changer selon les énantiomères.

III. INTERACTIONS PERCEPTIVES ET IMPACT SENSORIEL DE LA NOUVELLE LACTONE, MARQUEUR DE L'AROME DES VINS LIQUOREUX DE POURRITURE NOBLE.

Nous avons formulé l'hypothèse que la composante orangée dans les extraits de vins liquoreux de pourriture noble résultait d'un phénomène d'interactions perceptives associant en particulier la pentyl furanone et les composés évoqués précédemment (whiskey lactone, eugénol, ^{3}-nonalactone). Aussi, des expériences sensorielles ont-elles été mise en place pour l'étudier.

Pour cela, deux vins liquoreux de pourriture noble ont d'abord été sélectionnés, l'un présentant des nuances de fruits confits, et particulièrement d'orange confite, l'autre moins typé avec des nuances de fruits frais. Après le fractionnement des vins par CLHP, les composés, évoqués précédemment, comme étant susceptibles d'être impliqués dans les nuances d'orange confite ont été quantifiés. Les résultats ont bien confirmé l'hypothèse de départ, à savoir une différence de teneur pour les composés considérés entre les deux vins. Ensuite pour étudier l'impact sensoriel de chacun des composés dans un phénomène perceptif, on réalisé des expériences de reconstitution aromatique avec omission.

Trois séries d'analyse sensorielle ont été réalisées, la première avec les fractions du vin « typé », la deuxième (mélange) avec les fractions du vin « non-typé » mais en ajoutant les teneurs des composés retrouvées dans le vin « typé », la troisième avec les fractions du vin « non-typé ». Différents types d'échantillons ont ainsi été constitués avant de les soumettre à l'appréciation de leur caractère orangé et de leur niveau de typicité.

Code	Echantillon
F37+F38	Fractions CLHP qui présentent les notes recherchés
RAT	Le mélange total des fractions (1 à 50)
RAP	Le mélange total (1 à 50) sauf les fractions 37+38
RAP-WL	Le mélange d'échantillon RAP plus les teneurs de 4 composés impliqués, sauf la whiskey lactone
RAP-γN	Le mélange d'échantillon RAP plus les teneurs de 4 composés impliqués, sauf la γ-nonalactone
RAP-E	Le mélange d'échantillon RAP plus les teneurs de 4 composés impliqués, sauf l'eugenol
RAP-N	Le mélange d'échantillon RAP plus les teneurs de 4 composés impliqués, sauf la nouvelle lactone

Tableau 4 : Codage des échantillons utilisés.

Les résultats de l'analyse sensorielle du vin « typé » montrent clairement un effet direct de la whiskey lactone, de l'eugénol, et de la nouvelle lactone sur la perception de la note d'orange confite dans les vins liquoreux de pourriture noble. Il s'agit d'un phénomène d'« accord aromatique » aussi dénommé phénomène de perception « synthétique », bien connu en parfumerie. Ce phénomène résulte de la perception d'une tonalité aromatique différente de celle de chacun des composés volatils pris séparément. L'analyse sensorielle du « mélange » permet aussi de valider l'impact majeur de la whiskey lactone et de la nouvelle lactone sur la perception de l'arôme d'orange confite. Enfin, concernant l'étude sensorielle menée sur le vin « non typé », les résultats montrent qu'il y a un impact non significatif de l'addition de la whiskey lactone, de l'eugénol et de la pentyl furanone compte tenu de niveaux de concentrations trop faibles (ex teneur en pentyl furanone de 1 µg/L) dosées dans le vin « non-typé » (figure 2).

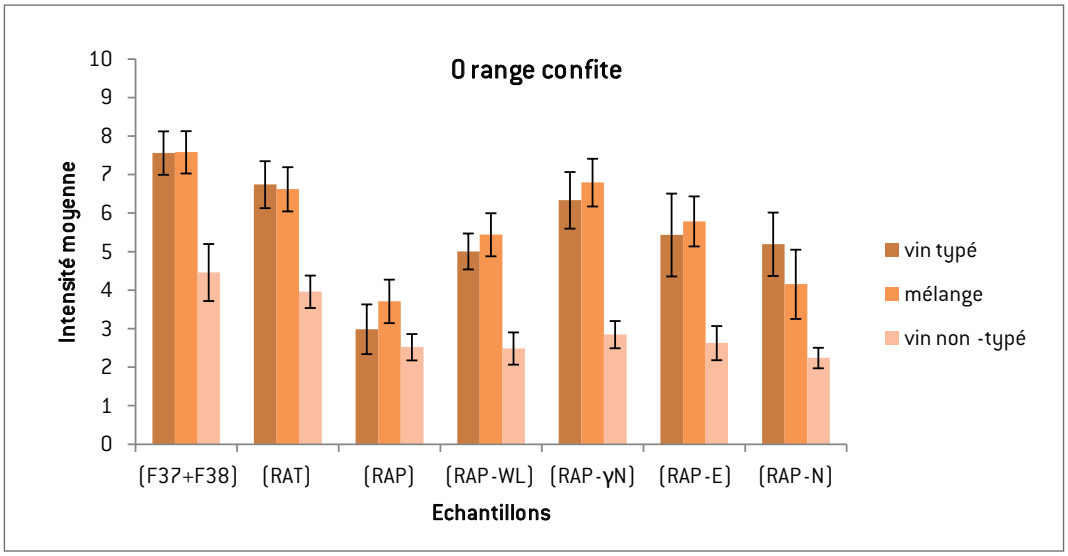


Figure 2 : Intensité moyenne des échantillons pour le descripteur d'orange confite

Un phénomène très similaire est observé au niveau de la typicité aromatique des fractions présentées. La whiskey lactone contribue à la typicité aromatique des vins liquoreux de pourriture noble comme l'avait souligné Elise Sarrazin (Sarrazin et al., 2009). La nouvelle lactone et l'eugénol ont aussi un impact sur le niveau de typicité des vins liquoreux lorsque ces composés sont associés avec la whiskey lactone. Enfin il faut souligner l'impact de cette nouvelle lactone sur la typicité de vins liquoreux de pourriture noble (figure 3).

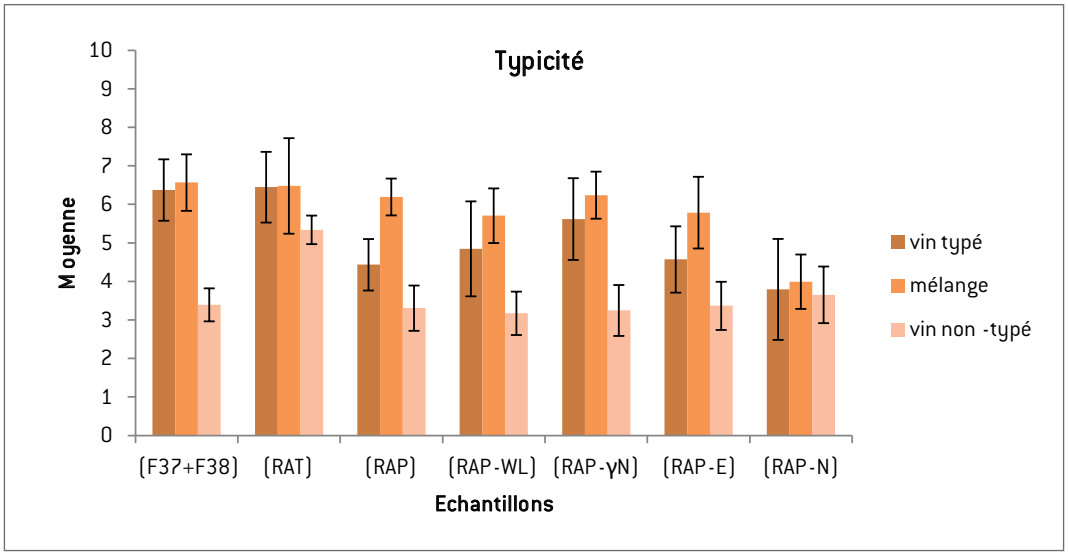


Figure 3 : Valeur moyennes de typicité pour les différents échantillons de reconstitution aromatique avec omission.

IV. CONCLUSION

Nos travaux se situent en continuité de ceux d'Elise Sarrazin (2007) qui avait mis en évidence l'existence d'un espace sensoriel propre aux vins liquoreux de Bordeaux, identifié et dosé des composants d'intérêt dans l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble. Cependant, ses travaux n'avaient pas pu aboutir dans l'interprétation des nuances aromatiques d'agrumes confits. Lorsque ces travaux ont été repris, il nous a semblé évident que la perception de ces notes aromatiques paraissait plutôt associée à une combinaison de molécules au niveau du système olfactif des dégustateurs, au travers de phénomènes d'interaction sensorielle.

Nous avons développé une nouvelle approche impliquant la chromatographie en phase gazeuse préparative pour valider, par des tests d'omission, l'importance de composants volatils associés à des notes d'orange confite. Cette validation a pu être faite à la fois sur l'extrait brut de vin liquoreux et avec des fractions purifiées. Nos travaux ont ensuite permis d'identifier une nouvelle lactone qui semble spécifique de vins liquoreux de pourriture noble. Cette molécule avec un arôme fruité/mentholé contribue au travers des phénomènes d'interactions perceptives avec d'autres composés volatils pour créer les notes d'orange confite. Les travaux se poursuivent pour étudier l'implication d'autres composés de l'arôme des vins liquoreux dans cet accord aromatique et se pencher sur la genèse de la pentyl furanone.

Remerciements : Les auteurs remercient Dr. Eric Frerot, Firmenich S.A, Geneve, Suisse pour son aide dans l'identification de la pentylfuranone, Dr. Alexandre Pons, Université de Bordeaux, ISVV, EA4577 OEnologie concernant le développement de techniques chromatographiques multidimensionnelle et préparative, Dr. Sophie Tempère, Université de Bordeaux, ISVV, EA4577 OEnologie pour les tests d'analyse sensorielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hasselbarth A., Weers M., Averbeck M., Fischer A., Ullrich F.(2007). Better understanding of aroma systems through aroma fractionation and recombination analysis (AFARA). Proceedings of the 8th Wartburg Symposium, pp 176-184.

Nikolantonaki, M., Jourdes, M., Shinoda, K., Teissedre, P.-L.., Quideau, S., & Darriet, P. (2012). Identification of adducts between an odoriferous volatile thiol and oxidized grape phenolic compounds: Kinetic study of adduct formation under chemical and enzymatic oxidation conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(10), 2647-2656

Elise Sarrazin, (2007). Recherches sur l'arôme des vins liquoreux des pourriture noble issus des cépages Sémillon et Sauvignon blanc. Thèse de Doctorat. Université Victor Segalen Bordeaux 2.

Sarrazin, E., Shinkaruk, S., Pons, M., Thibon, C., Bennetau, B., & Darriet, P. (2010). Elucidation of the 1,3-sulfanylalcohol oxidation mechanism: An unusual identification of the disulfide of 3-sulfanylhexanol in sauternes botrytized wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(19), 10606-10613.

Sarrazin, E., Tominaga, T., Dubourdieu, D., Darriet, P., (2009). De nouvelles connaissances sur l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble-Définition d'un espace sensoriel des vins liquoreux, caractérisation de composés clés et étude de leur genèse. Revue des OEnologues, 130,15-1.

Thibon, C., Dubourdieu, D., Darriet, P., & Tominaga, T. (2009). Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in vitis vinifera L. cv sauvignon blanc and semillon grape juice. Food Chemistry, 114(4), 1359-1364.

Thibon, C., Cluzet, S., Mérillon, J. M., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2011). 3-sulfanylhexanol precursor biogenesis in grapevine cells: The stimulating effect of botrytis cinerea. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(4), 1344-1351.

INTERACTIONS TANINS-LIPIDES : QUEL IMPACT SUR LE GOÛT DES VINS ?

Aurélien Furlan, Axelle Grélard, Isabelle Pianet, Erick J. Dufourc, Julie Géan

Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets (CBMN)
Université de Bordeaux, CNRS, Institut Polytechnique de Bordeaux
Allée Geoffroy Saint Hilaire, 33600 Pessac

INTRODUCTION

Les tanins font partie intégrante des composés qui participent aux qualités gustatives d'un vin. En effet, la sensation d'astringence est provoquée par l'interaction entre les tanins et les protéines de la salive qui conduit à une diminution de la lubrification de la cavité buccale, d'où cette sensation de sécheresse en bouche. Les travaux d'Olivier Cala (thèse financée par le CIVB soutenue en 2010) sur les interactions tanins-protéines de la salive réalisés par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré notamment que l'affinité des tanins pour les protéines est fonction de l'état d'oligomérisation des tanins (trimères > dimères > monomères) (fig.1) mais également de leur état colloïdal (libres ou auto-associés) (Cala et al., 2012) (fig.2).

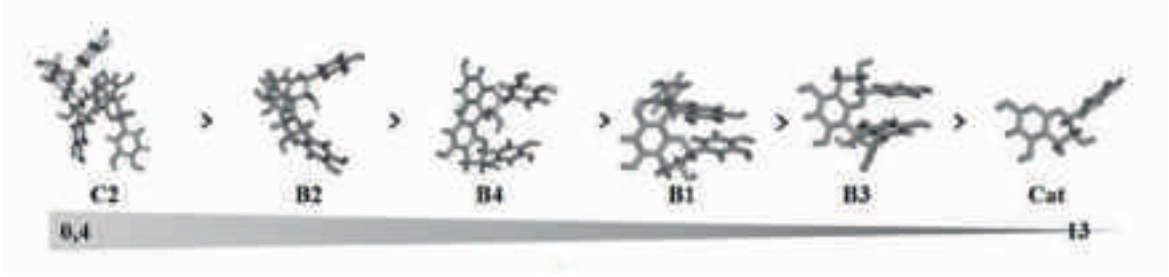


Figure 1. Echelle d'affinité absolue (en mM) des tanins pour les protéines de la salive en fonction de la structure du tanin (C, trimère ; B, dimères ; Cat, monomère) (Cala et al., 2010).

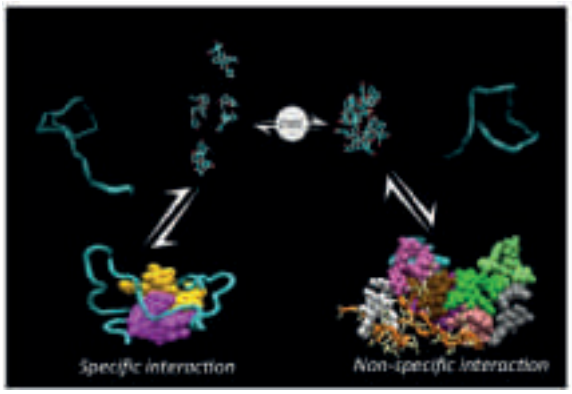


Figure 2. Modèle d'association des tanins avec les protéines de la salive en fonction de l'état colloïdal du tanin, libre ou auto-associé (Cala et al., 2012).

Lors de la dégustation, d'autres composés endogènes ou non (apportés par l'alimentation par exemple) sont susceptibles d'interagir avec les tanins du vin et parmi eux les lipides. En effet, le fromage, aliment gras par excellence, n'est-il pas l'inévitable compagnon du vin ? Et même si l'accord vins-fromages déchaîne les passions, il n'en demeure pas moins que le gras du fromage est un exhausteur de goût indéniable. Par ailleurs, de nombreux travaux scientifiques sur les interactions entre les tanins et les membranes cellulaires, initiés dans les années 90 face à l'intérêt grandissant des tanins comme antioxydants susceptibles de prévenir les risques de maladies cardiovasculaires et dégénératives, montrent que les tanins interagissent avec les lipides (Hashimoto et al., 1999 ; Kajiya et al., 2001, 2002).

L'objectif de la thèse d'Aurélien Furlan (débutée en octobre 2010) consiste donc à comprendre dans quelle mesure les interactions tanins-lipides pourraient jouer un rôle potentiel sur la perception gustative d'un vin. Alors qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune donnée d'analyse sensorielle au sujet de l'association vins-lipides et que l'aspect moléculaire de cette association n'a jamais été abordé dans le contexte du goût des vins, les résultats issus de cette thèse pourraient ouvrir une voie nouvelle et novatrice dans le domaine de la dégustation.

L'étude effectuée par RMN s'est focalisée sur les lipides endogènes en tant que constituants majoritaires des membranes buccales. Deux aspects ont été abordés. Le premier a consisté à quantifier l'affinité des tanins pour les lipides membranaires de manière à la comparer à celle trouvée pour les protéines de la salive. Le deuxième s'est intéressé à l'effet des tanins sur la dynamique et l'ordre de l'architecture membranaire dans laquelle on retrouve notamment les récepteurs gustatifs au niveau des papilles, les cellules sensorielles qui se situent pour l'essentiel dans la muqueuse linguale.

Les membranes biologiques étant des assemblages très complexes (fig.3), afin de simplifier le système membranaire, nous avons travaillé avec des membranes modèles faciles à réaliser, les vésicules multilamellaires, qui reproduisent la structure en bicouche moléculaire des membranes biologiques et qui ne sont constituées que de lipides (fig.4).

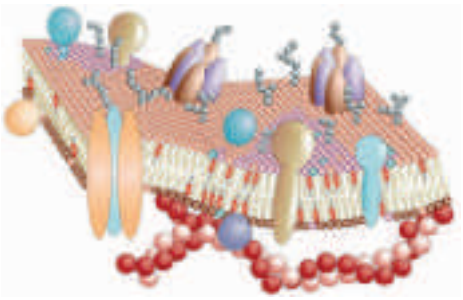


Figure 3. Structure d'une membrane biologique composée d'une bicouche constituée majoritairement de lipides mais également de protéines et de glucides (Pietzsch, 2004).

Figure 4. Vésicules multilamellaires composées d'un assemblage de bicouches lipidiques séparées par des couches d'eau (Loudet et al., 2010).

Dans notre cas, les vésicules multilamellaires ont été réalisées avec le DMPC (dimyristoylphosphatidylcholine) (fig.5), un phospholipide non chargé qui rend compte des lipides majoritairement trouvés dans les membranes buccales (fig.6).

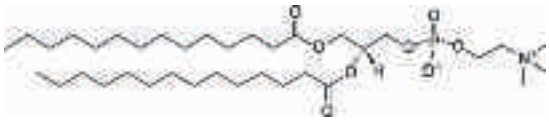


Figure 5. Structure du DMPC.

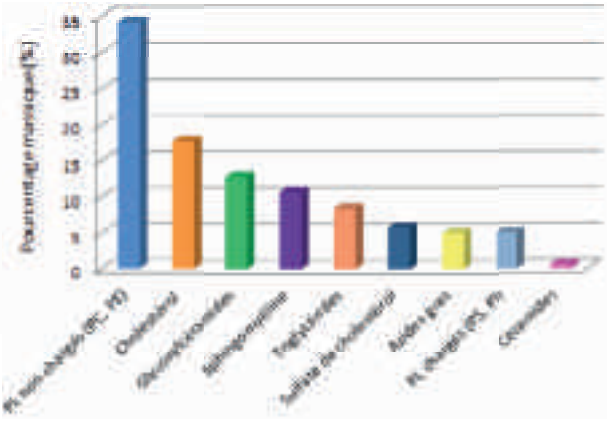
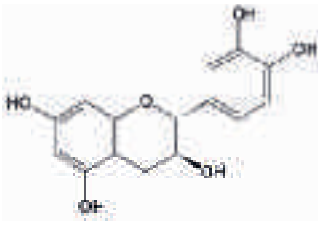
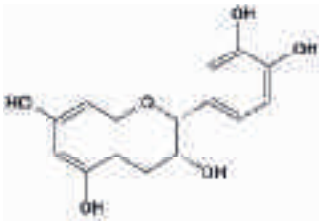


Figure 6. Composition lipidique des membranes buccales (Squier et al., 1991 ; Ganem-Quintanar et al., 1997 ; Thompson et al., 2001 ; Diaz-del Consuelo et al., 2005).

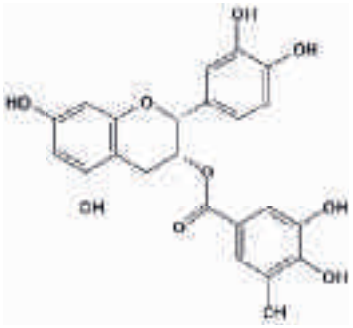
Le choix des tanins s'est porté sur les deux principaux tanins trouvés dans le vin rouge à savoir la catéchine et l'épicatéchine ainsi que deux autres tanins galloylés, l'épicatéchine gallate et l'épigallocatéchine gallate, afin d'étudier l'effet de la structure du tanin sur les interactions tanins-lipides et sur l'organisation membranaire (fig.7). Les concentrations en tanins utilisées ont été choisies inférieures à la concentration micellaire critique (CMC), comme c'est le cas dans le vin (Quideau et al., 2011), c'est-à-dire que les tanins se trouvent à l'état libre (non associé) (Pianet et al., 2008, Fabre et al., 2010).



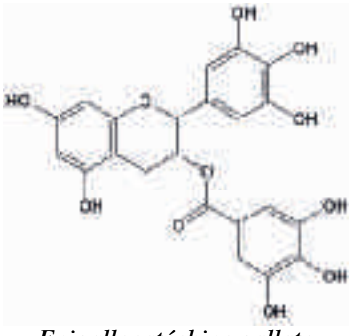
Catéchine



Epicatéchine



Epicatéchine gallate



Epigallocatéchine gallate

Figure 7. Structure des tanins étudiés.

Dans le but de se rapprocher des conditions réelles, les expériences d'abord menées sur un système simple, une membrane modèle constituée d'un seul lipide dans un milieu 100 % aqueux, ont ensuite été étendues à une membrane modèle constituée de DMPC et de cholestérol, deuxième lipide majoritaire des membranes buccales, dans un milieu aqueux alcoolisé à 12 % afin de mimer l'environnement dans lequel baignent les membranes buccales lors de la dégustation.

AFFINITÉ DES TANINS POUR LES LIPIDES MEMBRANAIRES

Des expériences de RMN du proton (1H) ont été réalisées sur une solution de vésicules multilamellaires, en milieu aqueux au pH de 7.4 et à la température de 37°C représentatifs de la bouche1, à laquelle ont été ajoutés des tanins. Une expérience similaire a également été effectuée au pH du vin de 3,5. Cette technique non destructive permet de montrer au niveau moléculaire la localisation des tanins dans la membrane (Uekusa et al., 2007) et de déterminer l'affinité des tanins pour les lipides (Ramstad et al., 2005).

Ainsi nous avons montré que les tanins sont localisés à la surface de la membrane et qu'ils interagissent préférentiellement avec la tête polaire des lipides. Une stoechiométrie de 1 tanin par lipide, quel que soit le tanin, a été considérée au vu des résultats. L'affinité, non pH-dépendante, varie avec la structure du tanin. L'échelle d'affinité relative montre en effet que les tanins non galloylés sont plus affins que les tanins galloylés (fig.8).

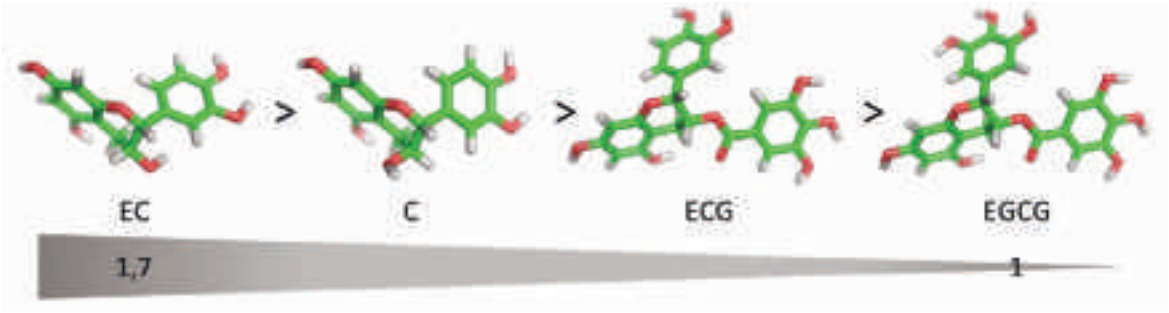


Figure 8. Echelle d'affinité relative des tanins pour les lipides membranaires.

Les constantes d'affinité des tanins pour les lipides sont de l'ordre du mM, c'est-à-dire du même de grandeur que celles trouvées pour les interactions tanins-protéines de la salive. Ce résultat est remarquable et indique qu'**il existe une compétition potentielle entre les interactions tanins-lipides et les interactions tanins-protéines de la salive.**

EFFET DES TANINS SUR L'ORGANISATION DES MEMBRANES

Des travaux ont été entrepris sur un système identique au précédent mais où le DMPC est maintenant deutéré sur une de ces deux chaînes alkyles (fig.9) afin de réaliser des expériences de RMN du deutérium (2H). Cette technique apporte une information à la fois sur l'ordre de la membrane et sur sa dynamique (Seelig, 1977 ; Davis, 1979 ; Dufourc, 2008).

[1] Le pH de la bouche varie autour de 7 et la température buccale normale varie entre 35,5 et 37,5C (d'après http://www.sante.gouv.fr/fiches-no-1-5-mesures-de-la-temperature-corporelle.html)

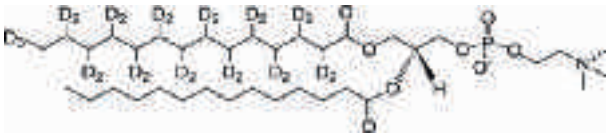


Figure 9. Structure chimique du DMPC deutéré sur une des deux chaînes alkyles.

Les résultats montrent que les tanins abaissent la température de transition de phase du DMPC (température à laquelle la membrane constituée de molécules de DMPC passe d'un état ordonné à un état plus désordonné) (fig.10), ce qui signifie que **les tanins ont un effet fluidifiant** c'est-à-dire qu'ils provoquent du désordre. L'étude de l'effet des tanins sur le cœur hydrophobe de la membrane montre que ce désordre se situe préférentiellement sur la partie supérieure de la chaîne carbonée à savoir celle la plus proche des têtes polaires (fig.11). Si l'on compare les tanins entre eux, la catéchine et l'épicatéchine montrent des effets similaires tandis que l'épigallocatéchine gallate se démarque avec un effet un peu plus important.

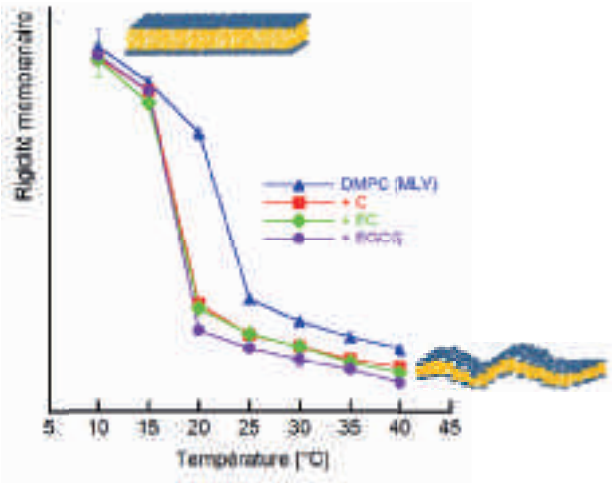


Figure 10. Effet des tanins sur la fluidité membranaire.

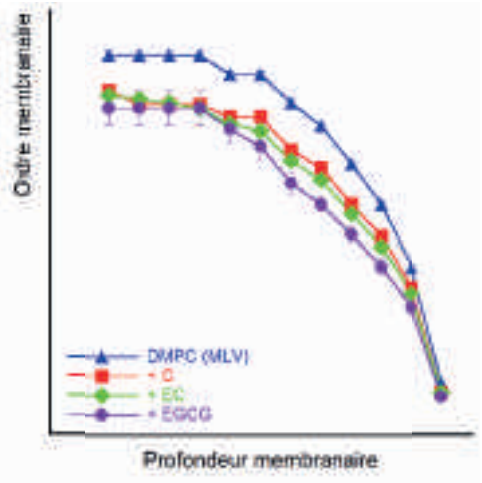


Figure 11. Effet des tanins sur la dynamique des chaînes carbonées.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats prouve que les tanins du vin interagissent avec les lipides des membranes buccales et que de ce fait les interactions tanins-lipides vont jouer un rôle dans la perception gustative d'un vin de deux façons possibles. D'une part, les lipides entrent en compétition avec les protéines de la salive en termes d'affinité pour les tanins et par conséquent vont jouer le rôle de modérateur de l'astringence. D'autre part, les tanins, en agissant comme fluidifiant des membranes lipidiques, siège des récepteurs gustatifs, sont susceptibles de moduler l'interaction de ces récepteurs avec les molécules sapides et donc de transformer la réponse au goût du vin.

A l'issue de ces conclusions, il serait désormais intéressant d'étudier l'effet de la nature des lipides (saturés ou insaturés) sur les interactions tanins-lipides. En effet, la composition des membranes buccales reflète le régime alimentaire : un régime alimentaire riche en acides gras essentiels va enrichir les membranes buccales en acides gras polyinsaturés (McMurchie et al.,

1984 ; Connor et al., 2000). On peut donc se demander comment va évoluer le goût d'un vin selon que l'on consomme du fromage riche en acides gras saturés ou un foie gras riche en acides gras insaturés ? Pour aller plus loin, l'analyse sensorielle pourra être explorée pour savoir s'il existe une corrélation entre ses résultats et ceux de chimie moléculaire.

Dans le cadre des accords mets-vins, un deuxième aspect pourrait être abordé en étudiant l'effet des tanins sur des gouttelettes lipidiques (fig.12), forme sous laquelle se trouvent majoritairement les lipides dans les aliments. A l'heure actuelle, le modèle d'une émulsion[2] lipidique de type huile dans l'eau semble prometteur au vu des premiers résultats obtenus en RMN.

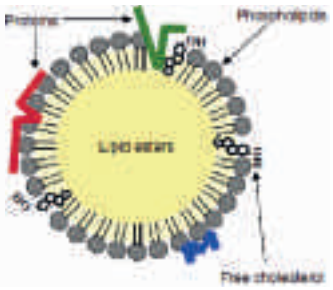


Figure 12. Architecture d'une gouttelette lipidique constituée d'un cœur hydrophobe recouvert en surface d'une monocouche de phospholipides (Fujimoto et al., 2008).

RÉFÉRENCES

Cala, O., Dufourc, E. J., Fouquet, E., Manigand, C., Laguerre, M., Pianet, I. (2012). The colloidal state of tannins impacts the nature of their interaction with proteins: the case of salivary proline-rich protein/procyanidins binding. *Langmuir* 28, 17410-17418.

Connor, S. L., Zhu, N., Anderson, G. J., Hamill, D., Jaffe, E., Carlson, J. Connor, W. E. (2000) Cheek cell phospholipids in human infants: a marker of docosahexaenoic and arachidonic acids in the diet, plasma, and red blood cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 21-27.

Davis, J. H. (1979). Deuterium magnetic-resonance study of the gel and liquid-crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophys.* J. 27 339-358.

Diaz-del Consuelo, I., Jacques, Y., Pizzolato, G.-P., Guy, R. H., Falson, F. (2005). Comparison of the lipid composition of porcine buccal and esophageal permeability barriers. *Arch. Oral Biol.* 50, 981-987.

Dufourc, E. J. (2008). Sterols and membrane dynamic. *J. Chem. Biol.* 1, 63-77.

Fabre, S., Pinaud, N., Fouquet, E., Pianet, I. (2010). Colloidal behavior of wine galloylated tannins. *Comptes Rendus Chimie* 13, 561-565.

Fujimoto, T., Ohsaki, Y.,·Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell Biol.* 130, 263-279.

[2] Dispersion sous forme de gouttelettes, d'un liquide dans un autre dans lequel il n'est pas miscible.

Ganem-Quintanar, A., Falson-Rieg, F., Buri, P. (1997). Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 44, 107-120.

Hashimoto, T., Kumazawa, S., Nanjo, F., Hara, Y., Nakayama, T. (1999). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 63, 2252-2255.

Kajiya, K., Kumazama, S., Nakayama, T. (2001). Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 65, 2638-2643.

Kajiya, K., Kumazama, S., Nakayama, T. (2002). Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 66, 2330-2335.

Loudet, C., Diller, A., Grélard, A., Oda, R., Dufourc, E. J. (2010). Biphenyl phosphatidylcholine: a promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields. *Progress in Lipid Research* 49, 289-297.

McMurchie, E. J., Margetts, B. M., Beilin, L. J., Croft, K. D., Vandongen, R., Armstrong, B. K. (1984) Dietary-induced changes in the fatty acid composition of human cheek cell phospholipids: correlation with changes in the dietary poly-unsaturated saturated fat ratio. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 975-980.

Pianet, I., André, Y., Ducasse, M.-A., Tarascou I., Lartigue, J.-C., Pinaud, N., Fouquet, E., Dufourc, E. J., Laguerre, M. (2008). Modeling procyanidin self-association processes and understanding their micellar organization: a study by diffusion NMR and molecular mechanics. *Langmuir* 24, 11027-11035.

Pietzsch, J. (2004). Mind the membrane, in *Horizon Symposia:* a living frontier - exploring the dynamics of the cell membrane.

Quideau, S., Duffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 586-62

Ramstad, T., Hadden, C. E., Martin, G. E., Speaker, S. M., Teagarden, D. L., Thamann, T. J. (2005). Determination by NMR of the binding constant for the molecular complex between alprostadil and ±-cyclodextrin: Implications for a freeze-dried formulation. *Int. J. Pharmaceut.* 296, 55-63.

Seelig, J. (1977). Deuterium magnetic resonance - theory and application to lipid-membranes, *Quart. Rev. Biophys.* 10, 353-418.

Squier, C. A., Cox, P., Wertz, P.W. (1991). Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. *J. Invest. Dermatol.* 96, 123-126.

Thompson, I. O. C., van der Bijl, P., van Wyk, C. W., van Eyk, A. D. (2001). A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Arch. Oral Biol.* 46, 1091-1098.

Uekusa, M., Kamihira, M., Nakayama, T. (2007). Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes as determined by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9986-9992.

ÉTUDE QUALITÉ BOUCHON
PÉRIODE ANALYSÉE JANVIER 2008 - DÉCEMBRE 2011

Eva Mondini
CIVB - service technique
1 cours du XXX juillet - 33075 Bordeaux cedex

eva.mondini@vins-bordeaux.fr

Dans le cadre des prélèvements effectués pour le Suivi Aval de la Qualité (SAQ), contrôle qualité régi par accord interprofessionnel étendu par les pouvoirs publics, nous nous sommes intéressés aux différentes qualités de bouchage ainsi qu'à la problématique de déviation organoleptique ayant pour origine la présence de PCA-PCP dans les bouchons et les vins.

Cette étude n'a pas la prétention d'être représentative. En effet, l'échantillonnage se limite à certains circuits de distribution en France (GMS, cavistes et grossistes) ainsi qu'aux principaux marchés exports. Néanmoins, elle propose, sur une période donnée, une photographie de la réalité des qualités de bouchage trouvées et une analyse des vins bouchonnés.

Cette étude fait suite à celle réalisée sur la période novembre 2004 - novembre 2007.

Sur la période étudiée, 9143 échantillons ont été prélevés au cours des 46 collectes dont :
- 30 collectes en France,
- 16 collectes à l'étranger (3 Belgique, 2 Grande Bretagne, 2 Pays-Bas, 2 Suisse, 2 Hong Kong, 1 Corée du Sud, 1 Allemagne, 1 Danemark, 1 Chine, 1 Etats Unis).

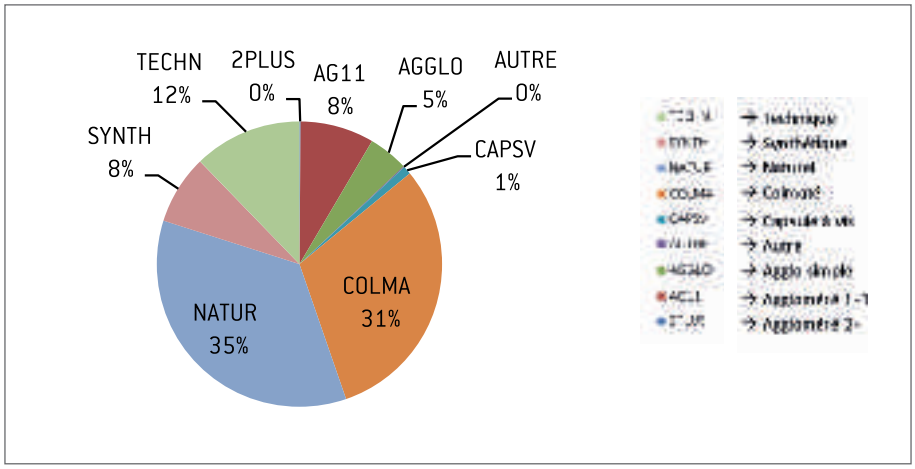
Lors des contrôles SAQ, seuls les échantillons jugés bouchonné/moisi par les dégustateurs lors de l'examen organoleptique sont analysés pour évaluer les teneurs en chloroanisoles et chlorophénols. Ainsi, sont analysés les TCA[1], les TeCA[2], les TBA[3] ainsi que l'ensemble de leurs précurseurs dans le vin et le bouchon.

[1] Trichloroanisole
[2] Tétrachloroanisole
[3] Tribromoanisole

1- ETUDE SUR L'ENSEMBLE DES VINS DÉGUSTÉS

a) Catégorie de bouchon

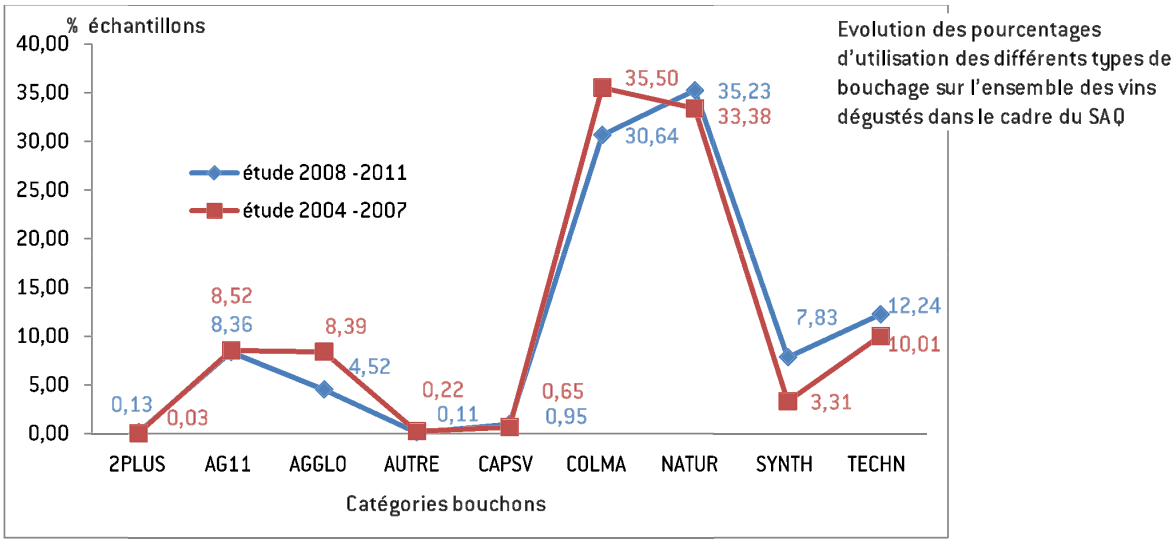
Le graphique ci-dessous présente les différents types de bouchage de l'ensemble des échantillons prélevés :



Répartition des différentes catégories de bouchons utilisées pour la période de collecte SAQ de 2008-2011

Deux grandes catégories représentent 2/3 des bouchages : les naturels (35.2 %) et les colmatés (30.6 %). Les bouchages techniques représentent plus de 10 % des bouchages (12.2 %).

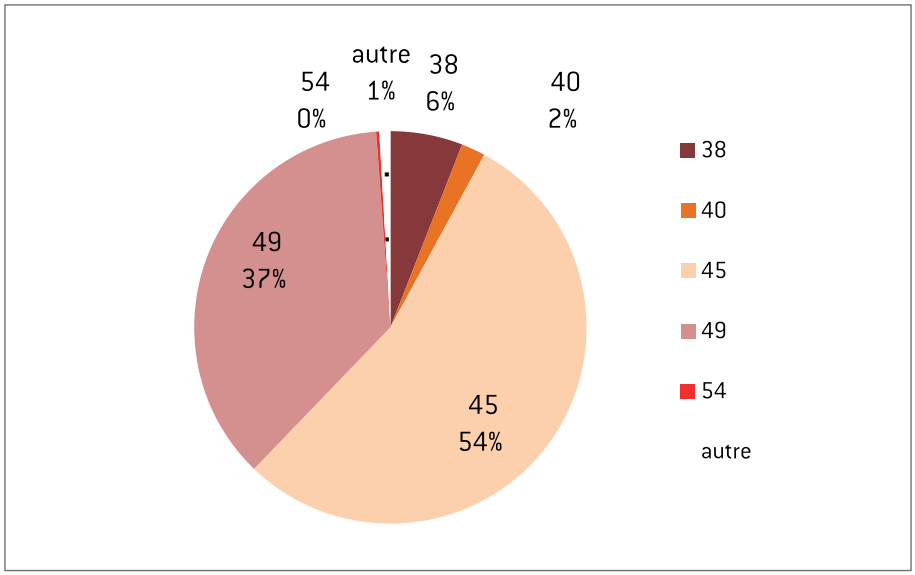
Le comparatif par rapport à la période 2004-2007 précédente permet de mettre en évidence des évolutions des utilisations des différents types de bouchage



Ainsi le pourcentage d'aggloméré a sensiblement diminué (- 4 points), tout comme le colmaté (-5 points) en faveur notamment du synthétique (+4 points) et du technique (+ 2 points). Le naturel reste stable voire augmente légèrement.

b) Dimension de bouchons

En ce qui concerne les dimensions de bouchons, le graphique suivant montre que les plus couramment utilisés sont les 45 et 49 mm :

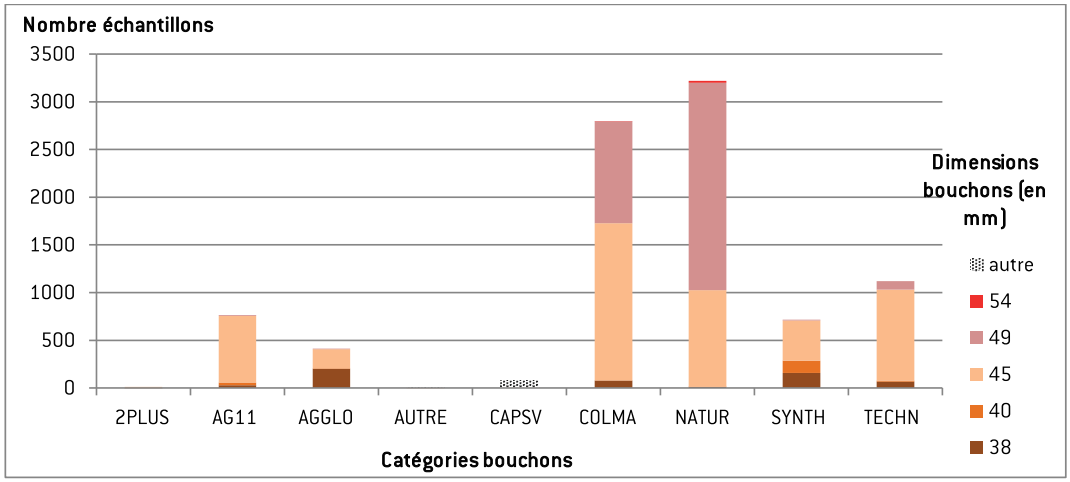


Répartition des différentes dimensions de bouchons utilisées
pour la période de collecte du SAQ de 2008-2011

Les proportions de bouchons de 54, 40 mm ou autres dimensions sont anecdotiques. Une petite proportion de 38mm reste notable et représente 6 % de la distribution totale

c) Catégorie et dimension de bouchons

Les bouchons de 38 mm sont principalement les agglomérés pour un total de 2.3 %



Répartition des différents types de bouchage (catégorie et dimensions de bouchons)
sur la période de collecte du SAQ de 2008-2011

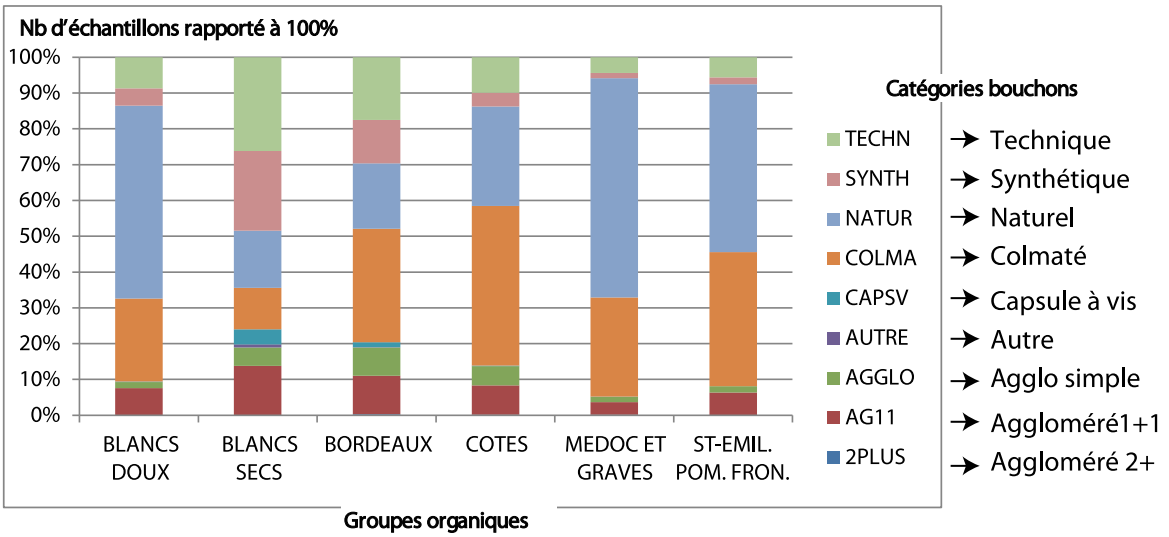
d) Utilisation des différents types de bouchons par groupe organique

Le graphique ci-dessous montre que les groupes organiques « Blancs secs » et « Bordeaux » utilisent une forte proportion de bouchons techniques (respectivement 26 % et 17 %) et synthétiques (respectivement 22 % et 12 %).

Il montre également la prédominance de l'utilisation des bouchons naturels pour les groupes organiques « blancs doux », « médoc et graves » et « libournais » : respectivement 54 %, 61 % et 47 %.

L'utilisation des bouchons colmatés est majoritaire pour le groupe organique « cotes » car ce type de bouchon représente près de 45 % de cette catégorie de vin.

Enfin les bouchons de type agglomérés sont essentiellement retrouvés dans les groupes organiques « Blancs secs » et « Bordeaux » (19 %) et quelques 14 % pour le groupe des « Côtes ».

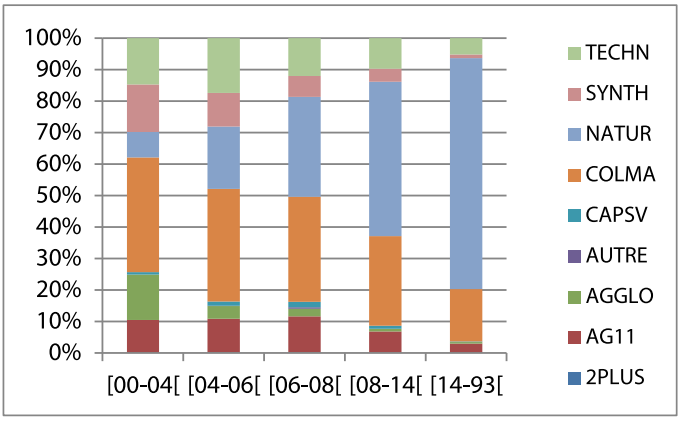


Description des différentes catégories de bouchage utilisées selon les groupes organiques sur la période de collecte du SAQ de 2008-2011

e) Utilisation des différents types de bouchons par tranche de prix

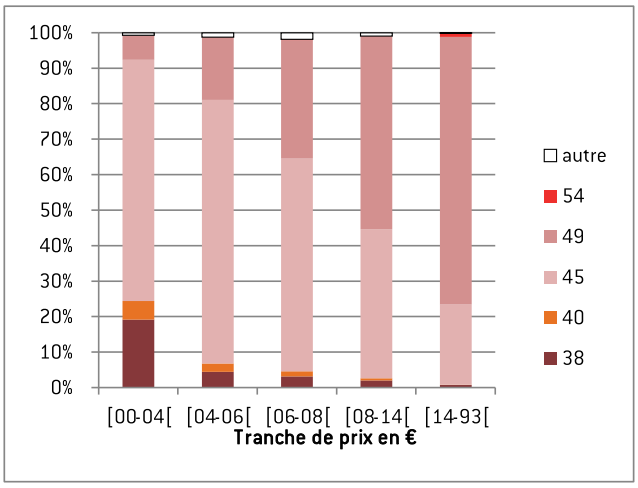
Les tranches de prix choisies permettent d'avoir une répartition homogène de la population des échantillons.

Conformément à ce que l'on pouvait attendre la proportion de bouchons naturels augmente avec le prix de vente de la bouteille.



Répartition des différentes catégories de bouchon en fonction du prix des échantillons prélevés

Avec l'augmentation de prix de la bouteille, on bascule progressivement de 45 vers 49mm.



Répartition des différentes dimensions de bouchon en fonction du prix des échantillons prélevés

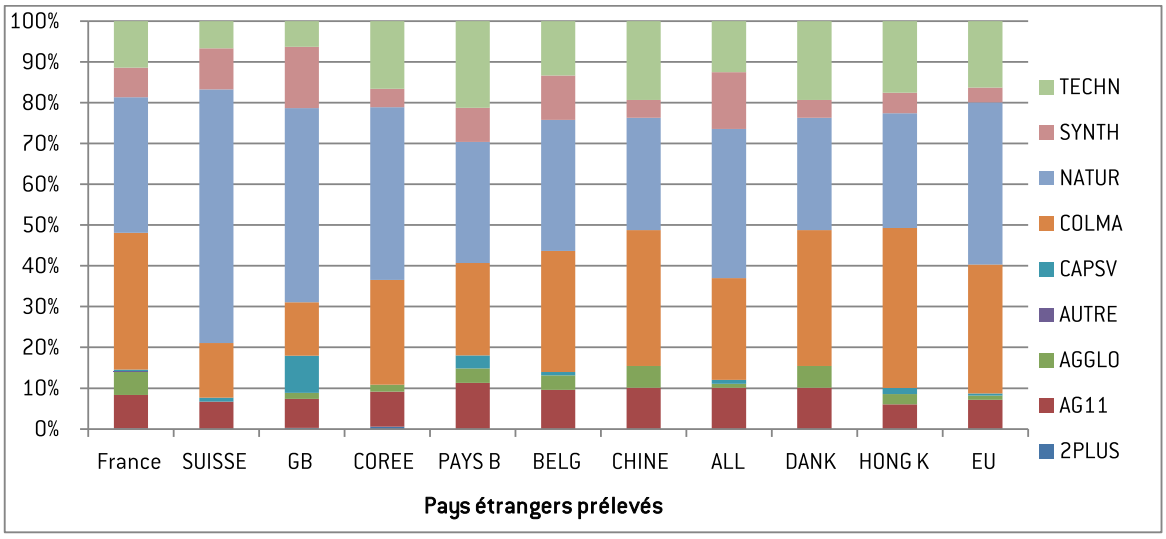
f) Utilisation des différents types de bouchons par pays

A noter l'utilisation de plus de 15 % de technique pour les pays comme les Pays-Bas (20 %), le Danemark, la Chine, Hong Kong, la Corée du Sud et les Etats Unis.

Une proportion importante de synthétiques, essentiellement en Grande Bretagne et en Allemagne.

L'utilisation majoritaire de bouchons naturels en Suisse (près de 60 %), en Grande Bretagne et aux Etats Unis.

Une part importante de capsule à vis pour le marché de la Grande Bretagne.



Description des différentes catégories de bouchage selon les pays étrangers prélevés dans le cadre du SAQ de 2008-2011

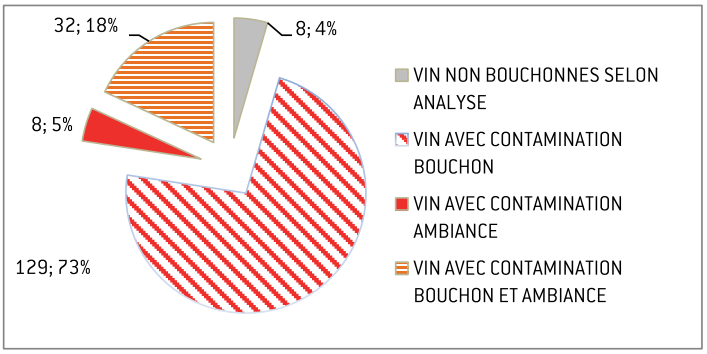
2) ETUDE SUR LES VINS BOUCHONNÉS/MOISIS

a) Variations de Db (vins qualifiés de « bouchonné/moisi » par les dégustateurs du SAQ)

La notation des dégustations SAQ permet la classification des vins en 4 grandes catégories : catégorie A (vins « excellents »), catégorie B (vins « conformes »), catégorie C (vins « passables »), catégorie D (vins « non conformes »). Parmi les vins notés en D sont qualifiés de Db, les vins en D pour lesquels les dégustateurs ont détecté des défauts de bouchons (moisi, poussiéreux, terreux).

2 % des vins dégustés sur la période ont été jugés altérés par un goût de bouchon.

Ces vins qualifiés de bouchonné ont fait l'objet d'analyses complémentaires dont les résultats sont présentés ci-dessous et qui permettent notamment de mettre en évidence les sources de contaminations.



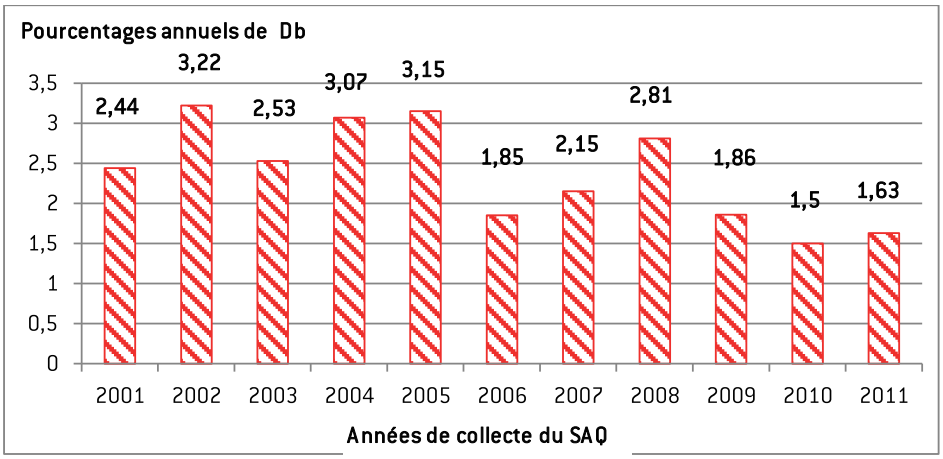
L'étude des échantillons bouchonnés (Db) révèle que dans plus de 95 % des cas, les motifs bouchonné/moisi trouvés par les dégustateurs ont été confirmés par les analyses de laboratoire.

Répartition des résultats d'analyse (en nombre ; pourcentage) pour les vins notés en Db dans le cadre des dégustations du SAQ de 2008-2011

Pour la plupart des échantillons bouchonnés / moisis analysés, la cause de défectuosité est principalement liée au bouchon : 73 %. 18 % sont liés à une contamination mixte bouchon et ambiance. Peu de problèmes de pollution environnementale ont été détectés (5 %).

A noter que les seuils de perception de TCA et de TeCA dans les vins sont communément admis à 3 ng/l dans le vin blanc et 5ng/l dans le vin rouge pour le TCA et 15 ng/l pour le TeCA.

L'évolution de ces vins classés en Db par les dégustateurs depuis 2001 est la suivante :



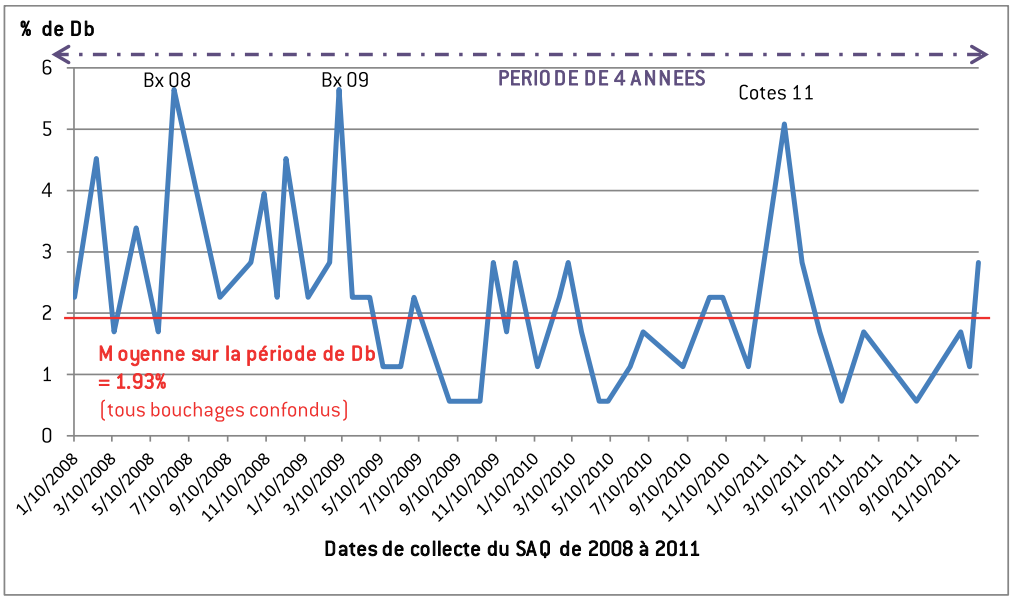
Evolution des pourcentages annuels de Db lors des 10 dernières années de collectes du SAQ

La tendance générale est à la diminution du taux moyen de Db par année de collecte SAQ, tout bouchage confondu.

Un maximum de 3.22 % a été atteint en 2002, un minimum de 1,5 % en 2010.

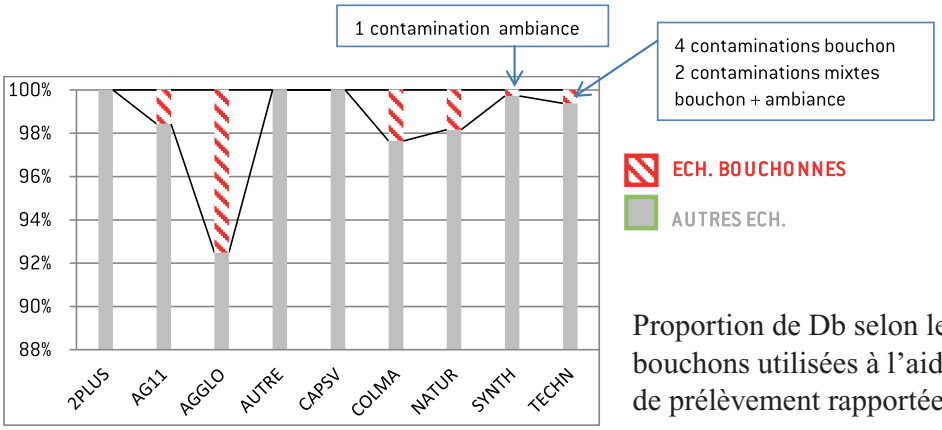
A noter que depuis 2001, un retour régulier des résultats est fait vers les fournisseurs de bouchons concernés qui ont mis en œuvre un certain nombre d'indicateur de leur process contribuant également à cette évolution positive.

Si le taux moyen de Db tend à diminuer, le graphique suivant montre les fluctuations selon les dégustations tout au long de la dernière période étudiée.



Fluctuations des pourcentages moyens de Db lors de chacune des collectes du SAQ sur la période de 2008 à 2011

Le taux de Db varie également fortement en fonction du type de bouchon utilisé comme le montre le graphique ci-dessous :



Proportion de Db selon les catégories de bouchons utilisées à l'aide d'une échelle de prélèvement rapportée à 100%

Ainsi on constate, que la proportion de Db pour les agglomérés simples dépasse largement la moyenne de Db de la période (1.93 %) en atteignant presque 7 % de Db. Les colmatés sont également légèrement supérieurs à la moyenne alors que les naturels frôlent cette moyenne.

L'importance du type de bouchon dans le pourcentage observé de Db peut également être abordée par le calcul suivant.

Le tableau ci-contre compare les pourcentages de Db moyens annuels pour l'ensemble des bouchages aux pourcentages de Db moyens annuels recalculés en écartant les bouchages synthétiques, techniques et capsules à vis.

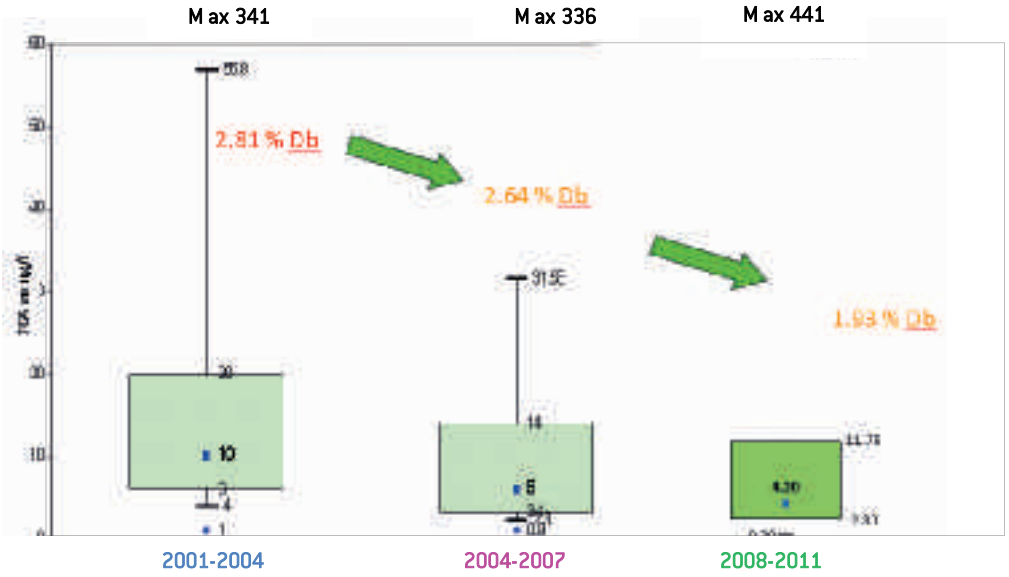
Année de collecte	% Db AVEC bouchons synthétiques, techniques et capsules à vis	% Db SANS bouchons synthétiques, techniques et capsules à vis
2008	2.81	3.00
2009	1.86	2.11
2010	1.50	2.29
2011	1.63	2.59

En conclusion, le pourcentage de Db depuis plus de 10 ans a tendance à diminuer avec certainement pour cause les efforts apportés sur les qualités de bouchage mais du fait également de l'évolution du choix du type de bouchons avec le développement des bouchons techniques et synthétiques notamment.

b) Variations du dosage de TCA vin et bouchon

• TCA VIN DANS LE TEMPS

Les diagrammes ci-après représentent les ventilations, sous forme de quartiles[4], des taux de TCA dosés dans les vins, au cours des trois dernières périodes d'étude du SAQ :



Evolution des répartitions des taux de TCA dans le vin (en ng/l)
au cours des trois dernières périodes d'étude du SAQ

Le taux d'échantillons bouchonnés s'est sensiblement amélioré passant de 2.81 % (période 2001-2004) à 2.64 % (période 2004-2007), et enfin 2.47 % (période 2008-2011).

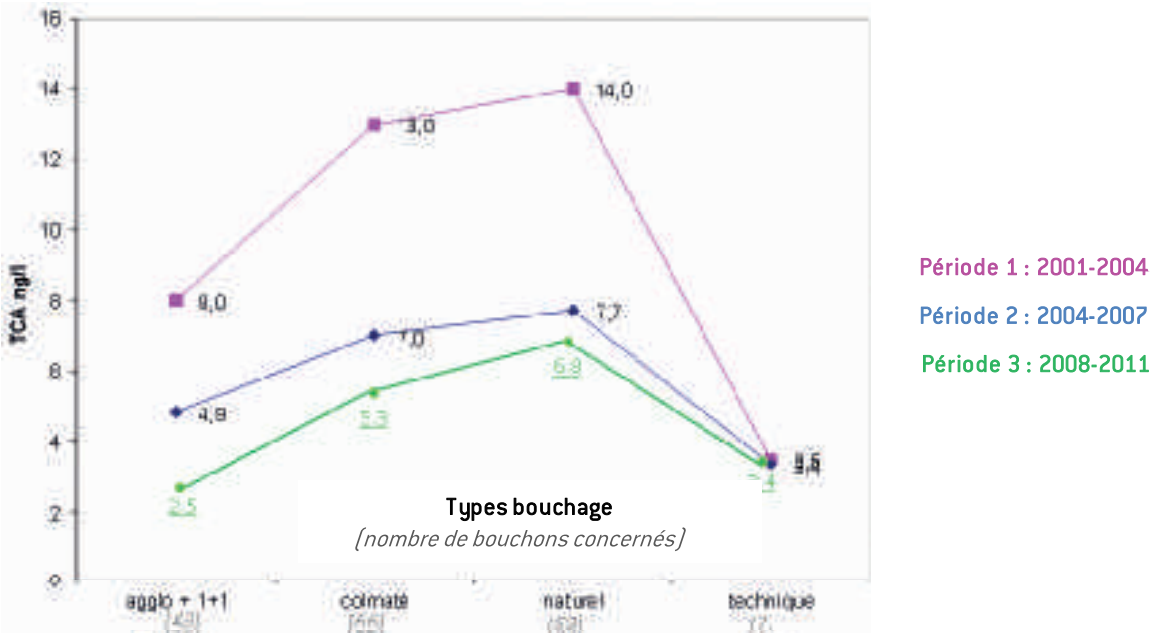
La valeur médiane a progressivement diminué passant de 10 à 6 et finalement à 4 ng/l sur la dernière période 2008-2011.

[4] Un quartile est chacune des 3 valeurs qui divisent les données triées en 4 parts égales, de sorte que chaque partie représente 1/4 de l'échantillon de population. Le 1er quartile sépare les 25 % inférieurs des données, le 2e quartile est la médiane de la série, le 3e quartile sépare les 75 % inférieurs des données.

Les valeurs de TCA semblent de moins en moins dispersées, même si la valeur maximale obtenue sur la période 2008-2011 a atteint plus de 400ng/l.

Alors même que les dégustateurs sont de plus en plus sensibles aux défauts de bouchons (médiane des taux de TCA vin en diminution), le pourcentage de vins bouchonnés diminue, du fait notamment de l'amélioration qualitative des matières sèches utilisées par les bouchonniers.

• TCA VIN DANS LE TEMPS ET SELON TYPES DE BOUCHAGES



Comparaison des médianes de TCA dans le vin (en ng/l)
selon les trois périodes d'études et en fonction des types de bouchage utilisés

On constate, au sein du diagramme ci-dessus, une forte disparité entre catégorie de bouchage des valeurs de TCA trouvés dans les vins bouchonnés/moisis.

Sur les trois périodes d'étude, les bouchages ayant les taux de TCA les plus importants sont les naturels puis les colmatés pour lesquels les médianes avoisinent en 2008-2011 respectivement 6.8ng/l et 5.3ng/l.

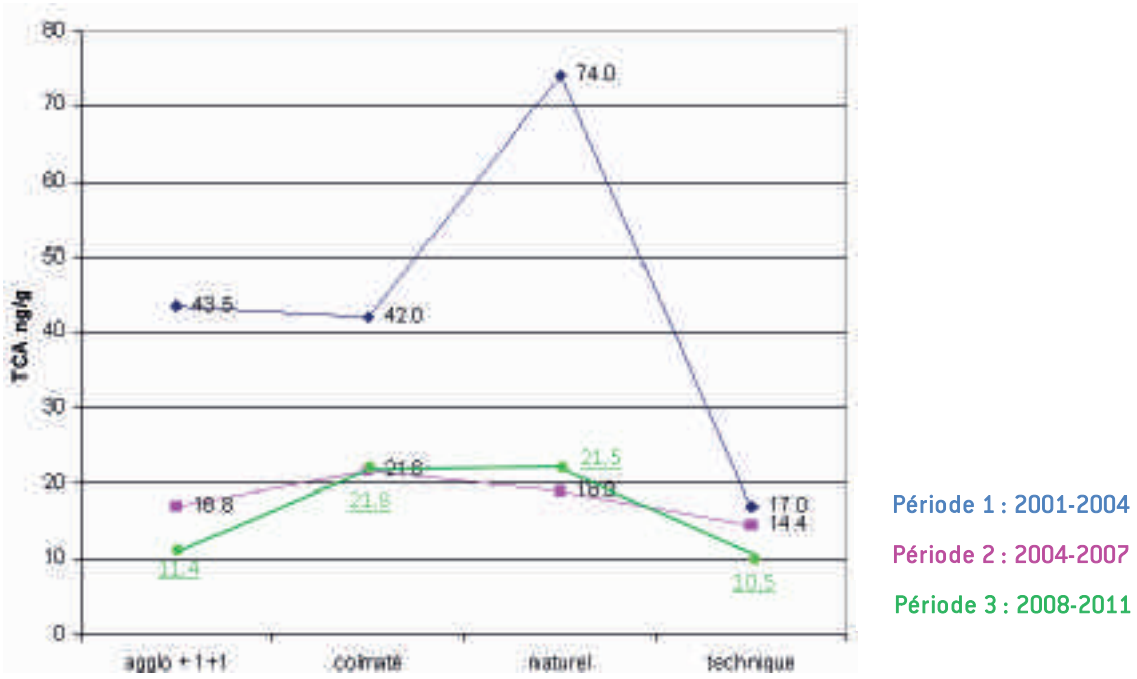
Parmi les lièges, les agglomérés possèdent des médianes plus raisonnables. Ces taux de TCA dans le vin doivent en effet prendre en compte l'utilisation de bouchons, principalement des vins à rotation rapide pour lesquels le temps de migration des TCA du bouchon vers le vin est plus court.

D'autre part, comme démontré précédemment dans le rapport, les agglomérés sont fortement utilisés par le groupe organique « blancs secs ». Sachant que le seuil de détection pour les vins blancs est de 3 ng/l, les résultats semblent cohérents et les taux de TCA plus faiblement dosés dans les vins ont pu être détectés par les dégustateurs qui ont majoritairement attribué des Db à des échantillons avec agglomérés.

Les valeurs de TCA des bouchons techniques restent très stables. Le nombre de vins qualifiés de bouchonnés ayant fait l'objet d'analyse sur la période 2008-2011 étant très faible (7 échantillons), il est difficile de pouvoir tirer plus de conclusion.

D'une façon générale, la baisse des valeurs de TCA trouvées dans les vins se poursuit comme le montre la comparaison des résultats (2007-2011) avec les études précédentes (2001-2004 / 2004-2007).

• TCA BOUCHON DANS LE TEMPS ET SELON TYPES DE BOUCHAGES



Comparaison des médianes de TCA dans les bouchons (en ng/g)
selon les trois périodes d'études et en fonction des types de bouchage utilisés

L'analyse de l'évolution du taux de TCA dans le bouchon laisse apparaître une stabilisation avec les résultats obtenus lors des périodes d'étude précédentes.

Sur la dernière période étudiée, le taux de TCA bouchon moyen est le plus fort pour les bouchages de type colmaté (21.8 ng/g), très proche des résultats des bouchons naturels (21.5 ng/g) et enfin l'aggloméré est à 11.4 ng/g.

Les bouchages techniques conservent des médianes pratiquement inchangées.

EN RÉSUMÉ :

- La comparaison des périodes d'étude a permis d'observer une augmentation importante des bouchages synthétiques (passant de 0.6 % en 2001-2004, à 3.3 % en 2004-2007 et enfin à 7.83 % de l'ensemble des échantillons en 2008-2011).

- On relève une tendance à la diminution des taux de vins qualifiés de bouchonnés par les dégustateurs.

- Les analyses réalisées sur les vins en D (avec défaut) et vin D bouchonnés confirment les déviations organoleptiques observées et mettent en évidence une contamination majoritairement due aux bouchons

- Les analyses révèlent une nette baisse des valeurs de TCA trouvées dans les vins par rapport aux études précédentes, pour les différents types de bouchages (aggloméré, naturel et colmaté).

- Le suivi des taux de TCA dans le bouchon semble révéler une stabilisation au cours des dix dernières années.

- Il reste encore quelque 1.93 % d'échantillons bouchonnés dans le cadre des contrôles SAQ.

OBSERVATOIRE DES MATIÈRES SÈCHES : BILAN INTERMÉDIAIRE APRÈS 2 ANS D'EXPÉRIMENTATION

Catherine CHASSAGNOU, Jean-Christophe CRACHEREAU, Véronique RAFFESTIN-TORT

Chambre d'Agriculture de la Gironde, Service Vigne et Vin, Vinopôle Bordeaux-Aquitaine

39 rue Michel Montaigne - CS20115 - 33295 BLANQUEFORT CEDEX

1. INTRODUCTION

La mise en bouteilles et les propriétés des obturateurs utilisés sont 2 éléments clés permettant de préserver toutes les qualités d'un vin au cours de sa conservation en bouteilles.

Bien que le bouchage classique en liège soit encore majoritaire dans le bordelais, les nouveaux types de bouchons issus de procédés industriels (techniques, synthétiques, capsule à vis…) sont en plein développement.

Afin de répondre au manque de références sur ces dernières générations de bouchons mis sur le marché, en particulier vis-à-vis des transferts d'oxygène inhérents à chaque type d'obturateur, l'observatoire des matières sèches a été mis en place en 2010 par le CIVB et le Service Vigne et Vin de la Chambre d'Agriculture de la Gironde. L'objectif de ce projet est triple :

- acquérir des données techniques exhaustives et représentatives des types d'obturateurs commercialisés au niveau de leurs performances d'obturation,
- garantir la protection de la typicité des vins de Bordeaux en lien plus particulièrement avec les transferts d'oxygène,
- suivre l'évolution du marché des bouchons.

Ce projet a été mis en place sur la période 2010-2014. Il est suivi par un comité de pilotage réunissant les professionnels de la filière vitivinicole. Les résultats intermédiaires (2010-2012) sont présentés dans cet article.

2. MISE EN PLACE DES ESSAIS ET OBTURATEURS CHOISIS

Dans le cadre de ce projet, 2 volets ont été mis en place. La **première phase** a permis de caractériser les performances (dont la perméabilité à l'O_2) de 50 différents obturateurs, représentatifs de 80 % du marché bordelais.

La **seconde phase** a pour objectif de déterminer l'influence de l'obturation sur l'évolution d'un vin. L'étude porte sur 24 modalités parmi celles étudiées lors de la première phase (Tableau 1) et suivies pendant 4 ans (2010-2014).

L'approche retenue permet d'être représentative des conditions réelles du marché. Les échantillons ont été prélevés directement sur les sites d'embouteillage auprès du négoce et de différents viticulteurs et n'ont pas été fournis par les bouchonniers.

Le vin embouteillé est un Bordeaux rouge millésime 2008. La mise en bouteilles a été effectuée sur le site de conditionnement d'une société de négoce en février 2010. Les conditions sont ainsi maîtrisées et identiques pour tous les lots de bouchons. Les bouteilles sont conservées en position couchée dans un local exempt d'aérocontamination.

Les bouteilles utilisées sont de type bordelaise répondant à la norme verrière NF EN 127-26. Le diamètre des goulots des bouteilles a été vérifié selon la norme ISO 2859-1, et ceci pour chaque numéro de moule. Les bouteilles non conformes (20 % des 276 bouteilles testées) ont été écartées de l'étude.

Types d'obturateurs	1ère phase	2ème phase
Naturels (45 et 49 mm)	11	4
Synthétiques (38, 40 et 45 mm)	9	5
Techniques 1+1 (40 et 45 mm)	6	3
Technologiques micro-agglomérés (38, 45 et 49 mm)	4	3
Colmatés (45 et 49 mm)	12	4
Agglomérés (38 et 45 mm)	5	2
Capsules à vis	3	3

Tableau 1 : Nombre de modalités de l'étude (1ère phase : caractérisation des performances des obturateurs et 2ème phase : influence de l'obturation sur l'évolution d'un vin)

3. PROTOCOLES DE SUIVI

Les modalités étudiées au cours de la 2ème phase ont été soumises à un protocole analytique avant et après embouteillage (Tableau 2).

	Avant mise en bouteilles (1ère phase)	Après mise en bouteilles (2ème phase)
Suivi de l'oxygène	Mesures d'O_2 sur bouteilles vides inertées à l'azote (40 modalités durant 3 mois)	Mesures d'O_2 dans l'espace de tête et de l'oxygène dissous dans le vin (24 modalités durant 3 mois)
Analyses bouchons/bouchage	Contrôles physiques/mécaniques avant mise + haloanisoles/halophénols sur les lots de bouchons	Contrôles bouchage à 12, 24, 36 et 48 mois
Analyses œnologiques	Caractérisation du vin de base	Suivis SO_2 L, SO_2 T, CO_2 et étude de la couleur (L, a* et b*) à 1, 3, 12, 24, 36 et 48 mois
Dégustations		Analyses sensorielles à 12, 24, 36 et 48 mois

Tableau 2 : Suivis réalisés tout au long de l'étude

4. RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1. Suivi de la perméabilité des obturateurs à l'oxygène

Lors du conditionnement, le vin subit de multiples opérations au cours desquelles de l'oxygène est susceptible de pénétrer dans le vin et d'y être dissous. Par la suite, l'oxygène qui pénètre au travers de l'obturateur joue un rôle très important sur l'évolution du vin (Figure 1).

Une fois l'oxygène prisonnier de la bouteille, le vin va progressivement le consommer. Dans un premier temps, l'oxygène dissous introduit avant et à la mise en bouteilles va réagir. Le plus souvent, le SO_2, protecteur du vin, est le premier touché. Sa baisse entraîne la diminution de son rôle d'antioxydant et d'antiseptique. Puis un équilibre s'établit, en fonction de la perméabilité de l'obturateur, avec des conséquences plus ou moins favorables à la qualité du vin.

Avec une pénétration d'oxygène lente et continue, l'évolution peut être très positive. Mais cette évolution, si elle est trop brutale ou trop intense, peut conduire à un vieillissement prématuré ou à une oxydation dénaturant profondément le vin.

Dans le cadre de cette étude, le matériel utilisé pour les mesures d'O_2 est le système Presens. Cet analyseur, associé à un couple « sonde-senseur », fonctionne sur le principe de la luminescence.

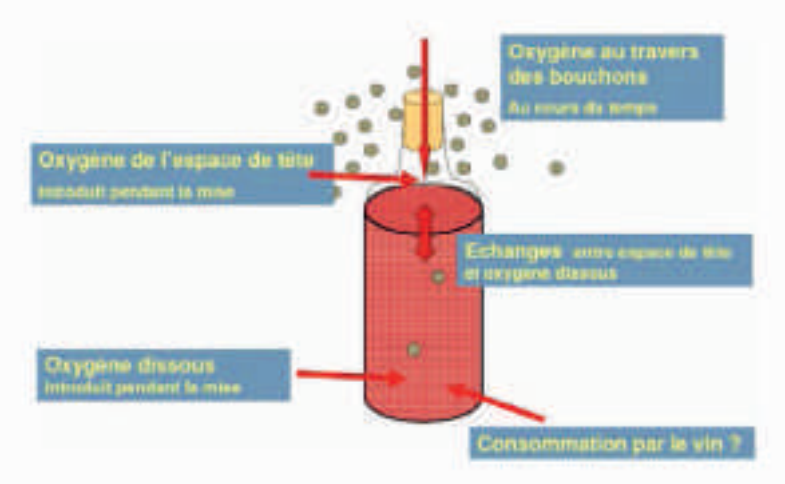


Figure 1 : Voies de pénétration et de consommation de l'oxygène dans le vin embouteillé

4.1.1. Suivi avant mise en bouteilles sur bouteilles inertées (1ère phase)

La pression partielle en O_2 mesurée dans les bouteilles après bouchage (Figure 2) de 40 modalités (8 bouteilles par modalité, préalablement inertées à l'azote) est représentée sur la Figure 3.

Figure 2 : Mesure de l'oxygène sur bouteilles inertées par le système de sonde Presens

On observe rapidement l'effet du bouchon sur la pression partielle en O_2. C'est sa seule perméabilité qui détermine la quantité d'O_2 qui pénètre et sa vitesse de pénétration.

De façon générale, ce sont les bouchons Naturels, Colmatés et Agglomérés qui laissent passer le plus d'oxygène. Viennent ensuite les bouchons Synthétiques, les 1+1, les Capsules et enfin les Technologiques. Ces résultats permettent de distinguer 2 grands types de cinétiques de diffusion.

La cinétique « en 2 temps » : pénétration rapide et régulière dans les 8 premiers jours puis beaucoup plus lente les jours suivants (bouchons Naturels, Colmatés et Agglomérés). La perméabilité plus importante de ces bouchons s'explique par la structure du liège. Le colmatage des lenticelles du bouchon, diminue la perméabilité à l'O_2 des bouchons Colmatés.

La cinétique « constante » : pénétration beaucoup plus lente et constante durant toute la durée des mesures (Capsules à vis, 1+1, Technologiques et Synthétiques).

Ces résultats doivent cependant être relativisés. En effet, les courbes obtenues sont des moyennes de plusieurs obturateurs ce qui lisse les hétérogénéités au sein d'une même classe de bouchons.

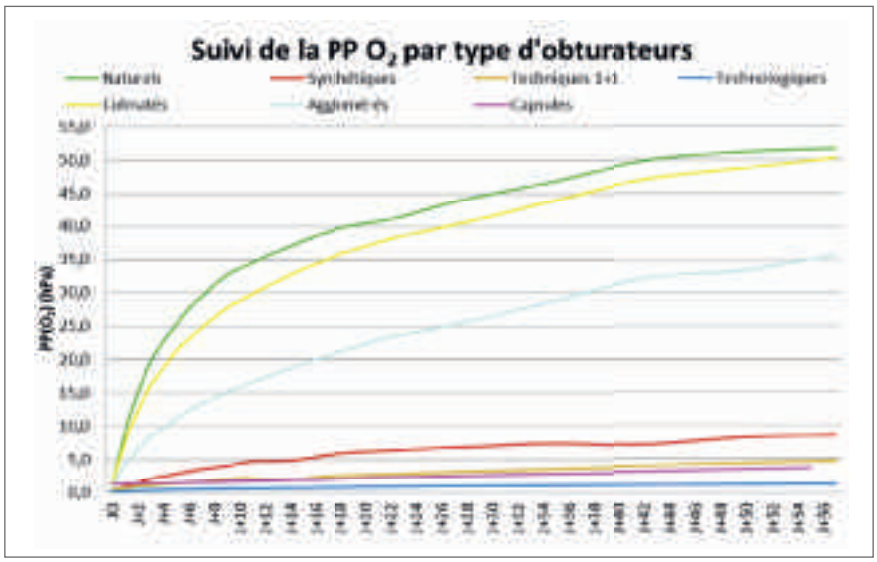


Figure 3 : Evolution de la pression partielle en O_2 (PP O2) par type d'obturateur

La plus grande étanchéité est obtenue par les obturateurs Technologiques micro-agglomérés. L'apport en oxygène à travers le bouchon est dispensé de manière contrôlée et régulière. Cette perméabilité est en outre beaucoup plus homogène, c'est-à-dire équivalente pour tous les bouchons d'un même lot.

A l'opposé, on trouve les bouchons Naturels. Leur perméabilité est dans l'ensemble « assez importante », mais c'est surtout par leur hétérogénéité, entre lots et au sein d'un même lot, qu'ils se distinguent des autres types d'obturateurs (Figure 4). Le choix visuel du bouchon ainsi que sa hauteur influencent fortement la perméabilité.

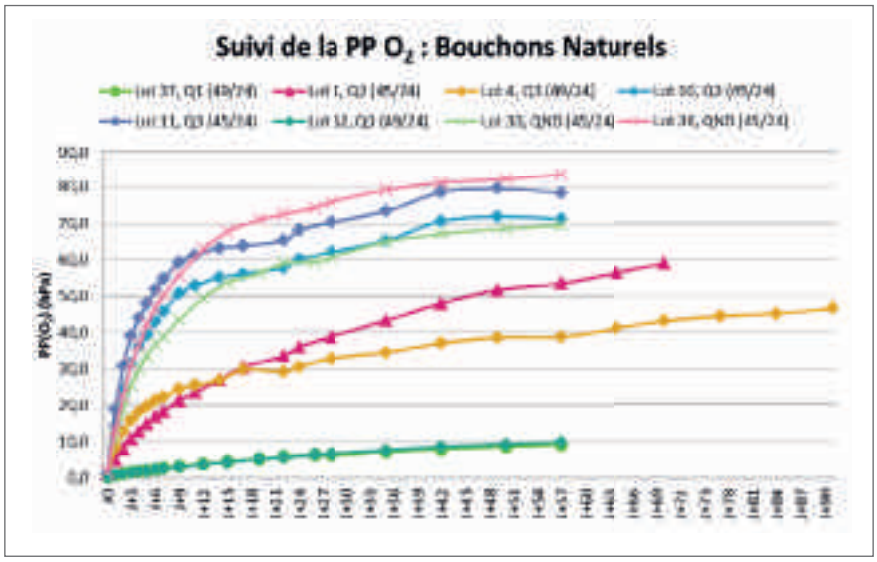


Figure 4 : Evolution de la pression partielle en O_2 (PP O_2) pour les lots de bouchons Naturels

En ce qui concerne les autres types d'obturations, plusieurs éléments sont à retenir. Le colmatage des bouchons Colmatés diminue effectivement la perméabilité de ceux-ci par rapport aux obturateurs Naturels. Cela ne modifie cependant en rien l'hétérogénéité du matériau naturel qu'est le liège. La comparaison des 2 autres types de bouchons Agglomérés (1+1 et Technologiques) par rapport aux Agglomérés traditionnels, révèle une nette diminution de leur perméabilité : diminution de près de 90 % de la perméabilité pour les bouchons Technologiques, un peu moins pour les bouchons 1+1.

4.1.2. Suivi après mise en bouteilles (2ème phase)

La Figure 5 représente l'évolution de la quantité d'O_2 total par type de bouchon après mise en bouteilles. La quantité d'O_2 total comprend la quantité d'O_2 gazeux présent dans l'espace de tête et la quantité d'O_2 dissous présent dans le vin.

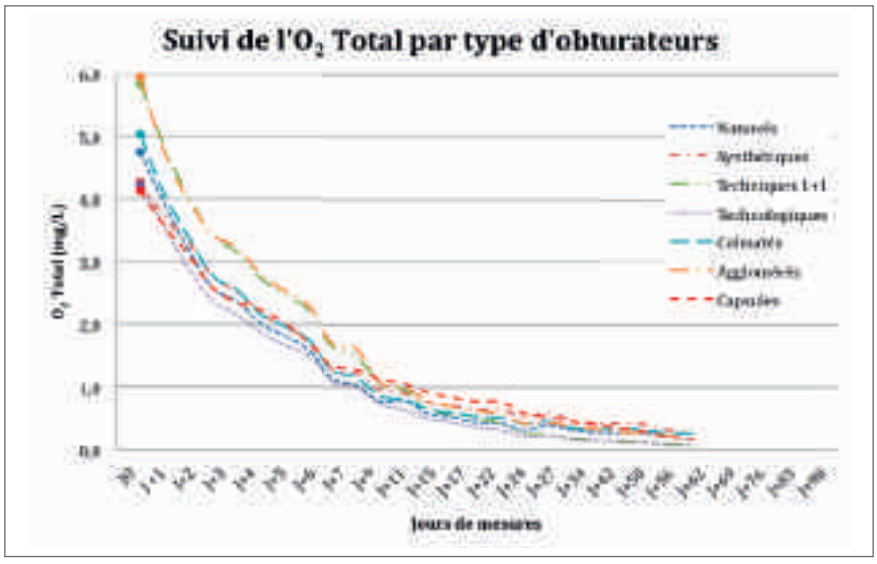


Figure 5 : Evolution de la quantité d'oxygène total après mise en bouteilles (moyennes des différents lots)

On observe que, quelque soit le type de bouchons, la quantité d'O_2 présente dans la bouteille diminue.

Les dosages de SO_2 libre et total réalisés en parallèle de ce suivi oxygène montrent qu'il existe une très bonne corrélation entre la quantité d'O_2 total à la mise en bouteilles et la diminution du SO_2 total sur les 30 jours suivants (à raison d'1 mg d'O_2 pour 4 mg de SO_2). Au-delà d'un mois, la perte en SO_2 est beaucoup moins significative. Les obturateurs qui sont le plus perméables présentent la plus forte perte en SO_2 les 2ème et 3ème mois (Naturels et Agglomérés).

4.2. Analyses bouchons/bouchage

4.2.1. Analyses sur les bouchons avant mise en bouteilles (1ère phase)

Une série de tests (dimensions, humidité, forces d'extraction, poussières et pression d'étanchéité liquide) basés sur la norme NF B 57 101 a été effectuée sur les lots de bouchons présentés dans le Tableau 1. Des analyses complémentaires à la norme ont également été mises en œuvre (absorption, masse volumique, examen sensoriel…).

De manière générale, les paramètres physiques et mécaniques testés donnent des résultats conformes, que ce soit sur bouchons Naturels, Colmatés ou alternatifs au liège. Toutefois, 2 points méritent d'être signalés :

Cas particulier du choix visuel :

Il existe un décalage fréquent entre le choix visuel annoncé par le fournisseur et le choix réel vendu. Le Tableau 3 résume cette constatation.

Ainsi, on peut voir qu'au sein d'une même qualité, on retrouve des qualités inférieures et supérieures en distribution à peu près gaussiennes sur les 3 premiers lots et des décalages parfois beaucoup plus importants comme sur le lot 53.

Lots	Qualité annoncée	Qualité effective
Lot 1	2	15 % de 1ère / 60 % de 2nde / 25 % de 3ème
Lot 4	3	20 % de 1ère / 50 % de 3ème / 30 % de 4ème
Lot 10	3	8 % de 2nde / 66 % de 3ème / 26 % de 4ème
Lot 11	3	77 % de 3ème / 23 % de 4ème
Lot 30	Qualité non définie	2/3 de 2nde / 1/3 de 3ème
Lot 32	3	15 % de 2nde / 85 % de 3ème
Lot 36	Qualité non définie	40 % de 3ème / 60 % de 4ème
Lot 37	1	50 % de 1ère / 50 % de 2nde
Lot 44	1	50 % de Sup / 50 % de 1ère
Lot 53	2	50 % de 3ème / 50 % de 4ème

Tableau 3 : Qualité annoncée et effective des lots de bouchons Naturels

Cas particulier des haloanisoles :

10 lots de bouchons Naturels, 12 lots de Colmatés, 5 lots d'Agglomérés, 6 lots de bouchons 1+1 et 5 lots de Technologiques micro-agglomérés ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC/MS) afin de doser les haloanisoles relargables en ng/L. En parallèle, ces mêmes lots de bouchons ont été analysés par GC/MS suite à une extraction totale afin de doser les halophénols et haloanisoles totaux en ng/g.

La Figure 6 reprend les lots pour lesquels des concentrations en 2,4,6-trichloroanisole (TCA, molécule responsable du « goût de bouchon ») ont été dosées à des teneurs supérieures aux spécifications suivantes :

TCA total en ng/g	TCA relargable en ng/L
Rouge : > 5 ng/g = risque élevé	Rouge : > 2 ng/L = risque élevé
Jaune : < 5 et > 2 ng/g = risque moyen	Jaune : < 2 et > 1 ng/L = risque moyen
Vert : < 2 ng/g = risque faible	Vert : < 1 ng/L = risque faible

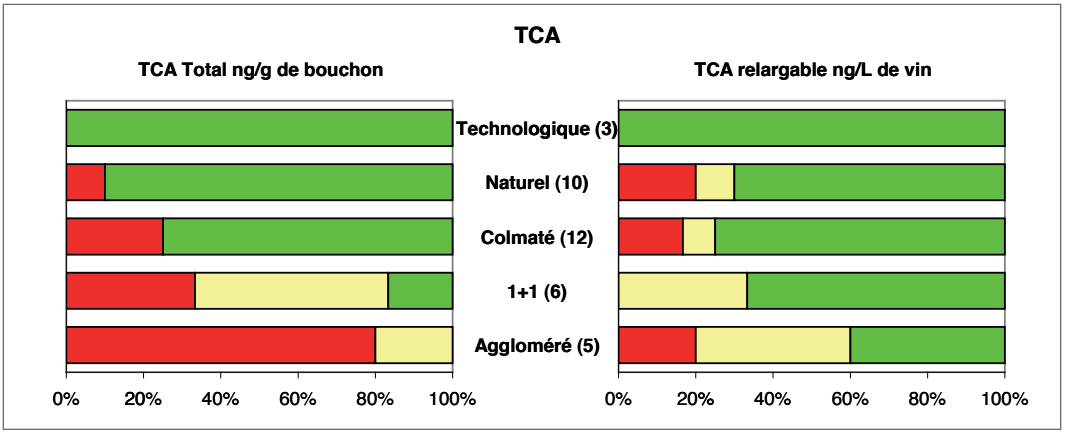


Figure 6 : Présence de TCA dans les bouchons en liège naturel ou à base de liège

La vision comparative des 2 méthodes d'analyses nous conduit à constater qu'il n'y a pas de relation directe entre elles. De plus, ce ne sont pas les mêmes bouchons qui ont été analysés par les 2 méthodes mais des bouchons différents issus de chaque lot.

Seuls les bouchons Technologiques sont exempts de TCA quel que soit le lot analysé. Les bouchons Agglomérés sont généralement pollués par cette molécule. L'écart entre les 2 méthodes est très marqué pour les bouchons 1+1. Ceci peut s'expliquer par la nature même de ces obturateurs composés de 2 rondelles de liège naturel et d'un manchon en aggloméré.

4.2.2. Analyses après 12 et 24 mois de stockage (2ème phase)

Pour chacune des périodes considérées et pour chacun des obturateurs, 12 bouteilles sont analysées selon les paramètres classiques de contrôle de mise : niveau de remplissage, repérage des bouteilles couleuses et examen du bout externe des bouchons.

Aucun de ces examens sur bouteilles obturées ne permet de mettre en évidence d'anomalie aussi bien à 12 mois qu'après 24 mois de stockage.

Après extraction des bouchons, l'absence de défauts est reconnue à 12 mois pour tous les obturateurs.

Malgré des conditions de stockage optimales pour l'ensemble des modalités, à 24 mois, des remontées capillaires plus ou moins importantes sont observées :

- pour 1 lot de bouchons Naturels sur les 4 mis en œuvre,
- pour 3 lots de bouchons Colmatés sur 4,
- pour les 2 lots de bouchons Agglomérés.

Les autres modalités (Synthétiques, Technologiques et 1+1) sont exempts de défauts.

Cas particulier des forces d'extraction :

Sur chacune des 12 bouteilles de chaque modalité, le test de forces d'extraction est réalisé (Figure 7).

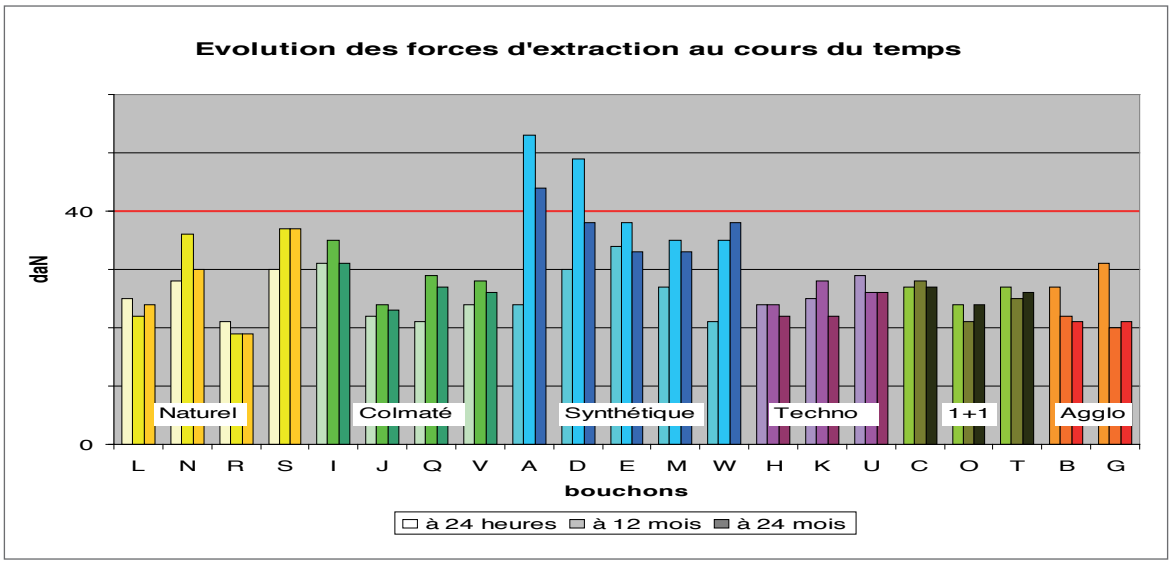


Figure 7 : Evolution des forces d'extraction au cours du stockage

Au sein de chaque « famille » d'obturateurs, les forces d'extraction sont hétérogènes (Figure 6). Par exemple, à 12 mois, les bouchons Synthétiques A et D présentent des résultats de forces d'extraction au-delà des valeurs communément admises alors que les bouchons M présentent des forces d'extraction correctes.

Ce test a également permis de mettre en évidence des hétérogénéités à l'intérieur même d'un lot avec des variabilités de forces d'extraction parfois importantes.

Il est également à noter l'évolution des forces d'extraction au cours du temps avec des lots de bouchons hors norme à 12 mois et dont les résultats diminuent pour tendre vers des valeurs satisfaisantes (lots A et D) à 24 mois. Inversement, certaines forces d'extraction ont tendance à augmenter au cours de cette période de stockage (lots S et W).

4.3. Analyses œnologiques et dégustations après 12 et 24 mois de stockage

Pour la partie analyses œnologiques et dégustations, les graphiques suivants illustrent le niveau de performance de chaque lot de bouchons (rapporté au pourcentage du nombre de lots étudiés pour chaque famille d'obturateurs). Pour chaque type d'obturateurs, le nombre de lots suivis est indiqué entre parenthèses. Les barres vertes représentent des niveaux satisfaisants, les jaunes des niveaux moyens et les rouges des niveaux mauvais.

4.3.1. Préservation du SO_2 et de la couleur

La Figure 8 représente la synthèse des mesures de SO2 libre, SO2 total et de la couleur (L, a*, b*) réalisées sur les 24 modalités de l'essai.

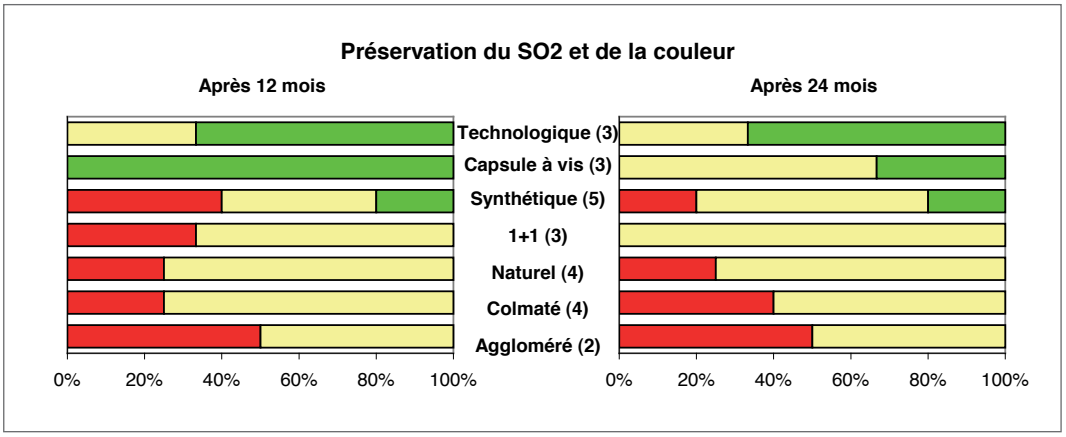


Figure 8 : Préservation du SO_2 et de la couleur à 12 et 24 mois

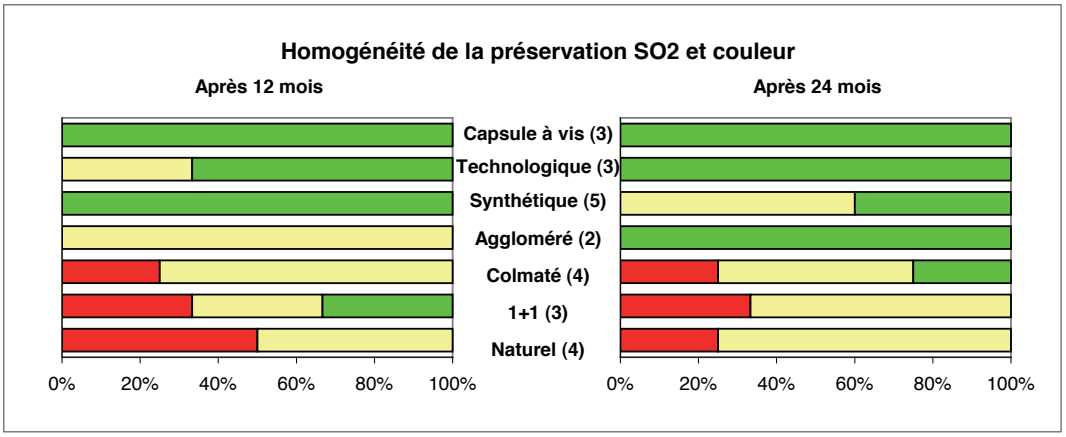


Figure 9 : Homogénéité de la préservation du SO_2 et de la couleur à 12 et 24 mois

Les indicateurs représentant la préservation du SO_2 et de la couleur montrent de bons résultats pour l'ensemble des bouchons Technologiques et les Capsules à vis (barres vertes). Ces 2 types d'obturateurs présentent aussi une très bonne homogénéité au sein de chaque lot. Les niveaux des autres obturateurs sont assez variables entre les lots de chaque catégorie. Au niveau de l'homogénéité au sein des lots, certains lots de bouchons Colmatés, 1+1 et Naturels présentent des hétérogénéités importantes (barres rouges).

4.3.2. Analyse sensorielle

L'évaluation sensorielle a été organisée après 12 et 24 mois de conservation, avec un jury de dégustateurs professionnels du vin de la région bordelaise. Pour chaque dégustation, la série de vins, constituée des 24 modalités, est dégustée suivant un protocole de service en carré latin qui élimine les effets d'ordre des échantillons.

Les vins font l'objet d'une dégustation descriptive selon la méthode mise en place par le Service Vigne et Vin de la Chambre d'Agriculture de la Gironde : commentaires de dégustation sur des fiches ULISI-INRA, notation des descripteurs de 0 à 5, attribution d'une note globale sur 20 pour juger de la qualité globale du produit et traitement statistique des résultats (Analyse en Composantes Principales, profil sensoriel des vins…).

Les figures suivantes présentent la synthèse des points essentiels.

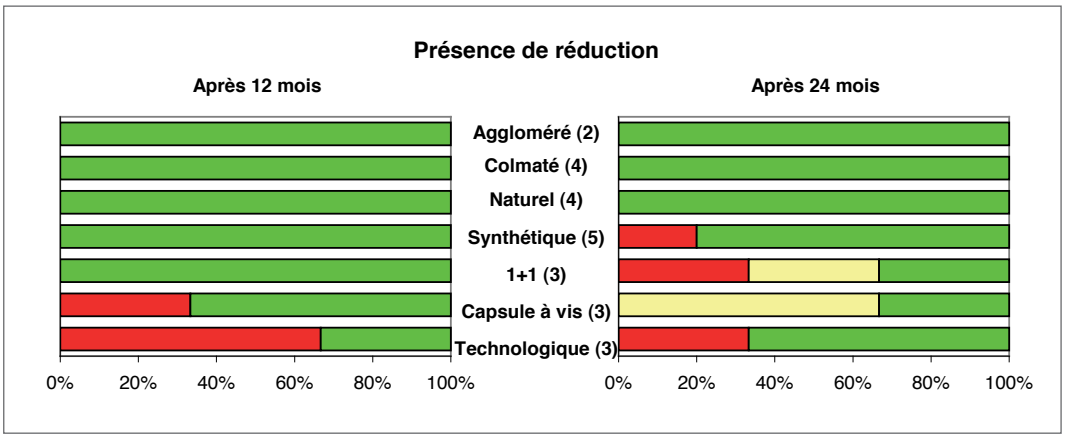


Figure 10 : Evolution des notes de réduction à 12 et 24 mois

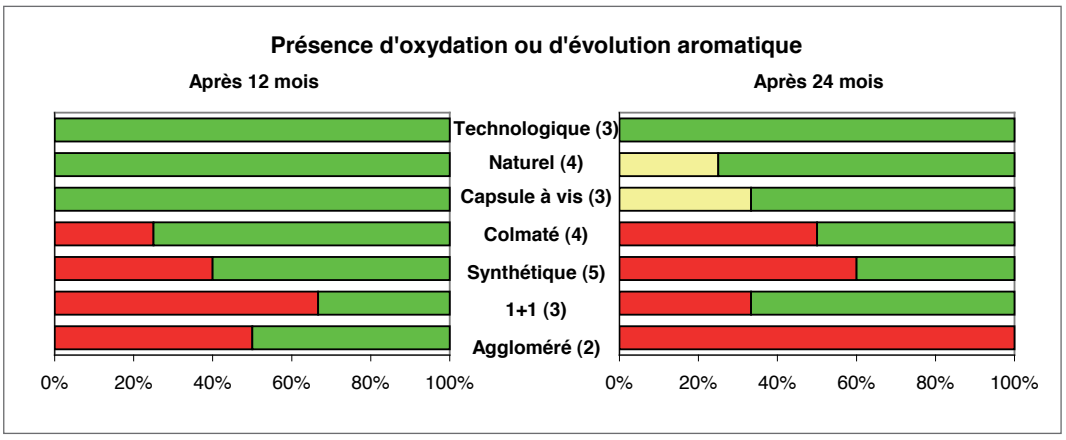


Figure 11 : Evolution des notes d'oxydation ou évolution aromatique à 12 et 24 mois

Certains lots de bouchons Technologiques et de Capsules à vis semblent plutôt favoriser la réduction du vin (barres rouges, Figure 10). A l'inverse, plusieurs lots de bouchons Agglomérés et Colmatés ont plutôt tendance à favoriser l'oxydation ou l'évolution de l'arôme (barres rouges, Figure 11). L'ensemble des lots de bouchons Naturels a donné peu de réduction ou d'oxydation (barres vertes). Enfin, les bouchons Synthétiques ou 1+1 présentent des lots favorisant la réduction et d'autres favorisant l'oxydation.

Au niveau de l'apparition d'un défaut aromatique, les bouchons Technologiques, 1+1 ou Naturels présentent peu de mauvais goûts (sauf un lot de 1+1 qui a été jugé bouchonné sur les échantillons dégustés après un an). Sur les autres modalités un goût étranger au vin (liégeux ou plastique) peut apparaître sur certains échantillons.

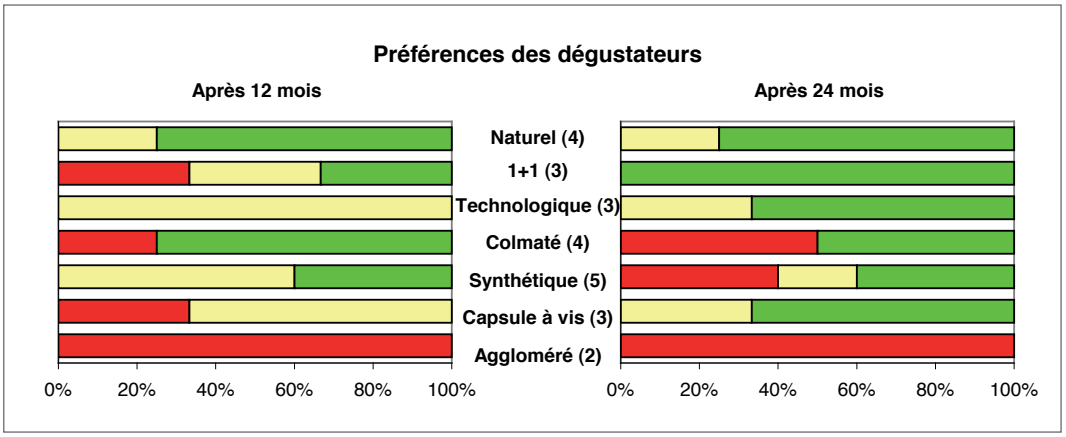


Figure 12 : Préférences des dégustateurs à 12 et 24 mois

La synthèse de ces différents aspects donne une appréciation très variable des lots de chaque catégorie par les dégustateurs (Figure 12). Les bouchons Agglomérés ont donné un mauvais jugement pour les 2 lots suivis et sont rejetés par les dégustateurs. Enfin, les autres types de bouchons montrent des résultats très différents en fonction des lots de bouchons.

5. PERSPECTIVES

Les données présentées précédemment sont des résultats intermédiaires et partiels et il est encore trop tôt pour tirer des conclusions générales. Ces résultats devront être complétés par les analyses et dégustations qui vont être réalisées en 2013 et 2014 afin de confirmer le niveau de performances de chaque obturateur.

De façon générale, les premiers résultats confirment l'importance de la qualité des obturateurs sur l'évolution du vin, le choix d'un type de bouchage étant à effectuer en fonction de la durée de vie du vin et de sa constitution de départ (en particulier de la teneur en polyphénols et du niveau de sulfitage).

Cette étude montre également l'importance capitale d'une bonne maîtrise des conditions de mise en bouteilles et en particulier des apports d'oxygène. Cela devrait notamment inciter les opérateurs à mettre en place des contrôles sur ces points critiques (respect d'un cahier des charges matières sèches, contrôles avant achat et à la livraison, audits oxygène…).

Les résultats de cet observatoire pourront également inciter les fournisseurs de matières sèches à poursuivre leurs efforts qualitatifs afin d'offrir des produits conformes aux attentes et aux besoins des producteurs de vins bordelais.

LES CAPACITÉS DE SEGMENTATION OLFACTIVE DES DÉGUSTATEURS PROFESSIONNELS

S. Tempère[1,2], MH. Schaaper[1,2], E. Cuzange[3], R. de Lescar[3], G. Sicard[4], G. de Revel[1,2]

[1] Univ. de Bordeaux, ISVV, EA 4577, Unité de recherche OEnologie, 33882 Villenave d'Ornon, France

[2] INRA, ISVV, USC 1219 OEnologie, 33882 Villenave d'Ornon, France

[3] Quali-Bordeaux, 33370 Artigues, France

[4] Univ. de Provence, NICN-UMR 7259, 13000 Marseille, France

E-mail : sophie.tempere@u-bordeaux2.fr

Dans l'art de sentir les odeurs, indéniablement, la performance la plus élevée est la capacité des sujets à extraire un trait olfactif pertinent des mélanges odorants. En terme scientifique, ce traitement sensoriel est appelé « segmentation olfactive ».

La littérature relative à la perception des mélanges odorants présente généralement ces capacités de segmentation comme une limite saillante du système olfactif. Chez les experts comme chez les novices, la capacité à discriminer les composants d'un mélange serait limitée à 3 ou 4 au maximum (Laing et Francis, 1989 ; Livermore et Laing, 1996). Ces résultats semblent condamner les possibilités de décrire la composition d'un vin ou d'un parfum et pourtant, il a été démontré que les experts sont capables de percevoir les mélanges aromatiques de façon analytique, plus analytique d'ailleurs que des sujets novices (Le Berre, 2007). Face à la richesse des mélanges aromatiques naturels dans notre vie quotidienne (tel que le vin) et donc à l'efficacité des traitements physiologiques et cognitifs mis en jeu lors du traitement de l'information olfactive, cette performance est déjà intéressante. Ce qui nous semble le plus remarquable, c'est la capacité que nous avons à nous focaliser sur un trait perceptif particulier. C'est justement sur cette capacité que des dégustateurs professionnels jouent leurs compétences. On peut citer la capacité des experts à déterminer la présence de défauts ou de caractéristiques qualitatives dans un mélange complexe tel que le vin. Les parfumeurs ou aromaticiens utilisent aussi cette capacité pour vérifier l'harmonie des accords olfactifs qu'ils proposent.

Cette performance olfactive peut impliquer aussi bien des phénomènes sensoriels (Goyert et al., 2007) que cognitifs (Leberre et al., 2008 ; Rabin et Cain, 1989). Lors des dégustations de contrôle ou de la recherche de défauts dans les vins, les capacités de segmentation des dégustateurs ont une importance primordiale. Cette étude a pour objectif de mieux comprendre les facteurs pouvant influencer les capacités de segmentation des dégustateurs.

INFLUENCE DE LA SENSIBILITÉ SUR L'APTITUDE À LA SEGMENTATION OLFACTIVE

Dans un premier temps, l'amplitude des différences inter-individuelles en termes de segmentation a été évaluée grâce à la mesure des seuils de détection de composés aromatiques clés dilués dans le vin.

Les seuils de détection ont été déterminés grâce à une série de tests de difficulté décroissante et impliquant un choix forcé à chaque niveau. On parle de méthode ascendante et de procédure d'essais 3-AFC (3 alternatives à choix forcé, procédure normalisée ISO 13301, 2002). A chaque niveau, on présente au participant, trois solutions : l'une seulement contient le produit à détecter, les deux autres sont des témoins ne contenant que le vin témoin. Chaque test consiste après flairage à déterminer : « Quel est de ces trois flacons celui qui sent différemment ? ». Le participant doit obligatoirement indiquer une réponse sur une feuille d'examen imprimée. Dix niveaux de concentrations croissantes séparées d'un facteur 2 et préparées dans le vin, ont été présentés successivement. Le seuil de détection individuel est déterminé en tenant compte des effets du hasard ou de fatigue olfactive (Wise et al., 2008). Ces seuils ont été exprimés en rang de dilutions. A la suite de l'application du protocole de détermination des seuils de détection à notre échantillon de professionnels du vin, les représentations graphiques des variations individuelles pour les 6 composés aromatiques ont donc été établies (Figure 1).

Il a pu être mis en évidence que les différences inter-sujets observées pour ces six composés aromatiques sont de même amplitude que celles déjà observées pour la sensibilité olfactive (facteur de dilution supérieur à 103) (Tempère *et al.,* 2011). La sensibilité est le reflet de nos capacités physiologiques périphériques, de l'efficacité de notre organe récepteur olfactif. Elle correspond aux mêmes mesures effectuées dans l'eau.

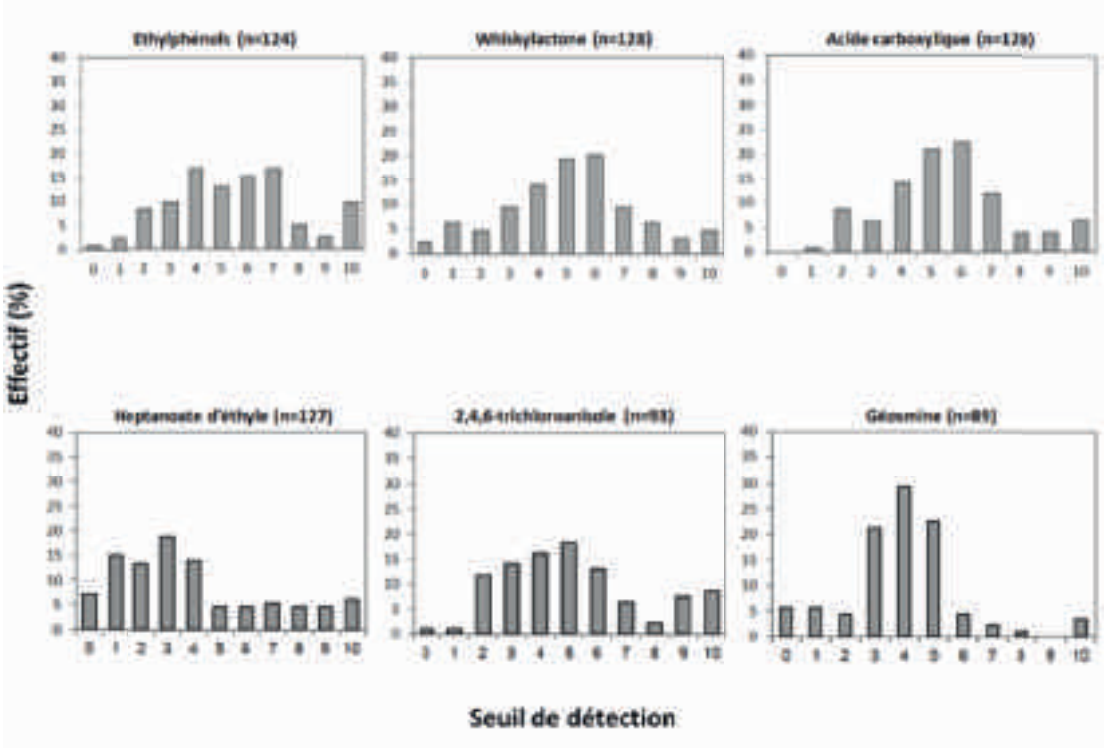


Figure 1 - Etude des capacités de segmentation : Distribution des seuils de détection mesurés pour des stimuli dilués dans le vin (n = Nombre de sujets testés). Six composés ont été testés : les éthylphénols (note animale, cuir), la whiskylactone (note boisée, noix de coco), les acides carboxyliques (note butyrique), l'heptanoate d'éthyle (note fruitée, ananas), le 2,4,6-trichloroanisole (goût de bouchon) et la (±)-géosmine (note moisie-terreuse). « 0 » correspond à des concentrations élevées : sujets ayant de faibles capacités de segmentation. « 10 » correspond à des concentrations faibles : sujets ayant de fortes capacités de segmentation.

Une expérience complémentaire a été entreprise pour étudier l'implication de la sensibilité dans la capacité de segmentation.

Les mesures dans le vin ont donc été mises en parallèle avec celles des seuils de détection dans l'eau (mesure de la sensibilité). L'analyse statistique (ANOVA factorielle) a permis de démontrer l'influence de la sensibilité sur la capacité de segmentation ($p < 0,01$) indépendamment du composé testé ($p > 0,05$). Les sujets les moins sensibles (sujets hyposmiques ou anosmiques spécifiques) ont des capacités de segmentation inférieures à celles des autres dégustateurs (test post-hoc de Tukey). Cette donnée supplémentaire confirme l'importance pour chaque sujet de connaître ses points forts et ses points faibles en termes de sensibilité olfactive. Cependant, l'étude des profils individuels démontre aussi que certains des sujets les plus sensibles à un composé odorant peuvent rencontrer des difficultés à détecter celui-ci dans le vin (Figure 2). Le profil de sensibilité individuel influe donc sur la capacité individuelle de segmentation, mais d'autres facteurs sensoriels semblent modifier la capacité de segmentation.

Une des explications pourrait être que la performance de segmentation est aussi influencée par la composition du vin : on imagine alors des processus d'interactions perceptives, des effets synergiques, des processus de masquage ou de fusion (accord aromatique).

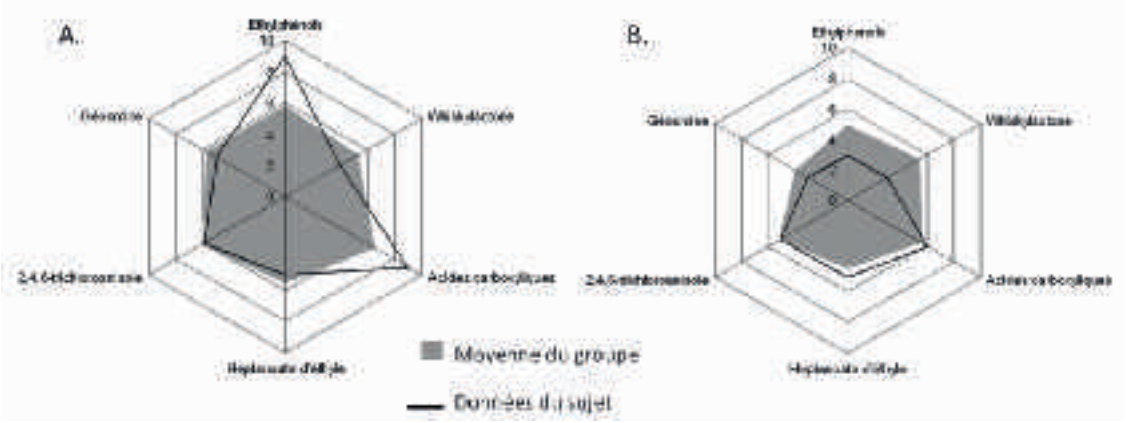


Figure 2 - Exemple de profils de détection d'un sujet. A. Mesure de détection dans l'eau = Sensibilité du sujet. B. Mesure de détection dans le vin = Capacité de segmentation du même sujet. Sur ces diagrammes radiaux, un seuil de détection étiqueté « 10 » correspond à un sujet sensible ou ayant une capacité de segmentation forte pour le composé correspondant. On présente ici un cas particulier illustrant la difficulté de la tâche de segmentation olfactive : le sujet est sensible aux éthylphénols et aux acides carboxyliques, mais ses capacités de segmentation sont proches de la moyenne pour ces deux composés. A noter que les gammes de concentrations utilisées dans l'eau et dans le vin diffèrent. En trait plein, la performance individuelle. En gris, le profil moyen de l'échantillon étudié.

INFLUENCE DES INTERACTIONS PERCEPTIVES SUR LA SEGMENTATION OLFACTIVE

Plus généralement les mécanismes d'interactions perceptives peuvent avoir un rôle important dans l'appréciation de la qualité des vins. Par exemple, la capacité de segmentation des notes fruitées des vins peut être modulée par la présence de défauts.

Lors d'une étude préliminaire, un vin exempt de tout défaut a été dégusté par un jury de 27 sujets formés. Les résultats de dégustation ont été comparés à ceux pour le même vin pollué

à une concentration infraliminaire en éthylphénols (non détectable par les dégustateurs) et à une concentration supraliminaire (perceptible par les dégustateurs). Les résultats démontrent que la présence d'éthylphénols à forte concentration peut masquer la perception des notes fruitées des vins. Ces résultats sont en accord avec différentes études antérieures (Chatonnet et al., 1990 ; Gerbaux et Vincent, 2001 ; San-Juan et al., 2011). Mais, ils démontrent surtout que l'intensité aromatique générale est également modifiée par la présence d'éthylphénols à une concentration pourtant imperceptible (Figure 3).

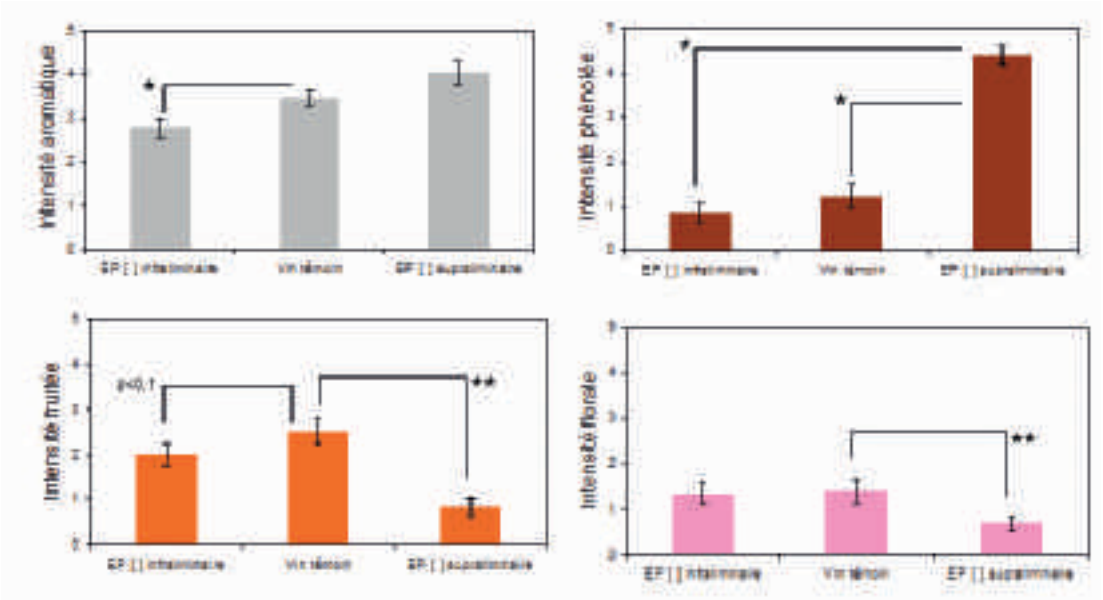


Figure 3 - Comparaison des notes de dégustation pour les critères intensité aromatique générale, intensité phénolée, intensité fruitée et intensité florale. Les résultats indiquent que la concentration la plus faible en éthylphénols (ajout au vin témoin de 9 µg/l) n'est pas perçue par les dégustateurs mais modifie la perception de l'intensité aromatique générale et la note fruitée. L'ajout d'éthylphénols à une concentration supraliminaire (perceptible par les dégustateurs – ajout au vin témoin de 932 µg/l) masque les notes fruitées et florales. Significativité : Test de Kruskall-Wallis, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

De plus, dans une autre expérience, nous avons montré que le rejet d'un vin contenant des éthylphénols pouvait s'effectuer alors que leurs concentrations étaient inférieures aux capacités de détection des sujets (Figure 4). Ce résultat met encore en évidence une modification de la qualité des vins pour des concentrations infraliminaires en éthylphénols. Cette différence entre le seuil de rejet et le seuil de détection est clairement significatif ; elle est observée individuellement pour 54 % des sujets.

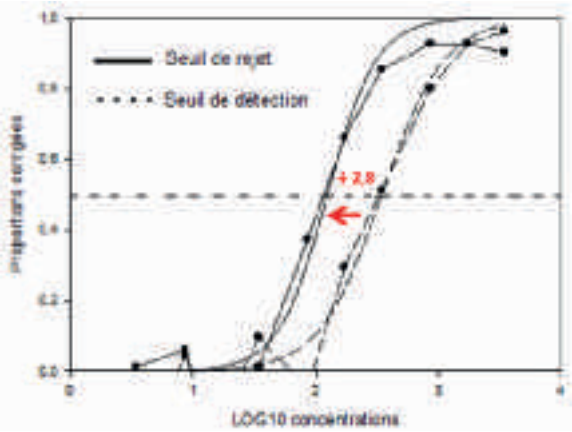


Figure 4 - Comparaison entre le taux de détection et le taux de rejet en fonction de la concentration en éthylphénols chez 83 dégustateurs professionnels. Un facteur de dilution de 2,8 est observé entre les deux seuils.

CARACTÉRISATION DES PHÉNOMÈNES DE MASQUAGE OLFACTIF

La seconde partie de ce travail vise donc à caractériser certaines interactions perceptives connues altérant la qualité des vins et modifiant les capacités de segmentation des dégustateurs.

L'exemple développé ici est celui du masquage des notes fruitées par le 2,4,6-trichloroanisole (TCA), marqueur du goût de bouchon. Cet effet dans les vins est connu de la profession. Une étude menée en 1996 a démontré qu'il n'existait pas de corrélation entre la concentration en TCA dans les vins et le jugement des dégustateurs (Pollnitz et al., 1996). Cette remarque semble souligner, comme vu précédemment pour les éthylphénols, qu'une modification de la qualité aromatique des vins peut intervenir pour des concentrations en TCA en-dessous du seuil de détection.

Un premier test triangulaire effectué par 137 dégustateurs professionnels dont les sensibilités au TCA et à l'heptanoate d'éthyle (composé à odeur fruitée) ont été mesurées, a démontré que les dégustateurs étaient capables de percevoir une modification de la note fruitée en présence de TCA à une concentration infraliminaire, et cela indépendamment des sensibilités initiales (Figure 5). A noter que cet effet, bien que significatif, n'est pas perçu par l'ensemble des dégustateurs.

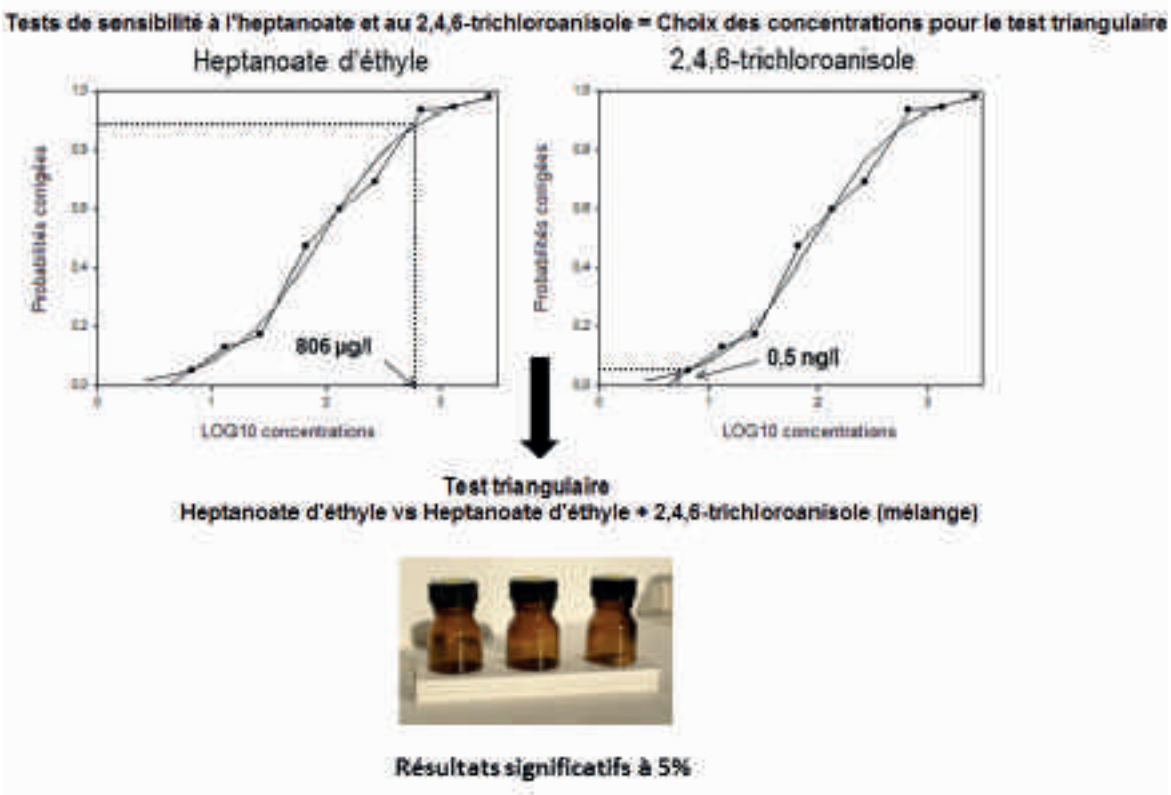


Figure 5 - Tests sensoriels effectués afin d'évaluer si la présence du 2,4,6-trichloroanisole peut modifier la perception de l'heptanoate d'éthyle. Après avoir effectué la mesure des sensibilités des sujets pour ces deux composés et afin de s'assurer que la 2,4,6-trichloroanisole est présenté à une concentration infraliminaire et l'heptanoate d'éthyle à une concentration supraliminaire, un test triangulaire prouve que celui-ci modifie la perception de la note fruitée de l'heptanoate d'éthyle. 137 dégustateurs ont participé à ce test.

Une expérience complémentaire a permis de démontrer que la présence du TCA à une concentration infraliminaire affecte les capacités de discrimination de la note fruitée chez les dégustateurs.

Par ailleurs, à des concentrations supraliminaires ou pour des sujets sensibles, le TCA semble masquer la note fruitée et rendre la tâche de segmentation de ce caractère plus difficile.

Nos expériences ont donc permis de démontrer grâce à différents tests psychophysiques (tests de discrimination triangulaires, mesures seuils de détection ou mesures d'intensité perçue), que les capacités de segmentation des sujets vis-à-vis d'une note fruitée pouvaient être modifiées en présence de TCA à une concentration supraliminaire et de manière plus surprenante à une concentration infraliminaire. Cette modification peut entraîner indirectement le rejet d'un vin, une des caractéristiques qualitatives de celui-ci étant altérée.

Ces effets de suppression sont souvent observés pour des mélanges pour lesquels les deux composés n'ont pas la même valence hédonique (Ferreira, 2011). D'après Rabin et Cain (1989), l'influence du caractère hédonique (j'aime – je n'aime pas) serait extrêmement pertinente dans les produits alimentaires complexes, et pourrait expliquer pourquoi l'odeur de certains produits complexes devient fortement réprimée par la présence de petites quantités de composés malodorants.

Il était donc important de s'intéresser à l'origine de cette interaction perceptive. Ce travail essaie de cerner l'origine de ces interactions mises en jeu dans la perception des mélanges aromatiques : intermoléculaire, périphérique ou centrale (dans le verre, le nez ou le cerveau), avec en perspectives, l'étude des différences de perception entre experts et consommateurs et la mise au point de méthodologies d'entraînement olfactif pour augmenter les capacités de segmentation.

On notera que des analyses chromatographiques en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont permis de démontrer l'origine purement sensorielle de ces interactions et d'écarter la piste d'interactions physico-chimiques intermoléculaires au niveau du vin dans le verre.

Afin de continuer notre investigation, la mise au point de différents protocoles est nécessaire afin évaluer l'origine de ces effets sensoriels. Ces différentes expériences sont en cours de validation.

Pour conclure, cette étude démontre la difficulté de prévoir les capacités de segmentation d'un dégustateur. Celles-ci sont dépendantes de son profil de sensibilité, mais aussi de phénomènes d'interactions perceptives. Ici comme ailleurs quand il s'agit de l'odorat, il est donc difficile de définir un sujet standard, même dans une population d'experts. Toutefois, il apparaît également judicieux d'accepter cette diversité afin d'obtenir une image sensorielle la plus réaliste (ou la plus complète) d'un produit comme le vin, surtout, probablement, si on s'intéresse au versant consommateur, qui présente les mêmes variations interindividuelles.

C'est ainsi que ce travail cherche à comprendre et décrire les performances des dégustateurs professionnels et s'inscrit dans le contexte des réformes de l'OCM et des dégustations de contrôle pour une recherche constante de la qualité des produits. Au-delà, il permet à chacun de mieux se connaître d'un point de vue de ses capacités sensorielles et de comprendre les difficultés des discours souvent divergents lorsqu'il s'agit de déguster un vin et d'en commenter les caractères olfactifs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Analyse Sensorielle. Méthodologie. Lignes directrices générales pour la mesure des seuils de détection d'odeur, de flaveur et de goût par une technique à choix forcé de 1 parmi 3. Recueil des normes françaises, Produits Alimentaire, Analyse Sensorielle, NF ISO 13301 (V09-023), Décembre 2002.

Chatonnet P., Boidron J.N., Pons M. 1990. Elevage de vins rouges en fûts de chêne : Evolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. Sciences des Aliments, 10, 565-587.

Ferreira V. 2011. Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative odour properties of simple odour mixtures : a flavour chemistry view. Part 1 : intensity and detectability. A review. Flavour and Fragrance Journal, 27, 124-140.

Gerbaux V, Vincent, B. 2001. Effects of volatile phenols on sensory quality of red wines from different cultivars. Revue des OEnologues, 99, 15–18.

Goyert HF, Frank ME, Gent JF, Hettinger TP. 2007. Characteristic component odors emerge from mixtures after selective adaptation. Brain Research Bulletin, 72, 1-9.

Laing DG, Francis GW. 1989. The capacity of humans to identify odors in mixtures. Physiology and Behavior, 46, 809-814.

Le Berre E. 2007. La perception des accords aromatiques : un exemple d'interactions perceptives dans les mélanges odorants. Thèse de doctorat en sciences de l'alimentation, Université de Bourgogne et Université James Cook.

Le Berre E, Thomas-Danguin T, Beno N, Coureaud G, Etiévant P, Prescott J. 2008. Perceptual processing strategy and exposure influence the perception of odor mixtures. Chemical Senses, 33, 193-199.

Livermore A, Laing DG. 1996. Influence of training and experience on the perception of multicomponent odor mixtures. Journal of Experimental Psychology : Human Perception and Performance, 22, 267-277.

Pollnitz AP, Pardon KH, Liacopoulos D, Skouroumounis GK, Sefton MA. 1996. The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2, 184-190.

Rabin MD, Cain WS. 1989. Attention and learning in the perception of odor mixtures. In : Laing D.G., Cain W.S., McBride R.L., Ache B.W., Ed, Perception of complex smells and tastes. Academic Press, Sydney, 173-188.

San Juan F, Ferreira V, Cacho J, Escudero A. 2011. Quality and aromatic sensory descriptors of spanish red wines can be predicted form their aroma-active chemical composition. Journal of Agriculture and Chemistry, 59, 7916–7924.

Tempere S, Cuzange E, Malak J, Bougeant JC, de Revel G, Sicard G. 2011. The training level of experts influences their ability to detect some wine key compounds. Chemosensory perception, 4, 99-115.

Wise PM, Bien N, Wysocki CJ. 2008. Two rapid odor threshold methods compared to a modified method of constant stimuli. Chemosensory Perception, 1, 16-23.

Mardi 5 février 2013
Palais des Congrès
de Bordeaux

11e JOURNÉE TECHNIQUE DU CIVB

Adaptation au changement climatique

LES ACTES DU COLLOQUE

BORDEAUX

Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux

S'ADAPTER AU CHANGEMENT CLIMATIQUE : LES CONSÉQUENCES DU CHANGEMENT CLIMATIQUE NOUS AMÈNE(RO)NT À ADAPTER NOS ITINÉRAIRES ET CHOIX TECHNIQUES. TOUR D'HORIZON DES PISTES À L'ÉTUDE.

Vincent Viguié

CIRED (Centre International de Recherche sur l'Environnement et le Développement)

Campus du Jardin Tropical - 45 bis, avenue de la Belle Gabrielle

94736 Nogent-sur-Marne Cedex

viguie@centre-cired.fr

UN CHANGEMENT MAJEUR

Le changement climatique est une réalité. On mesure déjà, à l'heure actuelle, de légères modifications des caractéristiques du climat terrestre par rapport au début du XXème siècle : augmentation de la température moyenne (de l'ordre de +0.7°C en moyenne mondiale, de l'ordre de +1°C en France), montée du niveau de la mer (de l'ordre de +1.5 cm), baisse du manteau neigeux (de l'ordre de -1 millions de km²), etc.

Le changement climatique va se manifester par une évolution rapide du climat en France. L'évolution du climat des territoires français peut être évaluée à partir des projections climatiques internationales et nationales. Comme il n'est pas possible de prédire les émissions futures, celles-ci se basent sur des scénarios, c'est-à-dire des évolutions possibles des émissions mondiales à l'horizon de 2100. Le GIEC a ainsi construit dans les années 90 un ensemble de scénarios contrastés, les scenarios d'émissions « SRES », pour servir de bases aux exercices internationaux de simulation du climat.

Le scénario A2 est par exemple l'un de ces scénarios, fréquemment pris comme référence : il suppose une augmentation rapide de la population et de l'économie mondiales, l'absence de politique climatique, et une croissance forte des émissions de gaz à effet de serre, dans la ligne des tendances actuelles. Les projections climatiques basées sur ce scénario prévoient en moyenne une augmentation des températures de l'ordre de 3°C à la fin du siècle. Cette augmentation peut paraître au premier abord relativement faible. Elle l'est, en effet, si on la compare aux variations de températures journalières, et aux variations de température entre les différentes saisons. Il ne faut néanmoins pas se laisser tromper par ce chiffre, dont la signification concrète est fort différente, le changement du climat englobant aussi de profonds changements dans les précipitations et les extrêmes météorologiques.

Une bonne illustration de cela provient du travail d'Hallegatte *et al.* [1] qui ont recherché les analogues de quelques grandes villes européennes pour la fin du XXIème siècle sur la base des

1 S. Hallegatte, J.C. Hourcade, et P. Ambrosi, « Using climate analogues for assessing climate change economic impacts in urban areas », *Climatic change* 82, no 1 (2007): 47–60.

températures et des précipitations projetées par deux modèles climatiques pour le scénario d'émissions A2. Avec cette méthodologie, et pour les simulations présentées sur les Figure 1 et Figure 2 (le modèle du Hadley Center et le modèle de Météo-France, respectivement), on constate ainsi qu'en 2100, suivant le modèle climatique utilisé, Paris connaîtrait un climat comparable à celui de Cordoue actuellement, ou à celui de Bordeaux. Le climat de Marseille deviendrait proche de celui de Cordoue également, ou d'un climat grec. Cette approche nous permet d'imaginer plus aisément l'adaptation qu'il faut envisager en France pour faire face au climat qui attend.

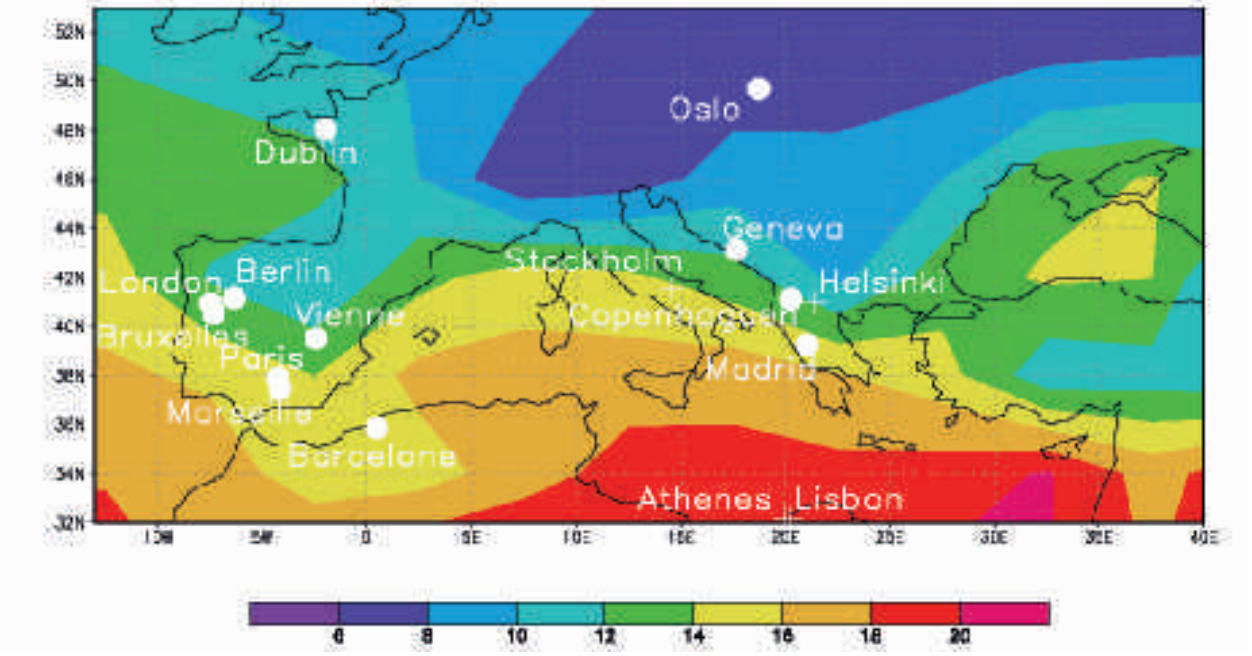


Figure 1 : Analogues climatiques en 2070, modèle du Hadley Centre, scénario SRES A2
(Source : Hallegatte, Ambrosi, Hourcade (2007))

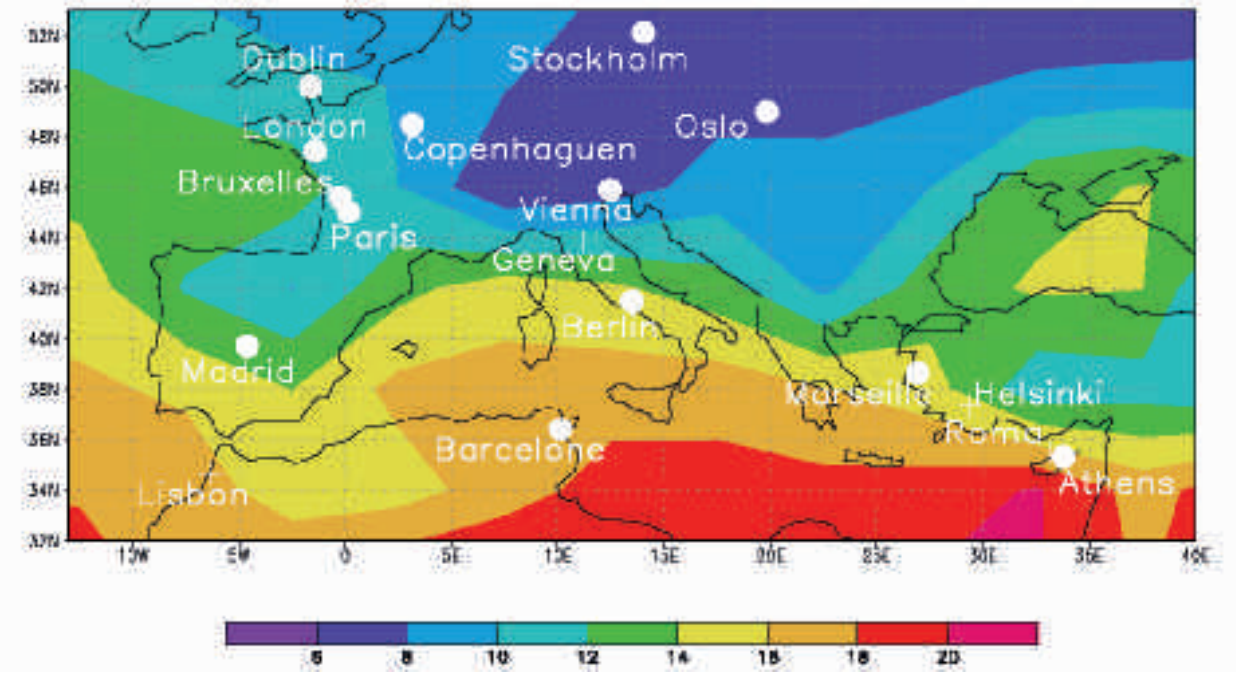


Figure 2 : Analogues climatiques en 2070, modèle de Météo-France, scénario SRES A2
(Source : Hallegatte, Ambrosi, Hourcade (2007))

LES CONSÉQUENCES SUR LA SOCIÉTÉ HUMAINE

En quoi ce passage à de nouveaux régimes climatiques est-il grave ? Mis à part certains cas extrêmes (climats désertiques, par exemple), il est difficile de dire que certains climats sont mieux adaptés que d'autres à l'homme. Pour reprendre l'exemple ci-dessus, il n'y a pas vraiment de raison d'affirmer que le climat de Cordoue serait moins bon pour les parisiens que le climat actuel de Paris. En revanche, les modes de vie, les infrastructures, les techniques agricoles y sont fort différentes et adaptées aux climats locaux : c'est lorsque pour une raison ou pour une autre on n'est pas bien adapté à son climat que les choses sont graves et que l'on commence à être vulnérable. La canicule de 2003 est une très bonne illustration de cela : ses dégâts furent extrêmement importants à Paris, alors qu'il s'agissait de températures observées couramment l'été dans le sud de l'Espagne, où chaque été ne provoque pas de conséquences aussi tragiques.

Le véritable enjeu du changement climatique est ainsi de savoir comment la transition va être gérée. C'est comment passer de territoires adaptés à notre climat actuel à des territoires adaptés au climat futur, et, ce, en quelques décennies.

L'adaptation des activités humaines n'est pas simple, mais il faut bien sûr imaginer que ce ne sont pas uniquement les hommes qui vont devoir s'adapter : la faune, la flore, et plus généralement les écosystèmes qui nous entourent vont également avoir à le faire aussi. Il n'est cependant pas évident du tout que ceux-ci y arrivent dans leur intégrité, vu la vitesse effrénée du changement climatique actuel quand on le compare aux changements climatiques géologiques. Les écosystèmes fonctionnant de manière très intégrée, quelques disparitions d'espèces sont susceptibles d'entraîner des conséquences en chaîne sur d'autres espèces : ces changements, qui peuvent être de très grande ampleur, sont extrêmement difficiles à prévoir, et vont eux aussi impacter les sociétés humaines, et sur des impacts directs des variations du climat.

C'est donc à ce double changement, changement du climat, et changement induit de l'environnement, qu'il va falloir s'adapter.

AU-DELÀ DES ENJEUX TECHNIQUES, POURQUOI S'ADAPTER AU NOUVEAU CLIMAT N'EST PAS SIMPLE ?

Toute la question va être de savoir comment gérer la transition entre des activités et des infrastructures basées sur notre climat actuel, et des activités et infrastructures adaptées au climat futur. Plusieurs questions rendent la tâche difficile.

La première question provient des enjeux techniques associés à cette transition. Je suis loin d'être un expert de ces sujets dans le cas de la vigne, mais j'imagine que de nombreuses questions se posent : quelles nouvelles méthodes d'entretien des pieds ? de vinification ? Peut-on garder les mêmes variétés ? etc. Ces questions sont complexes, et nécessitent d'importants travaux de recherche pour être résolus.

Le message que j'aimerais transmettre, ici, est qu'au-delà de ces enjeux techniques, un certain nombre de problèmes généraux se posent, qui doivent être pris en compte et rendent l'analyse extrêmement ardue. Ces problèmes sont liés au fait que, face à tout changement, le grand défi est la gestion de l'inertie. On est vulnérable face à un changement si on n'arrive pas à changer au même rythme, ou à anticiper. Or faire face au changement climatique suppose de modifier des infrastructures ou des modes d'organisation locale (spécialisation économique d'une région, par exemple) qui ne changent pas du jour au lendemain. Il faut donc prendre le problème le plus en amont possible.

Deux écueils rendent cela particulièrement difficile. Tout d'abord, le climat évolue progressivement. L'objectif n'est ainsi pas d'être parfaitement adapté au climat qu'il y aura en 2050, ou en 2100, mais d'être adapté tout au long du siècle à un climat sans cesse changeant, et dont l'évolution continuera encore par la suite.

Le deuxième écueil, c'est l'incertitude sur le climat futur, qui fait que même si l'on sait qu'il faut anticiper, on ne sait pas très bien à quoi se préparer. Cette incertitude a deux causes bien distinctes : d'une part notre connaissance imparfaite des mécanismes climatiques, et d'autre part l'impossibilité de prévoir les émissions futures. La comparaison entre les figures 1 et 2 au début du texte donne une bonne idée de l'incertitude due à notre connaissance imparfaite du climat : elle illustre, pour un même scénario d'émissions, les projections différentes faites par deux modèles climatiques différents.

Quel choix faire, quand, aujourd'hui, il s'agit par exemple de prendre une décision sur un investissement qui va porter sur plusieurs dizaines d'années ? Une solution est de privilégier un principe de précaution : choisir de s'adapter systématiquement au pire des cas possibles. Ce choix a un sens, mais est difficilement utilisable en pratique, car le coût en est souvent extrêmement élevé, de même que le risque de payer trop cher pour un résultat qui n'en valait pas la peine. Un certain nombre d'autres solutions existent, qui permettent de s'adapter au changement tout en réduisant au maximum le risque de coûts exagérés.[2]

IL EST CEPENDANT POSSIBLE D'AGIR

Un premier type d'actions possible, qui permettent de commencer à s'adapter au changement climatique malgré toutes les difficultés que nous avons listées, vient de l'idée que nous ne sommes aujourd'hui pas parfaitement adaptés à notre climat actuel. Nous sommes ainsi déjà vulnérables à un certain nombre de problèmes environnementaux : la biodiversité est menacée par les conséquences de nombreuses activités humaines, l'eau est fréquemment consommée de manière non durable, une fraction non négligeable de la population vit en zone inondable etc. Une part importante des conséquences projetées du changement climatique correspondent à une amplification de ces problèmes déjà existants : par exemple, la ressource en eau va décroître là où aujourd'hui elle est souvent mal utilisée, ou encore, la fréquence des inondations va augmenter dans un certain nombre de zones inondables à l'heure actuelle. Une mesure d'adaptation simple, dans ce cas, consiste simplement à commencer par mieux gérer la situation actuelle. C'est ce que l'on appelle une mesure « sans-regret », c'est-à-dire qu'elle est bénéfique dans tous les cas, à court terme aussi bien qu'à long terme, et ce quelle que soit l'ampleur future du changement climatique. Ce type de mesure n'est pas simple à mettre en place (elles l'auraient déjà été, sinon), et ne permettent pas de s'adapter à l'ensemble des impacts climatiques, mais elles constituent une première étape efficace.

Un autre type de mesure consiste à réduire la durée de vie des investissements, et à tenter d'éviter, autant que possible, ceux de longue durée. Un investissement dont on espère une rentabilité sur 10 ans sera en effet moins affecté par les diverses évolutions possibles du climat qu'un investissement dont on espère une rentabilité sur 20 ans ou plus. Dans le premier cas, au bout de 10 ans, il sera en effet toujours possible de changer ou non ses pratiques suivant l'évolution constatée du climat, ce qui est impossible dans le second cas.

[2] Pour plus d'informations, voir S. Hallegatte, « Strategies to adapt to an uncertain climate change », *Global Environmental Change* 19, no 2 (2009): 240–247.

Une troisième solution consiste à investir, lorsque l'occasion se présente, dans les marges de sécurité : lorsque s'adapter au pire des cas possibles, ou en tout cas à un scénario extrême, peut se faire sans coûter trop cher, il peut être utile de le faire. Le coût en cas de surestimation des impacts du changement climatique sera de toute façon faible, tandis que le gain peut être extrêmement important.

Enfin, il existe presque toujours de nombreuses manières différentes de s'adapter au changement climatique, les situations avec une unique solution étant extrêmement rares. Il est alors préférable, autant que possible, de favoriser les stratégies d'adaptation réversibles, financières ou institutionnelles, et qui permettent de revenir en arrière à moindre coût, aux investissements dans des solutions technologiques coûteuses et où l'argent, une fois investi, est perdu. L'exemple le plus typique de ce type d'approche est l'augmentation du risque d'inondation engendrée en de multiples endroits par le changement climatique. Il est possible, pour se protéger de ce risque, soit de favoriser des plans d'occupation des sols restrictifs, interdisant d'aller s'établir dans les zones qui deviendront potentiellement inondables, soit de construire des ouvrages de défenses (digues). Le grand avantage de la première solution est que l'on peut lever les interdictions des plans d'occupation des sols si l'on s'aperçoit à l'avenir que l'on a surestimé le risque, tandis qu'une fois la digue construite, il est impossible de revenir en arrière.

Toutes ces mesures ont bien entendu un coût à court terme, et il n'est pas forcément simple de les mettre en œuvre. Réduire la durée de vie des investissements conduit à choisir des investissements moins rentables. Investir dans les marges de sécurité n'est pas gratuit, et n'entraîne pas de gain à court terme. Les stratégies réversibles ne sont pas les plus simples à mettre en œuvre et à faire respecter etc. Ce coût doit cependant être vu comme une assurance, que l'on paye initialement mais qui limite les possibilités de pertes futures.

En conclusion, au-delà des problèmes technologiques et agronomiques, la conception et la sélection des mesures d'adaptation au changement climatique mettent en jeu des difficultés spécifiques :

- Le changement climatique est un processus évolutif : il ne suffit pas de savoir comment d'adapter à un climat nouveau, mais comment s'adapter à un climat sans cesse changeant
- Les caractéristiques exactes du climat futur ne sont pas connues avec grande précision, et ne peuvent par nature pas l'être, puisqu'il est impossible de prévoir quelles seront nos émissions de gaz à effet de serre futures. Les stratégies d'adaptation au changement doivent explicitement prendre en compte cette incertitude.

Ces difficultés ne rendent cependant pas la tâche impossible. Un certain nombre de moyens existent pour prévoir des stratégies robustes, robustes face à une évolution en continu du climat, et robustes face à plusieurs possibilités de climat pour demain.

Les échelles temporelles du changement climatique font que malheureusement il n'est pas possible d'attendre beaucoup des retours d'expériences a posteriori et de l'apprentissage par la pratique : nous sommes forcés d'anticiper ; attendre de voir quelles stratégies d'adaptation ont marché ailleurs ne peut entraîner qu'une action trop tardive. La recherche, la planification de long terme, l'échange d'idées et les collaborations entre acteurs peuvent cependant faciliter ce processus.

ÉTUDE DES IMPACTS À LONG TERME DU CHANGEMENT CLIMATIQUE ET DE L'ADAPTATION DE LA FILIÈRE VITI-VINICOLE FRANÇAISE - PROJET LACCAVE

Nathalie OLLAT[1] et Jean Marc TOUZARD[2]

[1] ISVV-INRA, UMR EGFV « Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne », 210 chemin de Leysotte, 33140 Villenave d'Ornon

[2] INRA-Supagro, UMR « Innovations », place Viala, 34000 Montpellier

Plus que d'autres productions agricoles, la viticulture et l'ensemble de la filière vinicole française devront faire face à l'enjeu majeur du changement climatique. Compte tenu de l'importance socio-économique de cette filière et des spécificités de la viticulture au regard du climat, du territoire et de l'innovation technologique, l'INRA a jugé important de mettre en œuvre un nouveau programme scientifique pluridisciplinaire (« métaprogramme ») pour étudier les impacts du changement climatique sur la culture de la vigne et la production de vin dans les différentes régions françaises, ainsi que les stratégies possibles d'adaptation. Ainsi 23 laboratoires de recherche français se sont associés pour relever ce défi et construire le projet LACCAVE (figure 1). En lien avec les instituts de recherche-développement et les organisations professionnelles, l'objectif du projet LACCAVE est de construire un savoir partagé sur la question du changement climatique, ainsi que des données, des pistes de réflexion et des éléments de décision pour mieux répondre à l'enjeu de l'adaptation de la filière au changement climatique.

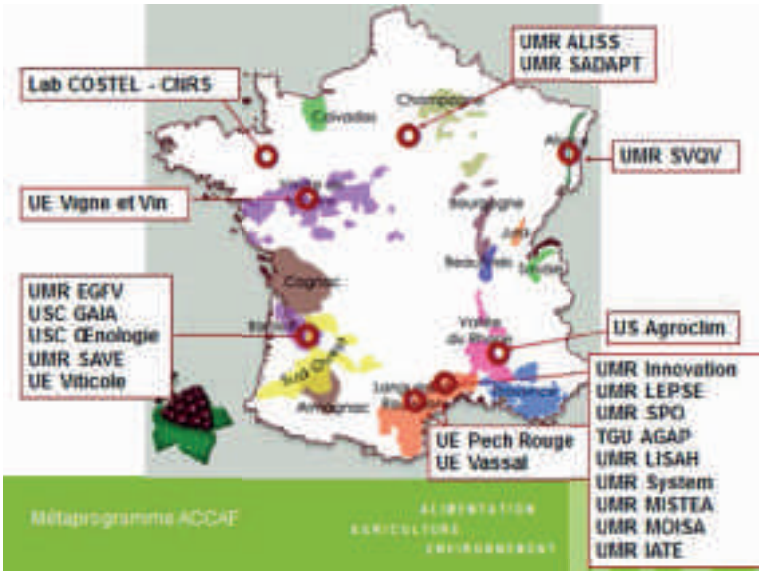


Figure 1 : liste des laboratoires impliqués dans le projet Laccave

1 - CADRE GÉNÉRAL DU PROJET

Le changement climatique est en cours. Pour la fin du siècle, les différents scénarios évaluent les conséquences de concentrations atmosphériques en CO_2 entre 540 et 950 ppm. L'accroissement moyen de la température de surface est estimé, d'après les simulations réalisées pour le 4ème rapport du GIEC, dans la fourchette de 1,8 à 4° C entre 1980-1999 et 2090-2099. Les prédictions sur la pluviométrie sont plus incertaines, mais elles font état d'une légère augmentation de la moyenne annuelle, avec une tendance à la diminution en période estivale dans les zones tempérées de moyenne latitude, qui serait nettement plus marquée autour du pourtour méditerranéen. En plus de ces variations de climat moyen, il est vraisemblable que le changement climatique s'accompagne d'un accroissement de la variabilité temporelle et spatiale et des extrêmes.

Même si tout doit être mis en œuvre pour les éviter (notamment par le contrôle des émissions de gaz à effet de serre), les dérèglements climatiques projetés sont probables en raison de l'inertie du système climatique et des engagements encore limités des pays. L'adaptation sera donc nécessaire, inévitable. Celle-ci doit être envisagée comme un complément désormais indispensable aux actions d'atténuation (réduction des émissions). L'adaptation au changement climatique peut se définir comme l'ensemble des actions contribuant à ajuster les systèmes naturels ou humains en réponse à des phénomènes climatiques, afin d'atténuer leurs effets néfastes ou d'exploiter leurs effets bénéfiques. Car si le réchauffement climatique induira des coûts pour la société, il entraînera également des opportunités qu'il s'agira de saisir (www.clermont.inra.fr/adage).

C'est pourquoi l'INRA a mis en place une opération de structuration transdisciplinaire de ses recherches, dénommée Métaprogramme ACCAF (Adaptation au Changement Climatique des AgroSystèmes et de la Forêt), dont l'objectif est d'évaluer les risques associés aux événements climatiques extrêmes et de définir des stratégies visant à anticiper et pallier les impacts de crises climatiques. il s'agit plus particulièrement : de prévoir (avec une quantification des incertitudes associées) les impacts régionaux du changement climatique sur l'agriculture et les écosystèmes diversement anthropisés, ; de comprendre et de maîtriser les principaux effets du changement climatique sur les dynamiques de la biodiversité (aires de répartition des espèces, ressources génétiques) et de la santé (espèces invasives, bioagresseurs, maladies) des écosystèmes ; d'adapter des espèces cultivées ou domestiquées aux modifications du climat et de la composition de l'atmosphère (CO_2) et de renforcer la capacité d'adaptation des systèmes de production et des filières ; de développer des technologies innovantes de l'adaptation compatibles avec la réduction des émissions et le renforcement des puits de gaz à effet de serre ; d'identifier les coûts et les bénéfices de mesures d'adaptation acceptables au regard d'autres enjeux (compétitivité économique, biodiversité, ressources en eau et en sols, critères de qualité fixés par l'aval) ; de définir des modes d'organisation collective (gouvernance des territoires, assurances, formation, innovation, valorisation) susceptibles de renforcer la capacité d'adaptation de l'agriculture et de la forêt au changement climatique
(http://www.inra.fr/les_recherches/metaprogrammes/adaptation_au_changement_climatique_de_l_agriculture_et_de_la_foret).

2 - QUE SAIT-ON DÉJÀ SUR LA VIGNE ?

La culture de la Vigne (*Vitis vinifera*) est contrainte à une gamme climatique étroite et par conséquent est particulièrement sensible aux changements climatiques (CC), avec des effets potentiels sur le rendement, la qualité et la viabilité économique (Jones *et al.* 2005). Depuis que la vigne est cultivée, des régions de production spécifiques ont été établies dans des zones climatiques précises. En combinaison avec des variétés et des pratiques culturales déterminées, les conditions climatiques ont joué un rôle décisif dans le développement de vins typiques (Schultz et al. 2010). Conjointement avec d'autres paramètres de l'environnement, les caractéristiques climatiques ont été utilisées au fil du temps pour délimiter pratiquement et juridiquement ces régions ou « terroirs ». En France, le système d'appellation est allé plus loin en ajoutant à la définition juridique des régions viticoles, des règlements pour les pratiques et les variétés. Au sein des productions agricoles, la viticulture française a développé des relations très particulières et codifiées avec les espaces géographiques d'une part, et la technologie d'autre part. Elle est à cet égard emblématique et représente un agro-système modèle pour analyser les impacts du changement climatique et étudier des stratégies d'adaptation (Seguin, 2010).

Plusieurs auteurs (Schultz 2000, Brisson et Levrault 2010, Garcia de Cortazar Atauri 2006, Pieri 2010) montrent que le CC aura un impact majeur sur la phénologie de la vigne. En raison de l'augmentation des températures, une avance de 20 à 40 jours pour tousles stades de développement peut être envisagée. Cette avance peut conduire de nouvelles régions situées au Nord de la France à devenir favorables à la culture de la vigne. Par ailleurs le confort hydrique des plantes serait réduit, avec des impacts négatifs principalement dans le Sud de la France, y compris le Sud-Ouest. La maturation aurait lieu dans des conditions beaucoup plus chaudes qu'aujourd'hui, avec des impacts majeurs sur la composition des baies et sur l'aptitude à élaborer les types actuels de vins (Duchêne *et al.* 2010). De plus, la variabilité devrait augmenter, et les interactions plante-pathogènes seront modifiées (Pangga *et al.* 2011). Tous ces défis nécessiteront des adaptations des viticulteurs, des producteurs de vin, des consommateurs et des décideurs. Jusqu'ici, très peu d'études ont été consacrées en France et à l'étranger à la capacité de l'industrie du vin à s'adapter au changement climatique (Holland *et al.* 2010).

La plupart des experts soulignent la complexité de la question du CC aux niveaux physique, biologique, technique, social, économique et culturel, notamment pour la viticulture et la production du vin (Jones *et al.* 2010). Il existe une grande variabilité de situations au sein des zones viticoles, en raison de la géomorphologie, de la couverture du sol, de la proximité des étendues d'eau et des zones urbaines (Bois *et al.*, 2008). Les paramètres environnementaux (température, eau, CO_2, éléments minéraux) qui seront affectés par le CC agiront probablement de manière interactive. Leurs effets combinés à l'échelle de la plante en tenant compte des nombreuses combinaisons porte-greffe / greffon (caractéristiques de cette plante pérenne ligneuse greffée) sont très difficiles à prédire. La composition des fruits résultant de ces changements est un enjeu majeur pour la viticulture. L'adaptation du matériel végétal, des pratiques culturales et œnologiques sera déterminante (van Leeuwen *et al.*, 2007, Ollat *et al.*, 2011). La relocalisation des vignobles peut également représenter une alternative. La capacité adaptative de la filière viti-vinicole va être influencée par de nombreux facteurs économiques, sociologiques et législatifs et il faut obligatoirement envisager des stratégies différentes d'une région à l'autre (Hinnewinkel, 2007). Par conséquent, des approches globales et pluridisciplinaires sont clairement nécessaires pour proposer des solutions efficaces d'adaptation fondées sur la combinaison d'innovations techniques, de stratégies de localisation et de changements institutionnels.

3 - LE PROJET LACCAVE

Coordonné conjointement par un chercheur de Bordeaux et un chercheur de Montpellier, le projet est structuré en 7 groupes de travail plus ou moins disciplinaires qui doivent progressivement interagir entre eux, et développer des liens avec les Instituts de recherche-développement et les organisations professionnelles. Laccave s'est également adjoint un Conseil Scientifique International composé de 5 experts originaires de différents pays européens, Etats Unis, Brésil, Afrique du Sud.

Le projet repose sur une analyse systémique de la problématique telle que représentée sur la figure 2.

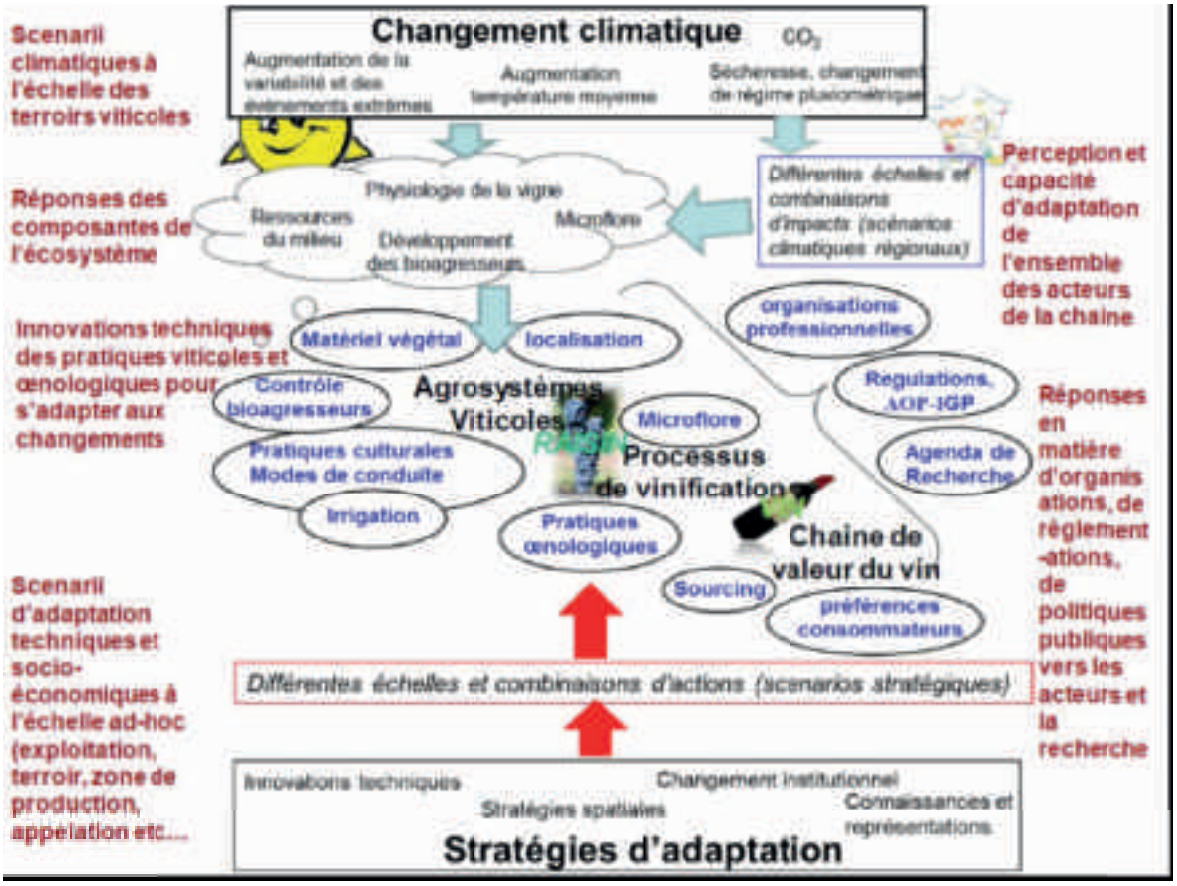


Figure 2 : représentation systémique des éléments pris en considération dans le projet Laccave pour étudier les impacts à long terme et l'adaptation de la filière viti-vinicole française au changement climatique

3-1 : Caractérisation et perception du Changement Climatique :

Ce groupe a pour objectif de rassembler et produire les connaissances de bases nécessaires au bon déroulement du projet. Il doit fournir à partir des prévisions actualisées du GIEC des prédictions régionalisées du climat à différentes échelles d'espace, et ce pour les différentes périodes concernées (avant 2050, période 2050-2100). Par ailleurs, il vise à mieux évaluer la perception qu'ont les différents acteurs de la filière du Changement Climatique, et à définir les paramètres qui influencent cette perception. Cette information est capitale pour réfléchir au processus d'adaptation. Finalement ce groupe doit contribuer à produire des synthèses des

connaissances nécessaires à tous les participants au projet, sachant qu'ils viennent d'horizons et de disciplines très différentes. Une attention spéciale sera portée aux questions de l'évolution des risques maladies.

3-2 : Bases physiologiques et génétiques de l'adaptation de la vigne au changement climatique :

Ce groupe a pour objectif de mieux établir les réponses de la vigne aux paramètres du climat (CO_2, température, eau) et d'en identifier les déterminants génétiques qui contrôlent ces réponses et les différences variétales (au niveau cépages et porte-greffes). La phénologie, la croissance végétative, la consommation en eau, le développement des raisins et leur composition (sucres, acides, composés aromatiques) seront plus particulièrement analysés. Les conséquences des modifications de la composition des raisins, mais aussi de la microflore du vignoble, sur l'élaboration des vins seront également étudiées. Globalement ce groupe de travail va bénéficier des recherches menées dans différents projets et en fera une synthèse. Il œuvrera à la mise en réseau des dispositifs expérimentaux et à la définition de protocoles communs pour la caractérisation du matériel végétal (phénotypage). Finalement il tentera d'intégrer les connaissances acquises dans des démarches de modélisation qui permettront à terme de simuler le comportement de la vigne dans des scénarii climatiques futurs.

3-3 : Tester des innovations technologiques pour l'adaptation au CC :

Ce groupe de travail a pour objectif de mettre au point et d'étudier les conditions techniques de mise en œuvre d'une gamme d'innovations qui pourraient permettre d'adapter la culture de la vigne et l'élaboration des vins au changement climatique. Ces pratiques innovantes sont relatives : aux procédés œnologiques et notamment à la manière dont ils peuvent répondre aux modifications attendues de la composition des raisins ; aux systèmes de culture de la vigne sous leurs différents aspects (densité de plantation, mode d'entretien du sol, taille, palissage, rapport feuilles/fruits), y compris l'irrigation ; au matériel végétal en essayant dans un premier temps de valoriser la diversité existante au niveau cépages et porte-greffes. Un des points clefs de ce groupe de travail est de mettre en œuvre une démarche de construction d'idéotypes variétaux sur la base d'une analyse systémique des besoins, des possibles et du potentiel adaptatif du matériel végétal.

3-4 : Evaluer les innovations et stratégies spatiales dans les terroirs :

Ce groupe de travail a pour objectif d'évaluer à l'échelle locale (petite région viticole, bassin versant) l'impact attendu du changement climatique en tenant compte des pratiques viticoles, et les conséquences de la mise en œuvre de pratiques adaptatives (technologiques, relocalisation) sur la durabilité et la pérennité du vignoble. Des évaluations multicritères prenant en compte la question de la typicité et des services écosystémiques (ressources en eau, protection des sols) seront mises en œuvre. L'évaluation de l'acceptation des pratiques adaptatives par les acteurs sera également conduite à partir d'interviews larges sur des questions de terroir, de typicité et d'impact environnemental, puis à partir de travaux de groupes sur les innovations, les transformations et les adaptations possibles. Quelques vignobles seront plus particulièrement étudiés : Val de Loire (Coteaux du Layon et Saumur Champigny) ; Languedoc-Roussillon (Roujan, Peyne, Banyuls).

3-5 : Evolution des stratégies économiques :

Le changement climatique va avoir un effet sur les coûts de production et sur la relation entre qualité et origine géographique. Ces éléments sont déterminants pour la compétitivité des entreprises de la filière, à l'échelle locale, mais aussi nationale et internationale. Le groupe de travail a pour objectif d'étudier les effets du CC sur la stratégie des producteurs et des consommateurs au sein de la chaîne de commercialisation du vin, sur les processus de

compétitions entre les régions viticoles et sur les réglementations au sein de la filière viti-vinicole. Comme il n'est pas envisageable d'analyser les conséquences économiques du changement climatique de manière exhaustive, les travaux seront focalisés sur l'analyse de la perception des consommateurs vis-à-vis des changements attendus du profil des vins d'une région donnée, sur les stratégies des producteurs et des entreprises associées en fonction de l'évolution de la demande des consommateurs et des coûts de l'adaptation et sur la compétition entre vignobles régionaux à l'échelle européenne. Finalement les impacts potentiels du CC sur la réglementation notamment en matière d'indication géographique seront analysés.

3-6 : Gestion et analyse des informations :

Ce groupe de travail a comme objectif de réfléchir au développement d'un système d'information pour la filière viti-vinicole, en rassemblant les informations de différentes natures, pré-existantes sur le sujet et issues du projet. Un état des lieux des outils bases de données existantes et des besoins des participants au projet sera conduit. Par ailleurs des méthodes d'analyses de données complexes et intégrées seront proposées aux participants.

3-7 : Construction de scénarios stratégiques pour 2050 :

Sur la base des démarches éprouvées de prospective, le groupe de travail doit construire des scénarios stratégiques d'adaptation de la filière viti-vinicole au changement climatique. Ces scénarios doivent constituer à la fois un cadre de réflexion et de travail pour l'ensemble du projet, mais aussi s'enrichir des résultats des différents groupes de travail du projet. L'originalité de la démarche repose sur le choix de partir de pré-scénarios basés sur 4 stratégies d'adaptation : stratégie conservatrice qui tend à maintenir autant que faire se peut les choses en l'état ; stratégie mettant en avant des innovations techniques importantes afin de maintenir les vignobles en place ; stratégie basée sur la délocalisation des vignobles en fonction de l'évolution du climat ; stratégie de dérèglementation totale où tout est possible partout. Une fois l'exercice de construction des scénarios réalisé, le groupe de travail les proposera à différentes régions viticoles comme base de réflexion et de travail concernant les stratégies particulières à envisager pour chaque vignoble. Il est bien entendu qu'aucune stratégie ne sera générale et que l'adaptation se fera via un ensemble de leviers qui sera spécifique à chaque situation. Le projet ne vise pas à proposer des solutions clefs en main, mais des outils de réflexion qui devront servir à définir de nouvelles questions-clefs de recherches et des recommandations pour les décideurs et les acteurs.

4 - QUID DES TRAVAUX À BORDEAUX ?

Cinq équipes de recherche bordelaise sont impliquées dans le projet Laccave et développent des travaux en lien avec le changement climatique. Il s'agit des UMRs EGFV et SAVE, des USCs OEnologie et Gaia[1] et de l'Unité expérimentale Viticole INRA de Bordeaux. Ces travaux reçoivent des soutiens financiers de la part du CIVB et de la Région Aquitaine. En premier lieu, les données issues du réseau de suivi de maturation géré depuis de nombreuses années par l'USC d'oenologie seront analysées en profondeur afin de mieux identifier les effets déjà observés du CC dans notre région. Par ailleurs, suite à la thèse de Benjamin Bois, des travaux sont conduits par l'UMR EGFV en lien avec le laboratoire COSTEL de Rennes pour cartographier le climat thermique à l'échelle du vignoble de St Emilion, et à l'échelle de différentes propriétés en Médoc, Pessac-Léognan et St Emilion. Cette cartographie associée à de la modélisation devrait permettre de connaître les facteurs qui expliquent la variabilité du climat à ces échelles, dans un objectif de valorisation de cette variabilité comme paramètre

[1] Gouvernance des Coopératives des Territoires, de l'Environnement et des Entreprises Agricoles

d'adaptation au changement climatique. Des suivis phénologiques et de maturation sont associés à la cartographie thermique, et s'accompagnent dans certains cas de microvinifications pour évaluer les effets sur le vin (USC OEnologie). Une attention particulière est également portée au matériel végétal (greffon et porte-greffe) comme paramètre d'adaptation au changement climatique. Un important dispositif expérimental de terrain rassemblant 52 cépages de différentes origines a été installé par l'UMR EGFV sur le domaine expérimental de l'INRA, afin de mieux évaluer leurs potentialités agronomiques et œnologiques sur le long terme en Bordelais. Les suivis de phénologie et de maturation ont débuté depuis 3 ans. Les données sont conservées dans une base de données VIT-PHE élaborée dans ce cadre. Des travaux sont également conduits par l'UMR EGFV sur les porte-greffes et leur rôle dans l'adaptation à la sécheresse de la vigne. Les bases physiologiques et génétiques sont étudiées grâce à une plateforme de 150 balances établie pour induire des contraintes hydriques très contrôlées. Ces travaux devraient se poursuivre pour explorer une très large gamme de diversité génétique et vérifier les observations au vignoble. La diversité génétique est également étudiée à l'échelle des microorganismes par l'USC OEnologie afin de sélectionner des levures ayant des potentialités adaptées à la composition modifiée des raisins. D'autres recherches conduites à EGFV visent à comprendre et à modéliser l'effet de la température sur le développement des raisins et l'accumulation des composés de la qualité. L'impact du changement climatique sur les maladies de la vigne est une question centrale. L'UMR SAVE met en place des recherches qui auront pour objectif de mieux identifier les facteurs de risques et comment se préparer à y faire face. Par ailleurs l'étude des conséquences économiques du changement climatique sur la filière viti-vinicole est au cœur de deux projets dont l'un vise à étudier la réponse des consommateurs aux nouveaux types de vin qui pourront être produits et l'autre à étudier les impacts économiques des adaptations à mettre en œuvre par les producteurs. Ces projets sont conduits en collaboration par les USC Gaia, OEnologie et l'UMR Aliss (Paris).

Enfin, sur commande de la Région Aquitaine, un ouvrage sur les impacts du changement climatique en Aquitaine est cours de rédaction sous la direction du climatologue et membre du GIEC, Hervé le Treut. Un chapitre y traitera spécifiquement de l'agriculture et de la viticulture. Il devrait être disponible en fin d'année 2013.

5 - CONCLUSIONS

Au cours du XXIème siècle, la viticulture, comme le reste de l'agriculture, devra faire face à un enjeu majeur qu'est le changement climatique. Compte tenu de l'importance socio-économique de cette filière, il est important de se préparer le mieux possible à ces évolutions et de mettre tout en œuvre pour s'y adapter. Que ce soit au niveau national ou au niveau régional, les chercheurs de différents organismes ont initié des projets pluridisciplinaires et collaboratifs pour mieux en évaluer les impacts et réfléchir aux adaptations possibles. Il est déterminant que ces recherches soient menées en collaboration étroite avec les professionnels afin de répondre au mieux à leurs interrogations et leurs attentes.

BIBLIOGRAPHIE

Bois B., Wald L., Pieri P., Van Leeuwen C., Commagnac L., Chery P., Christen M., Gaudillère J.P., Saur E., 2008. Estimating spatial and temporal variations in solar radiation within Bordeaux winegrowing region using remotely sensed data. J. Int. Sci. Vigne Vin, 42, n°1, 15-25.

Brisson N., Levrault F., 2010. Le Livre Vert du projet CLIMATOR. Ed. ADEME. 334p

Duchêne, E., Huard, F., Dumas, V., Schneider, C. and Merdinoglu, D., 2010. The challenge of adapting grapevine varieties to climate change. Climate Research 41, 193-204.

Garcia de Cortazar Atauri, I., 2006. Adaptation du modèle STICS à la vigne (Vitis vinifera L.). Utilisation dans le cadre d'une étude d'impact du changement climatique à l'échelle de la France. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Montpellier, 291 pp.

Hinnewinkel, J.C. 2007. Le vignoble bordelais à l'épreuve du changement climatique. In Proceedings of "Réchauffement climatique, quels impacts probables sur les vignobles ? 28-30 mars 2007, Dijon.

Holland, T. and Smit, B., 2010. Climate Change and the Wine Industry : Current Research Themes and New Directions. J. Wine R. 21, 125-136.

Jones, G. V. and Webb, L. B., 2010. Climate change, viticulture, and wine: Challenges and opportunities. J. Wine Res. 21, 103-106.

Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R. and Storchmann, K., 2005. Climate change and global wine quality. Climate Change 73, 319-343.

Ollat N., Fernandez L., Romieu C., Duchene E., Lissarague J.R., Lecourieux D., Ageorges A., Kelly M., Cacho J., Rivas J., Lamuela R., Goutouly J.-P., Van Leeuwen C., Marguerit E., Peccoux A., Barrieu F., This P., Lebon E., Pellegrino A., Martinez- Zapater J.M., Toregrossa L., 2011. Multidisciplinary research to select new cultivars adapted to climate changes. XVIIth International GIESCO meeting August 29 - September 2 2011, Asti and Alba, Italy.

Pangga IB, Hanan J, Chakraborthy S., 2011. Pathogen dynamics in a crop canopy and their evolution under changing climate, Plant Pathol. 60: 70-81.

Pieri, P., 2010. Changement climatique et culture de la vigne: l'essentiel des impacts. In, Changement climatique, agriculture et forêt en France: simulations d'impacts sur les principales espèces. Le Livre Vert du projet CLIMATOR (2007-2010), Ademe, ed, pp. 213-223.

Schultz H.R., 2000. Climate change and viticulture: a European perspective on climatology, carbon

Schultz, H. R. and Jones, G. V., 2010. Climate induced historic and future changes in viticulture. J.

Seguin B., 2010. Coup de chaud sur l'agriculture. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris. 206p

Van Leeuwen C., Bois B., Pieri P. and Gaudillère J.-P., 2007. Climate as a terroir component. Congress on climate and viticulture, 10-14 April 2007, Zaragoza, Spain.

LA MODÉLISATION DE LA PHÉNOLOGIE COMME OUTIL POUR CHOISIR LE MATÉRIEL VÉGÉTAL DANS UN CLIMAT CHANGEANT

Cornelis (Kees) van Leeuwen[1,2*], Amber Parker[1,2,3,4], Agnès Destrac[5], Laure de Rességuier[1,2], Inaki García de Cortázar-Atauri[6], et Isabelle Chuine[7]

[1]Univ. Bordeaux, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon, France

[2]Bordeaux Sciences Agro, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon, France

[3]The New Zealand Institute for Plant & Food Research Ltd. Marlborough Wine Research Centre, 85 Budge St, PO Box 845, Blenheim 7240, New Zealand.

[4]Lincoln University, P.O. Box 84, Lincoln 7647, New Zealand.

[5]INRA, ISVV, Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne, UMR 1287, F-33140 Villenave d'Ornon, France

[6]INRA-Agroclim, Domaine St Paul - Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France.

[7]Centre d'Ecologie Fonctionelle et Evolutive, Equipe Bioflux, CNRS, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

Pour correspondance : vanleeuwen@agro-bordeaux.fr

Mots clés : vigne, modélisation, phénologie, véraison, floraison, température, spatialisation, échelle, phénotypage.

RÉSUMÉ

Le climat est un facteur majeur de la production viticole. Par conséquent, les viticulteurs doivent faire évaluer leurs pratiques dans un climat changeant. Une meilleure connaissance des exigences thermiques de la vigne peut être obtenue grâce à la modélisation. Avec de bons modèles, il est possible de classer la précocité de la vigne, pour différents stades phénologiques, sur des critères objectifs. Une connaissance fine de la variabilité climatique dans la zone de production des vins de Bordeaux permet d'optimiser l'encépagement en fonction des possibilités thermiques offertes par le milieu. Enfin, le phénotypage d'un grand nombre de cépages permet d'étudier le comportement de tous les cépages bordelais, mais aussi de cépages non cultivés dans la zone de production des vins de Bordeaux. Ces travaux permettront de fournir des bases pour une réflexion sur une éventuelle introduction de variétés nouvelles dans l'encépagement de Bordeaux, à moyen ou long terme.

INTRODUCTION

Les conditions climatiques ont un effet majeur sur le développement de la vigne, la composition du raisin à maturité, ainsi que sur la qualité et la typicité du vin. Le climat varie dans l'espace (chaque région viticole est caractérisée par des conditions climatiques moyennes spécifiques) et dans le temps (il s'agit de l'effet « millésime »). Jusqu'à il y a une vingtaine d'années, la variabilité climatique inter-annuelle était considérée comme aléatoire. Depuis la fin du XXe siècle, les statistiques montrent que les conditions climatiques évoluent vers des températures plus élevées dans la très grande majorité des régions du globe. Cette évolution n'est évidemment pas sans conséquences sur la viticulture.

Malgré l'importance évidente du climat sur la qualité du vin, il n'est pas possible de définir des conditions climatiques optimales pour la production de vins de grande qualité. En effet, on produit de grands vins dans des régions aux conditions climatiques très diverses : la Moselle en Allemagne, la Bourgogne, le Bordelais, les Côtes du Rhône, la Napa Valley en Californie, etc. Pour comprendre l'effet du climat, il faut prendre en considération son interaction avec le matériel végétal. Les cépages cultivés de l'espèce Vitis vinifera varient considérablement dans leur précocité. Lorsqu'un grand nombre de cépages est cultivé dans un même endroit, leur maturité s'étale sur plus de deux mois. On peut aussi quantifier la précocité d'un cépage par son besoin en chaleur pour amener ses raisins à maturité : un cépage précoce a besoin d'une plus faible quantité de chaleur pour atteindre la maturité qu'un cépage tardif. On constate que la production de vins de grande qualité n'est possible que lorsque l'époque de maturité du cépage cultivé est en adéquation avec les conditions climatiques locales. Lorsque le cépage est trop tardif par rapport aux conditions climatiques de l'endroit dans lequel il est cultivé, les raisins ne peuvent pas atteindre une maturité satisfaisante. Ils restent acides, peu sucrés et herbacés. Il est évident qu'une telle composition du raisin est incompatible avec la production d'un vin de qualité. Lorsque le cépage est précoce par rapport aux conditions climatiques locales, la maturité est atteinte au cœur de l'été. Produits dans ces conditions, les raisins sont riches en sucres et peu acides, et donnent des vins déséquilibrés qui manquent de fraîcheur. On constate, par ailleurs, qu'une maturation dans des conditions chaudes limite le potentiel aromatique du raisin. En zone d'appellation, les viticulteurs ont toujours choisi des cépages dont la précocité est adaptée aux conditions climatiques locales, pour que la maturité ne soit atteinte ni trop tôt ni trop tard. Ceci se traduit par une époque de vendanges qui a généralement lieu entre le 10 septembre et le 10 octobre dans l'hémisphère Nord, malgré la diversité des conditions climatiques des régions viticoles réputées.

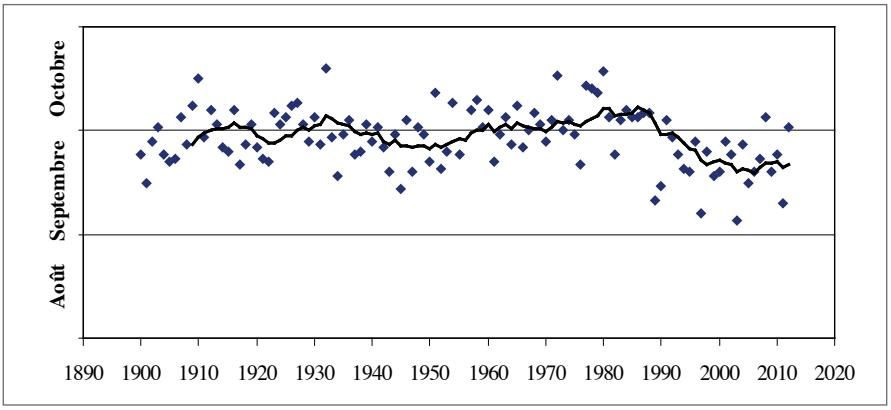


Figure 1 - Evolution de la date du début des vendanges dans une propriété viticole du Bordelais entre 1900 et 2012 (le Jour Julien 273 correspond au 30 septembre). La courbe correspond à la moyenne mobile sur 10 ans.

La phénologie de la vigne est en train d'être modifiée par l'effet du réchauffement climatique, même si la généralisation de pratiques culturales accélérant la maturité y participe également. Cette modification a débuté il y a environ 25 ans et se traduit par une avance de la date des vendanges d'une quinzaine de jours (Figure 1). Pour beaucoup de régions viticoles, l'avance des dates de maturité a permis d'atteindre plus régulièrement une excellente maturité du raisin et s'est traduite globalement par une amélioration de la qualité des vins produits. Cette amélioration est particulièrement nette pour les vins produits à base de Cabernet-Sauvignon dans le Bordelais et à base de Cabernet franc dans le Val de Loire. Historiquement, dans ces régions, ces cépages étaient cultivés à l'extrême limite septentrionale de leur zone de culture. Si la tendance du réchauffement climatique se poursuit, il est possible que, dans certaines appellations, l'époque de maturité de cépages traditionnellement cultivés devienne trop précoce. Ces cépages pourraient alors quitter la fenêtre optimale de l'époque de maturité. Ce risque est important pour les cépages qui sont historiquement précoces pour la zone climatique dans laquelle ils sont cultivés. Ceci est le cas, par exemple, du Sauvignon blanc à Bordeaux. Lorsque la maturité de ces cépages sera régulièrement atteinte au mois d'août, les vins risqueront alors de manquer de fraîcheur et d'expression aromatique et leur qualité en sera diminuée. Pour continuer à produire des vins de qualité qui expriment leur terroir dans un contexte de réchauffement climatique, les viticulteurs peuvent tenter de retarder le cycle phénologique par une modification de techniques culturales (taille tardive, augmentation de la hauteur du tronc, modification des opérations en vert…) ou l'utilisation de porte-greffe à cycle plus long (420A). Il est également possible d'adapter l'encépagement et d'évoluer progressivement vers des cépages dont l'époque de maturité est plus tardive. Pour les régions viticoles qui ont aujourd'hui un encépagement diversifié et dont l'époque de maturité des cépages cultivés varie, cette évolution de l'encépagement pourra se faire dans un premier temps à partir de ressources internes. A moyen terme il pourrait être nécessaire d'introduire des cépages plus tardifs, non autochtones, pour maintenir la date de maturité à l'intérieur de la fourchette optimale, compatible avec la production de vins fins. Le changement de l'encépagement semble être une solution radicale et peut susciter une appréhension. Cependant, il ne faut pas oublier que l'encépagement de la plupart des appellations a évolué dans le temps sans forcément altérer la notoriété de ces régions de production. Jusqu'au milieu du XIXème Siècle le Cot (ou Malbec) était un cépage important dans le Bordelais et le Merlot était quasi inconnu. La disparition du Cot au profit du Merlot n'a aucunement porté atteinte à la réputation des vins de Bordeaux.

Pour étudier l'adaptation de l'encépagement aux conditions climatiques changeantes il est utile de mieux connaître et prévoir le comportement des différents cépages de l'espèce Vitis vinifera face aux conditions climatiques, et en particulier les températures. La modélisation de la phénologie est l'outil qui permet d'atteindre cet objectif. Ensuite il est important de mieux connaître la variabilité spatiale du climat à l'intérieur de la zone de production des vins de Bordeaux. Cela permettra d'affiner le choix du cépage à chaque endroit du département de la Gironde. Enfin, il est utile d'étudier le comportement d'un grand nombre de cépages dans le climat bordelais. Ce suivi fournira des données pour créer et valider les modèles de phénologie et aussi d'accumuler des données sur leurs performances en terme de qualité et de typicité.

LA MODÉLISATION DE LA PHÉNOLOGIE

La phénologie traite de l'influence des conditions climatiques sur le développement des plantes et des animaux. Chez la vigne, des stades phénologiques importants sont le débourrement, la floraison et la véraison. Le plus souvent on parle de mi-débourrement, mi-floraison ou mi-véraison, lorsque 50 % des organes de la vigne ou de la parcelle ont atteint le stade en question. La maturité est un stade qu'il est difficile de déterminer au jour près. En effet, la maturité n'est

pas un stade bien précis et sa définition dépend du type d'utilisation des raisins : la composition du raisin à maturité n'est pas la même pour faire un crémant ou pour faire un vin rouge de garde. Comme la phénologie est fortement influencée par les conditions climatiques, il est possible de modéliser (c'est-à-dire de prévoir) le moment où une parcelle de vigne arrive à la mi-floraison ou la mi-véraison. Ces modèles utilisent essentiellement les températures, car il est établi que la phénologie est davantage déterminée par les températures que par la luminosité, les précipitations ou la vitesse du vent (Chuine *et al.*, 2000).

Plusieurs modèles existent pour modéliser la phénologie de la vigne : les degré-jours de Winkler (Winkler *et al.*, 1974), l'Indice de Branas (Huglin et Schneider, 1998) et l'Indice Héliothermique de Huglin (Huglin, 1978). Parmi ces modèles, le plus abouti est celui de Huglin, car il propose une classification de la précocité des cépages, basée sur l'Indice Héliothermique (Huglin et Schneider, 1998). Théoriquement, cette classification devrait permettre de choisir le cépage le plus adapté en fonction des potentialités thermique d'un endroit, à condition de disposer de données climatiques moyennes. Malgré un concept très novateur pour l'époque, une analyse approfondie du travail de Huglin montre les limites de cette étude. La classification de la précocité des cépages bordelais est incohérente : selon cette classification le Cabernet franc devrait mûrir avant le Merlot et le Sémillon en même temps que le Cabernet-Sauvignon ! Nous avons considéré qu'il était aujourd'hui possible de produire des modèles de phénologie et des classifications de la précocité des cépages plus précis, en utilisant :

(1) un très grand nombre d'observations de phénologie provenant de nombreux sites et années,
(2) des données météorologiques associées de grande qualité et
(3) des algorithmes mathématiques sophistiqués et la capacité de calcul d'ordinateurs pour les faire tourner.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la thèse d'Amber Parker.

Données et modèles testés

Plus de 4000 données ont été collectées dans des centres de recherches, des Instituts Techniques, des Chambres d'Agriculture et des domaines privés. Les données provenaient de 123 sites, couvraient la période 1960 à 2007 et concernaient une centaine de cépages. Pour chaque observation phénologique nous disposions de données climatiques quotidiennes collectées à moins de 5 km de distance, avec un dénivelé de moins de 100 m. Quatre modèles ont été testés, deux formes d'un simple modèle de degré-jours, proche du modèle de Winkler (appelé « Spring Warming » ou « SW »), et deux modèles plus sophistiqués (« UNIFORC » et « UniCHILL »). Un modèle plus sophistiqué est potentiellement plus précis, mais nécessite aussi plus de paramètres d'entrée et est, de ce fait, plus difficile à utiliser. Pour tester la qualité d'un modèle, on peut tester son efficience (plus EF est proche de 1, plus le modèle est performant), son RMSE (il s'agit approximativement de l'erreur de prédiction en jours, qu'on souhaite le plus bas possible) et son indice AIC (plus l'AIC est bas, plus le modèle présente un rapport intéressant entre la qualité de la prédiction et le nombre de paramètres nécessaires à faire tourner le modèle).

Résultats de la modélisation

Le modèle « Spring Warming » s'est avéré le plus intéressant, car il affichait à la fois une EF proche de 1, une faible erreur de prédiction et un faible indice AIC (Tableau 1). Le SW consiste à sommer les températures moyennes quotidiennes au-dessus d'un certain seuil, à partir d'une certaine date.

Modèle:	SW	SW t_0 = 1er janvier	UniFORC	UniCHILL
	Floraison			
EF	0,80	0,75	0,76	0,79
RMSE	5,4	6,1	6,0	5,6
	Véraison			
EF	0,74	0,57	0,72	0,69
RMSE	8,0	10,2	8,2	8,7

Tableau 1 - Performances de quatre modèles testés pour prévoir la floraison et la véraison.

Une fois le modèle « SW » sélectionné, il restait à déterminer la date à partir de laquelle établir la somme thermique (t_0) et la température de base (Tb). Plusieurs t_0 ont été testés entre le Jour Julien 1 (premier janvier) et le Jour Julien 100 (8 avril). C'est le Jour Julien 60 qui a donné les meilleures performances en terme d'efficience du modèle (Figure 2). Plusieurs Tb ont été testées entre 0 et 15°C. Ce sont de faibles Tb (inférieures à 4°C) qui ont donné les meilleurs résultats, en termes d'efficience du modèle en erreur de prédiction (Figure 3). Dans un souci de simplification pour les utilisateurs potentiels, la Tb de 0°C, très proche de l'optimum, a été retenue. Le modèle a été appelé « GFV » (Grapevine Flowering Veraison model) ; il consiste à sommer les températures moyennes quotidiennes à partir du Jour Julien 60, c'est-à-dire le premier mars (Parker et *al.*, 2011).

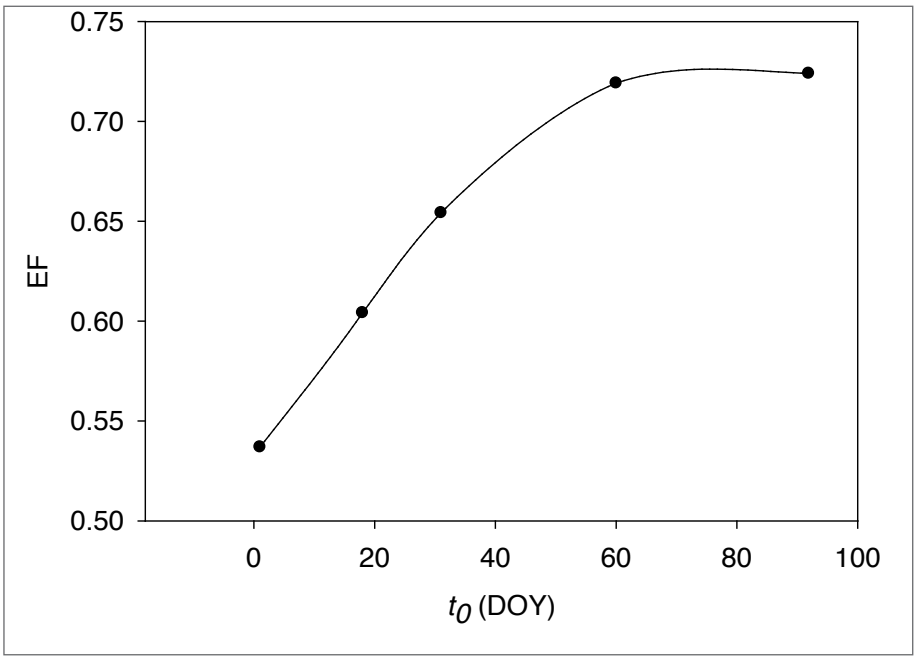


Figure 2 - Performances du modèle « SW » en fonction du jour de l'année à partir duquel la somme thermique est établie (DOY = Day Of the Year, ou Jour Julien)

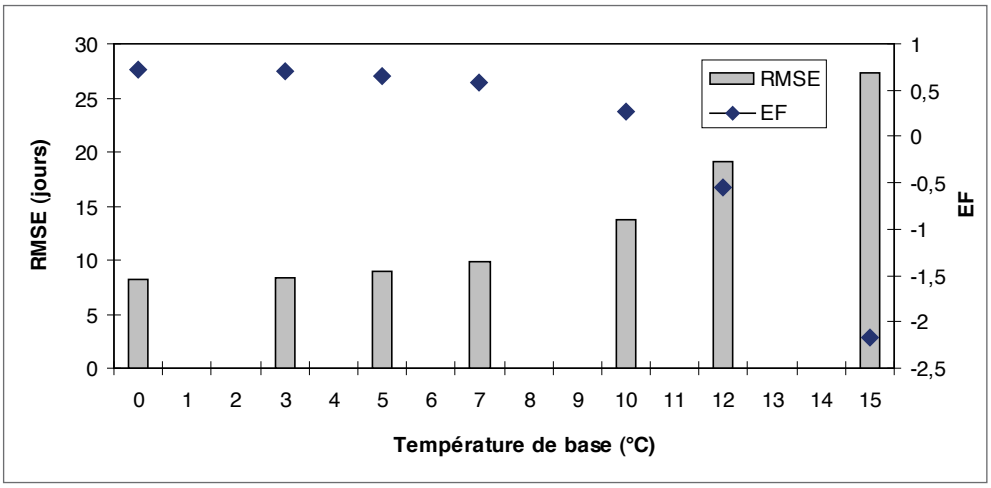


Figure 3 - Performances du modèle « SW » en termes d'efficience en de RMSE, en fonction de la température de base. Un bon modèle possède un EF proche de « 1 » et un RMSE le plus faible possible.

Validation

Le modèle a été validé à partir de données indépendantes, c'est-à-dire des données qui n'ont pas été utilisées pour la construction du modèle. Cette étape est essentielle dans le processus de modélisation, car elle permet de tester la généricité du modèle. Dans l'étape de la validation, il doit y avoir une bonne concordance entre les données observées et les données prédites par le modèle. Le modèle GFV a montré de bonnes performances au cours de la validation, qui a été conduite pour plus de dix cépages. Un exemple de la validation est donné dans la figure 4, pour les cépages Chardonnay et Merlot.

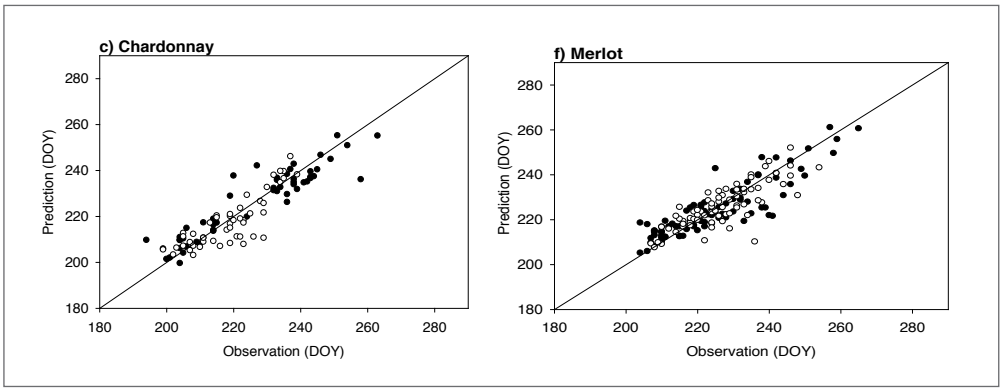


Figure 4 - Validation du modèle GFV pour les cépages Chardonnay et Merlot. Les ronds pleins correspondent aux données qui ont servi à créer le modèle et les ronds ouverts correspondent aux données de validation.

ETUDE DE LA VARIABILITÉ SPATIALE DU CLIMAT DE BORDEAUX

L'étude du climat est historiquement basée sur la comparaison de données issues de stations climatiques. Le climat des régions viticoles était caractérisé par les données climatiques d'une station de référence, souvent située dans la ville principale de la région (Gladstones, 1992). Cette approche avait une double limite. D'une part, le climat du site d'implantation de la station de référence est rarement représentatif de l'ensemble de la région : le climat de Mérignac n'est pas représentatif du climat du vignoble de Bordeaux. D'autre part, cette approche ne permet pas de connaître une éventuelle variabilité du climat à l'intérieur d'une région viticole donnée. La multiplication des stations climatiques automatiques et le progrès de la technologie informatique (en particulier l'avènement des Systèmes d'Information Géographiques (S.I.G.) et des logiciels de traitement d'images) permettent aujourd'hui d'étudier la variabilité spatiale du climat à l'intérieur d'une région viticole. Une étude de la variabilité climatique de la zone de production des vins Bordeaux, financée par le Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux (CIVB) a montré que le climat de cette région est beaucoup plus variable qu'on ne l'imaginait auparavant (Bois, 2007).

La variabilité spatiale des températures maximales dépasse 1,5°C dans le Bordelais. Certains secteurs apparaissent comme plus chauds, soit parce que les températures minimales sont plus élevées (Médoc, Blayais, ouest de l'Entre-Deux-Mers), soit parce que les températures maximales sont plus élevées (Pessac-Léognan, Graves, Sauternes) soit parce que les températures minimales et maximales sont plus élevées (Saint-Emilion et Pomerol). Cette variabilité spatiale du climat influence la date de maturité du raisin. Un écart de température moyen de 1,5°C peut induire un écart de maturité de l'ordre de 4 semaines. Il est clair qu'il est souhaitable d'adapter l'encépagement au potentiel thermique d'un endroit donné dans la zone de production des vins de Bordeaux : les secteurs frais sont mieux valorisés avec des cépages précoces et les secteurs chauds avec des cépages plus tardifs.

Les facteurs qui agissent sur la variabilité du climat en Gironde sont multiples : distance par rapport à l'océan et à l'estuaire, le relief (altitude, exposition, pente), la proximité d'agglomérations, la proximité du massif forestier situé à l'Ouest du département et le type de sol. Il est très probable qu'une variabilité significative du climat existe également à l'intérieur d'une appellation, ou d'un groupe d'appellations, avec des implications importantes pour la gestion technique du vignoble (choix du cépage et du porte-greffe, choix de la méthode d'entretien du sol, choix du système de conduite).

Un prolongement de l'étude de Bois (2007) a démarré en 2012 sur le secteur du Libournais, avec le soutien du CIVB, du GDON du Libournais, des Organismes de gestion des Appellations impliquées et du Crédit Agricole. Il consiste à augmenter la densité des mesures de températures d'un facteur 20 environ par rapport à l'étude de Benjamin Bois (Figure 5). L'étude climatique spatialisée, à l'échelle retenue, est particulièrement novatrice. Elle est aujourd'hui rendue possible par l'émergence de nouvelles technologies, en particulier la miniaturisation des stations automatiques à forte capacité de mémoire (plusieurs mois de stockage de données), les Modèles Numériques de Terrain (MNT), les géostatistiques et les Systèmes d'Information Géographiques (SIG). Les techniques développées pourront être appliquées plus tard à d'autres appellations du Bordelais. Outre la caractérisation du climat à échelle très fine, cette étude permettra de tester la validité des modèles de phénologie (et en particulier le modèle GFV) à cette échelle. Pour ce faire, la phénologie de la vigne est suivie sur 18 parcelles du réseau, en collaboration avec le Conseil du Vin de Saint-Emilion. Ce réseau a montré en 2012 des écarts dans les dates de la mi-floraison allant jusqu'à 10 jours et des écarts concernant la mi-véraison allant jusqu'à 18 jours.

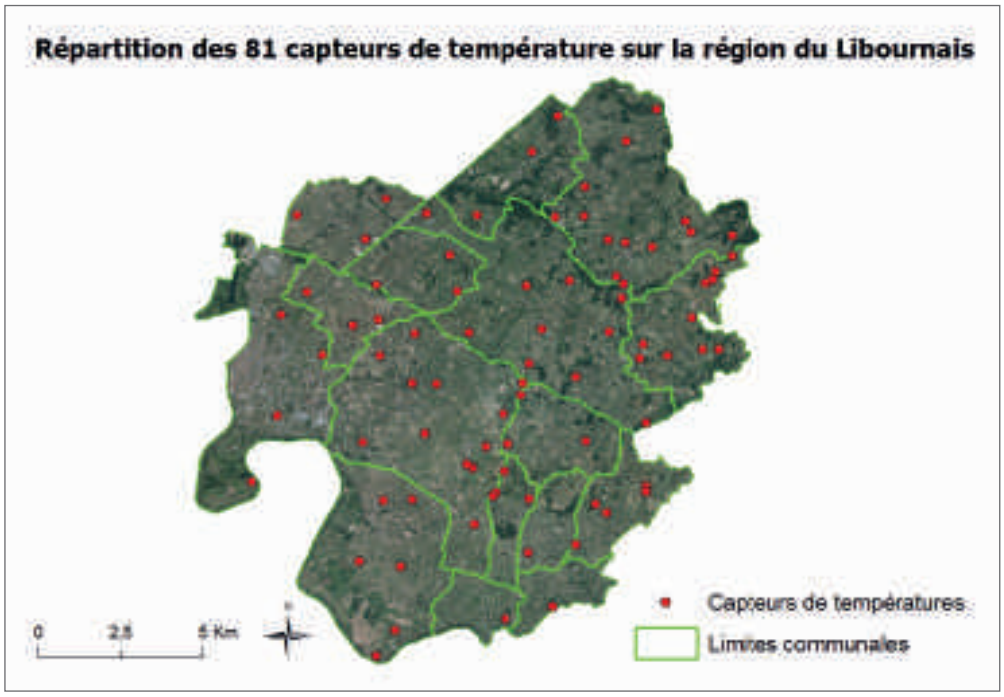


Figure 5 - Répartition des capteurs de température installés dans la région du Libournais Est

ETUDE DE COMPORTEMENT D'UN GRAND NOMBRE DE CÉPAGES DANS UN CLIMAT CHANGEANT

En 2009, une parcelle de phénotypage d'un grand nombre de cépages a été implantée sur le campus de la Grande Ferrade, à proximité de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, avec le soutien du CIVB. Les objectifs de cette parcelle sont multiples :

- étudier le comportement d'un grand nombre de cépages sur une longue période, dans un climat changeant
- étudier la typicité de ces cépages pour évaluer l'opportunité d'introductions dans l'encépagement bordelais
- fournir des données pour les travaux de modélisation
- fournir du matériel génétique parfaitement identifié aux équipes de génétique et de génomique fonctionnelle de l'ISVV.

Les cépages ont été choisis selon plusieurs critères. Tous les cépages actuellement autorisés dans la production des vins de Bordeaux sont présents ainsi que la grande majorité des cépages les plus plantés dans le monde. Une attention particulière a été portée à l'introduction de cépages tardifs, et de préférence ayant une typicité proche des variétés bordelaises (comme par exemple des cépages producteurs de thiols volatils pour les variétés blanches). Quelques variétés hybrides sont également présentes dans la collection. Pour que les données générées par la parcelle puissent être exploitées statistiquement, chaque cépage est présent avec 5 répétitions. Le phénotypage de la parcelle est le plus complet possible et comprend, entre autres, la notation des principaux stades phénologiques et des suivis complets de la maturation à partir de la mi-véraison, et ce pour chaque répétition individuellement (soit 250 analyses par semaine). La parcelle a commencé à fournir un jeu complet de données en 2012 ; la figure 6 est un exemple de résultat pour l'étude de la précocité des cépages au stade mi-débourrement.

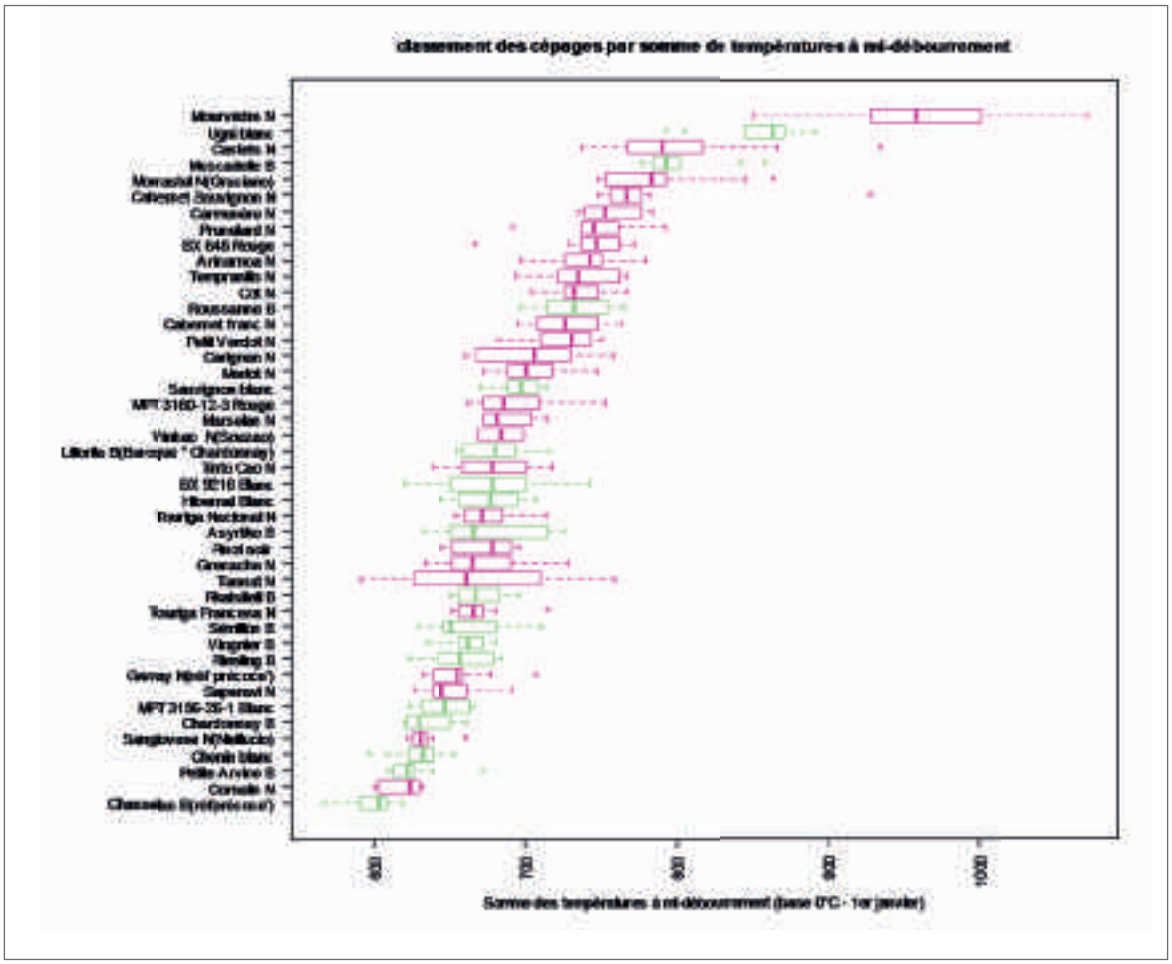


Figure 6 - Classification de la précocité de 44 cépages pour le stade mi-débourrement, en 2012, dans la parcelle de phénotypage de l'ISVV.

CONCLUSION

Le climat est un facteur important de la production viticole. Le changement climatique nécessite une adaptation de la viticulture, pour pouvoir continuer à produire des vins de qualité dans un nouveau contexte climatique. Une des pistes majeures de l'adaptation se situe au niveau du choix de l'encépagement. Des travaux de modélisation sont en cours pour mieux connaître le comportement de la vigne en fonction de la température et pour classer un grand nombre de cépages en fonction de leurs exigences thermiques. En parallèle, la variabilité climatique de la zone de production des vins de Bordeaux est étudiée à une échelle très fine. Enfin, le comportement d'un très grand nombre de cépages est étudié dans des conditions très rigoureuses. L'ensemble de ces travaux donnera aux viticulteurs de Bordeaux les données nécessaires pour faire évaluer leur matériel végétal dans un climat changeant.

RÉFÉRENCES

BOIS B., 2007. Cartographie agroclimatique à meso-échelle : méthodologie et application à la variable spatiale du climat en Gironde viticole. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 209 p.

CHUINE I., KRAMER K.and HÄNNINEN H., 2003. Plant development models. In: Phenology: an integrative environmental science,1st edn. Ed. M.D. Schwartz (Kluwer Press: Milwaukee, WI) pp. 217–235.

GLADSTONES J., 1992. Viticulture and environment. Ed. Winetitles, Adelaide, 310p.

HUGLIN P., 1978. Nouveau mode d'évaluation des possibilités héliothermiques d'un milieu viticole. *C.R. Acad. Agric.*, 1117-1126.

HUGLIN P., et SCHNEIDER Ch., 1998. Biologie et écologie de la vigne. Ed. Lavoisier Tec et Doc, Paris, 370p.

PARKER A., GARCIA de CORTAZAR ATAURI I., VAN LEEUWEN C. and CHUINE I., 2011. A general phenological model to characterise the timing of flowering and veraison of *Vitis vinifera L. Aust. J. Grape Wine Res.*, 17, n°2, 206-216.

WINKLER A., COOK J., KLIEWER W., LIDER L., 1974. General viticulture. University of California press, Berkeley, 710p.

TERROIRS VITICOLES ET CHANGEMENT CLIMATIQUE

Hervé Quénol
Laboratoire LETG-Rennes-Costel, UMR6554 LETG du CNRS,
Université Rennes 2,
place du recteur Henri le Moal 35043 Rennes. herve.quenol@uhb.fr

RÉSUMÉ

Le changement climatique global engendre une multitude de questions sur les répercussions sur le climat local et sur les terroirs viticoles. Des analyses scientifiques sont nécessaires pour évaluer les potentialités agroclimatiques actuelles et futures, notamment à travers une meilleure connaissance des variations locales du climat. Les approches de ces phénomènes à partir des modèles climatiques ne sont pas adaptées aux échelles fines et, de ce fait, apportent des résultats trop approximatifs. Même si de réels progrès ont été réalisés ces dernières années au niveau de la modélisation climatique régionale, aucun modèle utilisé dans un cadre opérationnel ne permet de faire une simulation du climat aux échelles locales (quelques dizaines de mètres). C'est donc à une échelle spatiale plus fine, en tenant compte des caractéristiques de surface et des capacités matérielles des viticulteurs, qu'il sera possible d'évaluer les conséquences imputables au changement climatique.

Mots clés : terroirs viticoles, changement climatique, échelles spatiales et temporelles, adaptation

INTRODUCTION

Les différents rapports du GIEC (Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat) ont alerté la communauté internationale d'une augmentation de la température ainsi que de la fréquence et de l'intensité des aléas climatiques au niveau mondial. Même s'il existe de nombreuses incertitudes sur l'intensité du changement climatique et ses conséquences, l'amélioration de la fiabilité des Modèles de Circulation Générale du climat (MCG) et la corrélation positive entre les rejets de Gaz à Effet de Serre (GES) et l'augmentation des températures de ces dernières décennies montrent que le réchauffement global sera compris entre 2 et 6°C (selon les scénarios et les modèles) à l'horizon 2050-2100 (Pachauri et Reisinger, 2007).

Un changement global du climat aura obligatoirement des répercussions sur le climat local et sur les terroirs viticoles. Dans ce contexte, les impacts attendus d'un éventuel changement climatique posent un certain nombre de questions, ne serait-ce que pour améliorer l'adaptation.

Au niveau des températures, les différences spatiales engendrées par les conditions locales (topographie, occupation du sol,…) sont très souvent supérieures à l'augmentation de températures simulée par les différents scénarios du GIEC pour les 50 années à venir. Les vignerons s'adaptent à cette variabilité spatiale du climat qui détermine en partie les caractéristiques et la typicité de leur vin. Dans le contexte du changement climatique, cette démarche d'analyse spatiale peut être une méthode d'adaptation à l'évolution temporelle du climat notamment à court et à moyen terme.

Pays	NB stations (S) et capteurs (C)	Réseau de mesures climatiques
Europe		
France		
Val de Loire		
Anjou	12 (S) ; 30 (C)	LETG-Rennes, UVV-INRA
Saumurois	10 (S)	SVSC
Champagne	22 (S)	CIVC
Bourgogne		
Aloxe-Corton	6 (S) ; 27 (C)	LETG-Rennes, CRC
Bordeaux		
La Louvière	16 (C)	LETG-Rennes
Dauzac	15 (C)	LETG-Rennes
Saint Emilion	80 (C)	ENTITAB, CIVB
Provence		
Sainte-Victoire	9 (C)	LETG-Rennes
Banyuls	11 (C)	LETG-Rennes
La réunion		
Cirque de Cilaos	2 (S) ; 12 (C)	LETG-Rennes
Espagne		
Arinzano (Navarre)	15 (C)	LETG-Rennes
Portugal		
Quinta Napoles (Vallée du Douro)	10 (C)	LETG-Rennes
Suisse		
Canton de Genève	19 (C)	LETG-Rennes
Roumanie		
Cotnari	12 (C)	LETG-Rennes
Italie		
Valo di Combras	6 (C)	LETG-Rennes
Allemagne		
Geisenheim	12 (C)	LETG-Rennes
Amérique du Sud		
Argentine		
Alta Vista (Mendoza)	2 (S) ; 15 (C)	LETG-Rennes
Atamisque (Vale de Uco)	11 (C)	LETG-Rennes
El Bolson	8 (C)	LETG-Rennes
Cafayate	1 (C) ; 15 (C)	INV, LETG-Rennes
Chili		
Valé de Casablanca	13 (S)	AVC
Uruguay		
Montevideo	2 (S) ; 10 (C)	LETG-Rennes
Bolivie		
Vale de Tarija	10 (C)	LETG-Rennes
Canyon Los Inces	3 (S) ; 3 (C)	
Amérique du Nord		
Californie		
Paso Robles ; Red Hills	15 (C)	LETG-Rennes
Afrique		
Afrique du Sud		
Stellenbosch	40 (C)	Univ. Stellenbosch, LETG-Rennes
Océanie		
Nouvelle Zélande		
Marlborough	15 (S) ; 30 (C)	Univ. Christchurch
Asie		
Inde		
Sulawines (Nasik)	12 (C)	LETG-Rennes

Tableau 1 : vignobles expérimentaux où sont réalisées les observations à l'échelle locale

UNE ANALYSE AGROCLIMATIQUE ADAPTÉE À L'ÉCHELLE DES TERROIRS VITICOLES

La démarche scientifique vise à mettre en place une méthodologie reposant sur des observations climatiques et agronomiques *in situ* et sur de la modélisation spatiale du climat, permettant d'évaluer la variabilité spatiale des paramètres atmosphériques à l'échelle d'un terroir (valeurs moyennes et extrêmes climatiques). Confrontée à des observations agronomiques (ex : stress hydrique, phénologie, taux de sucre, taux d'alcool,…), l'étude climatique permet de déterminer le climat spécifique d'un terroir. En comblant le manque de données aux échelles fines, ce travail permet d'affiner les connaissances sur les modifications climatiques qui pourront apparaître dans les terroirs viticoles et donc, d'améliorer les estimations sur les possibles impacts économiques. Cette méthodologie est développée et appliquée[i] à plusieurs vignobles de renommée internationale, vignobles pour lesquels les caractéristiques climatiques jouent un rôle important sur la qualité du vin. La multiplication des sites expérimentaux (terroirs français, européens et étrangers du « nouveau monde ») permet d'étudier les potentialités agro climatiques locales des terroirs dans des conditions macro-climatiques différentes (tableau 1).

L'acquisition des données agroclimatiques est réalisée à plusieurs échelles spatiales et temporelles.

1- Pour chaque région viticole, l'analyse d'une série de données journalières ou mensuelles sur une période la plus longue possible (milieu du XXème siècle) est effectuée pour une ou plusieurs stations météorologiques issues des réseaux nationaux. Plusieurs méthodes statistiques ont été utilisées afin de caractériser la présence ou l'absence d'une rupture significative au niveau du réchauffement climatique. Ces analyses statistiques sont faites sur les données météorologiques mais également sur des indices bioclimatiques adaptés à la viticulture (Huglin et Schneider, 1998 ; Tonietto, 2004).

2- A une échelle plus fine, des stations météorologiques et des capteurs enregistrant la température sous abri sont installées afin d'étudier la variabilité spatio-temporelle du climat dans les vignobles. Les appareils de mesures sont disposés d'une part, suivant les caractéristiques locales (ex : pente, exposition, type de sol, distance à une rivière…) susceptibles d'influencer les variables climatiques et d'autre part, en les répartissant le mieux possible sur le terrain d'étude afin de ne pas avoir de secteurs sans prises de mesures ce qui pourrait être un problème au niveau de l'interprétation et de la modélisation des données. En général, quatre ou cinq stations météorologiques complètes (températures, humidité relative, rayonnement solaire, vitesse et direction du vent, précipitations) et une vingtaine de Data Logger enregistrant la température sont installés à hauteur moyenne de la vigne pour chaque site expérimental (photographie 1a et b)(Quénol, 2011).

Pour les suivis phénologiques et les analyses des raisins, les observations sont effectuées, dans la mesure du possible, sur des vignes ayant les mêmes caractéristiques (ex : cépages, porte-greffe,…). Les analyses sont réalisées à proximité des stations météorologiques suivant un protocole mis en place par les agronomes. Les observations phénologiques sont également réalisées avec des Plantcam (appareil photographique disposé à proximité du bourgeon de vigne) qui permettent d'enregistrer régulièrement (plusieurs fois par jour) des clichés photographiques de la croissance des bourgeons du débourrement à la maturation (photographie 1c).

[i] Programmes ANR-TERVICLIM (2008-2012), GICC-TERADCLIM (2011-2013) puis ACCAF-LACCAVE (2012-2015). http://terviclim.in2p3.fr

Figure 1 : Appareils de mesures disposés dans les vignobles : Station météorologique CAMPBELL BWS200 (a), data logger Tinytag sous abri antiradiation RS3 (b) et Plant-Cam (c).

UNE AUGMENTATION GÉNÉRALE DES TEMPÉRATURES À L'ÉCHELLE GLOBALE…

Au XXème et XXIème siècles, les courbes de température à l'échelle globale ont montré une importante tendance au réchauffement surtout à partir de la fin des années 90. Les dix années les plus chaudes depuis 1950 ont été observées après 1995 (Brohan et al., 2006 ; Solomon et al., 2007). Cette tendance au réchauffement global a été variable d'un hémisphère à l'autre. Comme l'indique Solomon et al. (2007) ainsi que Quense (2011), *« pour l'hémisphère sud, particulièrement à partir des années 1980, on note une tendance à l'augmentation moins nette que dans l'hémisphère nord. Pour l'hémisphère nord, la tendance est, en moyenne, 3,5 fois plus élevée entre 1979 et 2005 par rapport à la période 1901-2005. Tandis que pour l'hémisphère sud, la tendance est similaire pour les deux périodes ».*

Pour chaque vignoble expérimental du réseau (présenté ci-dessus), les séries annuelles (principalement la température minimale, moyenne et maximale) d'une station des réseaux nationaux ont été analysées sur des séries temporelles comprises entre 1960 et 2010. Toutes les stations (hormis Montevideo) ont enregistré une hausse des températures maximales et minimales.

- les stations d'Europe de l'Ouest et de l'Est ont enregistré une forte augmentation des températures minimales et maximales allant de 1,5°C à plus de 2°C entre 1960 et 2010 ;
- en Espagne et au Maroc, on observe une augmentation plus importante des températures maximales ;
- sur la façade Ouest des USA, ce sont les températures minimales qui ont enregistré une augmentation plus importante ;

Dans l'hémisphère sud, le réchauffement climatique est moins intense et l'augmentation des températures minimales et maximales est très variable suivant les secteurs (figure 2) :

- de part et d'autre des Andes, l'évolution des températures est également très variable. A Curico (Chili), les températures minimales sont de +2°C alors que la tendance est très faible pour les maximales. A Mendoza (Argentine), c'est le contraire qui est observé, avec une augmentation proche de 2°C pour les maximales et de seulement 0,6°C pour les minimales ;
- En Afrique du Sud, à La Réunion et en Nouvelle Zélande, l'augmentation des températures minimales et maximales est similaire (+1°C) ;

Ces résultats sont confirmés par Carrasco (2005) qui a observé, notamment au Chili central, une augmentation de la température minimale de 1,3 à 2,1°C et de 0,2 à 1,5°C pour la température maximale. Cette tendance au réchauffement, avec d'importantes variations annuelles, est fortement influencée par le phénomène ENSO (Rosenbluth *et al.*, 1997) mais également par des facteurs régionaux tels que la topographie (massif andin pour l'Amérique du Sud). Ces observations sont conformes aux résultats des travaux réalisés sur l'évolution et la répartition des anomalies de températures en comparaison avec les normales (Hansen *et al.*, 2010).

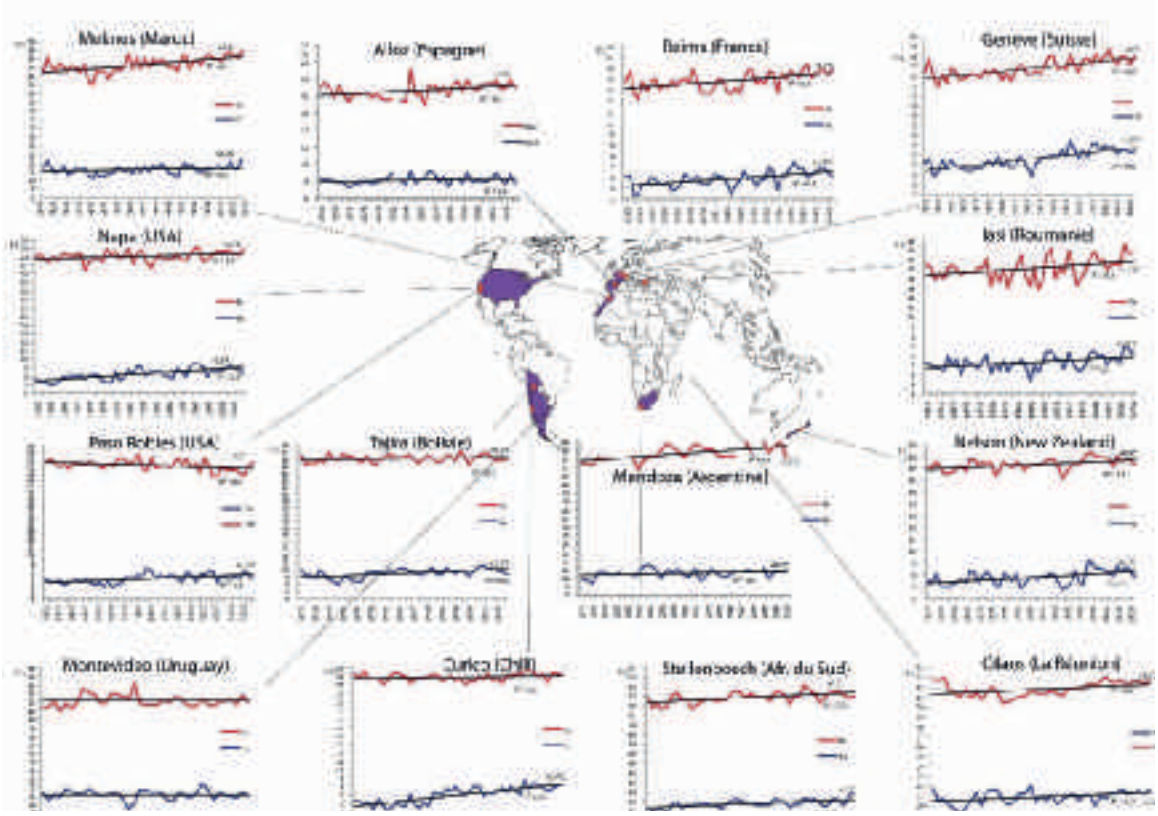


Figure 2 : Evolution des températures minimales et maximales au niveau des différents vignobles expérimentaux sur la période 1960- 2010.

AVEC UNE FORTE VARIABILITÉ SPATIALE À L'ÉCHELLE LOCALE…

A l'échelle d'un vignoble, la variabilité spatiale des températures liée à la topographie (pente et exposition), à la distance à la rivière et au type de sol est comparable aux différences régionales. Par exemple, l'analyse des températures minimales et maximales moyennes annuelles de la station météorologique de l'aéroport de Mendoza entre 1960 et 2010, montre une augmentation moyenne de 1,7°C pour les maximales et 0,6°C pour les minimales (figure 2). La moyenne des températures minimales (figure 3a) et maximales (figure 3b) enregistrées entre juin et novembre 2012 sur divers points de la Bodega Atamisque (Vallée de Uco, Province de Mendoza) montre des écarts thermiques proche de

1°C alors que les différents points sont séparés de quelques dizaines de mètres (cf. (2) ci-dessus). Ces contrastes thermiques importants s'expliquent, en partie, par la topographie variée du secteur avec notamment la mise en place d'inversions thermiques assez fréquentes lors de nuits radiatives claires. Ainsi, l'air froid provenant des massifs montagneux adjacents, a tendance à stagner dans les parties basses du vignoble, ce qui peut poser des problèmes de gels tardifs en

période de débourrement de la vigne mais également en période de vendange. Les secteurs en pente sont moins exposés à ce risque de gel. Pour les températures maximales, les différences sont moins importantes que pour les températures minimales (0,7°C). Toutefois, l'exposition, la pente, le type de sol ainsi que les secteurs abrités sont des éléments clés pouvant expliquer les contrastes thermiques observés.

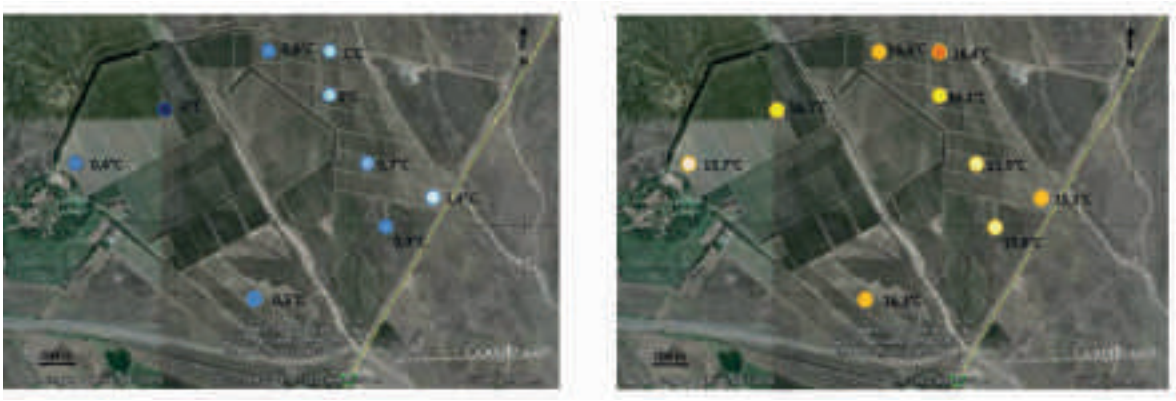


Figure 3 : Moyenne des températures horaires dans le vignoble d'Atamisque dans la Vallée de Uco (Argentine) : période de juin à novembre 2012

Ces études agro-climatiques à l'échelle d'une appellation ou d'un terroir ont été mises en place dans les autres régions viticoles présentées ci-dessus (tableau 1). Les résultats ont permis de mettre en évidence une importante variabilité spatiale du climat (notamment pour les températures) sur des espaces relativement restreints. Les analyses agronomiques ont montré aussi une relation entre ces différences climatiques locales et la vigne que cela soit au niveau de la phénologie ou des caractéristiques du raisin (Neethling *et al,* 2012 ; Bonnefoy *et al,* 2012).

CONCLUSION

La forte variabilité spatiale du climat sur des espaces très restreints engendrée par les aspérités (topographie,…) et la nature de la surface (type d'occupation du sol,…) sont du même ordre voire supérieure à l'augmentation de températures simulée par les différents scénarios du GIEC.

Dans un contexte d'intensification des concurrences entre les différents pays producteurs (notamment avec l'avènement des nouveaux pays viticoles) et où les viticulteurs des pays traditionnels se défendent en mettant en avant le *« terroir viticole »*, une estimation des conséquences du changement climatique à une échelle fine permettrait

a) Températures minimales

b) Températures maximales

de mieux orienter les possibles conséquences économiques et sociales de changement. L'objectif étant que les professionnels viticoles puissent adapter leurs pratiques culturales en fonction d'une nouvelle donne climatique en mettant à l'œuvre leur savoir-faire (techniques culturales raisonnées, évolution des variétés,…).

BIBLIOGRAPHIE

Bonnefoy C., Quénol H., Bonnardot V., Barbeau G., Madelin M., Planchon O. and Neethling E., 2012: Temporal and Spatial Analysis of Temperatures in a French wine-producing area : the Loire Valley. *International Journal of Climatology.* DOI : 10.1002/joc.3552

Brohan, P., Kennedy, J., Haris, I., Tett, S. et Jones, P., 2006 : Uncertainty estimates in regional and global observed temperature changes : a new dataset from 1850. *Journal of Geophysical Research,* 111, (D12 106).

Hansen, J., R. Ruedy, Mki. Sato, and K. Lo, 2010: Global surface temperature change. *Rev. Geophys.,* 48, RG4004, doi :10.1029/2010RG000345.

Neethling E., Barbeau G., Bonnefoy C. et Quénol H., 2012 : Evolution in climate and berry composition for the main grapevine varieties cultivated in the Loire Valley. *Climate Research,* 53, 89-101.

Pachauri R.K. and ReisingerA., 2007: *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* IPCC, Geneva, Switzerland. pp 104.

Quénol H., 2011 : *Observation et modélisation spatiale du climat aux échelles fines dans un contexte de changement climatique.* Habilitation à Diriger des Recherches à l'Université de Haute Bretagne, 2 vol., 298p.

Rosenbluth, B., Fuenzalida, H. et Aceituno, P., 1997 : Recent temperature variations in southern south america. *International Journal of Climatology,* 17, 67-85.

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B., Tignor, M. et Miller, H. L., 2007 : *Climate Change 2007: The Physical Science Basis.* Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge et New York, 996 p.

ADAPTATION DE LA VINIFICATION EN ROUGE AUX CONDITIONS DE CHANGEMENT CLIMATIQUE

Fernando Zamora

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Grup de Recerca en Tecnologia Enològica, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili. Campus de Sescelades, C/ Marcel.li Domingo, s/n. 43007-Tarragona, Spain. Tel: +34977558679 ; Fax : +349775 8686 ; email : fernando.zamora@urv.cat

Le concept de changement climatique n'est pas nouveau. La consommation de combustibles fossiles est à l'origine d'une augmentation de la concentration de dioxyde de carbone et d'autres gaz, qui, en réfléchissant le rayonnement du soleil, sont à l'origine d'un effet de serre (Crowley, 2000, Zamora, 2005a) qui est responsable du réchauffement global de la planète. Les données sont alarmistes. En 1958, la concentration de CO2 était de 315 ppm. Aujourd'hui, c'est plus de 370 ppm, et dans le meilleur des cas, il sera supérieur à 500 ppm d'ici la fin de la vingt et unième siècle (IPCC, 2012).

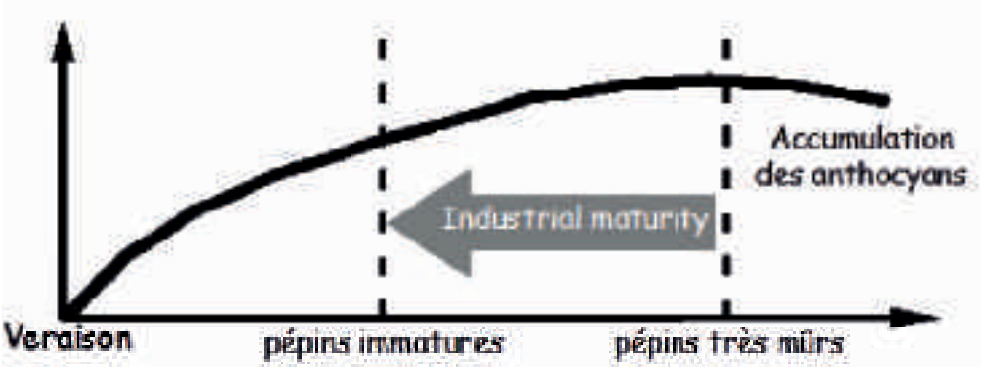


Figure 1 - Effets du réchauffement climatique sur la maturité du raisin

MAIS, QUEL IMPACT AURA LE CHANGEMENT CLIMATIQUE SUR LA VITICULTURE ?

La Figure 1 résume les principaux effets du changement climatique sur la maturation du raisin. Les raisins stockent d'avantage de sucres et dégradent plus vite les acides qu'en conditions normales (Jones *et al.*, 2005 ; Mira de Orduña, 2010). Par conséquent, les raisins arrivent à des teneurs en alcool potentiel et des pH très élevés, et plus tôt que d'habitude. Ce phénomène provoque l'avance de la date de la récolte. Cependant, les pellicules et les pépins en particulier ne sont pas encore mûrs. Par conséquent, un déséquilibre croissant entre la maturité industrielle et phénolique s'observe en conséquence du changement climatique. Dans ces conditions, lorsque les raisins ne sont pas bien mûrs, les œnologues doivent prendre une décision très difficile. S'ils réalisent une macération courte, les vins n'auront pas assez de couleur. Au contraire, s'il réalise

une macération plus longue, le risque d'extraire un excès des tanins astringents, herbacées et amers est très élevé (Llaudy *et al.*, 2008).

Que peut faire l'œnologue dans cette situation ? Je pense qu'il n'y a que deux possibilités. Soit, vendanger lorsque le degré alcoolique potentiel et le pH sont à un niveau correct et ensuite, adapter les conditions de vinification à des raisins verts.

Soit, attendre la maturité complète de la récolte lorsque les raisins sont très mûrs et puis, appliquer des techniques pour diminuer le degré alcoolique et le pH (Zamora, 2007).

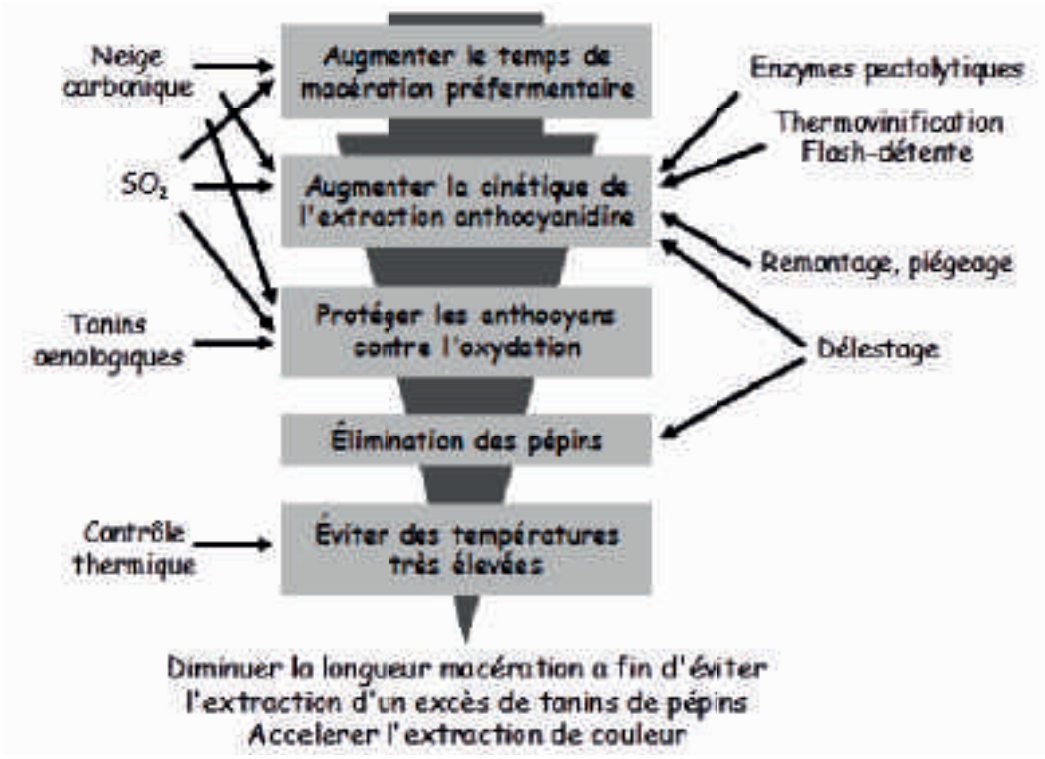


Figure 2 - Possibles stratégies de vinification à appliquer lorsque les raisins ne sont pas suffisamment mûrs

Dans le premier cas, il existe différentes stratégies possibles pour la vinification des raisins verts. La Figure 2 essaie d'illustrer quelques-unes des différentes possibilités. Fondamentalement, la durée de macération doit être raccourcie pour éviter l'extraction d'un excès de tanins de pépins et simultanément l'extraction de la couleur doit être accélérée. La durée de macération préfermentaire peut être allongée au moyen du froid (Zamora, 2004 ; Llaudy *et al.*, 2005). Les anthocyanines peuvent être protégés contre l'oxydation par l'utilisation correcte de la neige carbonique, le SO_2 ou même les tanins œnologiques (Zamora, 2003a). La cinétique de dissolution des anthocyanes peut être accélérée par un traitement avec des enzymes pectolytiques (Guadalupe *et al.*, 2007), par l'application d'un traitement thermique ou au moyen d'une augmentation des traitements mécaniques du chapeau (remontage, piégeage, délestage,) (Zamora, 2003b).

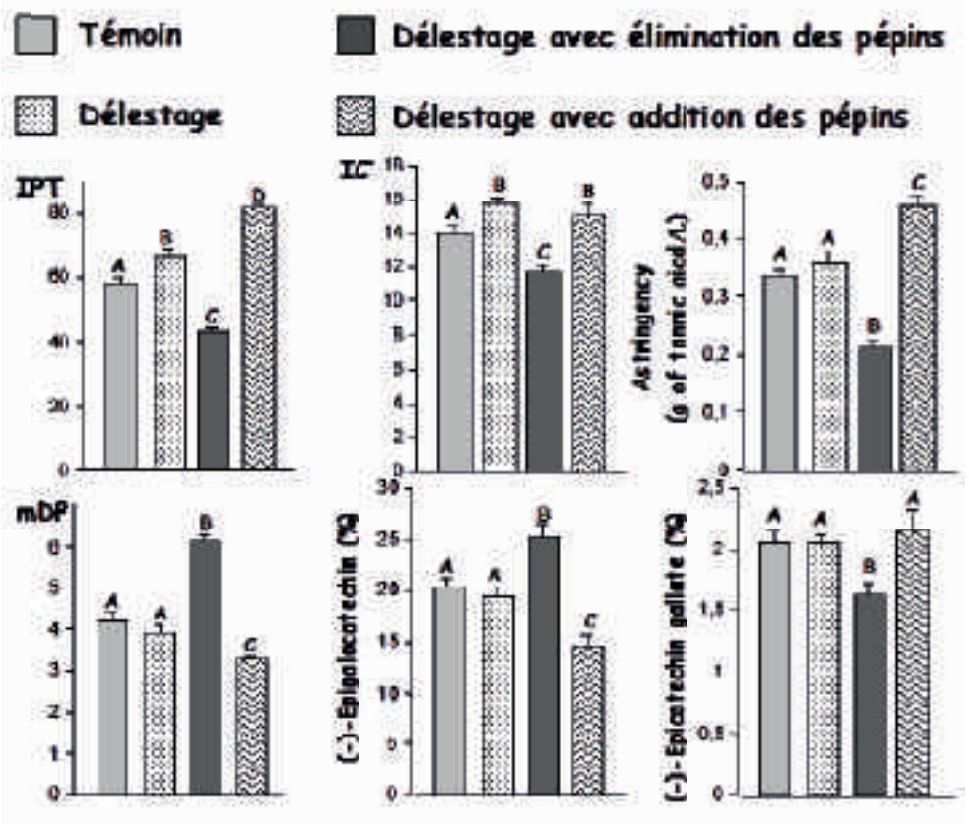


Figure 3 - Influence de l'élimination et de l'addition des pépins

Une autre stratégie intéressante à appliquer lorsque les raisins ne sont pas assez mûrs peut être l'élimination des pépins qui peut être effectuée au moyen du délestage (Zamora, 2005b). La Figure 3 illustre l'effet de l'élimination et l'ajout de pépins (Canals *et al.*, 2008). L'élimination des pépins par délestage peut produire une légère diminution de la couleur rouge et de la concentration en composés phénoliques totaux. Cependant, l'astringence diminue également considérablement ce qui permet des vins plus agréables. Cet assouplissement de l'astringence du vin est principalement du à la diminution de la présence de gallate d'épicatéchine, contenu en grande quantité dans les pépins.

Une fois la fermentation alcoolique terminée, d'autres stratégies peuvent être employés si les vins sont trop astringents ou amers. Une microoxygénation appropriée ou l'élevage en fût peuvent être très utiles pour assouplir les tanins insuffisamment mûrs (Llaudy *et al.*, 2006). D'autre part, l'onctuosité en bouche du vin peut être augmentée et l'astringence assouplie en enrichissant le vin avec des polysaccharides par l'élevage du vin sur lies (Zamora, 2002 ; Rodríguez *et al.*, 2005), en employant des souches de levures avec une plus grande capacité à libérer des polysaccharides (Gonzalez-Gonzalez Ramos et, 2006) ou en supplémentant des vins avec des levures inactivées prétraiteés pour favoriser la libération des polysaccharides (Guadalupe *et al.*, 2007 ;. Rodriguez *et al.*, 2010).

L'autre possibilité est d'attendre la maturité complète, de vendanger lorsque les raisins sont très mûrs puis, d'appliquer des techniques pour diminuer le degré alcoolique et le pH. Les stratégies possibles pour corriger un haut degré alcoolique et un pH élevé sont les suivantes :

1. Sélection de cépages et des clones qui mûrissent plus tard (Schultz, 2000).
2. Adaptation des techniques de culture de la vigne à cette nouvelle situation (Schultz, 2000).

3. Sélection des souches de levure avec un rendement plus faible dans la transformation de sucre en éthanol (Dequin and Barre, 1994).
4. Diminution de la teneur en sucres dans le jus de raisin ou de l'éthanol dans le vin par osmose inverse (Estévez *et al.*, 2011).
5. Évaporation partielle de l'éthanol du vin (Tabaks *et al.*, 2007).
6. Diminution du pH : échange cationique, électrodialyse (Walker *et al.*, 2004)
7. Utiliser des raisins verts récoltés pendant l'éclaircissage comme un procédé pour réduire simultanément la teneur en alcool et le pH du vin (Kontoudakis *et al.*, 2011).

Les deux premiers points sont sans doute probablement les meilleures stratégies. Il est clair que l'utilisation de nouveaux clones ou des cépages, ou la modification des techniques de culture peuvent être utiles pour retarder l'accumulation de sucres et la consommation des acides (Schultz 2000). Beaucoup de travaux sur la sélection clonale pendant ces dernières années ont eu pour objectif l'obtention de clones permettant d'obtenir rapidement une teneur en sucre élevée. Maintenant, nous devons revenir sur nos pas et rechercher parmi les vieilles vignes celles qui sont mieux adaptées aux nouvelles conditions climatiques. Cependant, ces stratégies nécessitent des études longues et laborieuses et un investissement économique considérable pour replanter la plupart des vignobles.

L'utilisation des souches de levure avec un rendement de production d'éthanol plus faible a été également proposée. Cependant, il semble que les souches naturelles de *Saccharomyces cerevisiae* donnent lieu aux rendements d'éthanol toujours semblables, ce qui conduit à une impasse, sauf si l'on emploie des organismes génétiquement modifiés (Dequin et Barre, 1994 ;. Malherbe *et al.*, 2003) ou des levures non-Saccharomyces (Ciani et Ferraro, 1996).

Les points 4 à 7 sont maintenant mieux connus, bien que beaucoup de travail soit nécessaire pour améliorer leurs capacités et leurs applications. Parmi ces procédures l'osmose inverse est celle la plus employée. Certaines entreprises offrent la possibilité de louer ce matériel à des caves. Le tableau 1 présente une analyse expérimentale de désalcoolisation partielle par osmose inverse avec deux vins rouges originaires de l'AOC Priorat et de l'AOC Penedès (Estévez *et al.*, 2011).

Parametre	AOC Penedès			AOC Priorat		
	Témoin	-1%	-2%	Témoin	-1%	-2%
Alcohol (%)	14.8 ± 0.2 A	13.8 ± 0.2 B	12.8 ± 0.2 C	16.2 ± 0.2 A	15.1 ± 0.2 B	14.1 ± 0.1 C
Acidité totale (g/l)	4.8 ± 0.1 A	4.8 ± 0.1 A	4.9 ± 0.1 A	5.2 ± 0.1 A	5.2 ± 0.1 A	5.6 ± 0.1 B
Intensité colorante	15.3 ± 1.5 A	15.6 ± 0.9 A	15.4 ± 0.7 A	15.4 ± 0.2 A	15.2 ± 0.4 A	14.5 ± 0.5 A
Teinte	67.7 ± 1.1 A	67.9 ± 0.4 A	68.3 ± 1.5 A	59.3 ± 1.2 A	60.0 ± 0.4 A	59.2 ± 0.5 A
Anthocyans (mg/l)	567 ± 41 A	546 ± 19 A	574 ± 14 A	200 ± 13 A	206 ± 23 A	226 ± 11 A
IPT	72.9 ± 2.5 A	73.9 ± 2.3 A	75.8 ± 20.6 A	62.4 ± 0.5 A	62.2 ± 0.2 A	62.1 ± 0.8 A
Proanthocyanidines (g/l)	1.8 ± 0.3 A	1.6 ± 0.2 A	1.7 ± 0.2 A	1.6 ± 0.2 A	1.7 ± 0.3 A	1.5 ± 0.2 A
mDP	6.8 ± 1.2 A	7.5 ± 1.8 A	7.2 ± 0.6 A	6.8 ± 1.8 A	5.8 ± 0.3 A	6.5 ± 0.7 A

Tableau 1 - Désalcoolisation partielle par osmose inverse

Les résultats montrent que des différences significatives sont observées pour les teneurs en alcool, tandis que les autres paramètres de laboratoire ont resté inchangés. Ces vins ont été dégustés aussi par un panel sensoriel entraîné (test de discrimination triangulaire). En général, les dégustateurs ont pu distinguer le contrôle et les vins partiellement désalcoolisés malgré des différences faibles. Par conséquent, l'osmose inverse semble être une procédure utile pour compenser l'excès en éthanol dans le vin.

Parametre	1ère vendange	2ème vendange	
		Témoin	Desalcoolisé
Alcool (%)	13.4 ± 0.1 *A*	15.9 ± 0.1 *B*	14.2 ± 0.1 *C*
TA (g/L)	7.0 ± 0.2 *A*	6.3 ± 0.2 *B*	7.1 ± 0.1 *A*
pH	3.45 ± 0.01 *A*	3.76 ± 0.03 *B*	3.55 ± 0.07 *C*
Anthocyans (mg/L)	191 ± 20 *A*	252 ± 25 *B*	271 ± 5 *B*
Color Intensity	8.7 ± 0.9 *A*	12.6 ± 1.5 *B*	17.0 ± 1.9 *C*
Proanthocyanidins (mg/L)	427 ± 115 *A*	1070 ± 17 *B*	969 ± 41 *C*
mDP	2.72 ± 0.13 *A*	4.80 ± 1.84 *B*	4.43 ± 0.36 *B*
(+)-Catechin (%)	26.2 ± 2.2 *A*	21.8 ± 1.4 *B*	19 ± 2.1 *B*
(-)-Epicatechin (%)	57.8 ± 0.7 *A*	57.6 ± 0.1 *A*	57.6 ± 1.9 *A*
(-)-Epicatechin-3-O-Gallate (%)	4.4 ± 0.4 *A*	4.9 ± 0.2 *B*	5.7 ± 0.3 *C*
(-)-Epigallocatechin (%)	11.6 ± 1.3 *A*	16.5 ± 0.6 *B*	17.7 ± 0.7 *C*

Tableau 2 - Influence de désalcoolisation partielle en utilisant des raisins des éclaircissages

Enfin, une autre stratégie possible est l'utilisation de raisins verts récoltés au cours d'un éclaircissage comme méthode pour réduire simultanément la teneur en alcool et pH du vin (tableau 2). Kontoudakis *et al.*, (2011) ont proposé que les raisins provenant de l'éclaircissage des grappes peut être utilisé pour produire un vin très acide avec une très faible teneur en alcool. Ce vin est ensuite traité avec de fortes doses de charbon et de bentonite. Ce vin, inodore et incolore, peut être utilisé pour réduire la teneur en l'éthanol et le pH du vin produit à partir de raisins très mûrs, qui avaient atteint la maturité phénolique complète. Dans leur étude, les auteurs ont utilisé des raisins du cépage *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon et Merlot de l'AOC Penedès et Bobal de l'AOC Utiel-Requena, qui ont été récolté à différents stades de maturité. La première récolte a été effectuée lorsque le degré potentiel d'alcool se situait entre 13,0 et 14,0 %. La deuxième récolte a été effectuée lorsque les raisins ont atteint la maturité phénolique optimale.

Trois dépôts de la première récolte et de trois dépôts de la deuxième récolte ont été élaborés sans aucune adjonction du vin à faible éthanol.

Comme prévu, les vins dont une partie de leur jus a été remplacé par le vin à faible teneur en alcool présentent un dégré alcoolique inférieur à leurs témoins. En effet, la teneur en éthanol, le pH et l'acidité totale de ces vins étaient plus proches des vins de contrôle de la première récolte que de ceux des vins de contrôle de la seconde pour les trois cépages. Les résultats concernant les composés phénoliques et la couleur ont été aussi très clairs. En fait, les concentrations en anthocyanes et proanthocyanidines ainsi que le degré de polymérisation moyen des

proanthocyanidines (mDP) et le pourcentage de la (-)-épigallocatéchine des vins de la deuxième récolte étaient significativement plus élevés que ceux de la première récolte. Ces données confirment la grande influence de la maturité phénolique sur ces paramètres. D'autre part, tous les vins traités présentent des paramètres similaires à ceux du vin témoin de la deuxième récolte. En outre, étant donné que le pH des vins traités était très inférieur que celui des vins non traités, son intensité colorante était plus élevé que leurs témoins.

On peut en conclure que la procédure proposée peut être utile pour la réduction partielle de la teneur en alcool et pour une diminution simultanée du pH des vins. La couleur des vins obtenus était mieux que leurs témoins correspondants et leur composition phénolique était similaire. En outre, cette procédure ne nécessite pas de matériel supplémentaire et est facile à appliquer. D'autres expériences sont nécessaires pour mieux adapter le processus et obtenir des vins plus équilibrés sans les problèmes d'excès d'alcool et à pH élevé.

Le changement climatique est inévitable. Nous pouvons nous adapter et essayer d'en atténuer ses effets. Ces techniques sont maintenant disponibles et leur utilisation peut être très utile pour compenser les effets du réchauffement climatique dans nos caves.

Remerciements : Nous remercions CDTI (Projet CENIT Demeter) pour le soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

Canals, R., Llaudy, M.C., Canals, J.M. and Zamora, F., 2008. Influence of the elimination and addition of seeds on the color, phenolic composition and astringency of red wine. *Eur. Food Res. Technol.*, **226**, 1183-1190.

Crowley, T.J., 2000. Causes of climate change over the past 1000 years. *Science,* **289**, 270-277.

Ciani, M. and Ferraro, L., 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized Candida stellata cells. *Appl. Environ. Microbiol.,* **62**, 128–132.

Estévez, S., Gil, M., González, E., Kountoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M. and Zamora, F., 2011. Aplicación de la osmosis inversa para la desalcoholización parcial de vinos tintos. Congreso Gienol. Cádiz.

Gonzalez-Ramos, D. and Gonzalez, R., 2006. Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by Saccharomyces cerevisiae. *J. Agric. Food Chem.,* **54**, 9411–9416.

Guadalupe, Z., Palacios, A. and Ayestaran, B., 2007. Maceration enzymes and mannoproteins: a possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *J. Agric. Food Chem.,* **55**, 4854-4862.

Intergovernamental Panel on Climate Change. http://www.ipcc.ch/index.html

Jones, G. V., White, M. A. and Cooper, O. R., 2005. Climate change and global wine quality. *Clim. Change*, **73**, 319-343.

Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M. and Zamora, F., 2011. Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Aust. J. Grape Wine Res.,* **17**, 230-238.

Llaudy, M.C., Canals, R., Cabanillas, P., Canals, J.M. and Zamora, F., 2005. La maceració prefermentativa en fred; Efectes de l'extracció del color i dels compostos fenòlics, i influencia del nivell de maduració del raïm. ACE *(Revista d'Enologia),* **72**, 11-14.

Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M. and Zamora, F., 2008. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in a wine simulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.,* **226**, 337-344.

Llaudy, M.C., Canals, R., González-Manzano, S., Canals, J.M., Santos-Buelga, C. and Zamora, F., 2006. Influence of Micro-Oxygenation Treatment before Oak Aging on Phenolic Compounds Composition, Astringency, and Color of Red Wine. *J. Agric. Food Chem.,* **54**, 4246-4252.

Malherbe, D.F., du Toit, M., Cordero Otero, R.R., van Rensburg, P. and Pretorius, I.S., 2003. Expression of the Aspergillus niger glucose oxidase gene in Saccharomyces cerevisiae and its potential applications in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **61**, 502–511.

Mira de Orduña, R., 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.,* **43**, 1844–1855

Rodríguez, M., Lezáun, J., Canals, R. Llaudy, M.C. Canals, J.M., Zamora, F., 2005. Influence of the presence of the lees during oak ageing on colour and phenolic compounds composition of red wine. *Food Sci. Technol. Int.,* **11**, 289-295.

Rodriguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M. and Perez-Magarino, S., 2010. Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of red wine. *Eur. Food Res. Technol.,* **230**, 485-496.

Schultz, H.R., 2000. Climate change and viticulture: a European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Aust. J. Grape Wine Res.,* **6**, 2–12.

Takács, L., Vatai, G. and Korány, K., 2007. Production of alcohol free wine by pervaporation. *J. Food Eng.,* **78**, 118–125.

Walker, T., Morris, J., Threlfall, R. and Main, G., 2004. Quality, sensory and cost comparison for pH reduction of Syrah wine using ion exchange or tartaric acid. *J. Food Qual.,* **27**, 483-496.

Zamora F., 2002, La crianza del vino tinto sobre lías; Una nueva tendencia. *Enólogos,* **19**, 24-29.

Zamora F., 2003a. El tanino enológico en la vinificación en tinto. *Enólogos,* **25**, 26-30.

Zamora, F., 2003b. Elaboración y crianza del vino tinto; aspectos científicos y prácticos Editorial Mundi-Prensa; AMV Ediciones. Madrid.

Zamora, F., 2004. La maceración prefermentativa en frío de la uva tinta. *Enólogos,* **32**, 36-39.

Zamora, F., 2005a. El cambio climático: una amenaza para nuestra viticultura. *Enólogos*, **39**, 28-31.

Zamora, F., 2005b. El "delestage", una técnica muy útil para la elaboración de vinos tintos. *Enólogos,* **37**, 28-31.

Zamora, F., 2007. El cambio climático y el futuro de nuestra viticultura. *Terruños*, **19**, 44-54.

Mardi 5 février 2013
Palais des Congrès
de Bordeaux

11e JOURNÉE TECHNIQUE DU CIVB

Management de la protection du vignoble et de l'environnement

LES ACTES DU COLLOQUE

BORDEAUX

Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux

DIX ANNÉES DE RECHERCHES SUR LA FLAVESCENCE DORÉE DE LA VIGNE

Sylvie Malembic-Maher, Nathalie Arricau-Bouvery, Patricia Carle, Jean-Luc Danet, Delphine Desqué, Kaelig Guionnaud, Brigitte Batailler, Pascal Salar, Sandrine Eveillard et Xavier Foissac

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie - INRA Bordeaux-Aquitaine

71, av. Edouard Bourlaux - BP 81 - F-33883 Villenave d'Ornon Cedex

La Flavescence dorée (FD) est une maladie de la vigne provoquée par une petite bactérie sans paroi : un phytoplasme. Le phytoplasme de la FD est transmis de vigne à vigne par une cicadelle d'origine Nord-Américaine, *Scaphoideus titanus*, qui s'alimente de sève élaborée où se multiplie cette bactérie (Figure 1). Les symptômes de la maladie sont un rougissement du feuillage chez les cépages rouges et un jaunissement chez les cépages blanc, les feuilles s'enroulent et deviennent craquantes, les grappes se dessèchent et les bois ne lignifient pas en fin d'été ce qui donne à la vigne un port pleureur. La gravité des symptômes et la rapidité de propagation de cette maladie font qu'elle est classée de quarantaine au sein de l'Union Européenne avec la mise en place de méthodes de lutte obligatoire. Observée pour la première fois en Armagnac dans les années 50 (Caudwell 1957), elle touche aujourd'hui tout le Sud de l'Europe. En France, plus de la moitié de la superficie du vignoble est en lutte obligatoire et en Gironde, 86 % des communes viticoles sont dans le périmètre de lutte obligatoire. La lutte passe par la détection et l'arrachage des plants contaminés, les traitements insecticides contre la cicadelle dans les zones contaminées et dans toutes les vignes mères et pépinières, et la plantation de matériel certifié indemne de maladie.

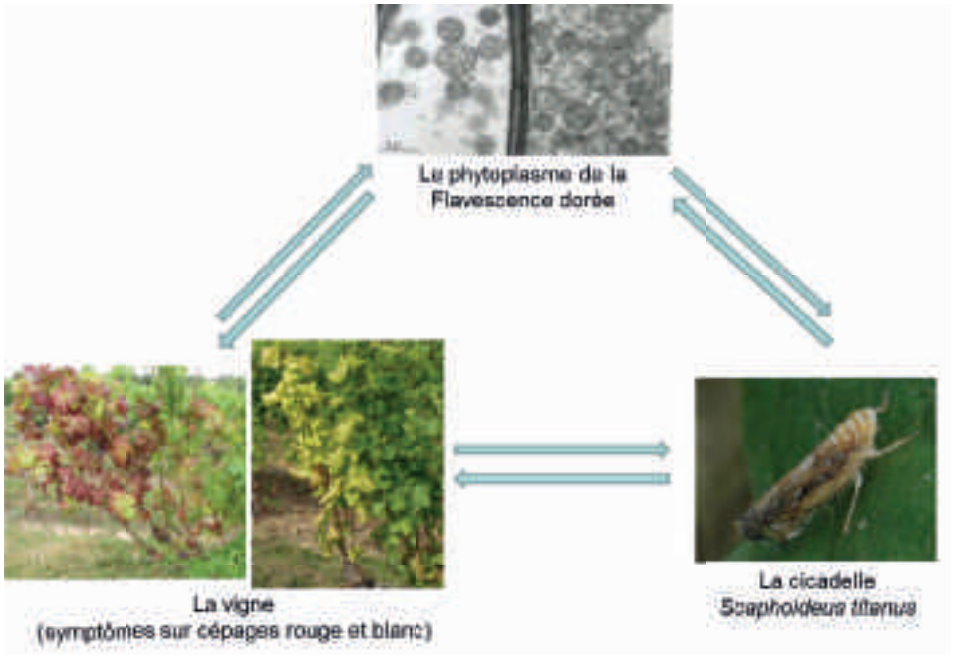


Figure 1 : La Flavescence dorée, une maladie avec trois partenaires.

L'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie de l'INRA de Bordeaux mène des recherches sur la Flavescence dorée depuis près de 10 ans. Ces recherches visent à mieux comprendre le cycle de la maladie d'une part pour améliorer la lutte telle qu'elle est pratiquée aujourd'hui et d'autre part pour proposer des méthodes de lutte complémentaires voire alternatives à la lutte insecticide qui est coûteuse et polluante.

Ces recherches s'orientent selon deux grands axes : I. comprendre les origines et la diffusion de la maladie afin de mieux prédire les risques d'épidémies, II. comprendre les mécanismes d'interaction entre les partenaires de la maladie (phytoplasme, vigne et vecteur) afin de tenter de bloquer ces interactions.

I. COMPRENDRE LES ORIGINES ET LA PROPAGATION DES ÉPIDÉMIES

Le séquençage du génome du phytoplasme de la FD a été réalisé (Malembic-Maher et al. 2008 ; Carle et al. 2011). Ce travail nous a permis d'identifier des gènes qui ont été utilisés comme outils pour le génotypage des souches de phytoplasmes présentes dans les compartiments sauvages et viticoles.

a. Diversité et propagation des souches dans les vignobles.

Le génotypage des phytoplasmes FD a été réalisé par séquençage de 3 gènes marqueurs *(map, secY et uvrB-degV)*. L'analyse de plus d'une centaine d'échantillons prélevés dans les vignobles français et européens a permis de mettre en évidence l'existence de 3 groupes génétiques de souches de phytoplasmes FD en Europe (Arnaud *et al.* 2007 ; Figure 2). Les souches du groupe FD1, qui présentent une certaine diversité génétique, sont minoritaires (15 % des cas en France) et localisées principalement dans le Sud-Ouest de la France. Les souches du groupe FD2, qui sont toutes génétiquement identiques, sont majoritaires (85 % des cas en France) et retrouvées dans tous les vignobles Européens. Enfin, les souches du groupe FD3 n'ont pas été détectées en France mais sont présentes en Italie et dans les Balkans (Figure 2).

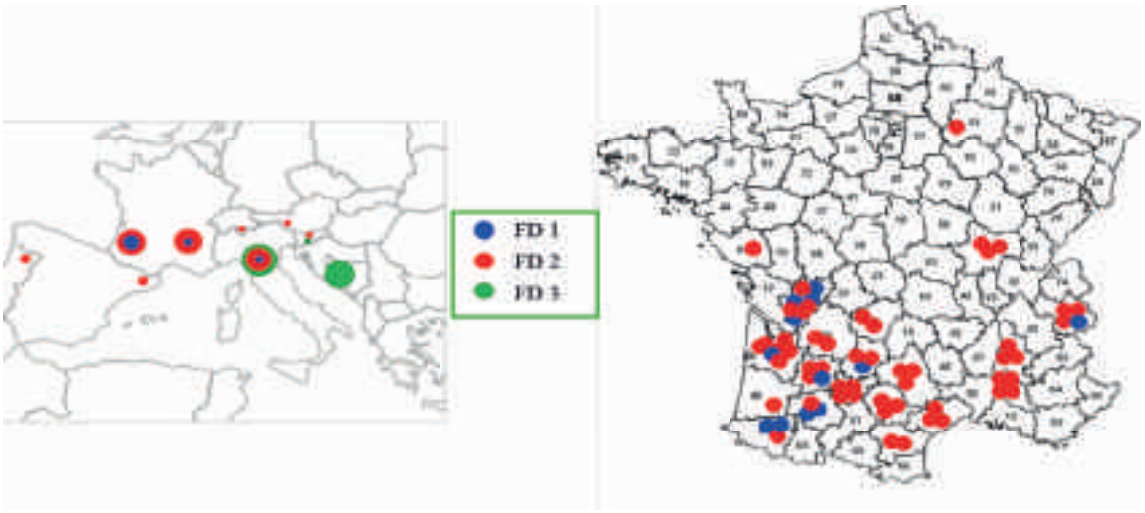


Figure 2 : Diversité et répartition des souches de phytoplasme de la Flavescence dorée en France et en Europe.

La clonalité et la prédominance des souches du groupe FD2 sur les souches du groupe FD1 en France montrent qu'elles se sont propagées rapidement et sur de longues distances au sein du vignoble. Nous avons alors tenté de comprendre ce qui pouvait être à l'origine des différences d'incidence et de répartition entre les souches FD2 et FD1. Nous avons ainsi montré que les deux types de souches sont efficacement transmises par l'insecte vecteur et qu'il n'y a pas de population majoritaire de *S. titanus* porteuse de la souche FD2 (Papura *et al.* 2009). La prédominance de FD2 ne semble donc pas liée au vecteur. Elle ne semble pas non plus être due à une virulence accrue de cette souche car FD2 et FD1 se multiplient à la même vitesse dans la plante et aucune différence n'a été mise en évidence en termes de sévérité de symptômes (Salar *et al.* 2012). Cependant, le génotypage d'échantillons « historiques » prélevés entre 1994 et 2005 en Europe a mis en évidence que les nouveaux foyers (dans des régions jusque-là indemnes), de jeunes parcelles, des parcelles de pieds-mères et des pépinières ont été contaminés par la souche FD2. Ceci va dans le sens d'une propagation à grande échelle de cette souche dans les années 90-2000 par l'intermédiaire du transport de bois contaminés, relayé ensuite par une propagation locale par l'insecte vecteur.

A partir de ces études de diversité, un test de diagnostic des phytoplasmes de la vigne (Flavescence dorée et Bois noir) par PCR en temps-réel a été développé (Pelletier *et al.* 2009). Il est aujourd'hui utilisé comme méthode de référence par les laboratoires agréés pour la détection obligatoire de cet organisme de quarantaine.

b. Diversité des souches dans les plantes sauvages et risques d'échanges avec le vignoble.

Un travail de détection et de génotypage a ensuite été mené sur plus de 300 échantillons de plantes sauvages et d'insectes vecteurs de phytoplasmes prélevés dans différents pays européens à proximité de parcelles de vignes (infectées ou non) ainsi que dans des zones non viticoles. Ceci a permis de mettre en évidence que les aulnes *(Alnus glutinosa)*, bien que n'exprimant pas de symptômes, sont porteurs, pour près de 80 % d'entre eux, de phytoplasmes génétiquement proches du phytoplasme de la FD (Arnaud *et al.* 2007 ; Malembic-Maher *et al.* 2007). Dans 3 % des cas, ces phytoplasmes se sont avérés appartenir aux groupes génétiques FD1, FD2 et FD3 (en France, Italie, Allemagne, Hongrie et Serbie) ; et ceci dans des zones viticoles mais également dans des zones non viticoles. Les clématites sauvages ont également été trouvées porteuses de phytoplasmes du groupe FD3 dans des zones viticoles et non viticoles d'Italie et des Balkans (Fillipin *et al.* 2009). Ces phytoplasmes étaient donc présents dans ces plantes avant leur passage à la vigne. De plus il a été montré que la cicadelle de l'aulne *Oncopsis alni* et le fulgore *Dictyophara europaea* sur Clématite sont capables de transmettre les phytoplasmes de ces plantes sauvages à la vigne (Maixner *et al.* 2000 ; Filippin *et al.* 2009). Ces plantes constituent donc un réservoir qui peut être à l'origine de nouvelles épidémies mais le risque demeure assez faible car les souches de type FD sont peu fréquentes (3 %), la transmission à la vigne par les vecteurs est occasionnelle et *S. titanus* ne se nourrit pas sur ces plantes. Le risque majeur reste l'introduction de cicadelles infectieuses ou la plantation de bois contaminés dans les zones indemnes.

L'ensemble de ces travaux a permis d'élaborer le scénario suivant concernant l'origine de la FD en Europe (Figure 3) : avant l'introduction de *S. titanus* en Europe, les phytoplasmes de type FD étaient présents sur les plantes sauvages et étaient transmis à la vigne de façon occasionnelle sans provoquer d'épidémies. Quand *S. titanus* a été introduit dans l'entre-deux-guerres par importation de bois de *Vitis* d'Amérique du Nord, il s'est multiplié sur la vigne et s'est avéré capable de transmettre de vigne à vigne certaines des souches provenant des plantes sauvages, générant alors les premières épidémies.

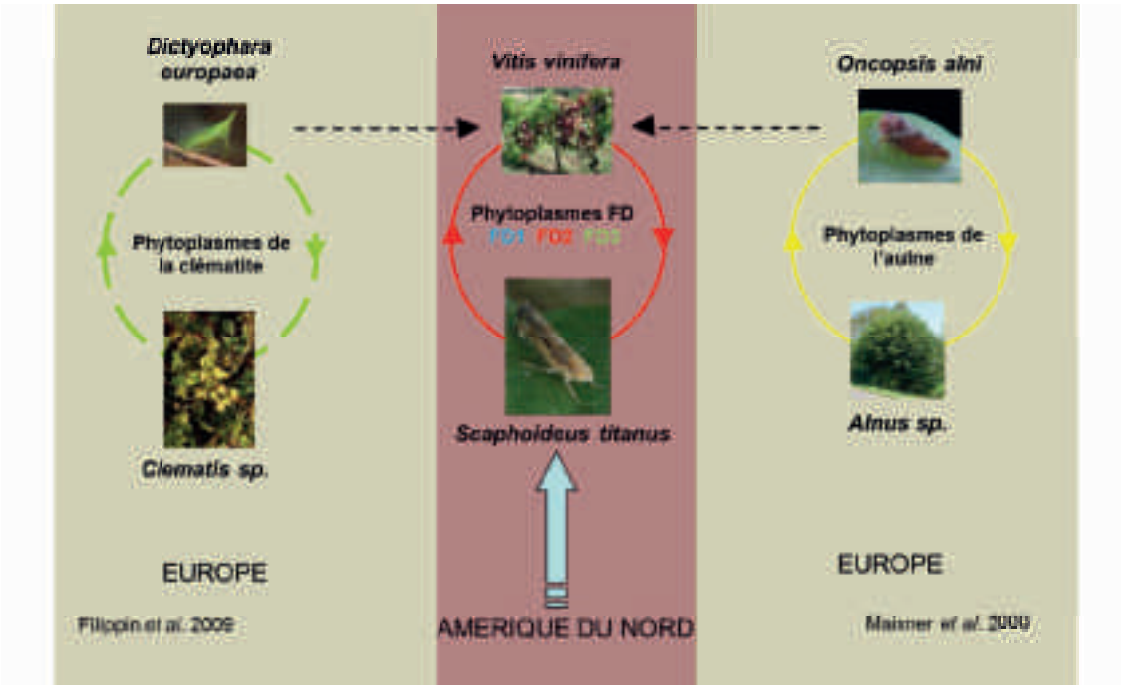


Figure 3 : Scénario de l'origine de la Flavescence dorée de la vigne en Europe.

c. Le risque des repousses ensauvagées de porte-greffes (PG)

Si les clématites et les aulnes présentent un risque limité, les repousses ensauvagées de porte-greffe qui sont très fréquemment présentes aux abords des vignes cultivées sont beaucoup plus préoccupantes. En collaboration avec la FREDON, les SRAL et la cellule de transfert Vitinnov, nous avons étudié ce risque dans les vignobles des bords de Garonne en Gironde où de nombreux hybrides de *Vitis* américains poussent à l'état sauvage (Figure 4). Ces *Vitis* expriment peu voire pas du tout les symptômes de la maladie mais peuvent être porteurs de phytoplasmes. Dans cette zone, les foyers de FD persistent alors que la lutte obligatoire et les traitements insecticides ont été mis en place. Aux alentours et à l'intérieur de parcelles infectées, traitées depuis plusieurs années, nous avons prélevé des échantillons de *Vitis* et nous avons recherché la présence de cicadelles de la FD. Trente pour-cent des repousses de PG ont été trouvé infectées par le phytoplasme de la FD. D'importantes populations de vecteurs ont été collectées sur les PG dont 20 % au plus étaient porteurs du phytoplasme FD, alors qu'aucun insecte n'était présent dans les parcelles. De plus, le génotype des phytoplasmes présents dans les PG, les vecteurs et les parcelles avoisinantes était identique ce qui montre qu'il y a eu échange. Les PG ensauvagés constituent donc un réservoir de la maladie avec risque élevé de recontamination des vignobles où la lutte est appliquée. Cette situation n'est pas spécifique de la zone car des PG ensauvagés porteurs de phytoplasmes FD et ou de cicadelles vectrices ont aussi été détectés dans d'autres vignobles girondins.

Figure 4 : Repousses de porte-greffes ensauvagés

II. COMPRENDRE LES MÉCANISMES D'INTERACTION ENTRE LES PARTENAIRES DE LA MALADIE. VERS DES MÉTHODES DE LUTTE ALTERNATIVES ?

a. Interaction entre le phytoplasme et son insecte vecteur. Blocage de la transmission.

Les phytoplasmes, pour être transmis à une plante par leur insecte vecteur, doivent effectuer un cycle complexe dans le corps de celui-ci, comprenant le franchissement de plusieurs barrières tissulaires (Figure 5). Ce cycle de transmission passe par des interactions fines entre les phytoplasmes et le vecteur. Le séquençage du génome du phytoplasme de la FD a permis de sélectionner et de caractériser des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans ces interactions. Nous étudions actuellement le rôle de ces protéines dans les mécanismes de transmission avec pour objectif de tenter de les bloquer. Ainsi, nous avons montré que la protéine VmpA, qui code une protéine ancrée à la surface du phytoplasme FD, se fixe à des protéines de l'insecte vecteur (Desqué *et al.* 2012 ; Figure 5). Notre objectif est maintenant d'identifier le récepteur dans les insectes et de bloquer la fixation de VmpA à l'aide de molécules inhibitrices (petits peptides ou anticorps). Ces compétiteurs seront utilisés pour évaluer leur effet sur la transmission du phytoplasme de la FD par *S. titanus*.

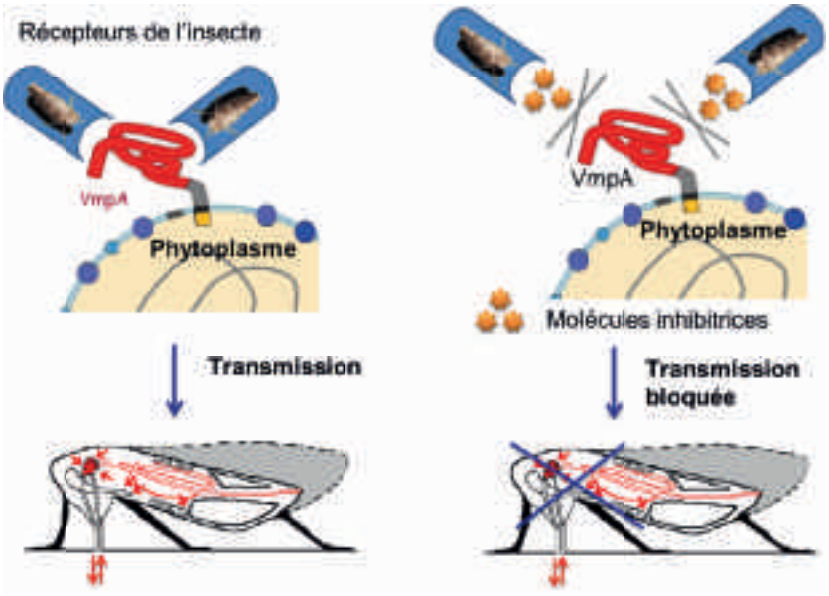


Figure 5 : Cycle de transmission des phytoplasmes FD dans la cicadelle vectrice et possibilité de bloquer cette transmission.

b. Interactions phytoplasme FD/vigne et insecte vecteur/vigne. Recherche de résistances à la FD au sein du genre Vitis.

Des années d'observations au vignoble ont permis de mettre en évidence qu'il existe des différences importantes d'expression des symptômes en fonction des cépages de vigne (Boudon-Padieu 1996). De plus, certains porte-greffes n'expriment pas les symptômes de la maladie. Notre objectif est de mieux caractériser ces différences en termes de quantité de phytoplasmes hébergés par la plante et en termes d'attraction du vecteur, facteurs déterminant la vitesse de propagation de la maladie. Nous recherchons également au sein des *Vitis*, des espèces ou des variétés qui seraient plus résistantes au phytoplasme et/ou au vecteur. Ces études sont menées

en collaboration avec les unités EGFV (INRA de Bordeaux) et SVQV (INRA de Colmar) pour la partie plante et l'unité SAVE (INRA de Bordeaux) pour la partie insecte.

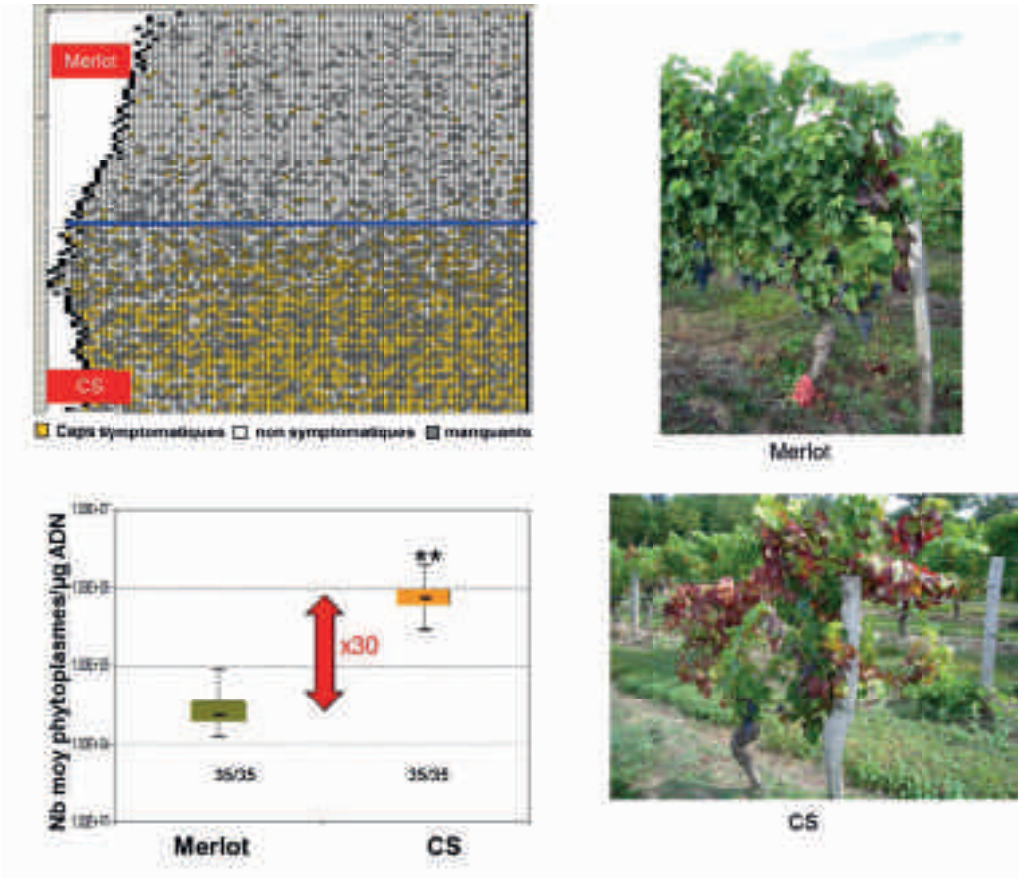


Figure 6 : Différences de comportement vis-à-vis de la Flavescence dorée entre le Merlot et le Cabernet Sauvignon en termes d'expression de symptômes et en termes de concentration en phytoplasmes au sein des plantes.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des observations et des prélèvements en vignoble en focalisant sur les cépages Cabernet Sauvignon (CS) et Merlot (M), qui présentent des comportements opposés vis-à-vis de la FD (Figure 6). Nous avons ainsi montré, sur plusieurs parcelles infectées à encépagement mixte, que la proportion de pieds infectés est plus faible pour le Merlot que pour le CS. De plus, l'intensité des symptômes et la propagation des phytoplasmes dans la plante sont restreintes chez le Merlot. Enfin, la quantité de phytoplasmes dans les rameaux symptomatiques de Merlot est inférieure à celle mesurée dans le CS, et cet écart se creuse au cours du temps pour atteindre 30 fois moins de phytoplasmes en fin de saison (Eveillard *et al.* 2012). Le Merlot constitue donc une faible source d'innoculum, ce qui va limiter la propagation par le vecteur (Bressan *et al.* 2005). Dans un deuxième temps, des inoculations du phytoplasme FD par l'insecte vecteur en conditions contrôlées de serre de haut confinement ont permis de confirmer que les phytoplasmes se multiplient en moyenne 100 fois moins dans le Merlot que dans le CS.

Afin de compléter ces résultats, des travaux d'innoculation des phytoplasmes en serre de haut confinement sont actuellement menés sur un ensemble de cépages (les plus emblématiques du vignoble français), de porte-greffes mais aussi de *Vitis* sauvages originaires de différents

continents. Après inoculation par l'insecte, les symptômes sont observés et les phytoplasmes sont quantifiés. Ceci a déjà permis de mettre en évidence des variétés au sein desquelles les phytoplasmes se multiplient difficilement.

Ces variétés vont également être testées pour leur attractivité vis-à-vis de l'insecte vecteur en réalisant des tests de choix et des tests d'alimentation par électropénétrographie (Figure 7).

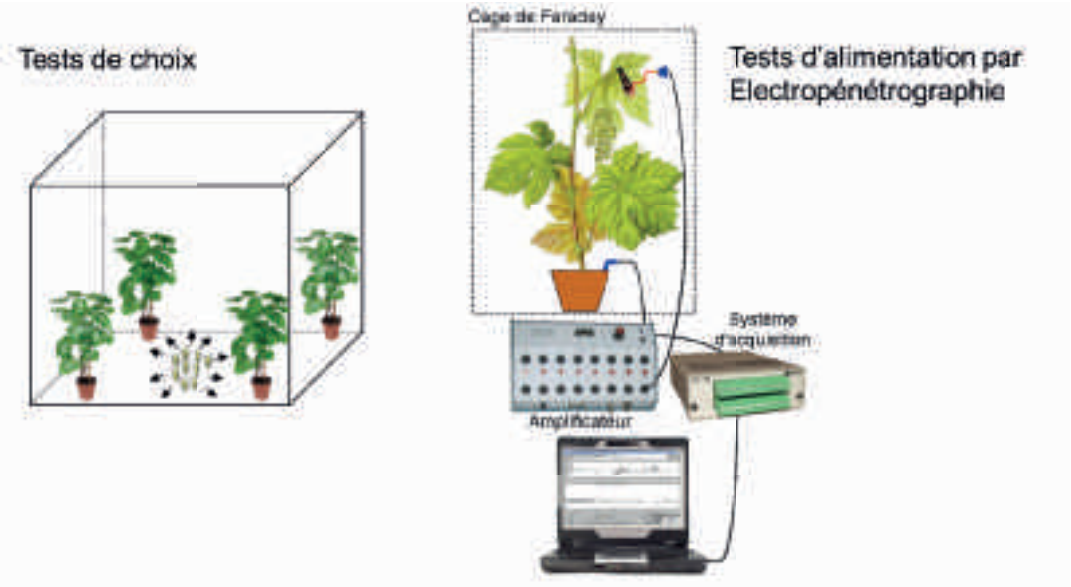


Figure 7 : Evaluation de l'attractivité de différents cépages vis-à-vis de *S. titanus* (collaboration avec l'UMR SAVE).

En perspective, ces travaux pourront permettre de sélectionner des cépages et des PG au sein desquels les phytoplasmes se multiplient moins et/ou qui sont moins appétant pour l'insecte vecteur. Des combinaisons des cépages et PG les plus résistants seront testées pour leur comportement suite à l'infection par le phytoplasme de la FD. Nous évaluerons également un éventuel effet « protecteur » vis-à-vis de cette maladie des PG les plus résistants sur les cépages les plus sensibles comme le Cabernet Sauvignon.

Remerciements : Le CIVB a contribué de manière importante au financement de ces recherches. Elles ont également été financées par l'INRA, La Région Aquitaine, FranceAgrimer et par un programme COST (European COST Action FA0807).

REFERENCES :

***Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E. & Foissac, X. (2007).** Multilocus sequence typing confirms the close genetic inter-relatedness between three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4001-4010.

***Boudon-Padieu, E. (1996).** Grapevine yellows induced by phytoplasmas. Diagnosis, epidemiology and research. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France* **82**, 5-20.

***Bressan, A., Spiazzi, S., Girolami, V. & Boudon Padieu, E. (2005).** Acquisition efficiency of Flavescence dorée phytoplasma by *Scaphoideus titanus* Ball from infected tolerant or susceptible grapevine cultivars or experimental host plants. *Vitis* **44**, 143-146.

***Carle, P., Malembic-Maher, S., Arricau-Bouvery, N., Desque, D., Eveillard, S., Carrere, S. & Foissac, X. (2011).** 'Flavescence doree' phytoplasma genome: a metabolism oriented towards glycolysis and protein degradation. *Bulletin of Insectology* **64**, S13-S14.

***Caudwell, A. (1957).** Deux années d'étude sur la flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. *Annales d'amélioration des plantes* **4**, 359-363.

***Desqué, D., Malembic-Maher, S. & Foissac, X. (2012).** VmpA is an antigenic membrane protein of flavescence dorée phytoplasma and binds to leafhopper vector proteins. Congress of the International Organisation of Mycoplasmology » Toulouse, jul. 2012.

***Eveillard, S., Labroussaa, F., Salar, P., Danet, J.L., Hevin, C., Perrin, M., Masson, J., Foissac, X. & Malembic-Maher, S. (2012).** Looking for resistance to the Flavescence doree disease among Vitis vinifera cultivars and other Vitis species. International Council for the study of Virus and virus-like diseases of the Grapevine" UC Davis, oct. 2012.

***Filippin, L., Jovic, J., Cvrkovic, T., Forte, V., Clair, D., Tosevski, I., Boudon-Padieu, E., Borgo, M. & Angelini, E. (2009).** Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence doree in clematis and grapevine and preliminary results on the role of Dictyophara europaea as a vector. *Plant Pathol* **58**, 826-837.

***Maixner, M., Reinert, W. & Darimont, H. (2000).** Transmission of grapevine yellows by Oncopsis alni (Schrank) (Auchenorrhyncha : Macropsinae). *Vitis* **39**, 83-84.

***Malembic-Maher, S., Salar, P., Vergnes, D. & Foissac, X. (2007).** Detection and diversity of "flavescence doree" - related phytoplasmas in alders surrounding infected vineyards in Aquitaine (France). *Bulletin Of Insectology* **60**, 329-330.

***Malembic-Maher, S., Constable, F., Cimerman, A., Arnaud, G., Carle, P., Foissac, X. & Boudon-Padieu, E. (2008).** A chromosome map of the Flavescence doree phytoplasma. *Microbiology-Sgm* **154**, 1454-1463.

***Papura, D., Delmotte, F., Giresse, X., Salar, P., Danet, J. L., Van Helden, M., Foissac, X. & Malembic-Maher, S. (2009).** Comparing the spatial genetic structures of the Flavescence doree phytoplasma and its leafhopper vector Scaphoideus titanus. *Infection Genetics and Evolution* **9**, 867-876.

***Pelletier, C., Salar, P., Gillet, J., Cloquemin, G., Very, P., Foissac, X. & Malembic-Maher, S. (2009).** Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis* **48**, 87-95.

***Salar, P., Charenton, C., Foissac, X. & Malembic-Maher, S. (2012).** Multiplication kinetics of Flavescence dorée phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. Accepted: 10 September 2012. Eur J Plant Pathol DOI 10.1007/s10658-012-0093-3.

LES STIMULATEURS DE DÉFENSE DE LA VIGNE, MYTHE OU RÉALITÉ ? QUELLE EFFICACITÉ ET QUEL AVENIR EN PROTECTION DE LA VIGNE : DU GÈNE AU CHAMP ?

Marie-France CORIO-COSTET et Marie-Cécile DUFOUR

INRA, UMR santé et agroécologie du vignoble, UMR SAVE (1065), ISVV, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon.

La vigne en tant que culture pérenne est soumise aux attaques de nombreux bioagresseurs, dont des parasites biotrophes tels que l'oïdium et le mildiou, responsables des deux principales maladies de la vigne. Ces deux parasites d'importation, en provenance des Etats-Unis (1847 pour l'oïdium et 1878 pour le mildiou) sont à l'origine de la majorité des traitements phytosanitaires appliqués sur cette culture avec parfois des conséquences sur l'adaptation des agents pathogènes (émergence de résistance aux traitements fongicides), mais aussi au niveau environnemental et sur la santé. Dans ce cadre et dans celui du plan Ecophyto, qui vise à réduire les intrants pesticides, le développement de méthodes de lutte, dites « alternatives » voire « complémentaires », est nécessaire. Ainsi les recherches sur les stimulateurs de défenses des plantes présentent-elles un double intérêt : celui de diminuer les intrants pesticides *sensu stricto*, et celui de mettre en place une méthode de lutte originale, à large spectre d'action.

QU'EST-CE QUE LA STIMULATION DE DÉFENSES DES PLANTES OU SDP ?

Depuis la découverte de la possibilité de stimuler les défenses d'une plante, de nombreuses études réalisées au laboratoire ont mis en évidence l'efficacité de la stimulation des défenses d'une plante (benhamou, 2009). À ce jour, « l'immunité des plantes », ou résistance systémique acquise (SAR) est sous tendue par des mécanismes physiologiques qui commencent à être bien connus et qu'il est possible de simplifier selon le schéma suivant en 4 étapes (figure 1).

1/Elicitation et réception du signal de stimulation : mise en contact de la plante avec un éliciteur ou SDP (stimulateur des défenses des plantes) qui va déclencher le processus de défense. Cet éliciteur ou stimulateur peut être de diverses origines. Il peut s'agir d'extraits biologiques de végétaux ou d'algues (extrait de la renouée de Sakhaline, feuilles de saules, extrait de laminaires), d'extraits d'agents pathogènes (filtrat de culture d'Eutypa, de botrytis), de bactéries, de produits inorganiques (silice, carbonates, phosphonates), de molécules naturelles (ex : laminarine, acide salicylique) ou d'analogues de substances naturelles (acibenzolar-S-Méthyle ou BTH, probénazole, acide -aminobutyrique, méthyle jasmonate).

2/Signalisation : la diffusion du signal transitera via une cascade d'évènements au niveau cellulaire (génération de peroxyde d'hydrogène, dépolarisation des membranes cellulaires, flux de calcium, phosphorylations) qui conduira à la mise en place de différentes défenses au sein de la plante, dépendante de l'action de différentes phytohormones telles que l'éthylène, l'acide salicylique, l'acide jasmonique, les auxines, ou encore l'acide abscissique.

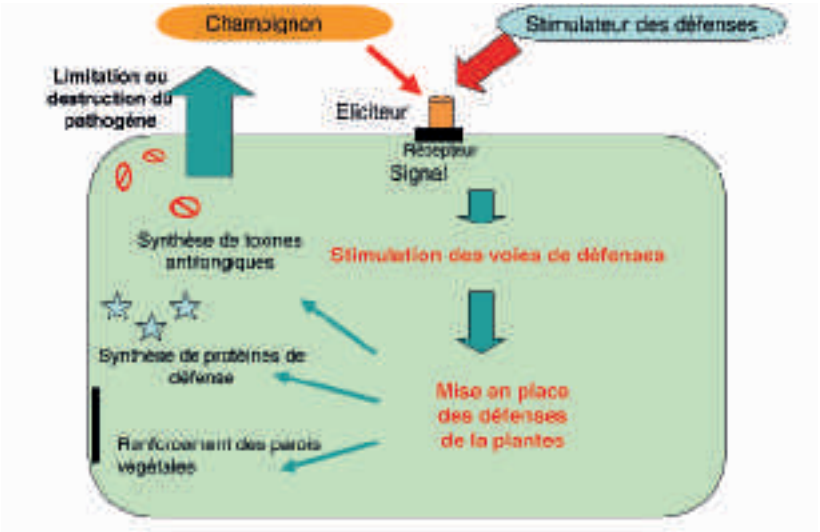


Figure 1 : Schéma représentant les différentes phases de réponse d'une plante à un stimulateur de défense

3/Surexpression de gènes de défense : La mise en route de ces voies hormonales conduira à la régulation de nombreux gènes, codant pour des protéines impliquées dans les défenses. Ces différents gènes peuvent appartenir à la famille des PR-Protéines (pathogenesis related proteins) qui peuvent être des enzymes, qui participent à la dégradation des parois des agents pathogènes, ou des protéines au mode d'action encore inconnu. D'autres gènes participeront à la biosynthèse de molécules de défenses, telles que les phytoalexines, auxquelles appartient le resvératrol, certainement l'un des polyphénols de type stilbèniques le plus connu, ou coderont pour des enzymes impliquées dans le renforcement des parois.

4/Mise en place des défenses : diverses protéines sont donc synthétisées en plus grand nombre, permettant soit de détruire ou de stopper le développement du pathogène avec des enzymes, des phytoalexines ou par un renforcement mécanique des parois de la cellule végétale.

PEUT-ON STIMULER LES DÉFENSES DE LA VIGNE AU VIGNOBLE ET COMMENT CONNAÎTRE L'ÉTAT DE DÉFENSE DE LA PLANTE ?

Aujourd'hui, il est possible de mimer l'attaque d'un pathogène à l'aide d'éliciteur et de préparer la plante à se défendre, en augmentant l'efficacité de son d'immunité innée (innate immunity). *Cependant, si les stimulateurs de défenses des plantes (SDP) présentent de bonnes efficacités reproductibles en conditions contrôlées au laboratoire, paradoxalement, il s'avère que l'application de cette méthode in natura est plus délicate et conduit le plus souvent à des efficacités très variables. Pourquoi ?*

En réalité, l'utilisation de ce type de méthode fait intervenir de nombreux paramètres, et pas seulement d'ordre végétal (figure 2). En effet, souvent oublié, l'agent pathogène peut jouer en rôle important dans l'efficacité des défenses. Sa diversité, son agressivité, son cycle biologique sont autant de paramètres à prendre en compte dans l'efficacité de ces méthodes. De la même manière, les réponses d'un cultivar ou génotype de vigne n'est pas identique à un autre. Ainsi selon l'âge, le stade physiologique, l'organe considéré, les défenses de la vigne seront-elles plus ou moins efficaces et mobilisées plus ou moins rapidement. Malheureusement, ces aspects sont

encore mal connus. Le dernier paramètre important concerne, bien évidemment, les conditions environnementales (climat, nutrition) qui auront des effets sur l'agent pathogène (pression épidémique), sur la plante (mise en place de ses défenses), mais aussi sur les éliciteurs (biodisponibilité).

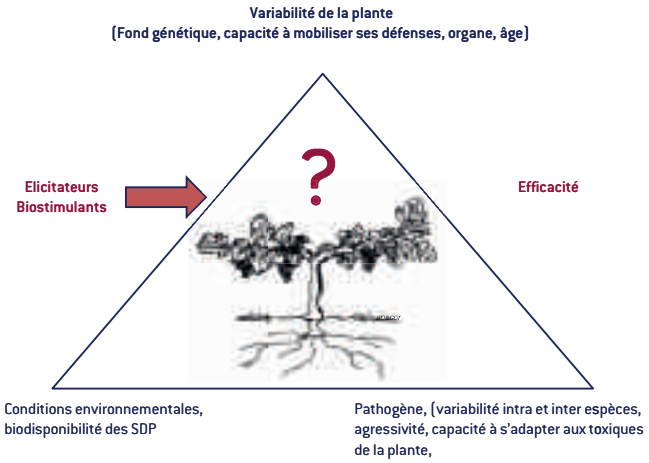


Figure 2 : Paramètres influençant l'efficacité des réponses de la plante

Pour répondre à ces questions, et tenter de mieux comprendre quels facteurs interviennent dans les défenses des plantes, nous avons avec le soutien du CIVB, (participation à la thèse de M-C Dufour) développer des outils qui permettent de connaître l'état de défense de la vigne dans différentes conditions :

- Après élicitation ou non avec différents éliciteurs,
- Après inoculation des différents agents pathogènes en faisant varier leur diversité intra et inter espèce,
- Sur des génotypes partiellement résistants, stimulés ou non,
- En condition de laboratoire, mais aussi au vignoble sous de forte pression épidémique.

Cet outil appelé « BioMolChem », qui combine trois approches (biologique, moléculaire et biochimique) nous a permis d'établir des corrélations entre l'efficacité des défenses de la plante après stimulation avec un éliciteur et un état de protection de la plante. Les données accumulées au cours des dernières années nous ont permis de montrer *que tout éliciteur n'est pas égal à un autre.* Ceci a été montré sur différentes souches d'oïdium (appartenant soit au groupe génétique A soit B) et de mildiou (souches sensibles ou résistantes à différents fongicides). Ainsi montrons-nous qu'un éliciteur (analogue de l'acide salicylique) a des effets au laboratoire similaires qu'elle que soit l'espèce considérée (oïdium ou mildiou). De manière plus surprenante, un autre éliciteur de type phosphonate (éliciteur et fongicide) révèle une efficacité plus faible sur les souches d'oïdium de groupe A. Un fertilisant « phosphonate » s'avère quant à lui plus efficace sur le mildiou que sur les deux groupes d'oïdium (figure 3). Ces expériences démontrent que *tout produit ou extrait élicitant les défenses de feuilles ne conduit pas à la même efficacité selon la variabilité intra ou inter espèce des agents pathogènes* (Dufour et Corio-Costet, 2013, sous presse).

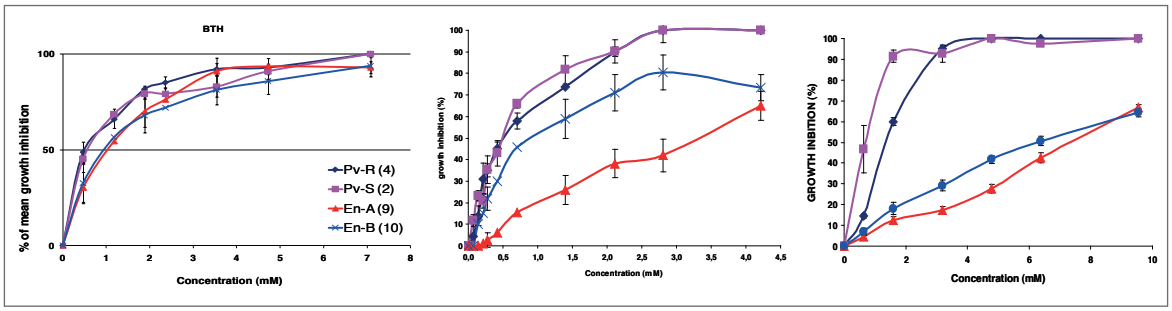


Figure 3 : Efficacité de protection de trois éliciteurs (analogue de l'acide salicylique, un phosphonate (fongicide) et un phosphonate fertilisant), en fonction de la dose appliquée sur des feuilles de vigne, 24h avant l'inoculation. Les courbes roses et bleu foncé correspondent chacune à plusieurs souches mildiou de la vigne sensibles (rose) ou résistantes aux fongicides (bleu foncé). Les courbes rouges et bleues correspondent à différents souches d'oïdium appartenant au groupe génétique A (rouge) ou B (Bleu).

Par ailleurs, des essais réalisés au vignoble avec deux de ces produits ont montré que l'efficacité des défenses au vignoble varie selon l'organe (figure 4) considéré. C'est particulièrement vrai pour l'analogue d'acide salicylique qui conduit à des défenses de la vigne qui protège mal les feuilles en cas de forte pression épidémique, mais à l'inverse conduit à une très forte protection des grappes, bien meilleure que celle procurée par un phosphonate utilisé dans les mêmes conditions. Ceci montre sans ambiguïté, que *selon l'éliciteur et l'organe considéré, la mise en place des défenses de la vigne et leur efficacité peuvent être variables,* et qu'il est nécessaire de connaître le potentiel de l'éliciteur choisi.

Figure 4 : Efficacité de protection de plusieurs traitements avec deux stimulateurs de défense ou un fongicide, sur feuilles et grappes à la date du 2 août 2009, après inoculation artificielle de mildiou *(Plasmopara viticola)*

QUEL EST L'ÉTAT DE DÉFENSE D'UNE PLANTE ET COMMENT LE METTRE EN ÉVIDENCE AVANT L'ATTAQUE DU PATHOGÈNE ?

À l'aide de quelques gènes marqueurs que nous avons choisi, nous avons développé une méthode de PCR-quantitative qui permet d'évaluer le niveau d'expression d'une vingtaine de gènes d'intérêt impliqués dans les défenses de la vigne (figure 5). Ainsi montrons-nous, que *ces gènes sont fortement surexprimés après une élicitation avec l'analogue de l'acide salicylique, que les agents pathogènes seuls conduisent à une répression de ces gènes de défenses.* Après une élicitation et une infection par du mildiou ou de l'oïdium, ces gènes sont à nouveau surexprimés à différents niveaux au cours du temps. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence des gènes marqueurs qui sont corrélés à l'efficacité des défenses (Dufour et al., 2013, sous presse) d'un SDP, tels que les gènes PR2, 6 et 8 qui codent pour des protéines de défenses et qui seraient des marqueurs de protection, et des marqueurs de défenses tels que les gènes PR1, 10, 3 (autres protéines de défense) et le gène codant pour la stilbène synthase impliquée dans la biosynthèse des phytoalexines de la vigne. À partir de ces résultats, l'outil moléculaire a été testé au vignoble de 2009 à 2012, et nous montrons que l'expression de certains gènes semble être corrélée au niveau de protection.

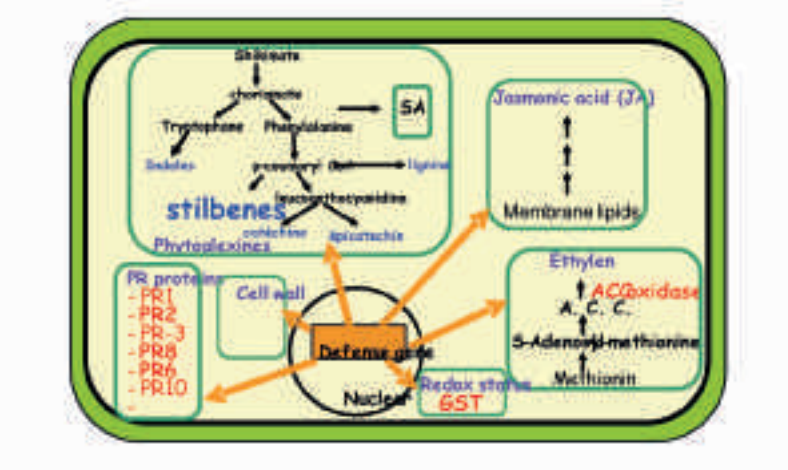


Figure 5 : Représentation schématique des gènes suivis et impliqués dans les différentes voies de défenses de la vigne

Pour compléter cette étude moléculaire, l'analyse de polyphénols et en particulier de stilbènes a été effectuée sur des feuilles élicités ou non, infectées ou non. Les analyses qualitatives et quantitatives réalisées par HPLC ont montré que contrairement à certaines idées reçues, les quantités de resvératrol et de picéide augmentent dans les feuilles infectées, mais sans efficacité réelle (Dufour et al., 2013). Par contre, après élicitation, on note une augmentation d'un stilbène particulier, le ptérostilbène, dont les quantités sont directement corrélées à l'utilisation d'un SDP et à son efficacité (figure 6).

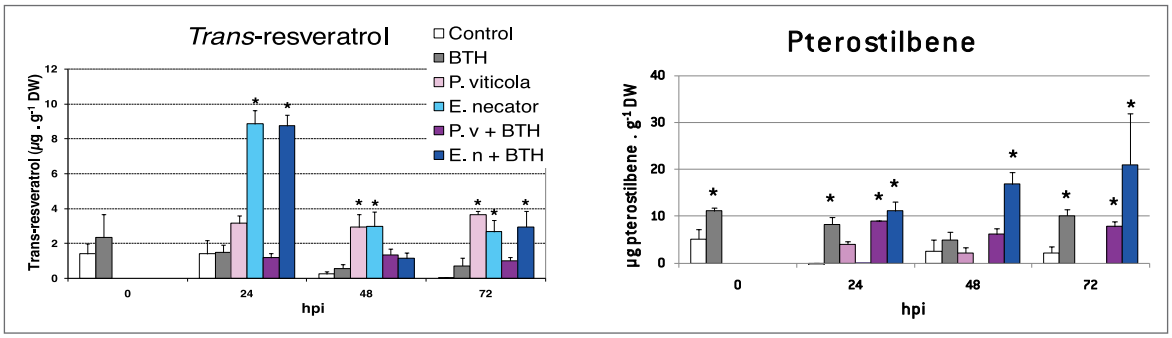


Figure 6 : Contenu en trans-resvératrol et en ptérostilbène au cours du temps (heures après inoculation) dans des feuilles de vigne élicitées ou non avec un analogue de l'acide salicylique (BTH) et inoculées ou non avec l'oïdium (En en bleu) ou avec du mildiou (Pv S ou R en rose et violet).

Ce rôle du ptérostilbène en tant que marqueur biochimique de l'état de défense de la vigne a été retrouvé après analyses du contenu en polyphénols de génotypes partiellement résistants ou résistants à l'oïdium et au mildiou, ayant introgressé différents QTL de résistance, issus de *Muscadinia rotundifolia* (plants fournis par D. Merdinoglu, INRA Colmar).

Au vignoble, l'analyse réalisée après plusieurs traitements et juste avant l'inoculation artificielle de mildiou, révèle l'importance des quantités de ptérostilbène en tant que marqueur de défenses efficaces vis-à-vis du mildiou, ainsi que la présence d'une molécule inconnue également corrélée à l'efficacité des défenses.

À ce jour, cet outil « BioMolChem » innovant est le seul permettant d'évaluer l'état de défense de la vigne et l'efficacité de ces défenses, tant au laboratoire qu'au vignoble. Bien évidemment, ces premiers résultats nécessitent une validation sur l'ensemble des millésimes de 2009 à 2011 (analyses en cours) et sur d'autres cépages.

PEUT-ON UTILISER LES SDP DANS DES STRATÉGIES DE PROTECTION AU VIGNOBLE ?

De nombreux essais ont été réalisés avec des SDP, peu ont donné lieu à des publications scientifiques et généralement les pressions épidémiques observées étaient plutôt faibles ne dépassant pas 20 % en fréquence d'attaque. Les expérimentations réalisées au vignoble au cours de la thèse de Marie-Cécile Dufour, sous de fortes pressions épidémiques (inoculation artificielle d'oïdium ou de mildiou) montrent qu'il est possible de protéger efficacement les organes de la plante (figure 4), mais avec parfois des effets inattendues, tels qu'un retard de véraison pour certain SDP activant certaines voies hormonales. Ce retard est cependant rattrapé avant récolte. L'utilisation de l'analogue de l'AS, responsable de ces retards de véraison a montré aussi une bonne efficacité anti-botrytis.

Concernant, la maîtrise de l'utilisation des SDP, des travaux sont nécessaires permettant, dans un futur proche, de les inclure dans des programmes de traitements. En effet, ces produits ajoutés à des ½ doses de fongicides ou mis en alternance permettent dans nos conditions d'obtenir d'excellents résultats et ce lors de forte pression épidémique (figure 7).

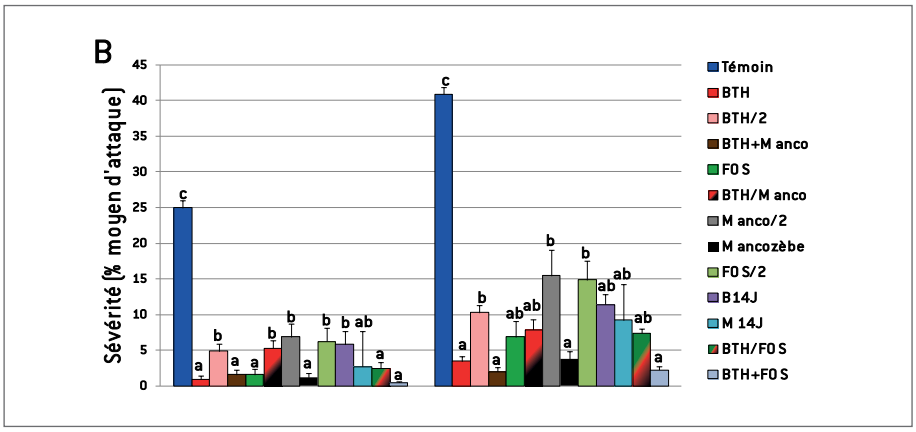


Figure 7 : Sévérité d'attaque du mildiou sur grappes en 2011 (juin et juillet), exprimée en % moyen d'attaque. **BTH+Manco ou BTH+FOS :** demi-dose des deux produits en association, **BTH/2, Manco/2 et FOS /2 :** produits appliqués à demi-dose, **BTH/Manco ou BTH/FOS :** demi-doses des deux produits appliquées alternativement, **B14J et M14J :** BTH et Mancozèbe à pleine dose appliqués tous les 14 jours. BTH = analogue d'acide salicylique, Manco = dithane ou mancozèbe, Fos = phosphonate, témoin = parcelle non traitée avec les anti-mildiou et les SDP.

Dans ces conditions il serait possible d'envisager une diminution des intrants pesticides de 30 à 50 %. Toutefois, il convient d'être prudent et d'expérimenter sous différents millésimes une telle utilisation des SDP.

L'utilisation des SDP peut également s'avérer d'un grand intérêt dans le cadre de l'utilisation future de génotypes de Vitis partiellement résistants à des maladies telles que l'oïdium et le mildiou de la vigne. Nous avons montré ainsi qu'il est possible d'assurer une protection complète avec le soutien d'un SDP appliqué en conditions de laboratoire.

QUELLES PERSPECTIVES POUR L'UTILISATION DES SDP ?

En terme de perspectives, il conviendrait de :

- Poursuivre ces études avec d'autres SDP de différentes origines, en conditions naturelles et d'évaluer leur efficacité en association avec des molécules fongicides, ou lors de pressions épidémiques faibles avec le soutien d'outil d'aide à la décision de les appliquer judicieusement,
- Il serait intéressant également de combiner des SDP élicitant différentes voies de défense et de mieux cerner la spécificité des SDP vis-à-vis des différents agents pathogènes. De par leur spectre d'action large, l'efficacité des SDP mériterait d'être évaluée sur d'autres bioagresseurs (insectes, nématodes, mycoplasme, virus…) dans une vision plus globale de la protection de la vigne.
  Des études préliminaires semblent montrer que de tels produits pourraient être utiles afin de limiter le développement de botrytis et l'attaque et l'extension de nécroses par des agents du dépérissement du bois de la vigne sur de jeunes boutures,
- L'étude de ces SDP dans le cadre de la protection intégrée ou de l'agriculture biologique pourrait s'avérer un débouché intéressant,
- Etant donné, la variabilité des réponses des différents cultivars ou génotypes, une étude sur leur efficacité en fonction des cépages et des conditions agronomiques sera indispensable si nous voulons généraliser leur utilisation et s'assurer d'un bon niveau de protection reproductible et limiter la variabilité.

L'avenir nous dira si la protection du vignoble sera « SDP or not SDP ? That is the question », et dépendra pour partie de l'autorisation de mise sur le marché vigne de produits efficaces.

Remerciements : Nous remercions le CIVB pour son soutien financier, l'INRA de Colmar (D. Merdinoglu) pour les génotypes résistants, le laboratoire du Prof JM Mérillon, et plus particulièrement S. Cluzet et C. Lambert pour leur aide au cours des analyses d'HPLC, tout le personnel de l'UMR SAVE et du PCT terrain qui a permis la réalisation des essais au vignoble (G Taris, L Druelle, P Sauris).

QUELQUES RÉFÉRENCES

Benhamou N (2009) La résistance chez les plantes. Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Lavoisier, Paris, pp376.

Dufour MC, Lambert C, Bouscaut J, Mérillon JM and M-F Corio-Costet (2013) Benzothiadiazole-primed defense responses and enhanced differential expression of defense genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *(Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola). Plant Pathol,* acceptée le 2 mai 2012, DOI: 10.1111/j.1365.3059.2012.02628.x, sous presse.

Dufour MC, and MF Corio-Costet (2013) Variability in the sensitivity of biotrophic grapevine pathogens *(Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola).* to acibenzolar-S methyl and two phosphonates. *Eur. J Plant Pathol.* Acceptée le 11 décembre 2012. DOI: 10.1007/s10658-012-0159-2, sous presse.

Dufour MC, Druelle L, Sauris P, Merdinoglu D, Cluzet S, et M-F Corio-Costet (2012) "BioMolChem" : une méthode pour évaluer l'état de défenses de la vigne, naturelles ou induites par élicitation : du gène au champ. AFFP- 10ème conf. Int. Sur les maladies des plantes, Tours (3-5 décembre). 8 pages.

DÉVELOPPEMENTS ANALYTIQUES POUR L'IDENTIFICATION ET LE SUIVI IN SITU DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LA DÉFENSE DES FEUILLES DE VIGNES CARACTÉRISÉES POUR LEUR NIVEAU DE RÉSISTANCE AU MILDIOU

Loïc Becker[1], Vincent Carré[1], Anne Poutaraud[2], Didier merdinoglu[2], Patrick Chaimbault[1]

[1] Université de Lorraine. Laboratoire de Chimie et Physique-Approche Multi échelle des Milieux Complexes (LCP-A2MC), EA 4632, Institut Jean Barriol Fédération de Recherche 2843 ; ICPM 1, Boulevard Arago ; Metz Technopole Cedex 03, F-57078, France.

[2] Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Equipe Génétique et Amélioration de la Vigne, UMR 1131, 28, rue de Herrlisheim, F-68021 Colmar, France

I. INTRODUCTION

La viticulture représente un intérêt économique, gastronomique et culturel en France. Sa préservation est un souci majeur face aux différentes agressions auxquelles elle est soumise.

Le projet de recherche que nous menons vise à améliorer les connaissances concernant les mécanismes de défense naturelle de la vigne lorsque celle-ci est infectée par le mildiou *(Plasmopara viticola)*. L'étude se focalise sur des composés de faible masse (métabolites secondaires de la plante) susceptibles d'être impliqués dans les processus de défense des feuilles de vigne. Notre approche fait appel à différentes techniques d'analyse et en particulier la spectrométrie de masse de feuilles de vigne de variétés résistantes, sensibles mais également hybrides issues de croisements.

Le premier aspect repose sur une exploration du contenu cellulaire général (étude métabolomique) par spectrométrie de masse à très haute résolution d'une population d'hybrides. Cette dernière est issue de croisements entre des variétés résistantes et sensibles, présentant ainsi des degrés de résistance variés au mildiou. Dans ce genre d'approche, des feuilles de la population étudiée sont mises en contact avec le pathogène avant d'être analysées et comparées à une série de feuilles témoin. La comparaison des profils fait ressortir un certain nombre de composés (ou métabolites) d'intérêt qui sont sélectionnés afin d'être soumis à un traitement statistique permettant la mise en relief de ressemblances (ou de dissemblances) entre échantillons.

Le deuxième aspect concerne le suivi moléculaire par spectrométrie de masse à temps de vol de l'infection de feuilles de vigne par *Plasmopara viticola*. L'outil original que constitue l'imagerie par spectrométrie de masse permet de donner une information sur la localisation directe sur les feuilles des composés impliqués dans la défense de la vigne (lieu de leur synthèse

par la plante). Un laser de longueur d'onde 266 nm est employé pour sa capacité à ioniser les molécules organiques (les molécules doivent porter une charge électrique pour être analysées par spectrométrie de masse) présentes au sein des végétaux. En outre, la finesse du spot de ce laser (de l'ordre de 40 μm) permet de sonder de petites surfaces avec une résolution spatiale élevée.

Nous montrerons ici notre démarche ainsi que quelques résultats significatifs que nous avons obtenus.

II. ÉTUDE MÉTABOLIQUE DE FEUILLES DE VIGNE INFECTÉES

L'étude différentielle par spectrométrie de masse entre feuille infectée et feuille saine (témoin) a pour but de confronter leurs profils métaboliques. La population étudiée est obtenue par croisement variétal afin de présenter des degrés variés de résistance au mildiou. La sensibilité au pathogène est repérée par l'échelle de notation OIV-452 (Office International de la Vigne et du Vin) s'étalonnant de 1 (pour les variétés sensibles) à 9 (pour les variétés résistantes). Deux jeux d'échantillons sont générés, un premier inoculé avec le pathogène *Plasmopara viticola*, un deuxième servant de référence (groupe témoin) comportant des feuilles n'ayant subi aucun stress. Les échantillons obtenus[1] sont analysés par spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier, dite à très haute résolution (FTICRMS), associée à une source d'ionisation par électrospray (ESI). Cet outil est particulièrement bien adapté pour l'interprétation de mélanges aussi complexes que les extraits de feuille[2]. En effet, la très grande résolution de ce spectromètre permet la distinction de composés de masse moléculaire très proche et sa très grande exactitude de mesure de masse permet d'attribuer à chaque masse détectée, une formule chimique. De plus, la possibilité de mener des expériences de fragmentations des ions moléculaires permet de conforter les hypothèses d'identification. La source électrospray quant à elle préserve les espèces fragiles lors du processus d'ionisation. L'analyse de la composition chimique nécessite l'extraction préalable des métabolites contenus dans la feuille car elle s'effectue en phase liquide. Deux modes d'ionisation sont possibles : le mode positif et le mode négatif. Pour cette étude, les analyses présentées sont réalisées en mode négatif car il fournit des empreintes spectrales plus informatives. Ceci est vraisemblablement lié à l'abondance de métabolites acides et polyphénoliques.

1) Profilage métabolique par spectrométrie de masse

Un total de 582 spectres de masse a été obtenu se décomposant en 97 analyses (nombre de génotypes) effectuées en triplicata des échantillons témoins et des échantillons inoculés. Un exemple d'empreinte spectrale d'un échantillon inoculé et du même échantillon sain (témoin) est présenté en Figure 1.

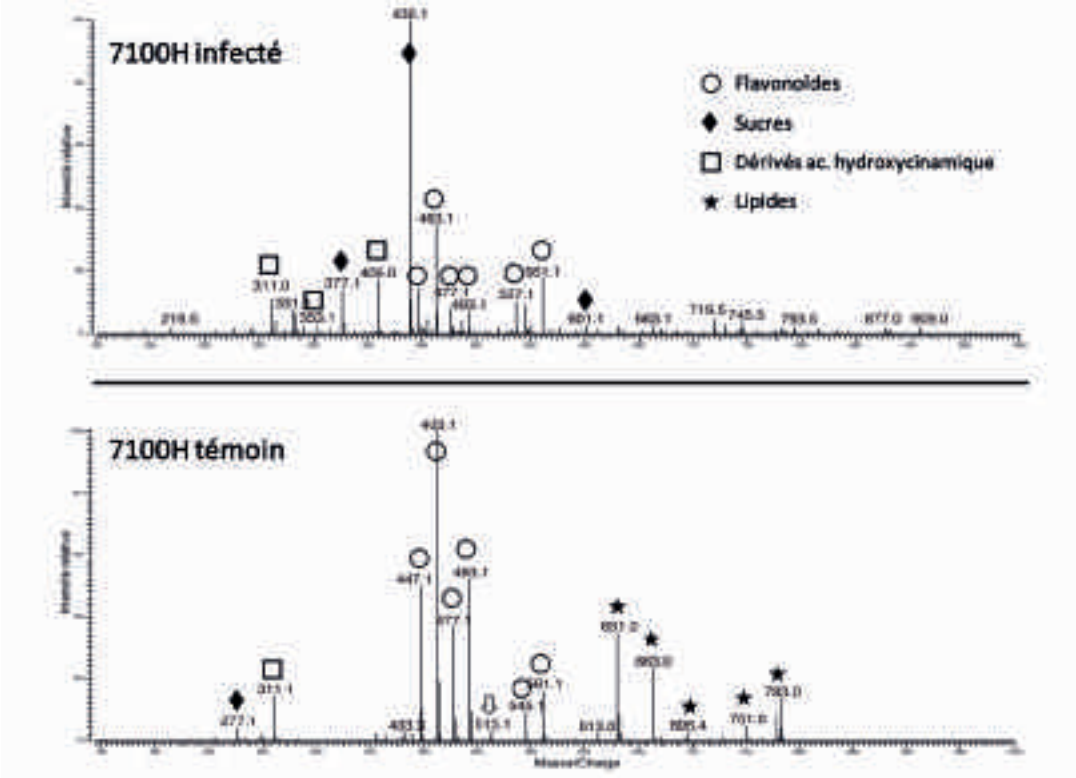


Figure 1 : spectre ESI-FTICRMS en mode de détection négatif de l'échantillon inoculé de génotype 7100H.

Après identification, les ions observés ont pu être principalement regroupés en 4 familles moléculaires : des flavonoïdes, des sucres, des dérivés d'acide hydroxycinamique et des lipides. En ce qui concerne les lipides, la plupart d'entre eux sont phosphorylés et il constituent 3 sous-familles dont les représentants sont connus pour être constitutifs des cellules des plantes voire même plus spécifiquement des chloroplastes (organites dans lesquels la photosynthèse a lieu)[3]. Ces lipides jouent en outre un rôle dans la régulation de la croissance de la plante et interviennent également dans ses mécanismes de défense[4].

Nous avons alors établi une liste de 19 ions marqueurs représentatif de la variabilité inter échantillon que, compte tenu du nombre de données générées, nous avons soumis à un traitement statistique de type analyse en composante principale (ACP).

2) Traitement statistique de l'information

Avant traitement des données nous avons réduit à 50 individus notre étude en éliminant certains échantillons qui pouvait potentiellement comporter un biais analytique en corrélant nos observations à des dosages, principalement des flavonoïdes, obtenus par chromatographie en phase liquide de métabolites.

L'ACP des observations est présentée en Figure 2

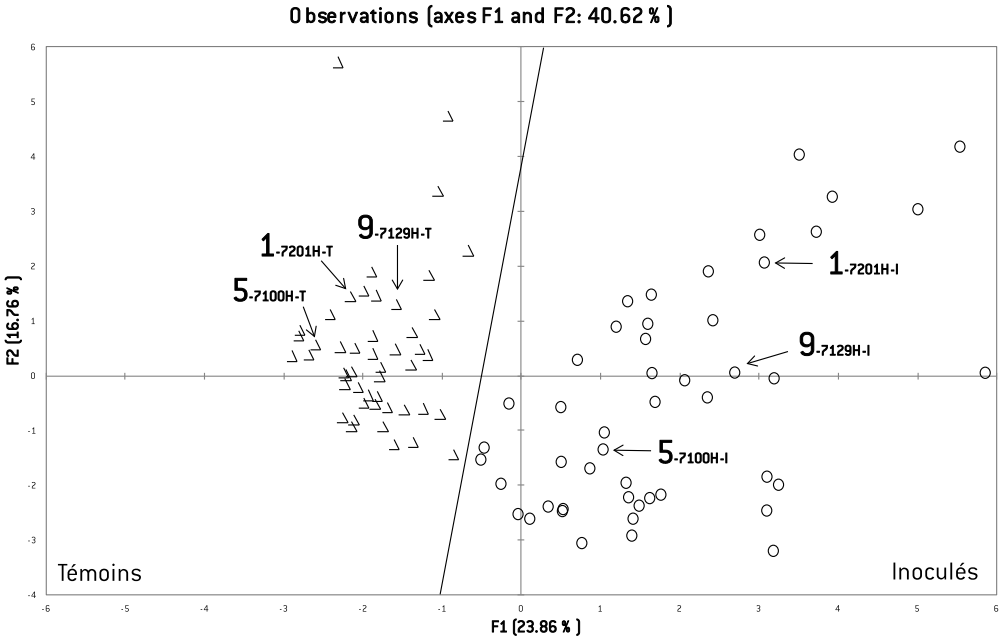


Figure 2 : Analyse en composantes principales des individus (50 hybrides). Les triangles représentent les individus témoins (indexés T) et les cercles, les individus inoculés (indexés I). Les numéros en gros représentent l'OIV.

On observe une ségrégation nette entre les échantillons témoins et inoculés. Tout comme les saccharides, les lipides sont fortement portés sur la droite de l'axe F1. Ils favorisent donc cette séparation. Cependant, si ce travail permet de mettre en évidence la contamination des feuilles de vigne par le mildiou, les échantillons ne sont pas classés par degré de résistance. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la biosynthèse de ces molécules est impactée par l'infection mais pas forcément directement impliquée dans la défense de la feuille. Les résultats obtenus par l'approche métabolomique apportent donc un faisceau d'informations intéressantes mais comme toute méthode d'analyse, l'ensemble des composants d'un échantillon n'est pas forcément détecté. Par exemple ici, les stilbènes sont des composés qui sont synthétisés par la plante lorsque celle-ci est soumise à une attaque biotique ou abiotique. Ils n'ont cependant pas pu être détectés lors des analyses par ESI-FTICRMS alors que présents dans les échantillons comme l'ont révélées des analyses en chromatographie. Néanmoins, une information par imagerie peut être obtenue sur ces composés.

III. IMAGERIE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Ce volet concerne l'analyse in situ de feuilles de vigne au moyen de l'imagerie par spectrométrie de masse (ISM). Cette technique permet d'obtenir des informations structurales sur les composés détectés et une localisation directe sur la surface étudiée (information spatiale) de ces mêmes composés. L'instrumentation mise en jeu ici est la spectrométrie de masse à temps de vol couplée à une source de désorption/ionisation laser. Ces analyses peuvent être conduites avec ou sans l'utilisation de matrice (produit chimique intermédiaire d'ionisation préservant les espèces fragiles).

1. Imagerie par LDI-TOFMS

Cette partie décrit les résultats obtenus en imagerie par désorption/ionisation laser (LDI) c'est-à-dire sans utilisation de matrice. L'avantage de la LDI repose sur le fait que la préparation de l'échantillon est très simple, il suffit de fixer ce dernier sur la plaque d'analyse (Figure 3). Ainsi, peu de paramètres entrent en compte. Certains composés ne peuvent être ionisés facilement dans ces conditions.

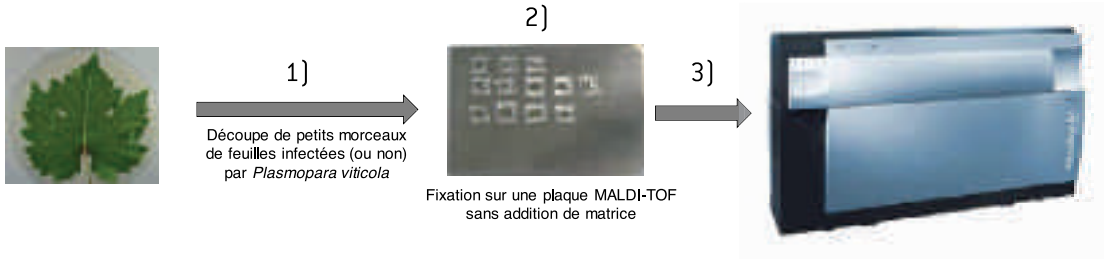


Figure 3 : protocole d'échantillonnage et d'analyse de feuilles de vigne en imagerie LDI-TOFMS. 1) De petits morceaux de feuille sont découpés au scalpel (environ 1cm²). 2) Ces échantillons sont fixés sur la plaque d'analyse à l'aide d'un scotch en aluminium et 3) la plaque d'analyse est insérée dans le spectromètre et l'analyse peut débuter (après programmation de la machine et sélection de la zone à cartographier).

a. Mode positif

Pour chaque expérience en imagerie, un certain nombre de paramètres sont fixés. Ils concernent l'énergie laser, la taille de l'impact laser (estimée à environ 40 µm), le pas qui sépare deux tirs laser qui déterminera donc la résolution de la cartographie (fixée à 50 µm), et enfin, le nombre de tirs laser pour chaque point (établi à 50). Nous employons un laser de type Nd-YAG à 266 nm pour plusieurs raisons : i) le spot de ce laser présente un profil gaussien, ii) le maximum d'énergie se concentre sur une zone très faible permettant de sonder de petites surfaces, iii) il permet d'ioniser un grand nombre de molécules organiques. En mode positif, ce sont principalement des ions moléculaires radicalaires (M.+) qui sont détectés, notamment pour des composés de la famille des stilbènes (resvératrol et ptérostilbène).

La Figure 4 présente des images (2mm ➡ 2mm) réalisées par spectrométrie de masse provenant de deux échantillons de feuilles de Cabernet Sauvignon issues de plants élevés en serre : un échantillon d'une feuille témoin (images A et B) et un échantillon à 5 jours après infection par *Plasmopara viticola* (images C et D). Ces images représentent la répartition sur ces échantillons des ions caractéristiques soit du resvératrol à droite, ou soit du ptérostilbène à gauche. Pour les images A et B de la feuile témoin, on ne remarque aucune présence de ptérostilbène ou de resvératrol (intensité nulle) sur la zone analysée.

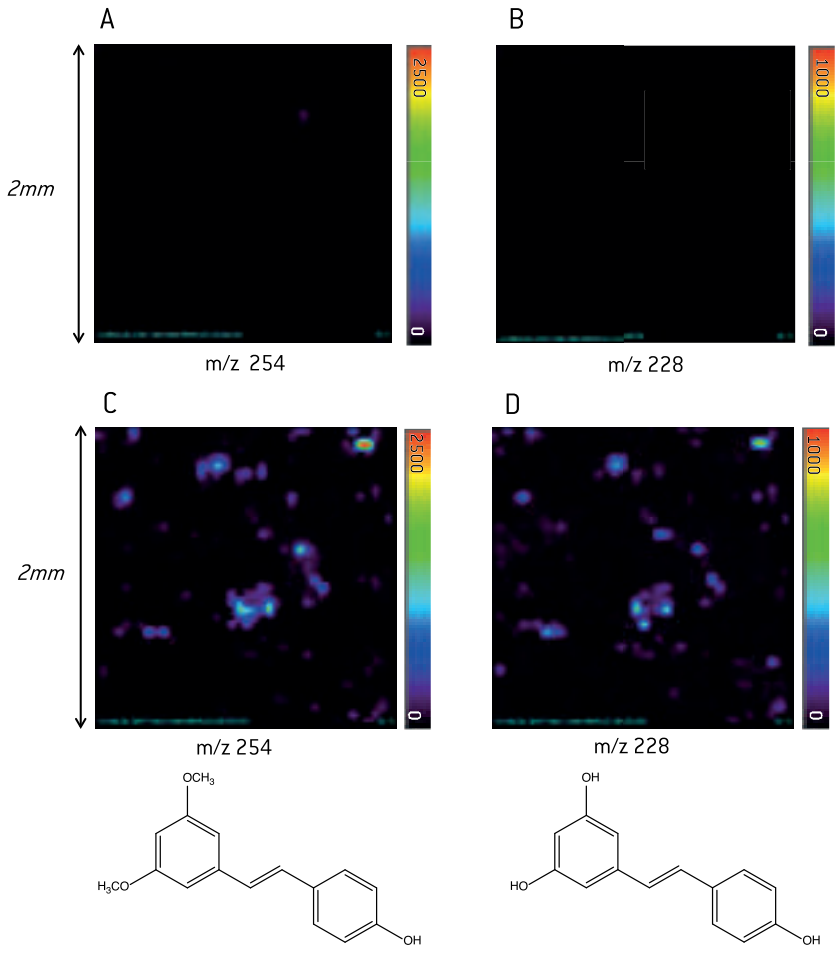


Figure 4 : Image par spectrométrie de masse d'une surface ab axiale de feuille de vigne Cabernet Sauvignon (dimensions : 2x2 mm). A) et B) distributions respectives des ions m/z 254 (ptérostilbène) et m/z 228 (resvératrol) pour une feuille de Cabernet Sauvignon témoin. C) et D) distributions respectives des ions m/z 254 et m/z 228 pour une feuille de Cabernet Sauvignon analysée à 5 jours post-infection. Les structures moléculaires de ces deux ions sont représentées en-dessous des images. L'échelle d'intensité est indiquée sur le coté, les 4 images ont été normalisées deux à deux en fonction de l'intensité la plus élevée pour chaque composé présenté.

Les images C et D de la Figure 4 correspondent à la feuille infectée. Des zones de biosynthèse importante de ces composés sont observables. Lorsque la feuille est en contact avec le pathogène, elle réagit en synthétisant ces métabolites secondaires[5] et les molécules reconnues pour intervenir directement lors de l'attaque du pathogène sont notamment les stilbènes[6]. Les deux stilbènes présentés montrent une répartition de leur biosynthèse similaire, colocalisée sous l'effet du pathogène. Les points très intenses correspondent à des sites d'infection, en l'occurrence les stomates, organes permettant à la feuille les échanges gazeux avec son environnement. Ces deux composés permettent de différencier un échantillon inoculé d'un échantillon témoin, puisque pour ce dernier, ils ne seront pas détectés car non synthétisés par la feuille.

b. Mode négatif

Le mode de détection négatif peut apporter des compléments d'analyse en révélant des métabolites non détectables en mode positif. Dans ce mode, des ions radicalaires (M.-) par capture d'électrons ainsi que des ions déprotonés [M-H]- peuvent être détectés. Nous avons pu détecter ainsi la quercétine sur des feuilles prélevées cette fois en extérieur. La répartition de la biosynthèse de ce flavonoïde est remarquable car elle est, comme les stilbènes, très localisée. Le travail d'évaluation de ce mode se poursuit actuellement.

2. Corrélation avec la fluorescence en microscopie confocale

En 2012, le Laboratoire d'Ecologie Systématique et Evolution (CNRS UMR 8079) d'Orsay, l'Institut des Sciences du Végétale (CNRS UPR 2355 & FRC 3115) de Gif-sur-Yvette et l'Equipe Génétique et Amélioration de la Vigne (UMR 1131) de l'INRA de Colmar publiait un article relatant le développement d'une méthode de microscopie confocale pour la localisation au niveau cellulaire des stilbènes induit par *Plasmopara viticola* dans les feuilles de vigne[7]. Cette technique permet en outre de localiser ces stilbènes dans un espace à 3 dimensions ce que ne permet pas la spectrométrie de masse. En revanche, si la microscopie confocale permet de mesurer la fluorescence des stilbènes avec une grande sensibilité et une résolution spatiale bien inférieure au micromètre, cette détection reste soumise aux différences de viscosité du milieu de détection et surtout ne donne pas d'information le type de stilbène détecté contrairement à la spectrométrie de masse. Des travaux de microscopie corrélatives ont été entrepris entre ces équipes et la notre afin d'associer les avantages de chacune de ces détections. Bien qu'il reste du chemin à parcourir, les premiers travaux sont encourageants.

3. Imagerie par MALDI-TOFMS

L'utilisation de matrice peut permettre de favoriser l'ionisation de composés plus fragiles. Les matrices sont de petites molécules organiques qui absorbent l'énergie délivrée par les photons émis par le laser. Cette énergie est ensuite transmise aux molécules de l'échantillon en phase gazeuse. Ce mode d'ionisation est plus doux que la LDI. Cependant, la désorption/ionisation laser assistée par matrice (en anglais MALDI pour Matrix Assisted laser Desorption/Ionisation) implique d'optimiser un certain nombre de paramètres tels que le choix de la matrice, son mode de dépôt, sa concentration et enfin la composition de son solvant. Le développement de l'imagerie MALDI est mené sur un spectromètre de masse à temps de vol de type équipé d'un laser à 355nm.

Les premiers essais dans ce domaine s'effectuent sur extraits méthanoliques afin de déterminer les matrices les plus appropriées à l'ionisation de nouveaux métabolites. Les premiers essais constituent un point de départ encourageant pour l'étude MALDI des feuilles de vigne. En effet, jusqu'à présent, les flavonoïdes, à l'exception de la quercétine en mode négatif, n'avaient pas été détectés en mode positif en LDI-TOFMS. Or les premiers spectres effectués montrent la détection de la quercétine, la myricétine et surtout de viniférines, dimères de resvératrol jamais détectées auparavant en LDI-TOFMS voire même en ESI-FTICRMS lors des études de profils métaboliques. La suite de la démarche consistera à analyser toujours par MALDI-TOFMS un broyat filtré de feuille fraîche. Ce type d'échantillon qui se rapproche plus de la complexité d'une feuille que de son extrait méthanolique, pourra également fournir des informations plus riches. Cette étape permettra en outre d'estimer les effets de matrice (baisse de sensibilité de détection due au milieu d'analyse devenu très complexe). Les résultats obtenus nous guiderons pour le choix de la matrice. Lorsque l'ensemble des paramètres inhérents à l'ionisation MALDI de ces échantillons seront optimisés, des expériences d'imagerie *in situ* sur feuilles de vigne en MALDI-TOFMS seront menées.

IV. CONCLUSION

Les directions dans lesquelles peut s'engager la recherche pour la compréhension des relations « hôtes-pathogènes » des plantes sont nombreuses. Parmi celles-ci, l'analyse globale et *in situ* des métabolites secondaires de la plante par spectrométrie de masse est en plein essor car cette technique permet d'accéder à l'identification des marqueurs d'un phénomène biologique (maladie, résistance, etc).

Ici, nous avons présenté l'étude métabolomique menée par ESI-FTICRMS sur une population d'hybrides de résistance variée au mildiou. Le travail d'identification a permis de dégager un certain nombre de composés appartenant à des familles moléculaires variées impactées par l'infection par cet oomycète. Les données spectrométriques ont été soumises à l'analyse en composantes principales et nous avons observé une ségrégation franche entre les deux sous-populations, infectée et témoin.

Dans un deuxième temps, l'étude consacrée à l'imagerie par spectrométrie de masse a apporté des compléments d'information. Les expériences menées en LDI en mode positif et négatif sont relativement rapides à mettre en œuvre et permettent d'observer des molécules d'intérêt. Nous avons montré qu'il est possible dans ce cas de détecter et de localiser directement sur l'échantillon des métabolites plus en rapport avec la résistance comme les stilbènes.

Comme nous l'avons montré, le développement instrumental progresse rapidement. Il reste encore beaucoup à faire dans ce domaine pour cerner définitivement la relation qui unit Plasmopara viticola aux dépens de *Vitis vinifera*.

V. BIBLIOGRAPHIE

[1] R. Pezet, C. Perret, J.B. Jean-Denis, R. Tabacchi, K. Gindro, and O. Viret, 6 -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *J. Agric. Food. Chem* **2003**, *51*, 5488-5492.

[2] P. Schmitt-Kopplin and N. Hertkorn, Ultrahigh resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 1309-1310.

[3] F.F. Hsu, J. Turk, T.D. Williams, and R. Welti, Electrospray ionization multiple stage quadrupole ion-trap and tandem quadrupole mass spectrometric studies on phosphatidylglycerol from Arabidopsis leaves. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 783-790.

[4] C. Testerink and T. Munnik, Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 368-375.

[5] R.A. Dixon, E.R. Blyden, and J.S. Ellis, *Origin of phytoalexin,* in *Biochemical aspects of crop improvement,* CRCPress, Editor 1991. p. 179-222.

[6] P. Langcake, Disease resistance of vitis spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ⇨ -viniferin, ⇨ -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* **1981**, *18*, 213-226.

[7] L.G. Bellow S., Brown S. C., Poutaraud A., Cerovic Z. G., In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by Plasmopara viticola in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.* **2012**.

LA COMMUNAUTÉ MICROBIENNE DE LA BAIE DE RAISIN ; IMPACT DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

Guilherme Martins[1,2], Cécile Miot-Sertier[1], Béatrice Lauga[3], Olivier Claisse[1], Aline Lonvaud[1], Guy Soulas[1], Isabelle Masneuf-Pomarède[1,2]

[1]USC Oenologie- INRA, Université Bordeaux Segalen, ISVV, Villenave d'Ornon, France,

[2]ENITA de Bordeaux, Gradignan cedex,

[3] Equipe Environnement et Microbiologie UMR IPREM 5254 IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Avenue de l'Université, BP 1155, Pau cedex, 64013, France

INTRODUCTION

Les conditions de production de raisin de qualité vont évoluer dans les années à venir avec d'une part, les recommandations restrictives de l'usage des traitements phytosanitaires et d'autre part, l'évolution climatique vers un réchauffement. A l'heure actuelle, beaucoup de producteurs choisissent des itinéraires alternatifs pour protéger leur vignoble. En Aquitaine, la viticulture biologique se développe à un rythme rapide : les surfaces consacrées à la vigne biologique ont augmenté de plus de 30 % ces cinq dernières années. Si la communauté microbienne fermentaire est désormais bien connue, l'écosystème microbien à la surface de la baie de raisin a été beaucoup moins étudié, notamment dans sa double composante, fongique et bactérienne. Il est désormais bien établi que ces microorganismes sont retrouvés dans le moût puis dans le vin tout au long de son élaboration (Renouf et al., 2005, 2007). Peu de travaux sont consacrés à l'étude de l'origine, de la composition de la communauté microbienne de la baie, et des facteurs environnementaux susceptibles d'interagir sur son évolution.

Ce projet de recherche a pour objectif principal de décrire la dynamique et la diversité des populations microbiennes de la baie de raisin puis d'évaluer l'impact de facteurs tels que le stade phénologique, le micro – climat et les pratiques culturales. Ces données doivent contribuer à une meilleure compréhension de l'écologie des communautés microbiennes présentes sur la baie de raisin. En particulier, nous avons ciblé l'étude de l'impact des produits phytosanitaires d'origine cuprique très utilisés en viticulture, indépendamment du mode de conduite du vignoble (viticulture biologique, viticulture intégrée ou viticulture conventionnelle). Si l'écotoxicité du cuivre sur les organismes telluriques et sur le fonctionnement biologique des sols n'est plus à démontrer (Ranjard *et al.*, 2006 a et b, 2008), son impact sur les communautés microbiennes de la baie de raisin n'a jamais été évalué.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de microbiologie, Faculté d'OEnologie de Bordeaux – Institut des Sciences de la Vigne et du Vin. Cette étude dans le cadre d'un axe de recherche établi depuis plusieurs années dans ce laboratoire, sur l'étude de l'écosystème microbien du raisin au vin.

DIVERSITÉ ET DYNAMIQUE TEMPORELLE DE LA COMMUNAUTÉ MICROBIENNE DE LA BAIE DE RAISIN

Pour cette étude, plusieurs parcelles de la région du Libournais ont été sélectionnées dans trois zones viticoles : Pomerol, Lussac, Puisseguin. Sur chaque zone, deux propriétés, l'une en viticulture conventionnelle, la seconde en viticulture biologique sont retenues, avec par ailleurs une homogénéité du vignoble pour l'âge des pieds de vigne, taille et opérations en vert. Le merlot, cépage dominant dans cette région, est présent sur les 6 parcelles. Par ailleurs, les trois zones sont choisies pour des contrastes microclimatiques afin d'étudier l'incidence du microclimat sur la diversité des communautés microbiennes présentes sur les baies de raisin. Pomerol est considéré comme un terroir chaud et précoce, comparativement à Lussac et Puisseguin, définis comme des terroirs plus frais (Bois 2007).

Pour chaque parcelle, trois placettes de prélèvements sont identifiées assurant ainsi une représentativité intra-parcellaire. Au total, 5 prélèvements de baies sont réalisés stérilement, de la véraison à maturité avancée (10-15 jours après la date effective de maturité technologique).

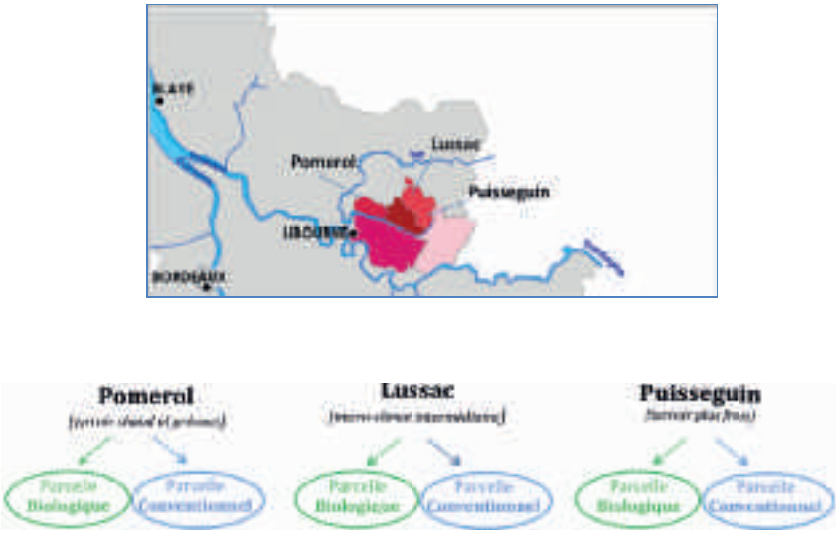


Figure 1 : schéma décrivant les parcelles et le dispositif expérimental

Dans la plupart des travaux menés jusqu'à présent, la microflore était étudiée après broyage des baies, opération qui crée une première étape de sélection des microorganismes (Bae *et al.* 2006 ; Nisiotou *et al.*, 2007). Les colonies ainsi isolées sont proches de la réalité de l'écosystème « moût », mais une partie de la microflore de la surface de la baie est éliminée par le pressurage des grappes. L'approche proposée dans ce travail diffère en ce sens que nous lavons les baies afin de récupérer la communauté microbienne présente à la surface du fruit. Nous avons utilisé deux méthodologies complémentaires basées d'une part sur la culture des microorganismes sur des milieux sélectifs et d'autre part, sur l'analyse d'empreinte moléculaire de l'ADN extrait à partir des échantillons d'eau de lavage de baies.

L'analyse des niveaux de population sur plusieurs millésimes montre une augmentation progressive du stade de début véraison au stade de maturité. Les concentrations de levures et bactéries sont voisines, depuis 10^4 UFC/gramme de raisin aux stades véraison, à 10^6 UFC/gramme de raisin au stade maturité et maturité avancée. Dans nos conditions expérimentales, la présence de bactéries lactiques et acétiques n'est mise en évidence que pour les stades de maturité et maturité avancée.

Afin de préciser la nature des genres/espèces de ces micro-organismes, nous avons identifié puis mis en collection des isolats. L'identification génétique des colonies bactériennes révèle une diversité importante comprenant 44 espèces appartenant à 21 genres. Parmi eux, les genres *Pseudomonas* et *Micrococcus* sont les plus représentés. La fréquence d'apparition de *Pseudomonas sp.* est significativement supérieure aux deux premiers stades de maturation par rapport aux stades de maturité ; la situation inverse est observée pour *Micrococcus sp.*, qui est majoritaire aux derniers stades de maturation (figure 2). Ainsi les espèces à Gram négatif décroissent au fur et à mesure de la maturation au profit des bactéries à Gram-positif, celles-ci dominant ensuite dans le moût de raisin, puis lors de la vinification. Les espèces bactériennes identifiées à la surface de la baie de raisin sont présentes dans d'autres compartiments de la plante, notamment la rhizosphère ou l'endosphère (Compant *et al.*, 2005, 2011). De nombreux travaux rapportent, pour *Pseudomonas, Acinetobacter et Pantoae spp*, leur action bénéfique vis-à-vis de la plante, et leur capacité potentielle à inhiber le développement de *Botrytis cinerea* en particulier par des phénomènes de potentialisation et d'élicitation (Compant *et al.*, 2005 ; Haas *et al.*, 2005).

Pour la population fongique, parmi les huit genres identifiés, les espèces appartenant au genre *Aureobasidium* sont les plus abondantes et leur présence est vérifiée pour tous les stades de prélèvements. *Aureobasidium pullulans* est rapportée comme étant un agent potentiel de biocontrôle vis-à-vis du développement de pathogènes de la vigne et d'Aspergillus, avec pour conséquence, par exemple, une diminution de la production d'ochratoxine A au niveau des baies de raisin (De Felice *et al.* 2008).

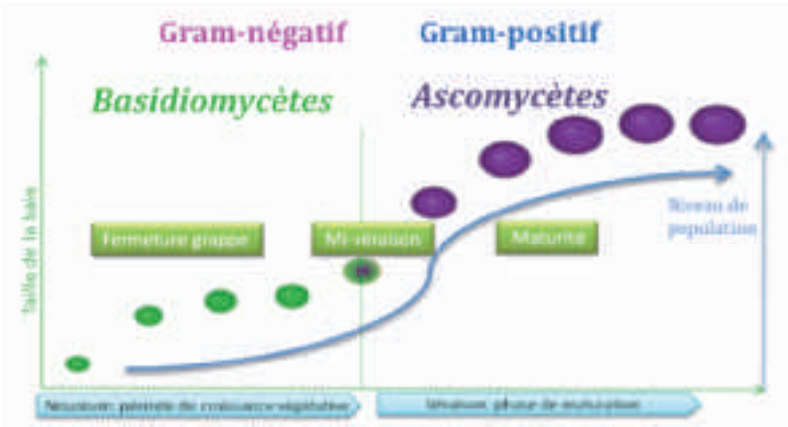


Figure 2 : Évolution de la population cultivable levures/bactéries au cours du développement de la baie

L'étude de l'activité métabolique des communautés microbiennes à l'aide des plaques Biolog® nous a permis de déterminer l'indice de diversité (indice de Shannon) et l'activité moyenne globale (AWCD) de la microflore à chaque prélèvement (Tableau I). De façon générale, les valeurs d'indices de Shannon et d'AWCD sont significativement plus élevées au stade maturité avancée.

Tableau I : Indice de diversité de Shannon et AWCD calculés à partir de substrats dégradés, Plaque Biolog ® EcoPlate, pour les différents stades et les parcelles de Pomerol et Puisseguin en 2010. * indique des différences significatives ($p < 0,05$) ANOVA un facteur « stade phénologique ». Les valeurs représentent la moyenne des triplicatas.

Stade	Indice de Shannon	Ecartype	AWCD	Ecartype
(Déb Véraison)	3.27	0.10	1.00	0.25
(Mi - Véraison)	3.26	0.07	0.88	0.21
(Déb Maturité)	3.23	0.15	0.88	0.33
(Maturité)	3.18	0.17	0.74	0.38
(Mat Avancée)	4.12*	1.29	1.18*	0.45

Le stade maturité avancée constitue un groupe séparé des autres stades phénologiques, tant sur le plan des niveaux de population que sur la diversité métabolique. Les populations de bactéries acétiques sont alors plus élevées et les levures fermentaires, bien que très rares à la surface de la baie de raisin, sont plus fréquemment détectées (non-*Saccharomyces, Brettanomyces*) (Tableau II).

Région viticole	Stades Phén.	Mode cond.	*Saccharomyces* spp.	*Hanseniaspora* spp.	*Metschikowia pulcherrima*	*Torulaspora delbrueckii*	*Candida zemplinina*	*Issatchenkia orientalis*	*Brettanomyces bruxellensis*
Lussac	Début de Maturité	Bio	-	-	-	-	-	-	-
		Conv	-	-	-	-	-	-	-
	Début de Maturité II	Bio	-	-	-	-	-	+	-
		Conv	-	+	-			-	-
	Maturité	Bio	+	+	-	+	+	+	+
		Conv	-	+	-	-	+	-	-
	Maturité Avancée	Bio	+	-	+	+	+	+	+

Tableau II : Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel. Échantillons provenant des vignobles de Lussac, campagne de 2008, à différents stades phénologiques pour les parcelles en mode de conduite biologique (Bio) et Conventionnel (Conv).

L'augmentation de la concentration en sucres dans les exsudats de la baie de raisin est une des raisons expliquant la dynamique des populations microbiennes et en particulier, les niveaux élevés de populations trouvées au stade de maturité avancée. Il existe une corrélation positive entre les teneurs en sucres des exsudats de la baie de raisin (D-Glucose + D-Fructose) et les niveaux de population cultivable, levure et bactérie.

MICROCLIMAT ET COMMUNAUTÉ MICROBIENNE DE LA BAIE DE RAISIN

Les trois terroirs viticoles étudiés dans ce travail se caractérisent par des microclimats très différents (Bois 2007). Pomerol est un terroir précoce, avec des températures moyennes plus élevées que celles mesurées à Lussac et Puisseguin, terroirs plus tardifs. Par ailleurs, l'humidité relative est plus élevée à Lussac et Puisseguin par rapport à Pomerol (tableau III).

A - Campagne de 2009	TM	UM	RR
Pomerol	20.06	69.48	80.00
Lussac	18.83	71.72	96.00
Puisseguin	18.22	72.37	87.50

B - Campagne de 2010	TM	UM	RR
Pomerol	19.36	69.55	74.50
Lussac	18.68	74.42	65.50
Puisseguin	18.03	74.47	76.00

Tableau III : Données climatiques concernant la campagne de 2009 et 2010. TM : température moyenne de l'air sous abri (°C) ; UM : humidité relative moyenne (%); RR : cumul des précipitations en mm.

Nous avons étudié différents paramètres de la population bactérienne et fongique tels que la structure, la densité et l'activité métabolique. Dans la majorité des cas, les niveaux de populations sont plus élevés dans les terroirs plus tardifs de Puisseguin et de Lussac que dans ceux de Pomerol. De même, les indices de diversité métabolique des échantillons de Puisseguin sont significativement supérieurs à ceux de Pomerol. Ainsi, dans la région du Libournais, les zones climatiques plus fraîches et humides, favorisent le développement des micro-organismes. Une activité de l'eau (Aw) sur la pellicule de raisin plus élevée pour la zone plus fraîche et humide peut favoriser le développement microbien, et ainsi expliquer les valeurs les plus élevées de populations et de diversité trouvées à Puisseguin par rapport à celles de Pomerol, terroir plus chaud et sec.

CUIVRE ET COMMUNAUTÉ MICROBIENNE DE LA BAIE DE RAISIN

Les teneurs en cuivre dans les eaux de lavage des baies ont été déterminées pour les échantillons prélevés en 2009 et 2010. Les valeurs fluctuent entre 0,05 µg/gr de baie et 7,5 µg/gr de baie selon le millésime et le mode de conduite (Martins *et al.*, 2012). Une corrélation négative entre niveaux de population, levures et bactéries, et concentration en cuivre des eaux de lavage des baies est mise en évidence, pour deux millésimes (2009 exemple figure 3 et 2010) indépendamment du terroir et du mode de conduite.

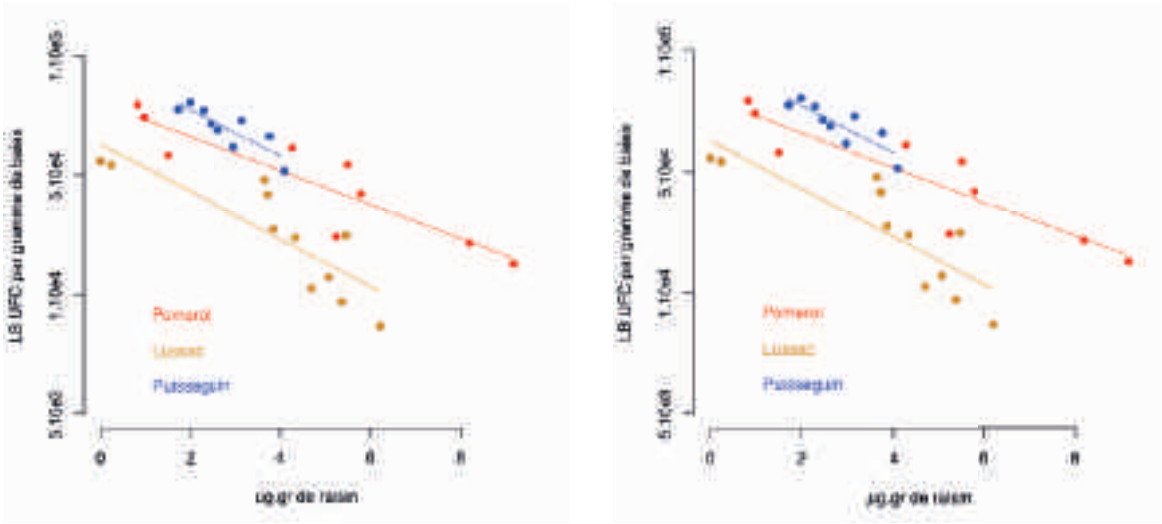


Figure 4 : Corrélation entre la quantité de cuivre présent sur les baies de raisin et la population cultivables sur milieu levure (LT) et bactéries (LB 1/10) pour les différents terroirs. Campagne de 2009, aux stades début maturité I et début de maturité II.

De la même façon, nous avons réalisé une analyse de corrélation entre l'indice de diversité calculé à partir des profils métaboliques Biolog® (Lussac, 2010, mode biologique et conventionnel, stades début et mi-véraison, début maturité) et les teneurs en cuivre des eaux de lavage des baies (test de Spearman). L'analyse montre une corrélation négative très significative (*p-value* < 0,0001 ; ρ = 0,90) entre l'indice de diversité (Shannon) et les niveaux de cuivre.

Enfin, nos résultats mettent également en évidence l'impact du cuivre sur la structure de la population bactérienne déterminée par empreinte moléculaire, en termes de diversité et de richesse. L'analyse de corrélation entre l'indice de Shannon calculé avec les profils d'empreinte moléculaire (Lussac, 2009, mode biologique et conventionnel) et les teneurs en cuivre des eaux de lavage montre une corrélation négative significative entre les deux (*p-value* < 0,031 ; ρ = 0,51). Cette corrélation est également significative pour l'indice de richesse (*p-value* < 0,012 ; ρ = 0,58).

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée pour plusieurs formulations de cuivre retrouvées dans les programmes de traitements phytosanitaires des parcelles étudiées. Il s'agit du ($CuSO4 + Ca(OH)_2$) ou du sulfate de cuivre ($CuSO_4$), constituant de la bouillie bordelaise, de l'oxyde de cuivre (Cu_2O), matière active entrant dans la composition du produit Nordox 74 WG (Nordox, AS - Oslo, Norvège), l'hydroxyde de cuivre ($Cu(OH)_2$) matière active entrant dans la composition du produit Champ™Flo (Nufarm, Auckland, Nouvelle Zélande). Le sulfate de cuivre, pur ou sous forme de bouillie bordelaise, a l'effet inhibiteur le plus important. Une CMI de 1 mg/mL pour 21 % des isolats, 2 mg/mL pour 71% et 4 mg/ml pour 8 % des isolats testés est obtenue pour le sulfate de cuivre comme substance active (sans excipient). En ce qui concerne la bouillie bordelaise, pour 96 % des isolats les valeurs de CMI varient entre 4 et 8 mg/L et un seul isolat dépasse la valeur de 16 mg/L. L'hydroxyde de cuivre inhibe la croissance de 48 % des individus avec des concentrations égales ou inférieures à 16 mg/ml. En revanche, l'oxyde de cuivre a les valeurs de CMI les plus élevées, avec 80 % de résistances à des concentrations supérieures à 32 mg/mL.

SYNTHÈSE

Nos travaux mettent en évidence une dynamique temporelle de la communauté microbienne à la surface de la baie de raisin. Les niveaux de population et la diversité de cette communauté augmentent à partir des stades de début véraison et début maturité en particulier aux stades de maturité avancée. Cette évolution est probablement liée au changement de la matrice baie de raisin, et notamment l'augmentation de la teneur en sucre dans les exsudats. Les populations cultivables fongiques et bactériennes se situent globalement à des niveaux équivalents, ce qui montre que ces deux communautés se maintiennent en équilibre au sein du biofilm établi à la surface de la baie.

Au cours de la maturation, l'enrichissement de cette communauté vient probablement de la propagation de nouvelles espèces par le vent, les insectes, des « splash » de pluie, ou encore la poussière de sol. D'un point de vue agronomique, les microorganismes isolés dans ce travail sont décrits comme contribuant activement à la croissance et à la santé du végétal, notamment comme agents potentiels de biocontrôle vis-à-vis du développement de pathogènes de la vigne. Ils jouent ainsi un rôle positif indirect sur la qualité de la récolte. La biodiversité de cette communauté décrite au cours de la maturation de la baie peut être qualifiée de « positive ». Le stade maturité avancé se caractérise par des niveaux de populations élevés et une biodiversité importante. Mais pour ce stade particulier, cette diversité, qui inclue des bactéries acétiques, des levures fermentaires type Brettanomyces peut se révéler « moins positive ».

Différents facteurs environnementaux vont modifier les niveaux, la structure et la diversité de cette population microbienne. Ainsi, les zones climatiques plus fraîches et humides, favorisent le développement des micro-organismes.

Dans le contexte actuel de la réduction des intrants, l'utilisation de produits inorganiques (à base de cuivre et soufre), agréés en agriculture biologique et en agriculture raisonnée se substitue aux produits phytosanitaires de synthèse. Nos travaux mettent en évidence, pour la première fois et à l'échelle de la parcelle, l'impact négatif des résidus cupriques de la baie de raisin sur la densité, l'activité et la structure de la communauté microbienne, en particulier dans sa fraction bactérienne. Ces résultats confirment que l'usage des produits phytosanitaires cupriques doit être réfléchi, indépendamment du système de production ou du mode de conduite. Ils montrent également l'importance du choix de la formulation du cuivre, pour son impact sur la communauté bactérienne. Dans un dispositif expérimental incluant différentes modalités de traitement (fréquence, nature des substances), il reste à comparer son effet par rapport à celui de différents produits de synthèse.

Ces travaux révèlent enfin l'intérêt des plaques Biolog™ comme indicateur microbien simple et rapide à mettre en œuvre au laboratoire. A destination des praticiens, cet indicateur permet d'évaluer l'impact des pratiques viticoles sur la diversité de la communauté microbienne de la baie de raisin, par exemple dans le cas d'une reconversion en agriculture biologique.

Remerciement : les auteurs souhaitent remercier le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux ainsi que FranceAgriMer pour leur soutien financier.

RÉFÉRENCES

Bae S, Fleet GH & Heard GM 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. J Appl Microbiol 100: 712–727.

Bois B 2007. Cartography of agroclimatic indices at mesoscale level - Methodology and case study of Bordeaux winegrowing area. Implications on vine development and fruit ripening. Université Bordeaux 1, Talence.

Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H & Sessitsch A 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. Microb. Ecol 62: 188–197.

Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C & Ait Barka E 2005. Endophytic Colonization of Vitis vinifera L. by Plant Growth-Promoting Bacterium Burkholderia sp. Strain PsJN. Applied and Environmental Microbiology 71: 1685 –1693.

De Felice DV, Solfrizzo M, De Curtis F, Lima G, Visconti A & Castoria R 2008. Strains of Aureobasidium pullulans Can Lower Ochratoxin A Contamination in Wine Grapes. Phytopathology 98, 1261–1270

Haas D & Défago G 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat. Rev. Microbiol. 3: 307–319.

Martins G., Miot-Sertier C., Lauga B., Claisse O., Lonvaud A., Soulas G., Masneuf-Pomarède I. 2012. Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. International Journal of Food Microbiology, 17, 158, 93-100.

Nisiotou AA, Spiropoulos AE & Nychas G-J 2007. Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and Botrytis-Affected Grape Must Fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 73: 6705–6713.

Ranjard L, Echairi A, Nowak V, Lejon DP, Nouaïm R, Chaussod R. 2006a. Field and microcosm experiments to evaluate the effects of agricultural Cu treatment on the density and genetic structure of microbial communities in two different soils. FEMS Microbiol Ecol. 58(2):303-15.

Ranjard L, Lignier L, Chaussod R. 2006b. Cumulative effects of short term poly-metallic contaminations on soil bacterial community structure. Applied and Environmental Microbiology. 72:1684-1687.

Ranjard L, Nowak V, Echairi A, Faloya V, Chaussod R., 2008. The dynamics of soil bacterial community structure in response to yearly repeated agricultural copper treatments. Res Microbiol. 159(4):251-4.

Renouf V, Claisse O & Lonvaud-Funel A 2005 Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. Australian Journal of Grape and Wine Research 11: 316–327.

Renouf V, Claisse O & Lonvaud-Funel A 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl Microbiol Biotechnol 75: 149–164.