

Indices sanitaires et marqueurs chimiques pour évaluer l'état sanitaire du raisin

I. Définitions, principes et tests préliminaires avec *Botrytis cinerea*

Sandrine BELCHER et Agnès DIENES-NAGY, Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon

Renseignements: Sandrine Belcher, e-mail: sandrine.belcher@acw.admin.ch, tél. +41 22 363 43 36

La Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW a mis en place une série d'essais pour évaluer la pertinence et l'interprétation qualitative de paramètres génériques liés à la pourriture grise. L'idée est de pouvoir utiliser des informations, générées rapidement par des appareils de mesure multiparamétriques basés sur la spectrométrie, comme marqueurs de l'état sanitaire présent ou latent du raisin. Cette première partie aborde la problématique, les paramètres étudiés et les observations préliminaires sur des cépages sensibles ou résistants qui ont conduit à des études de marqueurs plus spécifiques sur le terrain et en laboratoire.



Grappe fortement infectée par *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise.

Introduction

Le suivi de la maturation du raisin sert à déterminer une date optimale de récolte d'après l'augmentation du taux de sucre, la diminution de l'acidité et, plus récemment, l'accumulation de composés phénoliques responsables de l'arôme et de la qualité du vin. Les conditions climatiques et la pression de la pourriture peuvent toutefois modifier cet optimum, puisque quelques jours suffisent parfois à anéantir les grappes.

L'action de *Botrytis cinerea*, appelé communément «pourriture grise» en raison du feutrage gris présent sur les baies atteintes, est multiple: oxydation des composés phénoliques, détérioration des arômes primaires des raisins, diminution des rendements, production de mauvais goûts, fragilisation vis-à-vis d'infections secondaires d'origine microbienne ou fermentaire.

Marqueurs du métabolisme modifié de la vigne malade

Parfois spectaculaire et fulgurante en fin de maturation, la pourriture n'est cependant pas un processus instantané: l'infection peut avoir lieu très tôt dans la saison, à travers les parties sénescentes ou mortes de la plante, mais la période d'infection la plus favorable à un développement ultérieur sur les grappes est la floraison (Keller *et al.* 2003; Viret *et al.* 2004). Le pathogène reste latent au moins jusqu'à la véraison et son développement au cours de la maturation est ensuite fortement lié aux conditions climatiques. Dès l'infection, le champignon induit un certain nombre de changements (physiologiques, biologiques et chimiques) dans la plante qui débute bien avant les symptômes visibles et, en l'absence de traitement, se poursuivent pendant toute la maturation. Ces modifications peuvent être de trois ordres:

- **Diminution ou transformation des composés utilisés par le botrytis pour se développer et se nourrir:** dégradation de la pectine, des terpènes, des polyphénols, notamment par l'enzyme d'oxydation laccase ou des stilbènes oxydases (Pezet *et al.* 1991), consommation de sucres, d'acide tartrique ou de matières azotées. La déshydratation et diminution d'acides peut d'ailleurs s'assimiler

à une maturation, ce qui explique pourquoi la «pourriture noble», également due à *B. cinerea*, mène à une surmaturation recherchée pour l'élaboration de vins doux.

- **Accumulation de déchets ou de métabolites excrétés par le champignon:** parmi ceux-ci figurent notamment le glycérol ou d'autres sucres-alcools (mannitol, inositol, arabitol) résultant d'une consommation de glucose ou de fructose, l'acide gluconique, l'acide acétique (également présent en cas de pourriture acide), des colloïdes comme le glucane gênant la clarification, ainsi que des métabolites spécifiques identifiés plus récemment comme l'abscisolate, le botrydial et les acides botrytistiques (Wang *et al.* 2008).
- Apparition de composés défensifs fabriqués par la plante contre l'attaque de botrytis (phytoalexines). Dans cette catégorie entrent des acides gras ou des oligosaccharides, certains acides organiques (glycolique, malique, tartrique) ou encore les stilbènes (picéides, resvératrol, viniférines, ptérostilbènes) (Pezet *et al.* 2003).

En plus des modifications induites, la disponibilité en certains éléments peut également favoriser le développement du botrytis ou au contraire expliquer la résistance particulière de certains cépages face à l'infection. Les stilbènes, notamment, ont été reconnus comme agents éliciteurs (défensifs) efficaces contre le mildiou. (Pezet *et al.* 2004; Gindro *et al.* 2007; Schnee *et al.* 2008). L'expression et la présence de ces métabolites diffèrent selon les stades d'infection et les stades de développement du raisin. Chacun d'eux, à un moment ou un autre, peut ainsi marquer la présence de *B. cinerea*.

Évaluer l'état sanitaire à l'aide d'indicateurs ou d'indices

Définir un «indice sanitaire» revient à donner une image globale de la qualité du raisin. Il peut refléter tout ou partie des métabolites présents à un moment donné; il peut aussi discriminer divers types d'infection ou de maladie.

Depuis une dizaine d'années, des outils d'analyse multiparamétriques se sont développés basés essentiellement sur la spectrométrie: cette approche permet d'avoir rapidement, souvent de façon non destructive, une information indirecte sur un certain nombre de données chimiques. Ces appareils ont révolutionné les analyses traditionnelles en permettant le suivi d'un plus grand nombre d'échantillons. Ils nécessitent néanmoins la mise en place d'une base de données de référence

pour des cépages représentatifs comparables à ceux que l'on désire ensuite analyser. Les informations spectrales enregistrées constituent une sorte d'«empreinte digitale» de l'échantillon et reflètent les informations structurales d'un grand nombre de composés présents. Grâce à divers traitements mathématiques, il est ensuite possible de quantifier relativement précisément – et simultanément – plusieurs de ces composés présents dans une matrice complexe, comme le vin ou le moût de raisin.

De plus, les traitements mathématiques en jeu permettent non seulement de calibrer des molécules individuelles, mais également d'établir des paramètres plus génériques qui concernent des groupes de composés chimiques évoluant de façon analogue. Ces calibrages génériques portent le nom d'indices.

Les premiers calibrages d'indices sanitaires fournis par ces appareils se basaient essentiellement sur les traces laissées dans le raisin par une infection fongique, microbologique ou bactérienne. Leur but était de donner une image globale de l'état du raisin, non d'un point de vue ponctuel, mais «historique». Les changements métaboliques, tels que décrits ci-dessus, dus à une infection de botrytis restent toujours mesurables dans la baie, même si le raisin a été traité par la suite ou si son apparence extérieure est saine (latence ou résistance). Le problème de définition d'indice sanitaire se résume alors à extraire la «bonne» information du spectre du raisin.

Sur des cépages provenant du sud de la France et d'Espagne (Dubernet *et al.* 2000), quatre premiers indices ont été établis par un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de la marque ©Winescan: **pourriture grise, pourriture acide, traces d'activité fermentaire, traces de bactéries lactiques**. Créés à l'origine comme aide objective au paiement à la qualité des vendanges, ils reflétaient les concentrations en glycérol, acide gluconique, acide acétique, éthanol, sorbitol, mannitol, arabitol, mesoinositol, butanediol, méthyl-3-butanol-1, acétate d'éthyle, acide lactique et acétate d'isoamyl. D'autres modèles, plus axés sur la pourriture grise, sont venus compléter ces premiers indices, pas toujours faciles à interpréter: si des grappes saines avaient des indices élevés, il pouvait s'agir de traces d'infections latentes. Mais parfois des grappes visiblement atteintes donnaient des indices identiques à ceux des raisins sains. Cette incohérence a été attribuée soit à l'interférence d'un autre champignon, l'*Aspergillus*, soit au poids donné à l'acide gluconique dans la détermination de l'indice global.

Cet acide, issu de l'oxydation des sucres par le botrytis, a été dès le départ un indicateur de choix dans la construction des modèles des indices sanitaires. >

Malheureusement, cette transformation s'est avérée extrêmement variable selon les cépages et terroirs. De plus, la base de données d'origine (cépages du sud de la France essentiellement) n'était pas adaptée notamment à la Suisse. Les nouveaux modèles ont donc réintégré, avec plus ou moins d'importance, le facteur purement visuel (Fischer 2007).

Résultats des essais préliminaires d'ACW

Deux analyseurs de type ©Winescan ont été évalués. Le premier intègre le modèle «français» d'indices sanitaires basé sur les métabolites de botrytis, tandis que le second reprend une adaptation «visuelle» basée sur des données de la Chambre d'agriculture de la Gironde. Des correctifs de type multilinéaire, basés sur des essais d'Allemagne ou de Nouvelle-Zélande, ont été ajoutés en faisant intervenir en priorité l'acide gluconique, le glycérol et l'acidité volatile.

Des essais ont été conduits pour interpréter ces multiples indices, leurs différences et leurs corrélations éventuelles. Ces expériences ont été réalisées sur des échantillons présentant des traces visibles de pourriture grise et/ou acide, provenant du vignoble de Changins ou de La Côte, ou sur des échantillons faisant partie d'essais de résistance à *B. cinerea*, traités ou non traités. Des mélanges de baies atteintes et non atteintes ont également été réalisés en proportions diverses.

Ces essais préliminaires se sont révélés intéressants à plusieurs titres:

- **L'indice de pourriture grise** fourni par les modèles métaboliques a pu être corrélé directement aux concentrations de glycérol et d'acide gluconique, à la modification du rapport glucose/fructose (consommation de sucres), de l'indice de formol (consommation d'azote) et, dans une moindre mesure, avec le taux de potassium (tabl.1). Comme

prévu, cet indice n'a eu que peu de relation avec la pourriture visible ou la mesure de l'activité laccase, donc avec les résultats fournis par le deuxième modèle. Les algorithmes de calcul étant trop différents l'un de l'autre, les résultats n'ont pu être transférés entre les deux appareils utilisés à Changins, bien que ceux-ci soient complémentaires. La principale différence réside dans la mesure des concentrations de l'acide gluconique. Bien que la corrélation avec les indices sanitaires soit forte, les concentrations effectives sont extrêmement faibles dans les cépages mesurés à Changins, comparativement aux cépages similairement atteints dans le sud de la France et qui constituent la base du modèle.

- **L'indice de pourriture acide** est lui aussi lié à l'acide gluconique, mais principalement corrélé avec des métabolites issus de processus fermentaires ou préfermentaires comme l'acide acétique (ou acidité volatile), le butanediol, l'inositol ou même l'éthanol. Ces relations ne sont toutefois significatives qu'avec des raisins fortement atteints de pourriture (> 60 %).
- **L'indice d'activité lactique** (en lien avec l'acide lactique) ne s'est pas révélé pertinent dans ces premiers essais.
- **L'indice d'activité fermentaire** est encore plus général car il varie conjointement avec les deux indices de pourriture grise et acide, bien qu'il ne soit pas corrélé directement à l'un ou l'autre des métabolites en particulier. Il est nécessaire néanmoins que l'attaque dépasse les 50 % pour voir cet indice varier significativement.
- Ces indices sanitaires, et notamment l'indice de pourriture grise, ont pu mettre en évidence des différences entre les cépages traités ou non traités contre le botrytis, ainsi qu'entre des cépages témoins et inoculés artificiellement (fig.1). De ce

Tableau 1 | Essais préliminaires: corrélation de l'indice de pourriture grise avec divers métabolites

Pourriture grise	Coefficient de corrélation r^2
Glycérol	0,90
Acide gluconique	0,86
Rapport Glucose/Fructose	0,77
Indice de formol	0,71
Potassium	0,63

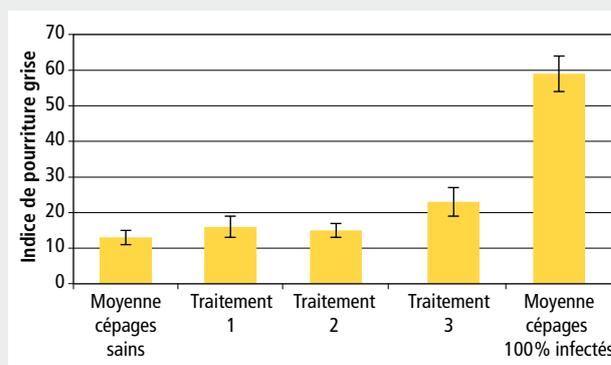


Figure 1 | Influence des traitements contre le botrytis sur une parcelle de Gamay.

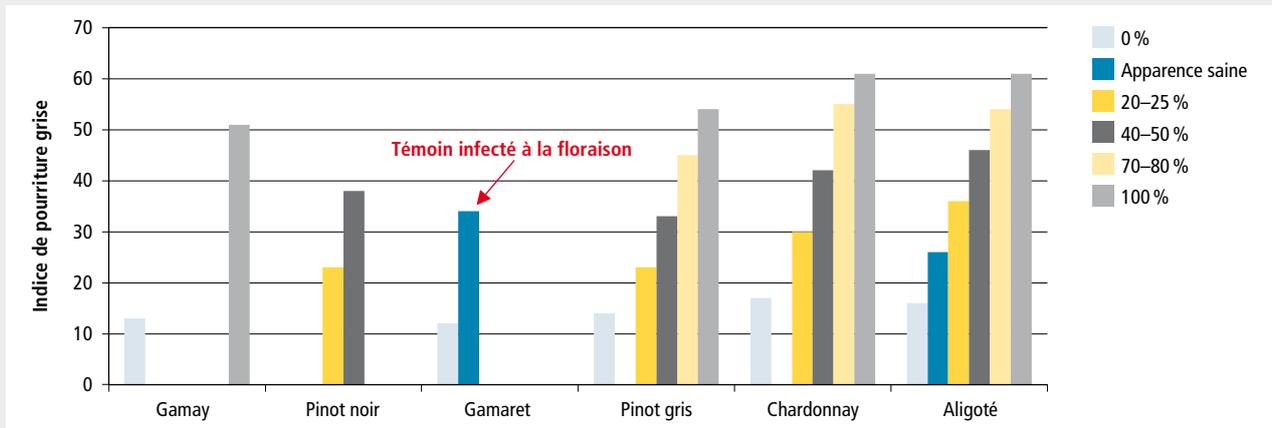


Figure 2 | Indice de pourriture grise en fonction du taux d'infection.

point de vue, le Gamaret, cépage reconnu pour sa résistance, a fourni des résultats intéressants pour la recherche de marqueurs métaboliques et pour l'interprétation des indices sanitaires. Un témoin non traité, infecté artificiellement à la floraison par une souche de botrytis, mais resté sain pendant toute la maturation, a révélé des indices identiques à ceux de mélanges artificiels contenant 30 à 50 % de botrytis (fig. 2). Cela confirme la pertinence d'un indice sanitaire global comme marqueur de pourriture, mais aussi de risque d'infection. Dans le cas du Gamaret, il confirme la latence du champignon, ainsi que la résistance de ce cépage à l'infection.

C'est dans cette optique qu'a été mise en place une étude systématique plus spécifique sur les millésimes 2009 et 2010.

Remerciements

Nous remercions C. Monnard, D. Nardonne et F. Vuichard pour les analyses spectrométriques et classiques au laboratoire.

Bibliographie

- Dubernet M., 2000. Analyse objective de la qualité des vendanges par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et réseaux de neurones. *Revue française d'Œnologie* (185), 18–21.
- Fischer U., 2007. Mesure de l'état sanitaire du raisin. *In focus* 31 (1), 19–21.
- Gindro K., Godard S., De Grootte I., Viret O., Forrer H.-R. & Dorn B., 2007. Peut-on stimuler les mécanismes de défense de la vigne? Une nouvelle méthode pour évaluer le potentiel des éliciteurs. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 39 (6), 377–383.
- Keller M., Viret O. & Cole F. M., 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: Defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology* 93 (3), 316–322.
- Pezet R., Pont V. & Hoangvan K., 1991. Evidence for Oxidative Detoxication of Pterostilbene and Resveratrol by A Laccase-Like Stilbene Oxidase Produced by *Botrytis-Cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39 (6), 441–450.
- Pezet R., Viret O., Perret C. & Tabacchi R., 2003. Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould. *Journal of Phytopathology* 151 (4), 208–214.
- Pezet R., Viret O. & Gindro K., 2004. Plant-microbe interaction: the Botrytis grey mould of grapes. Biology, biochemistry, epidemiology and control management. *Advances in Plant Physiology* 7, 71–116.
- Schnee S., Viret O. & Gindro K., 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and molecular Plant Pathology* 72 (4-6), 128–133.
- Viret O., Keller M., Jaudzems V. G. & Cole F. M., 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. *Phytopathology* 94 (8), 850–857.
- Viret O., 2004. Delta-viniferin, a resveratrol dehydromer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (18), 5488–5492.
- Wang T. S., Zhou J. Y. & Tan H., 2008. Three new metabolites from *Botrytis cinerea*. *Journal of asian natural Products Research* 10 (10), 919–924.