

ESTIMATION DE LA MATURITE PHENOLIQUE DES RAISINS ROUGES PAR LA METHODE ITV STANDARD

CAYLA Laure – ITV France – Centre de Recherche et d'expérimentation sur les vins rosés – 70 av du Président Wilson – 83550 Vidauban

RENARD Romain – ITV France – Station Régionale Midi-Pyrénées – V'innopôle – BP 22 – 81310 Lisle sur Tarn

EN RESUME

Depuis plusieurs années, I.T.V. France travaille sur une méthode d'estimation du potentiel polyphénolique de la vendange rouge, appelée Méthode I.T.V. Standard. Elle est susceptible d'apporter au viticulteur une information pertinente et complémentaire de celle couramment fournie par le suivi en cours de maturation des teneurs en sucres et de l'acidité totale. Une étude approfondie des différentes étapes de la méthode I.T.V. Standard a débouché sur leur optimisation et permis de les rendre plus fiables.

Ainsi, les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons ont été précisées ; la phase de macération des raisins en présence d'une solution alcoolique a été réduite à une heure ; dans le cas de cépages à fort potentiel colorant cette étape devient facultative ; le dosage des anthocyanes fait appel à la méthode Puissant-Léon dont la mise en oeuvre est simple, rapide, fiable et automatisable (on peut alors traiter jusqu'à 60 échantillons en 6 heures). La répétabilité de la méthode, depuis le prélèvement des baies jusqu'au dosage des anthocyanes, est très bonne avec un coefficient de variation moyen inférieur à 5%.

INTRODUCTION

La détermination de la date optimale de récolte, c'est-à-dire le moment où le raisin présente le potentiel œnologique le plus élevé, reste somme toute l'un des soucis majeurs du viticulteur moderne, puisque la qualité d'un vin est déterminée pour une part non négligeable par la qualité de la matière première. Pour aider le producteur dans son choix de l'instant propice, il a été développé des outils de détermination de la qualité des raisins fondés sur le suivi d'un marqueur qualitatif au cours de la période de maturation.

Les critères analytiques classiques, tels que la teneur en sucres, l'acidité totale, le pH, ont longtemps prévalu comme indicateurs privilégiés de l'état de maturité de la vendange, en raison de leur détermination analytique simple. Leur pertinence est toutefois mise en défaut dans de nombreuses situations, notamment celles où un cépage est cultivé dans des conditions qui ne lui permettent pas de s'exprimer pleinement. On note alors un fort décalage entre l'information fournie par ces indicateurs et la réalité qualitative du raisin (matière colorante, tanins, arômes). Dans le cas particulier des cépages rouges, l'observation de l'évolution des composés phénoliques au cours de la maturation s'impose comme une technique complémentaire intéressante, pour ne pas dire nécessaire.

ITV France, au travers d'un réseau de cinq unités ITV régionales implantées dans les principaux vignobles français a longuement travaillé sur la mise au point et la validation d'une méthode standardisée d'évaluation de la richesse polyphénolique des cépages rouges français répondant à des impératifs incontournables de fiabilité, de simplicité et de rapidité de mise en oeuvre (traitement d'un grand nombre d'échantillons), de sécurité et de coût. Aujourd'hui, nous proposons à la profession une méthode validée qui permet de cerner de manière tout à fait satisfaisante l'optimum de maturité des cépages étudiés et de récolter dans le respect des réalités du millésime et du terroir.

1 – Les anthocyanes et la maturité polyphénolique : quelques rappels

Les anthocyanes et les tanins sont les principaux représentants des composés phénoliques présents dans les raisins et les vins rouges. Ils participent de manière importante à leurs caractéristiques organoleptiques. Les anthocyanes appartiennent à la famille des flavonoïdes, caractérisée par un squelette carboné de type 2-phényl-benzopyrone (1,2) ; les anthocyanes présentes dans les raisins rouges de *Vitis vinifera* sont des monoglucosides de noyau flavylum se différenciant en fonction du degré d'hydroxylation/méthoxylation de noyau latéral et de la nature de l'acide estérifiant le glucose (acide acétique, coumarique ou caféique). On dénombre ainsi aujourd'hui 17 formes d'anthocyanes, dont 5 glucosylées, 5 acétylées, 5 coumaroylées et 2 caféoylées (3). Les formes aglycones des anthocyanes sont appelées anthocyanidines. La couleur de ces molécules est dépendante de leur structure chimique, des conditions de milieu (pH) et de leurs interactions avec d'autres constituants (4,5,6). Ces caractéristiques chromatiques particulières ont été mises à profit lors du développement des principales méthodes de dosage global des anthocyanes. Ainsi, la méthode Stonestreet utilise la capacité du dioxyde de soufre à se combiner avec les anthocyanes pour donner un produit incolore, et la méthode Puissant-Léon applique le principe selon lequel à pH très acide, la majorité des anthocyanes sont présentes sous la forme cation flavylum, de couleur rouge (7).

Les anthocyanes sont localisées dans les vacuoles des cellules de la pellicule dans les premières assises cellulaires de l'hypoderme (8). Elles apparaissent au niveau des raisins au début du stade véraison, et subissent une évolution au cours de la maturation en trois étapes : une phase d'accumulation rapide, une phase de stagnation où la concentration passe par un maximum, et enfin une phase de décroissance. Ce modèle théorique souffre quelques exceptions, notamment dans le cas d'une mauvaise adaptation de la vigne à son environnement (9). La répartition et la qualité des différentes anthocyanes chez *Vitis vinifera* varient en fonction des cépages, des conditions pédoclimatiques et des modes de culture. Il ressort ainsi que le 3-glucoside de malvidol est l'anthocyane majoritaire et que le cépage Pinot Noir ne recèle aucune anthocyane acylée (10 et 11). Les quantités globales à maturité varient entre 500 et 3000 mg/kg (12).

Le suivi de la dynamique d'accumulation des anthocyanes et des polyphénols totaux lors de la phase de maturation des raisins, s'est avéré être un outil intéressant pour la détermination de la maturité des raisins rouges. On a pu observer ainsi qu'un niveau de maturité satisfaisant est atteint lorsque l'on enregistre une chute significative des teneurs en anthocyanes. A ce stade, les pigments sont en moins grande concentration, mais la dégradation des parois des cellules de la pellicule favorise leur diffusion dans la phase liquide. De plus, on enregistre dans les pépins une chute notable des quantités de tanins extractibles au caractère astringent marqué (13).

Il existe aujourd'hui de nombreuses méthodes pour la détermination qualitative ou quantitative du potentiel phénolique des raisins rouges (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19). Elles diffèrent par les objectifs qu'elles affichent – suivi du potentiel phénolique total ou partiel au cours de la maturation, aide à la détermination de la maturité optimale, estimation du potentiel phénolique extractible et de la contribution des pépins à ce potentiel, aide à la gestion des vinifications... - mais aussi par les techniques employées lors du traitement des raisins. Les principaux points sur lesquels les méthodes divergent sont les suivants :

- l'échantillonnage des raisins à la parcelle : grappes entières, fractions de grappe, baies seules
- le traitement de l'échantillon : broyage, centrifugation, échantillon traité en frais ou après lyophilisation
- l'extraction des composés phénoliques : pas d'extraction autre que le traitement par broyage ou centrifugation ou macération en conditions diverses (durée, température, nature de la solution d'extraction, ...)

- les méthodes de dosage des différentes fractions phénoliques

Ces divergences dans le choix des principes et matériels mis en œuvre ont un impact fort sur la simplicité et la rapidité d'exécution de la méthode, son coût et surtout l'information qu'elle délivre.

2 – OPTIMISATION ET FIABILITE DE LA METHODE ITV STANDARD

Les principales étapes de la méthode ITV standard – prélèvement, stockage et traitement des raisins, conditions de macération, méthode de dosage des anthocyanes – ont fait l'objet d'un important travail d'optimisation et de validation de la part des cinq unités ITV régionales, sur autant de cépages régionaux.

2.1 – Choix d'une méthode d'échantillonnage des raisins

L'échantillonnage des raisins à la parcelle ne peut être considéré en marge de la méthode ITV ; c'est un point crucial qui mérite que l'on s'y attarde un peu.

Il existe plusieurs manières de récolter un échantillon de raisins représentatif sur une parcelle donnée : grappes entières, portions de grappes et baies seules.

La première méthode est relativement destructive si l'on désire obtenir un échantillon représentatif en suivi de maturation. Ainsi, en 1995 et 1996, seules les méthodes de prélèvement par fractions de grappes et par baies ont été comparées.

La comparaison a porté sur les paramètres suivants : poids de 200 baies, teneurs en sucres (ou TAVP, Titre Alcoométrique Volumique Potentiel), acidité totale, pH, concentration en anthocyanes et indice de polyphénols totaux. Les résultats sont livrés dans les tableaux 1 et 2.

Paramètres mesurés	Coefficient de détermination (r^2) entre les méthodes « Portions de grappes » et « Baies indépendantes »
Poids 200 baies (g)	0.94
Titre Alcoométrique Volumique Potentiel (TAVP)	0.92
Acidité Totale	0.88
Anthocyanes	0.76
Composés phénoliques totaux (CPT)	0.72

Tableau 1 : corrélation entre deux modes d'échantillonnage des raisins à la parcelle pour 5 paramètres analytiques – 1995/1996

Paramètres mesurés	Répétabilité des méthodes d'échantillonnage (10 prélèvements)					
	« Portions de grappes »			« Baies indépendantes »		
	Moyenne	Ecart Type	CV (%)	Moyenne	Ecart Type	CV (%)
Poids 200 baies (g)	296.3	4.80	1.60	201.5	7.5	3.7
Sucres réducteurs (g/L)	193.3	0.88	0.45	218.8	2.32	1.1
Acidité Totale (g/L)	4.9	0.78	1.59	5.4	0.023	0.4
Anthocyanes (g/kg)	1.6	0.038	2.33	1.8	0.051	2.8
Composés Phénoliques Totaux (CPT)	5.3	0.16	3.00	9.2	0.24	2.6

Tableau 2 : mesure de la répétabilité de deux méthodes d'échantillonnage pour 5 paramètres analytiques - 1996

Les résultats obtenus pour le 5 paramètres analytiques mesurés sont très corrélés entre les deux méthodes d'échantillonnage (tableau 1). Les corrélations sont particulièrement élevées pour les critères analytiques classiques (TAV, AT) et le poids des baies ; elles restent satisfaisantes dans le cas des teneurs en anthocyanes et des composés phénoliques totaux.

La répétabilité des modes d'échantillonnage a été éprouvée sur 10 lots de raisins prélevés consécutivement par une même personne. Les différences observées entre échantillons pour les 5 paramètres analytiques sont faibles, les coefficients de variation (CV) n'excédant pas 4 %.

Ces résultats ont été très largement confirmés par ceux enregistrés en Midi-Pyrénées par la Station régionale ITV pour la méthode « baies indépendantes » ($CV_{\text{poids baies}} = 3.2 \%$; $CV_{\text{anthocyanes}} = 4 \%$; $CV_{\text{CPT}} = 4.1 \%$).

Ces observations montrent que les deux modes d'échantillonnage expérimentés donnent une information de teneur et de fiabilité comparable (forte corrélation et CV faible). Au final, nous avons retenu pour la méthode ITV standard le prélèvement par « baies indépendantes », car il offre une mise en œuvre simple et rapide.

Nous avons de même tenté de mesurer la reproductibilité du mode de prélèvement par baies indépendantes. Lorsque le prélèvement est réalisé dans le respect des consignes (§ 3.1) avec un minimum de minutie les coefficients de variation pour les principaux paramètres (Poids des baies, TAVP, AT, anthocyanes, CPT) sont inférieurs à 5%.

A l'opposé, un prélèvement fait par une personne qui n'a pas pris connaissance des consignes, ou qui manifeste de la mauvaise volonté, aboutit à des résultats très peu reproductibles ; nous avons ainsi pu observer des coefficients de variation supérieurs à 15%.

En conclusion, pour obtenir des résultats fiables, il est souhaitable que toute personne destinée au prélèvement subisse en début de campagne un test de répétabilité, et dans tous les cas, il est indispensable qu'une parcelle soit échantillonnée par une seule et même personne au cours de la campagne.

2.2 – Le problème du stockage des échantillons

Le traitement des échantillons dans un délai très bref après leur arrivée au laboratoire, est très fortement conseillé pour un bon degré de fiabilité de la méthode.

Conscients de la difficulté de respecter cette règle, nous avons étudié l'influence sur la qualité des résultats analytiques d'un stockage prolongé des échantillons – sous forme de baies ou sous forme de filtrat après macération des baies (voir § 3.3) – à température maîtrisée (réfrigération, congélation) pour proposer un traitement différé sans perte d'information.

2.2.1 – Conservation 24 heures à 4°C en baies entières

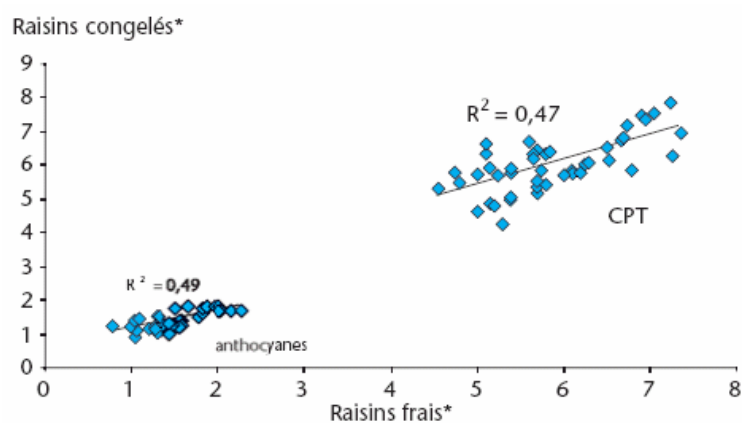
Dix lots de deux cents baies ont été prélevés consécutivement par la même personne. Cinq lots ont fait l'objet d'un traitement immédiat et cinq lots ont été traités après vingt-quatre heures de stockage au réfrigérateur à 4°C dans leur boîte de prélèvement. La composition des baies et leur poids sont notablement modifiés par un stockage prolongé. Dans nos conditions, nous enregistrons une perte du poids de 12 %, une chute des concentrations en anthocyanes de 25 %. Les composés phénoliques totaux affichent un comportement stable. Il est à noter que ces modifications sont relativement

reproductibles, les coefficients de variations enregistrés à 24 h d'intervalle étant pratiquement identiques (tableau 3).

2.2.2 - Baies congelées

Quarante-trois lots de 400 baies provenant de parcelles diverses ont été scindés chacun en deux échantillons représentatifs de 200 baies, le premier étant traité dès sont arrivé au laboratoire, le second après une période de congélation.

La figure 1 montre une relation peu étroite entre les résultats observés sur raisins frais et leur doublon congelé pour les paramètres anthocyanes et composés phénoliques totaux. Le comportement des



* Echelle commune CPT/anthocyanes. Les anthocyanes sont exprimées en mg/kg de raisins et les CPT en indice IPT par kg de raisin

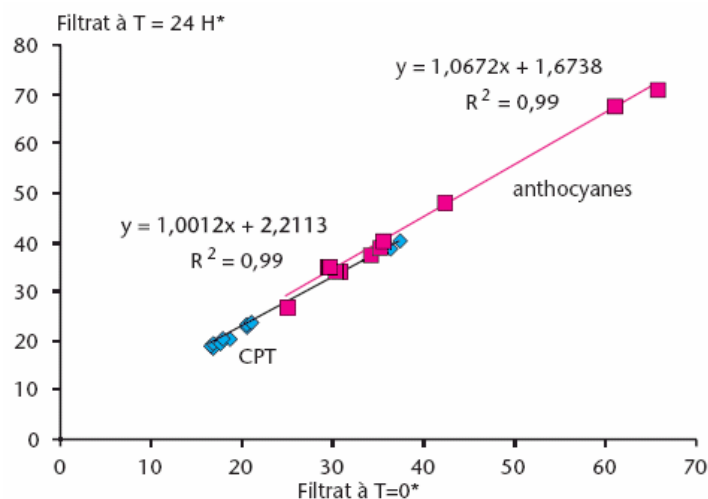
échantillons n'est pas stable ; sur certains lots on constate une perte des teneurs en anthocyanes parfois conséquente, alors que sur d'autres lots on observe une évolution inverse.

Figure 1- Relation entre les résultats analytiques (anthocyanes et composés phénoliques totaux) enregistrés sur raisins frais et sur raisins congelés, 1994 /1995.

2.2.3 - Conservation 24 heures à 4°C du filtrat après broyage, macération et filtration.

La méthode I.T.V. standard prévoit une étape de macération des baies après broyage dans une solution hydroalcoolique (voir § 3.3.). Le broyat macéré est ensuite filtré sur coton de verre et l'on récupère une phase liquide limpide destinée à l'analyse. Nous avons étudié l'évolution des caractéristiques analytiques de cette phase liquide (ou filtrat) lorsqu'on la soumet à un stockage de 24 h à 4°C.

Les résultats obtenus pour la mesure des anthocyanes et des composés phénoliques totaux avant et après stockage montrent une corrélation linéaire parfaite (figure 2). Les pentes des droites de régression sont proches de l'unité, ce qui veut dire que le filtrat ne subit qu'une faible modification de sa composition quantitative en anthocyanes et composés phénoliques totaux.



* Echelle commune CPT/anthocyanes. Les anthocyanes sont exprimées en mg/kg de raisins et les CPT en indice IPT par kg de raisin

Figure 2- Relation entre les résultats analytiques (anthocyanes et composés phénoliques totaux) enregistrés sur filtrat frais et sur filtrat après 24h de conservation à 4°C, 1999

2.2.4 - Conclusion sur le stockage des échantillons

Les conditions de stockage des échantillons sont, nous l'avons vu, très importantes. Un stockage mal approprié peut nuire de façon conséquente à la pertinence des résultats analytiques. Ainsi, la technique consistant à congeler les baies avant traitement est à éviter, les résultats obtenus sur baies congelées étant très peu reproductibles. Le stockage des raisins ou du filtrat pendant 24 h au réfrigérateur peut-être envisagé, en sachant toutefois que l'on enregistre une perte quantitative, mais reproductible, en anthocyanes pour les baies alors que le comportement du filtrat est très stable dans cet intervalle de temps mais demande une préparation préalable des échantillons. Dans tous les cas, le choix du mode de conservation des échantillons avant analyse doit être fait en début de campagne et appliqué de manière suivie jusqu'au dernier contrôle de maturité.

2.3 - Détermination du temps de macération

2.3.1- Macération longue ou courte ?

Pour déterminer le temps minimal nécessaire à une totale diffusion des anthocyanes dans nos conditions opératoires, nous avons réalisé des mesures de cinétiques d'extraction des anthocyanes au cours d'une macération de deux heures. Nous pouvons observer sur la figure 3 que les teneurs en anthocyanes n'évoluent pratiquement plus après une heure de macération ; 95 % des anthocyanes diffusibles sont présentes dans la phase liquide à ce stade. Un supplément de macération d'une heure ne se justifie donc pas. Des mesures de répétabilité de la phase de macération nous ont permis d'enregistrer des coefficients de variation ne dépassant pas 5 % pour la mesure des anthocyanes et des polyphénols totaux. Cette technique caractérisée par un rendement d'extraction important autorise une estimation fiable du contenu en anthocyanes des raisins et cela quel que soit leur potentiel.

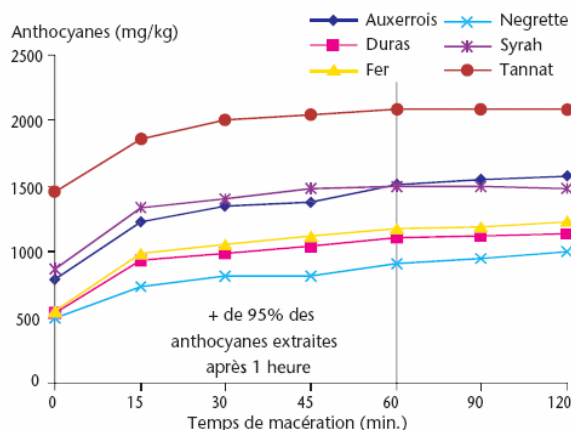


Figure 3- Evolution des teneurs en anthocyanes au cours de la macération du broyat dans une solution hydroalcoolique. Résultats sur six cépages de Midi-Pyrénées, 1999

2.3.2 - Peut-on s'affranchir de la macération ?

Le dosage des anthocyanes et des composés phénoliques totaux est réalisé immédiatement après broyage. A ce stade, la concentration en anthocyanes de la phase liquide représente, selon les cépages, entre 46 et 64 % de la concentration observée après deux heures de macération. La répétabilité est très bonne puisqu'elle se situe en dessous de 5 %. Si l'on veut gagner du temps sur la mise en oeuvre de la méthode, une telle extraction peut-être envisagée. Toutefois, en raison d'un rendement d'extraction plus faible, il est fortement conseillé de l'utiliser sur des variétés de raisin à fort potentiel en anthocyanes.

2.4 - Méthodes de dosage des anthocyanes : décoloration au SO₂ ou Puissant-Léon ?

L'optimisation de cette méthode passe par l'utilisation d'une technique de dosage des anthocyanes précise, pertinente et rapide. Dans cette optique, nous avons comparé les deux principales méthodes de dosage global des anthocyanes par spectrophotométrie visible - la méthode Stonestreet (décoloration au dioxyde de soufre) et la méthode Puissant-Léon (acidification du milieu) (20) – sur la teneur et la fiabilité de l'information qu'elles délivrent.

2.4.1- Corrélation entre les deux méthodes de dosage

Les observations pluriannuelles qui ont été faites sur le réseau I.T.V. France montrent une très forte relation entre les deux méthodes ($R^2 > 0,95$) pour le dosage des anthocyanes (figure 4). Les résultats délivrés sont comparables mais pas identiques en valeur absolue. Ainsi, la méthode Puissant-Léon sous-estime d'environ 20 % les teneurs en anthocyanes. Cette constatation trouve son explication non pas dans le principe même du dosage, mais dans la valeur des coefficients de conversion des valeurs d'absorbance à 520 nm en teneurs en anthocyanes exprimées en mg/L propres à chacune des deux méthodes. (Remarque : Lorsque les dosages sont faits selon la méthode Stonestreet, il faut remplacer dans la formule de calcul le coefficient 870 par 701 pour obtenir des valeurs à l'échelle de celles rendues par la méthode Puissant-Léon ; A l'inverse, on exprimera les résultats obtenus par la méthode Puissant-Léon selon l'échelle de la méthode Stonestreet en remplaçant le coefficient 22,76 par 28,25).

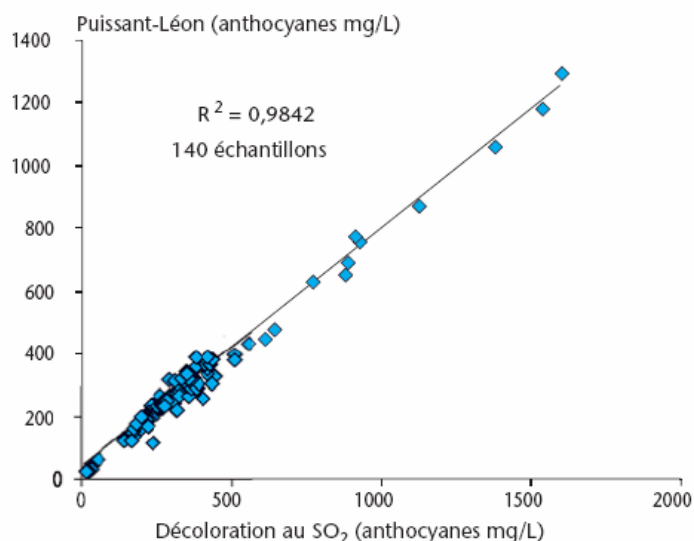


Figure 4- Exemple de relation entre les teneurs en anthocyanes mesurées par les méthodes Stonestreet et Puissant-Léon, 1999

2.4.2 - Répétabilité des méthodes de dosage

Au cours de deux campagnes consécutives, nous avons éprouvé la fiabilité de chacune des méthodes de dosage des anthocyanes. A partir d'une solution d'extraction, nous avons pratiqué dix dosages consécutifs. Le traitement des données nous a permis d'estimer la précision (intervalle de confiance) pour une probabilité de 95 % et la variabilité (coefficient de variation) des deux méthodes. Nous avons consigné dans le tableau 4 les résultats de dosages effectués sur deux solutions d'extraction différentes en 2000.

		Moyenne (anthocyanes en mg/L)	Ecart Type	Intervalle de confiance (en %)	C.V. (en %)
Série n°1 10 répétitions	Puissant- Léon	321.9	2.98	2.2	1
	Stonestreet	438	9.4	4.9	2.3
Série n°2 10 répétitions	Puissant- Léon	318	1.95	1.4	0.6
	Stonestreet	439	10.6	5.5	2.5

Tableau 4 – répétabilité des méthodes de dosage des anthocyanes - 1999

Les deux méthodes présentent un très bon degré de fiabilité avec un coefficient de variation n'excédant pas 3 %. La méthode Puissant-Léon se montre toutefois plus précise avec un intervalle de confiance plus restreint compris entre ± 2 % contre ± 5 %. A pertinence et fiabilité équivalente, la

méthode de dosage Puissant-Léon s'impose en raison d'une mise en oeuvre plus simple et plus rapide.

2.5 - Automatisation du dosage des anthocyanes et des composés phénoliques totaux

Dans le cadre de l'utilisation routinière du protocole d'estimation de la richesse polyphénolique, la gestion des analyses manuelles devient délicate. Nous avons donc adapté et optimisé cette méthode par l'utilisation d'un préparateur-passeur d'échantillons Gilson. L'automate Gilson réalise la préparation des échantillons (dilution au 1/100ème et préparation des tubes pour le dosage des anthocyanes), et assure la distribution dans la cuve du spectrophotomètre. Une liaison RS 232 série entre le spectrophotomètre et un programme adapté sur micro-ordinateur permet l'acquisition en continu des données. Transférés sous un tableur, les résultats peuvent être très facilement exploités.

Cette méthode automatisée permet un gain de temps important (60 échantillons traités en 6 h), et améliore la fiabilité des mesures. Un technicien doit cependant veiller à assurer le lien entre les différentes étapes (préparation des échantillons, lecture des absorbances). Toutefois, le coût engendré par un tel équipement (Automate Gilson : 80 KF et spectrophotomètre : 50 KF) ne peut s'envisager que dans le cas d'analyses de routine.

2.6 - Répétabilité de la méthode I.T.V. dans son intégralité

Après avoir passé en revue les principales étapes de la méthode I.T.V., nous avons étudié sa répétabilité globale, c'est-à-dire l'ensemble des étapes depuis le traitement des raisins à leur arrivée au laboratoire jusqu'au dosage des composés phénoliques. Ce travail a été réalisé au cours de deux campagnes consécutives (1999 et 2000) selon le protocole suivant : un lot conséquent de 2000 baies prélevées par une même personne est divisé en 10 échantillons représentatifs de 200 baies. Chaque échantillon est traité indépendamment le même jour par une même personne. A partir des résultats du dosage des anthocyanes, nous calculons la moyenne des séries, les écart-types, ainsi que l'intervalle de confiance et le coefficient de variation (tableau 5). Cette manipulation a été répétée deux fois en 2000.

	1999	2000	
		1 ^{ère} Série	2 ^{ème} Série
Echantillons de 200 baies	10	10	10
Moyenne (anthocyanes en mg/kg)	315.7	299.1	302.9
Ecart-Type	11.7	8.6	7.9
C.V. %	3.7	3.0	2.7
Intervalle Confiance % (5%)	8.5	6.9	6.2

Tableau 5 – répétabilité de la méthode I.T.V. standard en 1999 et en 2000 pour le paramètre "anthocyanes"

On note que pour le principal paramètre étudié – teneurs en anthocyanes – la fiabilité de la méthode est très bonne puisqu'elle est inférieure à 5 %. La précision globale quant à elle est inférieure à 10 %. Il est à noter que ces valeurs intègrent une variabilité due à la constitution des lots de 200 baies. Au final, pour un prélèvement donné, on peut attendre de la méthode des résultats présentant un très bon degré de fiabilité.

2.7 - La méthode I.T.V. et les analyses courantes

Nous avons comparé, pour les paramètres analytiques classiques – sucres, acidité totale et pH - les résultats obtenus sur jus de fond de cuve (moût initial avant fermentation alcoolique) avec ceux obtenus d'une part sur jus de broyat (méthode I.T.V.), d'autre part sur jus de foulage (les baies sont écrasées à l'aide d'un minifouloir de paillasse).

Le tableau 6 donne un exemple de résultats obtenus sur cépage Mourvèdre.

Sucres (g/L)			pH			AT (g H ₂ SO ₄ /L)		
Foulage	Broyage	Fond de cuve	Foulage	Broyage	Fond de cuve	Foulage	Broyage	Fond de cuve
225.2	226.4	232.3	3.59	3.97	3.57	4	3.6	4.6
240.3	235.8	246.4	3.5	4.05	3.69	3.6	4	3.6
202.2	204.5	209.1	3.57	3.99	3.60	4.2	3.8	4.4
217.2	224.1	206.8	3.36	3.82	3.51	4.8	3.9	3.8
174.9	180.5	172.6	3.29	3.67	3.28	5.3	4.2	5.8

Tableau 6 : comparaison des valeurs sucre, pH et acidité totale sur jus foulé, jus de broyage et jus de fond de cuve - 2000

L'effet le plus marquant est enregistré pour le pH. Le foulage permet d'avoir une bonne estimation du pH du moût. Le broyage extrait trop de potassium, ce qui augmente considérablement le pH. Le potassium présent dans les pellicules réagit très rapidement avec l'acide tartrique de la pulpe, ce qui entraîne une mauvaise estimation de l'acidité, celle-ci correspondant à la résultante des précipitations. Une comparaison des techniques broyage et foulage sur 370 échantillons de 200 baies montre que le broyage surestime les valeurs du pH de 14 % en moyenne et sous-estime les valeurs d'acidité totale de 16 % en moyenne. Pour les teneurs en sucres, les résultats des deux techniques sont comparables.

La méthode I.T.V. ne permet donc pas d'évaluer directement la maturité pulpaire, puisque les valeurs d'acidité totale et de pH obtenues sur jus de broyat sont trop éloignées de celles constatées sur les moûts à l'encuvage. Pour réaliser une telle estimation, il est donc nécessaire d'effectuer les analyses courantes sur un jus provenant du foulage préalable de l'échantillon destiné à la méthode I.T.V..

3 - Pertinence de la méthode I.T.V. standard pour la détermination de la maturité phénolique

La détermination de la date de récolte appropriée repose sur l'observation de l'évolution des teneurs en anthocyanes dans les raisins au cours de la maturation. On considère que la maturité phénolique est atteinte dans les premiers temps de la phase de surmaturation des raisins, correspondant à une chute notable des concentrations en anthocyanes après que celles-ci aient atteint un maximum. La construction d'une courbe représentant l'évolution des anthocyanes dans les raisins en fonction du temps facilite la visualisation de cette phase.

Nous avons voulu vérifier la pertinence de la méthode I.T.V. pour la détermination de la maturité phénolique en suivant sur plusieurs sites l'évolution des anthocyanes au cours de la maturation et en pratiquant plusieurs récoltes successives (5 dates) suivies de minivinifications standards. Les résultats que nous donnons ont été obtenus en Midi-Pyrénées sur les cépages Duras et Syrah en 1998.

3.1 - Evolution des anthocyanes au cours de la maturation

L'allure des courbes est proche pour les deux cépages (figure 5) ; on note une augmentation rapide des anthocyanes pendant les vingt premiers jours de la maturation. Cette augmentation continue encore pendant quelques jours mais avec une amplitude moindre. A ce stade, le comportement des deux cépages se différencie ; il faut quinze jours à la Syrah pour atteindre une concentration maximale en anthocyanes, alors que dix jours suffisent au Duras. Ensuite, la chute des anthocyanes sur le Duras est plus rapide que sur la Syrah, indiquant une maturation plus lente pour ce dernier. Les cinq dates de récoltes sont positionnées dans la phase d'accumulation des anthocyanes (D1 et D2), autour du maximum (D3 et D4) et dans la phase décroissante (D5). Après analyse de la courbe, la maturité phénolique est jugée optimale au 22 septembre (D4) pour le Duras et au 6 octobre (D5) pour la Syrah.

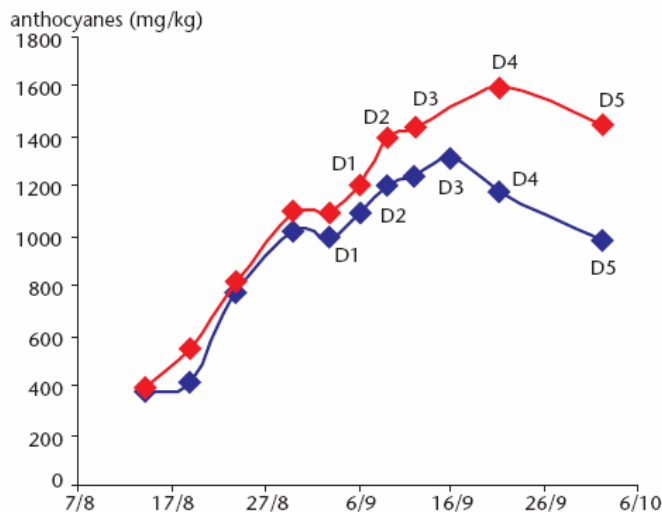


Figure 5 – Evolution des anthocyanes au cours de la maturation pour deux cépages rouges de Midi-Pyrénées (Syrah courbe rouge, Duras courbe bleue), 1999

3.2 - Relation entre la date de récolte et les qualités analytiques et organoleptiques des vins

Il existe une bonne relation entre la concentration en anthocyanes des baies, estimée par la méthode I.T.V. et celle que l'on retrouve dans le vin pour les dates de récolte précoces. Par contre, si l'on compare les dates de récolte correspondant d'une part au maximum d'accumulation en anthocyanes, d'autre part à la phase de surmaturation, la corrélation entre raisins et vins n'est plus vérifiée. Ainsi, les vins élaborés avec les raisins récoltés en légère surmaturation (D4 pour le Duras et D5 pour la Syrah) présentent des teneurs en anthocyanes supérieures à celles mesurées sur les vins issus de vendanges plus précoces présentant un potentiel en anthocyanes le plus élevé. Cela illustre la notion d'évolution de l'extractibilité des pigments pendant la phase de maturation des fruits. La dégustation des vins laisse apparaître l'intérêt que portent les dégustateurs aux vins issus des raisins récoltés à maturité phénolique optimale (tableau 7).

Dates de récolte	DURAS			SYRAH		
	Anthocyanes		Classement des vins en fonction du critère « qualité globale »	Anthocyanes		Classement des vins en fonction du critère « qualité globale »
	Raisins (mg/kg)	Vins (mg/L)		Raisins (mg/kg)	Vins (mg/L)	
D1	995	543	3	1090	690	4
D2	1200	607	2	1400	840	5

D3	1310	627	3	1430	836	3
D4	1180	685	1	1590	929	2
D5	980	601	4	1450	1058	1

Tableau 7 : relation entre la date de récolte et les qualités analytiques et organoleptiques des vins - 1998

Ces vins sont jugés comme présentant de jolis et intenses arômes de fruits, une bouche dense et bien équilibrée, et une couleur soutenue. Une récolte trop tardive (Duras D5) semble nuire à l'expression aromatique avec des notes de fruits cuits et confits trop prononcées. Les récoltes plus précoces pêchent par un léger déséquilibre en bouche avec la présence de tanins rugueux.

4 - Description de la méthode (illustration 1)

La méthode I.T.V. standard est basée sur une micro-macération, en milieu hydroalcoolique acide, à température ambiante. Cette dernière "modélise" les phénomènes intervenant lors d'une vinification "standard". Aussi, en quelques heures, on estime la quantité totale des composés phénoliques, mais également leur capacité à être extraits des pellicules. Un suivi régulier de cette évolution des polyphénols, à raison d'un prélèvement par semaine puis deux à l'approche de la récolte, permet de déterminer la phase optimale de maturité. Théoriquement, elle correspond au moment où les concentrations en anthocyanes dans les raisins chutent significativement après être passées par une valeur maximale.

4.1- Prélèvement des raisins à la parcelle

Sur deux rangs considérés comme représentatifs de la parcelle sur laquelle le suivi de maturation doit être réalisé, on sélectionne et identifie 100 souches exemptes de maladies du bois ou de viroses. On prélève deux baies par souche, à raison d'une baie par face de rang, en alternant la cible du prélèvement pour respecter l'hétérogénéité de constitution des raisins au sein d'un pied - positionnement du grain sur la grappe, positionnement de la grappe sur le rameau, rang d'insertion du rameau sur le pied. Les deux cents baies ainsi récoltées sont déposées dans une boîte de congélation tapissée d'une feuille de papier absorbant. Le transport se fait dans une glacière en présence de réfrigérant.

4.2 - Préparation des échantillons pour l'analyse

4.2.1- Dénombrement, pesée des baies et broyage

Si le prélèvement a été fait après une pluie, on sèche les baies à l'aide d'un papier absorbant puis d'un sèche-cheveux. Les baies sont alors comptées et pesées précisément afin de pouvoir exprimer les teneurs en anthocyanes par baie ou par unité de masse. Elles sont ensuite broyées à l'aide d'un mixer ménager de type "blender" pendant deux minutes à vitesse réduite.

4.2.2 - Extraction des composés phénoliques par macération

On prélève une fraction du broyat - environ 50 g - que l'on pèse précisément et que l'on fait macérer dans une solution hydroalcoolique (15 ml d'éthanol à 95 %, 85 ml d'HCl à 0,1 %) pendant 1 h à température ambiante avec une agitation tous les quarts d'heure. Le broyat macéré est alors filtré sur coton de verre ou centrifugé. On récupère alors une solution d'extraction limpide, condition nécessaire à la bonne conduite des mesures ultérieures par spectrophotométrie. La filtration sur coton de verre n'engendre aucune modification du contenu phénolique de la solution d'extraction.

4.3 - Dosage des anthocyanes et mesure de l'IPT

Les composés phénoliques totaux sont estimés par la mesure de l'absorbance à 280 nm sous 1 cm de parcours (cuve quartz) de la solution d'extraction après dilution au 1/100e. La concentration en anthocyanes est établie par la méthode "Puissant-Léon", correspondant à la mesure de l'absorbance à 520 nm sous 1 cm de parcours de la solution d'extraction après acidification (dilution de la solution au 1/20e avec HCl à 1 % en poids). Le potentiel en anthocyanes est exprimé en milligrammes par kilogramme de raisin.

5 - Conclusion

La méthode de détermination de la richesse en anthocyanes des raisins mise au point par l'I.T.V. est intéressante à plus d'un titre. Elle résulte d'une collaboration entre plusieurs centres I.T.V. Elle a été mise au point et validée à partir de données issues de différents vignobles représentant autant de cépages, conditions pédoclimatiques et méthodes culturales. Il ne s'agit donc pas d'un outil inféodé à un matériel végétal ou à une région viticole particulière. Sa mise en œuvre est simple et rapide. Toute manipulation pouvant faire l'objet d'un gain de temps a été optimisée dans ce sens, dans un souci constant de préservation de l'intégrité de l'information. Ainsi, le temps de dosage des anthocyanes et le temps de macération ont été diminués de moitié - on peut, en outre, envisager raisonnablement l'abandon de la macération pour des cépages à fort potentiel en anthocyanes. Nous avons de même montré que la méthode pouvait être en partie automatisée. Les principales étapes de la méthode ont été

étudiées dans le détail afin de déterminer leur précision et leur répétabilité. On aboutit ainsi à une méthode dont la variabilité globale n'excède pas 5 % dans des conditions normales de mise en œuvre. Elle permet d'appréhender avec un bon degré de fiabilité la zone optimale de maturité phénolique, de renseigner sur les potentialités d'un millésime par rapport à un historique (référentiel millésime) ou d'une parcelle au sein d'une exploitation (référentiel parcellaire). Un foulage des raisins avant broyage donne accès à une mesure pertinente de l'acidité et du pH du moût sans qu'il soit besoin de multiplier les échantillons lors d'un prélèvement. La méthode I.T.V. ne se substitue pas aux critères classiques de détermination de la maturité, elle se propose d'apporter une information complémentaire utile.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier les personnes qui ont participé à ce programme :

C. Liadouze, E. Vinsonneau unité I.T.V. Bordeaux, J. Marsault, F. Etienne unité I.T.V. d'Angers, J. Beguin, A. Bruetchy, P. Poupault unité I.T.V. de Tours, S. Grivot, V. Bouckenooghe de l'unité de Nîmes, J.Y. Cahurel unité I.T.V. de Villefranche sur Saône, B. Barthelemy, F. Davaux, E. Serrano unité I.T.V. de Gaillac, B. Labarbe de la SICAREX Beaujolais.

Ainsi que les partenaires financiers :

ANDA, ONIVINS, Conseils Régionaux dans le cadre des contrats
Etat / Régions, Comités interprofessionnels et syndicats viticoles...

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) RIBEREAU-GAYON P., **1968**. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris, 254 p.
- (2) FLANZY C., **1998**. OENOLOGIE. Fondements scientifiques et technologiques. Editions Tec et Doc, Paris, 1310 p.
- (3) LABARBE B., **2000**. Le potentiel polyphénolique de la grappe de *Vitis vinifera* var. Gamay noir et son devenir en vinification beaujolaise. Thèse de doctorat, ENSAM.
- (4) CABRITA L., FOSSEN T., ANDERSEN O.M., **2000**. Colour and stability of six common anthocyanidin 3-glucosides aqueous solutions. *Food Chem.*, **68**, 101-107.
- (5) MAZZA G., BROUILLARD R., **1987**. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.*, **25**, 207-225.
- (6) BROUILLARD R., **1982**. Chemical structure of anthocyanins. In : *Anthocyanins as food colors*. Academic Press, New York, p. 1-40.
- (7) RIBEREAU-GAYON J. ET P., PEYNAUD E., SUDRAUD P., **1972**. Dosage des anthocyanes dans les vins rouges. *Sciences et Techniques du Vin*. Tome 1, p. 497-499.

- (8) AMRANI-JOUTEI K., **1993**. Localisation des anthocyanes et des tanins dans le raisin. Etude de leur extractibilité. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II.
- (9) RIBEREAU-GAYON P., GLORIES Y., DUBOURDIEU D., MAUJEAN A., **1998**. Traité d'oenologie – Chimie du vin. Stabilisation et traitement. Editions Dunod, Paris.
- (10) SOUQUET J.M., CHEYNIER V., SARNI-MANCHADO P., MOUTOUNET M., **1996**. Les composés phénoliques du raisin. J. Int. Sci. Vigne Vin. La viticulture à l'Aube du IIIe Millénaire. N° hors série, 99-107.
- (11) LANARIDIS P., BENA-TZOUROU I., **1997**. Etude des variations des anthocyanes pendant la maturation des raisins de cinq cépages rouges, cultivés en Grèce. J. Int. Sci. Vigne Vin, 31, N°4, 205-212.
- (12) BOURSEIX M., **1974**. Les anthocyanes du raisin et du vin. Vignes et vin, N° spécial.
- (13) SAINT-CRICQ DE GAULEJAC N., VIVAS N., GLORIES Y., **1998**. Maturation phénolique des raisins rouges. Relation avec la qualité des vins. Comparaison des cépages Merlot et Tempranillo. Progrès Agricole et Viticole, 115, N° 13-14.
- (14) ARONZAZU, ALONSO, MISTOU, **1996**. Etude des conditions d'extraction des anthocyanes et des tanins du Pinot Noir au cours de la maturation. Mise au point d'un indice d'extractibilité. I.U.V.V. Jules Guyot. Laboratoire d'oenologie de Dijon. Mémoire de fin d'étude. Ecole Supérieure d'Agriculture de Barcelone.
- (15) DUPUCH V., **1996**. Appréciation de la matière phénolique des vins rouges – Application à la détermination de la date de récolte. Chambre d'Agriculture de la Gironde. Service Vigne.
- (16) GUNATA Z. ET AL., **1987**. Détermination de la qualité de la vendange par sa richesse en composés phénoliques. Applications à la vinification. Revue Française d'Oenologie n°107 p. 7-13
- (17) ROSON J.P., **1988**. Composition des raisins en anthocyanes et en tanins et qualité de la vendange. Application au vignoble de Cahors – Progrès Agricole et Viticole n°24.
- (18) RIOU V., ASSELIN C. Potentiel polyphénolique disponible du raisin. Estimation rapide par extraction partielle à chaud – Compte rendu interne INRA – Centre d'Angers – Unité de recherches sur la vigne et le vin.
- (19) VENENCIE C., UVEIRA M-N., GUIET S., **1997**. Maturité phénolique du raisin : mise en place d'une méthode d'analyse de routine. Revue Française d'Oenologie n°167.
- (20) BLOUIN J., **1992**. Techniques d'analyses des moûts et des vins. Ed. Dujardin-Salleron. Paris. p. 199-201.