Impact des traitements au cuivre sur le potentiel aromatique des jus blancs et rosés

Par **Pic Lucile**[1], **Rousseau Jacques**[2]
(1) Responsable expérimentations œnologiques
(2) Responsable Services Viticoles- Groupe ICV

MOTS CLÉS : cuivre, précurseurs glutathionylés et cystéinylés, glutathion réduit, fermentation alcoolique

INTRODUCTION

L'utilisation des produits cupriques dans la protection des maladies cryptogamiques de la vigne en France, est stable, voire en légère augmentation *(tableau 1)*, que ce soit sous forme de fongicides cupriques purs, notamment utilisés en viticulture biologique dont les surfaces augmentent régulièrement, ou d'organo cupriques couramment utilisés par l'ensemble des viticulteurs, surtout après véraison.
De ce fait, la problématique de l'impact d'éventuels résidus de cuivre dans les jus concerne de plus en plus de vinificateurs.

ANNÉES	2015	2016	2017
Evolution des ha déployés tous produits		+18%	-16%
Part des cupriques	27,6%	27%	28,2%
Evolution des ha déployés cupriques		+15,5%	-12%

Tableau 1 : *Evolution des ventes de fongicides cupriques et de leur part dans les ventes totales de fongicides en France (source : firmes)*

La contribution des molécules 3MH et 4MMP (en association à l'acétate de 3-mercaptohexan-1-ol (A3MH)), aux arômes variétaux de type pamplemousse, agrumes, fruits exotiques, buis, cassis a été démontrée pour plusieurs cépages dont le Sauvignon blanc (Tominaga, et al. 2000) et le Grenache (Ferreira, et al. 2002). La biogenèse de ces molécules à partir de leurs précurseurs (glutathionylés et cystéinylés) dans les vins a été décrite (T. Tominaga 2000) : l'activité β-lyase de *Saccharomyces* permet dès les premiers jours de la fermentation alcoolique la libération des thiols variétaux à partir de leurs précurseurs.

Le glutathion, polypeptide naturellement présent dans les raisins et composé de trois acides aminés est un anti-oxydant naturel. On peut le trouver sous sa forme réduite (GSH) ou oxydée (deux molécules de glutathion liées par un pont disulfure). Dans les mouts et dans les vins le rôle de sa forme réduite dans la prévention du brunissement est bien connu : en réagissant rapidement avec les o-quinone de l'acide caftarique, elle les empêche ainsi de se condenser entre elles en composé brun (Cheynier, et al. 1986). Outre son rôle préventif du brunissement, le glutathion sous forme réduite joue aussi un rôle essentiel dans la préservation du potentiel aromatique des vins, puisque il peut également entrer en concurrence pour les o-quinones avec 3MH, A3MH et 4MMP, protégeant ainsi les arômes (Dubourdieu 2003), (Roland et al, 2013).

Plusieurs études ont déjà montré l'effet des traitements à base de cuivre, notamment sur la teneur des vins en 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) et en 4-méthyl-4mercaptopentan-2-one (4MMP). Ainsi (Hatzidimitriou, et al. 1996) puis (Darriet, et al. 2001), ont établi le lien entre la fréquence de traitements cupriques, la teneur en cuivre des jus et la baisse du 4MMP dans les vins de sauvignon et du 3MH dans des vins de Cabernet sauvignon.
Hatzidimitriou, et al. 1996 ont aussi étudié l'impact des opérations préfermentaires sur la teneur en cuivre des jus blancs : la macération préfermentaire des raisins permet une réduction de 60 à 80% alors que le débourbage induit une faible évolution de cette concentration. Le niveau de turbidité (4 NTU vs 200NTU) obtenu à l'issue de ces clarifications n'impacte pas la concentration en cuivre des jus clarifiés.

Dufourq 2004 a mis en évidence une forte chute de la teneur en ces composés aromatiques dans des vins de Colombard, Sauvignon et Manseng à partir de la présence de 4mg/l de cuivre dans les mouts. Ces travaux le conduisent à recommander la recherche de teneurs en cuivre inférieures à 2mg/l sur les moûts pour des cépages dont la typicité est liée aux arômes «thiolés». Pour ce faire, il préconise de cesser toute application de cuivre après la fermeture de la grappe.
L'observation de terrain nous a souvent confrontés à des difficultés d'obtention de vins «thiolés» sur des matrices dont les teneurs en cuivre étaient cependant inférieures au seuil critique de 2mg/l avancé par Dufourq 2002. De fait nous avons souhaité compléter les travaux existants pour évaluer l'impact de résidus de cuivre compris entre 1 et 2mg/l mais aussi pour étudier les éventuels mécanismes mis en jeux au niveau des étapes préfermentaires.

› Matériels et méthodes

Afin d'obtenir une gamme de résidus en cuivre très faible, modérée (entre 1 et 2mg/l) et élevée (>3 mg/l), nous avons choisi de faire varier la quantité totale de cuivre apporté au vignoble à travers la fréquence des apports. Tous les apports sont effectués post fermeture de la grappe, des apports plus précoces ne conduisant pas à la présence de résidus (Hatzidimitriou, et al. 1996).
Sur 2 cépages, connus pour leur richesse en précurseurs thiols, (1 parcelle de Grenache de 25 ans, située à St Felix de Lodez (34), sur un sol graveleux, profond, taillé en cordon double de Royat et 1 parcelle de Sauvignon située à Montagnac (34), agée de 30 ans, sur un sol de molasses du Miocène à flanc de coteau, moyennement profond, taillé en Guyot et de vigueur moyenne) nous avons mis en place, à partir de début Juin, 3 modalités de traitements selon un plan d'expérience en blocs (4 placettes de 10 pieds par modalité, Figure 1):

- Aucun traitement
- Une application après véraison (pratique conventionnelle) à 3 kg/ha de cuivre métal
- 5 traitements à partir de début juin avec 15 jours d'intervalle, avec dose homologuée en conventionnel (3 kg/ha de cuivre métal par application).

Les traitements sont réalisés avec de la Bouillie Bordelaise Super 20K (15 kg/ha de bouille bordelaise à 20 % de cuivre), à l'aide d'un pulvérisateur à dos STIHL, avec un débit de 1,6 L/mn, en application face par face.

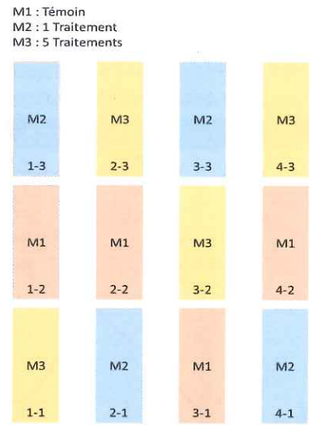
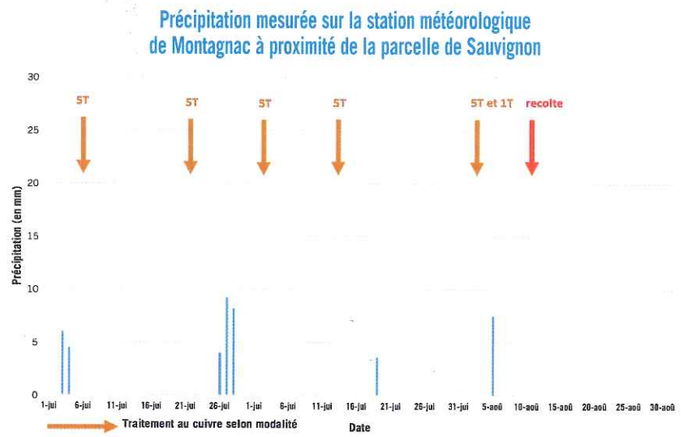


Figure 1 : *Mise en place spatiale des blocs d'expérimentation*



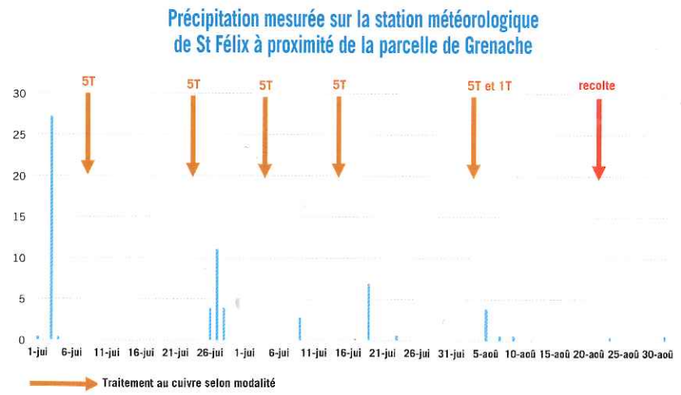


Figure 2 a et b : *Précipitations au cours des mois de juin à juillet à proximité des parcelles et positionnement des traitements appliqués sur les parcelles*

Le suivi de la pluviométrie pendant la période de traitement *(Figure 2)* montre que les précipitations cumulées sur la période de traitement restent faibles (25 mm sur Sauvignon, avec un cumul de 21 mm entre le deuxième et le troisième traitement et 29.6mm sur Grenache, avec un cumul de 19 mm entre le deuxième et le troisième traitement). Entre l'arrêt des traitements et la récolte, la pluviométrie a été très faible, inférieure à 8mm sur les deux essais. Il n'y a donc presque pas eu de lessivage des applications réalisées à partir du 29/6 ; soit à partir du 3ème traitement.
Un suivi régulier de la quantité de cuivre présent sur les baies est réalisé après véraison grâce à des analyses sur 200 baies effectuées tous les 4 à 5 jours.
Les raisins sont vendangés manuellement à un niveau de maturité équivalent à 12-12,5% d'alcool potentiel pour le Sauvignon et à 14% pour le Grenache. Ils sont ensuite tous vinifiés selon le même procédé en pressurage direct (incluant un sulfitage à 7g/qt en opération préfermentaire) puis levurés avec Opale®2.0 à 30g/hl et fermentés entre 18 et 20°C.

Un dosage du cuivre mais aussi des précurseurs de thiols glutathionylés et cystéinylés (C3MH, G3MH, C4MMP et G4MMP) ainsi que du glutathion est effectué sur les moûts après pressurage et après débourbage statique d'une nuit à 5°C (pas de réintroduction des bourbes fines à l'issue de la clarification statique).
Le cuivre est dosé par absorption atomique. Les précurseurs de thiols et le glutathion sont dosés par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (UPLC-MS). L'incertitude de mesure de ces précurseurs aromatiques est de 7% tandis que celle du glutathion est de 10% (Roland, et al. 2010). →

› Résultats

1 Impact des traitements au cuivre sur les résidus de cuivre sur les raisins :

La *Figure 3* illustre l'impact important des traitements au cuivre sur les concentrations en cuivre retrouvées sur les raisins de la parcelle de Grenache en l'absence de pluies significatives (<20 mm).

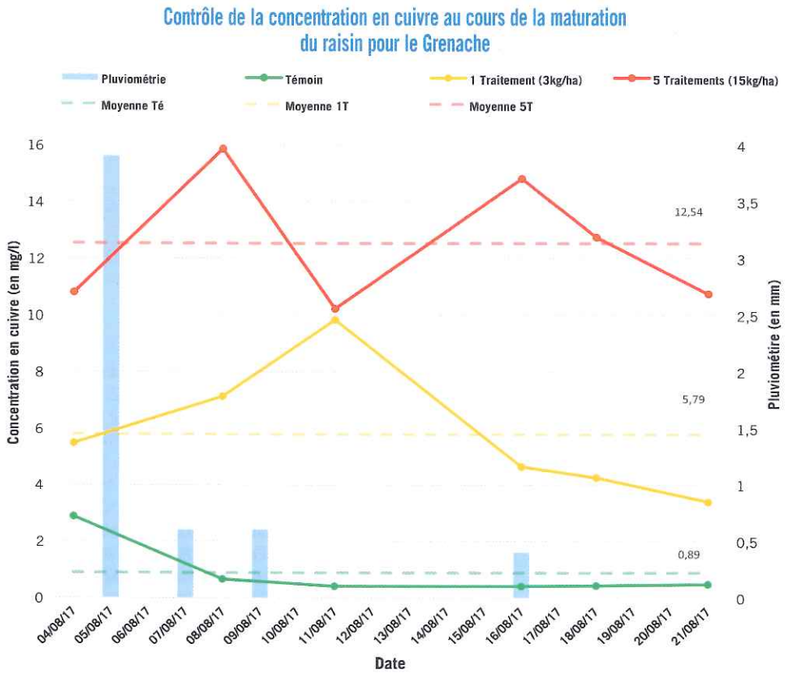


Figure 3 : Concentration en cuivre des raisins sur la parcelle de Grenache-Evaluation sur des prélèvements de 200 baies.

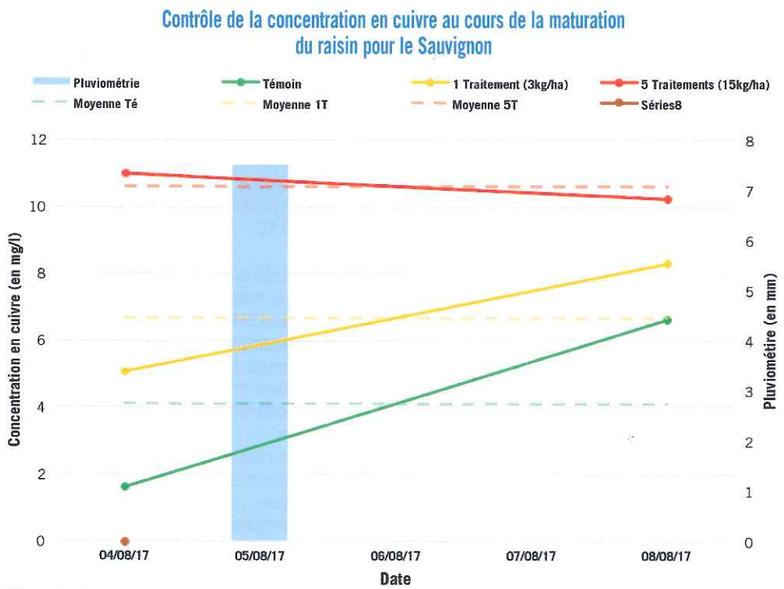


Figure 4 : Contrôle des concentrations en cuivre des raisins sur la parcelle de Sauvignon--Evaluation sur des prélèvements de 200 baies.

L'effet quantité de cuivre apporté est aussi mesuré sur Sauvignon *Figure 4*, mais le trop faible nombre de points de contrôles (dû à la précocité du millésime) ne nous permet pas de conclure sur la cinétique. Le niveau de cuivre mesuré sur les raisins Témoin, met cependant en évidence que des traitements avaient dû être réalisés par le propriétaire avant la mise en place de l'essai.

Ainsi, la comparaison des 3 schémas de traitements (rien, 1 application de 3kg/ha à véraison et 5 applications de 3kg/ha entre véraison et 15 jours pré-récolte) montre sur les deux parcelles:

- ➜ un effet cumulatif des traitements de cuivre sur la concentration mesurée sur les raisins (prélèvements de 200 baies) qui conduit à des teneurs comprises entre 0.9 et 13 mg/l
- ➜ l'absence d'effet des faibles précipitations (<20 mm) sur les teneurs en cuivre.
- ➜ La présence de résidus en quantité non négligeable, même avec un apport unique effectué quasiment dans le respect des délais avant récolte (17 jours au lieu de 21 jours-Grenache).

2 Impact des traitements au vignoble sur les paramètres analytiques

Les analyses réalisées sur les moûts après débourbage *(Tableau 2)* montrent un retard de maturité sur les modalités ayant fait l'objet de 5 traitements au cuivre. Cet effet des traitements au cuivre a déjà été décrit par (Hatzidimitriou, et al. 1996)

Analyse des moûts après débourbage de l'essai vignoble Sauvignon au stade M selon les différentes modalités

VALEURS	TÉ	1T	5T
Sucres en g/l	208,4	208,6	199,1
TAP calculé en %	12,4	12,4	11,8
AT en g H2SO4/l	4,66	4,66	5,01
Ac vol en g H2SO4/	< 0,10	< 0,13	< 0,10
SO2l en mg/l	36	33	30
SO2T en mg/l	81	73	60
pH	3,3	3,3	3,26
Ac tartrique en g H2SO4/l	4,8	5	4,8
K en g/l	1,41	1,38	1,24
N ass en mg/l	195	199	194
N animé en %	64	65	63
AC mal en g/l	3,31	3,26	3,69

Analyse des moûts après débourbage de l'essai vignoble Grenache au stade M selon les différentes modalités

VALEURS	TÉ	1T	5T
Sucres en g/l	244,8	236,2	237,8
TAP calculé en %	14,5	14	14,1
AT en g H2SO4/l	2,36	2,48	2,44
Ac vol en g H2SO4/	< 0,10	< 0,10	< 0,10
SO2l en mg/l	24	24	22
SO2T en mg/l	66	60	52
pH	3,51	3,48	3,49
Ac tartrique en g H2SO4/l	3,7	4,0	4,0
K en g/l	1,18	1,23	1,23
N ass en mg/l	166	148	152
N animé en %	61	63	64
AC mal en g/l	1,56	1,39	1,41

***Tableau 2 :** Analyse après débourbage des moûts provenant des parcelles de l'essai vignoble en fonction des modalités de traitements.*

3 Transfert du cuivre au cours des étapes de vinifications

Nous mesurons une forte chute de teneur du cuivre dosé entre les raisins prélevés à la parcelle et les jus non clarifiés (Press) obtenus à la cave expérimentale par la vinification de lots de 50kg *(Figure 5)*. Ces pertes sont variables et comprises entre 61% et 88% du cuivre mesuré sur raisin. Les teneurs en cuivre obtenues sur jus avant clarification sont alors comprises entre 0.3 et 4.2mg/l.

Notons que les méthodes d'extraction des jus diffèrent entre les analyses effectuées sur les prélèvements de 200 baies et les raisins vinifiés à la cave expérimentale, ce qui peut en partie expliquer la baisse de concentration mesurée.

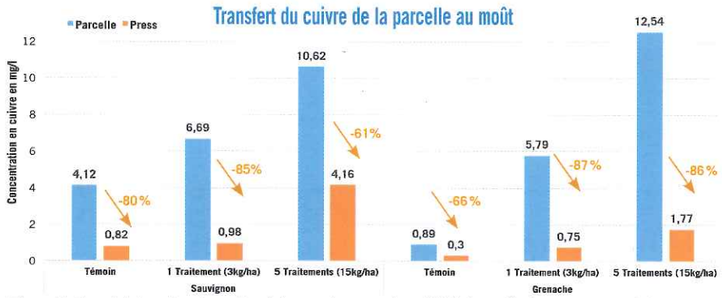


Figure 5 : Transfert du cuivre des raisins à la parcelle, mesuré sur 200 baies prélevées au moment de la récolte(Parcelle) au moût avant clarification (Press) (jus obtenus à cave expérimentale à partir de lots de 50kg).

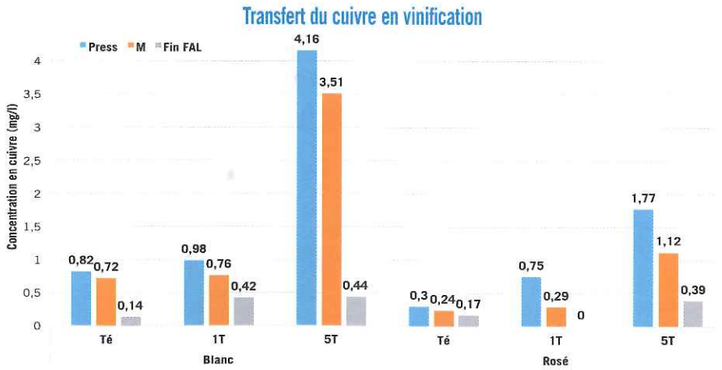


Figure 6 : Transferts du cuivre au cours de la vinification –Press = moût avant clarification, M = moût après décantation statique à froid sans ajout de bourbes fines (NTU<30)- Fin FAL : vin fermentation alcoolique terminée après 1 soutirage de mise au propre.

Le dosage du cuivre sur le raisin est un indicateur de la teneur éventuelle des jus à venir mais ne peut en aucun cas permettre d'évaluer précisément la concentration que l'on obtiendra en vinification : les baisses de concentrations entre analyses sur raisin et sur jus sont très variables (entre -61 et -87%). Le dosage sur raisin surestime fortement la concentration à venir sur jus.

La *Figure 4* montre que sur l'ensemble de nos essais, et quelle que soit la teneur en cuivre des jus à l'issue du pressurage, elle évolue très peu au cours de la clarification statique à froid. Les pertes mesurées sont comprises entre 0.1 et 0.65mg/l de cuivre, ce qui correspond en moyenne à une perte de 28% mais avec une grande variabilité. Ces pertes ne sont pas du tout liées à la teneur en cuivre avant clarification.

A contrario, à l'issue de la fermentation alcoolique les teneurs en cuivre mesurées après mise au propre sont particulièrement faibles (<0.45mg/l) et ceci, même pour des vins dans lesquels la teneur en cuivre avant levurage était élevée (>3 mg/l).

L'ensemble de ces résultats confirment les travaux de (Hatzidimitriou, et al. 1996).

4 Impact des traitements au cuivre sur le potentiel aromatique des jus

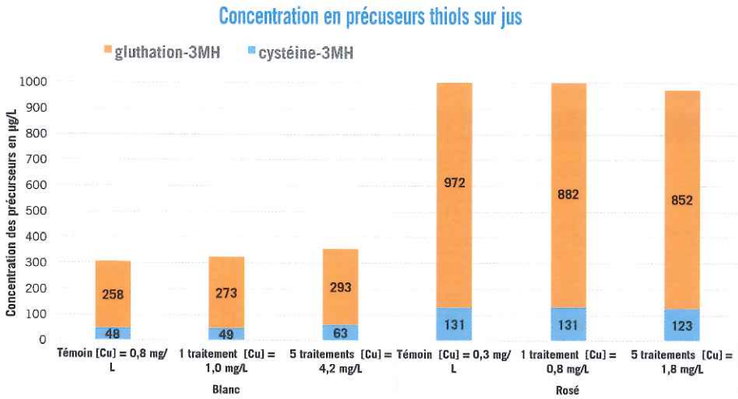


Figure 7 : Précurseurs thiols dosés après débourbage en fonction des modalités de traitement cuivre au vignoble-[cu] = concentration en cuivre du jus avant clarification.

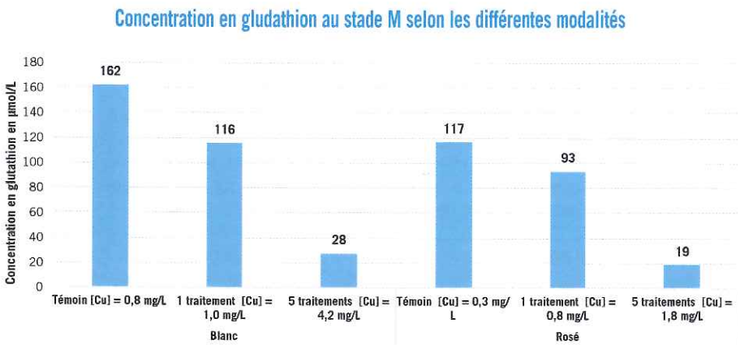


Figure 8 : Glutathion réduit dosé après débourbage en fonction des modalités de traitement cuivre au vignoble-[cu] = concentration en cuivre du jus avant débourbage.

Le dosage des précurseurs thiols *(Figure 7)* sur les jus après clarification statique et avant levurage montre que les précurseurs majoritaires sont les glutathion-3MH puis la cystéine-3MH. Le glutathion-4MMP et la cystéine-4MMP n'ont pas été détectés. L'effet des traitements au cuivre sur la concentration en ces précurseurs n'est pas significatif sur Sauvignon et est faible sur Grenache.
Dans ce cas, c'est principalement le glutathion-3MH qui diminue avec l'augmentation du nombre de traitements.
Sur jus avant fermentation alcoolique, l'impact des traitements mis en œuvre à la parcelle et des concentrations en cuivre qui en découlent sur la teneur en glutathion réduit disponible est significatif *(Figure 8)*. On relève une perte de 50% à 80% de glutathion réduit disponible suite à l'augmentation des teneurs en cuivre. Ces effets sont significatifs même pour des hausses de teneurs en cuivre qui peuvent paraître modérées.

5 Déroulement des fermentations alcooliques

Le suivi des fermentations alcooliques *(Figure 9)* montre que les très fortes teneurs en cuivre (>3 mg/l au moment du levurage) induisent une latence plus importante de 2 jours, sans pour autant conduire à une durée totale de fermentation alcoolique plus longue.

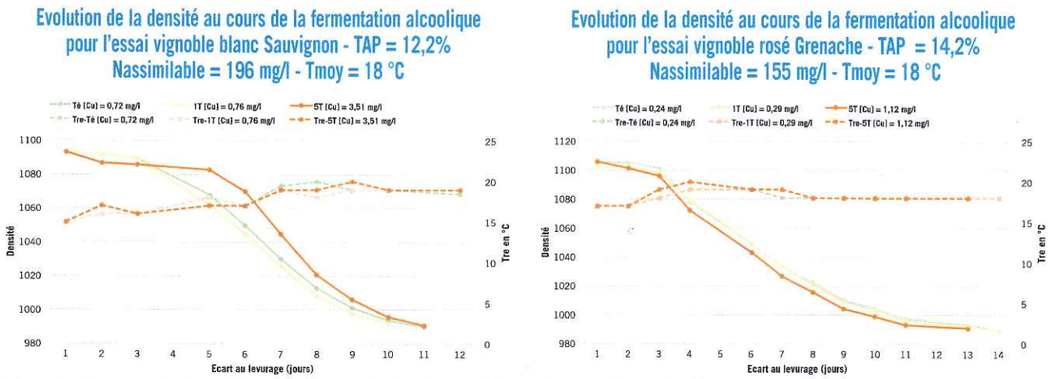


Figure 9 : Déroulement des fermentations alcooliques en fonction des modalités de traitement cuivre au vignoble-[cu] = concentration en cuivre du jus après débourbage. Levurage avec opale® 2.0 à 30g/hl.

Pour des teneurs en cuivre plus modérées (<1.5mg/l) nous n'avons mesuré aucun impact sur les cinétiques fermentaires.
Lors d'essais complémentaires (non présentés ici) nous avons pu vérifier que même avec des teneurs en cuivre nettement plus importantes (>10 mg/l), nous n'avions pas eu à déplorer d'arrêt de fermentation alcoolique après un levurage à 30g/hl associé à une bonne maîtrise des points clés de la fermentation alcoolique. Seuls des allongements de la phase de latence ont été constatés.

6 Profils organoleptiques des vins

Les vins ont été dégustés par des jurys experts grâce à l'analyse sensorielle descriptive quantifiée *(Figure 10)* selon la méthodologie développée à l'ICV (Granes , et al. 2009).
Sur le rosé, les différences significatives portent sur les descripteurs Agrumes, fruits exotiques et Cassis, significativement plus faibles pour la modalité 5 Traitements.
Bien que non significatif, nous relèverons aussi que les notes soufrées s'amplifient avec le nombre de traitements de même que la sécheresse. En parallèle, le volume diminue.
Sur Sauvignon, aucun descripteur ne donne lieu à des différences statistiques au seuil de 5%.
Cependant nous relevons que le lot 5 Traitements conduit à une baisse des notes Buis, Agrumes, fruits exotiques et une hausse de la rugosité, de la sécheresse et de l'astringence associée à une perte de volume.

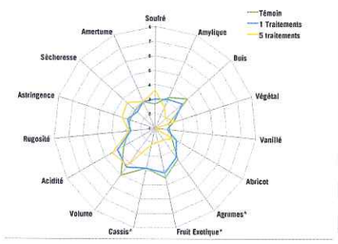
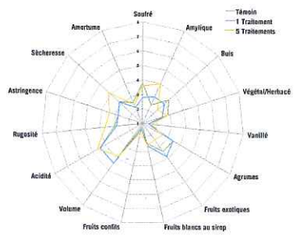


Figure 10 : Profils organoleptiques obtenus par ASDQ (*) : différences significatives au seuil de 5%.



CONCLUSION

La comparaison de trois plans de traitements à base de cuivre, nous a permis, grâce à un plan d'expérience en blocs, de confirmer sur deux matrices l'effet des apports de cuivre sur la maturation du raisin. Il a aussi été mis en évidence que, bien que la teneur en cuivre des jus soit naturellement proportionnelle à la quantité de cuivre apportée, ces deux valeurs ne sont pas mathématiquement liées.
Par ailleurs, en cas de faible pluviométrie, le respect de la DAR ne suffit pas à s'assurer de l'absence de résidus de cuivre dans les jus, il permet seulement d'en réduire la teneur. Enfin, comme déjà publié par d'autres auteurs, il est important de rappeler que la clarification par débourbage statique, ne permet de réduire significativement et régulièrement la teneur en cuivre des jus.
Il nous a été permis d'obtenir pour chaque matrice deux jus avant clarification avec des concentrations en cuivre inférieures à 1mg/l mais différentes entre elles (Δ 0.2 à 0.4mg/l) et un troisième jus avec un niveau nettement plus élevé de cuivre (1.8 et 4.2mg/l).
Grâce à ces gradients, nous avons pu étudier l'impact du cuivre non seulement sur la teneur en précurseurs aromatiques types «thiols» glutathionylés et cystéinylés, mais aussi sur le glutathion réduit (GSH). Il est alors clairement apparu que le cuivre réduit systématiquement la teneur en glutathion réduit sans impacter significativement la teneur en précurseurs. Les effets négatifs du cuivre, déjà décrits à plusieurs reprises, sur la teneur en composés aromatiques à l'origine du caractère «thiolé» de certains cépages ne peuvent donc être reliés à un effet direct de cet élément sur les précurseurs.
Ces premiers résultats suggèrent que c'est une diminution de la disponibilité en anti-oxydant naturel qu'est le glutathion réduit qui induit une perte en intensité aromatique sur les vins à l'issue de la fermentation alcoolique. Ces effets sont mesurables analytiquement sur les jus mais aussi organoleptiquement sur les vins pour des teneurs en cuivre inférieures à 1mg/l.

Ces résultats ouvrent par ailleurs des perspectives pour les vinificateurs quant aux éventuelles adaptations de process sur des raisins potentiellement «riches» en cuivre.
Ainsi, la mise en œuvre de techniques visant à enrichir les jus en précurseurs (comme la macération sur bourbes par exemple) risque de ne pas permettre l'obtention de vins plus «fruits exotiques», «agrumes», «pamplemousse» en l'absence de teneurs suffisantes en glutathion. A contrario, l'utilisation de préparations riches en glutathion réduit pourrait, peut être partiellement , ou du glutathion pur (si il devient autorisé) compenser les pertes liées à la présence de cuivre. L'évaluation de l'intérêt de ces techniques fera l'objet de nouveaux travaux en 2018.

Remerciements : Les auteurs remercient Etienne Ledard pour sa contribution très active à la réalisation de ces essais.

Références bibliographiques

Cheynier, V. F., E. K. Trousdale, V. L. Singleton, M. J. Salgues, et R., Wylde. «Characterization of 2-S-glutathionyl caftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines.» Journal of Agricultur and Food Chemistry, 1986: 34(2),217-221.

Darriet, P., V. Lavigne, J. N. Boidron, et D., Dubourdieu. *«Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage CPG-Olfactométrie.»* journal international de la vigne et du vin, 199: 25(3),167-174.

Darriet, Ph, et al. «Incidence des traitements anticryptogamiques avec des fongicides anti-mildiou, en absence de pression parasitaire, sur la composition des raisins et des vins de cabernet sauvignon.» Journal international des sciences de la vigne et du vin, 2001: 35, n°1,23-29.

Dubourdieu, D. et Lavigne-Cruege, V. *«Rôle du glutathion sur l'évolution aromatique des vins blancs secs.»* Station régionale ITV Midi-Pyrénées – Journée technique régionale-Les arômes des vins. 2003. 47-58.

Dufourq, Thierry. «UTILISATION DU CUIVRE EN VITICULTURE ET QUALITE AROMATIQUE DES VINS DE GASCOGNE.» Journées techniques Nationales Viticulture Biologique. Avignon, 2004. 93-96.

Ferreira, V., N. Ortin, A. Escudero, R. Lopez, et J., Cacho. *«Chemical characterization of the aroma of Grenache rose wines: aroma extract dilution analysis, quantitative determination, and sensory reconstitution studies.»* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002: 50(14),4048-54.

Granes , D, L Pic-Blateyron, J Negrel, et C Bonnefond. *«L'analyse sensorielle descriptive quantifiée (ASDQ), une méthode pour un langage commun.»* Revue française d'œnologie, 2009: (238), p. 16-21.

Hatzidimitriou, E, et al. *«Incidence d'une protection viticole anticryptogamique utilisant une formulation cuprique sur le niveau de maturité des raisins et l'arôme variétal des vins de Sauvignon. Bilan de trois années d'expérimentation.»* Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1996: 30 (3), 133-150.

Roland, A., F. Cavlier, et R. Schneider. *«Les thiols variétaux : point sur les voies de biogenèse et incidence des itinéraires de production et d'élaboration.»* Vinaromas. Toulouse, 2013. 11-14.

Roland, A., Vialaret., M. Moniatte, Rigou P., A. Razungle, et R., Schneider. «Validation of a nanoliquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and the accurate quantification by isotopic dilution of glutathionylated and cysteinylated precursors of 3-mercaptohexan-1-ol and 4-mercapto-4-methylpentan-2-.» Journal of Chromatography, 2010: 1217(10)-p1626-1635.

Tominaga, T. *«Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin.»* Grand prix 2000 Academie AMORIM. 2000.

Tominaga, T., R. Baltenweck-Guyot, C. P. D. Gachons, et D., Dubourdieu. *«Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several Vitis vinifera Grape Varieties.»* American journal ofEnology ant viticulture, 2000: 51(2),178-181.