

DÉTERMINANTS DU COMPORTEMENT DES PIGMENTS AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOLIQUE DES VINS ROSÉS

Thèse de Cécile **LEBORGNE**¹

Analysée par Hervé **THIS**²

Direction de thèse :

Véronique **CHEYNIER**, Directrice de recherche, INRAE Montpellier, UMR Sciences pour l'œnologie
Jean-Roch **MOURET**, Directeur de recherche, INRAE Montpellier, UMR Sciences pour l'œnologie

Cette thèse CIFRE s'inscrit dans le cadre du projet PigRosé, porté par l'Institut Français de la Vigne et du Vin – Centre du Rosé (Vidauban, France) et financé par le Compte d'affection Spécial au Développement Agricole et Rural (CasDAR).

En 1783, dans un *Mémoire sur le degré de force que doit avoir le bouillon, sur sa pesanteur spécifique et sur la quantité de matière gélatineuse solide qu'il contient*, le chimiste Antoine Laurent de Lavoisier observe : « On ne peut s'empêcher d'être surpris, toutes les fois qu'on s'interroge soi-même sur les objets qui nous sont les plus familiers, sur les choses les plus triviales, de voir combien nos idées sont souvent vagues et incertaines, et combien, par conséquent, il est important de les fixer par des expériences et par des faits. »

Quoi de plus familier que les aliments et les boissons ? Dans ce champ, le vin a une importance économique et culturelle considérable. Son étude scientifique n'a cessé, depuis plusieurs décennies, de conduire à des améliorations techniques en matière de production et d'élevage. Et, dans ces travaux, les nouvelles méthodes d'analyse ont été essentielles. Notamment les chercheurs de l'UMR SPO (Sciences pour l'œnologie) de Montpellier se sont fait une belle réputation à explorer ces questions, et Véronique Cheynier avait été pionnière dans l'étude de ce que le monde de la sommellerie nomme fautivement des « tanins », alors que ce sont plus exactement des phénols. La thèse de Cécile Leborgne sur les vins rosés a bénéficié des outils, des connaissances et des expertises de cette équipe réputée, V. Cheynier étant une des deux directrices de la thèse.

Pour les vins rosés, la vinification particulière implique une macération contrôlée des pellicules dans le jus avant une étape de fermentation alcoolique en phase liquide, contrairement aux vins rouges, qui sont fermentés en phase hétérogène. Cette particularité limite l'extraction des composés (notamment pigmentaires) et conduit à des proportions différentes de composés phénoliques dans les vins rosés par rapport aux vins rouges, ce qui peut d'ailleurs avoir des effets sur les réactions qui se produisent pendant la vinification.

« Composés phénoliques » : l'expression impose une discussion, qui doit d'abord reconnaître que le manuscrit de thèse de C. Leborgne est très juste, à cet égard. En effet, après des

¹ Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'Institut Agro Montpellier et de l'Université de Montpellier, Sciences des aliments et nutrition, Ecole doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau, portée par l'Unité de recherche UMR, Sciences pour l'œnologie INRAE, soutenue le 12 juillet 2022.

² Membre de l'Académie d'agriculture de France, section 8 « Alimentation humaine ».

décennies/siècles d'exploration des composés qui contribuent à la couleur des végétaux, les catégories moléculaires sont maintenant assez bien fixées, au point que l'*International Union of Pure and Applied Chemistry*, qui règle les questions internationales de terminologie en chimie, a statué : on doit nommer « phénols », ou « composés phénoliques », des composés dont la molécule comporte au moins un groupe hydroxyle lié à un groupe arène. Ainsi les anthocyanes sont des phénols, ou plus exactement des « oligophénols »... mais en tout cas pas des « polyphénols », qui, comme pour d'autres polymères (peptides, protéines, saccharides...), doivent comporter plus de dix groupes phénols.

Depuis des décennies, les composés phénoliques qui contribuent à la couleur des vins ont été majoritairement isolés en solutions modèles de vin ou détectés dans des vins rouges ou blancs, ou dans des Porto pour certains, mais la science et la technologie des aliments s'étaient peu intéressées aux vins rosés. Or la vinification particulière de ces vins semblait pouvoir induire des différences de proportions des pigments natifs extraits, et favoriser l'oxydation lors des étapes pré-fermentaires, ce qui pouvait changer les réactions se produisant lors de la fermentation et des étapes post-fermentaires.

Des analyses des anthocyanes natives avaient montré que les vins rosés contenaient majoritairement des anthocyanes monoglucosides, ainsi que leurs dérivés acylés par l'acide acétique ou l'acide p-coumarique, ou encore par l'acide caféique, en plus petite quantité comme pour les vins rouges. Ces dérivés sont présents dans les vins rosés, mais moins abondants que dans les rouges ; les anthocyanes acylées, notamment par les acides hydroxycinnamiques, sont moins facilement extraites que les monoglucosides, notamment dans les conditions de vinification des rosés, car moins solubles dans l'eau (le moût), et, aussi, plus facilement adsorbées par les macromolécules de type protéines ou polysaccharides des parois végétales. Puis des études avaient montré la présence de pyranoanthocyanes, de carboxypyrananthocyanes et de phénylpyrananthocyanes, principalement les dérivés de la malvidine-3-O-glucoside et de son dérivé coumaroylé.

L'étude bibliographique de C. Leborgne a bien établi le manque de données disponibles sur ces vins particuliers que sont les rosés, conduisant à supposer que leur vinification atypique, influençant les proportions des composés phénoliques dans les moûts, modifierait aussi les réactions qui se produisent au cours de la vinification, et, plus précisément, au cours de la fermentation alcoolique ; la nature des pigments formés étant différente, la couleur le serait aussi.

Cette hypothèse a été à l'origine d'une vaste mise en relation de la composition en phénols des vins et de leur couleur, puis d'une recherche des effets de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition des vins rosés.

La thèse commence par discuter des études de la couleur des vins rosés qui utilisent la métabolomique centrée sur des analyses des phénols. Pour explorer la composition en pigments et la relier à la couleur, 268 vins rosés du commerce ont été analysés, et la concentration en 125 phénols a été déterminée par une approche de métabolomique ciblée, fondée sur de la chromatographie liquide ultra-haute performance, couplée à la spectrométrie de masse triple quadripolaire (UHPLC-QqQ-MS) ; la couleur a été déterminée par spectrophotométrie et colorimétrie.

Il a été ainsi montré que, si l'intensité de couleur est principalement déterminée par l'extraction de phénols (principalement anthocyanes et flavanols) des baies, différentes couleurs correspondent à différentes compositions en pigments. Les teintes saumon sont principalement dues à des pyranoanthocyanes, qui résultent des réactions des anthocyanes avec des acides phénoliques et l'acide pyruvique (un métabolite des levures). La rougeur des vins de couleur intermédiaire est due aux anthocyanes et aux carboxypyrananthocyanes, et la couleur des rosés sombres résulte de produits de réactions d'anthocyanes avec des flavanols ; enfin les teintes jaunes sont dues à des oxydations.

Quelle est l'influence du pH, de la température et de la concentration en ion sulfite lors de la fermentation alcoolique sur la couleur et la composition phénolique des vins rosés ? C. Leborgne et ses collègues avaient montré l'effet du SO₂ sur la couleur des vins rosés, en lien avec des phénomènes d'oxydation : cet effet n'interviendrait pas au cours de la fermentation alcoolique, mais plutôt lors des étapes post-fermentaires ou pré-fermentaires (brunissement des moûts). Toutefois une diminution notable de la couleur et de la teneur en phénols entre le moût et le vin a conduit à explorer l'effet de la fermentation alcoolique sur ces deux variables, pour les trois cépages clés des vins rosés de Provence : Syrah, Grenache, Cinsault.

Le chapitre 5 de la thèse discute les résultats obtenus dans l'étude de cette question. Cette étude a combiné la caractérisation globale des composés phénoliques et de la couleur par spectrophotométrie UV-visible, l'analyse de la composition phénolique par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse triple quadripolaire, ciblée sur 106 composés incluant les produits de dépolymérisation des proanthocyanidines et de leurs dérivés par phloroglucinolyse, et l'étude des répartitions des tailles moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique à haute performance.

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

La couleur du vin rosé dépend du niveau d'extraction et de l'état d'oxydation au stade du moût, qui déterminent tous deux la composition du moût et, par conséquent, les réactions et interactions des polyphénols qui se produisent pendant la fermentation. Les résultats obtenus pour le cépage Syrah indiquent une extraction plus facile des pigments à partir de ce cépage, malgré un temps de macération inférieur et un sulfitage ayant pu perturber l'extraction (le sulfitage plus poussé pourrait être en partie responsable de l'extraction supérieure, et, bien sûr, d'une moindre oxydation ; il aurait donc pu compenser en partie la macération plus courte).

Le chapitre 6, encore associé à une publication, se concentre sur les changements survenant au cours de la fermentation alcoolique des moûts de Syrah, Grenache et Cinsault, menée à l'échelle laboratoire (250 mL) et à l'échelle pilote (100 L). Les étapes pré-fermentaires ont été normalisées afin d'observer l'effet cépage indépendamment de la vinification. La couleur et la composition phénolique des moûts et des vins ont été analysées par spectrophotométrie UV-visible et les empreintes métabolomiques ont été acquises par chromatographie liquide à ultra-haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (CLHP-HRMS). Les données métabolomiques non ciblées ont mis en évidence des marqueurs liés au cépage comme les anthocyanes dans la Syrah, les acides hydroxycinnamiques et des dérivés du tryptophane dans le Grenache, et des norisoprénoides libérés pendant la fermentation dans le Cinsault. Les vins de Cinsault contenaient des composés de masse molaire supérieure, résultant probablement de l'oxydation des composés phénoliques.

Finalement les différences de couleur ne sont pas simplement liées à un phénomène de dilution et résultent notamment des profils phénoliques spécifiques aux différents styles de couleur. Ainsi la composition des vins rosés pâles de Provence est plus proche de celle des vins blancs, avec des composés phénoliques représentés principalement par des hydroxycinnamoyltartrates et de faibles

concentrations en pigments, tandis que les vins dont la couleur est plus intense contiennent des proportions supérieures de flavanols et d'anthocyanes, extraits des pellicules des raisins.

C. Leborgne et ses collègues ont mis en évidence trois groupes distincts, ayant des intensités colorantes croissantes et donc des valeurs de L^* décroissantes :

- la couleur et la teinte saumon-orange des vins du groupe le plus clair, pour lequel les composantes rouge et jaune sont fortement corrélées, et principalement dues aux phénylpyranoanthocyanes dérivées des hydroxycinnamates et aux carboxypyrananthocyanes formées à partir de l'acide pyruvique, un métabolite de levure. En effet, ces composés sont des pigments orangés et, contrairement à leurs précurseurs anthocyaniques, ils sont totalement colorés en solution aqueuse indépendamment du pH.

- la couleur plus intense et plus rouge des vins du groupe intermédiaire est associée à des concentrations supérieures en anthocyanes et en carboxypyrananthocyanes, avec des valeurs de pH plus faibles.

- la couleur rouge des vins les plus foncés est influencée par des pigments dérivés des anthocyanes et des flavanols. Seuls les composés de faible masse (dimères) de ces familles figurent parmi les cibles de la méthode MRM utilisée dans l'étude, mais ils peuvent être considérés comme des marqueurs des composés de plus haut poids moléculaire issus des mêmes réactions, de même que les unités de flavanols libérées par phloroglucinolyse, également dosées dans la méthode.

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

Lors de ces travaux, le Cinsault a montré une composition atypique, constituée en grande partie de composés à forte masse molaire, difficilement détectables et absorbant dans le visible. De plus, la corrélation entre la composante jaune et des composés incolores indique la présence de pigments jaunes inconnus et, donc, non analysés par les méthodes ciblées. Les résultats de la composition phénolique obtenus par l'approche sans *a priori* restent à approfondir, car toutes les données n'ont pas été exploitées, et seulement 40 de ces composés ont été identifiés comme des composés phénoliques sur la base de leurs temps de rétention, m/z et de leur spectre UV. Ce nombre est donc bien inférieur à celui des composés dosés par la méthode ciblée, plus sensible. Cependant cette approche a également permis de détecter d'autres types de marqueurs et, notamment, un grand nombre de composés azotés : ces composés comprennent des dérivés de peptides et de bases puriques, et, probablement aussi, des adduits formés par réaction entre des peptides et des composés phénoliques.

On voit finalement tout l'intérêt d'une telle étude des vins par leurs composés phénoliques, quitte à ce que ces derniers soient envisagés dans leurs réactions avec d'autres composés d'autres catégories.

C. Leborgne, aujourd'hui ingénieure de recherche INRAE à l'Unité expérimentale de Pech Rouge, a parfaitement mérité que sa thèse soit signalée par l'Académie d'agriculture de France et que cette analyse figure sur le site pour la valorisation de ces travaux.