



## ***Rentrée 2021***

### ***Les 5 nouveautés du Laboratoire Excell***

Comme à chaque rentrée, nous sommes ravis de vous faire part de notre été studieux et de nos développements récents. Vous trouverez ci-dessous cinq articles présentant les nouveautés du Laboratoire. Une communication plus spécifique sur les vendanges 2021 aura lieu prochainement lorsque nous aurons collecté suffisamment de données les concernant. Aussi, un webinaire sera organisé pour évoquer les nouvelles analyses utiles en tant qu'outils décisionnels pour le pilotage des vendanges.

#### ***L'Éthylthioglycolate : Mister Hyde dans la famille des thiols***

Les thiols volatils variétaux comme le 3-sulfanylhexan-1-ol ou le 4-sulfanyl-4-méthylpentan-2-one sont connus depuis plus de vingt ans comme des composés clés dans le profil aromatique des vins de Sauvignon (Tominaga et al 1998) mais aussi dans bon nombre d'autres cépages blancs et rouges (Rolland et al 2011). Les notes aromatiques associées aux fruits exotiques, aux agrumes..., participent notablement au bouquet des vins. Ils font l'objet d'itinéraires techniques précis pour favoriser ou limiter certains composés et ainsi maîtriser les concentrations de ces molécules pouvant être fortement impactantes dans la typicité des vins. La fraîcheur aromatique des vins étant aussi devenue un enjeu de plus en plus important, nous observons que les thiols sont également impliqués dans cette perception. Il en est de même pour le benzène-méthanthiol (BMT) dans la thématique de la minéralité des vins. Ces molécules ont une caractéristique commune : ils ont un impact organoleptique à des concentrations extrêmement faibles (pouvant descendre jusqu'au ng/L).

Dans le cadre de nos travaux sur ces composés, l'éthylthioglycolate (ETG) ou éthyl-2-sulfanylacetate, est un thiol identifié récemment par l'équipe de Philippe Darriet de l'ISVV (Nikolantonaki et al. 2011) dans les vins blancs de Sauvignon ou Riesling et certains vins rosés issus de Cabernet Sauvignon, Merlot, Mourvèdre, Grenache, Cinsault et Syrah. Le seuil de perception défini lors de ces travaux de recherche est de 0.2 à 0.3 µg/L et le seuil de rejet (odeur identifiée comme désagréable) entre 0.3 à 0.5 µg/L suivant les vins.

Les notes aromatiques associées vont du « végétal » à « herbacé » en allant vers des notes plus lourdes comme « alliacé » ou « fèves au lard ». En deçà de son seuil de perception (<0.25 µg/l), la présence d'éthylthioglycolate participerait à une diminution de la fraîcheur et des nuances fruitées des vins, selon les dégustateurs ayant participé à cette étude.

L'origine de cette molécule n'est pas encore complètement élucidée, cependant l'exposition à l'oxygène des moûts durant l'étape préfermentaire semblerait jouer un rôle important. En effet, les vins issus de jus pressés sous atmosphère inerte contiendraient notablement moins d'ETG que ceux exposés à l'oxygène durant cette étape. L'oxygène jouerait aussi un rôle sur les quantités d'ETG lors du vieillissement des vins en bouteille, Maria Nikolantonaki ayant aussi montré une augmentation des concentrations en éthylthioglycolate sur les millésimes les plus anciens d'un même vin de Bordeaux.

Le laboratoire Excell propose maintenant le dosage de cette molécule avec une méthode LC-MS/MS (cf. Figure 1) proche de celle utilisée en routine pour le dosage des thiols variétaux, pour aider à la compréhension des déviations de type « alliacé » ou de potentielles « lourdeurs » de certains vins ainsi que pour tracer l'évolution oxydative lors de processus de vieillissement hétérogène. Les aspects « alliacés » et « herbacés » laissent aussi planer le doute sur la présence de composés dans le cadre de certaines contaminations au vignoble.

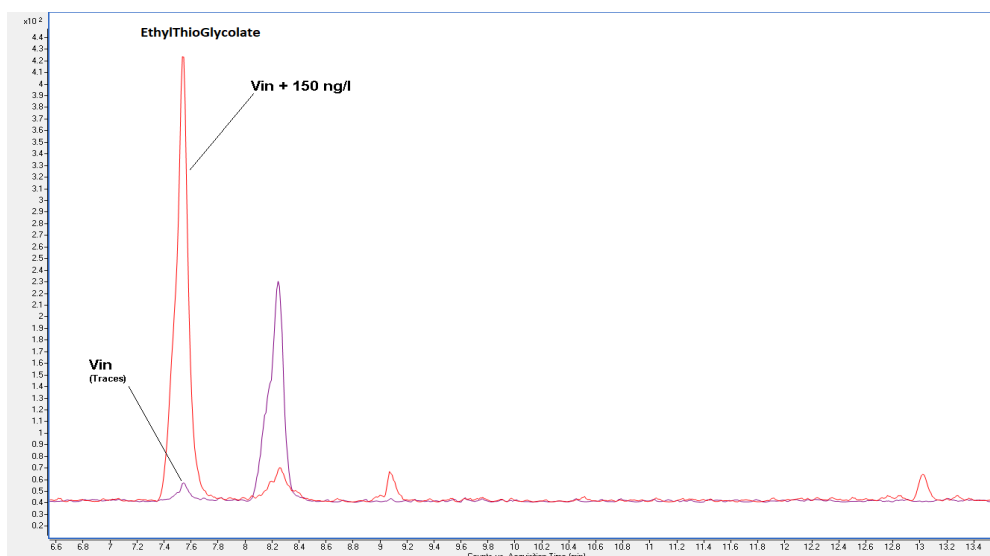


Figure 1 : Chromatogramme du dosage de l'éthylthioglycolate

## ***L'analyse des Brettanomyces : la discrimination des souches est possible***

Les travaux de notre doctorant Paul Le Montagner (étude sur les biofilms de *Brettanomyces* dans les caves) et les analyses TYP\Brett nous le rappellent tous les jours ou presque : la diversité intraspécifique au sein de l'espèce *Brettanomyces* est très importante avec de nombreuses conséquences œnologiques. Nous pouvons ainsi citer la résistance variable au SO<sub>2</sub> (test TYP\Brett), l'adhésion sur les matériaux de la cave (thèse de Paul), la résistance aux faibles ou aux fortes températures, la production d'autres composés déviants (acides gras, composés impliqués dans les goûts de souris...). Pouvoir discriminer les souches est donc particulièrement intéressant. Sans oser de parallélisme maladroit, le contexte est relativement similaire avec les tests COVID où la PCR est la méthode de référence pour détecter le virus et où d'autres méthodes de biologie moléculaire complémentaires permettent d'identifier les variants.

L'analyse des microsatellites est une méthode de typage moléculaire basée sur la PCR ; méthode d'amplification de séquences génétiques cibles. Un microsatellite est une séquence d'ADN de quelques nucléotides répétés en tandem et contenu dans un locus spécifique du chromosome d'un microorganisme. Ces répétitions formant des « motifs » très abondants dans le génome, ils permettent de discriminer des souches d'une même espèce.

Cette méthode a notamment servi à déterminer l'appartenance des souches de *Brettanomyces bruxellensis* à des groupes génétiques selon des critères définis. Elle peut être utilisée aussi pour caractériser les groupes présents au vignoble, dans un chai et ainsi cartographier les zones de contaminations par groupe de souches.

Cette approche développée par le laboratoire Excell participe à la compréhension de phénomènes globaux et aussi à la localisation de *Brettanomyces bruxellensis* au sein d'une même zone de production. Elle permet de bien objectiver l'origine des contaminations et les différences constatées dues aux spécificités des souches rencontrées. Aussi, la participation effective de *Brettanomyces* dans les problématiques des goûts de souris semble aussi très souche dépendante.

## ***L'acide fumarique : un nouvel agent antibactérien autorisé***

Les populations de bactéries sur raisins ont fortement progressé ces derniers millésimes et les conditions sont également plus propices à certains développements (pH plus élevés, raisonnement des doses de SO<sub>2</sub>...). En lien aussi avec les objectifs de maintien de fraîcheur des vins, la réalisation systématique de la FML est également raisonnée dans certains itinéraires (comme les vins de base des effervescents). La gestion des flores bactériennes est donc devenue un enjeu majeur. Depuis la résolution OIV-OENO 581A-2021, l'acide fumarique est un composé bactéricide autorisé pour bloquer la fermentation malolactique dans les vins. L'OIV propose des traitements entre 300 et 600 mg/L. Certains de nos partenaires provençaux, champenois et cognaçais ont prévu des essais pour bloquer les développements de FML dans leurs matrices respectives. Ils souhaitent pour cela pouvoir quantifier les doses de produits ajoutés.

Plusieurs négociants nous ont également demandé la possibilité de tracer cet usage. Nous avons donc développé rapidement et efficacement une méthode de dosage en chromatographie ionique permettant de cibler spécifiquement et de quantifier précisément l'acide fumarique (LQ de 50 mg/L ; cette sensibilité étant suffisante pour tracer des additions exogènes versus les quantités potentiellement produites par certains métabolismes microbiens endogènes comme le cycle de Krebs de la levure) dans les moûts et les vins. Le dosage de ce nouvel intrant est donc désormais disponible au laboratoire EXCELL.

## *Lactobacillus hilgardii* : détection et quantification de cette bactérie pernicieuse

L'an dernier, nous avons démêlé une problématique récurrente sur la partie septentrionale du vignoble : l'augmentation du caractère lacté et l'apparition de troubles dans les vins en sortie de fermentations. Après avoir réalisé de nombreuses analyses microbiologiques en allant jusqu'au séquençage des germes isolés, nous avons constaté que la bactérie incriminée était *Lactobacillus hilgardii* (cf. Figure 2). Cette dernière est une bactérie lactique relativement rare dans le consortium microbiologique œnologique avec seulement 2% des bactéries selon Lonvaud et al. 2010 (Microbiologie du vin – bases fondamentales et applications aux Editions Lavoisier). C'est une bactérie hétérofermentaire (cela signifie qu'à partir de sucres, elle produit de l'acide lactique et de l'acide acétique) décrite dans certaines problématiques de contaminations de vins riches en alcools avec des sucres résiduels. Les principales données de la bibliographie décrivent aussi cette bactérie dans les vins de liqueur ou des mistelles, grâce sa composition spécifique membranaire qui lui confère une forte résistance à l'alcool. Outre les déviations organoleptiques cette bactérie peut provoquer des problèmes de troubles et de filtrabilité des vins.

Sur la base de ces premières identifications nous avons développé une technique de PCR quantitative spécifique de cette espèce de bactéries. Lors des vendanges 2020, nous avons remarqué que *Lactobacillus hilgardii* pouvait être présente en forte proportion sur les raisins. Dans plusieurs cas, cette bactérie a profité de conditions favorables (faibles doses de SO<sub>2</sub> en premier lieu) pour se développer durant les phases fermentaires avec des productions parfois significatives d'amines biogènes, de phénols volatils (composés à fonction vinyle) et de composés impliqués dans les goûts de souris. Il est très probable que ces productions soient variables selon les souches et les substrats disponibles.

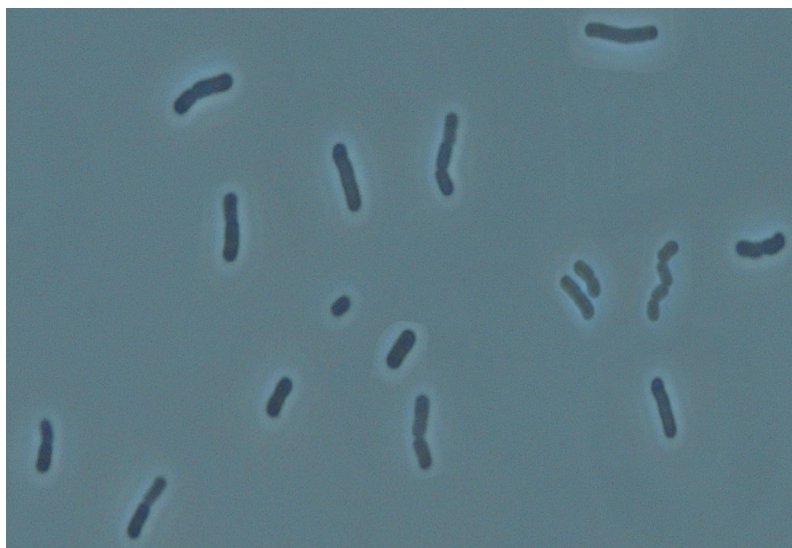


Figure 2 : *Lactobacillus hilgardii* en microscopie x1000

Lors des travaux de mises au point de la technique de Q-PCR, nous avons également développé une technique permettant de détecter et de quantifier l'espèce *Lactobacillus plantarum*. Cette espèce appartient aussi au consortium bactérien indigène des raisins (la référence précédemment évoquée évoque une proportion de 24% de cette espèce parmi les bactéries lactiques du moût). Elle peut être aussi ajoutée sous forme de bactéries sélectionnées (certains levains bactériens commercialisés sont des souches de *Lactobacillus plantarum*). Si l'immense majorité des espèces du genre *Lactobacillus* connus en œnologie sont des bactéries hétérofermentaires (production d'acide lactique et d'acide acétique à partir des sucres) et que seules *Lactobacillus debrueckii* et *Lactobacillus nagelii* sont des bactéries homofermentaires (production exclusive d'acide lactique à partir des sucres), l'espèce *Lactobacillus plantarum* est parfois hâtivement classée aussi comme homofermentaire. Effectivement, elle ne consomme le glucose que par la voie de la glycolyse (production d'acide lactique) mais elle a potentiellement toute la machinerie génétique et enzymatique pour utiliser aussi la voie des pentoses phosphate. Elle est donc à classer parmi les bactéries hétérofermentaires facultatives (comme *Lactobacillus mali*). Cela signifie qu'en présence de glucose, la voie hétérofermentaire est réprimée et donc le développement précoce de *Lactobacillus plantarum* ne présente pas de risque de montée de volatile. Néanmoins sa présence peut être problématique plus tardivement.

Les techniques de Q-PCR *Lactobacillus hilgardii* et de Q-PCR *Lactobacillus plantarum* sont donc désormais disponibles au laboratoire EXCELL. Elles viennent compléter les techniques déjà très diversifiées de quantification spécifique des différentes espèces de levures non-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia fructicola*, *Pichia kluyveri*, *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Zygosaccharomyces bailii* et bien sûr à différents niveaux d'identification *Brettanomyces bruxellensis* (cf. point 2 de ce document)).

## EXCELL et la R&D : Le Club des 5 docteurs de l'équipe EXCELL

A l'image de son grand frère, le groupe LAFFORT, le laboratoire EXCELL investit fortement dans la R&D. Les nouveautés décrites rapidement dans ce document en sont une belle démonstration concrète. Les investissements de matériels analytiques et les développements fréquents d'innovations avec les fournisseurs sont aussi des travaux très importants. Dans tout ce mécanisme, les expériences et les compétences techniques ainsi que les valeurs d'innovation et de curiosité de nos collaborateurs sont également un point essentiel. Pour accompagner cela plusieurs recrutements de docteurs ont récemment eu lieu pour consolider les expertises et aborder chaque thématique de la façon la plus scientifique possible. Parmi les 36 collaborateurs ce sont désormais 5 docteurs qui œuvrent à la coordination de ces travaux. L'occasion de vous les présenter ici en quelques mots :

**Caroline Gardia-Parège** est docteure en chimie. Elle est spécialiste des contaminants environnementaux. Elle a notamment participé à de nombreux projets de recherche sur la présence des pesticides dans les eaux et dans les sols y compris viticoles. Caroline a rejoint l'équipe au printemps pour continuer à dynamiser nos développements en chimie fine. Sa présence contribue aussi à apporter des réponses plus précises concernant les résidus de pesticides.

**Zurine Rasines Perea** est docteure en chimie du vin. Au gré de différentes expériences, elle a fait des composés phénoliques sa spécialité. Elle dispose aussi d'une solide expérience en chimie analytique. Concernant les composés phénoliques, l'augmentation des sollicitations pour des dosages de degré de polymérisation et d'astilbine entre autres, démontre que cette thématique est essentielle pour nos partenaires. Le rôle de Zurine est donc de catalyser les développements analytiques nécessaires pour répondre à ces nouveaux challenges mais également entretenir les techniques d'analyses fines des vins (y compris des arômes).



**Alice Dauphin** est docteure en électrochimie. Cette discipline longtemps délaissée des sciences œnologiques est une thématique majeure de développement au laboratoire EXCELL depuis près de 4 ans. Les différentes prestations analytiques proposées (voltamétrie linéaire et cyclique sur vins, dosage du potentiel RedOX des sols et des parties végétales) apportent déjà des éléments de réponses précieux à nos partenaires sur ces sujets. Afin de gagner en expertise le laboratoire EXCELL s'est rapproché d'un expert du CNRS en la matière, le professeur Stéphane Arbault (CNRS/Université de Bordeaux) dans le cadre d'un projet de post-doc réalisé par Alice. Alice a donc intégré l'équipe EXCELL depuis le mois d'août 2021.

**Calypso Chadfeau** est docteure en chimie des matériaux. Calypso est friande d'innovations et ses origines charentaises l'ont amené à s'intéresser tout spécifiquement à la filière viti-vinicole. Calypso interviendra donc dans le cadre de la Zone Verte EXCELL (<https://www.zoneverteexcell.com/>) et également dans le développement et l'optimisation des équipements technologiques proposés par le laboratoire (comme le Quick Trap®).

**Vincent Renouf**, le directeur du laboratoire, est également docteur en microbiologie du vin. Même si depuis sa thèse de nombreuses expériences ont élargi ses champs d'applications, Vincent reste très attaché au dynamisme des nouvelles prestations analytiques en microbiologie et dans les autres secteurs du laboratoire.

Et bientôt **Paul Le Montagner** : le laboratoire EXCELL finance depuis un an et demi la thèse de Paul Le Montagner. Paul réalise son doctorat au sein de l'équipe du professeur Isabelle Masneuf Pomarède. Comme évoqué dans le point 2 de ce document, Paul étudie les capacités de bioadhésion des souches de *Brettanomyces*. Ces données permettront de mieux caractériser les phénomènes de biofilms microbiens observés dans certains cas de figures lors de nos audits d'hygiène ou d'écologie microbienne réalisés en caves.