De la synthèse des flavanols aux tanins du vin : quelle place pour les pépins de raisin ?

Pauline Rousserie

▶ **To cite this version:**

Pauline Rousserie. De la synthèse des flavanols aux tanins du vin : quelle place pour les pépins de raisin ?. Biologie du développement. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0320 . tel-02908391

HAL Id: tel-02908391
https://theses.hal.science/tel-02908391

Submitted on 29 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par Pauline ROUSSERIE

DE LA BIOSYNTHÈSE DES FLAVANOLS AUX TANINS DU VIN : QUELLE PLACE POUR LES PÉPINS DE RAISIN ?

Sous la direction de : Pr. Laurence GENY-DENIS

Soutenue le 13 décembre 2019

Membres du jury :

M. DARRIET Philippe, Professeur des Universités, Université de Bordeaux	Président
M. DE FREITAS Victor, Professeur des Universités, Université de Porto	Rapporteur
Mme. LE BOURVELLEC Carine, Chargé de Recherche INRA, Université d'Avignon	Rapporteur
Mme. MAURY Chantal, Enseignant Chercheur, ESA Angers	Examinateur
Mme. LACAMPAGNE Soizic, Ingénieur de Recherche, Université de Bordeaux	Invité
Mme. GENY-DENIS Laurence, Professeur des Universités, Université de Bordeaux	Directrice de thèse

À mon grand-père Bernard,

À mes oncles Thierry, Martial et Jeannot,

REMERCIEMENTS

Naturellement, je tiens en premier lieu à remercier ma directrice de thèse, le Professeur Laurence Geny-Denis. Laurence, je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de recherche à tes côtés. Au-delà de toutes les compétences que tu as pu transmettre, de tous les conseils avisés que tu as pu me prodiguer, je tiens à te remercier pour ta passion, ton enthousiasme et ta bienveillance. La confiance que tu m'as accordée me permet aujourd'hui de ressortir grandie de cette expérience. Laurence, trouve ici mes plus sincères remerciements et ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à remercier le Conseil Interprofessionnel des Vins de Bordeaux (CIVB) d'avoir financé ce projet. Je remercie tout particulièrement Monsieur Laurent Charlier pour son suivi au cours de ce travail.

Je remercie également le Conseil Départemental de la Dordogne de m'avoir accordé une bourse de troisième cycle. Trouvez ici l'expression de toute ma gratitude.

Merci à Monsieur Philippe Darriet, directeur de l'Unité de Recherche Œnologie de m'avoir accueillie au sein de son unité, mais également d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Philippe, soyez assuré de toute ma reconnaissance.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame Carine Le Bourvellec, chargé de recherche INRA, et Monsieur Victor de Freitas, professeur à l'université de Porto, qui ont accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements vont également à Madame Chantal Maury, enseignant chercheur à l'ESA d'Angers, qui a accepté d'examiner ce travail.

Soizic, si tu n'avais pas été là, rien de tout cela ne serait arrivé. Je ne sais pas si je serai capable de trouver les mots à la hauteur de ce que je te dois. Cependant, la simplicité du mot merci peut aussi recouvrir des réalités immenses ! Alors, bien au-delà de tous les conseils que tu m'as donnés, j'aimerais te dire merci pour ta générosité, ton optimisme à toute épreuve, ta gentillesse et ta bienveillance. Je suis à la fois fière et heureuse que nos routes se soient croisées, comme quoi le destin est parfois bien fait ! Soizic, MERCI pour tout.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Bordeaux Imaging Center, Etienne, Sébastien et Mélina, une grande partie de ce travail n'aurait pu se faire sans votre aide. Votre soutien scientifique et moral m'ont permis d'aborder toutes les problématiques inhérentes à ce travail de manière beaucoup plus sereine !

Je tiens également à remercier l'Unité Expérimentale Viticole de Bordeaux 1442, INRA, pour la fourniture du matériel biologique de ce travail.

Merci à toutes les personnes du laboratoire Biochimie et Physiologie de la Vigne : Merci Amélie pour tes précieux conseils en biologie moléculaire, et pour la mise au point de SCANPEP. Céline, ta douceur et ta bienveillance m'ont toujours touché, je te remercie pour tous tes conseils de sophrologie, relaxation, détente. Sache que dans les moments les plus difficiles, nos conversations m'ont souvent aidé à remonter la pente ! Audrey, tu tiens si formidablement bien la double casquette de technicienne/psychologue, et rien que pour ça tu mérites bien des lattes vanilles à vie ! Merci d'avoir toujours pris le temps de m'écouter et d'essayer de me comprendre. Emilie, Marie, mes colocataires de bureau, merci pour tous ces beaux moments de partage et de franches rigolades ! Merci à Coraline pour tous ces ballons évaporés, et merci à Bastien d'avoir pris le temps de relire cette thèse. Je tiens également à remercier mes stagiaires, Paul Peronnet et Enzo Naval, merci à vous deux de vous être autant impliqués dans ce travail, ça a été un plaisir de travailler avec vous ! Merci également à Gauthier pour ta bonne humeur et ta joie de vivre (et aussi pour être resté jusqu'à pas d'heure pour trier des pépins), maintenant c'est à ton tour !

J'ai également une petite pensée pour le hall techno, et plus particulièrement pour le professeur Martine Mietton-Peuchot. Martine, merci de m'avoir poussé à passer ce fameux concours, sans vous je n'y serais jamais arrivé. Rémy, Arnaud et Fabrice, merci pour tous ces beaux moments de partage et de rires ! Et puis, Marie et Rémy, merci pour ces moments passés à refaire le monde, à se poser des questions que certainement personne ne s'est jamais posées, à lire le dictionnaire, ou encore à regarder des navets à la télé !

Lebna, merci pour ton professionalisme, ta bonne humeur et ton humour ! Durant ces années, ta capacité à résoudre les problèmes administratifs et ton positivisme m'ont fait chaud au cœur !

J'aimerais bien évidemment remercier mes camarades de fortune, ceux qui ont accepté, pour le meilleur comme pour le pire, de voguer sur les vagues de la recherche, de tâter de la pipette, de laver de l'éprouvette, d'allumer du bec bensun et j'en passe et des meilleures. A vous tous, un grand merci, sans vous cette aventure aurait été beaucoup moins gaie, ça a été un plaisir de travailler avec vous. On est arrivés en tant que collègues et on ressort en tant qu'amis, quel plaisir ! Fannie, Laura et Adeline, des montages photos les plus mal faits en passant par les concours de roulades de piscine, des émissions de Koh-Lanta en passant par les parties de Mario, des fous rires en passant par les crises de larmes, je ne garde que de bons et précieux souvenirs à vos côtés. Delphine et Alicia, que ce soit dans l'eau ou dans la semoule de la recherche, qu'est-ce qu'on a bien pu pédaler ! Merci pour tous ces bons moments de partage, des clubs londoniens au York Shire de Talence, vous avez pour moi de véritables piliers ! Et puis je ne peux pas oublier les autres doctorants et post-doctorants ! Marie (x 3), Syntia, Clément, Mathilde, Juju, je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Et puis, il y a les amis de toujours, de la cour de l'école primaire à la cour du lycée, je ne peux pas ne pas penser à vous aujourd'hui ! Que ce soit le club des pradins, mon petit Guillaume, ma Laura, Mylène, Adrien, Benjamin, ou bien le club des sarladais, Mathou, Nathou, Juju, Gaga, Benito (I DID IT), Guido, Antoine, Gilou, je vous remercie un par un pour tous ces moments de partage et de fous rire. Parce que nos plus belles bêtises sont aujourd'hui nos plus beaux souvenirs, comme dirait l'autre, les copains d'abord !

Mon Gaby, tu mériterais bien un CD dédicacé de Luna Parker (ou de Booba) pour m'avoir supporté ces derniers mois ! Merci d'avoir toujours été là dans les moments durs, merci de m'avoir rassuré et réconforté, merci pour ta patience et tes encouragements, ils ont été bien plus précieux que tu ne le penses.

Enfin, mes derniers mots sont destinés à ma famille, mes très chers grands-parents et parents, ma très chère sœur, Mathilde, et mon très cher frère, Pierre. Je ne saurais assez vous remercier pour votre amour sans failles, votre soutien inconditionnel et votre confiance de tous les instants. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

ARTICLES DANS DES JOURNEAUX INTERNATIONAUX A COMITÉ DE LECTURE

Rousserie P., Rabot A. et Geny-Denis L. 2019. "From Flavanols Biosynthesis to Wine Tannins: What Place for Grape Seeds?". *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **67**(5): 1325-43. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05768

Rousserie P., Lacampagne S., Vanbrabant S., Rabot A., Geny-Denis L., 2019. « Influence of berry ripeness on seed tannin extraction in wine". *Food Chemistry* – sous révision

ARTICLE DANS DES MEDIAS SANS COMITÉ DE LECTURE

Rousserie P., Rabot A. et Geny-Denis L. 2019. "From grape to wine:a focus on seed tannins". *Science&Wine*, https://www.ciencia-e-vinho.com/2019/01/27/

COMMUNICATION ORALE LORS D'UN CONGRÈS INTERNATIONAL

Rousserie P., Lacampagne S., Vanbrabant S., Rabot A., Geny-Denis L., 2019. "Wine tannins: what place for grape seeds?" Oeno-IVAS 2019, 11ème Symposium International d'Oenologie de Bordeaux – 11ème edition du colloque international In Vivo Analytica Scientia, Bordeaux (France), 25-27 Juin 2019.

COMMUNICATIONS ÉCRITES LORS D'UN CONGRÈS INTERNATIONAL

Rousserie P., Lacampagne S., Vanbrabant S., Rabot A., Geny-Denis L., 2019. "Wine tannins: what place for grape seeds?" Oeno-IVAS 2019, 11ème Symposium International d'Oenologie de Bordeaux – 11ème edition du colloque international In Vivo Analytica Scientia, Bordeaux (France), 25-27 Juin 2019.

Rousserie P., Rabot A., Jourdes M., Geny-Denis L. 2018. « New Insight on the phenolic metabolism of grape berry seeds". Macrowine, Saragosse (Espagne), 28-21 Mai 2018.

COMMUNICATIONS ORALES LORS D'UN CONGRÈS NATIONAL

Rousserie P. et Geny-Denis L. 2018. « Impact du changement climatique sur la maturité de la baie, focus sur le métabolisme phénolique des pépins de raisin". 3ème journée des doctorants et post-doctorants de l'ISVV, Villenave d'Ornon (France), 14 Novembre 2018.

Rousserie P., Lacampagne S., Vanbrabant S., Rabot A., Geny-Denis L., 2019. “Wine tannins: what place for grape seeds?” Journée de l’école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Bordeaux, Talence (France), 14 Mai 2019. Prix de la meilleure communication orale.

COMMUNICATION ÉCRITE LORS D’UN CONGRÈS NATIONAL

Rousserie P., Rabot A. et Geny-Denis L. 2018. “Phenolic metabolism of grape seed”. Journée de l’école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Bordeaux, Talence (France), 18 Avril 2018.

TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE 31

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE 37

I. LE PÉPIN DE RAISIN : DÉVELOPPEMENT ET MATURITÉ 39

I.1. Développement de la baie de raisin 39

I.2. Morphologie et anatomie de la baie de raisin et de ses pépins 40

I.3. Développement du pépin de raisin 43

II. LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE LA BAIE DE RAISIN 44

II.1. Les composés non-flavonoïdes 45

II.2. Les composés flavonoïdes 46

III. LES TANINS 48

III.1. Description générale 48

III.2. Les tanins du raisin : pellicules vs pépins 50

IV. LA BIOSYNTHÈSE DES TANINS : DES FLAVANOLS AUX PROANTHOCYANIDINES 51

IV.1. Voie métabolique 51

IV.2. Focus sur les deux enzymes clés de la biosynthèse des flavanols : la leucoanthocyanidine réductase et l'anthocyanidine réductase 54

IV.2.a. La leucoanthocyanidine réductase 54

IV.2.b. L'anthocyanidine réductase 56

IV.3. Régulation de la voie de biosynthèse 57

IV.4. La polymérisation des flavanols 59

V. LES TANINS DE PÉPINS: TRANSPORT ET LOCALISATION 61

V.1. Les voies de transport des composés phénoliques 61

V.2. Localisation des tanins de pépins 64

V.2.a. Localisation tissulaire des tanins 64

V.2.b. Localisation cellulaire des tanins 64

VI. RÔLE ET IMPORTANCE DES TANINS DE PÉPINS DANS LE VIN 66

VI.1. La notion de maturité phénolique 67

VI.2. Les outils d'évaluation de la maturité phénolique du pépin 69

VI.3. Extractibilité des tanins de pépins 70

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES 75

I. MATÉRIEL VÉGÉTAL 77

I.1. Les parcelles 77

I.2. Les millésimes 77

I.2.a. Millésime 2015 ... 78
I.2.b. Millésime 2016 ... 79
I.2.c. Millésime 2017 ... 80
I.2.d. Millésime 2018 ... 82
I.3. Les stades de prélèvements ... 83
I.4. Prélèvements de baies ... 85
I.4.a. Spécifique à l'étude génomique et chimique ... 85
I.4.b. Spécifique à l'étude microscopique ... 85
II. ÉTUDE DES TANINS ... 86
II.1. Les solvants et les réactifs ... 86
II.2. Extraction des tanins de pépins ... 86
II.3. Analyse chromatographique ... 87
II.4. Analyse des flavanols ... 87
II.4.a. Analyse des flavanols du pépin de raisin ... 88
II.4.b. Analyse des flavanols du vin ... 88
II.5. Analyse des tanins condensés ... 88
II.5.a. Principe ... 88
II.5.b. Analyse des tanins condensés du pépin ... 90
II.5.c. Analyse des tanins condensés du vin ... 90
II.5.d. Expression des résultats ... 91
III. ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE ... 92
III.1. Les solvants et les réactifs ... 92
III.2. Extraction des ARNs totaux ... 93
III.3. Élimination de l'ADN génomique des extraits d'ARN ... 94
III.3.a. Traitement à la DNAse ... 94
III.3.b. Vérification de l'efficacité du traitement à la DNAse ... 95
III.4. Quantification et vérification de l'intégrité des ARNs ... 95
III.4.a. Quantification des ARNs totaux ... 95
III.4.b. Pureté et qualité des ARNs totaux ... 96
III.5. Synthèse des ADNc complémentaires ... 96
III.6. Étude de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel ... 97
III.6.a. Principe ... 97
III.6.b. Design des amorces de qPCR ... 98
III.6.c. PCR quantitative en temps réel ... 100
III.6.c.i) Sélection des gènes de normalisation ... 100
III.6.c.ii) Expression des résultats ... 101
IV. ÉTUDE DE LA LOCALISATION DES TANINS DE PÉPINS ... 102
IV.1. Détermination du lieu de biosynthèse des tanins de pépins ... 102
IV.1.a. Préparation des échantillons ... 102

IV.1.a.i) Inclusion des échantillons 103
IV.1.a.ii) Coupes 104
IV.1.b. Immunomarquages 104
IV.1.b.i) Synthèse des anticorps 104
IV.1.b.ii) Vérification de la spécificité des anticorps primaires polyclonaux 106
IV.1.b.iii) Protocole d'immunomarquage 110
IV.1.c. Contraste et observation des coupes au microscope électronique à transmission 111
IV.2. Localisation des tanins de pépins 112
IV.2.a. Préparation du matériel végétal 112
IV.2.a.i) Fixation des échantillons 112
IV.2.a.ii) Cryoprotection des tissus 112
IV.2.a.iii) Inclusion et congélation des pépins 112
IV.2.a.iv) Coupes 113
IV.2.b. Observations des coupes 113
IV.2.b.i) Observation au scanner de lames - NanoZoomer 113
IV.2.b.ii) Observation en microscopie confocale 114
IV.2.c. Mise au point de la méthode expérimentale 114
V. ÉTUDE DE L'EXTRACTIBILITE DES TANINS DE PÉPINS 117
V.1. Design expérimental 118
V.2. Méthode d'échantillonage 120
V.2.a. Analyse de la composition phénolique 120
V.2.b. Observations des levures de fermentation au scanner de lame 120
VI. ANALYSE STATISTIQUE 121

CHAPITRE III : CARACTÉRISATION ET LOCALISATION DES TANINS DE PÉPINS DE RAISIN 123

I. CARACTÉRISATION DES TANINS DE PÉPINS AU COURS DE LEUR DÉVELOPPEMENT 126
I.1. Caractérisation des flavanols 126
I.2. Caractérisation des tanins condensés 133
I.2.a. Teneurs 133
I.2.b. Étude structurale 139
I.2.b.i) Degré de polymérisation moyen (DPm) 139
I.2.b.ii) Le pourcentage de galloylation (% G) 140
I.2.b.iii) Les sous-unités terminales et les sous-unités d'extension 142
I.3. Conclusion 144
II. ÉTUDE COMPLÉMENTAIRE : CARACTÉRISATION FINE DES TANINS DE PÉPINS DE MERLOT 144
II.1. Caractérisation des flavanols 145
II.2. Caractérisation des tanins condensés 147
II.3. Conclusion 150

III. LOCALISATION CELLULAIRE DES TANINS DE PÉPINS 151
III.1. Localisation tissulaire des tanins au sein du pépin 152
III.2. Localisation cellulaire des tanins 155
III.3. Conclusion 156
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE 157
V. CONCLUSION GÉNÉRALE 162

CHAPITRE IV : CARACTÉRISATION ET LOCALISATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES TANINS DE PÉPINS DE RAISIN 165

I. ÉTUDE DES ENZYMES CLES DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES FLAVANOLS 168
I.1. La leucoanthocyanidine réductase (LAR) 168
I.2. Étude de l'expression des gènes VvLAR1 et VvLAR2 168
I.2.a. Liaison entre l'expression des gènes VvLAR1 et VvLAR2 et les teneurs en catéchine des pépins de raisin 172
I.3. L'anthocyanidine réductase (ANR) 176
I.3.a. Étude de l'expression du gène VvANR 176
I.3.b. Liaison entre l'expression du gène VvANR et la teneur en épicatéchine des pépins de raisin . 179
I.4. Conclusion 181
II. LOCALISATION CELLULAIRE DES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA BIOSYNTHÈSE DES FLAVANOLS DU PÉPIN DE RAISIN 182
II.1. Planches d'images 183
II.2. Ultrastructure 200
II.3. Localisation cellulaire de la protéine LAR1 201
II.4. Localisation de la protéine LAR2 202
II.5. Localisation de la protéine ANR 202
II.6. Conclusion 202
III. DISCUSSION GÉNÉRALE 203
IV. CONCLUSION GÉNÉRALE 210

CHAPITRE V : ÉTUDE DE L'EXTRACTIBILITÉ DES TANINS DE PÉPINS DE RAISIN EN FONCTION DE LA DATE DE RÉCOLTE 211

I. CARACTÉRISATION DES BAIES 214
I.1. Niveau de maturité 214
I.2. Teneurs en tanins des pépins frais 215
II. « APPARITION » DES TANINS DANS LE VIN AU COURS DES ÉTAPES DE LA VINIFICATION 217
II.1. Influence du compartiment de la baie 217
II.2. Influence du niveau de « maturité » des pépins 219

II.3. Conclusion *222*
III. ÉVOLUTION DE LA TENEUR INTRINSÈQUE EN TANINS DES PÉPINS AU COURS DE LA VINIFICATION 223
III.1. Résultats *223*
III.2. Conclusion *227*
IV. ÉTUDE DU LIEN PROBABLE ENTRE LES TENEURS FINALES EN TANINS DANS LES VINS DE PÉPINS EN FONCTION DU POTENTIEL D'EXTRACTIBILITE DES TANINS DE PÉPINS 227
IV.1. Résultats *227*
IV.2. Conclusion *231*
V. DISCUSSION GÉNÉRALE 231
VI. CONCLUSION GÉNÉRALE 234

CHAPITRE VI : VERS UN NOUVEL OUTIL D'ÉVALUATION DE LA MATURATION DU PÉPIN DE RAISIN : SCANPEP 237

I. SCANPEP : COMMENT ÇA FONCTIONNE ? 242
II. LIEN ENTRE L'INDICE SCANPEP ET LES TENEURS INTRINSÈQUES EN TANINS DES PÉPINS DE RAISINS 245
III. LIEN ENTRE L'INDICE SCANPEP ET L'EXTRACTIBILITE DES TANINS DE PEPINS DANS LE VIN ……..247
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE 252
V. CONCLUSION GÉNÉRALE 253

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 255

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 267

ANNEXES 291

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% G	Pourcentage de Galloylation
4CL	4-Coumarate-Coenzyme A Ligase
A	Albumen
AA	Acide aminé
ABA	Acide abscissique
ACC	Acétyl-CoA Carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ANR	Anthocyanidine Réductase
ANS	Anthocyanine Synthase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine tri-phosphate
AVI	Inclusions vacuolaires contenant des anthocyanes
BET	Bromure d'éthidium
bHLH ou MYC	Basic helix-loop-helix
BLT	Bilitranslocase
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Catéchine
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase
CHI	Chalcone Isomérase
CHS	Chalcone Synthase
CMC	Carboxyméthylcellulose
CoA	Coenzyme A
C-P	Catéchine-phloroglucinol
Cu	Cuticule
Cys-C	4β-(*S*-cystéinyl)-catéchine
Cys-EC	4β-(*S*-cystéinyl)-épicatéchine
Cyt	Cytoplasme
DEPC	Pyrocarbonate d'éthyle
DFR	Dihydroflavonol Réductase
DMACA	*p*-dimethylaminocinamaldehyde
DNAse	Désoxyribonucléase
dNTP	Désoxyribunucléotide triphosphate
DPm	Degré de polymérisation moyen
DTT	Dithiothréitol
DV	Début Véraison
E	Embryon
E/O	Est-Ouest
EA	Potentiel d'extractibilité des anthocyanes
EBG	Early Biosynthetic Genes
EC	Épicatéchine
ECG	Épicatéchine Gallate
ECG-P	Épicatéchine gallate-phloroglucinol
EC-P	Épicatéchine-phloroglucinol
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EGC	Épigallocatéchine

EGC-P	Épigallocatéchine-phloroglucinol
Ep	Epiderme
F3’5’H	Flavonoïde 3’5’-Hydroxylase
F3’H	Flavonoïde 3’-Hydroxylase
F3H	Flavanone 3-hydroxylase
FG	Fermeture de grappe
Fin FA	Fin fermentation alcoolique
Fin Macé	Fin macération post fermentaire
FITC	Fluorescéine Iso Thio Cyanate
FV	Fin Véraison
GST	Glutathion-S-transférase
H_2SO_4	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorydrique
HHDP	Acide hexahydroxydiphénique
HPF	Congélation haute pression
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
IFR	Isoflavone réductase
JAA	Jour après anthèse
LAR	Leucoanthocyanidine Réductase
LBG	Late Biosynthetic Genes
M	Maturité
MF	Matière Fraîche
Mi FA	Mi fermentation alcoolique
Mi Macé	Mi macération post fermentaire
MP%	Pourcentage de Maturité du pépin
MYB	Myeloblastome
N	Noyau
N/S	Nord/Sud
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
P	Paroi cellulaire
PAL	Phénylalanine Ammonolyase
PAs	Proanthocyanidines
PBS	Tampon phosphate salin
PCBER	Phénylcoumaran benzylique éther réductase
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PEG 4000	Polyéthylène glycol 4000
PFTE	Polytétrafluoroéthylène
Pl	Plaste
PLR	Pinorésinol-laricirésinol réductase
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PPO	Polyphénol Oxydase
PVPP	Poly(vinylpolypyrrolidone)
RE	Réticulum Endoplasmique
RGB	Rouge Vert Bleu
RNAse	Ribonucléase
RPM	Rotation par minute
RPT	Richesse polyphénolique totale
RT	Transcriptase inverse
RTS	Room Temperature Stable
SDR	Déshydrogénase/Réductase à chaine courte
SDS	Sodium dodécyl sulfate

SM	Surmaturité
STS	Stilbène Synthase
T	Tonoplaste
Tes	Testa
Ta	Tanin
TAE	Tris-Acétate-EDTA
Teg	Tegmen
Ti	Tégument interne
TRITC	Tetramethylrhodamine
TT	Transparent Testa
UA	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
V	Vacuole
VeT	Vésicule tanique
VST	Vacuole sans tanins
VT	Vacuole tanique
WD40 ou WDR	Tryptophan-aspartic acid repeat

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Courbe de développement de la baie de raisin 39
Figure 2 : Représentation schématique de la structure générale d'une baie de raisin, ... 41
Figure 3 : Représentation schématique d'un pépin de raisin, A face ventrale, B phase dorsale 42
Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe de pépin de raisin à maturité, A coupe longitudinale, B coupe transversale 42
Figure 5 : Courbe de développement du pépin de raisin 43
Figure 6 : Structure générale des stilbènes 46
Figure 7 : Structure générale des flavonoïdes 47
Figure 8 : Les différentes classes de flavonoïdes 47
Figure 9 : Structure chimique des flavanols 48
Figure 10 : Les liaisons inter-flavonoïdes de type A (A) et de type B (B) 49
Figure 11 : Voie de biosynthèse des composés phénoliques 52
Figure 12 : Réaction catalysée par la leucoanthocyanidine réductase (LAR) 54
Figure 13 : Réaction catalysée par l'anthocyanidine réductase (ANR) 56
Figure 14 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biosynthèse des flavanols de la baie de raisin 58
Figure 15 : Les potentielles voies de polymérisation des flavanols 59
Figure 16 : Représentation schématique de la régulation des ratios Cys-Catéchine/Catéchine et Cys-Epicatéchine/Epicatéchine par LAR : implication dans le contrôle de la polymérisation des sous-unités flavanols 61
Figure 17 : Représentation schématique des différentes voies de transport cellulaire des flavonoïdes 62
Figure 18 : Les différents types de cellules à vacuoles taniques ou non taniques selon Park (1995) 65
Figure 19 : Les différents types de vacuoles taniques selon Park (1995) 65
Figure 20 : Les principaux types de cellules à tanins selon Park (1995) 66
Figure 21 : Échelle de couleur du pépin de raisin en fonction de son développement, d'après Ristic & Iland, 2005 70
Figure 22 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2015 79
Figure 23 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2016 80
Figure 24 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2017 82
Figure 25 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2018 83
Figure 26 : Plan expérimental de l'étude des tanins 86
Figure 27 : Principe de la réaction de phloroglucinolyse 89
Figure 28 : Plan expérimental de l'étude transcriptomique 92

Figure 29 : qPCR en temps réel : principe du Sybr Green® 97
Figure 30 : Variation de l'expression des gènes de ménage..... 101
Figure 31 : Plan expérimental de l'étude de la localisation des enzymes LAR1, LAR2 et ANR responsables de la synthèse des flavanols 102
Figure 32 : Préparation des pépins à la cryofixation : plan de coupe 103
Figure 33 : Blast du peptide immunogène dirigé contre la protéine LAR 1 (A), contre la protéine LAR 2 (B) et contre la protéine ANR (C) 105
Figure 34 : Montage du transfert de protéine sur membrane de nitrocellulose 108
Figure 35 : Western-blot sur protéines extraites de fleurs, ligne 2, et de pellicules de baies vertes, lignes 3 et 4 de Cabernet Sauvignon, d'après Lacampagne (2010)..... 109
Figure 36 : Technique de congélation rapide par immersion directe dans de l'isopentane..... 113
Figure 37 : Protocole d'inclusion des composés phénoliques de pépin et de vin rouge sur des précouches de filtration 114
Figure 38 : Spectres d'émission de la lignine et de la chlorophylle après excitation avec des sources laser standard de microscope confocal à neuf longueurs d'onde différentes Le spectre de la lignine est représenté en pointillé et celui de la chlorophylle en trait plein..... 116
Figure 39 : Observations de la « précouche vin » (A), de la « précouche tanins de pépin » (B) et d'une coupe de pépin Cabernet Sauvignon à Fermeture de Grappe millésime 2017 en microscopie confocale (C) (laser 488 nm)..... 116
Figure 40 : Observations des « précouche seule » (A), « précouche vin » (B) et « précouche tanins de pépins » (C) au scan de lame sous filtre FITC 117
Figure 41 : Design expérimental des nanovinifications 118
Figure 42 : Méthode d'échantillonnage mise en place au cours des nanovinifications..... 120
Figure 43 : Évolution de la teneur en flavanols libres, exprimée en mg/g de MF, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017 128
Figure 44 : Évolution de la teneur en flavanols libres, exprimée en µg/pépin, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017. 129
Figure 45 : Évolution de la teneur en flavanols libres, exprimée en µg/baie, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017 130
Figure 46 : Évolution de la teneur en proanthocyanidines, exprimée en mg/g MF de pépin, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017 134

Figure 47 : Évolution de la teneur en proanthocyanidines, exprimée en mg/pépin, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017 135
Figure 48 : Évolution de la teneur en proanthocyanidines, exprimée en mg/baie, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017 136
Figure 49 : Évolution du bilan hydrique au cours de l'année 2017 en comparaison avec les années 2015 et 2016 138
Figure 50 : Évolution du pourcentage de galloylation (% G) des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon, et Merlot en 2015, 2016 et 2017 141
Figure 51 : Caractérisation des unités d'extension et des unités terminales des proanthocyanidines, exprimées en mg/g de MF, des pépins de Sauvignon Blanc, Tannat, Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017..... 143
Figure 52 : Évolution de la teneur en flavanols libres des pépins issus des baies de Merlot en 2018, exprimée en mg/g de MF de pépin (A), en µg/pépin (B), en µg/baie (C). 146
Figure 53 : Évolution de la teneur en tanins condensés des pépins issus des baies de Merlot en 2018, exprimée en mg/g de MF de pépin (A), en mg/pépin (B), en mg/baie (C). 148
Figure 54 : Évolution du pourcentage de galloylation (A), des teneurs en unités terminales (B) et des teneurs en unité d'extension (C) des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018. 150
Figure 55 : Observation au Scan de lame de l'autofluorescence des tanins dans les pépins de Merlot du millésime 2018 aux stades 21 JAA, 28 JAA et 37 JAA 153
Figure 56 : Observation au Scan de lame de l'autofluorescence des tanins dans les pépins de Merlot du millésime 2018 aux stades 57 JAA, 79 JAA et 93 JAA. 154
Figure 57 : Observation de l'auto-fluorescence des parois cellulaires des cellules de l'albumen des pépins à 57 JAA (A) et 79 JAA (B) 155
Figure 58 : Mécanisme potentiel de l'évolution de la localisation des tanins de pépins au cours du développement de la baie 157
Figure 59 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimées en unité arbitraire (UA), dans les pépins issus des baies de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot des millésimes 2015, 2016 et 2017. 169
Figure 60 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimées en unité arbitraire (UA), dans les pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018. 171
Figure 61 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimée en unité arbitraire (UA) et de la teneur en catéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Sauvignon blanc et Tannat au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017. 173

Figure 62 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimée en unité arbitraire (UA) et de la teneur en catéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Cabernet Sauvignon et Merlot au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017. 174
Figure 63 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimée en unité arbitraire (UA) et de la teneur en catéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018..... 175
Figure 64 : Évolution de l'expression relative du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA) des pépins issus des baies de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017..... 177
Figure 65 : Évolution de l'expression relative du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA), des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018..... 178
Figure 66 : Évolution de l'expression du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA), et de la teneur en épicatéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017. 180
Figure 67 : Évolution de l'expression du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA), et de la teneur en épicatéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018. 181
Figure 68 : Le transport cellulaire des tanins selon Brillouet et al., 2014 207
Figure 69 : Cinétiques d'apparition des tanins dans la matrice vin, exprimée en g/L, en fonction des compartiments de la baie utilisés pour la vinification : pépins (A), pellicules (B), et baies entières (C), et pour 3 dates de vendanges (sous-maturité, maturité, sur-maturité) 218
Figure 70 : Représentation schématique de la diminution de la surface de contact du pépin avec le jus en lien avec le ratio pépin/jus 222
Figure 71 : Evolution de la teneur en tanins condensés des pépins de raisin (exprimée en mg/g de pépin) et pourcentage de « vidange» des tanins de pépins, au cours de la vinification en fonction de la date de vendange..... 225
Figure 72 : Evolution de la teneur en PAs des pépins de Merlot 2018, exprimée en mg/g de pépin, et de la teneur en PAs des vins de pépins, exprimée en g/L, au cours de la vinification 228
Figure 73 : Représentation schématique des types de tanins de pépins dans le pépin et dans le vin en fonction de leur capacité d'extractibilité 229
Figure 74 : Observations au Scan de lames des levures de fermentation du vin de pépins à différentes étapes de la vinification sous filtre FITC (A : Mi FA ; B : Fin FA ; C : Mi Macé ; D : Fin Macé), Barre = 250 µm..... 230
Figure 75 : Représentation schématique des éléments clés de la maturité phénolique du pépin de raisin selon l'idée des professionnels 240
Figure 76 : Principe de fonctionnement de ScanPep..... 243

Figure 77 : Evolution de l'indice SCANPEP au cours des millésimes 2017 et 2018 pour les parcelles du réseau maturité de l'ISVV 244
Figure 78 : Représentation schématique de la corrélation entre les teneurs en flavanols totaux (A) ou en proanthocyanidines (B) et l'indice SCANPEP pour l'ensemble des stades étudiés en 2017 et 2018 246
Figure 79 : Profil d'évolution de la maturité des pépins des deux parcelles d'essai : la parcelle précoce M+ et la parcelle tardive M- 248
Figure 80 : Profil d'évolution de la teneur en flavanols des vins, exprimée en mg/L au cours de la vinification pour 3 dates de récoltes et pour 2 parcelles à maturité contrastée. 249
Figure 81 : Représentation schématique de corrélation entre les teneurs en proanthocyanidines (colonne de gauche) et en flavanols totaux (colonne de droite) et l'indice SCANPEP à chaque étape de la vinification 251

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les acides phénols du raisin et du vin 45
Tableau 2 : Les principales formes de flavanols 48
Tableau 3 : Caractéristiques des parcelles d'études 77
Tableau 4 : Dates de mi-floraison, mi-véraison et récoltes des millésimes 2015, 2016, 2017 et 2018 dans le bordelais. 78
Tableau 5 : Températures moyennes, heures d'ensoleillement et précipitations des millésimes 2015, 2016, 2017 et 2018 dans le bordelais. Normales calculées à partir des données météo de 1981 à 2010. 78
Tableau 6 : Dates des prélèvements des baies issues de la parcelle « expérimentale » de l'INRA au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017 84
Tableau 7 : Dates des prélèvements des baies de Merlot issues de la parcelle « commerciale » au cours du millésime 2018 85
Tableau 8 : Gradient d'élution pour l'analyse des tanins 87
Tableau 9 : Equations des courbes de calibration des standards de C, EC, ECG et EGC 88
Tableau 10 : Composition du mix réactionnel de la PCR qualité 95
Tableau 11 : Composition du mix réactionnel pour la synthèse d'ADNc à partir de 200 ng d'ARNs dénaturés 97
Tableau 12 : Composition du mix réactionnel de la qPCR 99
Tableau 13 : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative en temps réel 100
Tableau 14 : Caractéristiques des protéines LAR 1, LAR 2 et ANR étudiées en immunomarquage 104
Tableau 15 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la localisation des protéines LAR1, LAR2 et ANR 110
Tableau 16 : Protocole détaillé de l'immunomarquage réalisé à l'aide d'un automate : étape, solutions, temps de contact et objectif de chaque étape 111
Tableau 17 : Caractéristiques physiologiques des lots de baies de Merlot 2018 vendangées au stade sous-maturité, maturité et surmaturité 119
Tableau 18 : Teneur en flavanols libres, à maturité et surmaturité, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017. 132
Tableau 19 : Poids d'un pépin et nombre de pépins par baie pour le Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017 132
Tableau 20 : Teneur en proanthocyanidines à maturité et surmaturité, exprimée en mg/g de MF, en mg/pépin et en mg/baie, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017. 137

Tableau 21 : Représentation des différences significatives entre les DPm des PAs des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017 139
Tableau 22 : Tableau récapitulatif des localisations cellulaires des enzymes LAR et ANR en fonction du stade de développement des pépins..... 203
Tableau 23 : Caractéristiques biochimiques des baies de Merlot 2018 vendangées à 3 dates différentes..... 215
Tableau 24 : Teneurs en flavanols et proanthocyanidines, exprimées en mg/g de pépins frais, des pépins de Merlot 2018 aux 3 dates de prélèvement. 216
Tableau 25 : Ratios marc /jus des nanovinifications aux trois dates de récolte 221
Tableau 26 : Evolution des teneurs en flavanols et PAs, exprimées en mg/g de pépin, des pépins de Merlot du millésime 2018 au cours de la vinification en fonction de la date de récolte..... 224
Tableau 27 : Caractérisation des sous-unités d'extension et terminales, exprimée en %, des tanins de pépins de Merlot du millésime 2018 au cours de la vinification en fonction de la date de vendange 226
Tableau 28 : Indices SCANPEP des pépins de Merlot du millésime 2017 et 2018..... 245

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Les méthodes d'évaluation de la maturité phénolique des raisins

Annexe 2 : Script informatique du logiciel ScanPep

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La production de vin de qualité constitue un enjeu économique de taille pour la France. A titre d'exemple, le secteur vitivinicole représente près de 290 000 emplois, et en 2016 les exportations de vin ont rapporté près de huit milliards d'euros, faisant de la filière le deuxième secteur excédentaire de la balance commerciale (Durand, 2016; Cardebat, 2017). À l'heure de la mondialisation, le vin est devenu un produit mondial, consommé sur tous les continents, touchant des pays, des populations, des classes d'âges et des classes sociétales totalement nouveaux. La mondialisation ne touche pas exclusivement la consommation de vin, mais également sa production. Ainsi, par vagues successives, de nouveaux pays producteurs ont émergé, faisant évoluer le marché du vin vers une concurrence exacerbée, poussant les producteurs à élaborer des stratégies de différenciation toujours plus poussées. Ainsi, même si le vin français reste une référence en termes de savoir-faire, de raffinement et de qualité, les enjeux de demain obligent les acteurs de la filière à maintenir, et à améliorer le potentiel de leur vignoble en qualité et en quantité. Or, comme le disait Émile Peynaud, « pour faire du bon vin, il faut d'abord du bon raisin, et ce n'est pas simple altruisme » (Peynaud, 1996).

La constitution du raisin prédispose la constitution du futur vin, et par analogie, la qualité du futur vin sera fortement dépendante de la qualité du raisin. Les critères déterminant la qualité d'un raisin reposent en partie sur son contenu en composés d'intérêt œnologique (sucres, acides, arômes et composés phénoliques) et leur capacité d'extraction dans la matrice vin. Ces composés s'accumulent au cours du développement du fruit dans chacun des tissus constituant la baie : la pellicule, le pépin et la pulpe, et permettent de définir le niveau de maturité œnologique du raisin.

La maturité œnologique du raisin, qui permet d'évaluer la qualité de la vendange, correspond à un état d'équilibre entre différents types de maturités : la maturité technologique, la maturité aromatique, la maturité texturale et enfin la maturité phénolique. Ainsi, afin d'obtenir un raisin de qualité, chacun de ces éléments doit être pris en compte et la date de la récolte dépendra en partie du niveau atteint par chacune de ces maturités.

La maturité phénolique de la baie correspond à la teneur en composés phénoliques de la baie, mais également à leur potentiel d'extractibilité qui définira leur diffusion dans le vin. A ce titre, cette notion de maturité phénolique renvoie à la teneur en anthocyanes, contenues dans les pellicules de la baie, et à la teneur en tanins, localisés à la fois dans la pellicule et dans le pépin de raisin. Durant la première phase de croissance de la baie, les tanins s'accumulent au sein de la pellicule et du pépin de raisin, puis au cours de la seconde phase de croissance, une diminution nette de leurs teneurs est observée dans le pépin. Même si ce phénomène de maturité phénolique commence à être bien connu pour les parties charnues de la baie, très peu de travaux ont été menés sur les pépins de raisin. Or, la teneur en tanins des pépins de raisin pouvant être jusqu'à dix fois supérieure à celle de la pellicule, ils représentent une part importante des tanins présents dans le vin et influent donc sur les qualités organoleptiques du vin produit. La maîtrise de leur évolution au cours de la maturation du fruit ainsi

que de leur extraction durant la vinification constitue donc des étapes clés impactant de manière significative la qualité du vin fini.

L'objectif global de ce travail de recherche est de caractériser le métabolisme phénolique des pépins de raisins tout au long du développement de la baie afin de pouvoir définir de manière fiable, simple et concrète la notion de maturité phénolique du pépin dans le but d'identifier le meilleur moment pour la récolte ainsi que les paramètres à mettre en œuvre pendant la vinification. Afin de répondre à cette problématique, ce projet s'articule autour de trois grands axes qui sont :

- La description fine de la composante tanique des pépins grâce à une approche analytique et microscopique permettant d'identifier leurs structures chimiques ainsi que de les localiser au sein des différents tissus du pépin au cours de son développement ;
- La définition de la voie de biosynthèse et de ses mécanismes au cours du développement de la baie grâce à des approches moléculaires et enzymatiques ;
- La caractérisation de leur potentiel d'extractibilité en fonction du niveau de maturité de la baie. Cette approche, plutôt « pratique » a pour objectif de développer des indicateurs et des outils d'aide à la décision pour mieux orienter le vinificateur dans ses choix de dates de vendanges et de pratiques œnologiques afin de tirer le meilleur parti des tanins de pépins. Ainsi, a été développé au cours de ce travail, un nouvel indicateur appelé SCANPEP visant à caractériser la maturité des pépins en lien avec leur composante tanique et l'extractibilité de ces composés.

Ce manuscrit sera présenté en sept principaux chapitres. Après avoir réalisé une étude bibliographique visant à présenter l'état de l'art sur le sujet et présenté l'ensemble des approches expérimentales utilisées, ce mémoire s'articulera autour de quatre chapitres de résultats visant chacun à répondre aux axes cités ci-dessus.

Le premier chapitre de résultats s'attachera, à partir d'une approche analytique et microscopique, à (1) réaliser une description fine de l'évolution de la composante tanique des pépins au cours de leur développement et à (2) localiser ces composés dans les différents compartiments des pépins.

Le second chapitre de résultats étudiera l'évolution de l'expression des gènes codant pour les enzymes clés de la voie de biosynthèse des flavanols (la leucoanthocyanidine réductase et l'anthocyanidine réductase), ainsi que leur localisation subcellulaire dans le pépin afin d'émettre des hypothèses sur le schéma métabolique et ses potentielles régulations.

Le troisième ainsi que le quatrième chapitre, auront une portée plus pratique. Ils ont pour objectifs respectifs l'étude de l'extractibilité des tanins de pépins dans le vin en fonction de la date de récolte et

la validation d'un nouvel outil permettant de qualifier la notion de maturité phénolique du pépin (SCANPEP).

Enfin, nous proposerons une conclusion générale visant à (1) apporter un éclairage nouveau sur le métabolisme phénolique des pépins et la notion de maturité du pépin et (2) proposer des pistes d'outils d'aide à la décision qui pourraient à terme être intégrés dans des modèles d'itinéraires techniques de choix de date de vendanges et de procédés de vinification.

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le pépin de raisin : développement et maturité

I.1. Développement de la baie de raisin

La baie de raisin est un fruit charnu à pépins et son développement est dépendant de la présence ou non de pépins viables. En effet, une absence de fécondation entraînera systématiquement de la coulure, et une mauvaise fécondation entrainera du millerandage. Ainsi, pour qu'une baie se développe normalement, au minimum un ovule doit avoir été fécondé (Carbonneau et al., 2015). Dans le cas d'un développement normal, la croissance de la baie suit une courbe en double sigmoïde (Coombe et al., 2000). On dénombre ainsi deux phases de croissance active séparées par un plateau: la phase de croissance herbacée, le plateau herbacé et la phase de maturation (Staudt et al., 1986) (**Figure 1**).

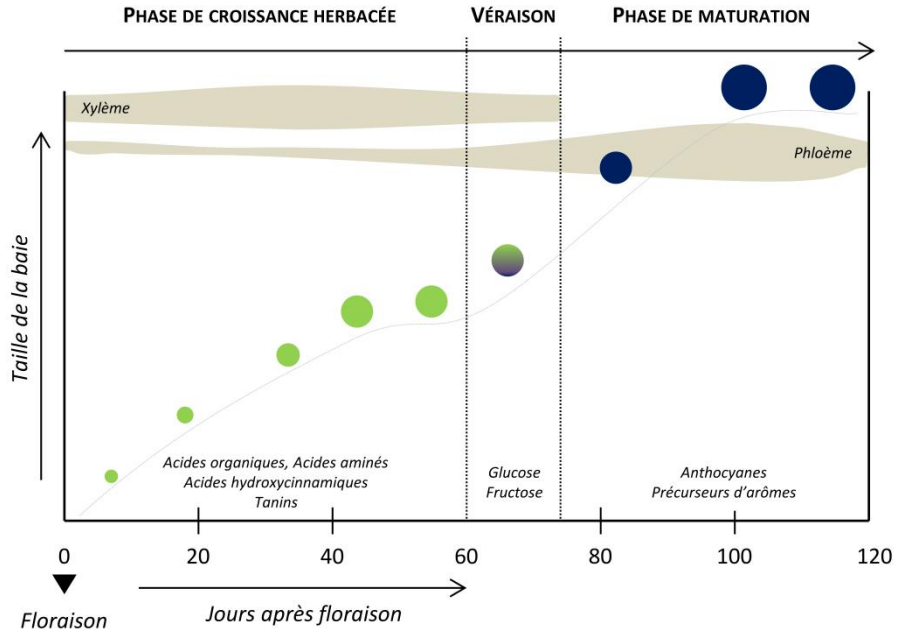


Figure 1 : Courbe de développement de la baie de raisin
Schéma adapté de Coombe et MacCarthy, 2000 et Kennedy, 2002

La phase de croissance herbacée, qui dure entre 45 et 65 jours selon le cépage et les conditions environnementales, débute à la nouaison suivant immédiatement la fécondation. Durant cette période, la baie et les embryons présents dans les pépins de raisin se forment. Avec un pic atteint au huitième jour après la floraison, les premières semaines de cette phase sont le lieu de nombreuses divisions cellulaires, à l'origine de l'augmentation du volume de la baie. Lors de cette phase, la forte activité photosynthétique favorise la synthèse et l'accumulation de nombreux composés tels que les acides organiques (tartrique et malique), les acides hydroxycinnamiques, les acides aminés, et les tanins. Afin d'assurer le bon fonctionnement cellulaire, l'eau, les éléments minéraux ainsi que le saccharose, transportés respectivement par le xylème et la sève phloémienne, sont métabolisés par la baie. La fin

de cette période de croissance végétative est caractérisée par un ralentissement de la croissance et un arrêt de l'évolution du nombre de cellules (Carbonneau et al., 2015).

À l'issue de cette première phase de croissance, la baie est ferme et de couleur verte en raison de la forte présence de chlorophylle, pigment prédominant de la baie à cette période de son développement.

Le plateau herbacé est une phase de ralentissement de la croissance séparant la croissance herbacée du murissement du fruit. Cette étape, dont la durée dépend des conditions environnementales et du cépage, prépare l'induction de la véraison (Ojeda, 1999; Ollat et al., 2002).

La phase de maturation, qui dure entre 35 et 65 jours, débute par la véraison et se termine à la récolte des baies. La véraison se caractérise par un changement de couleur des baies, qui passent du vert au rouge dans le cas de cépages rouges et de vert au jaune dans le cas de cépages blancs. Ce phénomène, qui s'échelonne entre huit et quinze jours au niveau d'une même grappe, est marqué essentiellement par quatre phénomènes physiologiques importants (Carbonneau et al., 2015; Ollat et al., 2002) :

- la diminution de l'acidité totale de la baie ;
- l'accumulation en eau et en sucres, issus de la photosynthèse et de la transformation de l'acide malique en sucres réducteurs, apportés par la sève phloémienne vers les cellules de la pulpe ;
- le début de la synthèse des anthocyanes, pigments responsables de la couleur rouge de la baie ;
- le ramollissement du fruit et l'affinement de la pellicule.

Après la véraison, le xylème perd sa fonctionnalité, et l'essentiel des transports durant la maturation des raisins est assuré par le phloème. Durant cette phase, l'accumulation des sucres et de l'eau conduit à une augmentation du volume cellulaire, autorisé par le relâchement des parois cellulaires au niveau de la pulpe et de la pellicule (Deytieux-Belleau et al., 2008). Ainsi la taille, le diamètre et le volume de la baie vont considérablement augmenter. Durant cette période, le fruit sera plus sensible aux pourritures, et ce paramètre pourra être intégré dans le choix de la date de vendanges (Ribéreau-Gayon et al., 2017; Williamson et al., 2007). La phase de maturation sera également caractérisée par l'accumulation d'autres molécules essentielles à la qualité du vin telles que les arômes et précurseurs d'arômes.

I.2. Morphologie et anatomie de la baie de raisin et de ses pépins

La coupe longitudinale d'un raisin frais à maturité permet de déterminer la structure générale du fruit **(Figure 2**). Anatomiquement, la baie de raisin est composée d'un péricarpe, qui constitue la

partie charnue de la baie, et de graines appelées pépins. Au centre du fruit, on retrouve les deux loges de l'ovaire devenues deux cavités logeant les pépins. Ces deux loges sont séparées par un tissu central appelé columelle. Le péricarpe est constitué de trois tissus distincts qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur : l'épicarpe ou pellicule, le mésocarpe ou pulpe et l'endocarpe qui est la paroi très mince des loges contenant les pépins.

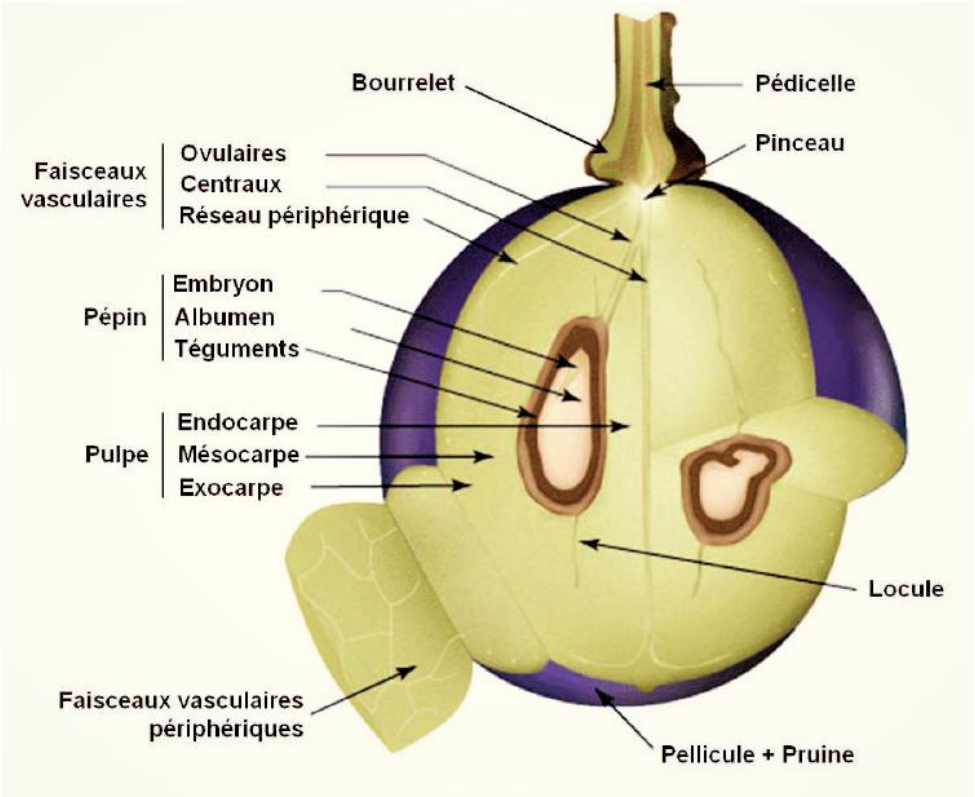


Figure 2 : Représentation schématique de la structure générale d'une baie de raisin, Schéma d'après Coombe, 1987

Oenologiquement, la baie de raisin à maturité est divisée en trois parties distinctes :

- La pellicule, représentant environ 10 à 15 % du poids de la baie, qui peut être divisée en deux parties qui sont l'épiderme (tissu le plus externe) et l'hypoderme (tissu le plus interne). L'épiderme est recouvert d'une cuticule composée d'exsudats issus de sa paroi et forme une couche cireuse à l'extérieur des cellules.
- La pulpe, pouvant représenter jusqu'à 80 % du poids de la baie et qui est composée de 25 à 30 couches cellulaires.
- Les pépins, ne représentant qu'environ 6 % du poids de la baie et qui contiennent et protègent l'embryon.

Morphologiquement, la forme générale du pépin peut être comparée à celle d'un « cœur », avec à sa base un « bec » appelé bec micropylaire (**Figure 3**). Il comporte deux faces : une face ventrale et

une face dorsale. Sur sa face ventrale se trouve une ligne médiane longitudinale facilement distinguable, correspondant au raphé. De part et d'autre du raphé, les flancs du pépin se creusent en deux fossettes symétriques. Sur sa face dorsale, on aperçoit un bref prolongement du raphé qui aboutit à un mamelon, appelé chalaze. La forme de la chalaze, qui se situe généralement au tiers supérieur du pépin chez *Vitis vinifera*, ainsi que la longueur du raphé, sont des caractères distinctifs des cépages (Carbonneau et al., 2015 ; Fournioux et al., 2011 ; Pacottet, 2012).

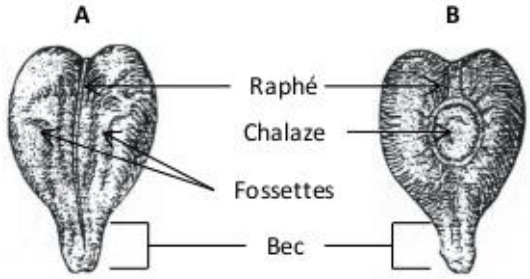


Figure 3 : Représentation schématique d'un pépin de raisin, A face ventrale, B phase dorsale
Schéma adapté de Ristic et Iland, 2005

Structuralement, le pépin est divisé en trois parties qui sont les téguments, l'albumen et l'embryon **(Figure 4**). Les téguments forment l'enveloppe externe du pépin et jouent essentiellement un rôle de protection. Ces téguments sont au nombre de deux : le tégument externe et le tégument interne.

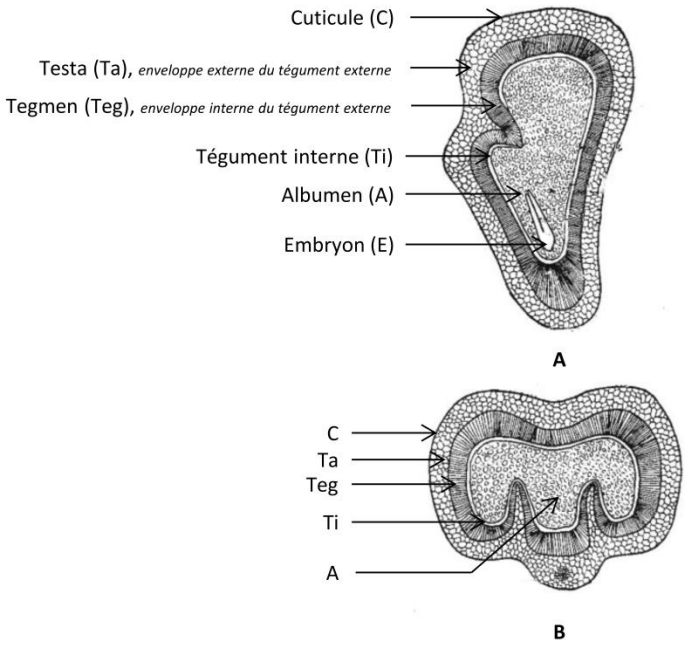


Figure 4 : Représentation schématique d'une coupe de pépin de raisin à maturité, A coupe longitudinale, B coupe transversale
Schéma adapté de Pacottet, 2012

Le tégument externe est composé à son tour de (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- un épiderme cuticulé ;
- une première enveloppe, appelée *testa*, composée de larges cellules parenchymateuses à paroi mince et pecto-cellulosique ;
- une seconde enveloppe, plus interne, nommée *tegmen*, ou épiderme interne, composée de deux couches cellulaires, où les cellules, étroitement accolées les unes aux autres, présentent des parois très épaisses et très fortement lignifiées (Fournioux et al., 2011; Pacottet, 2012).

Le tégument interne présente trois assises cellulaires pecto-cellulosiques nommées de l'extérieur vers l'intérieur : épiderme externe, assise moyenne et épiderme interne. Le tégument interne, parfois nommé membrane protéique, renferme l'albumen, qui lui-même contient l'embryon.

L'albumen est composé de cellules polygonales uniformes riches en globules graisseux, en grains d'aleurone et en cristaux d'oxalate de calcium (Pratt, 1971).

I.3. Développement du pépin de raisin

Loin d'être un simple organe réceptacle accumulant des réserves nutritives fournies par la plante, les pépins ont la capacité de pouvoir synthétiser de nombreuses molécules complexes ainsi que de réguler leur propre développement. Ce dernier, qui est grandement dépendant de la régulation hormonale, peut être divisé en trois phases distinctes : l'embryogenèse, le remplissage et la dessiccation (**Figure 5**) (Adams et al., 1980; Egli, 2017).

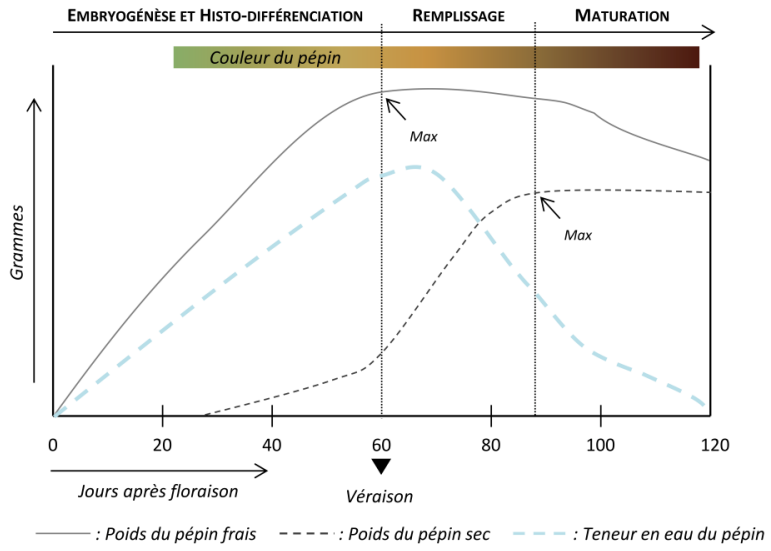


Figure 5 : Courbe de développement du pépin de raisin
Schéma adapté de Bewley et al., 2013 et Ristic et al., 2005

La pollinisation et la fertilisation marquent le début de la première phase de développement du pépin, qui se terminera lorsque toutes les structures du pépin seront formées. La fusion du pollen avec un ovule entraîne la formation d'un zygote diploïde, qui se différenciera en un embryon vital pour la génération suivante de la plante. La première division cellulaire du zygote intervient de 14 à 28 jours après la floraison (Ebadi et al., 1996). L'embryogenèse est accompagnée par la mise en place de l'albumen, tissu de réserve nécessaire au futur développement de l'embryon, ainsi que par la mise en place des téguments externes et internes. À la fin de cette phase de croissance, le nombre de cellules final du pépin est atteint (Bewley et al., 2013; Egli, 2017). À ce stade, le pépin est de couleur verte et il semblerait que cette phase de développement soit concomitante avec la première phase de croissance de la baie (Coombe et al., 2000).

La deuxième phase de développement du pépin, qui débute environ 60 jours après la floraison correspond à une phase d'accumulation de réserves carbonées et azotées sous forme de protéines, amidon et lipides (Ristic et al., 2005). Le sucrose, résultant de l'activité photosynthétique de la plante, constitue la principale source carbonée du pépin. Les acides aminés quant à eux représentent la principale source azotée du pépin (Bewley et al., 2013; Egli, 2017). Ces deux composés sont transportés de la plante au pépin par le phloème. Durant cette phase, l'accumulation de réserves entraînera une augmentation du volume cellulaire, qui entraînera elle-même une augmentation du volume du pépin. Les réserves nutritives du pépin s'accumulant au niveau des vacuoles cellulaires, elles chassent l'eau jusqu'à présent retenue dans les pépins. Ainsi, au cours de cette phase, une diminution de la teneur en eau est observée ainsi qu'une augmentation du poids sec du pépin. À la fin de cette phase, le pépin passe de la couleur verte à une couleur jaunâtre.

La troisième et dernière phase de développement, correspondant à la maturité physiologique du pépin, débute lorsque le poids sec du pépin a atteint son maximum. À ce stade, la plante cesse d'approvisionner le pépin en nutriments et en eau. Une chute drastique d'environ 90 % de la teneur en eau du pépin est observée, limitant grandement toute son activité physiologique. Le poids des pépins frais chute, et ils passent de la couleur jaunâtre à la couleur marron. Ristic et al., estiment que cette phase débute environ 90 jours après la floraison, soit au milieu de la phase de maturation de la baie de raisin, dénotant alors un décalage entre maturité physiologique du pépin et celle de la baie (Ristic et al., 2005). Si la baie n'était pas récoltée, ce délai permettrait au pépin de continuer à graduellement perdre de l'eau, lui permettant d'acquérir sa tolérance à la dessiccation avant sa « libération » du fruit (Bewley et al., 2013; Egli, 2017; Finch-Savage, 2003).

II. Les composés phénoliques de la baie de raisin

Les composés phénoliques sont largement répandus au sein du règne végétal (raisins, pommes, poires, thé…). Il s'agit de métabolites secondaires impliqués à divers titres dans le mode d'action de

défense des plantes contre les agents pathogènes. Leur mode d'action peut être lié à leur pouvoir antimicrobien, à leur participation au renforcement des parois cellulaires et à leur capacité de modulation et d'induction des réactions de défense de l'hôte (Clérivet et al., 1996). Par ailleurs, les polyphénols présentent une multitude de propriétés biologiques intéressantes pour la santé. En effet, de par leurs activités antioxydantes, antibactériennes, analgésiques ou encore anti-inflammatoires, les vertus des polyphénols sont largement étudiées en médecine, pharmacologie et cosmétologie.

Outre leurs actions de défense et leurs propriétés biologiques, les composés phénoliques jouent également un rôle clé dans la perception organoleptique du vin en contribuant à sa couleur, son astringence et son amertume. Bien que les tanins du vin puissent provenir du bois des barriques lors de l'élevage de ce dernier, la majeure source de tanins du vin demeure la baie de raisin. En fonction du cépage, des conditions climatiques, du terroir et des conditions de vinification, la teneur en tanins des vins varie entre 1 et 4 g/L pour les vins rouges et entre 100 et 300 mg/L pour les vins blancs (Ribéreau-Gayon et al. 2017).

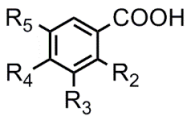
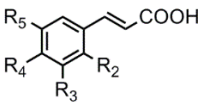
Le mot « polyphénol » permet de définir la structure chimique des molécules de cette famille : « phénol » signifiant que ces molécules présentent un cycle aromatique contenant un ou plusieurs groupes hydroxyles, et « poly » signifiant que ces molécules contiennent plusieurs cycles aromatiques. Les composés phénoliques du raisin sont répartis en deux grandes familles : les composés non-flavonoïdes, et les composés flavonoïdes.

II.1. Les composés non-flavonoïdes

Les principaux composés non-flavonoïdes retrouvés dans la baie de raisin ainsi que dans le vin sont les acides phénols et les stilbènes.

Les acides phénols peuvent être divisés en deux classes : les acides benzoïques et les acides hydroxycinammiques (**Tableau 1**).

Tableau 1: Les acides phénols du raisin et du vin

Structure	Nom	R2	R3	R4	R5
 Acide benzoïque	Acide *p*-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H
	Acide protocatéchique	H	OH	OH	H
	Acide vanilique	H	OCH_3	OH	H
	Acide gallique	H	OH	OH	OH
	Acide syringique	H	OCH_3	OH	OCH_3
	Acide salicylique	OH	H	H	H
	Acide gentisique	OH	H	H	OH
 Acide hydroxycinnamique	Acide *p*-coumarique	H	H	OH	H
	Acide caféique	H	OH	OH	H
	Acide férulique	H	OCH_3	OH	H
	Acide sinapique	H	OCH_3	OH	OCH_3

Dans les vins rouges, leur concentration varie entre 100 à 200 mg/L, tandis que dans les vins blancs, elle est de l'ordre de 10 à 20 mg/L. Les acides benzoïques présentent une structure de base en C3-C1. Dans le vin, ils se distinguent entre eux par la substitution de leur noyau benzénique ; dans le raisin, ils se retrouvent principalement sous forme d'hétérosides estérifiés. Les acides hydroxycinammiques, qui ont une structure de base en C6-C3 sont majoritairement présents sous forme estérifiée, principalement avec de l'acide tartrique.

Les stilbènes, qui sont présents dans les sarments de vigne, les baies, le vin et le bois de chêne présentent une structure de base en C6-C2-C6. L'existence de la double liaison carbone-carbone reliant les deux cycles permet la formation de deux formes de stilbènes : la forme *trans (E)* et la forme *cis* (Z) (**Figure 6**).

Figure 6 : Structure générale des stilbènes

Les différentes formes *trans* et *cis* peuvent être méthylées, hydroxylées ou méthoxylées. Elles peuvent également être conjuguées avec des glucosides ainsi qu'être oligomérisées. Le revestérol, qui a été identifié pour la première fois en 1939 dans les racines d'hellébore, est le stilbène le plus connu et le plus étudié (Takaoka, 1939). Il apparaît comme l'unité monomérique de base des stilbènes. Sa glycosylation aboutit à la formation de picéide, sa méthylation à la formation de ptérostilbène et son oligomérisation à la formation de viniférines et vitisines. La teneur en stilbènes des raisins et des vins varie grandement en fonction des cépages, des pratiques culturales et des procédés de vinification (Bavaresco et al., 2007).

II.2. Les composés flavonoïdes

La structure générale des flavonoïdes est composée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C). La structure de base est donc constituée de 15 atomes de carbone organisés en C6-C3-C6 que l'on appelle unité flavane (**Figure 7**). Le cycle A est nommé cycle phloroglucinol, le cycle B est nommé catéchol si un atome d'hydrogène est présent en position 5' ou cycle pyrogalloyl s'il s'agit d'un groupement hydroxyle et enfin le cycle C est un cycle pyrane.

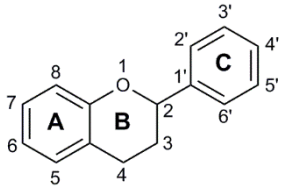


Figure 7 : Structure générale des flavonoïdes

À ce jour, plus de 6000 flavonoïdes différents ont été identifiés et listés. Leur classification repose dans un premier temps sur la position du carbone reliant les cycles B et C. Ainsi, lorsque les cycles B et C sont reliés au niveau du carbone 3, on parle d'isoflavones et lorsqu'ils sont reliés au niveau du cycle 4, on parle de néoflavonoïdes. Lorsque les cycles B et C sont reliés au niveau du carbone 2, les flavonoïdes sont subdivisés une deuxième fois en fonction du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, on retrouve alors les familles suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanols, anthocyanidines et chalcones (**Figure 8**).

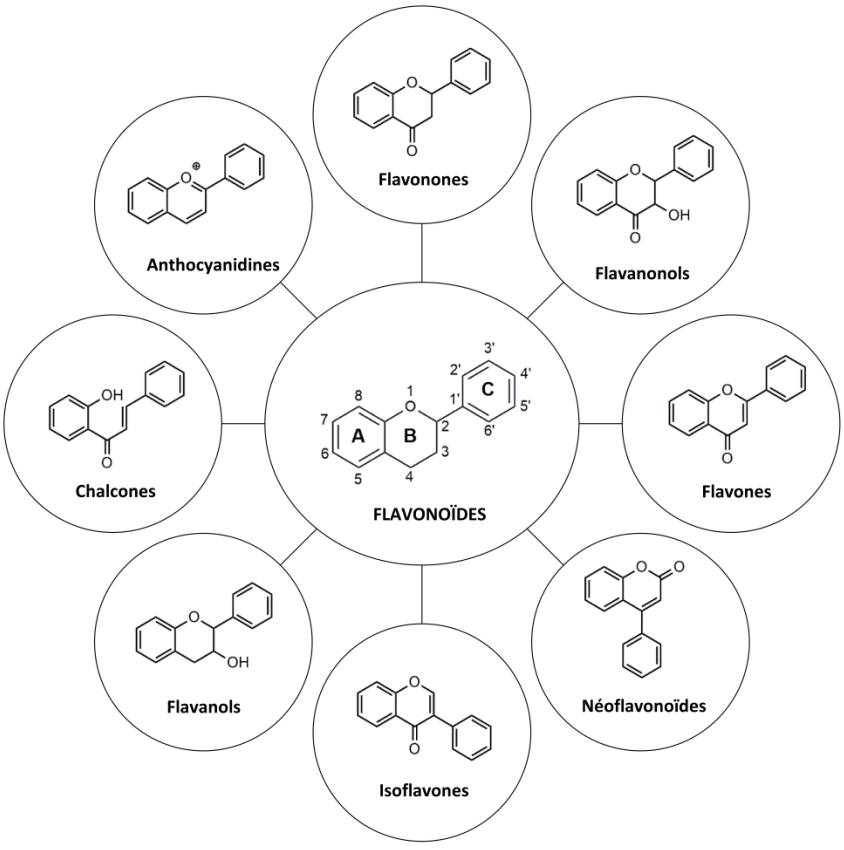


Figure 8 : Les différentes classes de flavonoïdes

Les flavanols, également appelés flavan-3-ols à cause de la position d'un groupe hydroxyle en position 3 du cycle C, sont la forme la plus réduite des flavonoïdes. Chimiquement, ils diffèrent entre eux par leur stéréochimie, le degré d'hydroxylation du cycle C ainsi que le nombre de groupes

hydroxyles du cycle B (**Figure 9**). Les molécules issues de cette famille constituent les unités de base des tanins condensés du raisin.

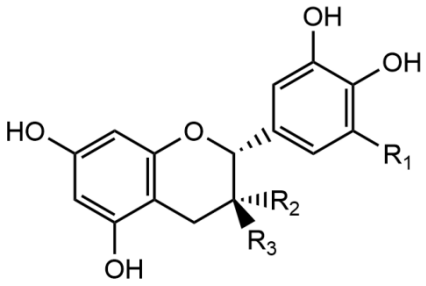
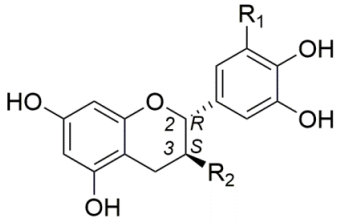
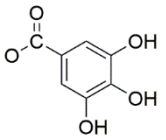
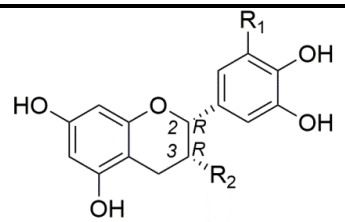
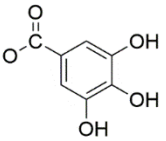


Figure 9 : Structure chimique des flavanols

Dans le vin, tout comme dans le raisin, les flavanols sont retrouvés sous formes monomériques, dimériques, oligomériques (composées de 3 à 10 sous unités) et polymériques (composées de plus de 10 sous unités). Les principales formes de flavanols retrouvées dans le raisin et dans le vin sont présentées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Les principales formes de flavanols

Structure	Flavanols	R1	R2	C1	C2
	(+)-Catéchine	H	H	R	S
	(+)-Gallocatéchine	OH	H	R	S
	(+)-Gallocatéchine gallate	OH		R	S
	(-)-Epicatéchine	H	H	R	R
	(-)-Epigallocatéchine	OH	H	R	R
	(-)-Epicatéchine gallate	H		R	R

III. Les tanins

III.1. Description générale

Le mot « tanin » dérive du mot *tan* dont l'origine, qui reste incertaine, proviendrait du mot gaulois *tann-* qui signifie chêne vert. La définition propre du mot tanin est la suivante « Substance d'origine végétale rendant les peaux imputrescibles ». En effet, du fait de leur capacité à s'agglomérer autour des fibres de collagène présentes dans les peaux, ils protègent la matière, qui, de ce fait, ne subit pas de dégradation au cours du temps. Ainsi, les tanins sont par définition des molécules capables de se

complexer avec des protéines et des polysaccharides pour former des complexes macromoléculaires stables.

Chimiquement, il existe trois grands types de tanins qui diffèrent aussi bien par leur structure que par leur origine : les tanins hydrolysables regroupant les gallotanins et les ellagitanins, les tanins condensés et les tanins complexes.

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols facilement hydrolysables en oses et en acides phénols. Selon la nature de l'acide phénol libéré au cours de l'hydrolyse, on distingue les gallotanins, qui libèrent de l'acide gallique, et les ellagitanins, qui libèrent l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP). Dans le vin, ces composés peuvent provenir du bois de la barrique utilisée lors de l'élevage des vins ou bien de l'ajout de tanins œnologiques. Leur concentration dans le vin ne dépasse pas quelques milligrammes par litre de vin (Tarascou, 2005).

Généralement les tanins condensés sont des molécules issues de la polymérisation des flavanols, sous-classe des flavonoïdes. La variation structurale des tanins condensés est liée à la nature et au nombre des différentes sous-unités qui les composent, mais également au type de liaisons qui les relient entre elles. En effet, ces dernières peuvent être reliées par deux types de liaison inter-flavonoïdes : les liaisons de type B et les liaisons de type A. Les liaisons de type B se font entre le carbone C4 de l'unité supérieure et le carbone C8 ou C6 de l'unité inférieure (**Figure 10**). Les proanthocyanidines (PAs) de type A, retrouvées de façon moins abondante, sont doublement liées. Ainsi, ils comportent une liaison éther supplémentaire par rapport au type B, qui peut se faire entre le carbone C2 de l'unité supérieure et la fonction hydroxyle portée par le carbone C7 ou C5 de l'unité inférieure (**Figure 10**).

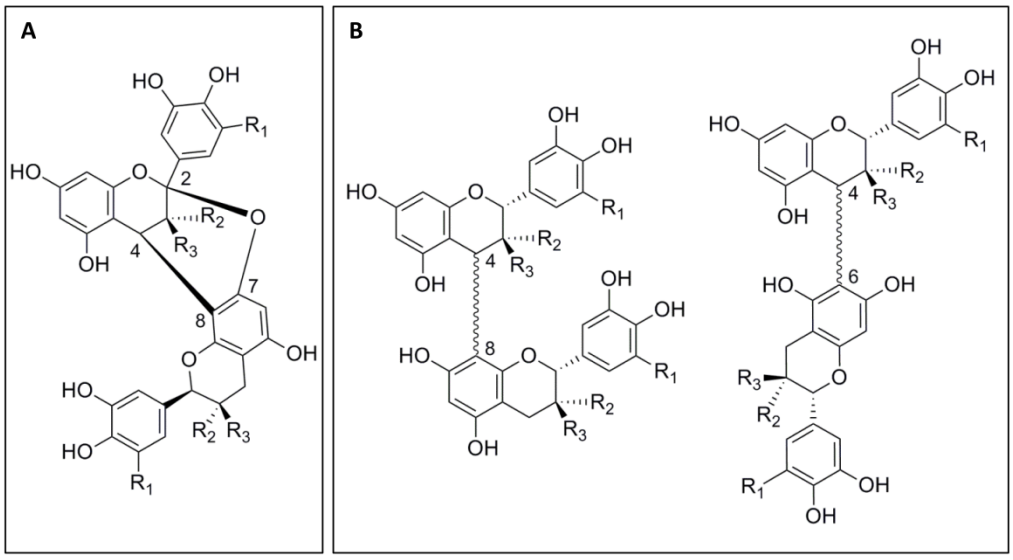


Figure 10 : Les liaisons inter-flavonoïdes de type A (A) et de type B (B)

On parle d'oligomères lorsque 3 à 10 sous-unités flavanols sont reliées entre elles. Lorsque le degré d'oligomérisation est supérieur à 10 on parle de polymères, ces derniers pouvant adopter une structure de type linéaire ou branchée. Les unités monomériques les plus retrouvées, aussi bien dans le raisin que dans le vin, sont la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine. La classification des proanthocyanidines, ou tanins condensés, repose sur la nature des monomères qui les composent. Ainsi, on distingue deux classes de tanins condensés : les procyanidines qui sont des polymères constitués de (+)-catéchine et de (-)-épicatéchine, et les prodelphinidines qui sont des polymères constitués de (+)-gallocatéchine et de (-)-épigallocatéchine.

III.2. Les tanins du raisin : pellicules vs pépins

Les tanins représentent le troisième constituant le plus abondant des raisins et des vins après les glucides et les acides (Shi et al., 2003). En fonction du stade de maturité de la baie ainsi que de leurs tissus de provenance (pellicule, pépin, pulpe), leurs structures et leurs teneurs diffèrent. Il est généralement admis que sur le total des polyphénols extractibles de la baie, 10 % ou moins proviennent de la pulpe, 28 à 35 % proviennent de la pellicule et 60 à 70 % du pépin (Shi et al., 2003).

Par ailleurs, il est également admis que contrairement aux pellicules qui contiennent à la fois des procyanidines et des prodelphinidines, seules des procyanidines sont retrouvées dans le pépin. De plus, la nature des unités d'extension et des unités terminales apparaît différente en fonction de la provenance des tanins. En effet, il semblerait que la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine soient respectivement l'unité d'extension et l'unité terminale privilégiées des tanins pelliculaires. En revanche, dans le cas des tanins de pépins, aucune tendance structurale ne se dégage (Downey et al., 2003). D'autre part, bien que des différences soient observées en fonction des millésimes et des cépages, les tanins pelliculaires présentent un degré de polymérisation plus élevé que les tanins de pépins. En effet, le degré de polymérisation moyen (DPm) des pellicules est compris entre 2,1 et 85,7, alors que celui des pépins se situe entre 2,3 et 30,3 (Rousserie et al., 2019). Cependant, même si cette observation s'avère vraie la plupart du temps, il existe quelques exceptions où le degré de polymérisation moyen des tanins du pépin est plus important que celui des pellicules (Petropoulos et al., 2017). De plus, de considérables différences peuvent être observées au sein d'un même cépage. À titre d'exemple, dans la littérature, les tanins pelliculaires de raisins issus du cépage Cabernet Sauvignon peuvent présenter des DPm allant de 3,4 à 85,7 et des tanins de pépins présentant des DPm allant de 3 à 16,1. Enfin, tout comme le degré de polymérisation moyen, il semblerait que le pourcentage de galloylation des tanins diffère grandement en fonction du tissu de provenance des tanins. Ainsi, les tanins de pépins présentent un degré de galloylation plus élevé que celui des pellicules, allant de 13,1 à 32,2 % pour les pépins contre 1,4 à 19 % pour les pellicules (Rousserie et al., 2019).

L'impact des tanins sur la qualité des vins, notamment sur l'amertume et l'astringence n'étant plus à démontrer, de nombreux travaux de recherches ont été réalisés sur les mécanismes de leur biosynthèse.

IV. La biosynthèse des tanins : des flavanols aux proanthocyanidines

IV.1. Voie métabolique

Les flavanols, qui constituent les sous-unités de base des tanins condensés du raisin sont synthétisés *via* la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Cette voie, fortement conservée chez les plantes supérieures, dérive de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et permet la formation de plus de 9000 espèces chimiques impliquées dans divers processus biologiques (pigmentation, mécanisme de défense, interaction symbiotique, fertilité, transport de l'auxine) (Buer et al., 2010 ; Dixon et al., 1999, 2002 ; Lepiniec et al., 2006 ; Vogt, 2010 ; Williams et al., 2004). Il s'agit d'une cascade enzymatique complexe faisant appel à différentes familles d'enzymes telles que des oxygénases, des ligases, des oxydoréductases et un grand nombre de transférases (Vogt, 2010). Cette voie de biosynthèse, qui se déroule dans le cytosol de la cellule, peut être divisée en deux parties : une partie en amont qui est commune à la synthèse de tous les flavonoïdes, et une partie en aval, spécifique à la synthèse des flavanols et des anthocyanes. Les gènes codants pour les enzymes de la partie « supérieure » ou « en amont » de cette voie métabolique sont nommés gènes précoces (EBG, Early Biosynthetic Genes), tandis que les gènes codants pour les enzymes de la partie « inférieure » ou « en aval » sont nommés gènes tardifs (LBG, Late Biosynthetic Genes) (Lepiniec et al., 2006) **(Figure 11**).

Les substrats ainsi que les molécules énergétiques utilisés par cette voie sont issus de deux voies du métabolisme primaire : la voie de l'acétate et celle du shikimate (Lepiniec et al., 2006). La synthèse de la majorité des produits issus du métabolisme des phénylpropanoïdes nécessite un apport énergétique. Grâce à leurs liaisons thioesters riches en énergie, les esters de coenzyme A (CoA), et notamment le manolyl-CoA apportent cette énergie nécessaire. Ce dernier est synthétisé à partir de l'acétyl-CoA, produit issu essentiellement de la glycolyse, sous l'action de l'acétyl-CoA carboxylase (Fraser et al., 2011 ; Plaxton et al., 1996 ; Vogt, 2010 ; Winkel-Shirley, 2001).

La phénylalanine, synthétisée *via* la voie du shikimate, est le substrat de la première enzyme de la voie des phénylpropanoïdes. La voie du shikimate, absente chez les animaux, permet la biosynthèse de tous les acides aminés aromatiques : le tryptophane, la tyrosine, et la phénylalanine. Elle débute par la condensation du phosphoénolpyruvate, issu de la glycolyse, et de l'erythrose-4-phosphate, issu de la voie des pentoses phosphates, en shikimate.

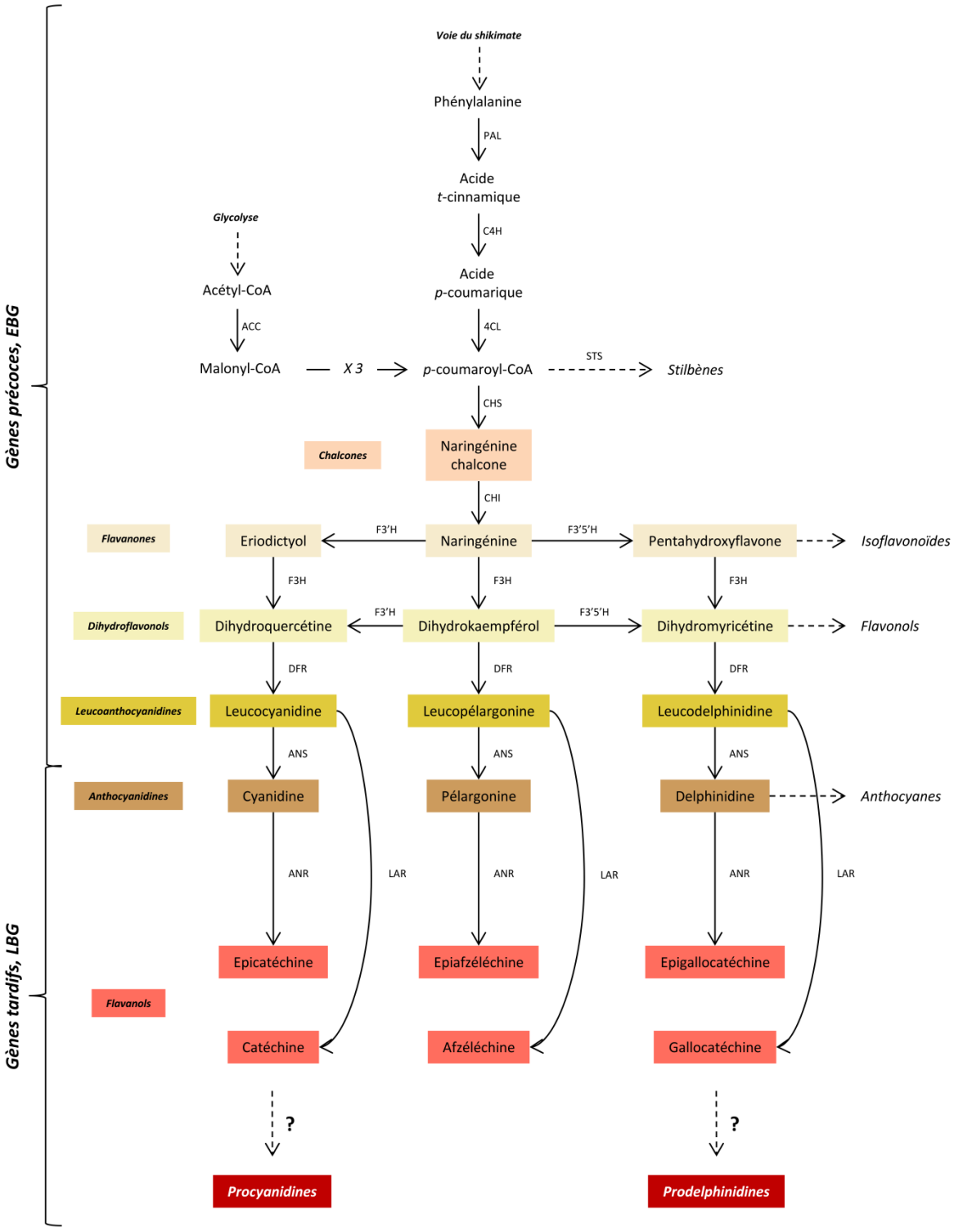


Figure 11 : Voie de biosynthèse des composés phénoliques

4CL : 4-Coumarate-Coenzyme A Ligase ; ACC : Acétyl-CoA Carboxylase ; ANR : Anthocyanidine Réductase ; ANS : Anthocyanine Synthase ; C4H : Cinnamate 4-hydroxylase ; CHI : Chalcone Isomérase ; CHS : Chalcone Synthase ; DFR : Dihydroflavonol Réductase ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; F3'H : Flavonoïde 3'-Hydroxylase ; F3'5'H : Flavonoïde 3'5'-Hydroxylase ; LAR : Leucoanthocyanidine Réductase ; PAL : Phénylalanine Ammonolyase ; STS : Stilbène Synthase

EBG: Early Biosynthetic Genes ; LBG : Late Biosynthetic Genes

Puis, une succession de réactions enzymatiques permet la production de chorismate, qui par le biais de trois voies différentes aboutira à la synthèse de la tyrosine, de la phénylalanine et du tryptophane (Dewick, 1995; Fraser et al., 2011; Herrmann et al., 1999; Tzin et al., 2010; Vogt, 2010). La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes débute par la désamination de la phénylalanine en acide *t*-cinnamique sous l'action de la phénylalanine ammonia lyase (PAL). Puis, la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) hydroxyle en position 4, l'acide *t*-cinnamique en acide *p*-coumarique. La coumarate CoA ligase (4CL) catalyse ensuite la synthèse de *p*-coumaroyl-CoA à partir de l'acide *p*-coumarique. Sous l'action de la stilbène synthase (STS), la réaction du *p*-coumaroyl-CoA avec 3 malonyl-CoA aboutira à la synthèse des stilbènes, tandis que sous l'action de la chalcone synthase (CHS), elle aboutira à la synthèse des flavonoïdes (Dixon et al., 2002; Ferrer et al., 2008 ; Lepiniec et al., 2006; Vogt, 2010). Les précurseurs des tanins sont donc formés *via* la CHS à partir de la voie des phénylpropanoïdes. Puis, une chalcone isomérase (CHI) convertit la chalcone obtenue en naringénine, qui est le précurseur de tous les flavonoïdes à l'exception des aurores. Par la suite, trois enzymes différentes peuvent hydroxyler la naringénine. Ainsi, elle peut être hydroxylée en position 3 du cycle B sous l'action de la flavonoïde-3-hydroxylase (F3H) ce qui aboutit à la formation du dihydrokaempférol. Elle peut également être hydroxylée en position 3' par la flavonoïde-3'-hydroxylase (F3'H) formant de l'ériodictyol, ou bien en position 3' et 5' par la flavonoïde-3'-5'hydroxylase, aboutissant à la formation de pentahydroxyflavone.

Le dihydrokaempférol est également un substrat des enzymes F3'H et F3'5'H qui l'hydroxylent respectivement en dihydroquercétine et dyhydromyricétine. Parallèlement, la F3H catalyse la transformation de l'ériodictyol en dihydroquercétine et du pentahydroxyflavone en dyhydromyricétine.

À ce point de la voie de biosynthèse, les trois dihydroflavonols synthétisés : dihydrokaempférol, dihydroquercétine et dyhydromyricétine, peuvent être réduit *via* la dihydroflavonol réductase (DFR) formant respectivement les trois leucoanthocyanidines suivantes : la leucopélargonidine, la leucocyanidine et la leucodelphinidine. Puis, les leucoanthocyanidines sont oxydées en anthocyanidines (pélargonidine, cyanidine et delphinidine) sous l'action de l'anthocyanidine synthase (ANS), également appelée leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) (Dixon et al., 2002; Ferrer et al., 2008; Lepiniec et al., 2006; Rousserie et al., 2019).

A ce stade de la voie de biosynthèse, les flavanols peuvent être synthétisés à partir des leucoanthocyanidines ou bien des anthocyanidines par deux oxydoréductases :

- La leucoanthocyanidine réductase (LAR) réduit les leucoanthocyanidines en flavanols, transformant la leucocyanidine, la leucodelphinidine et la leucopélargonine en respectivement catéchine, gallocatéchine et afzéléchine (Bogs et al., 2005; Lepiniec et al., 2006).

- L'anthocyanidine réductase (ANR) réduit les anthocyanidines en flavanols, transformant la cyanidine, la delphinidine et la pélargonine en respectivement épicatéchine, épigallocatéchine et épiafzéléchine (Bogs et al., 2005; Lepiniec et al., 2006).

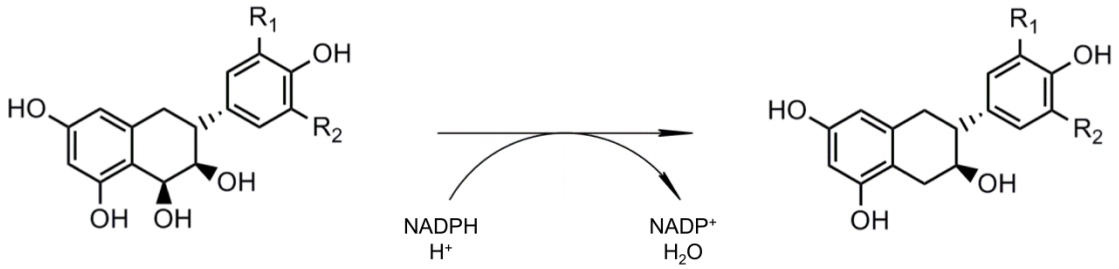
La polymérisation des flavanols synthétisés, dont le mécanisme reste encore très mal connu, aboutit à la formation des proanthocyanidines (Zhao et al., 2010).

IV.2. Focus sur les deux enzymes clés de la biosynthèse des flavanols : la leucoanthocyanidine réductase et l'anthocyanidine réductase

Comme décrits précédemment, les tanins condensés, ou proanthocyanidines, sont des polymères de flavanols. Dans le raisin, et plus particulièrement dans le pépin de raisin, les monomères les plus présents sont la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine et l'(-)-épicatéchine gallate. La leucoanthocyanidine réductase (LAR) et l'anthocyanidine réductase (ANR) permettant respectivement la synthèse de la catéchine et de l'épicatéchine apparaissent donc comme les deux enzymes clés de la synthèse des tanins condensés des pépins de raisin.

IV.2.a. La leucoanthocyanidine réductase

La leucoanthocyanidine réductase (LAR) est une enzyme cytosolique NADPH-dépendante catalysant la réduction des leucoanthocyanidines en anthocyanidines (**Figure 12**).



Leucoanthocyanidines

R_1	R_2	
H	OH	Leucopélargonidine
OH	H	Leucocyanidine
H	OH	Leucodelphinidine

trans-Flavanols

R_1	R_2	
H	H	(+)-Afzéléchine
OH	H	(+)-Catéchine
OH	OH	(+)-Gallocatéchine

Figure 12 : Réaction catalysée par la leucoanthocyanidine réductase (LAR)

La réaction catalysée associe l'élimination du groupe carboxylique benzylique des leucoanthocyanidines à l'oxydation d'un équivalent NADPH. La leucodelphinidine et la leucocyanidine sont les substrats favoris de l'enzyme, présentant respectivement une constante de

Michaelis (K_m) égale à 5 µM et 6 µM. La leucopélargonidine, qui peut également être un substrat de l'enzyme, présente une affinité beaucoup plus faible (K_m = 26 µM) (Tanner et al., 2003). Ainsi, l'affinité de l'enzyme avec son substrat semble être fonction du degré d'hydroxylation du cycle B des leucoanthocyanidines.

En 2003, l'équipe de Tanner et al., est la première à avoir caractérisé la LAR dans les feuilles de *Desmodium uncinatum* (Tanner et al., 2003). Elle a montré que cette enzyme était un monomère de 42,7 kDa constitué de 382 acides aminés. Cependant, même si la LAR est une enzyme commune à de nombreux organismes, il semble que chaque organisme présente une enzyme ayant ses propres caractéristiques. Ainsi, chez *Vitis vinifera*, la LAR apparaît comme une protéine monomérique de 45,4 kDa constituée de 362 acides aminés.

La LAR est une enzyme appartenant à la superfamille des déshydrogénases/réductases à chaine courte (SDR). Ces enzymes sont caractérisées, entre autres, par deux motifs d'acides aminés conservés : un site riche en glycine en N-terminal, signature de la fixation du NADPH et une triade catalytique de type Ser…..LysXxxXxxXxxTyr (Kallberg et al., 2002). À l'intérieur de cette superfamille, on dénombre cinq sous-familles : classique, étendue, intermédiaire, divergente, complexe et PIP. La LAR a été classée dans la famille des PIP, pour les trois premières enzymes découvertes appartenant à cette famille (Gang et al., 1999; Koeduka et al., 2008; Min et al., 2003; Wang et al., 2006): pinorésinol-laricirésinol réductase (PLR), isoflavone réductase (IFR) et phénylcoumaran benzylique éther réductase (PCBER). Dans l'ensemble, la structure de la LAR1 est composée de 11 hélices α, 4 hélices 3_{10} et 13 brins β. Tout comme la majorité des protéines SDR, elle est composée de deux domaines : un domaine N-terminal adoptant un repliement de type Rossman et un domaine C-terminal, plus court, dont la fonction reste encore assez méconnue, mais qui pourrait être liée à la fixation du cofacteur, voire du substrat. Le coenzyme se lie à l'interface de ces deux domaines sur un site riche en glycine par le biais de nombreuses interactions: liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques et contacts hydrophobes. Le mécanisme catalytique de LAR1, proposé par Maugé et al., se déroule en deux étapes : la déshydratation en C7 de la leucoanthocyanidine, produisant un intermédiaire électrophile méthylène quinone, qui est ensuite réduit en C4. À noter que l'analyse de la structure 3D du complexe a mis en évidence que la cavité accueillant le substrat apparaissait plus large que nécessaire, suffisamment plus importante pour envisager que des entités plus complexes que les leucoanthocyanidines ou les flavanols puissent se fixer à l'enzyme (Maugé et al., 2010).

Chez *Vitis vinifera*, deux gènes homologues codant pour la LAR ont été identifiés : *VvLAR1* et *VvLAR2*. Tant au niveau de leur localisation que de leur profil d'expression, ces deux gènes présentent des caractéristiques différentes. Tout au long de la maturité de la baie, l'expression de *VvLAR1* apparaît extrêmement faible dans les feuilles et dans les pellicules de raisin. En revanche, avec un pic

d'expression atteint deux semaines après la floraison, il est très fortement exprimé dans les pépins. Ainsi, le gène *VvLAR1* semble être spécifique au pépin de raisin.

Les transcrits de *VvLAR2* ont été détecté dans les fleurs, les pellicules de raisins, les feuilles et en plus grande quantité dans les pépins de raisin. Le pic d'expression de *VvLAR2*, plus tardif que celui de *VvLAR1*, est atteint à la véraison (Bogs et al., 2005; Gagné et al., 2009).

IV.2.b. L'anthocyanidine réductase

Tout comme la LAR, l'anthocyanidine réductase (ANR) est une enzyme cytosolique NADPH-dépendante. Elle catalyse la double réduction des anthocyanidines en flavanols en utilisant comme co-facteur deux molécules de NADPH (**Figure 13**).

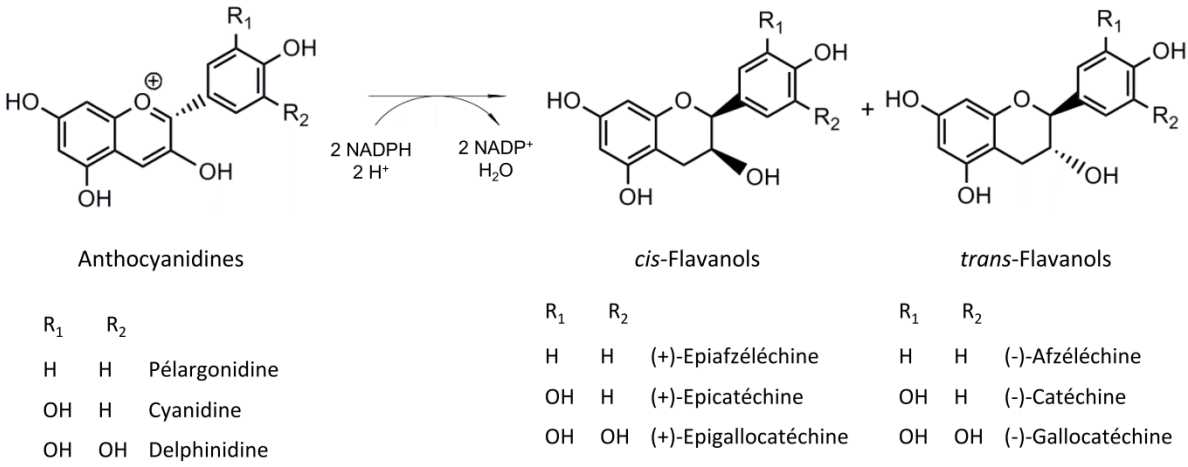


Figure 13 : Réaction catalysée par l'anthocyanidine réductase (ANR)

Tout comme la LAR, l'ANR peut avoir différents substrats : la cyanidine, la pélargonidine et la delphinidine. Avec une constante de Michaelis égale à 2,8 µM, la cyanidine semble le substrat favori de l'enzyme, suivi par la pélargonidine et la delphinidine (Gargouri et al., 2009). À l'inverse de la LAR, qui catalyse uniquement la synthèse de *trans*-flavanols, il semble que la réaction catalysée par l'ANR aboutisse à la formation des deux isomères *trans* et *cis*. L'enzyme ANR aurait donc une double activité : réductase et épimérase en C3. Après élution sur une colonne chirale des produits de la réaction catalysée par l'ANR sur son substrat la cyanidine, Gargouri et al., ont mis en évidence la présence de l'(+)-épicatéchine et de son isomère la (-)-catéchine (Gargouri et al., 2010). Ce point est intéressant à noter car dans la littérature scientifique relative à ce domaine, seules l'(-)-épicatéchine et la (+)-catéchine sont mentionnées comme flavanols principaux du raisin. Le fait que l'analyse des flavanols de la baie soit souvent menée sur des colonnes HPLC ou UPLC non chirales expliquerait cette confusion. Ainsi, de même que pour la cyanidine, la double réduction de la pélargonidine et de la delphinidine par l'ANR entraîne respectivement la synthèse de (-)-afzélachine et (+)-épiafzélachine

pour la première, et de (-)-gallocatéchine et (+)-épigallocatéchine pour la seconde (Gargouri et al., 2010).

Elle a été mise en évidence et caractérisée pour la première fois chez *Arabidopsis thaliana* et *Medicago truncatula* (Xie et al., 2003, 2004). Chez la vigne, l'ANR apparaît comme une protéine monomérique contenant 338 acides aminés. Structurellement, l'ANR présente beaucoup de similitudes avec la LAR.

En effet, elle appartient également à la superfamille des SDR, mais, à l'inverse des LAR qui font partie de la sous-famille des PIP, l'ANR est classée comme une SDR de type classique. Tout comme la LAR, elle est composée de deux domaines : un domaine N-terminal adoptant un repliement de type Rossman et un domaine C-terminal, plus court. La structure de l'ANR est composée de 12 hélices α et 12 feuillets β. Le cofacteur se lie à l'enzyme sur un site riche en résidus glycine qui se situe à l'interface des domaines C et N terminaux (Gargouri et al., 2009). L'enzyme ne possède qu'un site de fixation de cofacteur, indiquant que le transfert d'hydrure se produit séquentiellement. Le mécanisme catalytique de l'ANR proposé par Gargouri et al., est le suivant : un transfert d'hydrure en C2 suivi de la production d'un intermédiaire méthylène quinone, puis un transfert d'hydrure en C4. L'épimérisation en C3, qui apparaît comme étant réversible, suit la double réduction catalysée par l'enzyme (Gargouri et al., 2009).

L'expression de *VvANR*, qui est corrélée avec l'accumulation de proanthocyanidines à base d'épicatéchine, est retrouvée à des niveaux équivalents dans les pépins, les pellicules, mais également les feuilles et les fleurs (Gagné et al., 2009). Chez le pépin, deux pics d'expression du gène *VvANR* ont été observés : un premier, deux semaines après la floraison, qui est suivi par une diminution progressive de l'expression jusqu'à la véraison où un deuxième pic d'expression est observé. Après la véraison, l'expression de *VvANR* chute drastiquement pour devenir *quasi* nulle (Bogs et al., 2005).

IV.3. Régulation de la voie de biosynthèse

Les gènes de la voie de biosynthèse des flavanols sont soumis à un contrôle transcriptionnel par le biais de facteurs de transcription pouvant eux-mêmes être soumis à une régulation par des paramètres exogènes et endogènes (Ferrier, 2008; Jaakola, 2013; Lepiniec et al., 2006; Liu et al., 2015; Savoi et al., 2016, 2017; Xu et al., 2015).

Chez les plantes, trois familles de protéines impliquées dans la régulation de la biosynthèse des flavanols ont été identifiées : les protéines de type MYB (Myeloblastome), les protéines bHLH (Basic helix-loop-helix) également nommées MYC et les protéines de type WD40 (tryptophan-aspartic acid repeat) également nommées WDR.

En interagissant entre elles, ces molécules forment un complexe nommé « complexe MBW » (MYB-bHLH-WD40) qui agit comme un facteur de transcription. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, le complexe transcriptionnel MBW composé des protéines TT2 (Transparent Testa 2, MYB), TT8 (Transparent Testa 8, bHLH) et TTG1 (Transparent Testa Glabra3, WD40) active la transcription du gène BANYULS codant pour l'ANR (Lepiniec et al., 2006). Chez *Vitis vinifera*, aucun complexe de régulation transcriptionnel de type MBW n'a été mis en évidence à ce jour. Les seuls facteurs de transcription connus appartiennent tous à la famille MYB. Ces facteurs de transcription possèdent un domaine de liaison à l'ADN dans leur partie N-terminale, appelé domaine MYB, et un domaine de régulation de la transcription dans leur partie C-terminale. Les domaines MYB sont composés d'une à trois répétitions de 50 acides aminés nommés R1, R2 et R3 (Dubos et al., 2010; Jin et al., 1999). En fonction de ce nombre de répétitions, on dénombrera trois sous-familles nommées MYB1R, MYBR2R3 et MYB3R. Avec plus de 100 membres identifiés chez *Vitis vinifera*, la sous famille MYBR2R3 est la plus représentée chez les plantes (Jin et al., 1999; Dubos et al., 2010; Stracke et al., 2001).

Chez *Vitis vinifera*, plusieurs MYB activant l'expression des gènes *VvANR*, *VvLAR1* et *VvLAR2* ont été identifiés. Parmi ces facteurs, on dénombre *VvMYBPA2*, *VvMYB5a*, *VvMYB5b*, *VvMYBPAR et VvMYBPA1* (Deluc et al., 2006, 2008; Gagné et al., 2009; Koyama et al., 2014). *VvMYBC2-L1* apparaît à ce jour comme le seul facteur MYB répressif de la voie de biosynthèse, notamment en réprimant l'expression des gènes *VvANR* et *VvLAR1* (Huang et al., 2014). Ces facteurs de transcription, ayant pour la plupart des gènes cibles différents, interviennent à différents moments du développement de la baie **(Figure 14)**.

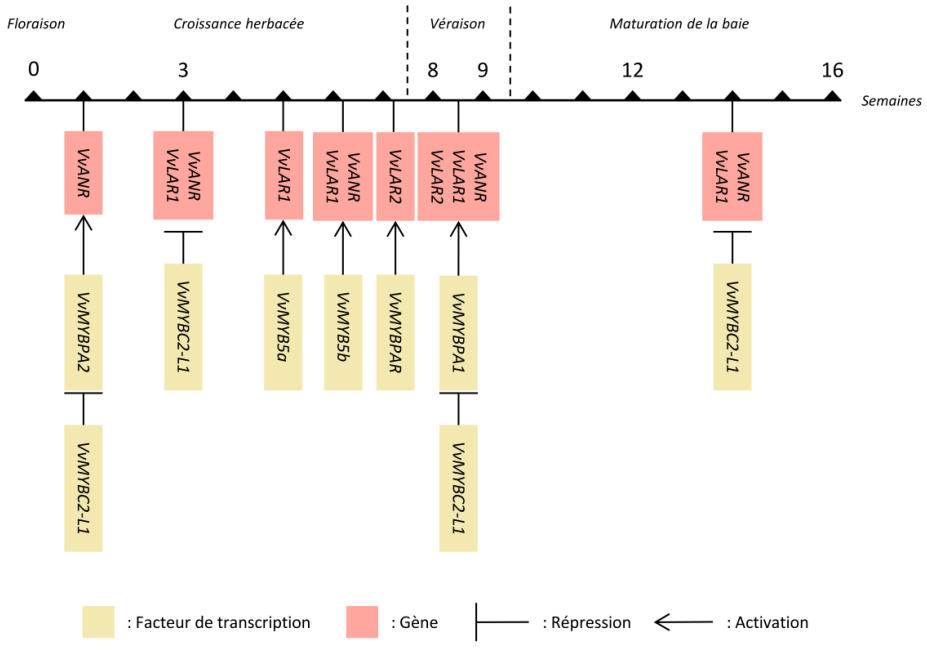


Figure 14 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biosynthèse des flavanols de la baie de raisin

IV.4. La polymérisation des flavanols

Les modalités de synthèse des flavanols sont bien connues. Cependant lorsqu'il est question du mécanisme de leur polymérisation, l'incompréhension demeure. S'agit-il d'une polymérisation purement chimique ? Purement enzymatique ? Ou bien peut-on envisager un mélange de ces deux mécanismes ? Quelles formes adoptent les flavanols avant de se polymériser ? Restent-ils sous forme native, ou bien sont-ils complexés à d'autres molécules ?

Lors de la polymérisation de deux molécules, il y a toujours une molécule « précurseur » et une molécule « ajoutée » qui vient se greffer à ce précurseur. Dans le cas des proanthocyanidines, il semblerait que le rôle de la molécule ajoutée soit toujours porté par les flavanols. En revanche, différentes molécules peuvent jouer le rôle de précurseurs : les leucoanthocyanidines, les anthocyanidines ou bien les flavanols eux-mêmes (Dixon et al., 2004) (**Figure 15**). Dans tous les cas, le mécanisme réactionnel semble toujours être le même : les flavanols en tant que nucléophiles réagiraient avec un composé électrophile (quinone méthide ou carbocation) pour former un oligomère. L'origine de cette quinone méthide et de ce carbocation, dépendante de la molécule précurseur, est diverse. En effet, ils peuvent dériver des leucoanthocyanidines, connues pour être naturellement instables, mais également dériver des flavanols, qui sous l'action d'une enzyme de type oxydase produiraient une quinone, qui serait ensuite convertie en carbocation. Cette hypothèse a été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana*, par Pourcel et al., qui ont démontré le rôle d'une enzyme de type laccase-like dans la polymérisation des flavanols (Pourcel et al., 2005).

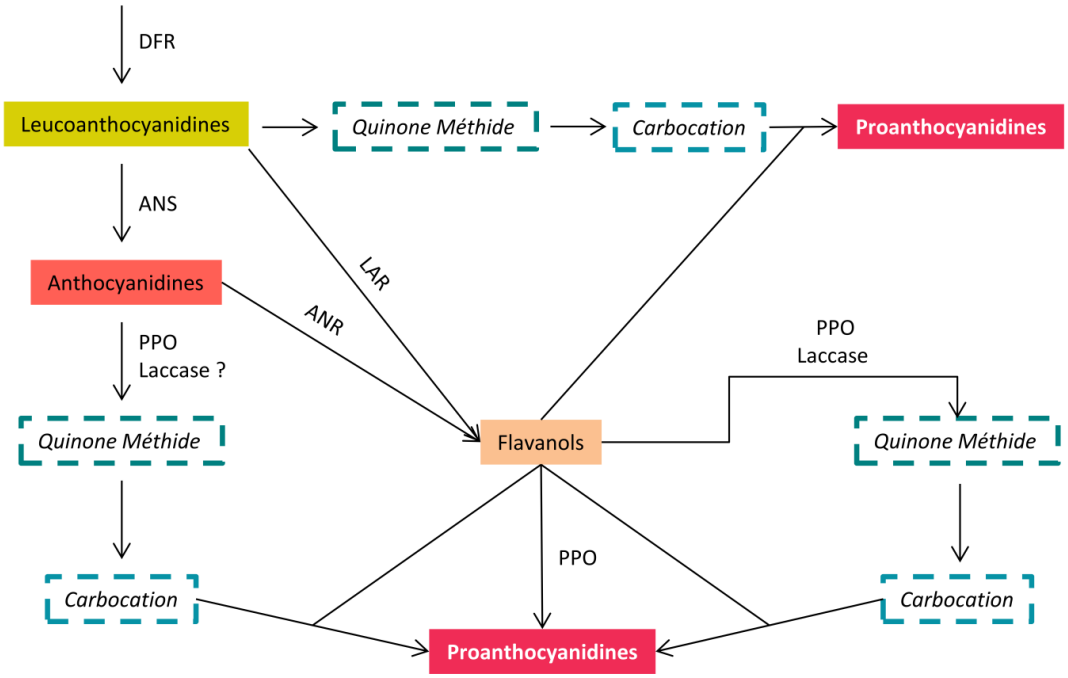


Figure 15 : Les potentielles voies de polymérisation des flavanols
Schéma adapté de Dixon et al., 2005 et Terrier et al., 2009

De la même façon, Sanchez-Mundo et al., ont reporté l'implication d'une polyphénol oxydase dans la polymérisation de l'épicatéchine chez *Capsicum annum* (Sancher-Mundo et al., 2016). Les anthocyanidines peuvent elles aussi, sous l'action d'une enzyme de type polyphénol oxydase, aboutir à la formation d'un carbocation, qui, attaqué par un flavanol, entraînera la formation d'un oligomère. Ainsi, même si ces mécanismes de polymérisation peuvent faire appel à différentes enzymes, il semblerait que la polymérisation à proprement parler des flavanols se réalise chimiquement. Néanmoins, cette hypothèse peut tout de même être remise en question. En effet, chez le lotus, Liu *et al.*, ont reporté une polyphénol oxydase en mesure de complexer un oligomère de flavanols avec des flavanols aboutissant à la production de proanthocyanidines (PAs) complexes (Liu et al., 2014).

De plus, de récentes recherches ont mis en évidence la potentielle implication, plus ou moins indirecte, de la LAR dans la polymérisation des flavanols. En effet, la présence des gènes LAR, codant pour les enzymes responsables de la synthèse de catéchine, a été curieusement reportée dans des plantes synthétisant des PAs majoritairement composés d'épicatéchine.

Dans la même veine, après avoir surexprimé le gène codant pour LAR du cacao (*Theobroma cacao*) chez *Arabidopsis thaliana*, Liu et al., ont étonnamment observé une augmentation de la teneur en épicatéchine (Liu et al., 2013). Cette intéressante observation amène à suggérer que la LAR possède plusieurs fonctionnalités. De plus, l'équipe de Dixon a reporté qu'une perte de fonction de l'enzyme LAR chez *Medicago truncatula* entraînait une diminution de la teneur en épicatéchine, ainsi qu'une accumulation de 4β-(*S*-cysteinyl)-épicatéchine (Cys-EC), démontrant que la LAR était responsable de la conversion de la Cys-EC en épicatéchine. Chez *Vitis vinifera*, Dixon et al., ont démontré *in vitro* la capacité de la LAR1 ainsi que de la LAR2 à convertir respectivement la 4β-(*S*-cysteinyl)-catéchine (Cys-C) et la Cys-EC en catéchine et épicatéchine. La Cys-EC et Cys-C peuvent, de manière non-enzymatique, toutes deux se comporter comme des sous-unités d'extension des proanthocyanidines (Liu et al., 2016; Yu et al., 2019). Ainsi, il semblerait donc que les sous-unités catéchine et épicatéchine se présentent comme les sous-unités terminales des PAs, tandis que les sous-unités Cys-C et Cys-EC se présentent elles, comme les sous-unités d'extension. L'enzyme LAR serait donc à elle seule responsable de la synthèse des sous-unités d'extension, et régulerait la teneur en sous-unités terminale. La longueur des PAs dépendant du ratio sous-unités d'extension/sous-unités terminales, la LAR apparaîtrait comme l'enzyme clé de la polymérisation des tanins condensés (Jun et al., 2018) (**Figure 16**).

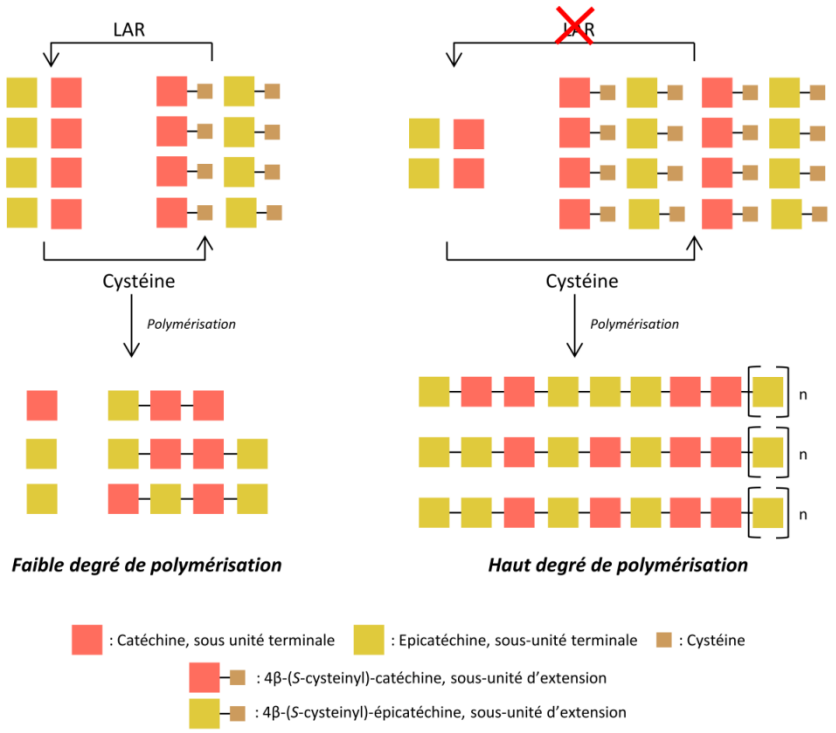


Figure 16 : Représentation schématique de la régulation des ratios Cys-Catéchine/Catéchine et Cys-Epicatéchine/Epicatéchine par LAR : implication dans le contrôle de la polymérisation des sous-unités flavanols
Schéma adapté de Liu et al., 2016

V. Les tanins de pépins: transport et localisation

V.1. Les voies de transport des composés phénoliques

Tout au long de son développement, la baie de raisin accumule des tanins condensés au sein de la pellicule et des pépins. La synthèse des flavanols, sous-unités des tanins condensés, se déroule au sein du cytoplasme de la cellule. Le fait que les tanins condensés de la baie se retrouvent principalement au sein de la vacuole, des plastes ou bien des parois cellulaires implique nécessairement la mise en place d'un, ou plusieurs mécanismes de transport (Braidot et al., 2008; Brillouet et al., 2013).

En 1974, Stafford fut l'un des premiers à soumettre l'hypothèse selon laquelle les enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes étaient organisées en complexe multi-enzymatique (Stafford, 1974). Plus tard, l'identification et la co-localisation des enzymes CHI, CHS, DFR et F3H assemblées en complexe enzymatique au niveau du réticulum endoplasmique (RE) chez *Arabidopsis thaliana* a permis de valider le modèle proposé par Stafford (Lepiniec et al., 2006). Les flavanols seraient alors synthétisés au niveau de la face cytoplasmique du RE, à partir d'un complexe enzymatique, avant leur accumulation cellulaire.

À ce jour, trois mécanismes de transports des flavanols, pouvant être synergiques ont été proposés : un transport *via* les glutathion-S-transferases, un transport impliquant des transporteurs membranaires, ainsi qu'un transport vésiculaire (**Figure 17**).

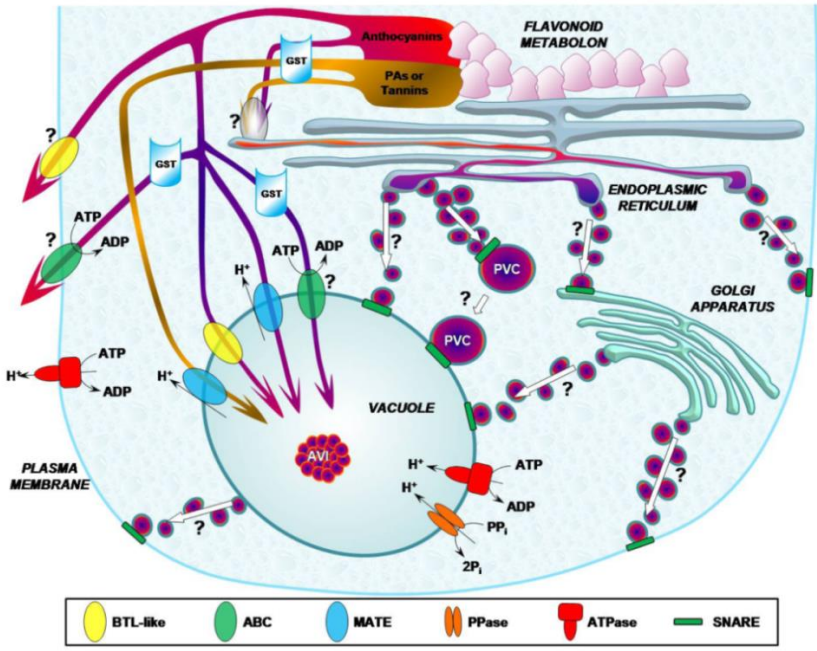


Figure 17 : Représentation schématique des différentes voies de transport cellulaire des flavonoïdes
Schéma d'après Petrussa *et al.*, 2013
AVI : Inclusion vacuolaire contenant des anthocyanes; BTL: Bilitranslocase; GST : Glutathion-S-Transferase ; PAs: Proanthocyanidines; PVC: Compartiment pré-vacuolaires contenant des anthocyanes

En tant qu'agent réducteur, le glutathion peut se complexer avec des molécules toxiques pour la plante, telles que les espèces oxygénées réactives, permettant alors leur neutralisation (Li, 2009). La complexation du glutathion avec d'autres molécules est assurée par des enzymes appelées glutathion-S-transférases (GST). Ces dernières catalysent la complexation du glutathion avec les anthocyanines ou les flavanols, permettant d'éviter tout phénomène d'oxydation. Puis, le transport de ces dérivés vers les vacuoles se fait grâce à un transport primaire *via* des transporteurs spécifiques appelés pompes à glutathion (Mueller et al., 2000; Zhao, 2015). Récemment Perez-Diaz et al., ont mis en évidence la participation de plusieurs GSTs dans le transport des flavonoïdes chez *Vitis vinifera*. Ainsi, il semblerait que *VviGST4* agisse en tant que transporteur d'anthocyanines et de PAs tandis que *VviGST4* jouerait un rôle important dans l'accumulation des PAs dans les pépins de raisin (Pérez-Díaz et al., 2016).

En ce qui concerne les transporteurs, trois types de transporteurs impliqués dans le transport des flavonoïdes ont été identifiés : les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette), les transporteurs MATE (Multidrug And Toxic Extrusion) ainsi que les transporteurs de type BLT (Mammalian Bilitranslocase Transporters). L'énergie fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet aux protéines de type ABC de transporter des substrats à travers la membrane. À ce titre, les

transporteurs de types ABC appartiennent à la famille des transporteurs primaires. Chez les plantes, on dénombre 8 sous-familles de protéines ABC (de A à H). Chez *Vitis vinifera*, Franciso et al., ont démontré l'implication d'un transporteur ABC de type ABC-C couplé à une GST dans la transport des anthocyanidines-3-O-glucosides (Francisco et al., 2013). Ainsi, les anthocyanines, seraient dans un premier temps, couplées à une molécule de glutathion *via* l'action d'une GST, puis seraient prises en charge par un transporteur de type ABC-C, qui assurerait leur transport à travers la membrane vacuolaire (Francisco et al., 2013). Contrairement aux transporteurs de type ABC, les transporteurs MATE sont qualifiés de transporteurs secondaires. À ce titre, ce type de transport se faisant sans consommation d'énergie, les transporteurs MATE couplent le transport de substrats aux gradients électrochimiques. Chez *Medicago truncatula* l'implication des transporteurs de type MATE1 dans le transport de molécules d'épicatéchine-3-O-glucoside a été démontré (Zhao et al., 2009). Le même type de transport a également été observé dans les pépins d'*Arabidopsis thaliana via* le tranporteur TT12 (Marinova et al., 2007). Chez *Vitis vinifera*, l'expression des transporteurs MATE1 et MATE2-GFP, corrélant avec l'accumulation de PAs dans le pépin de raisin, suggère également leur implication dans le transport des flavanols (Zhao et al., 2009; Zhao et Dixon, 2010; Zhao, 2015).

Enfin, la dernière catégorie de transporteurs impliquée dans le transport des flavonoïdes concerne une protéine membranaire homologue des mammifères : la bilitranslocase (BLT) (Braidot et al., 2008). Comme les transporteurs MATE, cette protéine appartient à la famille des transporteurs secondaire. En 2008, Braidot et al., ont démontré la corrélation positive entre l'expression de la translocase et l'accumulation vacuolaire des flavonoïdes chez la vigne (Bertolini et al., 2009; Braidot et al., 2008; Braidot et al., 2008; Petrussa et al., 2013). Ces protéines, localisées au niveau des parois cellulaires et des vacuoles, ont été détectées dans les pellicules de raisins issus de cépages rouges et de cépages blancs. À ce jour, leur présence au niveau des pépins de raisin reste à démontrer.

Le dernier mécanisme de transport de flavonoïdes est un transport de type vésiculaire : du site de biosynthèse des flavonoïdes à leur lieu de stockage final. Au sein d'une cellule, il existe essentiellement deux types de transports vésiculaires en fonction de la destination finale des vésicules : un transport où les vésicules sont adressées directement vers la paroi cellulaire et un autre où elles sont adressées vers la vacuole (Lin et al., 2003). L'accumulation d'anthocyanines au niveau de la vacuole de la cellule est à l'origine de la création d'inclusions vacuolaires nommées AVI. Ces AVIs, qui ont été observées chez de nombreuses espèces végétales, sont dépourvues de membranes et quelques fois associées à des protéines, ou des lipides. Des études réalisées sur des cultures cellulaires de vigne ont permis de mettre en évidence la présence de vacuoles d'anthocyanes cytoplasmiques appelées anthocyanoplastes (Zhang et al., 2006). Ces anthocyanoplastes, synthétisés au niveau du RE, fusionneraient avec des structures pré-vacuolaires avant d'être adressés à la vacuole, où ils fusionneraient de nouveau avec les AVIs (Petrussa et al., 2013). Ce même type de structure, contenant des PAs, a été observé dans les cellules de l'enveloppe externe du pépin d'*Arabidopsis thaliana*

(Kitamura et al., 2004). Par ailleurs, toujours chez *Arabidopsis thaliana*, Poustak et al., ont démontré la capacité des cellules à utiliser le réseau trans-golgien pour le transport vacuolaire d'anthocyanines du RE vers la vacuole (Poustka et al., 2007). A noter que l'adressage, la fusion et le recyclage de telles vésicules nécessitent obligatoirement la présence de protéines ou de séquences d'adressage de type SNARE, GTPase ainsi que des récepteurs vacuolaires (Petrussa et al., 2013).

V.2. Localisation des tanins de pépins

À ce jour, très peu d'études portent sur la localisation tissulaire et cellulaire des tanins dans le pépin de raisin, ainsi que sur l'évolution de cette localisation durant le développement de la baie.

V.2.a. Localisation tissulaire des tanins

Néanmoins, les rares études publiées sur ce sujet s'accordent à dire qu'au cours de développement de la baie, les tanins se retrouvent majoritairement dans le *testa* (Cholet, 2001; Kigel et al., 1995; Pacottet, 2012; Park, 1995; Thorngate et al., 1994). Sur des raisins issus du cépage Cabernet Franc, l'équipe de Chevalier a quant à elle évalué l'évolution de la localisation des composés phénoliques de pépins tout au long de la maturité de la baie : du 11ème jour après la floraison jusqu'au 123ème. Les résultats de cette étude montrent que le seul tissu ne contenant pas de tanins est l'albumen. Néanmoins, dans la littérature, il a déjà été reporté des cas d'autofluorescence des cellules de l'albumen, pouvant être potentiellement relié à la présence de composés phénoliques au sein de ce tissu (Cholet, 2001). L'évolution de la teneur en tanins semble donc différer en fonction du tissu.

Ainsi, pas ou peu d'évolution de teneur est observée dans le *testa* et le tégument interne, suggérant que 11 jours après la floraison, le testa et le tégument interne renferment déjà la quasi-totalité des tanins qu'ils présentent à maturité. En revanche, la présence de tanins dans l'épiderme semble progresser pour atteindre un pic à la véraison (Cadot et al., 2006).

V.2.b. Localisation cellulaire des tanins

Dans les cellules des baies, les tanins sont retrouvés dans les parois et dans les vacuoles (Amrani Joutei et Glories, 1994; Lacampagne, 2010; Park, 1995). Dans une cellule, il est possible de trouver plusieurs types de vacuoles contenant ou non des tanins (Park, 1995). Selon cet auteur, une très grande diversité de vacuoles taniques peut exister dans les différents tissus de la baie. Ainsi, en fonction de la forme et du nombre de vacuoles par cellule, il est possible de différencier quatre types de cellules à vacuoles taniques ou non taniques (**Figure 18**). Puis, en fonction de l'aspect des tanins, huit types de vacuoles taniques peuvent être trouvés (**Figure 20**), créant ainsi une très grande diversité de « cellules à tanins » (**Figure 20**).

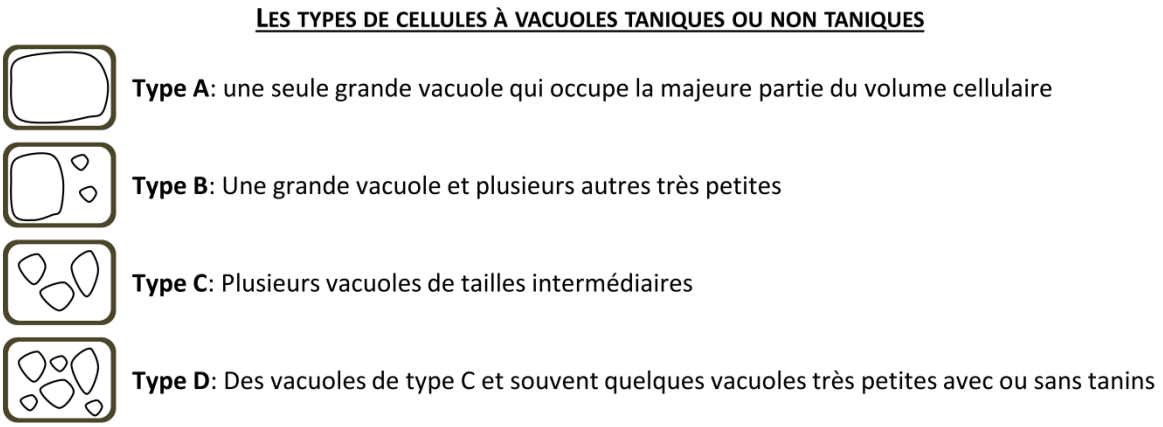


Figure 18 : Les différents types de cellules à vacuoles taniques ou non taniques selon Park (1995)

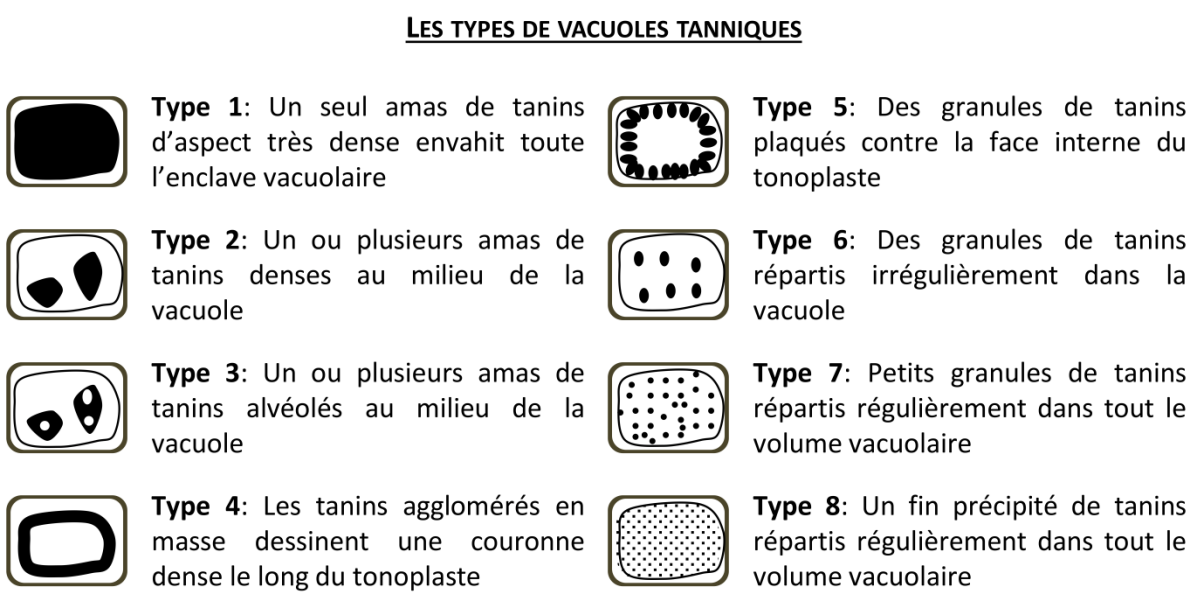


Figure 19 : Les différents types de vacuoles taniques selon Park (1995)

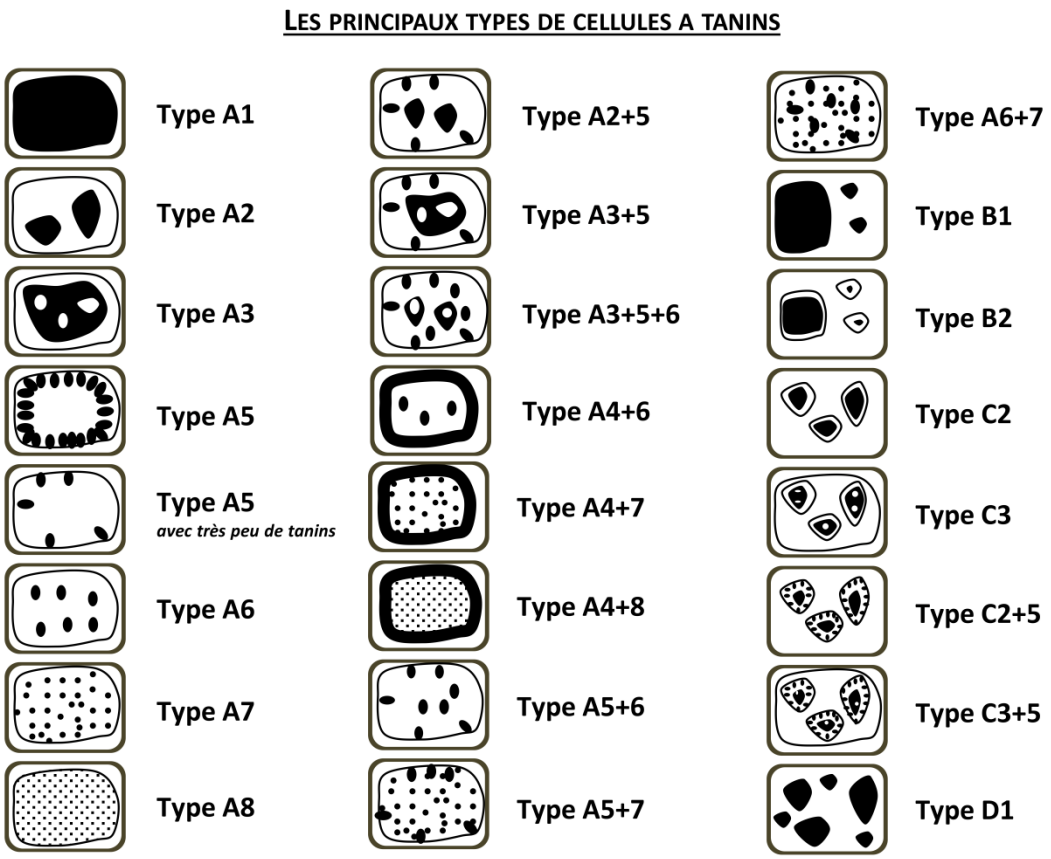


Figure 20 : Les principaux types de cellules à tanins selon Park (1995)

VI. Rôle et importance des tanins de pépins dans le vin

Le terme vinification représente l'ensemble des opérations au cours desquelles les raisins se transforment en vin. Cet ensemble d'opérations est constitué d'une multitude de techniques, qui varient en fonction du type de vin que l'on souhaite élaborer et de son mode d'élevage. Ce travail de recherche se focalise en partie sur la contribution tanique des pépins de raisin au vin ; aussi, au cours de cette approche bibliographique, seule la vinification en rouge sera abordée.

Classiquement, la vinification en rouge repose sur deux phénomènes principaux qui sont : la macération des parties solides du raisin avec son jus, et la fermentation alcoolique au cours de laquelle le sucre du moût sera transformé en alcool et en gaz carbonique par les levures (Fleet, 2002; Moreno-Arribas et al., 2005; Ribéreau-Gayon et al., 2017).

De ce fait, le vin rouge est à juste titre qualifié de vin de macération. C'est au cours de cette macération que les parties solides de la baie (pellicules, pépins et potentiellement rafles) transféreront vers la partie liquide (jus) leurs composés qui seront, en partie, à l'origine de la couleur et des caractéristiques gustatives et aromatiques des vins. Pour l'œnologue, la macération apparaît comme un véritable outil, qui lui permettra de moduler l'extraction des composés d'intérêt des raisins en fonction

du type de vin qu'il souhaite élaborer. En conséquence, les vins de style primeur, à consommer jeunes, doivent posséder un arôme et un fruité et ne nécessitent pas une extraction poussée. Au contraire, l'élaboration de vins à fort potentiel de garde suppose une richesse suffisante en tanins, et impose donc une macération plus longue dans le temps (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

Indépendamment de la conduite de la vinification, le cépage, la maturité du raisin et son état sanitaire constituent les premiers paramètres à prendre en compte lors de l'élaboration d'un vin.

La notion de proportion de pellicules et de pépins par rapport au volume de jus, qui détermine le rapport jus/marc influe alors sur le taux de phénols totaux. De la même façon, la connaissance de la composition, de la teneur et de la structure des tanins des pellicules et des pépins permettront d'appréhender et d'évaluer la contribution tanique des parties solides de la baie au vin. Ainsi, la maturité des raisins reste l'élément primordial et déterminant de la qualité du vin produit.

Sur un plan purement physiologique, la maturation du fruit a pour objectif d'amener les pépins dans un état les rendant aptes à germer et à produire une nouvelle plante. Sur le plan œnologique, la maturité de la baie ne peut être résumée à l'aptitude du fruit à donner une nouvelle plante. En effet, le moment où le raisin est défini comme oenologiquement mûr est un moment de subtil équilibre entre les différentes composantes qualitatives de la baie : sucres, acidité, tanins, arômes et extractibilité. À ce titre, le terme de maturité de raisin recouvre quatre types de maturités différentes (Ribéreau-Gayon et al., 2017) :

- la maturité technologique, prenant en compte la teneur en sucres et l'acidité du moût ;
- la maturité phénolique, correspondant à l'équilibre existant entre la teneur en composés phénoliques de la baie et leur capacité d'extraction ;
- la maturité aromatique définissant le raisin avec le plus grand potentiel aromatique, prenant notamment en compte la teneur en arômes variétaux de la baie ;
- la maturité texturale, en lien avec la capacité de dilacération et la résistance mécanique des pellicules.

Ainsi, l'emploi d'indicateurs de maturité pertinents, solides et fiables permettant de caractériser la constitution de la baie de raisin apparaît comme une des clés de réussite de l'élaboration d'un vin de qualité.

VI.1. La notion de maturité phénolique

Le principal problème rencontré avec la notion de maturité réside dans la signification même du terme. En effet, selon les auteurs, elle est définie de manières différentes. Dans le traité d'œnologie, le terme de maturité phénolique de la baie de raisin est défini de la façon suivante : « La maturité phénolique correspond à l'obtention simultanée d'un potentiel important en pigments dans le raisin et

d'une bonne capacité de diffusion dans le vin. » (Ribéreau-Gayon et al. 2017). Cette définition ne tient donc pas compte de la teneur en tanins des baies de raisin, qui sont pourtant, au même titre que les anthocyanes, des composés phénoliques de la baie de raisin. Selon Alain Reynier, la maturité phénolique correspond à l'aptitude d'un raisin à céder ses composés phénoliques. La teneur en tanins de la baie est donc ici prise en compte dans la définition de la maturité phénolique. Cependant l'auteur considère que le seul suivi de la teneur en anthocyanes de la baie de raisin permet de caractériser la maturité phénolique du fruit, négligeant alors les teneurs en composés phénoliques du pépin de raisin (Reynier, 2012). Selon Nicolas Vivas, le raisin ayant atteint sa maturité phénolique correspond à un raisin contenant un maximum d'anthocyanes et de tanins souples et peu astringents (Vivas, 2007). Au cours de cette définition, Vivas distingue donc les tanins du raisin en deux catégories : les tanins souples, qui sont les tanins que l'on souhaite extraire, et les tanins durs, ceux que l'on ne souhaite pas extraire. En effet, la vinification de raisins présentant une teneur élevée en tanins n'aboutit pas forcément à l'élaboration d'un vin tanique, et inversement la vinification de raisins ne présentant pas une teneur en tanins élevée peut aboutir à la création d'un vin tanique (Bindon et al., 2014 ; Hanlin et al., 2009 ; Harbertson et al., 2002, 2009, 2012). Cette observation a poussé les œnologues à employer le terme de bons et de mauvais tanins (correspondant aux tanins souples et durs définis par Vivas) sans pour autant que l'on soit à ce jour capables scientifiquement de définir et distinguer un bon tanin d'un mauvais tanin.

Ainsi, par le biais de toutes les définitions énoncées précédemment, il semble que la notion même de maturité phénolique n'ait pas de définition précise. Le fait qu'un terme aussi fréquemment employé ne puisse pas posséder de définition concrète, peut s'expliquer de deux manières : soit la problématique à laquelle on cherche à répondre est mal définie, soit les connaissances actuelles sont insuffisantes et ne permettent pas de caractériser le phénomène.

Au vu de la différence de composition et de constitution de la pellicule et du pépin de raisin, le terme de maturité phénolique de la baie de raisin doit prendre en compte deux notions : la maturité phénolique de la pellicule d'une part, et la maturité phénolique du pépin d'autre part. Ainsi, si l'on cherche ici à définir la maturité phénolique de la baie de raisin, plusieurs aspects doivent être pris en compte :

- la notion de teneur en composés phénoliques de la baie de raisin (pellicule, pulpe et pépins), incluant donc les anthocyanes et les tanins ;
- la notion d'extractibilité des composés phénoliques au cours de la vinification ;
- l'aspect sensoriel et la notion de goût apporté au vin par les composés phénoliques.

Ayant pris conscience de l'importance de pouvoir déterminer la maturité phénolique du raisin de manière précise et fiable, les différents acteurs du monde vitivinicole ont mis au point différents outils d'évaluation de maturité phénolique.

VI.2. Les outils d'évaluation de la maturité phénolique du pépin

Jusqu'à présent, il existe essentiellement quatre techniques permettant d'évaluer la maturité phénolique des raisins: la méthode Glories, la méthode CASV ou méthode ITV standard, une approche sensorielle et une approche visuelle.

La méthode de Glories constitue la première technique permettant d'évaluer la maturité phénolique des baies de raisin. Le principe de cette méthode repose sur l'extraction d'une bouillie complète du raisin (pellicules, pépins et pulpe) à deux pH différents : pH 1, permettant d'extraire un maximum de composés phénoliques, et d'apprécier ainsi le potentiel phénolique total de la baie et pH 3,2, censé modéliser les conditions technologiques de l'extraction, représentant donc le potentiel phénolique d'extraction de la baie. Puis, par le biais de mesures spectrométriques et de calculs empiriques, trois autres indicateurs de maturité phénolique sont révélés : l'EA correspondant au potentiel d'extractibilité des anthocyanes, le RPT correspondant à la richesse polyphénolique totale des raisins et le MP% représentant la contribution tanique des pépins à la RPT (**Annexe 1**) (Ribéreau-Gayon et al. 2017).

Cette approche reste à ce jour l'approche la plus communément utilisée pour évaluer la maturité phénolique de la baie de raisin et de ses pépins. Néanmoins, cette méthode, qui permet de renseigner le viticulteur sur de nombreux aspects de la maturité phénolique de ses baies, reste une méthode fastidieuse et longue à réaliser, et ne le renseigne pas sur la notion de goût apporté.

La méthode CASV, mise au point par l'IFV Pôle Bordeaux-Aquitaine, comparable à la méthode ITV standard, permet de déterminer la date optimale de vendange au regard la maturité phénolique des baies. Cette méthode est basée uniquement sur la teneur en anthocyanes de la pellicule de raisin. Ainsi, au cours de cette approche, la teneur en anthocyanes des pellicules est déterminée hebdomadairement tout au long de la maturité de la baie. La date optimale de vendange est déterminée lorsque la teneur en anthocyanes a baissé d'environ 20 à 30 mg/L par rapport au pic d'accumulation maximum en anthocyanes (Anneraud et al., 2009; Cayla et al., 2007, 2002). La plus grande faiblesse de cette technique d'évaluation de la maturité phénolique de la baie est liée à l'absence d'évaluation de la teneur en tanins des pellicules et des pépins de raisin. Par ailleurs, le manque de notion d'extractibilité des composés phénoliques dans le vin rend l'interprétation de cet indice de maturité phénolique difficile.

L'approche sensorielle destinée à évaluer la maturité phénolique des pépins consiste en un examen visuel et gustatif des pépins en prenant notamment en compte, leur couleur, leur résistance, leurs arômes et leur astringence. Ces caractéristiques sont ensuite notées à l'aide d'une grille d'évaluation de la maturité du raisin, ce qui permet d'évaluer la maturité phénolique du pépin, et plus généralement du raisin (**Annexe 1**) (Rousseau et al., 2000). Au regard de cette technique d'évaluation de la maturité

phénolique du pépin, trois grandes critiques peuvent être apportées : le manque de notion d'extractibilité, l'absence de mesure quantitative de la teneur en tanins et la subjectivité propre à chacun dans la note attribuée aux caractéristiques sensorielles du pépin.

L'approche visuelle consiste à évaluer la couleur de la face ventrale et dorsale de 20 pépins de raisin en fonction d'une échelle de couleur définie par l'équipe de Ristic (**Figure 21**) (Ristic et al., 2005).

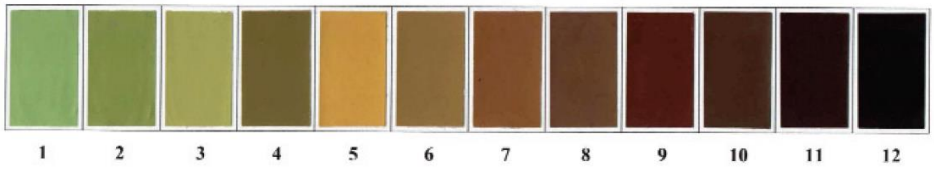


Figure 21 : Échelle de couleur du pépin de raisin en fonction de son développement, d'après Ristic & Iland, 2005

Ainsi, à chaque pépin est attribuée une valeur colorimétrique qui elle-même est attribuée à une valeur numérique comprise entre 1 et 12 (**Figure 21**). Les moyennes des valeurs numériques obtenues pour la face dorsale d'une part, et la face ventrale d'autre part sont réalisées. Puis, la moyenne des moyennes des faces dorsales et ventrales est ensuite calculée, donnant une valeur numérique ainsi qu'un pourcentage de coloration marron attribués à la couleur du pool de pépin étudié (**Annexe 1**). La valeur de couleur moyenne obtenue étant corrélée avec la teneur en tanin du pépin, cet indicateur de maturité permet, en théorie, de définir de manière simple et peu coûteuse la teneur en tanins des pépins de raisin (Ristic et al., 2005). Cette approche d'évaluation de la maturité phénolique du pépin, qui permet d'appréhender la teneur en tanin du pépin, n'apporte pas d'indications sur la capacité d'extraction de ces derniers dans le vin.

En conclusion, il n'existe pas, à ce jour, d'indicateur de la maturité phénolique des pépins simple, fiable et robuste, et qui prenne simultanément en compte la teneur en composés phénoliques, la capacité d'extractibilité et le potentiel sensoriel de ces derniers.

VI.3. Extractibilité des tanins de pépins

À ce jour, les rares études portant sur le lien entre la composition phénolique des raisins et le vin qui en résulte ont estimé qu'il y avait entre 9 et 50 % des tanins de raisin importés dans le vin (Bindon et al., 2010; Hanlin et al., 2010; Harrison, 2018; Kennedy, 2008; Rousserie et al., 2019; Sparrow et al., 2015). Cette estimation, extrêmement large, qui peut être expliquée par la différence des méthodes expérimentales utilisées lors de ces études, ou bien par la différence des cépages utilisés, ne permet pas d'établir réellement le lien entre les tanins de la grappe et ceux du vin (Bindon et al., 2014; Hanlin et al., 2009; Harbertson et al., 2002, 2009, 2012). Dans la même veine, Bindon et al., (2014) n'ont trouvé qu'une corrélation très faible, voire absente, entre les tanins du raisin et ceux du vin qui en

résulte, contrairement à la teneur en anthocyanes du raisin positivement corrélée avec les intensités colorantes des vins (Bindon et al., 2014).

De la même façon, la contribution tanique des différentes parties de la baie, à savoir le pépin et la pellicule, reste assez mal connue. En effet, après l'éclatement des baies *via* le pressurage, il apparaît difficile de déterminer la distincte contribution tanique des pépins d'une part et des pellicules d'autre part. Cependant, il existe de nombreuses idées préconçues quant à la capacité d'extractibilité des tanins en fonction de leur origine.

La première est certainement celle qui indique que les tanins pelliculaires sont extraits dans le vin plus rapidement que les tanins provenant des pépins. Cette idée est appuyée par de nombreuses études, qui ont prouvé que l'extraction des tanins pelliculaires était finie dès les premiers jours de la fermentation alcoolique (Amrani Joutei et Glories, 1994; Bautista-Ortín et al., 2016; González-Manzano et al., 2004; Pascual et al., 2016; Peyrot des Gachons et al., 2003). Cependant, d'autres publications ont mis en évidence le prolongement de l'extraction des tanins pelliculaires jusqu'à la fin de la macération post-fermentaire (Aron et al., 2007; Bindon et al., 2014; Busse-Valverde et al., 2012; Gil et al., 2012).

Une autre idée préconçue est liée au fait que les tanins de pépins s'extrairaient plus tard dans la fermentation alcoolique, et ce en lien avec l'apparition d'éthanol dans le vin. En effet, même si la présence d'éthanol facilite et accélère l'extraction des tanins de pépins dans le vin, le paramètre primordial influençant l'extractibilité des tanins de pépins est le niveau de réhydratation de ce dernier (Bindon et al., 2014; Busse-Valverde et al., 2012; Canals et al., 2005; Casassa et al., 2013; Hernandez-Jimenez et al., 2012). Il a été prouvé qu'une fois le taux de réhydratation nécessaire atteint, le pépin relarguait son contenu tanique indépendamment de la présence d'alcool (Hernandez-Jimenez et al., 2012).

Enfin, une dernière idée repose sur l'origine des tanins présents dans le vin. En effet, même si les tanins de pépins s'extraient moins facilement que les tanins pelliculaires, ils n'en sont pas moins majoritaires dans le vin. Selon les études, indépendamment des réarrangements moléculaires pouvant intervenir lors de la vinification et de l'élevage du vin, 60 % des tanins du vin proviennent des pépins et 40 % des pellicules (Kennedy, 2008; Nel, 2018).

Les pépins renfermant jusqu'à 10 fois plus de tanins que les pellicules, la différence d'extractibilité de ces composés en fonction de leur origine ne permet donc pas de compenser la différence de teneur en tanins des pépins et des pellicules.

Lors d'une vinification dite classique, l'extraction des tanins à partir de la baie de raisin s'effectue pendant la phase de macération. Cependant, leur concentration dans les vins peut être modulée par les conditions de vinifications, et notamment les procédés utilisés lors de celle-ci. En effet, dans le but de

faciliter ou d'améliorer l'extraction des tanins de la baie, de nombreux procédés ont été développés. Parmi ces procédés, trois techniques de macération différentes, ainsi que trois procédés innovants ont un impact significatif sur l'extraction des tanins de pépins.

Le premier type de macération ayant un impact positif sur l'extraction des composés phénoliques du pépin de raisin est la macération à froid. Cette macération pré-fermentaire consiste à laisser reposer le marc et le jus pendant quelques jours à faible température dans le but d'éviter tout départ fermentaire. Il existe essentiellement deux types de macération à froid : la première consiste à laisser reposer le marc et le jus pendant 3 à 5 jours à une température comprise entre 10 et 15°C, la deuxième consiste à laisser reposer le marc et le jus pendant environ dix jours à une température environ égale à 4°C. Contrairement à la première technique, il semblerait que la deuxième permette d'augmenter significativement l'extractibilité des tanins de pépins. Ainsi, le temps de macération des pépins de raisin influerait positivement sur l'extraction des tanins, car l'augmentation du temps de contact pépin-jus permettrait une réhydratation plus importante du pépin, ce qui augmenterait la diffusion des tanins dans le vin (Aleixandre-Tudo et al., 2018 ; Busse-Valverde et al., 2011; Panprivech et al., 2015;). La deuxième technique de macération requiert l'utilisation d'un cocktail enzymatique composé de divers types d'enzymes : pectinases, cellulases, hemicellulases et glycosidases (Fia et al., 2014). Ces enzymes, au départ conçues pour améliorer la dégradation des parois cellulaires des cellules de la pellicule, permettent également d'augmenter l'extraction des tanins de pépins dans le vin (Busse-Valverde et al., 2010; Bautista-Ortín et al., 2013, 2016; Moreno-Pérez et al., 2013; Li et al., 2017). À titre d'exemple, l'ajout d'un tel cocktail enzymatique dans une solution modèle de vin contenant des pépins permet d'augmenter de 700 % l'extraction des tanins de pépins (Busse-Valverde et al., 2011). Ce phénomène peut être expliqué essentiellement de deux façons différentes. D'une part, les parois cellulaires des cellules du pépin de raisin étant composées, entre autres, de cellulose, hémicellulose, pectines, protéines, lignine, il n'apparaît donc pas surprenant qu'un tel mélange enzymatique puisse aboutir à la désorganisation des couches cellulaires externes du pépin, facilitant alors l'extraction des tanins de ce dernier (Busse-Valverde et al., 2011). D'autre part, la digestion des débris des parois cellulaires par les enzymes limite l'adsorption des tanins de pépins, ce qui permet d'augmenter la proportion finale des tanins de pépins dans le vin (Bindon et al., 2010a, 2010b; Hanlin et al., 2010; Harrison, 2018; Hazak et al., 2005). La dernière technique de macération permettant de faciliter l'extraction des tanins de pépins dans le vin est une macération post-fermentaire. Cette technique consiste à laisser reposer, après fermentation complète, le marc et le vin pendant 5 à 44 jours. Cette technique permet d'augmenter la contribution tanique des pépins dans le vin, mais également celle des pellicules. Ainsi, il a été démontré qu'une macération post-fermentaire de 20 jours permettait d'augmenter respectivement de 20 et 10 % l'extraction des tanins provenant des pellicules et des pépins (Busse-Valverde et al., 2012).

D'autres procédés, considérés comme innovants, sont reconnus comme favorisant l'extraction des composés phénoliques de la baie de raisin. Le premier d'entre eux, appelé thermovinification, consiste à chauffer la vendange foulée et éraflée à une température comprise entre 60 et 70 °C pendant un court laps de temps d'environ 30 à 40 minutes. En fragilisant les parois cellulaires et en perturbant la structure des cellules, ce procédé permet une libération quasi immédiate de l'essentiel du contenu cellulaire, en particulier des anthocyanes (Coffelt et al., 1965; He et al., 2012; Smith et al., 2015). L'effet d'un tel procédé sur l'extraction des tanins à proprement parler apparaît toutefois variable (Sacchi et al., 2005; Wagener, 1981). Le second procédé est la « flash détente » qui consiste à chauffer la vendange entre 85 et 96 °C pendant trois à quatre minutes, puis à l'envoyer dans une enceinte sous vide-poussé (50 à 60 mbars). Tout comme lors de la thermovinification, ce procédé entraîne une fragilisation des structures cellulaires, permettant l'extraction des composés phénoliques.

Toutefois, il semble que ce procédé ait une plus grande incidence sur les tanins de la pellicule que sur ceux du pépin (Morel-Salmi et al., 2006). Enfin, les champs électriques pulsés apparaissent comme le dernier procédé innovant favorisant l'extraction des composés phénoliques de la baie. Cette technique consiste à créer un champ électrique entre deux électrodes immergées. L'exposition des cellules à ce champ électrique provoque une électroporation se caractérisant par l'apparition de pores temporaires ou permanents au niveau de la membrane cellulaire favorisant l'extraction des composés phénoliques (Zimmermann et al., 1974). L'efficacité de ce traitement apparaît toutefois variable, en fonction dans un premier temps du matériel végétal (cépages, niveau de maturité, millésime), et dans un second temps des paramètres du champ électrique appliqué (énergie, durée et voltage) (Boussetta et al., 2012; Cholet et al., 2014; Delsart et al., 2012, 2014; El Darra et al., 2016; López et al., 2008; Morel-Salmi et al., 2006).

CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Matériel végétal

I.1. Les parcelles

Les baies analysées lors de ce travail de recherche proviennent de deux parcelles différentes : une parcelle expérimentale de l'INRA de Villenave d'Ornon, et une parcelle « commerciale » appellation Pessac-Léognan, présentant toutes deux des densités de plantation comparables et des modes de palissage semblables. Ces deux parcelles ont été choisies en raison de leurs homogénéités : pas de variabilité intra-parcellaire, de déséquilibre nutritionnel, de symptômes de viroses, de variation de vigueur.

La parcelle expérimentale de l'INRA est une parcelle multi-cépages, ce qui a l'avantage de limiter le biais introduit par les conditions climatiques et environnementales dans notre étude. La parcelle « commerciale » est une parcelle de Merlot.

Les caractéristiques de chacune de ces parcelles sont résumées **Tableau 3**.

Tableau 3 : Caractéristiques des parcelles d'études
Densité/ha²= 10 000/(Écartements des rangs (m) x Écartements des pieds (m) ; E = Écartement des rangs (m)

Identification	Date de plantation	Cépage	Porte-greffe	Densité/ha²	Orientation des rangs	Taille	Hauteur de rognage	Type de sol
Parcelle « expérimentale »	1992	Sauvignon Blanc	Gravesac	5500	N/S	Guyot double	-	Sablo-graveleux
	1992	Tannat	Gravesac	5500	N/S	Guyot double	-	Sablo-graveleux
	1992	Cabernet Sauvignon	Gravesac	5500	N/S	Guyot double	-	Sablo-graveleux
	1992	Merlot	Gravesac	5500	N/S	Guyot double	-	Sablo-graveleux
Parcelle « commerciale »	1983	Merlot	3309 C	5556	E/O	Guyot double	1,75 m	Graveleux avec sous-sol argilocalcaire

I.2. Les millésimes

Les travaux présentés dans ce travail de recherche portent sur des baies de raisins prélevées à Villenave-d'Ornon (« parcelle expérimentale ») et à Martillac (« parcelle commerciale ») au cours des millésimes 2015, 2016, 2017 et 2018. Les dates de mi-floraison, mi-véraison et de récoltes de chacun de ces millésimes sont répertoriées dans le **Tableau 4**. Les caractéristiques climatiques comprenant les températures moyennes, la durée d'ensoleillement ainsi que la pluviométrie de chacun de ces millésimes sont répertoriées dans le **Tableau 5**.

Tableau 4 : Dates de mi-floraison, mi-véraison et récoltes des millésimes 2015, 2016, 2017 et 2018 dans le bordelais.

			Récolte			
			Blancs		Rouges	
Période	**Mi-Floraison**	**Mi-Véraison**	**Sauvignon**	**Sémillon**	**Merlot**	**Cabernet Sauvignon**
1994-2014	3 Juin	6 Août				
2015	5 Juin	6 Août	2 Septembre	15 Septembre	15 Septembre	1 Octobre
2016	11 Juin	7 Août	2 Septembre	8 Septembre	15 Septembre	1 Octobre
2017	30 Mai	30 Juillet	16 Août	1 Septembre	1 Septembre	7 Septembre
2018	3 Juin	4 Août	23 Août	5 Septembre	7 Septembre	17 Septembre

Tableau 5 : Températures moyennes, heures d'ensoleillement et précipitations des millésimes 2015, 2016, 2017 et 2018 dans le bordelais. Normales calculées à partir des données météo de 1981 à 2010.
Source :infoclimat.fr, station météorologique de Bordeaux-Mérignac

	Températures moyennes (°C)					Ensoleillement (h)					Précipitations (mm)				
	Normale	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**Normale**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**	**Normale**	**2015**	**2016**	**2017**	**2018**
Janvier	6,6	6,7	9,2	4,7	9,4	96	75,4	58,3	132,1	34,7	87,3	93,4	233,8	27,5	121,8
Février	7,5	6,5	8,8	9,8	5,1	114,9	113,6	95,4	101,4	95,7	71,7	79,5	151,7	75,0	49,8
Mars	10,2	10,3	9,7	12,2	9,8	169,7	117,6	145,8	143,6	136,7	65,3	38,4	110,2	65,6	113,3
Avril	12,3	14,5	12,1	13,0	14,5	182,1	197,2	162,1	281	154,2	78,2	26,9	59,8	21,5	77,6
Mai	16,1	16,4	16,2	18,2	16,7	217,4	201,8	190,2	271,2	205,4	80	33,5	92,6	51,8	47,3
Juin	19,3	21,0	18,9	21,7	21,1	238,7	301,1	181,7	268,2	236,3	62,2	43,8	74,5	136,9	45,9
Juillet	21,3	23,1	21,5	21,8	23,4	248,5	281,2	273,4	192,9	287,7	49,9	35,3	12,7	27,8	62,3
Août	21,4	22,1	22,8	22,1	23,3	242,3	251,8	313,2	267,4	280,8	56	89,7	11,3	30,2	19,2
Septembre	18,5	17,5	20,7	17,4	20,6	202,7	209,3	221,7	176,4	252,8	84,3	35,4	65,1	72,1	3,2
Octobre	14,9	13,9	13,9	16,4	15,2	147,2	169,2	167,1	184,9	164,6	93,3	51,8	12,0	13,4	62,5
Novembre	9,9	12,8	10,4	9,1	10,8	94,4	108,3	90,7	161,9	128,3	110,2	51,8	85,5	51,7	88,4
Décembre	7,2	10,6	8,1	6,9	9,7	81,8	127,6	124,7	62,7	53,5	105,7	12,5	13,2	162,7	93,2
Annuel	**13,8**	**14,6** ***(+ 0,8)***	**14,4** ***(+ 0,6)***	**14,4** ***(+ 0,6)***	**15,0** ***(+ 1,2)***	**2035,4**	**2154** ***(+ 6 %)***	**2024** ***(- 1 %)***	**2242** ***(+ 10 %)***	**2031** ***(- 0%)***	**944,1**	**592,1** ***(- 37 %)***	**922,4** ***(- 2 %)***	**2242** ***(+ 10 %)***	**784,5** ***(-17%)***

I.2.a. Millésime 2015

Les caractéristiques météorologiques du climat du millésime 2015 sont répertoriées **Figure 22**.

L'hiver 2014-2015 a présenté des températures proches de la normale, légèrement plus fraîches en Janvier, mais plus douces en Février. Quant aux précipitations, le cumul des pluies a été légèrement excédentaire avec en moyenne 10 % en plus. Mars fut moins pluvieux que la normale et moins ensoleillé (-63 heures d'ensoleillement), ce qui n'a pas permis un débourrement précoce. Ainsi, sur les parcelles de références de Bordeaux raisin, les premiers bourgeons de Merlot sont apparus le 15 Avril, et ceux de Cabernet Sauvignon le 19 Avril, soit dix jours plus tard que la moyenne décennale. Les conditions climatiques de Mai ont permis un développement sans ralentissement des rameaux avec l'apparition des premières fleurs fin Mai, dans la moyenne des dix dernières années. Le mois de Juin fut très ensoleillé, très chaud et très sec, avec seulement cinq jours de précipitations entre le 9 et le 16

Juin, ce qui a permis une floraison rapide avec une nouaison correcte, prédisposant à une maturité homogène. Ainsi, avant la fin du mois de Juin, les baies ont atteint le stade « petit pois ». Juillet 2015 fait partie des quatre mois de Juillet les plus chauds en Aquitaine depuis plus d'un siècle après 2006, 2013 et 1983. Les fortes températures et le manque de pluie significative avant le 20 ralentirent la phénologie : l'arrêt de croissance est noté au début de la véraison.

En effet, les premières baies colorées sont apparues le 22 juillet, il fallut attendre le 6 Août pour noter le stade mi-véraison et le 17 Août pour voir toutes les parcelles vérées. Le mois d'Août fut plus chaud que la normale, avec des précipitations 30 % plus importantes que la normale, ce qui permit de relancer le fonctionnement de la plante et d'assurer une seconde partie de véraison rapide et homogène. Septembre et Octobre furent frais et ensoleillés autorisant des vendanges sereines. En effet, Septembre sec, mais sans chaleur excessive assura la maturation complète des différents cépages. D'autant qu'Octobre, tout aussi ensoleillé termina la dernière phase de maturation des Cabernets.

Malgré les fortes chaleurs de Juin et Juillet, les vendanges n'ont pas été particulièrement précoces. Ainsi, les premiers Sauvignons furent récoltés les derniers jours d'Août, et les derniers sémillons la troisième semaine de Septembre. La récolte des raisins rouges débuta avec les Merlots la troisième décade de Septembre, et celle des Cabernets se prolongea au-delà de la mi-Octobre.

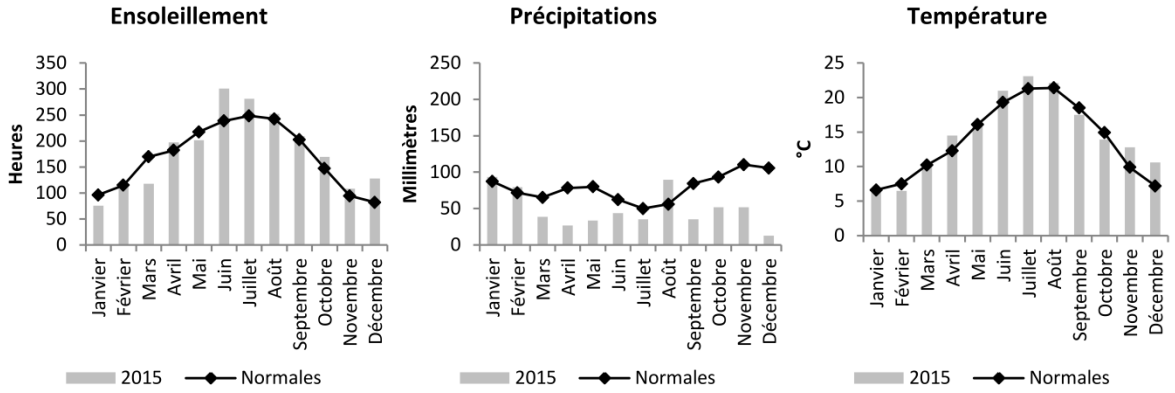


Figure 22 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2015
Source :infoclimat.fr, station météorologique de Bordeaux-Mérignac

I.2.b. Millésime 2016

Les caractéristiques météorologiques du climat du millésime 2016 sont répertoriées **Figure 23**.

Un hiver doux et extrêmement pluvieux sont sans conteste les caractéristiques premières du millésime 2016. En effet, le cumul de pluie de Janvier, Février et Mars a avoisiné les 500 mm contre les 230 mm enregistrés en moyenne lors des trente dernières années. Malgré ce temps pluvieux et un taux d'ensoleillement faible, l'hiver fut doux avec seulement cinq jours de gel enregistrés. Dans ces conditions, les premiers signes de la reprise végétative sont apparus fin Février. Les faibles

températures de Mars et les fortes pluies cumulées ont retardé le débourrement : les premiers bourgeons sont apparus la dernière semaine de Mars. Les fortes amplitudes thermiques observées en Mai n'ont pas permis une croissance régulière de la vigne. Ainsi, en dépit d'un débourrement précoce, les conditions climatiques de Mai ont provoquées un ralentissement du développement végétatif. Les premières fleurs ont été observées les derniers jours du mois. Le beau temps s'est installé définitivement mi-Juin, favorisant la croissance des baies qui ont évoluées très rapidement pour atteindre le stade petit pois à la fin Juin. En Juillet, les pluies ont été faibles et peu fréquentes, l'ensoleillement légèrement excédentaire et les températures supérieures à la normale. Les conditions hydriques peu restrictives pendant la phase de croissance végétative ont permis d'expliquer la taille des baies assez généreuse. Ainsi, fin Juillet, le bilan hydrique n'a pas permis l'arrêt définitif de croissance et le début franc de la véraison, il a fallu attendre la fin de la première semaine d'Août pour observer un changement significatif de la couleur des baies. En Août, l'ensoleillement fut 30 % supérieur à la normale, et les températures plus élevées d'environ 5°C par rapport à la moyenne. Les pluies salvatrices début Septembre ont permis de relancer la maturation. Puis, à partir de la mi-Septembre, le temps fut plus clément, avec un fort ensoleillement et peu de pluie, ce qui a permis de parfaire la maturation et d'aborder sereinement les vendanges.

Les vendanges ont débuté dans la région des Graves et Pessac Léognan, du 22 Août pour les Sauvignons blancs jusqu'au 5 septembre pour les sémillons tardifs. La récolte des rouges débuta la troisième semaine de Septembre avec les Merlots les plus précoces, cependant la majorité furent récoltés début Octobre. Pour les Cabernets, la récolte se prolongea au-delà de mi-Octobre sous un climat ensoleillé.

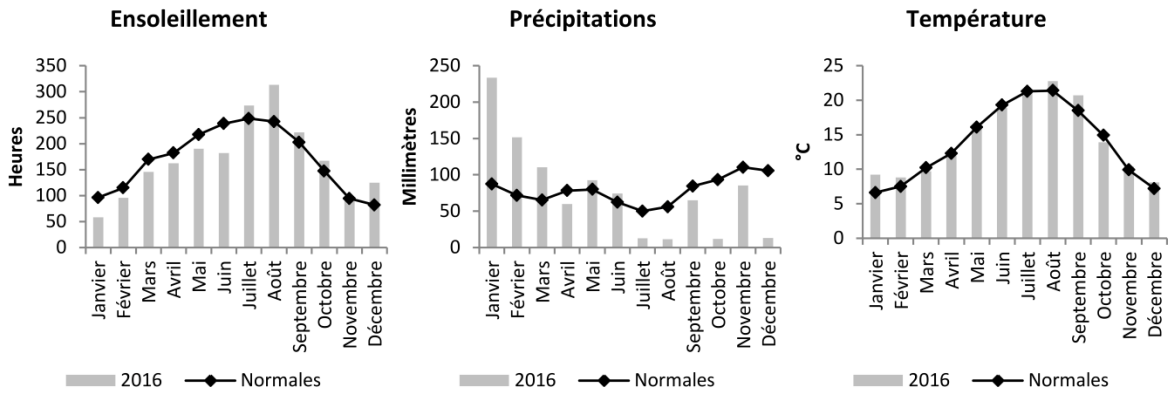


Figure 23 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2016
Source :infoclimat.fr, station météorologique de Bordeaux-Mérignac

I.2.c. Millésime 2017

Les caractéristiques météorologiques du climat du millésime 2017 sont répertoriées **Figure 24**.

Le millésime 2017 fut marqué par un important épisode de gel à la fin Avril, anéantissant près de la moitié de la récolte bordelaise. Janvier 2017 fut marqué par des températures très basses d'environ 2°C inférieurs à la normale ainsi que par sécheresse. En plus de son importante fraîcheur, Janvier fut également très sec, avec un déficit de pluviométrie d'environ 60 mm par rapport aux moyennes observées au cours des trente dernières années.

La douceur des mois de Février et Mars a conduit à une reprise de végétation précoce. Les premiers signes de la reprise végétative sont apparus la troisième semaine de Mars pour une date moyenne de débourrement le 28 Mars. Le mois d'Avril fut caractérisé par un fort ensoleillement, de très faibles précipitations, et des températures supérieures à la normale. Bien évidemment, il restera gravé dans les mémoires comme le mois du gel historique qui, en deux épisodes successifs, les 20 et 21 Avril suivis des 27 et 28 Avril, a détruit 30 à 50 % de la récolte 2017 en Gironde. La situation fut très hétérogène, avec des vignobles ayant perdus la quasi-totalité de leurs récoltes, tandis que d'autres n'ont pas ou peu été touchés. Ainsi, pour les propriétés épargnées, les faibles précipitations et l'ensoleillement du printemps ont favorisé une croissance rapide de la vigne, aggravant les dégâts occasionnés par le gel. Le mois de Mai fut chaud, permettant une floraison précoce, rapide et homogène. Fin Juin, les épisodes orageux ont retardé l'installation de la contrainte hydrique. L'été fut ensuite exceptionnellement sec, sans chaleur excessive avant la dernière semaine d'Août. Début Septembre, les conditions climatiques se sont dégradées faisant craindre un développement massif de pourriture grise pour les cépages rouges. Un retour aux conditions anticycloniques aura permis aux Merlots cultivés sur les terroirs les plus tardifs ainsi qu'aux Cabernets d'achever leur maturation sous un climat favorable.

Les vendanges des blancs secs dans le Sauternais ont commencé dès le début de la première quinzaine d'Août, soit un record de précocité pour certaines propriétés. Le Sauvignon blanc fut lui récolté à la fin Août, et les Sémillons les plus tardifs furent vendangés à la mi-Septembre. Les Merlots subissent les précipitations du début Septembre, de ce fait leur récolte a dû être anticipée au cours de la deuxième décade de Septembre afin de limiter le développement de la pourriture grise.

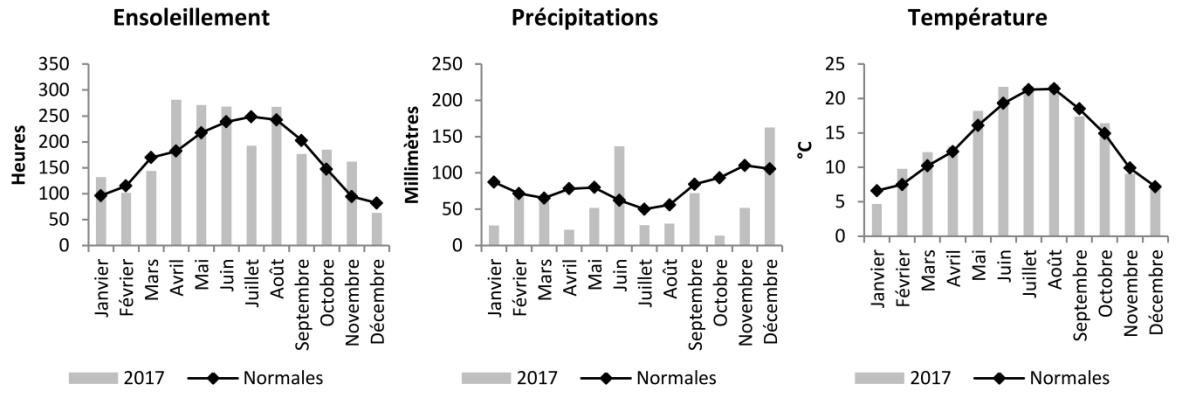


Figure 24 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2017
Source :infoclimat.fr, station météorologique de Bordeaux-Mérignac

I.2.d. Millésime 2018

Les caractéristiques météorologiques du climat du millésime 2018 sont répertoriées **Figure 25**.

Le début de l'année 2018 fut extrêmement pluvieux, avec une moyenne dépassant de 40 % les normales observées depuis plus de trente années, réduisant considérablement le temps d'ensoleillement. Malgré ce temps gris et pluvieux, Janvier 2018 fut très doux, avec des températures de 3°C supérieurs à la normale. Février quant à lui fut froid et sec avec seize jours de gelées et un épisode neigeux les 6 et 7. Avec vingt journées de précipitations, Mars fut extrêmement pluvieux, de plus, en dépit d'une première quinzaine assez douce, la température moyenne fut inférieure à la normale. Ainsi, la reprise végétative n'a pas eu lieu en Mars comme les années précédentes. Le gonflement des premiers bourgeons a été observé à la fin de la première décade d'Avril, soit 10 à 12 jours plus tard qu'en 2017. A partir de la mi-Avril, les températures sont remontées pour atteindre des valeurs estivales avec parfois des valeurs supérieures de 10°C à la moyenne. Dans ce contexte, la croissance s'est accélérée, et le retard observé à la reprise végétative a été complètement gommé pour le stade dix feuilles étalées. Les premières fleurs sont apparues fin Mai, en se déroulant sur une dizaine de jours maximum, la floraison fut rapide, sans accidents notables de coulure. Avec plus de 10 000 hectares touchés, Juillet fut marqué par des épisodes de grêle. Le mois de Juillet 2018 a présenté la moyenne de température la plus élevée enregistrée depuis 1954. Les fortes précipitations et les hautes températures observées ont entretenu une pression mildiou considérable, avec les premiers dommages constatés sur la récolte dès le stade petit pois. De plus, aucune restriction hydrique n'ayant été observée, la croissance végétative est demeurée très active. Le début de changement de couleur est observé à partir de fin Juillet, et la mi-véraison est notée le 4 Août. Il faudra attendre fin Août pour observer les premiers signes d'une contrainte hydrique. Septembre fut extrêmement sec et ensoleillé, remplissant les conditions idéales pour une maturation lente de l'ensemble des tissus de la baie.

Les vendanges en blanc ont commencé dans le sauternais le 23 Août, continua fin Août pour le Sauvignon blanc, et s'acheva à la mi-Septembre pour les Sémillons les plus tardifs. Les vendanges des premiers raisins rouges ont débuté le 7 Septembre, pour se généraliser la semaine du 17.

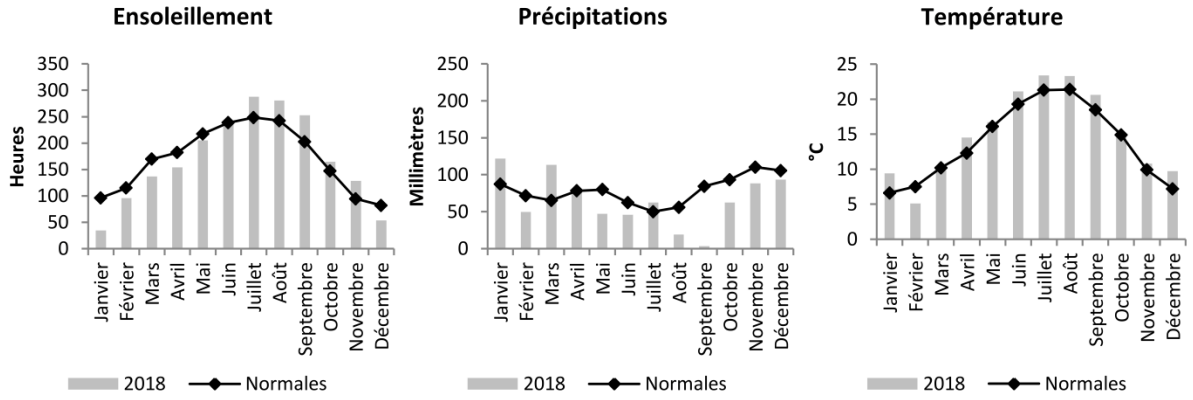


Figure 25 : Caractéristiques météorologiques du millésime 2018
Source :infoclimat.fr, station météorologique de Bordeaux-Mérignac

I.3. Les stades de prélèvements

Les baies de raisin ont été récoltées de manière homogène et aléatoire en évitant les deux premiers rangs de parcelle, ainsi que les pieds en bout de rang. Pour les millésimes 2015, 2016 et 2017, les cépages Merlot, Cabernet Sauvignon, Sauvignon blanc et Tannat ont été récoltés aux stades suivants : Fermeture de grappe (FG), Début Véraison (DV), Fin Véraison (FV), Maturité (M) et Surmaturité (SM). Pour le millésime 2018, le cépage Merlot a été récolté environ deux fois par semaine du stade Petit Pois au stade Surmaturité. Les dates de prélèvements de chacune de ces modalités sont répertoriées dans le **Tableau 6** et le **Tableau 7.**

Tableau 6 : Dates des prélèvements des baies issues de la parcelle « expérimentale » de l'INRA au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017

		2015		2016		2017	
	Stade de développement	**Date de Prélèvement**	**Jours après anthèse**	**Date de Prélèvement**	**Jours après anthèse**	**Date de Prélèvement**	**Jours après anthèse**
Sauvignon blanc Parcelle « expérimentale »	Fermeture de grappe	27 Juillet	24	18 Juillet	21	19 Juillet	18
	Début véraison	10 Août	44	16 Août	50	28 Juillet	37
	Fin Véraison	27 Août	61	26 Août	60	22 Août	52
	Maturité	10 Septembre	75	1er Septembre	66	31 Août	61
	Surmaturité	25 Septembre	90	15 Septembre	80	14 Septembre	75
Tannat Parcelle « expérimentale »	Fermeture de grappe	27 Juillet	24	18 Juillet	21	19 Juillet	18
	Début véraison	10 Août	44	16 Août	50	28 Juillet	37
	Fin Véraison	27 Août	61	28 Août	62	22 Août	52
	Maturité	10 Septembre	75	26 Septembre	91	28 Septembre	89
	Surmaturité	25 Septembre	90	10 Octobre	105	13 Octobre	104
Cabernet Sauvignon Parcelle « expérimentale »	Fermeture de grappe	27 Juillet	24	18 Juillet	21	19 Juillet	18
	Début véraison	10 Août	44	16 Août	50	28 Juillet	37
	Fin Véraison	27 Août	61	29 Août	63	22 Août	59
	Maturité	10 Septembre	75	3 Octobre	98	28 Septembre	89
	Surmaturité	25 Septembre	90	12 Octobre	107	13 Octobre	104
Merlot Parcelle « expérimentale »	Fermeture de grappe	-	-	18 Juillet	21	19 Juillet	18
	Début véraison	-	-	16 Août	50	28 Juillet	37
	Fin Véraison	-	-	29 Août	63	22 Août	52
	Maturité	-	-	26 Septembre	91	14 Septembre	75
	Surmaturité	-	-	10 Octobre	105	28 Septembre	90

Tableau 7 : Dates des prélèvements des baies de Merlot issues de la parcelle « commerciale » au cours du millésime 2018

	Stade de développement	Date de Prélèvement	Jours après anthèse
Merlot Parcelle « commerciale »	Fermeture de grappe 1	27 Juin	21
	Fermeture de grappe 2	29 Juin	23
	-	4 Juillet	28
	-	13 Juillet	37
	Début Véraison	18 Juillet	42
	-	20 Juillet	44
	-	2 Août	57
	Fin Véraison	8 Août	63
	-	10 Août	65
	-	17 Août	72
	-	24 Août	79
	-	29 Août	84
	-	31 Août	86
	-	7 Septembre	93
	-	12 Septembre	97
	-	14 Septembre	99
	-	18 Septembre	103
	-	21 Septembre	105
	Maturité	25 Septembre	109
	Sur-maturité	3 Octobre	117

I.4. Prélèvements de baies

I.4.a. Spécifique à l'étude génomique et chimique

Pour chaque date et chaque cépage, 10 grappes ont été prélevées sur 10 pieds différents puis aussitôt congelées dans l'azote liquide et conservées à -80 °C jusqu'à épépinage. Les pépins ont ensuite été séparés manuellement du reste de la baie dans de l'azote liquide puis broyés à l'aide d'un broyeur à billes. Les poudres ont été ensuite conservées à -80 °C jusqu'à analyse.

I.4.b. Spécifique à l'étude microscopique

L'étude microscopique a porté sur la localisation des enzymes responsables de la synthèse des principaux flavanols, et sur la localisation des tanins.

La localisation cellulaire des enzymes et des tanins a été réalisée sur les baies de Cabernet Sauvignon du millésime 2017 aux stades fermeture de grappe et véraison. La localisation tissulaire des tanins a été réalisée sur les baies de Merlot du millésime 2018 récoltées hebdomadairement du stade petit pois à surmaturité.

II. Etude des tanins

L'étude des tanins a été réalisée sur pépin et sur vin (**Figure 26**) et a porté d'une part sur le dosage des flavanols et d'autre part sur le dosage des tanins condensés. Les caractéristiques structurales des tanins condensés telles que le degré de polymérisation moyen et le pourcentage de galloylation ont été analysées après phloroglucinolyse.

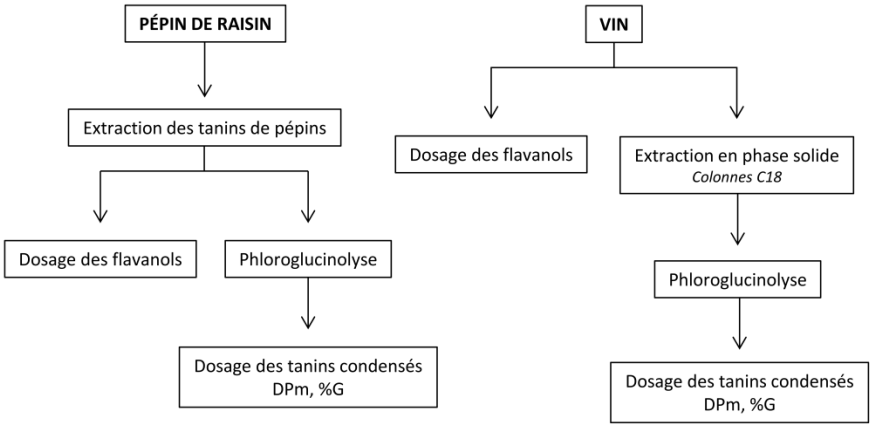


Figure 26 : Plan expérimental de l'étude des tanins

II.1. Les solvants et les réactifs

L'eau déionisée a été purifiée à l'aide d'un système MilliQ (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le méthanol et l'acide chlorydrique ont été achetés chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France). L'acide acétique a été acheté chez Fisher Scientific (Illkirch, France).

Les standards de (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)-épicatéchine gallate, (-)-épigallocatéchine ont été acheté chez Extrasynthèse (Genay, France). Le phloroglucinol, l'acide ascorbique et l'acétate de sodium ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

II.2. Extraction des tanins de pépins

Le protocole d'extraction des tanins de pépins a été adapté de celui de Lacampagne (2010).

Il s'agit d'une double extraction solide/liquide suivie d'une extraction par sonication. Dans 20 ml de tampon d'extraction (méthanol à 0,1 % HCl 12 N), 0,5 g de poudre de pépin est mise sous agitation modérée (500 rpm) pendant 3 heures, à température ambiante et à l'obscurité. Le mélange est ensuite soniqué pendant 10 minutes, puis filtré sur tamis moléculaire de porosité 40 µm (DUTSCHER, Brumath, France). La poudre est remise en suspension et les tanins sont extraits une deuxième fois selon le même protocole. Les tanins sont ensuite dosés sur chacune des extractions et l'addition des concentrations permet de connaître la teneur en tanins du pépin. Les extractions sont réalisées en triplicatas (triplicatas biologiques).

II.3. Analyse chromatographique

Les flavan-3-ols et les tanins condensés ont été analysés par chromatographie liquide haute pression grâce au système Thermo Ultimate 3000 comprenant une pompe (LPG 3400 SD), un compartiment à colonne thermostaté, un injecteur d'échantillon (WPS-3000 TSL) et un détecteur à barrette de diodes (DAD-3000). Le système était contrôlé par le logiciel Chromeleon data treatment system (version 7.2).

La colonne utilisée pour l'analyse des échantillons était une Hichrom ODS C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm).

Les solvants utilisés étaient :

- Solvant A : Eau déionisée à 1 % d'acide acétique
- Solvant B : Méthanol 100 %

Le gradient utilisé est répertorié dans le **Tableau 8** :

Tableau 8 : Gradient d'élution pour l'analyse des tanins

Temps (min)	Solvant A *Eau déionisée, acide acétique (1%)*	Solvant B *Méthanol 100%*
0	95	5
45	80	20
60	68	32
62	0	100
67	0	100
68	95	5
72	95	5

Le débit utilisé était de 1 ml/min. La détection a été réalisée à une longueur d'onde de 280 nm, et le volume d'injection utilisé pour chacun des échantillons était de 20 µl. Chaque échantillon a été injecté 3 fois.

II.4. Analyse des flavanols

Les monomères (+)-catéchine (C), (-)-épicatéchine (EC) et (-)-épicatéchine gallate (ECG) et (-)-épigallocatéchine (EGC) ont été identifiés et dosés dans l'UV.

Les gammes d'étalonnage (250, 125, 50, 25 et 5 mg/L) ont été établies à 280 nm à partir des standards commerciaux de C, EC, ECG et EGC. Pour les échantillons, les concentrations inconnues ont été déterminées à l'aide des équations de régression obtenues à partir des gammes de standards.

Les équations des courbes de calibration (aire en fonction de la concentration massique exprimée en mg/L) ainsi que coefficient de détermination R^2 de chaque standard sont répertoriés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Equations des courbes de calibration des standards de C, EC, ECG et EGC

Standard	Equation de la courbe de calibration	R^2
(+)-Catéchine	$y = 0{,}3339x - 0{,}2087$	0,987
(-)-Epicatéchine	$y = 0{,}3546x + 0{,}1381$	0,999
(-)-Epicatéchine gallate	$y = 0{,}8576x - 0{,}8134$	0993
(-)-Epicagallocatéchine	$y = 0{,}0369x - 0.3089$	0.998

II.4.a. Analyse des flavanols du pépin de raisin

Six cents microlitres d'extraits de tanins de pépins sont évaporés à l'aide d'un RapidVap (Labconco, Kansas City, Etats-Unis) avant d'être repris dans un mélange composé de 100 µl de méthanol et 500 µl d'eau déionisée (v/v). Les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide de filtres seringue PFTE de porosité 0,45 µm (Roth, Lauterbourg, France) et injectés dans le système HPLC. La méthode de détection utilisée est celle décrite précédemment (Chapitre II, paragraphe II.3). Chaque échantillon a été injecté trois fois.

II.4.b. Analyse des flavanols du vin

Les échantillons de vins ont été filtrés à l'aide de filtres seringue PFTE de porosité 0,45 µm puis injectés directement dans le système HPLC. La méthode de détection utilisée est celle décrite précédemment (Chapitre II, paragraphe II.3). Chaque échantillon a été injecté trois fois.

II.5. Analyse des tanins condensés

Afin de déterminer la composition, le degré de polymérisation ainsi que le pourcentage de galloylation des tanins, la méthode de phloroglucinolyse développée par Kennedy est utilisée pour chaque échantillon (Kennedy et al., 2001). Puis, les produits de la réaction sont analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse.

II.5.a. Principe

Le principe de la phloroglucinolyse repose sur la propriété des proanthocyanidines à se transformer en anthocyanidines en milieu acide et à chaud. Ainsi, les liaisons interflavanes des proanthocyanidines sont rompues libérant les sous-unités terminales sous forme de monomères (flavan-3-ols) et les sous-unités d'extension sous forme de flavan-3-ols avec un carbocation au niveau du carbone 4. Une fois formé, ce carbocation est piégé par un agent nucléophile, le phloroglucinol, générant un adduit (**Figure 27**).

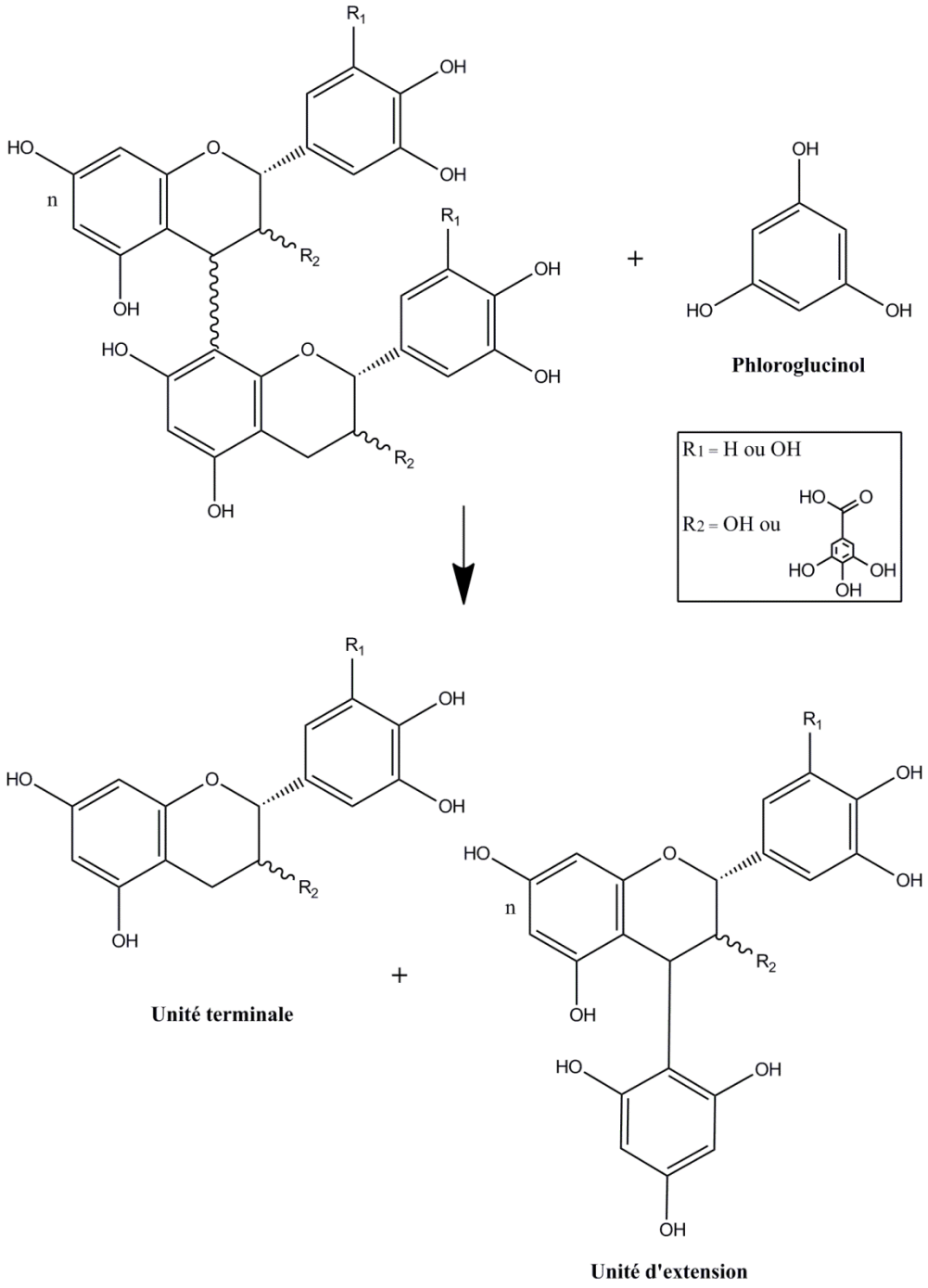


Figure 27 : Principe de la réaction de phloroglucinolyse

Ainsi, après la phloroglucinolyse des tanins condensés de pépin, les unités terminales libérées sont : la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épicatéchine gallate. Les unités d'extension libérées sous forme d'adduit de phloroglucinol sont les adduits : la (+)-catéchine-phloroglucinol (C-P), l'(-)-épicatéchine-phloroglucinol (EC-P) et l'(-)-épicatéchine gallate-phloroglucinol (ECG-P). La phloroglucinolyse des tanins condensés de vin génère une autre unité terminale : l'(-)-épigallocatéchine (EGC) ainsi qu'une autre unité d'extension : l'(-)-épigallocatéchine-phloroglucinol (EGC-P).

II.5.b. Analyse des tanins condensés du pépin

Six cents microlitres d'extraits de tanins de pépins sont évaporés à l'aide d'un RapidVap (Labconco, Kansas City, Etats-Unis) avant d'être repris dans 200 µl de mélange réactionnel (méthanol contenant 5 g/L de phloroglucinol et 10 g/L d'acide ascorbique). Les échantillons sont ensuite mis à l'étuve à 50°C pendant 20 minutes puis la réaction est arrêtée par ajout de 200 µl d'acétate de sodium à 200 mM.

Les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide de filtres seringue PFTE de porosité 0,45 µm et injectés dans le système HPLC. La méthode de détection utilisée est celle décrite précédemment (Chapitre II, paragraphe II.3).

La réaction a été réalisée trois fois (triplicatas biologiques) et chaque échantillon a été injecté trois fois.

II.5.c. Analyse des tanins condensés du vin

Afin de purifier, mais également de concentrer les tanins condensés du vin rouge, une étape préalable au dosage des tanins est nécessaire. Dans ce but, une extraction en phase solide (SPE : Solid Phase Extraction) est réalisée sur chaque vin. Cette méthode est basée sur la différence d'affinité entre l'échantillon à traiter (phase liquide) et l'absorbant qui se trouve dans la colonne (phase solide). Ainsi, dans notre cas elle est utilisée pour purifier, mais également pour enrichir notre fraction en composé cible. Au cours de ce travail, nous avons utilisé des colonnes en phase inverse C18 (Supelco, Saint Quentin Fallavier, France) permettant la rétention de composés présentant des groupements hydrophobes.

Dans un premier temps, afin de retirer l'éthanol du vin, 5 ml de vin sont concentrés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif. Puis, le résidu obtenu est dissout dans 20 ml d'eau déionisée pour être purifié sur colonne C18. Après avoir conditionné la colonne avec du méthanol, l'échantillon est déposé sur celle-ci et par application d'un vide en sortie de colonne l'échantillon est percolé sur la colonne. Puis un lavage de la colonne est réalisé à l'aide de 50 ml d'eau déionisée. Enfin, les analytes cibles sont récupérés après élution de la colonne avec 50 ml de méthanol.

Dans un second temps, les fractions ainsi obtenues sont ensuite évaporées sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif et reprises dans 1 ml de méthanol.

Puis, 100 µl de la fraction ainsi obtenue sont mélangés à 100 µl de mélange réactionnel (méthanol contenant 50 g/L de phloroglucinol et 10 g/L d'acide ascorbique). Ce mélange est mis à l'étuve à 50°C pendant 20 minutes puis la réaction est arrêtée par ajout de 200 µl d'acétate de sodium à 200 mM.

Les échantillons sont ensuite filtrés à l'aide de filtres seringue PFTE de porosité 0,45 µm et injectés dans le système HPLC selon la méthode de détection utilisée est celle décrite précédemment (Chapitre II, paragraphe II.3).

La réaction a été réalisée trois fois (triplicatas biologiques) et chaque échantillon a été injecté trois fois.

II.5.d. Expression des résultats

L'analyse chromatographique permet de doser les différentes unités (terminales et d'extension) grâce à leur temps de rétention ainsi que leur spectre d'absorption. Un spectre d'absorption couplé à un spectre de masse a été réalisé afin de valider la méthode.

Afin de déterminer les concentrations de chaque échantillon, les coefficients de proportionnalité déterminés par Kennedy ont été utilisés (Kennedy et al., 2001).

Le degré de polymérisation moyen (DPm) est calculé comme suit :

$$\mathrm{DPm} = \frac{\sum \text{concentrations en unités terminales} + \sum \text{concentrations en unités d'extension}}{\sum \text{concentrations en unités terminales}}$$

Le pourcentage de galloylation (% G) est calculé comme suit :

$$\%\,\mathrm{G} = \frac{\sum \text{concentration en unités terminales (ECG)} + \sum \text{concentration en unités d'extension}(\mathrm{ECG} - \mathrm{P})}{\sum \text{concentration en unités terminales} + \sum \text{concentration en unités d'extension}}$$

III. Etude transcriptomique

L'étude transcriptomique a porté sur l'analyse du niveau d'expression des gènes d'intérêt liés au métabolisme des tanins (*VvLAR1*, *VvLAR2* et *VvANR*) et est résumée **Figure 28.**

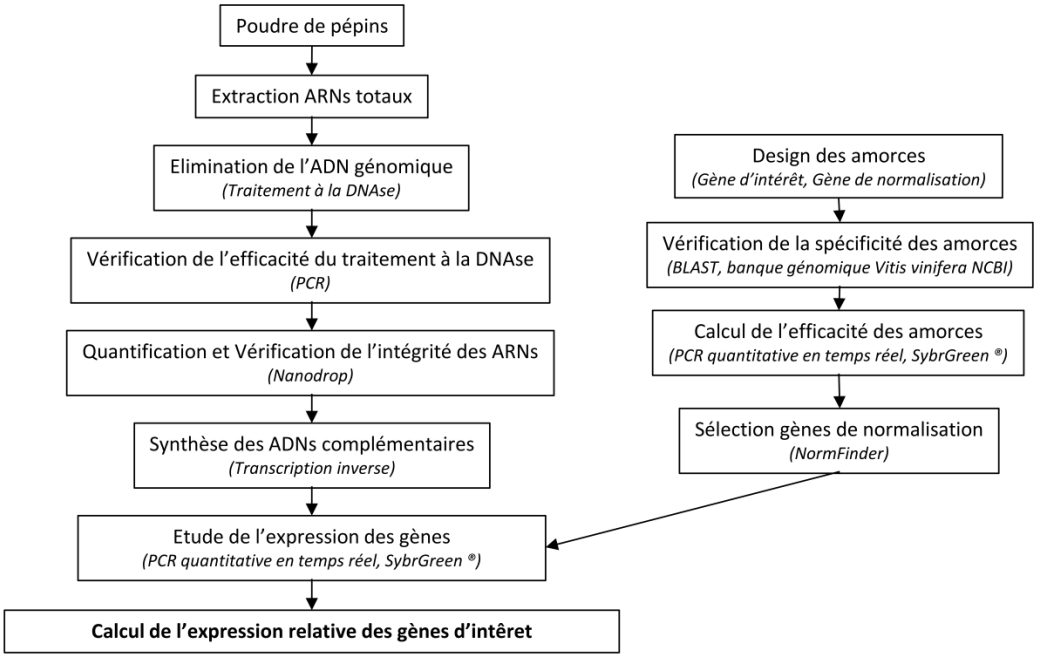


Figure 28 : Plan expérimental de l'étude transcriptomique

III.1. Les solvants et les réactifs

L'eau déionisée a été purifiée à l'aide d'un système MilliQ (Merck, Darmstadt, Allemagne). L'eau utilisée pour la biologie moléculaire (stérile, exempte de DNases, RNases et protéases) a été achetée chez Merck (Merck, Darmstadt, Allemagne). Le Tris-HCL (molecular grade), 1M, pH 8.0 a été acheté chez Fisher scientific (Illkirch, France). Le tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) 50X, pH 8.0 a été acheté chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Le 2-Mercaptoéthanol, le perchlorate de sodium ($NaClO_4$), l'agarose, le marqueur de poids moléculaire (100-1500 paires de bases), le bromure d'éthidium (BET) et le polyéthylène glycol 4000 (PEG 4000) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). La solution de sodium dodécyl sulfate 20 % (SDS) et la poly(vinylpolypyrrolidone) (PVPP) ont été achetés chez Fischer scientific (Illkirch, France). La Go Taq polymérase, les dNTPs, les oligo(dT)15 primers ont été achetés chez Promega (Charbonnières-les-Bains, France). Le SYBR Green supermix a été acheté chez Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Les amorces ont été achetées chez Eurofins Scientific (Paris, France).

Les kits d'extractions d'ARNs « RNeasy Plant Mini Kit», les kits de traitement DNAse, les kits de purification et concentration des ARNs et les kits de transcriptions inverses ont été respectivement

achetés chez Qiagen (Courtaboeuf, France), Ozyme (Saint-Cyr-l'Ecole, France), Thermo Fisher (Saint-Herblain, France) et Fisher (Illkirch, France).

III.2. Extraction des ARNs totaux

Les extractions des ARNs totaux du pépin de raisin sont réalisées à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit ». Le principe du kit repose sur trois étapes essentielles : une lyse des cellules, l'adsorption des ARNs sur une membrane de silice, et l'élution des ARNs.

Les pépins étant riches en polyphénols et polysaccharides, une étape préliminaire de lyse a été supplémentée à celle proposée par le kit afin de réduire la formation de complexes insolubles liés à l'interaction des polyphénols et des polysaccharides avec les ARNs (Birtić et al., 2006; Gambino et al., 2008; Salzman et al., 1999).

Pour cette étape supplémentaire, la composition du tampon d'extraction est :

- 2 % (p/v) PEG 4000 ;
- 2 M $NaClO_4$;
- 2 % (p/v) PVPP ;
- 20 % (v/v) SDS ;
- 1 M Tris-HCl pH 8 ;
- 2 % (v/v) 2-Mercaptoéthanol.

Cent mg de poudre de pépins est mélangé à 1 ml de tampon d'extraction dans un tube Eppendorf stérile, puis placé sous forte agitation (1500 rpm) à 65°C pendant 30 minutes dans un Thermal Shaker lite (VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

Le mélange obtenu est ensuite transféré sur la colonne Qia Schredder fournie dans le kit puis centrifugé à 10 000 G, à 18°C pendant 2 minutes. Dans un tube Eppendorf stérile, un volume d'éthanol 100 % est mélangé au filtrat obtenu, puis centrifugé à 10 000 g, à 18°C pendant 15 minutes. Le culot obtenu est repris dans 100 µl d'eau DEPC, 450 µl de tampon de lyse fourni dans le kit, 3,5 µl de 2-Mercaptoéthanol et 100 µl d'éthanol 100 %. La totalité de l'échantillon est ensuite transférée sur la colonne RNeasy fournie dans le kit puis centrifugée à 8000 g à 18°C pendant 1 minute. Six étapes de lavages consécutives sont ensuite réalisées :

- Tampon RW1 (fourni dans le kit) : 2 fois
- Tampon RPE (fourni dans le kit) : 4 fois

Entre chaque lavage, la colonne est centrifugée à 8000 g, à 18°C pendant 1 minute.

La colonne est éluée après transfert sur un tube Eppendorf stérile par 30 µl d'eau DEPC sont déposés. La colonne est centrifugée à 8000 g, à 18°C pendant une minute. Cette étape est répétée deux fois.

Pour chaque extraction, la teneur et la pureté des ARNs extraits sont évaluées par spectrophotométrie à 230 nm, 260 nm et 280 nm à l'aide d'un NanoDrop™ 3300. Afin de vérifier la qualité et l'intégrité des ARNs totaux obtenus, un mélange d'1 µg d'ARN et 5 µl de tampon de charge 6X (0,03% de bleu de bromophénol, 0,03% de xylène cyanol FF, 60 mM EDTA, pH 7,6, et 60% de glycérol dans de l'eau DEPC) est déposé sur gel d'agarose 1 % (p/v) dissout dans du tampon TAE 1X (Tris-Base 2,42 g/L, acide acétique 0,057 % (v/v), EDTA 0,5 mM pH 8.0). La migration s'effectue ensuite dans du tampon TAE 1X à un voltage constant de 100 mV. Les acides nucléiques, qui sont chargés négativement, migrent vers l'anode plus ou moins loin dans le gel en fonction de leur masse et de leur encombrement stérique. Une fois la migration terminée, le gel est mis à révéler dans une solution contenant du tampon TAE 1X auquel sont ajoutées quelques gouttes de BET permettant la révélation de la présence des ARNs sous rayonnement UV. Après observation du gel, trois bandes sont détectées : une première correspondant à l'ADN génomique, une deuxième correspondant aux ARNs ribosomiques 28S et une troisième correspondant aux ARNs ribosomiques 18S. L'observation de ces deux dernières bandes validant la présence d'ARNs dans nos échantillons, le traitement à la désoxyribonucléase (DNase) est réalisé afin d'éliminer l'ADN génomique restant.

III.3. Elimination de l'ADN génomique des extraits d'ARN

III.3.a. Traitement à la DNAse

Le traitement à la DNase est réalisé avec l'utilisation d'un kit RTS (Room Temperature Stable) DNase (RTS DNase™ Kit, MO Bio Laboratories, US). Un volume contenant jusqu'à 30 µg d'ARN totaux extraits est mélangé avec 10 unités (1 µL) de DNase, 0,1 volume de tampon réactionnel (Buffer 10X), et un volume d'eau DEPC. Le mélange est mis à incuber à 37°C dans un thermocycleur (MJ Mini Thermo cycler, Bio-Rad, USA) pendant 20 minutes pour l'hydrolyse de l'ADN génomique. Puis, 0,1 volume de résines (RTS DNase removal resin) est ajouté dans le mélange qui est ensuite incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Une agitation toutes les minutes est réalisée pour une bonne dispersion des résines qui vont éliminer l'ADN génomique hydrolysé. Après centrifugation à température ambiante pendant 1 minute à 13000 g, le surnageant contenant les ARNs totaux purifiés est récupéré et transféré dans un nouveau tube Eppendorf stérile. Les ARNs obtenus sont à nouveau dosés par Nanodrop et analysés par électrophorèse.

III.3.b. Vérification de l'efficacité du traitement à la DNAse

Afin de valider l'absence d'ADN génomique, une PCR des extraits d'ARN purifiés est effectuée à l'aide d'un thermocycleur suivie d'une électrophorèse dans les conditions décrites précédemment (Chapitre II, paragraphe III.2).

Les amorces utilisées pour cette étape sont spécifiques au gène constitutif *VvGAPDH* (**Tableau 13**). Dans un tube Eppendorf stérile, 2 µl d'ARNs dilués au vingtième sont mélangés au mix réactionnel décrit dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Composition du mix réactionnel de la PCR qualité

	Concentration	Volume (µl)
Tampon GoTaq ® Reaction Buffer	5X	4,3
dNTP	10 mM	0,43
$MgCl_2$	25 mM	1,43
Amorce sens	1 mM	0,7
Amorce anti-sens	1 mM	0,7
GoTaq Polymérase	5 U/µl	0,07
H_2O DEPC	-	12,37
		Volume final = 20 µl

Les tubes sont placés dans un thermocycleur et soumis au programme suivant :

- Dénaturation initiale de l'ADN : 95 °C pendant 2 minutes,
- 40 cycles d'amplification avec :
  - Dénaturation de l'ADN cible : 95°C
  - Hybridation des amorces : 60°C
  - Élongation de l'ADN : 72°C
- Phase finale d'extension : 75°C pendant 5 minutes

Les mélanges sont ensuite déposés sur gel pour valider l'absence de bandes d'ADNs.

III.4. Quantification et vérification de l'intégrité des ARNs

III.4.a. Quantification des ARNs totaux

La concentration en ARNs totaux est mesurée à 260nm selon l'équation de la loi de Beer-Lambert :

$$\text{C massique} = \frac{\text{A x } \varepsilon}{\text{l}}$$

Avec :

- C massique = concentration massique d'acide nucléique en ng/µl
- A = Absorbance à 260 nm
- ε = Coefficient d'extinction molaire ($ng.cm^{-1}.\mu l^{-1}$)
- l = trajet optique en cm

III.4.b. Pureté et qualité des ARNs totaux

Afin de vérifier la pureté des échantillons d'acides nucléiques, les absorbances à 280 nm et 230 nm sont mesurées et les ratios des absorbances 260/280 nm et 260/230 nm sont calculés dans le but de détecter des éventuelles contaminations avec des protéines, des polysaccharides, des peptides, des carbohydrates, du phénol, ou encore de l'isothiocyanate de guanidine.

Puis, afin de vérifier la qualité des ARNs après traitement DNAse, une électrophorèse est réalisée dans les conditions énoncées précédemment (Chapitre II, paragraphe III.2). L'élimination de la première bande observée avant le traitement valide l'efficacité du traitement DNAse. L'observation des deux bandes correspondantes aux ARNs ribosomiques indique que les ARNs ne se sont pas dégradés suite au traitement.

Les ARN messagers (ARNm), contenus dans les extraits d'ARNs totaux peuvent alors être utilisés comme matrice pour la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) par la technique de transcription inverse (RT, reverse transcription).

III.5. Synthèse des ADNc complémentaires

La synthèse d'ADNc a été réalisée en utilisant le kit de transcription inverse d'Invitrogen Superscript® III (Fisher, Illkirch, France) à partir de 200 ng d'ARNs totaux.

Dans un premier temps, des dilutions de tous les extraits d'ARNs totaux dans de l'eau DEPC sont réalisées afin d'obtenir une concentration en ARNs égale à 18,2 ng/µl. Puis, 200 ng d'ARNs (correspondant à un volume de 11 µl) sont mélangés à 1 µl d'oligodT(15) primers 50 mM et 1 µl de dNTPs 10 mM. Ils sont ensuite dénaturés par chauffage à 65 °C pendant 5 minutes dans un thermocycleur, puis placés dans la glace pendant 5 minutes afin d'éviter la reformation de structures secondaires.

Dans un second temps, les 200 ng d'ARNs sont mélangés au mix réactionnel décrit dans le **Tableau 11** puis ce mélange est incubé dans un thermocycleur à 50 °C pendant 2 heures (synthèse de l'ADNc), puis à 70 °C pendant 15 minutes (destruction de l'ARN résiduel).

Tableau 11 : Composition du mix réactionnel pour la synthèse d'ADNc à partir de 200 ng d'ARNs dénaturés

	Concentration	Volume (µl)
Tampon réactionnel (5X First-Strand Buffer)	5X	4
DTT	0.1 M	1
Inhibiteur de RNase (RNaseOUT™)	40 U/µl	1
Transcriptase Inverse (SuperScript™ III RT)	200 U/µl	1
Mix ARNs – OligodT(15) - dNTPs	-	11
		Volume final = 20 µl

Les ADNc sont ensuite dilués au 1/20ème dans de l'eau stérile puis stockés au -20 °C jusqu'à utilisation. Le reste des ARNs sont quant à eux stockés à -80°C.

III.6. Etude de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel

III.6.a. Principe

À la différence de la PCR classique, la PCR en temps réel permet un suivi de l'amplification des ADNc tout au long de l'analyse *via* une révélation directe des produits amplifiés dans le milieu réactionnel. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Il existe deux principes généraux pour la détection des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (Sybr Green5® etc), et les sondes fluorescentes (Taqman assay, Molecular Beacons, Scorption Primers etc). Ici, la méthode choisie pour les expériences de PCR quantitative en temps réel utilise le Sybr Green®.

Dans le mélange réactionnel, le Sybr Green® libre en solution émet peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, l'agent intercalant se fixe à l'ADN double brin naissant, augmentant alors la fluorescence de l'échantillon (**Figure 29**). Ainsi, l'augmentation du signal fluorescent est observée pendant l'étape de polymérisation en temps réel grâce à un système de lecture intégré au thermocycleur à la fin de chaque étape d'élongation, pour chacun des cycles (Poitras et al., 2002). Les threshold cycles ou cycles seuils correspondent au nombre de cycles à partir desquels la fluorescence émise par le produit de PCR est égale au seuil de détection du fluorimètre, le seuil de détection étant significativement plus élevé que le niveau de fluorescence de base.

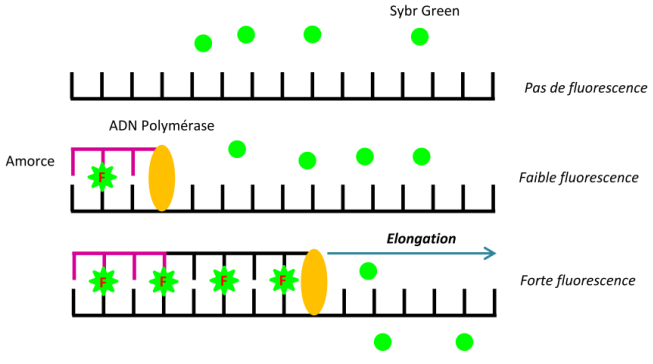


Figure 29 : qPCR en temps réel : principe du Sybr Green®

III.6.b. Design des amorces de qPCR

Les séquences d'ADN complémentaires des gènes de la vigne ont été recherchées dans la base de données NCBI. Les amorces ont été définies à partir des séquences d'ADNc des gènes d'intérêt *via* le site « Primer 3 plus ». Afin d'éviter toute formation de dimères d'amorces lors de la PCR, les conditions suivantes ont été imposées pour chaque définition d'amorce:

- Taille de l'amplicon : 100 à 250 paires de bases ;
- Température d'hybridation optimale : 60 °C ;
- Taille des amorces : 20 à 24 paires de bases ;
- Pourcentage de G/C : autour de 50% ;
- Nombre de bases autocomplémentaires en 3' : inférieur à 4.

Plusieurs couples d'amorces ont été définis pour chaque gène d'intérêt. Afin de vérifier la spécificité de chaque couple d'amorces, des alignements de séquences ont été systématiquement effectués avec le logiciel Nucleotide BLAST. Ainsi, seules les amorces s'alignant parfaitement et uniquement avec les séquences d'ADNc de nos gènes d'intérêts ont été conservées.

Puis, l'efficacité d'amplification de chaque couple d'amorces a été calculée. Elle se définit comme la proportion de duplication moyenne d'ADN cible pour chaque cycle d'amplification et doit être comprise entre 0 et 1 (la valeur 0 signifiant qu'aucune amplification ne s'est produite, la valeur 1 signifiant qu'une molécule d'ADN a généré deux amplicons après chaque cycle de PCR). Elle est définie par l'équation suivante :

$$N = N_0(1 + E)^{Ct}$$

Ou en échelle logarithmique :

$$\mathrm{Log}(N_0) = \mathrm{Log}(N) - \mathrm{Log}\,[(E + 1)^{Ct}]$$

Avec :

- N : Nombre de copies d'ADN nouvellement synthétisé
- N_0 : Nombre de copies d'ADN initialement présentes
- E : Efficacité d'amplification
- Ct : Cycle seuil pour lequel la valeur de la courbe de fluorescence franchit le seuil de fluorescence

Pour ce faire, un mélange d'1 µl de tous nos échantillons a été réalisé. Des dilutions en série de ce mélange ont été effectuées afin d'obtenir une gamme de concentration s'étalant de 10 ng/µl à 10 fg/µL. Puis, 2,5 µl d'ADNc ont été mélangés au mix réactionnel décrit **Tableau 12**.

Tableau 12 : Composition du mix réactionnel de la qPCR

	Concentration	Volume (µl)
Sybr Green Supermix®	5X	5
Amorce sens	1 mM	0,25
Amorce anti-sens	1 mM	0,25
Matrice ADNc	-	2,5
Eau DEPC	-	2
		Volume final = 10 µl

Puis, le mélange a été placé dans un thermocycleur et est soumis au programme suivant :

- Etape 1 : Dénaturation de l'ADNc
  - 95 °C pendant 3 minutes
- Etape 2 : Amplification de l'ADNc
  - Dénaturation : 95°C pendant 10 secondes
  - Hybridation des amorces : 60°C pendant 20 secondes
  - Elongation : 72°C pendant 10 secondes

L'étape 2 est répétée 40 fois, et la fluorescence de l'échantillon est mesurée à la fin de chaque cycle.

- Etape 3 : Courbes de fusion
  - A partir de 60°C, augmentation progressive de 0,5°C toutes les 10 secondes jusqu'à 95°C avec mesure de la fluorescence à chaque palier.

Chaque couple d'amorces est ensuite testé sur cette gamme d'ADNc avec le programme de PCR détaillé ci-dessus. À l'issue de la PCR, les courbes représentant l'évolution des C_t en fonction des Log (N_o) sont tracées pour chaque couple d'amorces. L'efficacité de la réaction peut alors être déterminée comme suit :

$$E = 10^{-1/pente} - 1$$

Le couple d'amorces est validé dès lors que l'efficacité est comprise entre 90 et 105 %, avec un coefficient de détermination R^2 supérieur à 0,98.

Les amorces utilisées pour l'étude de l'expression des gènes en qPCR en temps réel sont répertoriées **Tableau 13**. Neuf gènes ont été étudiés. Parmi eux, six gènes exprimés constitutivement, communément appelés gènes de ménage :

- *VvEF1α* codant la chaîne alpha du facteur d'élongation eF1.
- *VvSAND* codant la famille de protéines SAND. Les fonctions précises de ces protéines ne sont pas bien définies. Néanmoins, toutes ces protéines nucléaires présentent un même domaine conservé nommé SAND. Ils semblent qu'elles soient toutes

impliquées dans le remodelage de la chromatine, permettant d'activer, ou de réprimer la transcription de l'ADN.

- *VvGAPDH* codant la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, oxydase intervenant dans la glycolyse.
- *VvAct101* et *VvAct7* codant des actines qui sont des protéines impliquées dans de nombreux mouvements intracellulaires (changement de forme, guidage du mouvement des organites, déplacement cellulaire etc…).
- *VvUBS* codant une ubiquitine, enzyme impliquée dans les phénomènes de modifications post-traductionnelles des protéines.

Tableau 13 : Oligonucléotides utilisés en PCR quantitative en temps réel

Gène	Amorce	Séquence 5' → 3'	Nombre de nucléotides	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
VvEF1α	Sens	5'-CTCCAAGGATGACCCTGCTA-3'	20	59,4	150
	Anti-sens	5'-GGGCTCTTTCTCAAGCTCCT-3'	20	59,4	
VvSAND	Sens	5'-TTTAGGCCAGCACAAACTTCC-3'	20	57,9	240
	Anti-sens	5'-CCCAGCAGAGGAGAACATG-3'	20	59,4	
VvGAPDH	Sens	5'-GGTGGTTGACCTCACTGT-3'	20	59,4	147
	Anti-sens	5'-GAGTGCTATTCCAGCCTT -3'	20	59,4	
VvACT101	Sens	5'-ATTCCTCACCATCATCAGCA-3'	20	55,3	113
	Anti-sens	5'-GACCCCCTCCTACTAAAACT-3'	20	57,3	
VvACT7	Sens	5'-CTTGCATCCCTCAGCACCTT-3'	20	59,3	126
	Anti-sens	5'-TCCTGTGGACAATGGATGGA-3'	20	57,3	
VvUBS	Sens	5'-CACTTTTCAGCCTTGGCACT-3'	20	60,4	204
	Anti-sens	5'-ATGCCCTCACCATAAAGCAG-3'	20	60,1	
VvLAR1	Sens	5'-CTGAGGTTCTTCCTCCAACG-3'	20	59,4	178
	Anti-sens	5'-GGGAAGTGTCCTCCCAATCT-3'	20	59,4	
VvLAR2	Sens	5'-CAATACCCACCCTGCTGACG-3'	20	61,4	179
	Anti-sens	5'-CCGATCTTCTTCTCCCACAG-3'	20	59,4	
VvANR	Sens	5'-GGACAGGTCTGGTTGTGGAT-3'	20	59,4	133
	Anti-sens	5'-GGCCATCAGAGTAGGGATGA-3'	20	59,4	

III.6.c. PCR quantitative en temps réel

L'expression de chaque gène a été mesurée sur tous nos échantillons par qPCR selon le protocole décrit précédemment (Chapitre II, paragraphe III.6.b). Au cours de ce travail, les différences d'expression entre chaque stade de maturité sont exprimées de manière relative c'est-à-dire que les changements d'expression de nos gènes d'intérêt sont comparés à l'expression d'un gène de ménage stable dans le temps.

III.6.c.i) Sélection des gènes de normalisation

Une des difficultés majeures rencontrées lors des expériences de RT-PCR quantitative est le choix du gène de normalisation dit gène de ménage. En effet, il apparaît très difficile, voire impossible qu'un seul gène soit constitutivement exprimé de manière stable dans un ensemble d'échantillons. C'est

pourquoi nous avons choisi de tester six gènes de ménages différents : *VvSAND, VvAct101, VvEF1α* , *VvGAPDH, VvAct7* et *VvUBS.*

Afin de s'assurer de l'invariance de ces six gènes, leur expression a été mesurée en triplicat sur tous nos échantillons par qPCR. Puis, les données issues de ces expériences ont été soumises au logiciel « NormFinder » développé par (Andersen et al., 2004). Ce logiciel utilise un algorithme permettant d'estimer la variation d'expression d'un même gène entre deux ou plusieurs conditions expérimentales et ainsi d'estimer l'erreur systématique qui sera introduite dans nos résultats d'expérience pour chaque gène de ménage testé. Les niveaux de stabilité des six gènes de ménages testés apparaissent dans la **Figure 30**.

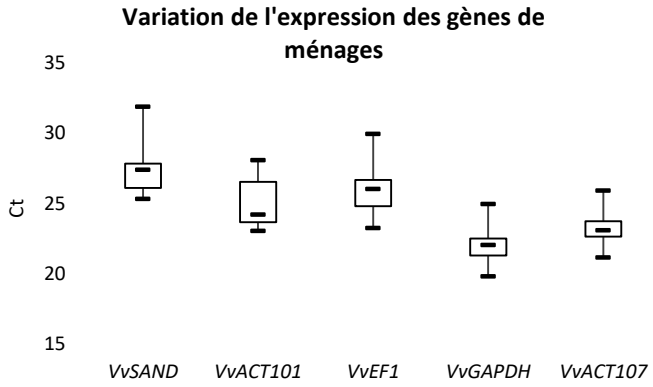


Figure 30 : Variation de l'expression des gènes de ménage

Après avoir évalué l'expression des six gènes, le gène *VvGAPDH* a été choisi comme gène de normalisation d'expression relative pour tout notre travail.

III.6.c.ii) Expression des résultats

L'analyse des données et la détermination de l'expression relative ont été réalisées selon la méthode du « $2^{\wedge\Delta\Delta CT}$ » (Livak et al., 2001) :

$$\Delta C_T = C_{T\ Gène\ cible} - C_{T\ Gène\ de\ référence}$$

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_{Condition\ contrôle} - (\Delta C_T)_{Condition\ expérimentale}$$

Lorsque :

- $2^{-\Delta\Delta CT} > 1$: le gène étudié est surexprimé dans la condition expérimentale par rapport à la condition contrôle.
- $2^{-\Delta\Delta CT} < 1$: le gène étudié est sous-exprimé dans la condition expérimentale par rapport à la condition contrôle.

IV. Étude de la localisation des tanins de pépins

Cette approche a pour objectif de caractériser tout au long de la maturité de la baie (i) le lieu de biosynthèse cellulaire des tanins de pépins et (ii) la localisation des tanins dans les assises tissulaires du pépin.

IV.1. Détermination du lieu de biosynthèse des tanins de pépins

La localisation des trois dernières enzymes de la voie de biosynthèse des tanins (LAR1, LAR2 et ANR) a été réalisée par immunomarquage sur des pépins de Cabernet Sauvignon en 2017 aux stades fermeture de grappe et véraison. Pour chacun des échantillons, dix pépins frais issus de dix baies différentes ont été disséqués à l'aide d'un scalpel stérile puis cryofixés afin de pouvoir réaliser les coupes et les immunomarquages selon le plan expérimental **Figure 31**. Ces expériences ont été effectuées en collaboration avec la plateforme d'imagerie Bordeaux Imaging Center (BIC).

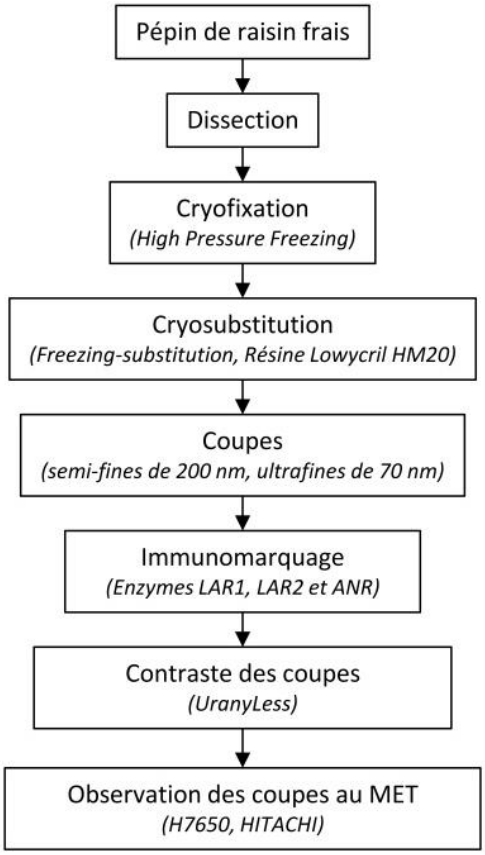


Figure 31 : Plan expérimental de l'étude de la localisation des enzymes LAR1, LAR2 et ANR responsables de la synthèse des flavanols

IV.1.a. Préparation des échantillons

Pour chacun des pépins, des sections d'environ 100 à 200 μm^3 ont été disséquées dans l'enveloppe externe du pépin (**Figure 32**).

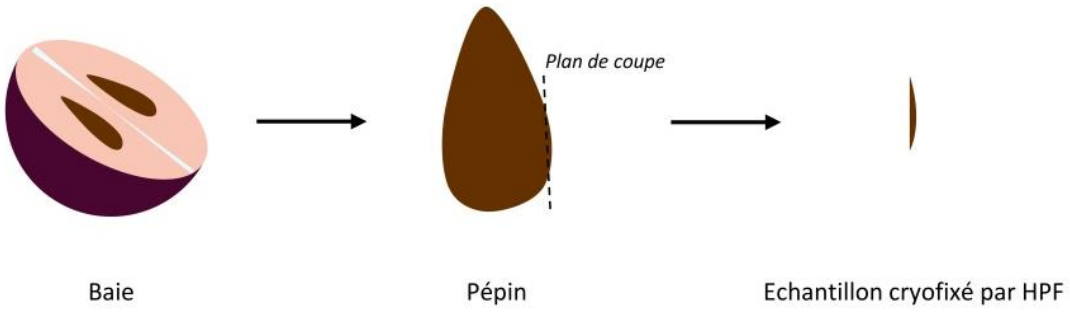


Figure 32 : Préparation des pépins à la cryofixation : plan de coupe

Puis, les échantillons ont été fixés par cryofixation selon la technique de congélation haute pression (HPF, EM HPM100, LEICA, Wetzlar, Allemagne) dont le principe repose sur la congélation ultrarapide et sous haute pression (2050 bars) de l'eau présente dans l'échantillon. L'eau passe directement de l'état liquide à l'état vitreux, ce qui permet d'éviter la formation de cristaux de glace, et donc de maintenir l'intégrité de l'échantillon tout en le conservant sous sa forme hydratée. Les échantillons sont ensuite conservés à très basse température (-190°C) dans une cryothèque, jusqu'à leur inclusion.

IV.1.a.i) Inclusion des échantillons

Dans le but de maintenir les structures cellulaires du pépin, ainsi que de pouvoir réaliser un immunomarquage de qualité (préservation de l'immunogénicité des tissus), l'inclusion des échantillons a été réalisée par cryosubstitution (freeze-substitution ou FS). Les échantillons ont été inclus dans une résine Lowycril HM20 afin de substituer l'eau congelée sans altérer l'ultrastructure de l'échantillon. Cette étape se réalise en trois phases principales qui sont : la déshydratation de l'échantillon, l'infiltration de la résine, et la polymérisation de cette dernière.

Les échantillons cryofixés sont inclus par des bains successifs à l'aide d'un appareil de cryosubstitution (AFS, LEICA, Wetzlar, Allemagne). Dans un premier temps, les échantillons sont placés dans des moules à plat à -90°C dans un bain d'acétone déshydraté pendant 72 heures. Puis, la température est progressivement augmentée de 3°C par heure jusqu'à atteindre -50°C. Les échantillons sont ensuite deux fois rincés dans un bain d'éthanol pendant une heure ; puis, toujours à -50°C, placés dans des bains successifs d'éthanol-résine HM20 selon le programme suivant : 30 % HM20/éthanol pendant 18 heures, 60 % HM20/éthanol pendant 24 heures, 100 % HM20 pendant 24 heures, puis 100% HM20 pendant 50 heures. Les échantillons sont ensuite placés sous UV à -50°C pendant 48 heures, puis la température est progressivement augmentée pour atteindre 20°C. Afin de terminer la polymérisation de la résine, une dernière étape est réalisée en plaçant les échantillons sous UV à température ambiante pendant 48 heures.

IV.1.a.ii) Coupes

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Ultracut-UCT, LEICA, Wetzlar, Allemagne). Deux types de coupes sont nécessaires :

- des coupes semi-fines de 200 nm, réalisées au couteau de verre, déposées sur lame de verre et colorées au bleu de toluidine pour observation au microscope optique afin de vérifier l'intégrité des échantillons, et de repérer les zones d'intérêt ;
- des coupes ultrafines de 70 nm, réalisées à l'aide d'un couteau de diamant, puis récupérées sur grilles de cuivre pour l'observation de l'ultrastructure des coupes et sur grilles de nickel préalablement filmées au Bulvar (1%) pour l'immunomarquage.

IV.1.b. Immunomarquages

IV.1.b.i) Synthèse des anticorps

Les anticorps primaires utilisés au cours de ce travail sont des anticorps polyclonaux, car ils reconnaissent, plusieurs épitopes d'un même antigène et présentent la capacité de tolérer les changements de nature des antigènes ainsi que de détecter des protéines dénaturées.

Les anticorps primaires polyclonaux dirigés contre les protéines LAR1, LAR2 et ANR ont été produits chez trois espèces différentes qui sont respectivement le lapin, la souris et le rat (BIOTEM, Apprieu, France). Le **Tableau 14** récapitule les numéros d'accession, la taille, la masse des protéines ainsi que les séquences des peptides immunogènes dirigés contre les protéines LAR1, LAR2 et ANR.

Tableau 14 : Caractéristiques des protéines LAR 1, LAR 2 et ANR étudiées en immunomarquage

Protéine	UniProtKB/Swiss-Prot	Taille (AA)	Masse (Da)	Peptide immunogène synthétisé
Leuanthocyanidine réductase 1	QDH44602.1	346	38,019	RPGPRSPSKAKIFKC
Leuanthocyanidine réductase 2	QDH44603.1	362	39,053	TIKTINDDRTVNKSC
Anthocyanidine réductase	D7U6G6.1	338	36,735	TTVRDPDNQKKVSHC

Afin de s'assurer de la spécificité des peptides immunogènes envers les protéines d'intérêt, leurs séquences ont été blastées dans la banque protéique NCBI *Vitis vinifera* (**Figure 33**).

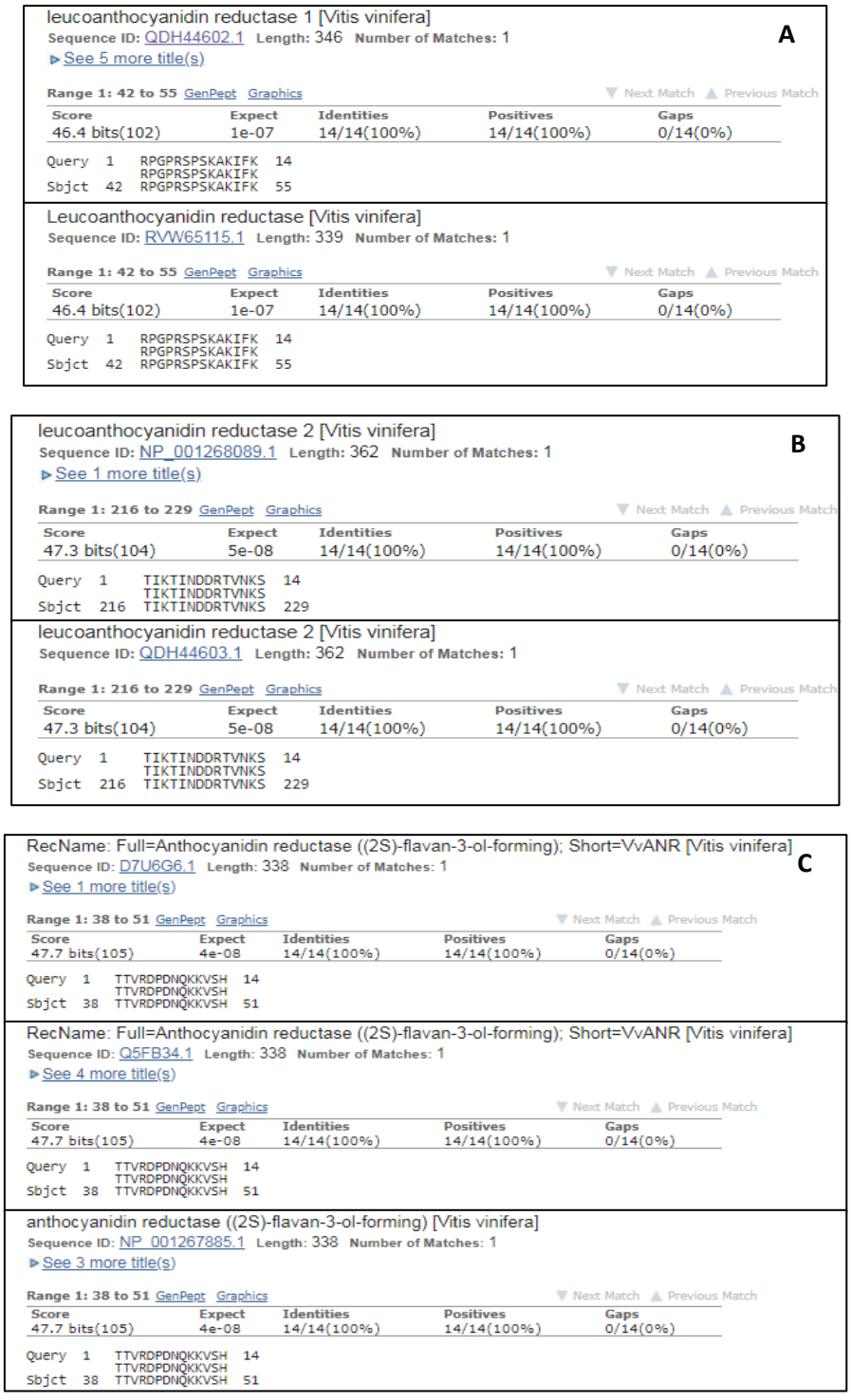


Figure 33 : Blast du peptide immunogène dirigé contre la protéine LAR 1 (A), contre la protéine LAR 2 (B) et contre la protéine ANR (C)

La séquence du peptide immunogène dirigé contre la protéine LAR1 (**Figure 33**) est reconnue à 100% par deux protéines de *Vitis vinifera* de 346 (QDH44602.1) et 369 (RVW65115.1) acides aminés dont notre protéine d'intérêt (QDH44602.1). En ce qui concerne la protéine LAR2, le blast du peptide antigénique a révélé 100 % d'homologie avec deux protéines LAR2 de *Vitis vinifera* de 362 acides aminés (QDH44603.1 et NP_001268089.1), dont notre protéine d'intérêt (QDH44603.1). Enfin, le

peptide dirigé contre la protéine ANR présente 100 % d'homologie avec trois protéines de *Vitis vinifera* (D7U6G6.1, Q5FB34.1 et NP_001267885) de 338 acides aminés, dont notre protéine d'intérêt (D7U6G6.1).

Les animaux ont subi chacun quatre immunisations. Avant la première immunisation et après la dernière, les sérums ont été contrôlés par ELISA. La méthode choisie pour la purification des anticorps est la chromatographie d'affinité sur protéine G sépharose 4 fast flow. La pureté des produits est vérifiée par SDS-PAGE (polyacrylamide 13,5 %, en conditions dénaturantes, coloration au bleu de Coomassie).

À l'issue de la purification, les volumes et les concentrations en anticorps obtenus pour chaque anticorps primaire purifié sont les suivants :

- Anti-LAR1 : 70 ml à 8,8 mg/ml
- Anti-LAR2 : 4 ml à 7,4 mg/ml
- Anti-ANR : 12 ml à 3,6 mg/ml

IV.1.b.ii) Vérification de la spécificité des anticorps primaires polyclonaux

Les travaux de Lacampagne (2010) ont permis de vérifier la spécificité des anticorps primaires polyclonaux envers les protéines d'intérêt par le biais de *western-blot* sur des extraits de protéines totales de pellicules de baies de raisin ou de fleurs de vigne. Les expériences concernant les protéines LAR1 et LAR2 ont été menées sur des pellicules de baies vertes de Cabernet Sauvignon, tandis que celles concernant la protéine ANR ont été réalisées sur des fleurs de Merlot.

Extraction des protéines totales

(1) Extraction des protéines totales

Le protocole utilisé pour l'extraction des protéines totales est mis au point par Deytieux (Deytieux, 2005).

Les pellicules de 20 baies ont été séparées et broyées finement dans l'azote liquide. De la même façon, 2 g de fleurs de vigne ont été broyés. Dans un tube à téflon pour centrifugeuse, trois volumes de tampon d'extraction (p/v) sont mélangés au matériel végétal.

Le tampon d'extraction est composé de :

- PVPP, 1 % ;
- Saccharose, 0,7 M ;
- Chlorure de potassium, 0,1 M ;

- Tampon Tris HCl pH 7,5, 0,5 M ;
- EDTA, 10 mM ;
- PMSF dissous dans l'éthanol, 1 mM ;
- B mercaptoéthanol, 2 %.

Dans un premier temps ce mélange est mis sous agitation à 4°C pendant 30 minutes, puis un volume égal d'une solution de phénol (Phe-Tris HCl, pH 7,5) est ajouté au mélange, et le tout est agité et homogénéisé comme décrit précédemment. Le mélange est ensuite centrifugé à 9000 g pendant 30 minutes à 4°C, et la phase supérieure est récupérée. La phase aqueuse est extraite de nouveau par ajout de 2 ml de tampon d'extraction et 2 ml de tampon phénol. Le mélange est ensuite centrifugé, la phase supérieure est récupérée et est additionnée à la précédente.

Afin d'éliminer le maximum d'agents contaminants, la phase phénolique récupérée est lavée trois fois avec un volume égal de tampon d'extraction.

Cinq volumes d'une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M dissous dans du méthanol sont ajoutés à la phase phénolique. Le mélange est placé toute une nuit à -20 °C, et le culot protéique est ensuite récupéré après centrifugation à 9000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot est ensuite lavé à l'acétate d'ammonium 0,1 M, puis deux fois au méthanol froid, et enfin deux fois à l'acétone 80 % froid. À chaque lavage, le culot est vortexé dans la solution de lavage puis est soniqué 3 fois 1 minute. Les tubes sont ensuite placés au repos pendant 15 minutes à -20 °C avant d'être à nouveau centrifugés à 9000 g pendant 20 minutes à 4°C.

A la fin des lavages, le culot est séché sous flux d'azote.

Western Blot

Les culots protéiques sont repris dans du tampon Laemmli (Tris HCl 0,05 M ; pH 6,8 ; SDS 2 % ; saccharose 5 % ; DTT 0,1 M ; bleu de bromophénol 0,5 g/L). Ils sont ensuite solubilisés pendant 3 minutes à 100°C, puis, les échantillons sont mis à migrer en gel de polyacrylamide (10 %).

Dans le but de transférer les protéines sur membrane de nitrocellulose, une membrane et 4 papiers Whatman 3M sont découpés à la taille du gel et trempés dans le tampon de transfert constitué de Tris 25 mM, Glycine 200 mM et méthanol 20 %. Le « sandwich » pour le transfert de protéine est schématisé **Figure 34**.

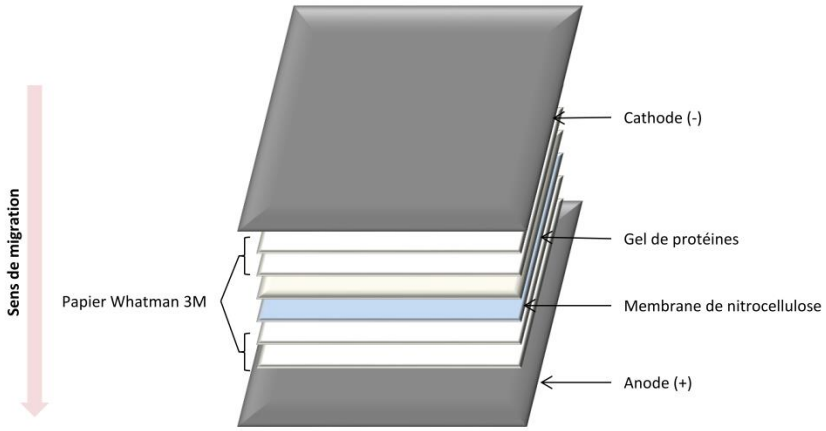


Figure 34 : Montage du transfert de protéine sur membrane de nitrocellulose

La membrane est saturée avec une solution de blocage (Lait écrémé 5 % ; Tris 10 mM ; pH 7,5 ; NaCl 100 mM ; Tween 20 0,1 %) pendant une heure à température ambiante. La membrane est ensuite rincée, puis incubée pendant 1 heure avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage (volume de tampon = 0,1 ml/cm² de membrane). La membrane est ensuite lavée avec un premier tampon de lavage (Tris 10 mM ; pH 7,5, NaCl 1M ; Tween 20 0,25 %) pendant 30 minutes sous agitation, avec changement du tampon toutes les 5 minutes. Puis, la membrane est lavée deux autres fois pendant 5 minutes dans un deuxième tampon de lavage (Tris 10 mM ; pH 7,5 avec 1 M de NaCl et 0,1 % de Tween 20). La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure avec les anticorps secondaires commerciaux couplés à la peroxydase dilués dans le tampon de blocage (volume de tampon = 0,1 ml/cm² de membrane). La membrane est ensuite lavée avec le premier et le deuxième tampon de lavage, comme décrit précédemment.

Enfin, la membrane est incubée avec le kit de détection (Opti-4CN Substrate Kit de BIO-RAD) pendant 30 minutes sous agitation jusqu'à ce que le niveau de sensibilisation désiré soit atteint. La membrane est ensuite lavée à l'eau distillée pendant 15 minutes et est scannée.

Pour confirmer la spécificité des anticorps contre la protéine ANR, un western-blot a été réalisé sur l'extrait de protéines issu des fleurs de Merlot (**Figure 35**). Deux bandes sont observées à 37 kDa, confirmant la spécificité de l'anticorps pour la protéine ANR. La deuxième bande observée pourrait correspondre à une forme phosphorylée de la protéine. Dans le but de confirmer cette hypothèse, un western-blot sur gel 2D a été réalisé, mais malheureusement les quantités trop faibles d'ANR n'ont pas permis de mener à bien cette expérience.

Pour confirmer la spécificité des anticorps contre LAR1, un western-blot a été réalisé sur des pellicules de baies vertes de Cabernet Sauvignon (Figure 35). Trois bandes sont observées à 25 kDa, confirmant la spécificité de l'anticorps. Comme pour la protéine ANR, les deux autres bandes

observées pourraient correspondre à une forme de phosphorylation de la protéine. Dans le but de confirmer cette hypothèse, un western-blot sur gel 2D a été réalisé, mais malheureusement les quantités trop faibles de LAR1 n'ont pas permis de mener à bien cette expérience. De la même manière, la spécificité des anticorps contre LAR2 a été testée par western-blot (**Figure 35**). Une seule bande est détectée à 38 kDa, confirmant la spécificité de l'anticorps.

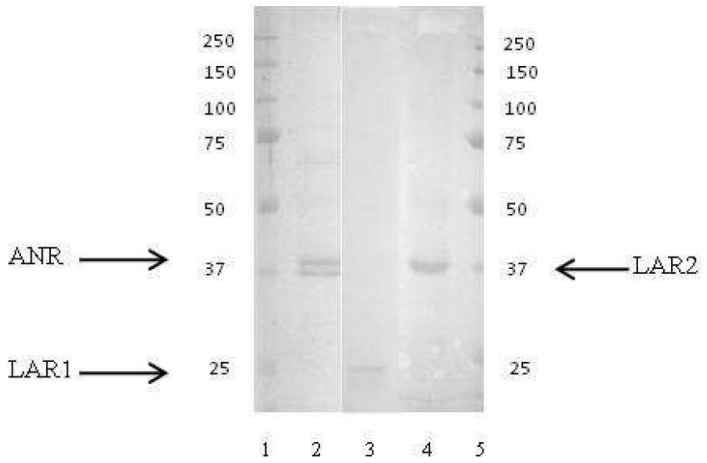


Figure 35 : Western-blot sur protéines extraites de fleurs, ligne 2, et de pellicules de baies vertes, lignes 3 et 4 de Cabernet Sauvignon, d'après Lacampagne (2010).
Ligne 1, marqueur de poids moléculaire (BIO-RAD) ; lignes 2, 3 et 4, extraits protéiques ; Ligne 2 : l'anticorps reconnaît deux bandes protéiques (38 kDa) ; Ligne 3 : l'anticorps reconnait deux bandes protéiques (25 kDa) ; Ligne 4 : l'anticorps reconnaît une bande protéique (38 kDa)

Analyse LC-MS

Une fois les spots des protéines d'intérêt repéré sur le gel de polyacrylamide, ils sont lavés dans un mélange eau-acétonitrile 50 % (v/v) pendant 4 heures, et digéré selon le protocole de Deytieux et al., (2007).

Les mélanges peptidiques résultants sont ensuite analysés par un système HPLC (LC Packings, Amsterdam, Pays-Bas) couplé à un spectromètre de masse équipé d'une trappe linéaire (LTQ OrbiTrap, ThermFinnigan, San Jose, États-Unis). Les peptides sont séparés sur colonne C18 PepMap TM de 15 cm et de 75 µm de diamètre interne, équipée d'une précolonne C18 PepMap de 5 mm et de 300 µm de diamètre interne.

Les solvants utilisés sont les suivants :

- Solvant A : Eau déionisée, 0,1 % acide formique, 5 % acétonitrile
- Solvant B : Eau déionisée, 0,1 % acide formique, 80 % acétonitrile

Le débit de la colonne est de 200 nl/min et les peptides sont élués par gradient linéaire de 5 à 40 % de solvant B en 35 minutes.

Le spectromètre de masse opère en mode positif avec un voltage appliqué de 2 kV. Les données sont enregistrées en alternant un scan MS sur la gamme *m/z* 300-1700 et cinq scans MS/MS en mode exclusion dynamique, chaque ion étant fragmenté 1 seule fois.

Les données issues de la fragmentation MS/MS ont été analysées *via* le logiciel Biowoks (ThermoFinnigan, San Jose, Etats-Unis) utilisant l'algorithme SEQUEST. La banque *Vitis vinifera* de NCBI est ensuite interrogée. L'oxydation des méthionines (+16) et la carbométhylation des cystéines (+57) sont considérées comme modifications différentielles. Seuls les peptides ayant un score de corrélation Xcorr supérieur à 1,9 (peptide monochargé), 2,2 (peptide dichargé), 3,75 (peptide trichargé) et 4 (peptide quadrichargé ou plus) sont retenus. Dans tous les cas, le ΔCn doit être supérieur à 0,1. Les protéines identifiées sur la base d'un peptide unique sont rejetées.

Malheureusement, l'analyse des bandes de gels n'a permis d'identifier aucune des protéines en lien soit avec la faible teneur en protéines de départ, soit en lien avec la potentielle oxydation des méthionines ou carbo-méthylation des cystéines. Néanmoins, au vu des résultats obtenus des Western-Blots, nous décidons de continuer notre étude avec ces anticorps-là.

IV.1.b.iii) Protocole d'immunomarquage

Les immunomarquages ont été réalisés après inclusion à l'aide d'un automate d'immunomarquage IGL (LEICA, Wetzlar, Allemagne).

Les anticorps secondaires utilisés au cours de ce travail sont couplés à des billes d'or colloïdal de diamètre plus ou moins important et leurs caractéristiques sont répertoriées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour la localisation des protéines LAR1, LAR2 et ANR

Protéine	Anticorps primaire	Anticorps secondaire, diamètre des billes d'or
Leuanthocyanidine reductase 1 LAR1	Lapin	Chèvre anti-lapin 6 nm
Leuanthocyanidine reductase 2 LAR2	Souris	Chèvre anti-souris 10 nm
Anthocyanidine réductase ANR	Rat	Chèvre anti-rat 6 nm

Pour chaque échantillon, deux types de contrôle ont été réalisés : un contrôle négatif avec omission de l'anticorps primaire, et un contrôle positif avec l'utilisation d'un anticorps LM20 qui reconnait les domaines homogalacturoniques des chaines pectiques composant les parois cellulaires des cellules végétales. Les différentes étapes du programme utilisé pour réaliser les immunomarquages sont détaillées dans le **Tableau 16**.

Tableau 16 : Protocole détaillé de l'immunomarquage réalisé à l'aide d'un automate : étape, solutions, temps de contact et objectif de chaque étape

Etape	Solution en contact avec les grilles	Temps (minutes)	But de l'étape
1	PBS, 50 mM Glycine	10	Saturation des sites aldéhydes libres
2	PBS, 50 mM Glycine	10	Saturation des sites aldéhydes libres
3	PBS, 1 % BSA	5	Saturation des sites aspécifiques
4	PBS, 1 % BSA	5	Saturation des sites aspécifiques
5	PBS, 0,5 % BSA-C	5	Saturation des sites aspécifiques *(saturation plus fine)*
6	PBS, 0,5 % BSA-C	5	Saturation des sites aspécifiques *(saturation plus fine)*
7	**Anticorps primaire dilué dans une solution de PBS, 0,5 % BSA-C**	**60**	**Liaison de l'anticorps primaire à la protéine d'intérêt**
8	PBS, 0,5 % BSA-C	5	Lavage
9	PBS, 0,5 % BSA-C	5	Lavage
10	PBS, 0,5 % BSA-C	5	Lavage
11	**Anticorps secondaire dilué dans une solution de PBS, 1 % BSA-C**	**90**	**Liaison de l'anticorps secondaire couplé à l'anticorps primaire**
12	PBS, 1 % BSA	5	Lavage
13	PBS, 1 % BSA	5	Lavage
14	PBS, 1 % BSA	5	Lavage
15	PBS	5	Lavage
16	PBS	5	Lavage
17	PBS	5	Lavage
18	**PBS, 1 % Glutaraldéhyde**	**2**	**Fixation**
19	PBS	5	Lavage
20	PBS	5	Lavage
21	Eau distillée	3	Lavage
22	Eau distillée	3	Lavage
23	Eau distillée	2	Lavage
24	Eau distillée	2	Lavage

IV.1.c. Contraste et observation des coupes au microscope électronique à transmission

Afin de faciliter leur observation au microscope électronique, les échantillons ont subi un contraste à l'uranyLess.

Le protocole se fait par flottage des grilles sur des gouttes successives. Dans un premier temps, la grille, côté coupe, est placée au contact d'une goutte de 10 µl d'uranyLess pendant 3 minutes puis elle est égouttée sur papier filtre et à nouveau placée au contact d'une goutte d'eau fraîchement distillée pendant 3 minutes. Cette étape de rinçage est répétée trois fois puis la grille est lavée une dernière fois à l'eau distillée, égouttée et séchée à l'air libre.

Les coupes sont ensuite observées avec un microscope électronique à haute tension de 120 kV (H7650, HITACHI), équipé d'une caméra SC1000 Orius 11 Mpx (GATAN, Evry, France) et l'acquisition des images se fait par le logiciel Digital Micrograph (GATAN, Evry, France).

IV.2. Localisation des tanins de pépins

Au cours de cette approche, les tanins de pépins de Merlot millésime 2018, ainsi que les tanins de pépins issus des nanovinifications ont été localisés par observation au scanner de lames puis au microscope confocal.

IV.2.a. Préparation du matériel végétal

Afin de préserver les échantillons et diminuer le phénomène de cristallisation de la glace dans les cellules, une technique s'apparentant à la méthode de Tokuyasu (Tokuyasu, 1973) a été utilisée pour la préparation des échantillons. Les pépins ont d'abord été fixés chimiquement, et ont été baignés dans une solution de cryoprotection composée de saccharose et de glycérol, puis ont été imprégnés dans un mélange CMC-gélatine. Enfin, ils ont été congelés dans l'azote liquide, puis conservés dans la banque jusqu'à leur coupe.

IV.2.a.i) Fixation des échantillons

Pour chaque date de prélèvement, 20 pépins provenant chacun de baies différentes ont été fixés chimiquement. Les 20 pépins ont été introduits dans un pilulier contenant le tampon de fixation composé de PBS 1X avec 4% de glutaraldéhyde (v/v) puis placés à l'obscurité pendant deux heures à 4°C. Afin d'éliminer l'excès de fixateur, les pépins sont ensuite rincés 4 fois à température ambiante avec du PBS 1X et introduits dans la solution de cryoprotection.

IV.2.a.ii) Cryoprotection des tissus

Le but de cette étape est d'empêcher les artefacts dus à la cristallisation de la glace dans la cellule. Une fois les pépins rincés, ils sont placés dans un nouveau pilulier contenant un mélange cryoprotecteur composé de PBS 1X, Glycérol 50 % (v/v) Saccharose 0,3 M, et $MgCl_2$ 0,015 M. Le pilulier est conservé à l'obscurité, à 4°C pendant 10 jours avant imprégnation dans une solution de CMC-Gélatine.

IV.2.a.iii) Inclusion et congélation des pépins

Une fois rincés, les pépins sont placés dans de nouveaux piluliers contenant un mélange de CMC (5 %) et gélatine (10 %), puis placés 48h sous une cloche à vide avec renouvellement des solutions d'imprégnation au bout de 24h.

Une fois les pépins imprégnés, ils sont placés par lot de deux à trois pépins dans des supports permettant une congélation rapide par immersion directe dans un liquide refroidi (**Figure 36**).Cette congélation directe dans l'azote liquide conduit au phénomène de caléfaction c'est-à-dire qu' il se

forme au contact des tissus des bulles d'azote gazeux qui isolent le tissu du froid ce qui ralentit sa congélation. Une fois les échantillons congelés, ils sont conservés à -80°C jusqu'à leur coupe.

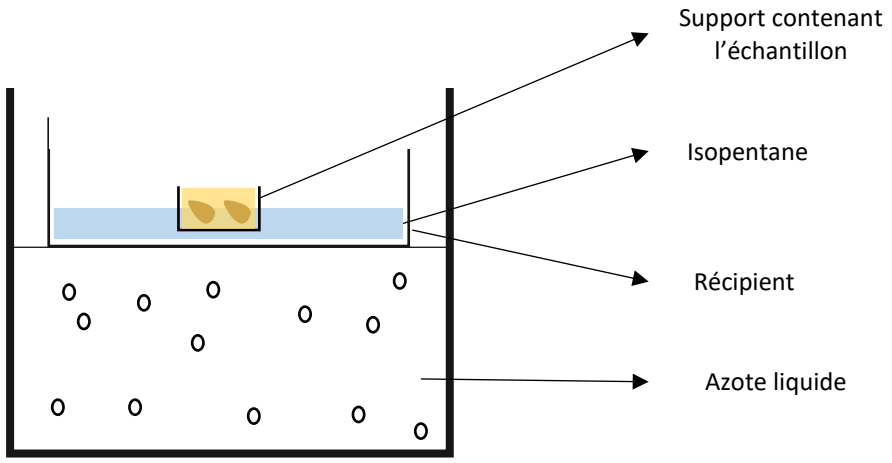


Figure 36 : Technique de congélation rapide par immersion directe dans de l'isopentane

IV.2.a.iv) Coupes

Les échantillons ont été coupés à l'aide d'un cryostat CM 3050 S (LEICA Wetzlar, Allemagne) thermostaté qui maintient l'échantillon et son support (CMC-Gélatine) ainsi que le couteau à -18°C. Des coupes de pépins de 30 µm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur lames de verre, puis placées au congélateur à -20°C. La fixation est ensuite réalisée avec quelques gouttes d'un milieu de montage anhydre composé de résine acrylique et de xylène (Eukit) avec après avoir placé les lames froides quelques secondes sur une plaque chauffante (30°C). Une lamelle est ensuite déposée sur la lame, et les lames ainsi montées sont laissées 36 heures sous hotte afin de permettre la polymérisation de la résine de montage. Les lames sont ensuite scannées au Nanozoomer, puis observées au microscope confocal.

IV.2.b. Observations des coupes

IV.2.b.i) Observation au scanner de lames - NanoZoomer

Un scanner de lame permet de créer des lames virtuelles, qui sont des reproductions numérisées du contenu optique d'une lame de verre. Le scanner de lame est donc composé d'un système d'acquisition (numérisation) de haute résolution, d'un système de stockage, et d'un système de diffusion. Le système d'acquisition est composé d'une platine motorisée en X, Y et Z, d'un objectif de microscope ainsi que d'une caméra optique haute résolution contrôlée par un logiciel d'acquisition (Ameisen et al., 2012).

Au cours de ce travail, les lames ont été scannées par le scanner automatique Nanozoomer 2 OHT (Hamamatsu, Herrsching, Allemagne) sous un objectif x20. L'acquisition des images se fait par le logiciel NDP View qui reproduit les fonctions d'un microscope. Dans notre cas, la numérisation des lames a été effectuée en fond clair, mais aussi en fluorescence avec deux types de filtres :

- Le filtre FITC ayant les caractéristiques suivantes : (λ ex = 480 nm ; λ em = 520 nm)
- Le filtre TRITC ayant les caractéristiques suivantes : (λ ex = 556 nm ; λ em = 617 nm).

IV.2.b.ii) Observation en microscopie confocale

Le microscope utilisé pour les observations est un microscope Leica DM6 CFS TCS SP8 équipé de quatre lasers (405 nm, 488 nm, 552 nm et 638 nm). L'objectif utilisé est un objectif x63, et les modes d'acquisition employés sont les modes confocal et acquisition spectrale.

IV.2.c. Mise au point de la méthode expérimentale

L'objectif de ce travail est de développer une approche permettant de localiser les tanins dans les différents tissus du pépin. Pour cela nous avons travaillé sur l'autofluorescence des tanins. Le principal problème rencontré lors de l'analyse par autofluorescence des composés phénoliques est la multitude de composés phénoliques que l'on peut trouver au sein du pépin. Ainsi, afin de valider les paramètres d'observations (ʎ excitation et ʎ émission) des tanins de pépins par autofluorescence un protocole d'inclusion des tanins a été développé (**Figure 37**).

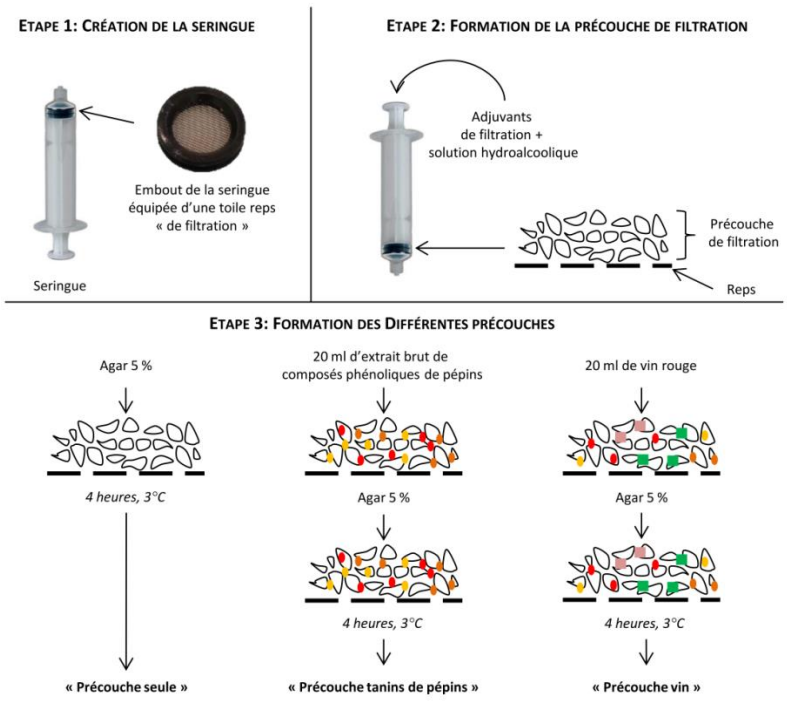


Figure 37 : Protocole d'inclusion des composés phénoliques de pépin et de vin rouge sur des précouches de filtration

Environ 1 g d'adjuvants de filtration, servant à la filtration de vin, sont mis en suspension dans une solution hydroalcoolique. Ce mélange est ensuite versé dans une seringue de 60 ml équipée d'une toile reps. La seringue est ensuite fermée et reliée à un récipient sous 0,5 bar de pression. La vanne entre la seringue et le récipient sous pression est ensuite ouverte, ce qui permet la formation de la précouche d'adjuvants. A partir de cette étape, trois types de précouches sont réalisées : une précouche seule, une précouche sur laquelle est filtré un extrait brut de composés phénoliques de pépins de Cabernet Sauvignon (2017), et une précouche sur laquelle est filtré un vin rouge commercial (Cave de Quinsac). Ainsi, 20 ml d'extrait bruts de composés phénoliques sont injectés dans la seringue et filtrés à travers la précouche d'adjuvants et de la même façon 20 ml de vin sont également filtrés. Une fois toutes les particules d'adjuvants déposées, la seringue est récupérée et placée à l'étuve à 60°C pendant 24 heures dans le but de sécher parfaitement la précouche. Puis, une solution d'agar 5 % d'UltraPure TM LMP (Low Melting Point) est versée sur les précouches. A noter ici que lors de cette étape d'inclusion, l'aiguille de la seringue est reliée au vide ce qui permet de s'assurer d'une pénétration homogène de l'agar sur toute la surface et l'épaisseur de la précouche. Afin de figer les précouches, les seringues sont ensuite placées à 4°C pendant 3 heures. La précouche est ensuite séparée de la seringue par insertion d'air comprimé au niveau de l'aiguille, puis le reps est retiré. La précouche est ensuite découpée, puis inclue dans un mélange CMC-Gélatine 5 % avant d'être coupée au cryostat. À l'issu de ce protocole sont donc obtenu trois types de précouches : une « précouche seule », une « précouche tanins de pépins » et une « précouche vin ».

Puis, ces précouches sont découpées et incluses dans un mélange CMC (5 %) et gélatine (10 %), et sont coupées au cryostat de la même manière que les pépins de raisin (Chapitre II.IV.2.a.iv).

Afin de valider les longueurs d'onde d'observation, les coupes de précouches, ainsi que les coupes de pépins ont été observées en microscopie confocale selon les paramètres suivants :

- Laser Argon 488 nm (15 %)
- Émission : 532 à 568
- PMT : 732 Volt
- Offset : 1%
- Plan Z : 0,07 µm
- Bit : 12 Bits
- Format : 1024 x 1024
- Voxel : 78,68 x 78,68
- Zoom : 2,96

La Figure 38 montre les spectres d'émission de la lignine et de la chlorophylle, qui sont les principaux pigments pouvant entraîner un biais dans l'étude de l'autofluorescence des tanins de

pépins. D'après Chapman et al., (2005), la lignine émet fortement entre 490 et 620 nm, tandis que la chlorophylle émet entre 650 et 770 nm. Ainsi, l'utilisation du laser argon 488 permet de s'affranchir des bruits de fond de la lignine et de la chlorophylle.

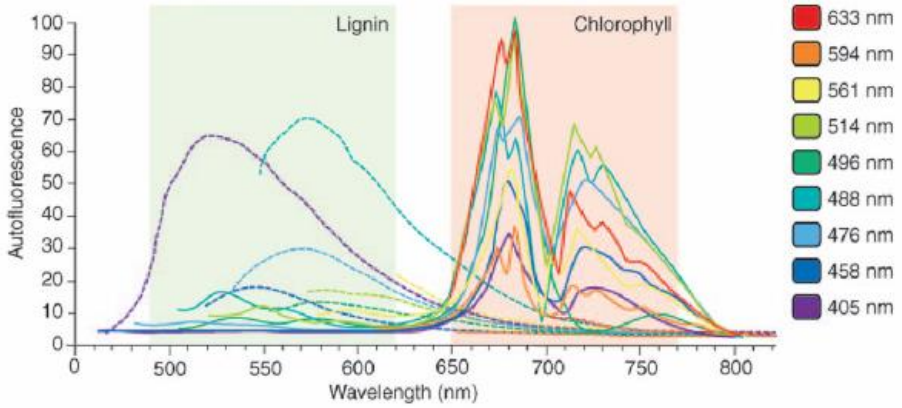


Figure 38 : Spectres d'émission de la lignine et de la chlorophylle après excitation avec des sources laser standard de microscope confocal à neuf longueurs d'onde différentes Le spectre de la lignine est représenté en pointillé et celui de la chlorophylle en trait plein

Source : Chapman et al., 2005

L'optimisation des longueurs d'émission a été déterminée par analyse spectrale des coupes de précouches et des coupes de pépins. Les longueurs d'émission ont été fixées entre 532 à 568 nm.

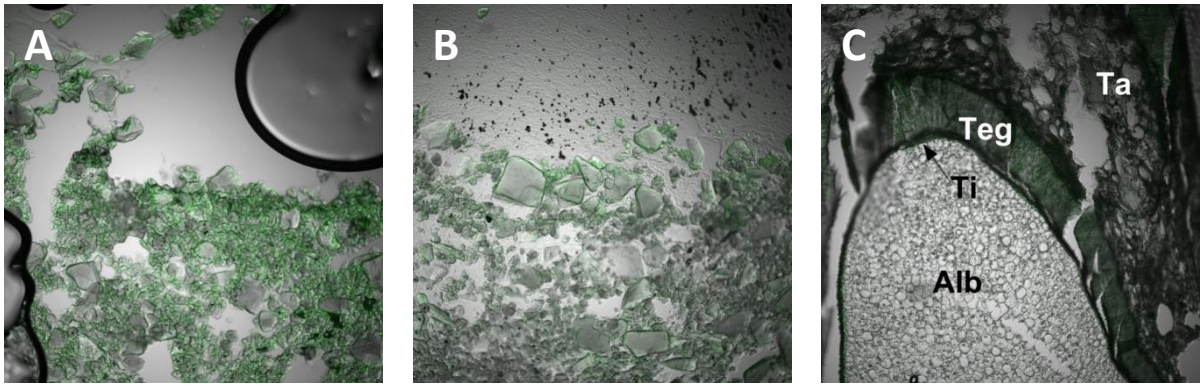


Figure 39 : Observations de la « précouche vin » (A), de la « précouche tanins de pépin » (B) et d'une coupe de pépin Cabernet Sauvignon à Fermeture de Grappe millésime 2017 en microscopie confocale (C) (laser 488 nm)

Au vu de la fluorescence observée (**Figure 39**), cette approche en microscopie confocale permet de valider notre méthode expérimentale. Néanmoins, les observations en microscopie confocale ne permettant pas de visualiser le pépin dans son intégralité, seule l'approche au scanner de lame le permet. En effet, seule cette approche permet de réaliser la localisation tissulaire des tanins de pépins sur une seule et même coupe de pépin.

Aussi, la numérisation des lames via le Nanozoomer a été effectuée en fond clair, mais aussi en fluorescence avec deux types de filtres :

- Le filtre FITC ayant les caractéristiques suivantes : (λ ex = 480 nm ; λ em = 520 nm)

- Le filtre TRITC ayant les caractéristiques suivantes : (λ ex = 556 nm ; λ em = 617 nm)

Le filtre FITC est le filtre dont les longueurs d'onde d'observation se rapprochent le plus des paramètres du confocal. Selon la **Figure 38**, le filtre TRITC permet de s'affranchir des bruits de fond de la lignine et la chlorophylle.

Enfin, ces coupes sont observées au Nanozoomer afin de valider l'autofluorescence des tanins de pépins sous filtre FITC (**Figure 40**).

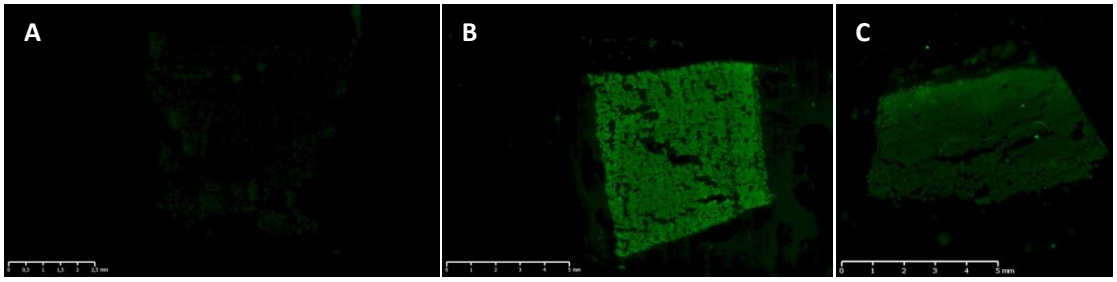


Figure 40 : Observations des « précouche seule » (A), « précouche vin » (B) et « précouche tanins de pépins » (C) au scan de lame sous filtre FITC

Dans un premier temps, nous pouvons apercevoir une légère autofluorescence de la « précouche seule » sous filtre FITC. Cette autofluorescence est probablement due à la présence de xylène, composé aromatique, présent dans la résine servant à monter les lamelles sur les coupes de précouches. Dans un second temps, nous observons une fluorescence des deux précouches vin et tanins de pépins. La précouche vin fluoresce de manière beaucoup plus intense que la précouche tanins de pépins. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence d'intensité. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer la présence d'autres composés phénoliques dans la précouche vin tels que les anthocyanes, ce qui pourrait augmenter l'intensité du signal. De plus, nous retrouvons également dans le vin des tanins provenant de la pellicule de raisin qui présentent des degrés de polymérisation bien plus élevés que ceux du pépin. Ainsi, la présence plus importante de cycles aromatiques sur les tanins issus des pellicules pourrait également expliquer la différence d'intensité obtenue. Néanmoins, l'observation de la fluorescence des composés phénoliques de pépin de raisin sous filtre FITC permet de valider partiellement notre approche expérimentale.

V. Étude de l'extractibilité des tanins de pépins

Afin de déterminer l'extractibilité des tanins de pépins en fonction de la maturité de la baie, une approche originale de nanovinification a été mise en place. Pour cela, trois types de vin ont été réalisés : un vin composé exclusivement de pépins de raisin, un vin composé exclusivement de pellicules de raisin ainsi qu'une modalité contrôle composée de baies entières. Le design expérimental ainsi que la méthode d'échantillonnage sont décrits **Figure 41** et **Figure 42**.

Les nanovinifications ont été réalisées sur le plateau de vinification de l'ISVV.

V.1. Design expérimental

Le design expérimental mis en place pour la réalisation des nanovinifications est résumé dans la **Figure 41**.

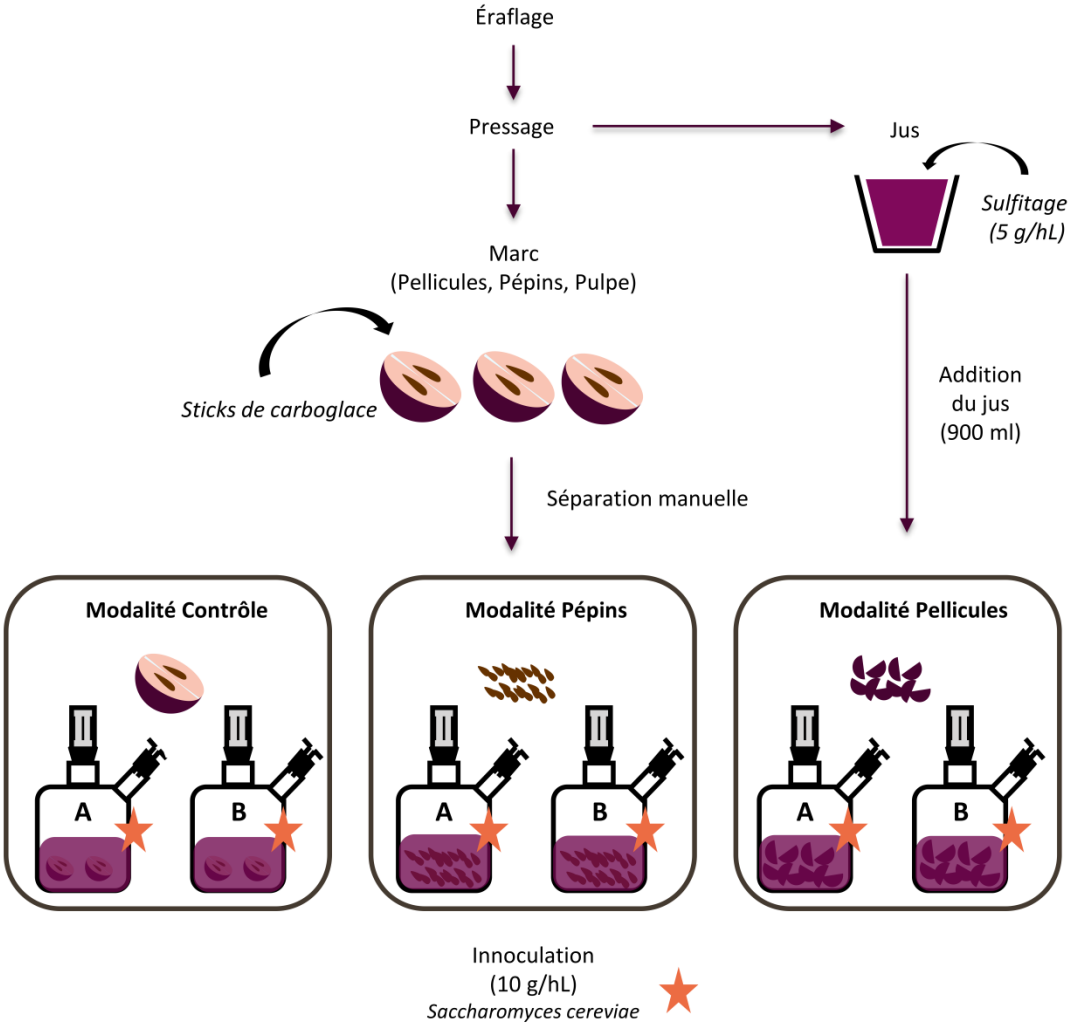


Figure 41 : Design expérimental des nanovinifications

Les nanovinifications sont réalisées sur les raisins de Merlot du millésime 2018 à trois stades de maturité différents : sous-maturité, maturité, et surmaturité, correspondant respectivement aux baies vendangées le 12 septembre, le 25 septembre et le 3 octobre 2018. Afin de caractériser la maturité de chacun des lots, le moût de 300 baies a été analysé à l'aide d'un WineScan™ (Foss, Hilleroed, Danemark). Les caractéristiques physiologiques de chaque lot de baies ont été sont résumées dans le **Tableau 17**.

Tableau 17 : Caractéristiques physiologiques des lots de baies de Merlot 2018 vendangées au stade sous-maturité, maturité et surmaturité

Paramètres physiologiques	Date de vendange		
	Sous-maturité 12/09	Maturité 25/09	Surmaturité 03/09
Poids moyen des baies (g)	2,20	1,76	1,53
Poids moyen des pépins frais (mg)	42,4	35,6	43,1
Poids moyen des pellicules fraîches (g)	0,29	0,23	0,40
Nombre moyen de pépins par baie	1,8	1,65	1,85
Volume de jus pour 100 baies (ml)	112	80	71
°Brix	18,3	19,2	20,1
Concentration en sucres (g/L)	199,9	209,2	220,1
Potentiel d'alcool	11,9	12,4	13,1
pH	3,3	3,4	3,5
Acidité totale (g/L H_2SO_4)	3,9	3,1	2,9
Acide malique	2,06	1,75	1,70

Après avoir récolté 10 kilos de raisins pour chacune des modalités, les grappes sont éraflées et les raisins pressés à 6 bars à l'aide d'un pressoir pneumatique de laboratoire (Bellot, Gradignan, France). Trois rebêchages sont effectués afin d'extraire le plus de jus possible. Afin d'éviter toute oxydation, le jus est directement sulfité à 5 g/hL. Après pressurage le marc est récupéré et les pépins et pellicules manuellement séparés. Des sticks de carboglace sont mélangés au marc lors de la séparation manuelle afin de limiter l'oxydation du matériel végétal.

Le jus et les matières solides séparés, trois types de vin ont été réalisés : un vin composé exclusivement de pépins, un vin composé exclusivement de pellicules et un vin « contrôle » composé de baies entières. Chaque modalité est dupliquée et est réalisée à partir de 900 ml de jus dans des fermenteurs de 2L (Atelier Jean Prémont ®, Bordeaux, France) auxquels a été rajoutée une masse de matière solide (pépins+pellicules, pépins seuls, pellicules seules) calculée de la manière suivante :

- Pour la modalité pépin :

$$\text{Poids de pépins} = \frac{100 \times \text{Volume de jus désiré}}{\text{Volume de jus de 100 baies}} \times \text{Nombre moyen de pépins par baie} \times \text{Poids moyen d'un pépin}$$

- Pour la modalité pellicule :

$$\text{Poids de pellicules} = \frac{100 \times \text{Volume de jus désiré}}{\text{Volume de jus de 100 baies}} \times \text{Poids moyen d'une pellicule}$$

- Pour la modalité contrôle :

$$\text{Poids de marc} = \text{Poids de pépins} + \text{Poids de pellicules}$$

Le contenu des fermenteurs est ensemencé avec un levain de levures *Saccharomyces cerevisiae*, souche Actiflore® F33 (Biolaffort, Bordeaux, France) à 10 g/hL. Le suivi de la fermentation

alcoolique est effectué par le contrôle quotidien de la densité à 20 °C à l'aide d'un densimètre électronique DMA 35 (Anton Paar, Courtaboeuf, France). Lorsque la densité atteint 0,990, la fermentation est considérée comme terminée et les vins subissent ensuite une macération post-fermentaire de 15 jours. À la fin de cette période, les vins sont filtrés sur des membranes de filtration de porosité 2 µm (Fisher Scientific, Illkirch, France) à l'aide d'une cloche de filtration sous vide d'un volume de 5 L. Puis, avant embouteillage, le dosage des sulfites est réalisé à l'aide d'un analyseur séquentiel Y15 (BioSystems, Alfortville, France), puis réajusté à 5 g/hL. Enfin, les vins sont embouteillés et conservés à 14 °C.

V.2. Méthode d'échantillonage

Pour chaque modalité, 4 prélèvements ont été réalisés : deux lors de la fermentation alcoolique, et deux lors de la macération post-fermentaire (**Figure 42**).

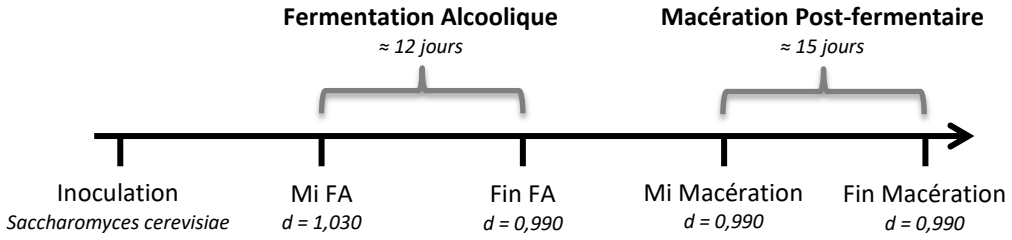


Figure 42 : Méthode d'échantillonnage mise en place au cours des nanovinifications

Dans le but de garder constant le ratio jus/marc, 30 ml de vin et la masse en matériel végétal correspondante à ce volume de vin ont été prélevés sur chaque fermenteur. Afin d'éviter tout phénomène d'oxydation du vin et du matériel végétal, à chaque ouverture de fermenteur de la neige carbonique a été introduite dans le fermenteur.

V.2.a. Analyse de la composition phénolique

Le contenu en tanins condensés et en flavanols des vins prélevés à chaque stade de la vinification a été réalisé selon la méthode décrite précédemment (Chapitre II, paragraphe II.4.b et paragraphe II.5.c) De la même façon, le contenu en tanins condensés et en flavanols des pépins prélevés à chaque étape de la vinification a été analysé selon la méthode décrite précédemment (Chapitre II, paragraphe II.4.a et paragraphe II.5.b).

V.2.b. Observations des levures de fermentation au scanner de lame

Pour chaque échantillon prélevé, 1 ml de vin a été centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes à température ambiante. Afin de laver le culot de tous composés phénoliques, ce dernier est resuspendu dans 1 ml de tampon PBS, puis vortexé et centrifugé selon les mêmes conditions (Mekoue Nguela et al., 2015). Cette étape de lavage a été réalisée quatre fois. Puis, une solution d'agar 5 % d'UltraPure

TM LMP (Low Melting Point) est versée sur les culots. Après 1 heure à 4°C, les culots sont inclus dans un mélange de CMC (5 %) et gélatine (10 %) et congelés à -20 °C.

Enfin, les culots sont coupés au cryostat selon la méthode décrite Chapitre II, paragraphe IV.2.a.iv., puis observés au scaner de lames sous filtre FITC.

VI. Analyse statistique

Dans ce travail, les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT. Pour toutes les données, la normalité a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk.

Pour les données suivant une loi normale, des analyses de variances (ANOVA) ont été réalisées. Lorsque le test ANOVA était significatif (p-value < 0,05), le test post-hoc de Tukey (HSD, Honestly Significative Difference) a été utilisé pour discriminer les groupes d'échantillons différents les uns des autres. Les groupes différents sont représentés par des lettres dans les tableaux de traitement ou sur les figures.

Pour les données ne suivant pas une loi normale, le test non paramétrique de Kruskall Wallis a été réalisé. Lorsque le test était significatif (p-value < 0,05), le test post-hoc de Conover-Inman a été utilisé pour discriminer les groupes d'échantillons différents les uns des autres. Les groupes différents sont représentés par des lettres dans les tableaux de traitement ou sur les figures.

CHAPITRE III : CARACTÉRISATION ET LOCALISATION DES TANINS DE PÉPINS DE RAISIN

Dans le vin, la plus grande source de composés phénoliques reste le raisin. Dans le raisin, les tanins peuvent provenir aussi bien de la pellicule que du pépin, mais également, en plus petite quantité, de la pulpe. En fonction du cépage, on estime la répartition des composés phénoliques de la manière suivante : environ 1 % ou moins proviennent de la pulpe, entre 11 et 50 % proviennent des pellicules et entre 44 et 89 % proviennent des pépins de raisins (Bordiga et al., 2011; Kennedy, 2008; Sacchi et al., 2005; Shi et al., 2003; Singleton et al., 1969).

Contrairement à la pellicule, dans les pépins de raisins, seules des procyanidines sont retrouvées : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine et la (-)-épicatéchine gallate (Gawel, 1998; Mattivi et al., 2009; Prieur et al., 1994; Su et al., 1969). À ce jour, de nombreuses recherches ont été réalisées sur l'évolution de la teneur et de la structure des tanins de pépins tout au long de la maturité de la baie. Il est généralement admis que les composés phénoliques du pépin de raisin s'accumulent durant la première phase de croissance de la baie et diminuent durant la seconde, cependant cette évolution reste encore discutée. En effet, d'un côté certains auteurs estiment qu'à maturité, le pépin de raisin a perdu jusqu'à 60 % de sa teneur initiale en tanins (Downey et al., 2003; Kennedy et al., 2000a, 2000b; Prieur et al., 1994; Romeyer et al., 1985) alors que d'autres n'observent aucune différence significative de la teneur en tanins de pépins au cours de son développement, empêchant l'établissement d'un profil d'évolution « type » (Bordiga et al., 2011; Obreque-Slier et al., 2010, 2012). Ces données contradictoires ne permettent pas d'établir une définition claire et concrète de la maturité phénolique du pépin de raisin, et par conséquent, empêchent la création d'un outil d'évaluation de cette dernière à la fois simple, fiable et précis.

Par ailleurs, très peu d'études portent sur la localisation des tanins de pépins de raisin, tout au long de leur développement. Or, il apparaît évident que les mécanismes d'extraction des composés phénoliques du pépin de raisin sont liés à leur localisation tissulaire. À ce jour et à notre connaissance, seule l'équipe de Chevalier a caractérisé l'évolution de la localisation des composés phénoliques des pépins de raisins issus du cépage Cabernet Franc (Cadot et al., 2006).

Les objectifs de ce chapitre sont donc d'une part de caractériser l'évolution de la teneur et de la structure des tanins de pépins tout au long de leur développement, et d'autre part d'analyser l'évolution de leur localisation tissulaire. Pour cela, une combinaison d'approches chimiques et microscopiques a été mise en place.

La première partie de ce chapitre sera dédiée à la caractérisation des flavanols libres et des tanins condensés de pépins au cours de leur développement, pour quatre cépages (Sauvignon blanc, Tannat, Merlot, Cabernet Sauvignon) et trois millésimes (2015, 2016 et 2017), afin d'essayer d'établir un profil type d'évolution des tanins de pépins à Bordeaux. Dans un second temps, ces résultats ayant permis d'établir un profil type, une étude complémentaire sur un seul cépage (Merlot) a été menée en 2018 et complétée par une approche microscopique permettant, en plus de la caractérisation physico-

chimique, d'établir une cartographie de la localisation tissulaire des tanins au sein des différents tissus du pépin.

I. Caractérisation des tanins de pépins au cours de leur développement

La quantification et la caractérisation des flavanols libres et des tanins condensés de pépins ont été réalisées pour quatre cépages différents (Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon, Merlot) décrits empiriquement comme produisant des vins à caractères taniques différents. Afin de minimiser l'impact du terroir ainsi que celui des pratiques culturales, les prélèvements ont été réalisés sur une parcelle expérimentale où tous les pieds sont cultivés de manière identique. Les prélèvements de pépins ont été réalisés au cours de trois millésimes (2015, 2016 et 2017) à cinq stades de développement de la baie :

- Baie verte, à fermeture de grappe correspondant à environ 20 jours après anthèse (JAA) (plus exactement 24 JAA en 2015, 21 JAA en 2016 et 18 JAA en 2017) ;
- Début véraison correspondant à 44 JAA en 2015, 50 JAA en 2016 et 37 JAA en 2017 ;
- Fin véraison correspondant à environ 60 JAA en 2015 et 2016 et 52 JAA en 2017 ;
- Maturation (récolte) comprise entre 61 et 89 JAA selon les cépages et les millésimes ;
- Surmaturité (récolte + 15 jours) allant de 90 JAA à 107 JAA selon les cépages, et les millésimes.

Ainsi, au cours de cette partie, nous discuterons dans un premier temps de l'établissement d'un profil type de l'évolution de la teneur en flavanols et en tanins condensés des pépins de raisin au cours du développement de la baie. Puis, nous discuterons également de l'effet cépage et de l'effet millésime sur les composés phénoliques du pépin de raisin.

I.1. Caractérisation des flavanols

Pour réaliser cette caractérisation, les quatre sous-unités caractéristiques des tanins de pépins de raisin que sont la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la (-)-épicatéchine gallate et la (-)-épigallocatéchine ont été analysées. Comme attendu et déjà décrit dans la bibliographie, seules la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la (-)-épicatéchine gallate ont été retrouvées dans les pépins (Bordiga et al., 2011; Chira et al., 2009, 2011; Ćurko et al., 2014; Downey et al., 2003; Kennedy et al., 2000; Kyraleou et al., 2017; Lorrain et al., 2011; Monagas et al., 2003; Obreque-Slier et al., 2010, 2012; Prieur et al., 1994).

Dans nos conditions expérimentales, les résultats permettent d'établir globalement un profil type d'évolution des teneurs en flavanols libres totaux, conservé entre les cépages et les millésimes (**Figure**

43). En effet, sauf pour les pépins de Sauvignon blanc en 2017, les teneurs en flavanols libres augmentent jusque début véraison puis diminuent ensuite, avec les teneurs les plus faibles trouvées à la récolte ou post-récolte. Ce profil est identique, quel que soit le mode d'expression choisi : en mg/g MF de pépin (**Figure 43**) en µg/pépin (**Figure 44**) ou en µg/baie (**Figure 45**). Bien qu'elles soient variables selon les millésimes, les teneurs sont comparables à la gamme déjà décrite dans la bibliographie (Downey et al., 2003; Fuleki et al., 1997; Lorrain et al., 2011; Obreque-Slier et al., 2010, 2012), et confirment l'évolution des profils décrits par (Downey et al., 2003; Kennedy et al., 2000; Romeyer et al., 1985).

Nos résultats permettent d'établir un profil d'évolution type des flavanols libres, conservé pour les quatre cépages et les trois millésimes avec une accumulation des tanins au cours de la phase de croissance active de la baie, soit durant les 30 à 40 premiers jours après anthèse, suivie d'une diminution des teneurs jusqu'à la fin du cycle.

Au-delà de la forme du profil, si l'on compare les millésimes et les cépages, des différences de teneurs apparaissent. En ce qui concerne l'effet millésime, il n'est pas possible de dégager une tendance quant à un millésime induisant une plus forte accumulation de flavanols qu'un autre (**Tableau 18**). Dans certains cas, c'est en 2017 que les teneurs sont les plus élevées (Sauvignon blanc 2017 à la récolte, Merlot 2017 post-récolte), toutefois cela peut être en 2015 pour le Cabernet Sauvignon à récolte ou en 2016 pour le Tannat et Merlot à récolte. Ces variations sont également observables si l'on considère l'expression des données en µg/pépin et en µg/baie.

Très peu de travaux dressent une analyse complète des paramètres modulant la teneur en flavanols (température, alimentation hydrique, précocité). Néanmoins, divers travaux ont été réalisés sur l'impact de l'alimentation hydrique sur la teneur en tanins, toutefois selon le mode d'expression de la teneur en tanins, les conclusions peuvent varier (Casassa et al., 2015; Genebra et al., 2014; Geny et al., 2003; Koundouras et al., 2006, 2009; Roby et al., 2004). Ainsi, en exprimant les résultats en mg de tanins/baie et en mg de tanins/g de MF, Casassa et al., démontrent qu'en cas de déficit hydrique, les concentrations exprimées en mg de tanins/g de MF augmentent principalement à cause de la réduction du poids des baies, entraînant *de facto* la diminution de la teneur en mg de tanins/baie (Casassa et al., 2015). Au contraire, Roby et al., sur Shiraz et Kondouras et al., sur Cabernet Sauvignon n'observent pas de modification de la teneur en tanins des pépins suite à un déficit hydrique, et cela malgré son impact sur le poids de la baie (Roby et al., 2004; Koundouras et al., 2009) . Il est donc difficile de rapprocher nos résultats avec les données bibliographiques, en raison d'une part des modes d'expression variés utilisés, et d'autre part des données contradictoires sur la manière dont l'alimentation en eau affecte le poids et nombre des pépins. En effet, lorsque certaines études ont montré une augmentation du nombre de pépins lors d'un déficit en eau (Roby et al., 2004), d'autres n'en dénotent aucun (Castellarin et al., 2007).

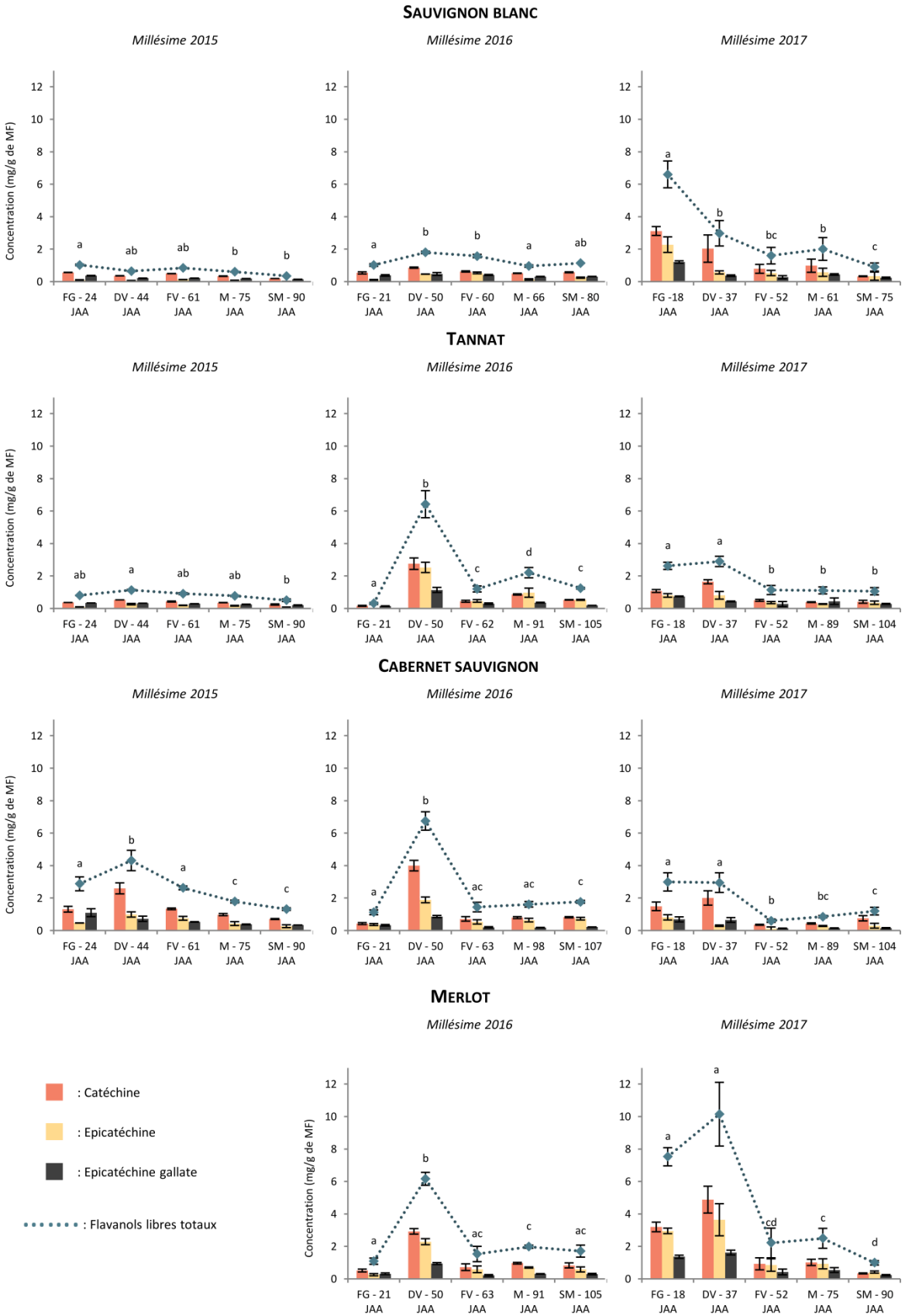


Figure 43 : Évolution de la teneur en flavanols libres, exprimée en mg/g de MF, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse

a, b, c et d indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs en flavanols totaux entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

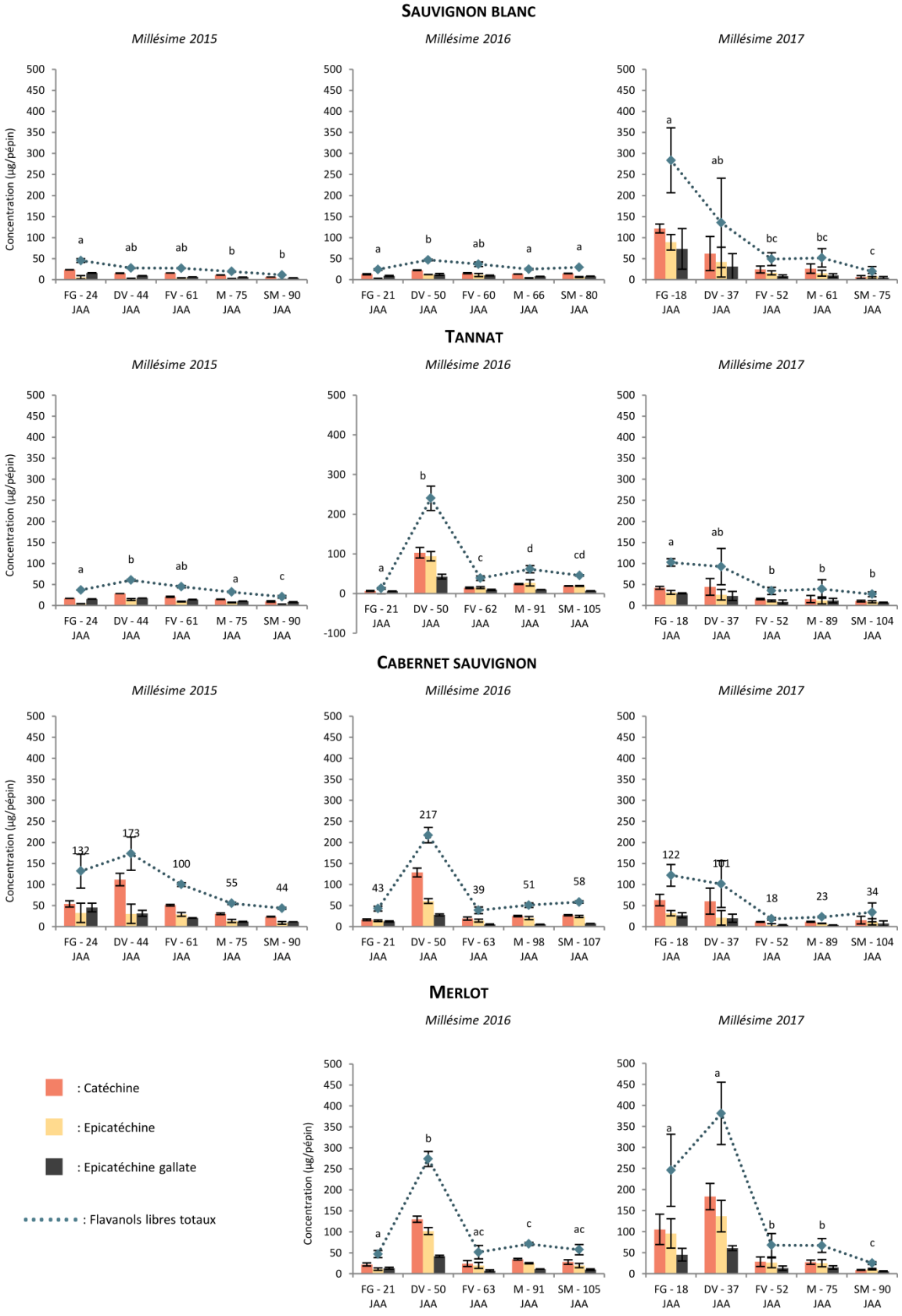


Figure 44 : Évolution de la teneur en flavanols libres, exprimée en µg/pépin, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017.

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse

a, b, c et d indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs en flavanols totaux entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

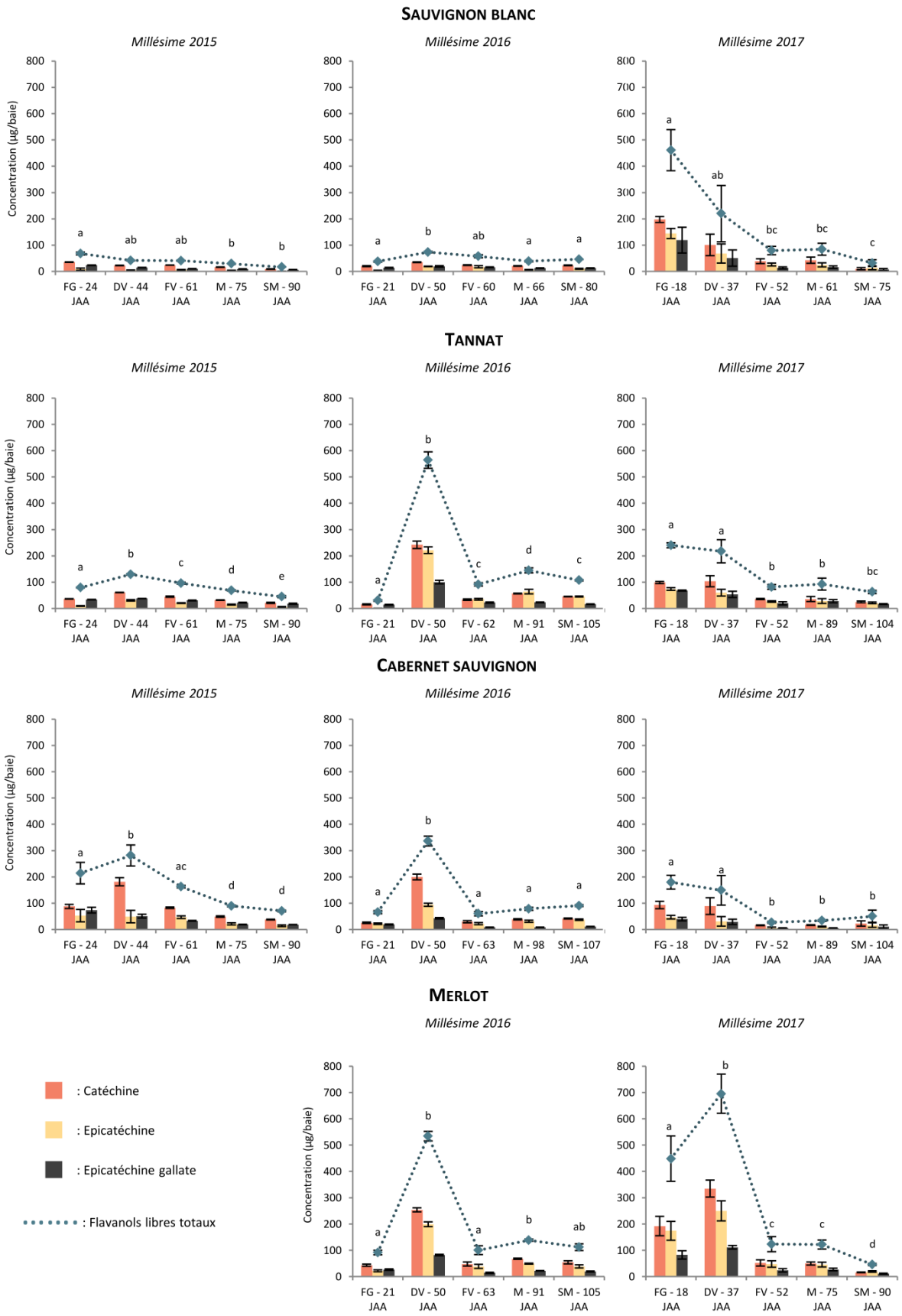


Figure 45 : Évolution de la teneur en flavanols libres, exprimée en µg/baie, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse

a, b, c et d indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs en flavanols totaux entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

Nos résultats ne permettent donc pas d'établir un lien de cause à effet entre le régime hydrique des 3 millésimes étudiés et les teneurs en flavanols libres des pépins. Un effet sur le nombre et le poids des pépins n'est pas non plus observable malgré des régimes hydriques très différents entre les millésimes.

En ce qui concerne l'effet cépage, aux stades terminaux (maturité et surmaturité) et pour un même millésime, si l'on compare les cépages, l'expression en mg/g de MF de pépin, ne permet pas de classer systématiquement les cépages par ordre de richesse en tanins (**Tableau 18**). Et ce, même si les pépins de Sauvignon blanc semblent moins riches en flavanols que les pépins de cépages rouges. Si l'on considère l'expression en µg/pépin, le classement est modifié : le Sauvignon blanc présente toujours des pépins moins riches en flavanols que les cépages rouges, et parmi les cépages rouges, les pépins de Merlot apparaissent globalement plus riches en flavanols. Il en est de même si l'on exprime les teneurs en µg/baie avec les baies de Tannat et Merlot qui apparaissent comme étant les plus riches en flavanols de pépins. Ces résultats peuvent s'expliquer par le poids des pépins et le nombre de pépins par baie. En effet, dans nos conditions expérimentales, nous observons des différences de poids et de nombre de pépins par baie (**Tableau 19**). Si les pépins de Tannat sont les plus petits, ils sont les plus nombreux par baie (2,25 pépins par baie en moyenne pour les trois millésimes, contre 1,88 pour le Merlot et 1,55 pour ceux de Sauvignon blanc et le Cabernet Sauvignon), alors qu'à l'inverse les pépins de Merlot sont toujours les plus gros (34,3 mg/pépin contre 30,8 pour le Cabernet Sauvignon, 27,5 pour le Sauvignon blanc et 26,2 pour le Tannat), mais pas toujours les plus faibles en nombre. Ainsi, dans notre étude, il apparaît essentiel d'exprimer nos résultats sous les trois unités (mg/g de MF de pépin, µg/pépin et µg/baie) afin de bien comprendre les mécanismes mis en jeu et les impacts qualitatifs sur le produit fini, mais également afin de comparer nos valeurs aux données de la bibliographie. En effet, ces dernières étant souvent exprimées en mg/g MF de pépin puis extrapolées à un volume de vin, elles ne prennent pas automatiquement en compte le nombre de pépins par baie ou bien le poids des pépins. Or, ce sont ces données qui impacteront le volume du pépin, et *de facto*, la surface de contact entre les parties solides de la baie et le jus de raisin, jouant alors un rôle déterminant dans les mécanismes d'extractibilité des composés phénoliques du pépin dans le vin (Setford et al., 2017).

Ainsi, pour un millésime donné et dans des conditions de culture similaires, à la fin du cycle du développement de la baie, la composition finale en composés phénoliques des pépins de raisin est comparable entre cépages. Nos résultats permettent ainsi de montrer pour la première fois qu'à la récolte, la quantité finale en flavanols libres de la baie issue des pépins est principalement due au poids et au nombre de pépins, plutôt qu'à leur teneur intrinsèque.

Tableau 18 : Teneur en flavanols libres, à maturité et surmaturité, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017.

a et b pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs intrinsèques à chaque unité de teneur (mg/g de MF ; µg/pépin ; µg/baie) (p<0,05).

A, B, C, D, E et F pour chaque colonne indiquent les différences significatives entre les moyennes (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

		Teneurs en flavanols libres (mg/g de MF)		Teneurs en flavanols libres (µg/pépin)		Teneurs en flavanols libres (µg/baie)	
		Maturité	Surmaturité	Maturité	Surmaturité	Maturité	Surmaturité
Sauvignon blanc	2015	0,6 ± 0,02 a A	0,3 ± 0,01 b A	19,5 ± 0,6 a A	11,2 ± 0,2 b A	29,3 ± 1,1 a A	16,8 ± 0,7 b A
	2016	1,0 ± 0,1 a B	1,1 ± 0,1 a B	24,9 ± 1,8 a B	29,4 ± 0,05 b B	38,9 ± 2,3 a B	46,0 ± 0,54 b B
	2017	2,0 ± 0,7 a C	0,9 ± 0,2 b B	51,9 ± 21,8 a BCDE	19,4 ± 12,1 b ABC	84,3 ± 22,5 a CEF	31,6 ± 12,8 b AB
Tannat	2015	0,8 ± 0,03 a D	0,5 ± 0,08 b C	31,9 ± 1,4 a C	20,8 ± 3,4 b C	68,6 ± 2,1 a C	44,7 ± 4,1 b B
	2016	2,2 ± 0,3 a C	1,3 ± 0,05 b D	61,5 ± 8,8 a DE	45,7 ± 1,9 b D	144,5 ± 9,5 a D	107,4 ± 2,6 b C
	2017	1,1 ± 0,2 a B	1,1 ± 0,2 a BD	39,3 ± 22 a ABCD	26,8 ± 5,6 b BC	92,3 ± 22,7 a CEF	63,03 ± 6,2 b D
Cabernet Sauvignon	2015	1,8 ± 0,09 a C	0,5 ± 0,08 b C	55,2 ± 2,7 a D	43,6 ± 2,6 b D	89,8 ± 3,3 a E	70,8 ± 3,1 b D
	2016	1,6 ± 0,2 a C	1,3 ± 0,05 b D	50,9 ± 5,4 a D	58,4 ± 3,1 b E	78,9 ± 5,8 a F	90,6 ± 3,5 b E
	2017	0,9 ± 0,08 a B	1,1 ± 0,2 a BD	22,9 ± 2,1 a B	34,0 ± 22,5 a ABCDE	33,78 ± 3,9 a AB	50,2 ± 23,1 a BD
Merlot	2016	2,5 ± 0,6 a C	1,0 ± 0,1 b BD	71,0 ± 3,7 a E	57,3 ± 12,2 a DE	138,5 ± 4,3 a D	111,9 ± 12,8 b C
	2017	2,0 ± 0,1 a C	1,7 ± 0,4 a D	66,9 ± 16,6 a DE	25,1 ± 3,4 b C	122,1 ± 17,2 a D	45,8 ± 4,2 b B

Tableau 19 : Poids d'un pépin et nombre de pépins par baie pour le Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017

ANOVA pour comparer les valeurs, a, b et c pour chaque colonne indiquent les différences significatives entre les moyennes (Test de Tuckey, p<0,05).

		Nombre moyen de pépins par baie	Poids moyen d'un pépin (mg)
Sauvignon blanc	2015	1,5 ± 0,5 a	30,1 ± 3,0 a
	2016	1,56 ± 0,5 a	25,9 ± 9,8 abc
	2017	1,63 ± 0,7 a	26,7 ± 2,2 ab
Tannat	2015	2,15 ± 0,7 a	22,3 ± 3,7 b
	2016	2,25 ± 0,7 a	27,9 ± 5,2 ab
	2017	2,35 ± 0,5 a	28,4 ± 7,4 abc
Cabernet Sauvignon	2015	1,63 ± 0,5 a	30,9 ± 4,6 ac
	2016	1,55 ± 0,4 a	31,6 ± 6,8 abc
	2017	1,48 ± 0,6 a	30,1 ± 9,1 abc
Merlot	2016	1,95 ± 0,6 a	35,8 ± 2,4 c
	2017	1,83 ± 0,8 a	32,8 ± 4,2 ac

Enfin, en plus des teneurs et du profil, en accord avec les données de la littérature, il apparait qu'à l'exception du Merlot, la répartition des flavanols libres est conservée pour la majorité des échantillons avec comme monomère le plus présent la catéchine, suivie de l'épicatéchine et de l'épicatéchine gallate. Si l'on considère le Merlot, dans nos conditions expérimentales et pour les deux millésimes étudiés, la catéchine et la épicatéchine sont présentes à parts égales, et toujours de manière plus importante que la épicatéchine gallate (Chira et al., 2011; de Freitas et al., 2000; Lorrain et al., 2011; Mattivi et al., 2009; Monagas et al., 2003; Obreque-Slier et al., 2010, 2012; Rodríguez Montealegre et al., 2006).

I.2. Caractérisation des tanins condensés

En parallèle de l'analyse des flavanols, les teneurs en tanins condensés, ou proanthocyanidines (PAs), ainsi que leur degré de polymérisation et leur pourcentage de galloylation ont été étudiés.

I.2.a. Teneurs

Tout comme pour les flavanols libres, un profil type et conservé de l'évolution des teneurs en proanthocyanidines a pu être établi pour les quatre cépages et les trois millésimes étudiés (**Figure 46**). Ce profil présente une augmentation des teneurs au cours de la période de croissance de la baie, puis une chute de ces teneurs au cours de la maturation. Ce profil est conservé quel que soit le mode d'expression (**Figure 47** et **Figure 48**) et en accord avec la bibliographie (Downey et al., 2003; Kennedy et al., 2000; Kyraleou et al., 2017). Les teneurs mesurées (entre 45 et 200 mg/g de MF), qui peuvent représenter jusqu'à vingt fois celles mesurées pour les flavanols, sont de l'ordre de celles décrites dans la littérature (Downey et al., 2003; Hernández-Jiménez et al., 2009; Lorrain et al., 2011; Obreque-Slier et al., 2012).

Ainsi, les tanins condensés représentent les formes majoritaires des tanins de pépins et présentent un profil d'évolution type conservé: une période d'accumulation jusqu'à véraison, puis une phase de dégradation ou de perte d'extractibilité réduisant alors les teneurs extraites.

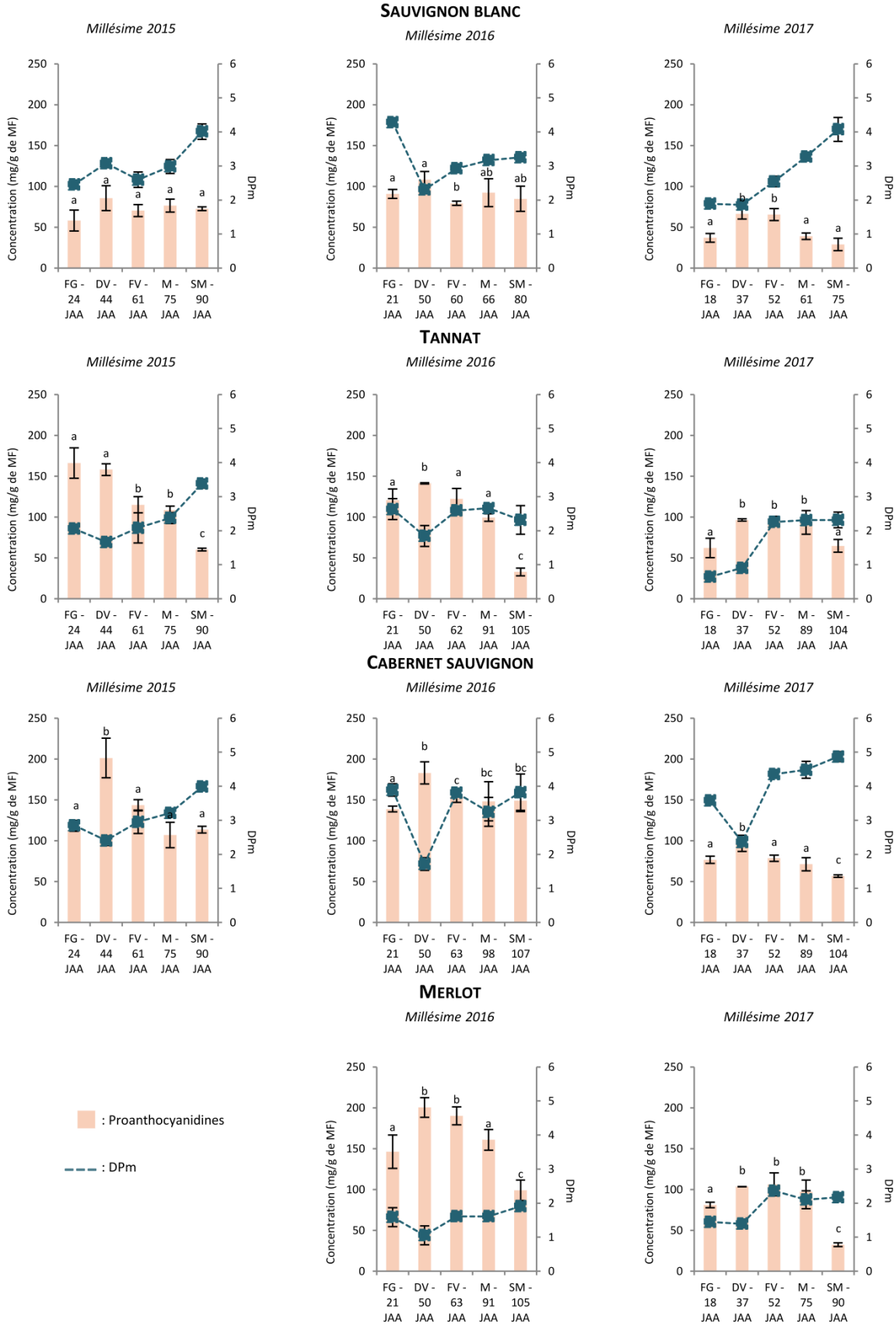


Figure 46 : Évolution de la teneur en proanthocyanidines, exprimée en mg/g MF de pépin, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse ; MF : Matière fraîche ; DPm : Degré moyen de polymérisation

a, b et c pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

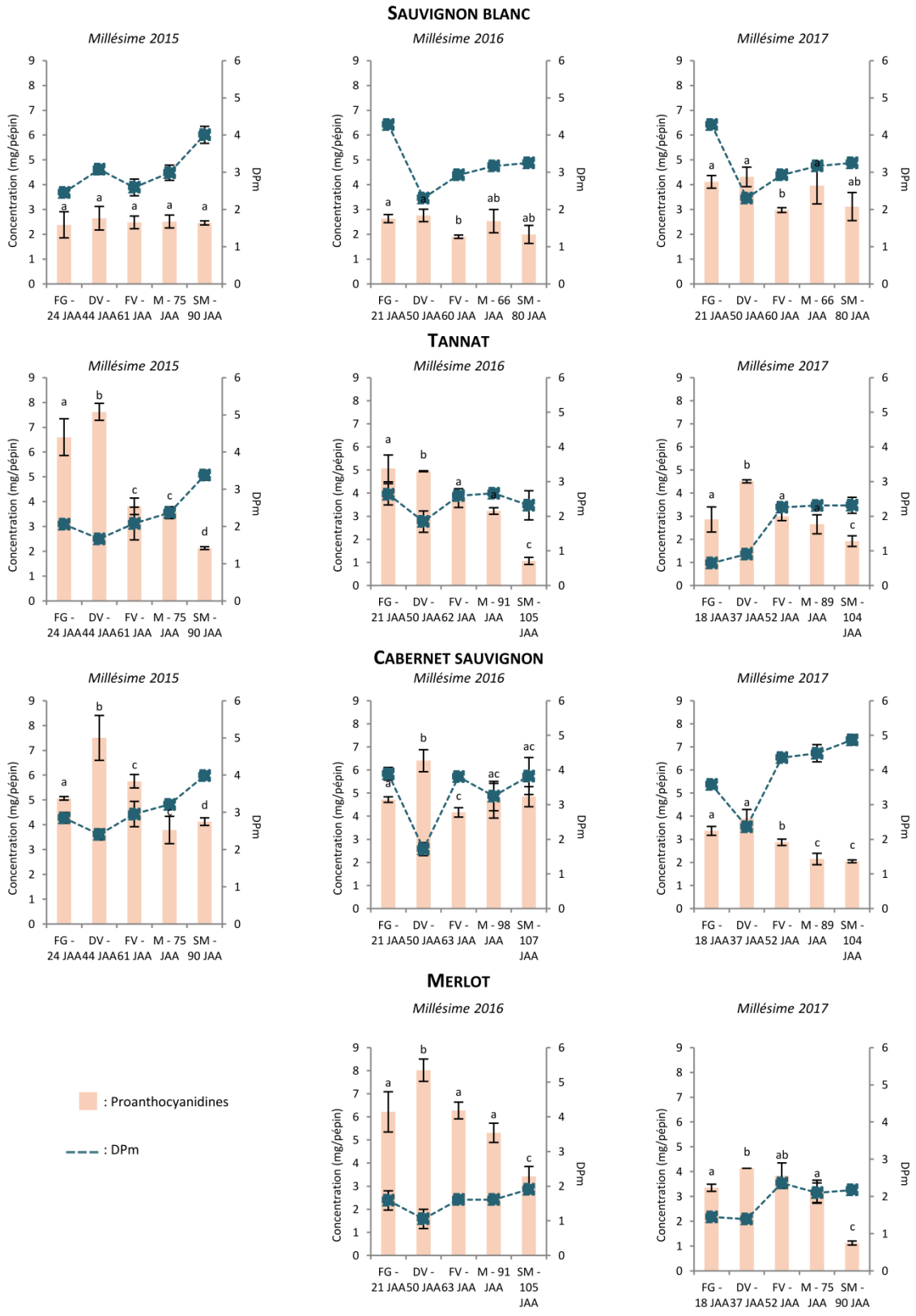


Figure 47 : Évolution de la teneur en proanthocyanidines, exprimée en mg/pépin, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse ; DPm : Degré moyen de polymérisation

a, b et c pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

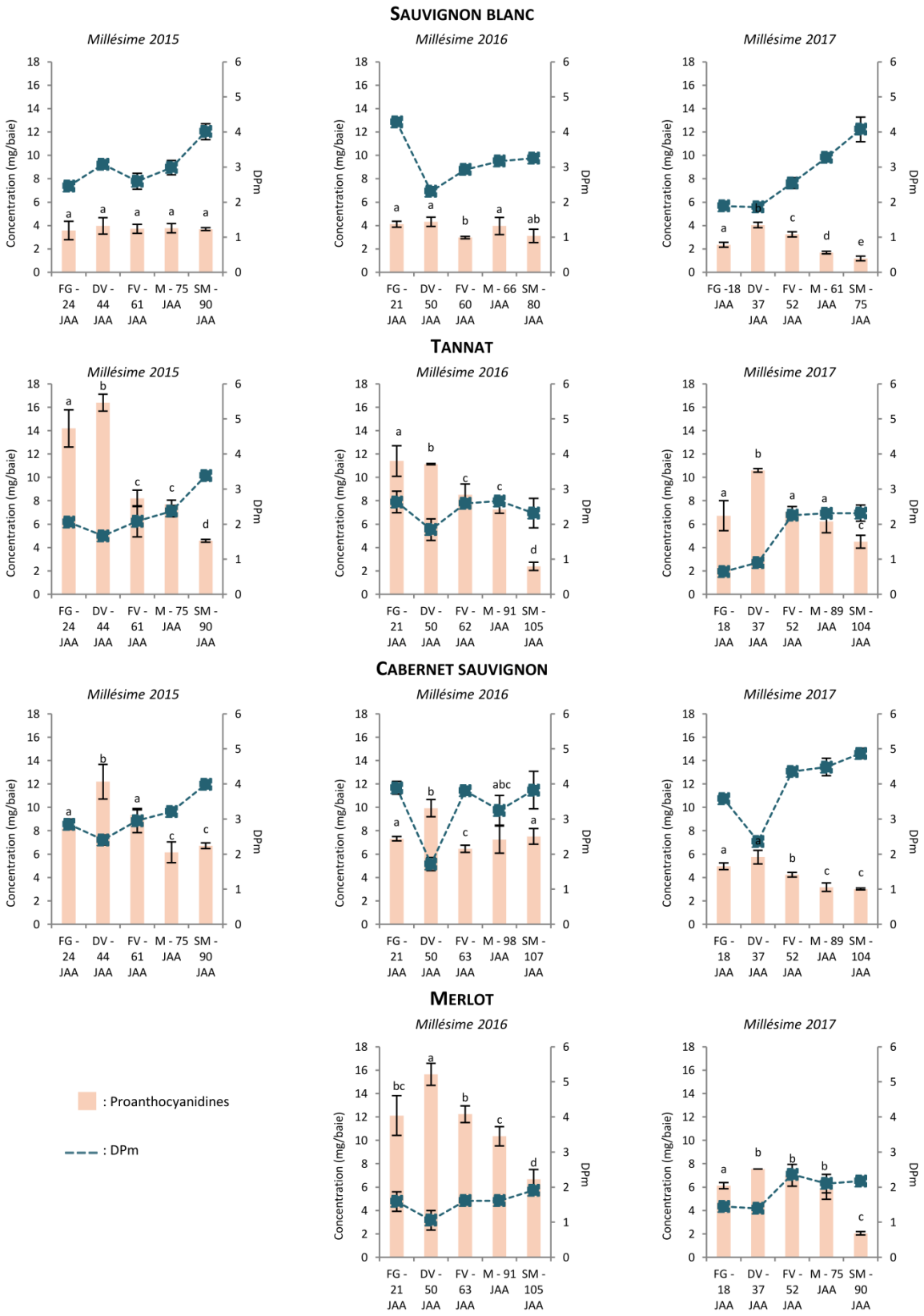


Figure 48 : Évolution de la teneur en proanthocyanidines, exprimée en mg/baie, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse ; DPm : Degré moyen de polymérisation

a, b et c pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, $p<0,05$).

Pour cette catégorie, l'effet cépage sur les teneurs en PAs semble encore plus délicat à mettre en évidence que pour les flavanols. Néanmoins, on peut tout de même noter que quel soit le millésime, les pépins de Sauvignon blanc présentent des teneurs en PAs toujours plus faibles que pour les pépins issus de cépages rouges. En revanche, il apparaît difficile de classer les pépins issus des cépages rouges en fonction de leur richesse en tanins condensés. En effet, ce classement se modifie systématiquement en fonction du stade considéré (récolte ou post-récolte), en fonction du mode d'expression (mg/g de MF, mg/pépin et mg/baie), et en fonction du millésime (**Tableau 20**).

Tableau 20 : Teneur en proanthocyanidines à maturité et surmaturité, exprimée en mg/g de MF, en mg/pépin et en mg/baie, des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017.

a et b pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs intrinsèques à chaque unité de teneur (mg/g de MF ; µg/pépin ; µg/baie) (Test de Kruskall Wallis, Test Conover-Iman, $p<0,05$).

A, B, C, D, E et F pour chaque colonne indiquent les différences significatives entre les moyennes (ANOVA, Test de Tuckey, $p<0,05$).

		Teneurs en proanthocyanidines (mg/g de MF)		Teneurs en proanthocyanidines (mg/pépin)		Teneurs en proanthocyanidines (mg/baie)	
		Maturité	Surmaturité	Maturité	Surmaturité	Maturité	Surmaturité
Sauvignon blanc	2015	76,5 ± 8 a A	72,6 ± 2,3 a A	2,52 ± 0,3 a A	2,46 ± 0,1 a A	3,78 ± 0,8 a A	3,69 ± 0,6 a A
	2016	92,2 ± 17 a AC	84,8 ± 15 a A	2,53 ± 0,47 a A	1,99 ± 0,36 a AC	3,95 ± 0,97 a A	3,11 ± 0,86 a A
	2017	39,01 ± 4 a B	29,1 ± 8 a B	1,04 ± 0,1 a B	0,73 ± 0,2 b B	1,69 ± 0,8 a B	1,19 ± 0,9 a B
Tannat	2015	108,5 ± 5 a C	60 ± 2 b C	3,58 ± 0,2 a C	2,12 ± 0,05 b C	7,7 ± 0,9 a C	4,56 ± 0,75 C
	2016	99,3 ± 4 a C	33 ± 5 b B	3,22 ± 0,1 a C	1,06 ± 0,2 b B	7,25 ± 0,8 a C	2,39 ± 0,9 AB
	2017	93,5 ± 14 a AC	64,7 ± 8 b AC	2,65 ± 0,41 a A	1,91 ± 0,23 b C	6,23 ± 0,91 a C	4,49 ± 0,73 b C
Cabernet Sauvignon	2015	107,1 ± 16 a CD	113,6 ± 4 a D	3,78 ± 0,6 a CD	4,12 ± 0,15 a D	6,14 ± 1,1 a C	6,7 ± 0,65 a D
	2016	148,2 ± 24 a D	149 ± 13 a E	4,66 ± 0,8 a D	4,8 ± 0,4 a E	7,22 ± 1,2 a C	7,44 ± 0,8 a D
	2017	71,2 ± 8 a A	56,7 ± 2 b C	2,14 ± 0,2 a A	2,04 ± 0,1 a C	3,16 ± 0,8 a AB	3 ± 0,7 a A
Merlot	2016	160,8 ± 13 a D	99,2 ± 12 b E	5,30 ± 0,4 a D	3,42 ± 0,43 b F	10,34 ± 1 a D	6,66 ± 1,03 b D
	2017	97,3 ± 14 a C	32 ± 2,3 b B	3,15 ± 0,46 a AC	1,12 ± 0,08 b B	5,75 ± 1,26 a C	2,0 ± 0,88 b AB

En revanche, contrairement aux flavanols, les teneurs mesurées dans les échantillons du millésime 2017 sont toujours les plus faibles et ceci, quels que soient les modes d'expression et la date considérée, alors que les teneurs de 2016 sont quasiment toujours les plus élevées. Il semble donc, pour cette catégorie, exister un effet millésime pouvant être relié aux conditions d'alimentation hydrique comme cela a pu être évoqué par certains auteurs (Casassa et al., 2015; Genebra et al., 2014; Lacampagne et al., 2010).

La comparaison de l'alimentation hydrique des trois millésimes étudiés permet de mettre en évidence des différences nettes dans le régime hydrique des plantes (**Figure 49**). En 2015, la contrainte hydrique a commencé à s'installer relativement tôt (avant la floraison). Néanmoins, un premier épisode pluvieux début juin (juste après la floraison), puis un second début août n'ont pas permis une installation soutenue de cette contrainte hydrique pendant la maturation du fruit. En 2016, après un printemps pluvieux, la contrainte hydrique s'est installée plus tardivement après la véraison, mais de manière durable jusqu'à la récolte. En 2017, malgré un début d'été relativement sec et un début d'installation de contrainte hydrique similaire à 2015, les pluies de début juillet ont stoppé cette

installation et aucune contrainte hydrique durable n'a réellement pu s'installer au cours de ce millésime en raison d'un second épisode pluvieux pendant les quinze jours avant récolte. Ainsi, lors de notre travail, nous avons bénéficié de trois types de millésimes contrastés au regard de la contrainte hydrique : 2017 pouvant être considéré comme un millésime sans contrainte hydrique, 2016 étant un millésime avec une contrainte hydrique durable et soutenue pendant le développement de la baie, et 2015 caractérisé par une contrainte hydrique moyenne et interrompue juste après la floraison et au début de la véraison.

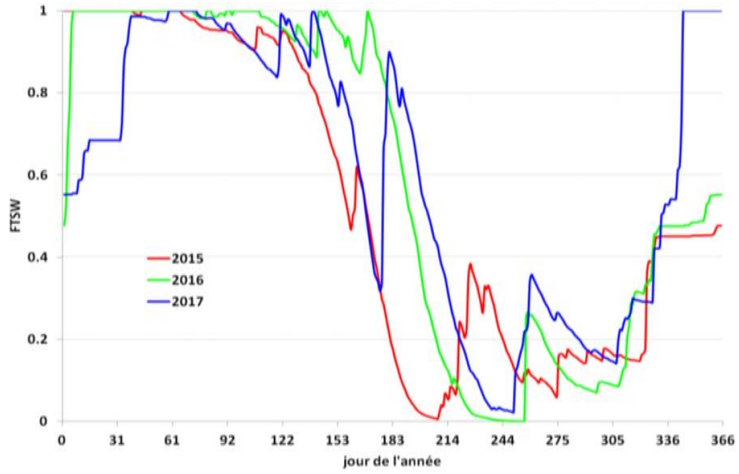


Figure 49 : Évolution du bilan hydrique au cours de l'année 2017 en comparaison avec les années 2015 et 2016
(Données INRA, ph. PIERI, source : bordeauxraisin.fr)

Sans approche statistique, nos résultats nous permettent de relier la caractérisation hydrique du millésime et les teneurs en PAs des pépins exprimées en mg/g de MF de pépin : les teneurs les plus faibles sont liées au millésime le moins contraint, et les teneurs les plus élevées liées au millésime le plus sec. Ces résultats confirment ceux de Lorrain et al., (2011), Casassa et al., (2015) et de Genebra et al., (2014) mais sont contradictoires de ceux de Geny et al., (2003) et Roby et al., (2004). Néanmoins, ces différences peuvent être expliquées par une modification de la régulation des gènes de la voie de biosynthèse liée à l'alimentation hydrique (Genebra et al., 2014). Les résultats de ces auteurs suggèrent que le régime d'irrigation altèrerait la biosynthèse des tanins : tous les transcrits codant les enzymes de biosynthèse des flavanols *(VvLAR1, VvLAR2, VvANR)* sont régulés positivement dans les pépins issus de plantes non ou peu irriguées, et ceci à tous les stades phénologiques. Le stress hydrique provoquant l'accumulation d'acide abcissique (Düring et al., 1995), nous pouvons penser que la régulation de ces voies métaboliques soit induite par l'acide abcissique (ABA), comme cela a pu être démontré au niveau de la pellicule par Lacampagne et al. (2010). Pour cet auteur, les niveaux d'expression de *VvLAR2* et *VvANR* sont augmentés après un traitement à l'acide abcissique modulant ensuite les teneurs finales en tanins des baies. Par une approche complémentaire de protéomique, il a également été démontré qu'un traitement à l'ABA juste avant véraison induisait une surexpression de trois protéines impliquées dans la voie métabolique des composés phénoliques : la chalcone isomérase, la dihydroflavonol-4-reductase et l'anthocyanidine réductase, toutes trois directement reliées à la

synthèse des tanins condensés (Giribaldi et al., 2010). Un autre point à évoquer semble être celui de la disponibilité en carbone pour la synthèse des tanins. S'il a été montré qu'un stress hydrique pouvait limiter l'importation et le métabolisme des sucres et/ou l'importation d'eau réduisant le carbone disponible pour la biosynthèse de composés secondaires dans des vignes stressées (Pastenes et al., 2014). Il est aussi bien connu qu'en cas de croissance végétative continue, ces flux carbonés sont préférentiellement distribués aux organes végétatifs plutôt qu'aux baies. Ainsi, en cas de non-limitation hydrique (comme c'est le cas de 2017), une partie des flux carbonés sont utilisés en permanence pour la croissance des rameaux et non pour la maturation des baies (Dai et al., 2010). Au contraire en 2016, alors que la contrainte hydrique s'est installée progressivement et durablement à partir de la véraison, l'arrêt de croissance végétatif a pu être marqué et les flux carbonés préférentiellement redirigés vers les baies (il est important ici de noter que nous ne sommes jamais en « stress »).

Ainsi, pour cette catégorie, nos résultats indiquent que, dans un contexte donné, la teneur finale en tanins condensés dans les pépins semble être plus influencée par le millésime que par le cépage. Par ailleurs, le nombre de pépins par baie ainsi que leurs poids semble être un des paramètres clés influençant l'apport tanique des pépins dans le vin.

I.2.b. Étude structurale

I.2.b.i) Degré de polymérisation moyen (DPm)

En plus des teneurs, les degrés moyens de polymérisation (DPm) ont été calculés (**Figure 46**). Le **Tableau 21** représente les différences significatives entre les groupes des moyennes de DPm.

Tableau 21 : Représentation des différences significatives entre les DPm des PAs des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours de leur développement en 2015, 2016 et 2017

a, b, c et d pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les moyennes de DPm entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, $p<0,05$).

		DPm				
		FG	DV	FV	M	SM
Sauvignon blanc	2015	a	b	a	b	c
	2016	a	b	c	c	c
	2017	a	a	b	c	d
Tannat	2015	a	b	a	c	d
	2016	a	b	a	a	ab
	2017	a	b	c	c	c
Cabernet Sauvignon	2015	a	b	ac	c	d
	2016	a	b	a	c	a
	2017	a	b	c	cd	d
Merlot	2016	a	b	a	a	c
	2017	a	a	b	b	b

Les valeurs obtenues varient entre 0,8 et 4,9 en fonction du stade, du cépage et du millésime considérés, ce qui est conforme à la gamme généralement observée (Chira et al., 2009, 2009, 2011;

Downey et al., 2003; Geny et al., 2003; Kennedy et al., 2000; Mattivi et al., 2009; Obreque-Slier et al., 2012).

A l'inverse du profil d'évolution des teneurs, le profil d'évolution des DPm présente plutôt une forme en U, avec un DPm qui diminue pendant la phase de croissance végétative de la baie, puis qui réaugmente pendant la phase de maturation (**Figure 46**). Ainsi, globalement, au stade où les teneurs sont les plus élevées, le DPm est le plus faible. Ce profil est conservé pour tous les cépages et les millésimes, à l'exception du Sauvignon blanc et du Tannat en 2017 où les teneurs les plus faibles sont observées dès le premier prélèvement. Ce type de profil a déjà été décrit par Downey et al., et Obreque-Slier et al., qui suggèreraient qu'après le pic de synthèse des flavanols libres observé à véraison, les tanins condensés s'allongeaient de manière *quasi* continue jusqu'à la fin du cycle de développement. En revanche, il est contraire à ce qui a été démontré par Bordiga et al., et Kennedy et al., pour qui le DPm diminuerait après véraison (Bordiga et al., 2011; Downey et al., 2003; Kennedy et al., 2000; Obreque-Slier et al., 2012).

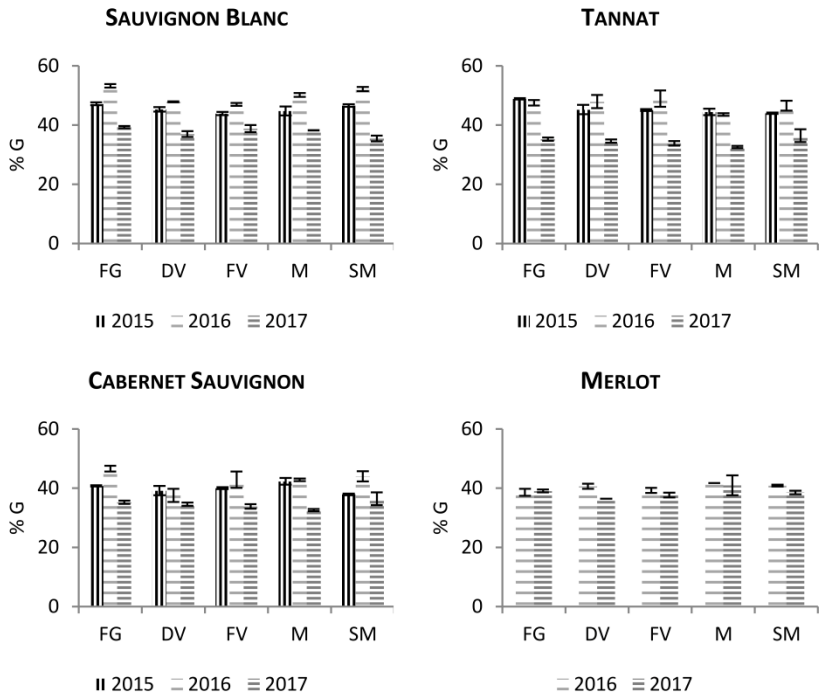
Si l'on s'intéresse à l'effet cépage, il apparait que les DPm les plus importants sont mesurés dans les pépins de Cabernet Sauvignon, puis de Sauvignon blanc, de Tannat et de Merlot (**Figure 46**), concordant avec certaines des données présentes dans la littérature (Chira et al., 2009, 2011; Lorrain et al., 2011; Obreque-Slier et al., 2012).

En ce qui concerne l'effet millésime, contrairement aux teneurs, nos résultats ne mettent pas en avant un DPm plus élevé pour une année donnée. De ce fait, contrairement aux teneurs, l'alimentation hydrique et le millésime ne semblent pas impacter ce critère, comme cela avait déjà été démontré par Geny et al,. Cependant, ces résultats sont contraires à ceux de Lorrain et al., qui avait montré un lien entre un faible DPm et un millésime pluvieux (Geny et al., 2003; Lorrain et al., 2011).

Ainsi, l'évolution du profil du DPm est conservée entre cépages et millésimes, avec un minimum au moment de la véraison. Certains cépages ayant des DPm plus hauts que d'autres dans des conditions de culture identiques, la valeur du DPm semble dépendante du cépage, mais sans lien apparent avec les teneurs en flavanols ou proanthocyanidines, ni avec les conditions climatiques du millésime.

I.2.b.ii) Le pourcentage de galloylation (% G)

La seconde caractéristique structurale étudiée dans ce travail est le pourcentage de galloylation (% G) des tanins de pépins (**Figure 50**).



		FG	DV	FV	M	SM
Sauvignon Blanc	2015	a	b	b	b	a
	2016	a	b	b	c	a
	2017	a	b	ab	b	b
Tannat	2015	a	b	b	b	b
	2016	a	a	a	b	a
	2017	a	a	a	b	a
Cabernet Sauvignon	2015	a	ac	a	b	c
	2016	a	b	c	c	c
	2017	a	a	a	b	a
Merlot	2016	a	b	a	b	b
	2017	a	b	ab	a	a

Figure 50 : Évolution du pourcentage de galloylation (% G) des pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon, et Merlot en 2015, 2016 et 2017

a, b et c pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre les moyennes de % G entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, $p<0,05$).

Le profil d'évolution du pourcentage de galloylation des tanins condensés de pépins au cours de leur développement apparaît constant, en accord avec les données de la littérature (Bordiga et al., 2011; Kyraleou et al., 2017; Obreque-Slier et al., 2010, 2012). Les valeurs acquises au cours de cette étude sont proches de celles déjà décrites dans la bibliographie (Chira et al., 2009; Lorrain et al., 2011; Obreque-Slier et al., 2012)

En ce qui concerne l'effet cépage, le pourcentage de galloylation du Sauvignon blanc apparaît comme étant plus élevé que celui de tous les cépages rouges étudiés. Par contre, nous n'observons aucune différence entre les cépages rouges, et ceci, quel que soit le millésime ou le stade de développement considéré, allant à l'encontre des travaux de Lorrain et al., (2011) qui avaient montré un pourcentage de galloylation plus important dans les pépins de Cabernet Sauvignon que de Merlot.

En revanche, l'effet millésime semble bien marqué, avec un % de galloylation toujours plus bas en 2017 (année la moins contraignante en terme hydrique) qu'en 2015 et 2016. Tout comme pour les teneurs, il est possible que les conditions environnementales puissent impacter ce critère avec une galloylation favorisée en cas de contrainte hydrique modérée. Cet effet a déjà été mis en évidence dans les pellicules, mais n'a jamais été reporté dans les pépins (Cáceres-Mella et al., 2017).

Ainsi, le profil d'évolution du pourcentage de galloylation est conservé entre les cépages et les millésimes et reste stable au cours du développement du pépin. Il semble être conditionné à la fois par le cépage et les conditions climatiques, avec une galloylation favorisée en cas de contrainte hydrique modérée.

I.2.b.iii) Les sous-unités terminales et les sous-unités d'extension

La caractérisation des unités terminales et d'extension, réalisée sur l'ensemble des échantillons (**Figure 51**), montre qu'au sein d'un même cépage et d'un même millésime, les tanins de pépins présentent les mêmes caractéristiques structurales pour chaque stade de développement, comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Bordiga et al., 2011; Downey et al., 2003; Kennedy et al., 2000; Kyraleou et al., 2017).

L'unité d'extension majoritaire retrouvée dans notre étude est l'épicatéchine, suivie de l'épicatéchine gallate et la catéchine, alors que l'unité terminale préférentielle semble être la catéchine, suivie en proportions égales de l'épicatéchine et de l'épicatéchine gallate (**Figure 51**).

Si l'on compare nos résultats avec les données de la bibliographie, il est assez difficile d'établir une relation directe avec le cépage ou les conditions du millésime. En ce qui concerne l'effet cépage, la bibliographie ne permet pas d'établir un consensus. Selon Obreque-Slier et al., il n'y aurait pas de sous-unité (terminale ou d'extension) préférentielle pour le Cabernet Sauvignon (Obreque-Slier et al., 2010, 2012); pour Chira et al. la catéchine semblerait, au contraire, être la sous-unité terminale majoritaire (Chira et al., 2009) alors qu'enfin pour Monagas et al., comme pour nous, l'épicatéchine serait majoritaire en tant qu'unité d'extension, et la catéchine en tant qu'unité terminale (Monegas et al., 2003).

Pour l'effet millésime, aucune source bibliographique ne rapporte de telles données.

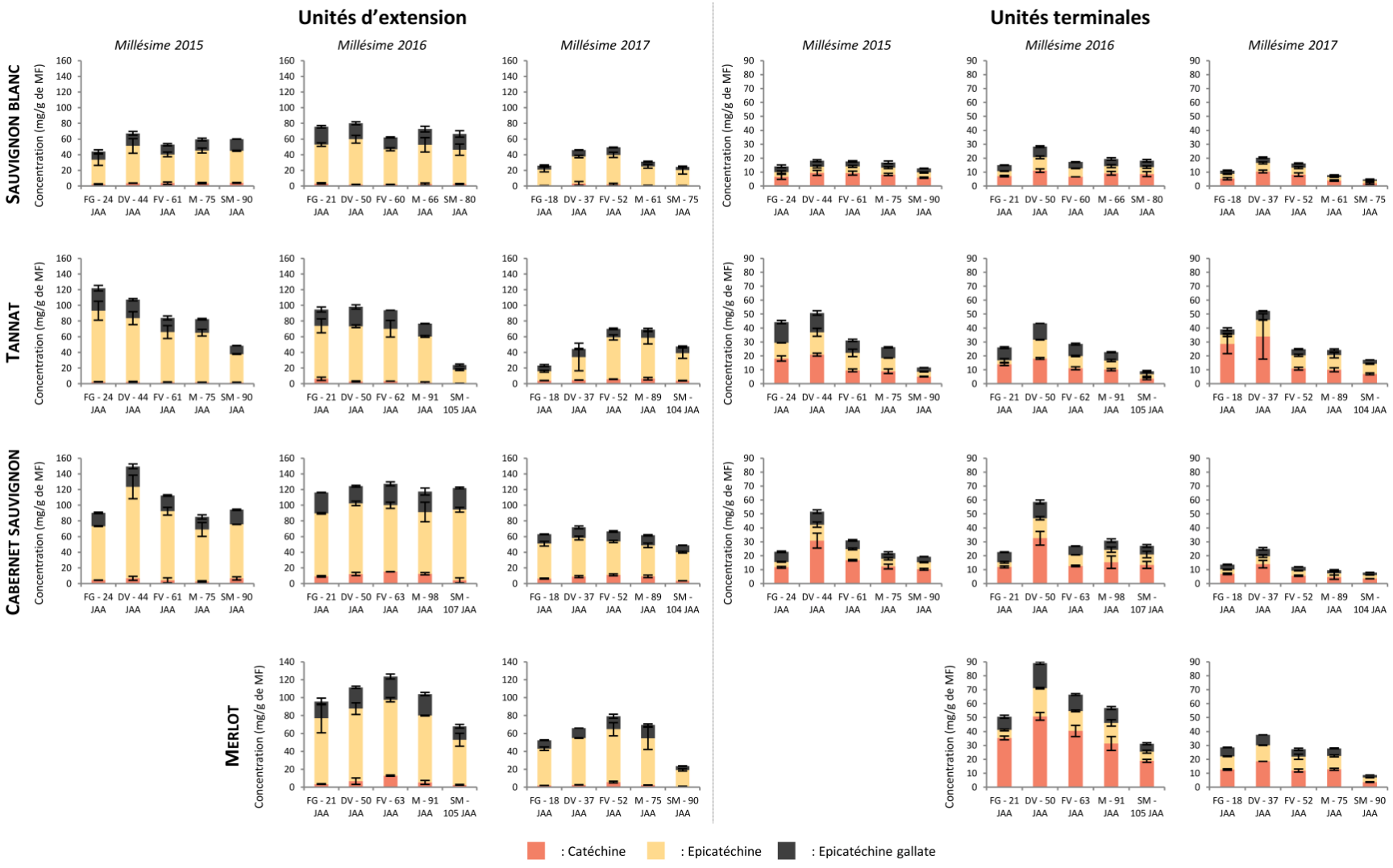


Figure 51 : Caractérisation des unités d'extension et des unités terminales des proanthocyanidines, exprimées en mg/g de MF, des pépins de Sauvignon Blanc, Tannat, Sauvignon et Merlot en 2015, 2016 et 2017.

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse ; MF : Matière fraîche ; DPm : Degré moyen de polymérisation

Cette caractérisation fine a donc permis de vérifier que, dans un même contexte environnemental (climat, pratiques culturales et sol), la répartition des unités terminales et d'extension ne variait ni en fonction du millésime, ni en fonction du cépage, ni au cours du développement du pépin. Cela serait une constante relativement fixe caractéristique d'un lieu donné. Ces résultats semblent être en accord avec ceux de Chira et al., qui avait démontré que les mécanismes de synthèse et de polymérisation des flavanols libres dépendaient plus de la parcelle que du cépage ou du millésime (Chira et al., 2009). Ainsi, nos mesures ayant toutes été réalisées sur une même parcelle, avec un sol, des conditions de culture et un climat identiques pour les quatre cépages, il n'est pas étonnant de n'observer qu'un seul profil pour l'ensemble des échantillons étudiés.

I.3. Conclusion

Ce premier travail de comparaison de cépages et de millésimes, dans des conditions de sol et de pratiques culturales identiques, a permis de montrer que le métabolisme des tanins de pépins était un métabolisme bien conservé, quels que soient le cépage et le millésime concerné. Les teneurs en tanins augmentent dans les pépins pendant la phase de croissance végétative de la baie jusqu'à véraison, puis diminuent pendant la maturation.

En revanche, si on ne considère que les teneurs au moment de la récolte, il apparait une grande diversité en fonction du cépage, du millésime et du mode d'expression utilisé. Ainsi nos résultats mettent en évidence que :

- **La teneur en tanins au moment de la récolte est plus liée au nombre et au poids de pépins par baie qu'à la concentration intrinsèque de tanins exprimée en mg ou µg/g de MF de pépin.**
- **L'effet cépage est surtout déterminant pour le DPm et le pourcentage de galloylation, mais influence ni les teneurs finales en flavanols, ni la répartition des différentes unités.**
- **Le millésime, par le biais de la contrainte hydrique, impacte surtout les teneurs en tanins condensés et le pourcentage de galloylation, mais n'a pas d'effet sur les teneurs en flavanols libres ou le DPm.**

II. Étude complémentaire : caractérisation fine des tanins de pépins de Merlot

Ainsi, afin de vérifier les hypothèses formulées précédemment et d'affiner le profil de la composition tanique de pépins au cours de leur développement, une nouvelle expérimentation a été mise en place en 2018. Il s'agit ici de réaliser, de manière fine, le suivi des teneurs et de la composition en flavanols et en tanins condensés de pépins de Merlot sur une parcelle différente de

celle déjà étudiée jusqu'à maintenant. Cette parcelle, bien que différente de la précédente, est néanmoins toujours située en Pessac-Léognan, sur un sol de graves et est plantée avec une densité comparable. Les baies ont été prélevées à partir du stade fermeture de grappe, soit vingt jours après l'anthèse, à raison d'un prélèvement tous les trois jours en moyenne, pendant 100 jours.

L'idée sous-jacente à cette expérimentation était, par la suite, de pouvoir relier les profils d'évolution en composés phénoliques (réalisés par dosage chimique), à l'étude de l'expression des gènes de biosynthèse des tanins et à l'étude de la localisation de ces tanins au sein des tissus et des cellules. Pour cela, il était nécessaire, d'avoir un profil avec des dates de prélèvement rapprochées dans le temps pour pouvoir ensuite positionner les observations microscopiques aux périodes les plus pertinentes.

II.1. Caractérisation des flavanols

L'évolution des teneurs en flavanols libres des pépins de Merlot du millésime 2018 est représentée dans la **Figure 52**.

Le profil d'évolution des flavanols observé lors de cette expérimentation (**Figure 52**) est comparable à celui déjà observé au cours des millésimes précédents, mais présente des données complémentaires. Ainsi, pour la première fois à notre connaissance, un profil fin de l'évolution des teneurs en flavanols de pépins décrit cinq phases distinctes:

- une phase de stabilisation des teneurs jusqu'à 37 JJA, correspondant à la fin de la période de croissance végétative de la baie (phase 1) ;
- une phase d'accumulation des teneurs entre 37 et 57 JAA correspondant au début de la véraison (phase 2) ;
- une phase de stabilisation des teneurs entre 57 et 65 JAA correspondant au déroulement de la véraison (phase 3) ;
- une phase de diminution des teneurs à partir de 65 JAA durant environ 20 jours (phase 4) ;
- une dernière phase de *quasi* stabilisation des teneurs jusqu'à la récolte voir post récolte (phase 5).

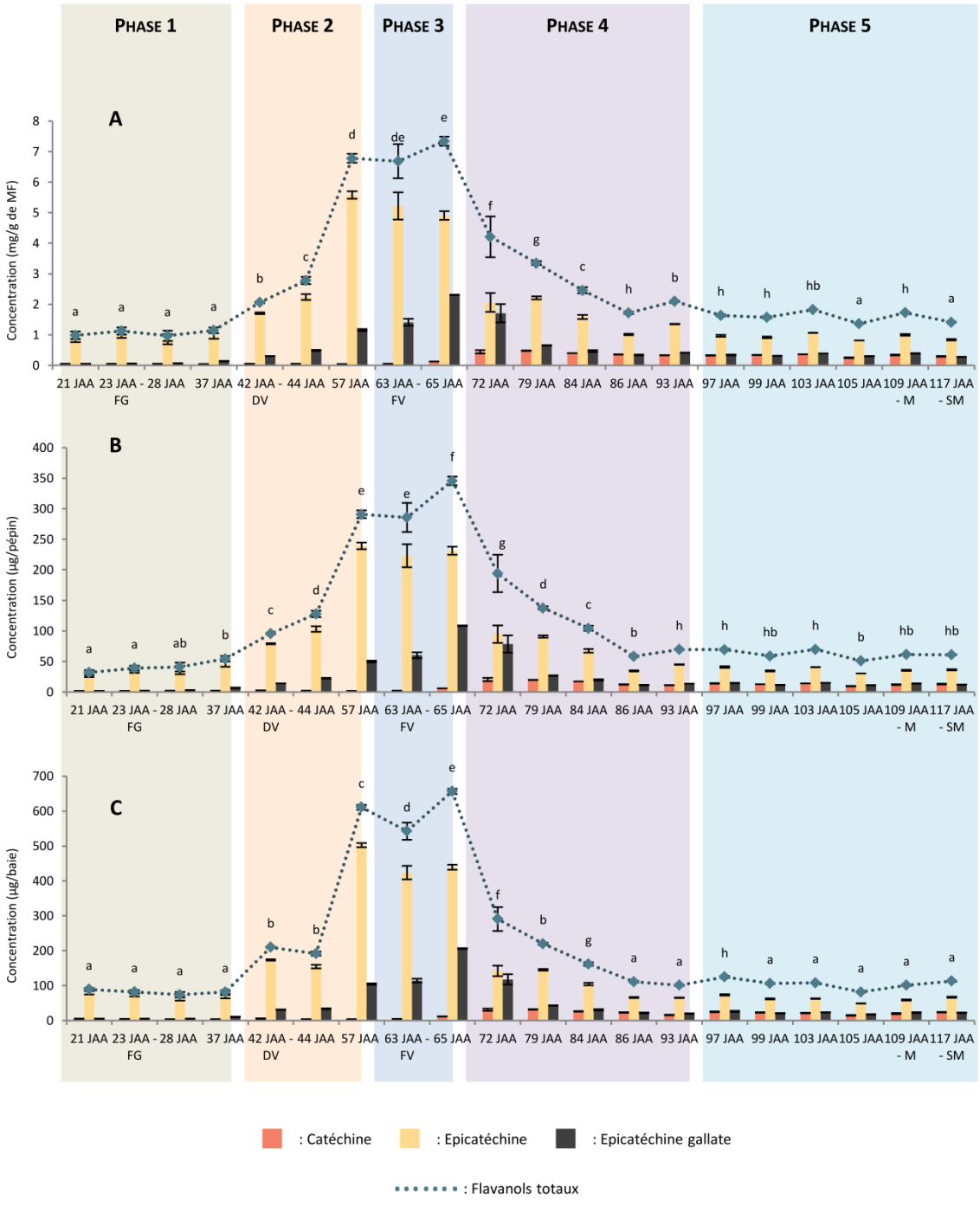


Figure 52 : Évolution de la teneur en flavanols libres des pépins issus des baies de Merlot en 2018, exprimée en mg/g de MF de pépin (A), en µg/pépin (B), en µg/baie (C).

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse

a, b, c, d, e, f, g et h indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs en flavanols totaux entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

Ces résultats nous permettent de confirmer le basculement du métabolisme des tanins à la véraison, avec potentiellement des modifications importantes d'expression de gènes et d'activités enzymatiques comme cela a été démontré (Bogs et al., 2005; Gagné et al., 2009; Genebra et al., 2014). Ils nous permettent également de montrer, pour la première fois, que les teneurs en flavanols détectées à la récolte sont quasi similaires à celles détectées quelques jours après la fin véraison. Ainsi, la notion de maturité phénolique ne doit pas uniquement tenir compte des teneurs en tanins, car elles sont définies bien avant que ce que l'on considère comme un pépin mûr œnologiquement.

Si l'on considère les teneurs (**Figure 52**), elles sont comparables à celles déjà décrites en 2017 et plus faibles que celles de 2016 (**Figure 43**, **Figure 44** et **Figure 45**). Comme 2017, 2018 n'est pas un millésime ayant induit une contrainte hydrique importante au vignoble, ce qui peut expliquer ces valeurs relativement plus faibles.

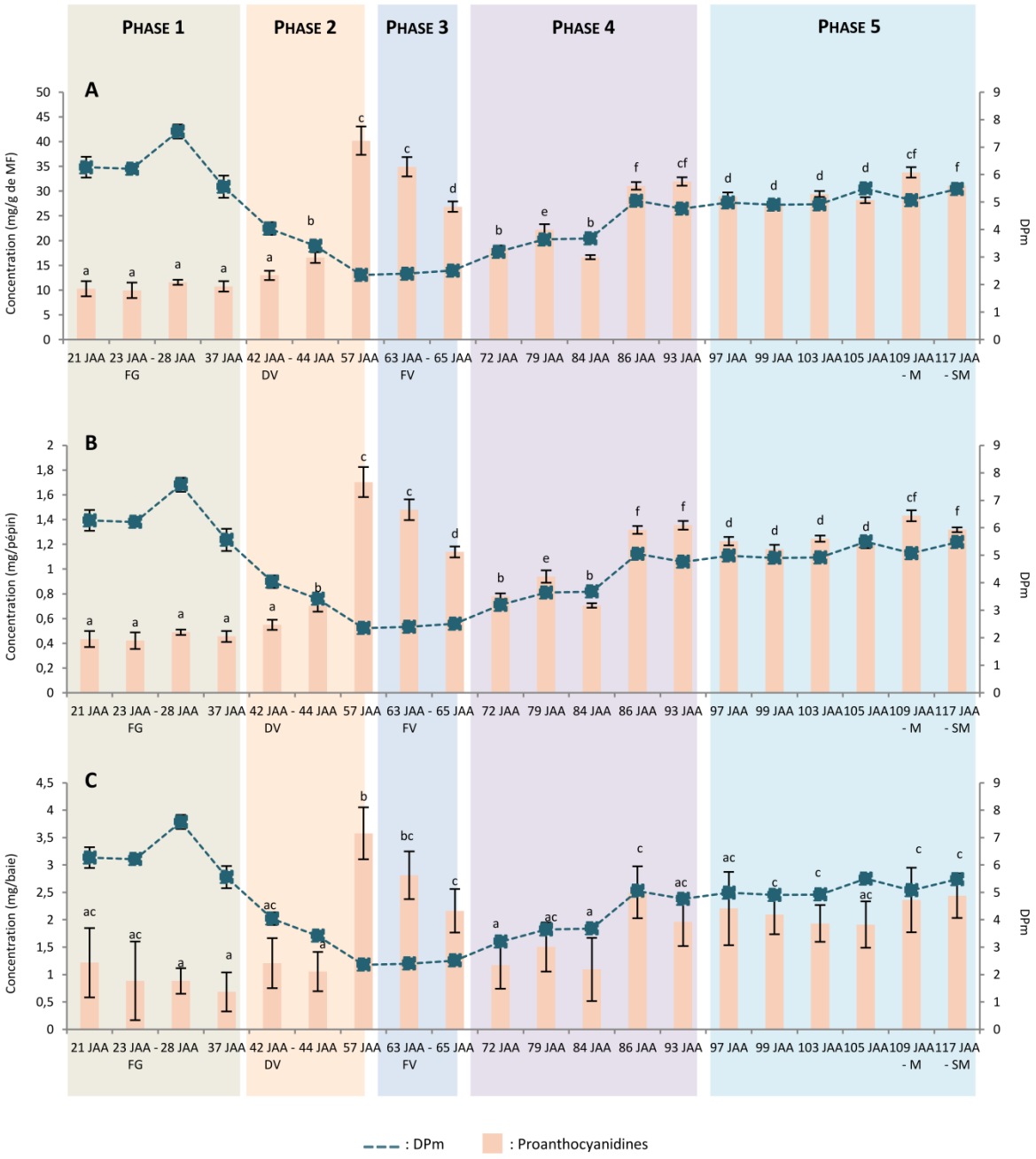
En revanche, contrairement aux résultats obtenus sur la première parcelle expérimentale, le monomère majoritaire est l'épicatéchine et non la catéchine, qui dans ce cas est *quasi* inexistante. Le monomère le plus présent dans les pépins de Merlot de cette parcelle en 2018 est l'épicatéchine, suivi de l'épicatéchine gallate et de la catéchine. Ainsi pour la première fois au cours de notre travail, la répartition des monomères est différente de celle observée au cours des trois années précédentes, alors que nous considérons le même cépage dans des conditions géographiques proches.

Les seuls paramètres qui sont modifiés sont la parcelle et le millésime. Ces résultats confirment donc l'hypothèse de Chira et al., (2009) de l'effet marqué du terroir sur la composition tanique des pépins de raisin. En effet, selon ces auteurs, pour un même millésime, la composition en flavanols libres diffèrerait en fonction des caractéristiques parcellaires et notamment la nature du sol des parcelles.

Ces résultats confirment et complètent les résultats obtenus au cours des trois années précédentes. Le profil d'évolution des teneurs en flavanols est mieux défini et cinq phases peuvent être décrites. L'effet millésime est ici aussi observé, et l'effet terroir est identifié grâce à une répartition des unités de flavanols libres différente de celle observée jusqu'à maintenant.

II.2. Caractérisation des tanins condensés

L'évolution des teneurs en tanins condensés des pépins de Merlot du millésime 2018 est représentée dans la **Figure 53**.



	21 JAA	23 JAA	28 JAA	37 JAA	42 JAA	44 JAA	57 JAA	63 JAA	65 JAA	72 JAA
DPm	a	a	b	c	d	e	f	f	f	e
	79 JAA	84 JAA	86 JAA	93 JAA	97 JAA	99 JAA	103 JAA	105 JAA	109 JAA	117 JAA
DPm	e	e	g	g	g	g	g	c	g	c

Figure 53 : Évolution de la teneur en tanins condensés des pépins issus des baies de Merlot en 2018, exprimée en mg/g de MF de pépin (A), en mg/pépin (B), en mg/baie (C).

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse ; DPm : Degré moyen de polymérisation

a, b, c, d, e et f indiquent les différences significatives entre les moyennes de teneurs en PAs entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05).

Tableau représentatif des différences significatives entre les moyennes de DPm entre chaque stade de développement (ANOVA, Test de Tuckey, p<0,05)

Le profil d'évolution des tanins condensés (**Figure 53**) semble évoluer d'une manière comparable à celui des flavanols libres. Ainsi, après une phase de faible variation des teneurs jusqu'à début véraison, les teneurs en tanins condensés augmentent pour atteindre un maximum autour de la mi-véraison pour chuter à fin véraison. Au cours de la phase de maturation, après une légère période d'augmentation, les teneurs restent stables jusqu'à la récolte, voire après la récolte. Ainsi, comme pour les flavanols, les cinq phases sont conservées et décrites pour la première fois de manière aussi fine.

Si l'on considère maintenant les teneurs, elles apparaissent plus faibles que celles mesurées en 2016 et 2017 dans ce cépage, en lien avec les conditions climatiques non contraignantes du millésime, ou bien en lien avec un meilleur fonctionnement hydrique de cette parcelle comparée à la parcelle d'expérimentation.

En ce qui concerne le DPm (**Figure 53**), à l'image des années précédentes, le profil d'évolution des DPm est inverse au profil d'évolution des teneurs en tanins condensés, avec une chute du DPm au moment où les teneurs en flavanols libres et en proanthocyanidines sont les plus hautes. Ainsi, le DPm diminue progressivement pendant la véraison, puis réaugmente à la fin et juste après, pour se stabiliser au cours de la seconde phase de maturation de la baie. Ce profil d'évolution est similaire à celui décrit par Downey et al., sur les pépins de Shiraz (Downey et al., 2003), mais contraire à celui décrit par Kennedy et al., qui observe une diminution constante du DPm des tanins condensés de pépins de Shiraz tout au long du développement (Kennedy et al., 2000).

Si l'on regarde les valeurs de DPm, elles sont nettement plus élevées que celles observées sur la parcelle expérimentale en 2016 et 2017 (5,5 ± 0,1, contre 1,9 ± 0,1 en 2016, et 2,2 ± 0,1 en 2017). Cette différence semble être plus due à un effet parcelle que millésime, car comme nous l'avons montré, et en accord avec Lorrain et al. (2011) et Geny et al. (2003), le DPm varie peu selon les années mais est plutôt un caractère du cépage ou de la parcelle.

Si l'on considère le pourcentage de galloylation, comme pour les essais précédents, il reste stable au cours du développement du pépin et est comparable à celui de 2016 et 2017, même si la valeur obtenue en 2018 (%G ≈ 30 tout au long du développement) est plus faible que celle des millésimes 2016 (%G ≈ 40) et 2017 (%G ≈ 40) (**Figure 54**). Cette observation est en accord avec nos conclusions précédentes qui montraient que le pourcentage de galloylation tendait à être augmenté en cas de contrainte hydrique modérée. Ici, en raison de l'absence de contrainte hydrique en 2018 sur cette parcelle, il est tout à fait cohérent de trouver des valeurs plus faibles que celles déterminées précédemment.

Enfin, contrairement aux résultats observés précédemment, dans les pépins de Merlot 2018, l'unité terminale préférentielle est l'épicatéchine, suivie de l'épicatéchine gallate, puis de la catéchine. En

revanche, en termes d'unité d'extension, l'épicatéchine apparaît toujours comme l'unité d'extension privilégiée, suivie par l'épicatéchine gallate et la catéchine (**Figure 54**).

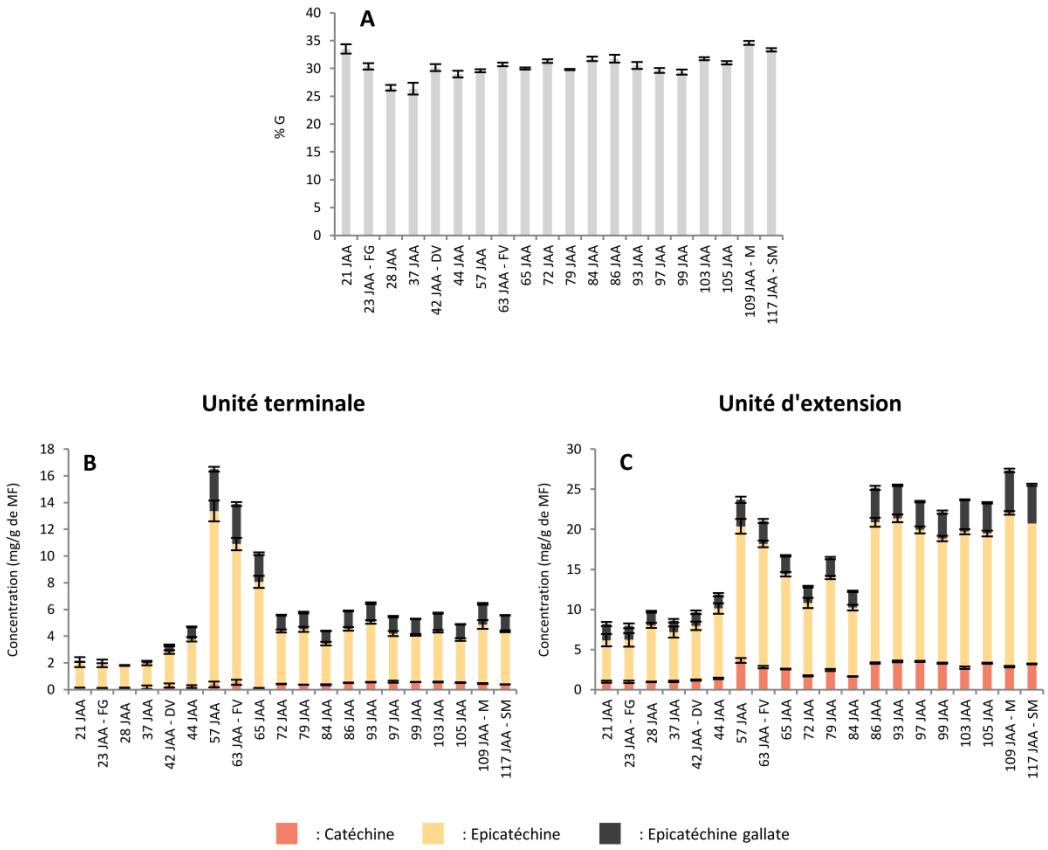


Figure 54 : Évolution du pourcentage de galloylation (A), des teneurs en unités terminales (B) et des teneurs en unité d'extension (C) des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018.

FG : Fermeture de Grappe ; DV : Début Véraison ; FV : Fin Véraison ; M : Maturité ; SM : Surmaturité ; JAA : Jours après Anthèse

II.3. Conclusion

Ce travail de comparaison fine de la caractérisation de la composante tanique de pépins issus d'une parcelle différente de celle étudiée jusqu'à présent (conditions de sol et de pratiques culturales) a permis de :

- **Confirmer et affiner le profil métabolique de la synthèse des tanins de pépins et de décrire cinq phases clés pour l'évolution des teneurs en flavanols et en tanins condensés avec un basculement du métabolisme au moment de la véraison.**
- **Mettre en évidence que la composition finale en tanins dans le pépin est atteinte bien avant la récolte et que la notion de maturité phénolique telle qu'elle est utilisée aujourd'hui ne doit pas se restreindre au dosage des tanins.**
- **Mettre en évidence que le DPm varie peu selon les années, mais est plutôt un caractère du cépage ou/et de la parcelle.**

- **Mettre en évidence que le millésime au travers la contrainte hydrique peut impacter le pourcentage de galloylation.**
- **Mettre en évidence que la répartition des unités terminales et d'extension est plus liée à la parcelle qu'au cépage.**

III. Localisation cellulaire des tanins de pépins

La caractérisation physico-chimique des tanins de pépins a permis de mettre en évidence l'évolution des teneurs au cours du développement de ce dernier. Néanmoins, en raison de la technique d'extraction qui se réalise sur broyat de pépins entiers, il est impossible de différencier les tissus du pépin contenant ces tanins. L'évolution de la composition en proanthocyanidines a été étudiée d'un point de vue histologique par Chevalier et al (2003) et Cadot et al. (2006) à partir d'une coloration au bleu de Toluidine et au p-dimethylaminocinamaldehyde (DMACA) pour localiser les flavanols. Selon ces auteurs, les tissus contenant des tanins condensés sont l'épiderme, les couches internes du tégument externe autour du raphé et la couche interne du tégument interne. Pour ces auteurs, tous ces tissus contiennent des tanins de la nouaison jusqu'à la récolte sans modification de contenu, même si l'observation microscopique indique une modification de la coloration au niveau des parois pouvant avoir des conséquences sur le contenu en tanins, sans pour autant qu'il ait été possible de caractériser biochimiquement ces différences (Cadot et al. 2006). Au cours de son travail, Cadot et al., a observé une augmentation de la coloration bleue du pépin à la vendange, due à la réaction avec le DMACA, laissant supposer une très forte concentration en tanins condensés à ce stade. Mais, la relation entre l'intensité de la coloration et la quantité de flavanols n'est pas toujours linéaire, car la réaction colorée n'est pas proportionnelle dans le cas d'un mélange hétérogène de flavanols rendant alors difficile l'exploitation de tels résultats (Errea et al., 2000; Treutter, 1989).

Ainsi, afin de compléter ces données, nous avons envisagé, pour étudier la localisation des tanins de pépins, d'utiliser la propriété d'autofluorescence des tanins, et ce sans coloration des tissus au préalable afin de limiter tout artéfact. Dans un premier temps, une méthode d'observation de l'autofluorescence des composés phénoliques a été développée. Dans un second temps, nous avons réalisé des coupes semi-fines des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018 à six stades répartis pendant les phases clés d'évolution des tanins définies par nos précédentes données analytiques (21 JAA, 28 JAA, 42 JAA, 57 JAA, 79 JAA et 93 JAA).

Les images produites nous permettent ainsi d'identifier à la fois les zones d'accumulation et les tissus contenant les tanins.

III.1. Localisation tissulaire des tanins au sein du pépin

La fluorescence nous permet de mettre en évidence une accumulation graduelle des tanins dans le pépin (**Figure 55** et **Figure 56**). Ainsi, au début du développement du pépin (21 JAA), la fluorescence est uniquement visible dans l'épiderme et dans le testa au niveau du bec du pépin. Puis, cette zone de fluorescence semble se disperser sur les deux côtés du pépin, toujours dans le testa (28 JAA). Par la suite, tout début véraison (42 JAA), la fluorescence s'intensifie et apparait au niveau du testa, du tegmen et de l'épiderme sur tout le pourtour du pépin. Plus étonnamment, au cours de la véraison, la fluorescence est également retrouvée dans la zone de l'albumen. Après véraison (57 à 93 JAA), l'aspect visuel change et les tissus les plus externes semblent perdre leur fluorescence.

Ces résultats illustrent, pour la seconde fois, la localisation des tanins au sein du pépin**.** Contrairement à Cadot et al. (2006), qui avait observé une présence constante de tanins dans l'intégralité de l'épiderme, du tegmen et du testa dès 60 JAA dans des pépins de Cabernet Franc, nous observons une accumulation progressive des tanins dans les différents tissus du pépin à partir du bec et du tegmen. N'existant pas d'autres travaux que ceux de Cadot et al. (2006), il nous est difficile à ce stade du travail de conclure définitivement au processus mis en place. De plus, nous avons observé pour la première fois une auto fluorescence dans l'albumen laissant penser à la présence de tanins dans ce tissu. Cela n'avait été reporté qu'une seule fois dans le pépin en début de croissance (Cholet, 2001). Dans la même veine, il a été démontré que chez le maïs, il existait des cellules situées à la périphérie de l'albumen contenant des anthocyanines (Neuffer et al., 1997).

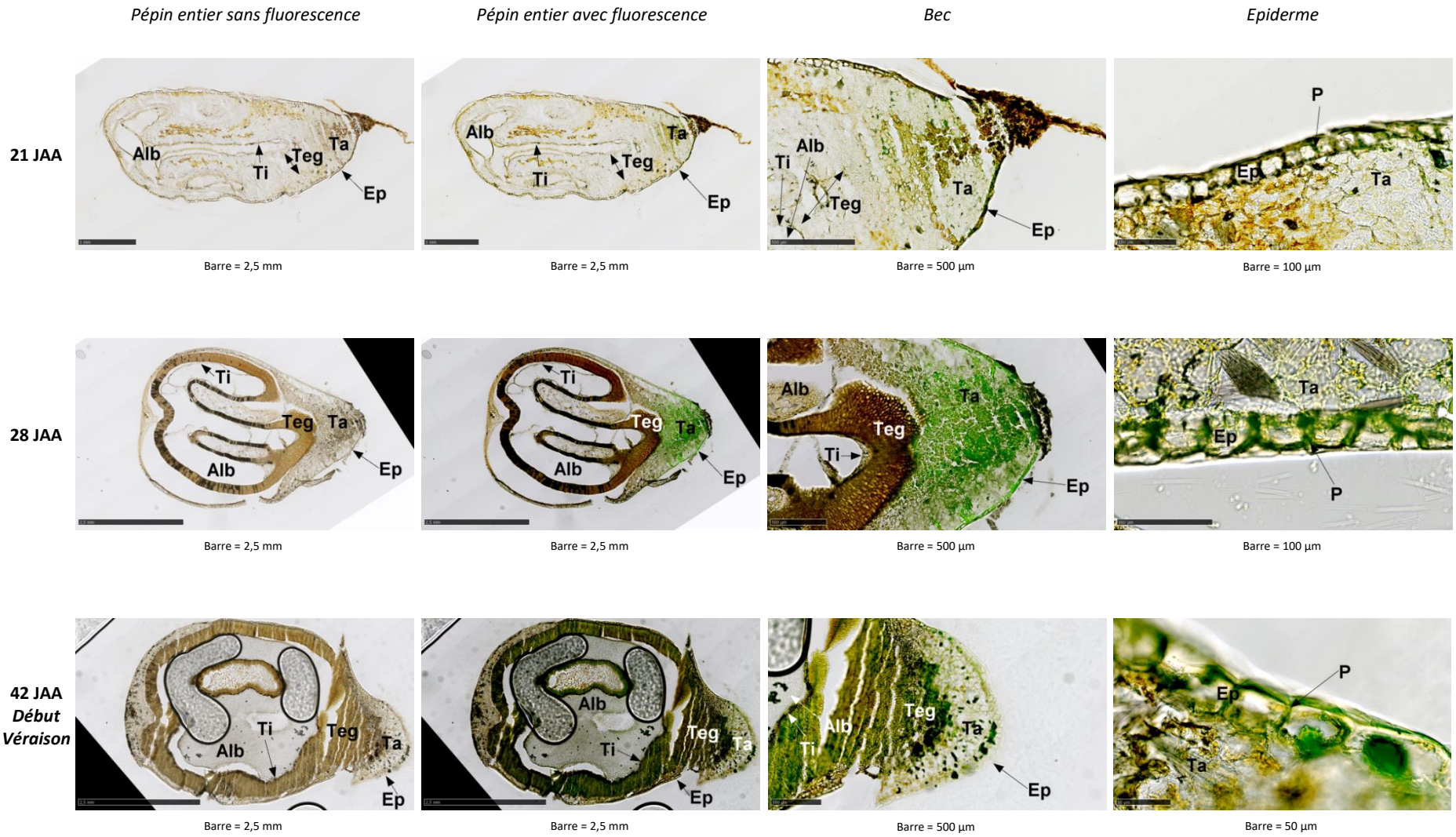


Figure 55 : Observation au Scan de lame de l'autofluorescence des tanins dans les pépins de Merlot du millésime 2018 aux stades 21 JAA, 28 JAA et 42 JAA

Alb : Albumen ; Ep : Épiderme ; JAA : Jours après Anthèse ; P : Paroi cellulaire ; Ta : Testa ; Teg : Tegmen ; Ti : Tégument interne

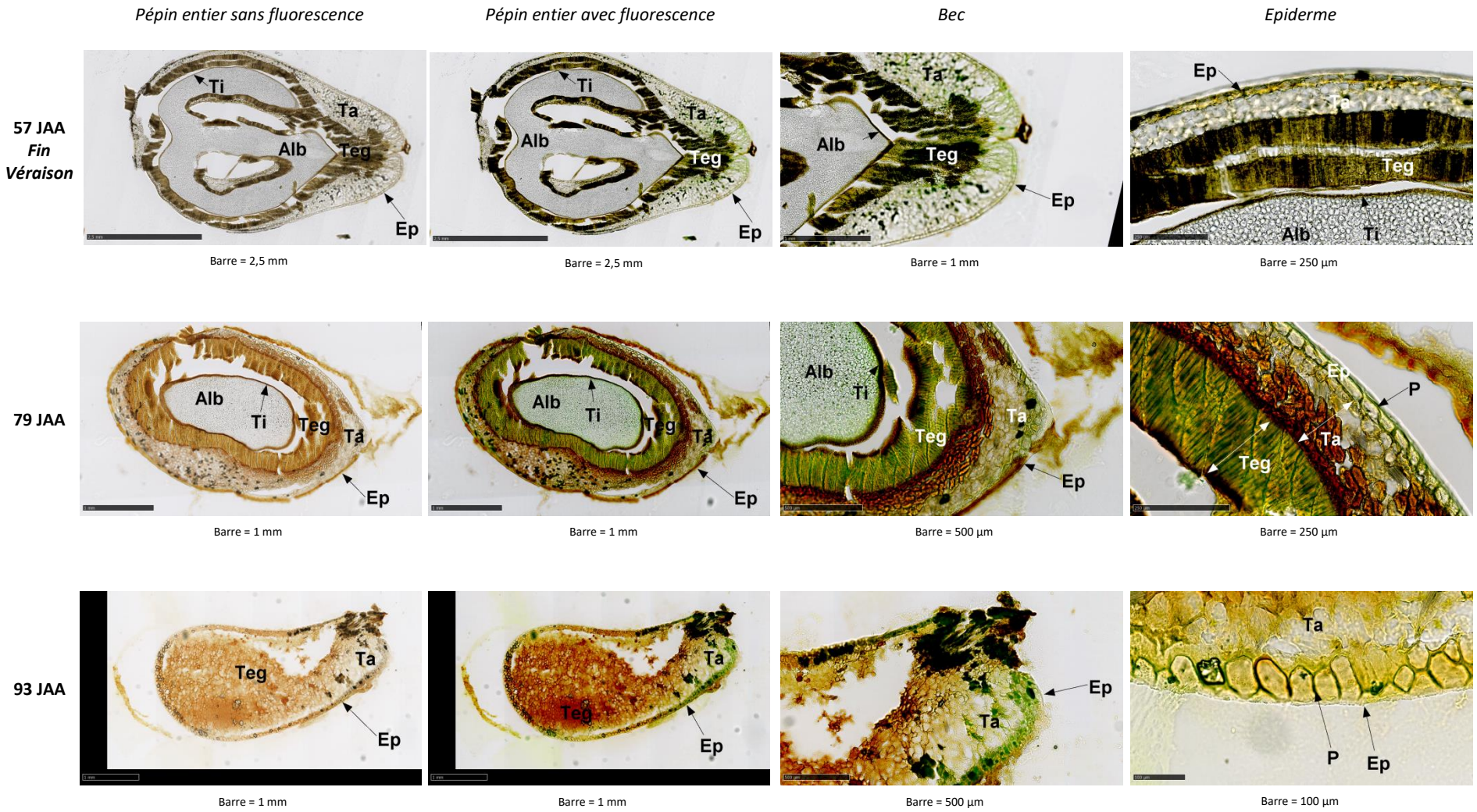


Figure 56 : Observation au Scan de lame de l'autofluorescence des tanins dans les pépins de Merlot du millésime 2018 aux stades 57 JAA, 79 JAA et 93 JAA.

Alb : Albumen ; Ep : Épiderme ; JAA : Jours après Anthèse ; P : Paroi cellulaire ; Ta : Testa ; Teg : Tegmen ; Ti : Tégument interne

III.2. Localisation cellulaire des tanins

Au-delà, de l'observation de la zone de pépins, si l'on regarde au niveau cellulaire, il apparait que la fluorescence est retrouvée surtout au niveau des parois cellulaires. Dans un premier temps, au niveau des parois du tégument et du tegmen, puis du testa et enfin de l'albumen, aux stades les plus tardifs (**Figure 55**, **Figure 56** et **Figure 57**).

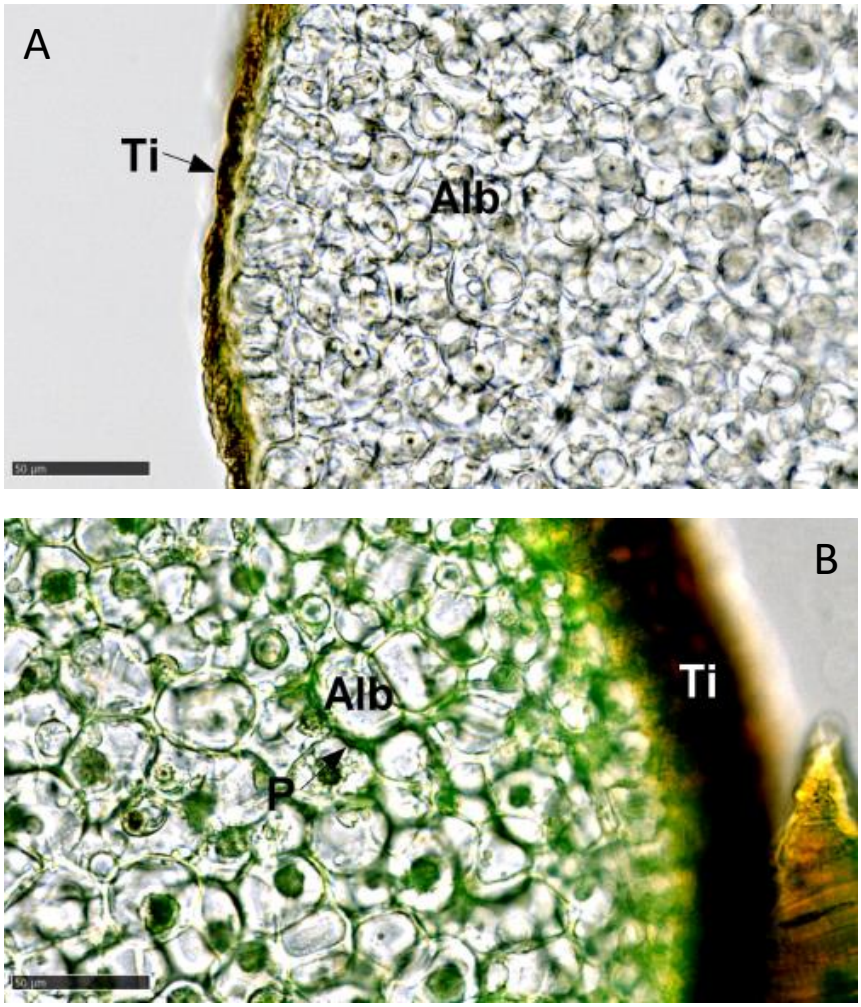


Figure 57 : Observation de l'auto-fluorescence des parois cellulaires des cellules de l'albumen des pépins à 57 JAA (A) et 79 JAA (B)

Alb : Albumen ; JAA : Jours après Anthèse ; P : Paroi cellulaire ; Ti : Tégument interne, Barre = 50 µm

Cette localisation pariétale dans les téguments du pépin n'est finalement pas si étonnante. Elle a été décrite par un seul auteur (Geny et al., 2003) à partir de dosages réalisés sur des extraits de parois de pépins. Ainsi, même si elle n'a jamais été observée en microscopie dans le pépin, la présence de tanins liés aux parois et plus précisément aux polysaccharides pariétaux a été envisagée par Cadot et al., lors de l'observation de la modification de l'aspect des parois, mais également rapportée au niveau des pellicules par plusieurs auteurs (Amrani Joutei et al., 1994; Lacampagne, 2010). En revanche, ce qui est étonnant, c'est la présence de cette autofluorescence au niveau des parois de l'albumen.

Néanmoins, il est à noter que cette fluorescence au niveau des cellules de l'albumen avait également été observée par Cholet (2001). Cependant, il convient, à ce stade de notre travail, de rester prudent quant aux interprétations, et d'envisager que cette fluorescence pourrait provenir d'autres constituants cellulaires du pépin de raisin, tels que les lignines. Mais en raison de la possible présence d'anthocyanidines dans des cellules d'albumen de maïs (Neuffer et al., 1997), il est envisageable que cela soit possible dans le pépin.

Enfin, si on essaye de mettre en relation l'évolution des teneurs en tanins et l'intensité de l'autofluorescence, il apparait une relation inverse. En effet, l'analyse quantitative a montré que les teneurs en tanins diminuaient après la véraison, alors que les images montrent une intensification de l'autofluorescence. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La première serait due à un artéfact de la méthode d'observation utilisée avec confusion des lignines et des tanins au niveau du signal d'autofluorescence. La seconde serait liée à la localisation elle-même avec une réelle insertion des tanins dans le maillage pariétal empêchant la libération de ces derniers au moment de l'extraction pour l'analyse chimique, comme cela a été démontré par Geny et al. (2003) dans le pépin et par Lacampagne (2010) dans la pellicule. Ainsi, il serait possible, par microscopie, de « visualiser » la présence de tanins liés au matériel pariétal sans pouvoir les extraire totalement, malgré des temps de macération longs. Cette hypothèse soulève donc plusieurs questions autour de l'extractibilité des tanins de pépins et du rôle que le vinificateur attribue à la notion de maturité phénolique.

III.3. Conclusion

Pour résumer, au cours du développement de la baie, l'accumulation des tanins dans les différents tissus du pépin est progressive. Schématisées dans la Figure 58, deux phases distinctes ont pu être décrites :

- **Une première phase où, à partir des tissus épidermiques situés au niveau du bec, les tanins « gagnent du terrain » vers les assises cellulaires situées au sommet opposé au bec du pépin.**
- **Une deuxième phase où les tanins semblent progresser des assises cellulaires les plus externes vers les plus internes.**

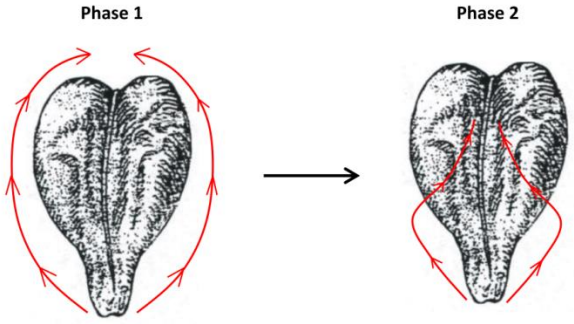


Figure 58 : Mécanisme potentiel de l'évolution de la localisation des tanins de pépins au cours du développement de la baie

À maturité, toutes les assises cellulaires du pépin fluorescent mais avec des intensités différentes laissant supposer à de potentielles variations de teneurs ou, à des états de polymérisation et/ou de liaison avec les composés pariétaux variables.

IV. Discussion générale

Ce premier chapitre avait pour objectif de caractériser le profil d'évolution des tanins de pépins à Bordeaux afin de :

- définir les phases clés du métabolisme des flavanols et des tanins condensés sur lesquels nous pourrions nous baser pour étudier les voies métaboliques et leurs modes de régulation ;
- caractériser la composition chimique des tanins de pépins pour essayer de trouver des marqueurs d'état de maturité du pépin ;
- définir l'importance du millésime et/ou du cépage sur la composition fine de la composante tanique des pépins, pour essayer de mieux comprendre les différences observées par le vinificateur ;
- localiser les tanins dans le pépin afin d'isoler les zones de biosynthèse et de visualiser leur localisation cellulaire, dans un contexte d'étude de l'extractibilité.

Nos premières mesures et dosages ont permis de caractériser le profil d'évolution des teneurs ainsi que les caractéristiques structurales des tanins de pépins au cours de leur développement. Le fait d'avoir comparé pendant trois années, quatre cépages cultivés dans des conditions identiques nous a permis de dégager un **profil type d'évolution des tanins de pépins pour les vignes cultivées à Bordeaux, quel que soit le cépage**. Le profil dégagé lors de ce travail a déjà été rapporté par divers auteurs (Downey et al., 2003; Genebra et al., 2014; Kennedy et al., 2000a, 2000b; Prieur et al., 1994; Romeyer et al., 1985). Il peut être décrit comme un profil « en cloche », présentant une première phase d'accumulation de flavanols libres et de tanins condensés pendant la croissance active de la baie jusqu'à véraison, puis une seconde phase pendant laquelle les teneurs en tanins diminuent jusqu'à la

récolte. En 2018, ce profil a été complété par une série de prélèvements et de mesures avec un pas de temps plus resserré, afin d'évaluer plus finement l'existence de périodes clés dans la biosynthèse des tanins. Ainsi nous avons pour la première fois, décrit cinq étapes couvrant l'ensemble du cycle de développement du pépin à Bordeaux:

- une première étape juste après la nouaison, d'environ quarante jours pendant laquelle la teneur des tanins est constante ;
- une seconde, d'une durée d'environ dix jours et débutant début véraison, pendant laquelle l'accumulation des tanins de pépins s'intensifie pour atteindre les valeurs maximales ;
- une troisième phase encadrant la véraison, avec des teneurs en tanins très élevées et stables ;
- une quatrième étape, post véraison, avec une chute rapide des teneurs pendant une durée d'environ vingt jours ;
- et enfin une dernière phase, correspondant aux trois dernières semaines avant récolte, où les teneurs en tanins restent stables et définitives.

Ces cinq étapes correspondent à celles déjà décrites par Downey et al. en 2003 sur Shiraz et vont nous permettre, pour la suite de ce travail, de choisir les stades les plus appropriés pour l'étude la localisation et l'analyse de l'expression des gènes. Ce profil fin, a également mis en évidence, contrairement aux idées reçues par la majorité des viticulteurs, que la composition tanique définitive des pépins est installée bien en amont de la récolte (environ trois semaines avant) et que la notion de maturité phénolique, telle que l'œnologue l'utilise actuellement, est sûrement à revisiter.

Le second intérêt de cette expérimentation menée sur une collection de vigne, c'est-à-dire dans des conditions de sol, climat et pratiques culturales identiques, est d'avoir pu établir une caractérisation physico-chimique de la composante tanique des pépins précise en comparant : l'évolution des teneurs ; la répartition des flavanols et unités terminale et d'extension ; le degré de polymérisation (DPm) et le pourcentage de galloylation (%G). Ce travail a permis de montrer que **la composition finale d'un pépin variait peu, et était comparable entre cépages et entre millésimes**, en termes de répartition de flavanols dans des conditions données et de quantités exprimées en mg tanins/g de MF de pépin. Ainsi, le pépin, en tant qu'organe de conservation, présente un profil relativement stable, quel que soit le cépage ou le millésime. Mais pour autant, la composante tanique dans un lot de baies à la vendange est bien différente d'un millésime à l'autre ou d'un cépage à l'autre. Nos résultats exprimés en mg de tanins/g de MF pépin, µg tanins/pépin ou µg de tanins/baie, comparés et enrichis de ceux des divers auteurs qui ont étudié les tanins de pépins, nous permettent de montrer que la composante tanique issue des pépins pour un lot de baie est majoritairement due au nombre et au poids des pépins par baie plutôt qu'à leur teneur intrinsèque en tanins (Bordiga et al., 2011; Chira et al., 2009, 2011; Ćurko et al., 2014; Downey et al., 2003; Fuleki et al., 1997; Genebra et al., 2014; Kennedy et al., 2000;

Kennedy et al., 2000; Kyraleou et al., 2017; Lorrain et al., 2011; Mattivi et al., 2009; Monagas et al., 2003; Obreque-Slier et al., 2010, 2012; Roby et al., 2004; Rodríguez Montealegre et al., 2006). **Ainsi, si les vins de Tannat ou de Merlot sont généralement décrits comme plus riches en tanins que les vins de Cabernet Sauvignon, ce n'est pas dû à une concentration plus importante de tanins dans leurs pépins. En effet, la raison serait plus liée à des pépins plus gros (pour le Merlot) ou plus nombreux (pour le Tannat), ce qui modifie alors les quantités totales de ces composés dans un lot.**

Le troisième point abordé dans ce travail est l'évaluation de l'effet cépage sur les composantes taniques du pépin. Le choix des cépages (un blanc et trois rouges) avait été fait de manière empirique par rapport aux caractéristiques taniques généralement décrites dans les vins issus de ces cépages. Ce choix a été suffisant pour évaluer l'effet cépage entre raisins rouges, mais insuffisant au niveau des raisins blancs, pour lesquels il aurait fallu avoir au minimum deux cépages blancs. En effet, nous avons montré que **l'effet cépage était surtout déterminant pour le DPm et le pourcentage de galloylation, mais influençait peu les teneurs finales en flavanols ou la répartition des différentes unités**, même si dans tous les cas il a été observé des différences entre le Sauvignon blanc et l'ensemble des autres cépages rouges. N'existant pas de travaux bibliographiques décrivant de manière fine la composition tanique des pépins entre un grand nombre de cépages, il nous est difficile d'apporter une interprétation fiable sur l'effet cépage. Néanmoins, si nous comparons uniquement les cépages rouges entre eux, nous résultats confirment ceux de Lorrain et al. (2011) qui avait comparé, à Bordeaux, pendant quatre millésimes la composition tanique du Merlot et du Cabernet Sauvignon. Ces auteurs avaient montré que les teneurs en tanins condensés de pépins de Merlot étaient supérieures à celles de Cabernet Sauvignon, alors que le DPm et le pourcentage de galloylation des pépins de Cabernet Sauvignon étaient plus élevés que celui du Merlot. Ainsi, il semblerait que le DPm et le pourcentage de galloylation soient de bons indicateurs pour discriminer ces deux variétés. En ce qui concerne le Tannat, aucun travail préalable n'avait été réalisé sur ce cépage qui apparait comme étant intermédiaire comparé aux deux autres cépages rouges étudiés. En effet, il apparaît comparable au Cabernet Sauvignon pour les teneurs en flavanols, proanthocyanidines et pourcentage de galloylation, mais plus proche du Merlot pour le DPm. Un autre point important de cette approche a été de démontrer **l'importance du cépage dans la construction de la baie et la formation des pépins, ce qui impacte alors sur le nombre et le poids de ces derniers**. En effet, quelles que soient les années étudiées, il s'avère que le poids et le nombre de pépins par baie sont des facteurs déterminants pour la définition de la composante tanique d'un lot de vendange. Nous avons pu observer que le Tannat était le cépage dont les baies étaient toujours les mieux fécondées, avec un nombre de pépins toujours supérieur aux autres cépages, mais des pépins plus petits. Par contre, c'est le Merlot qui présente toujours les pépins les plus gros alors que leur nombre par baie est dans une gamme moyenne. Par ailleurs, le Cabernet Sauvignon et Sauvignon blanc ont un nombre de pépins similaire, mais les pépins

de Sauvignon blanc sont plus petits. **Ainsi en fonction de l'unité d'expression choisie (mg tanins/g de MF, mg tanins/pépin ou mg tanins/baie) pour caractériser la composante tanique, l'effet cépage peut être remarquable et modifier totalement les résultats obtenus**.

Le quatrième aspect étudié dans ce chapitre concerne l'effet millésime et l'impact du niveau d'alimentation hydrique sur la composante tanique du pépin. Lors de notre travail, les quatre millésimes présentaient des caractéristiques climatiques différentes du point de vue du régime hydrique, ce qui nous permet, grâce à l'utilisation du bilan hydrique, de caractériser les quatre années et de les classer. En premier lieu, il est important de noter que même si les régimes hydriques sont différents, et que pour certaines années il a été possible de mettre en évidence une contrainte hydrique, en aucun cas, les parcelles étudiées n'ont présenté de stress hydrique marqué pouvant induire un dysfonctionnement photosynthétique induisant un blocage de maturité ou une chute des feuilles. Ce point est à souligner, car les nombreux travaux qui ont été réalisés auparavant sur l'impact de l'alimentation en eau sur le métabolisme des composés phénoliques s'attardent le plus souvent à comparer des plantes soumises à des stress hydriques et non à des contraintes (Castellarin et al., 2007; Kennedy et al., 2002; Koundouras et al., 2006). Néanmoins, nos résultats montrent **qu'en absence de contrainte hydrique (millésime 2017 et 2018), les teneurs en tanins condensés et le pourcentage de galloylation diminuent**, comme cela a déjà été proposé par Lorrain et al., (2001), Chira et al., (2009) ou Casassa et al., (2015). En revanche, les teneurs en flavanols libres et le DPm ne semblent pas impactés de manière significative par le niveau d'alimentation hydrique, à l'image de ce qui avait déjà été démontré par Geny et al. (2003) et Génébra et al. (2014). Ainsi, au contraire, lorsque l'année est plus sèche, mais sans stress hydrique, la synthèse des tanins serait favorisée. Ce mécanisme serait en partie lié à une régulation de l'expression des gènes *VvLAR1*, *VvLAR2* et *VvANR* qui seraient surexprimés plus tardivement dans les pépins en cas de déficit en eau (Genebra et al., 2014). Cette expression est induite par une production accrue d'acide abcissique (ABA), qui est le régulateur de croissance produit par la plante pour assurer la régulation hydrique *via* la fermeture des stomates (Livne et al., 1972; Tombesi et al., 2015). Ainsi, en cas de limitation hydrique, le taux d'ABA augmente et, comme l'a montré Lacampagne et al. (2009), entraine une surexpression de *VvLAR2* et *VvANR* dans la pellicule pouvant alors moduler les teneurs en proanthocyanidines. De plus, il est admis que le métabolisme des composés phénoliques est également régi par la capacité de la plante à alimenter la baie en éléments carbonés (Dai et al., 2010). En cas de stress hydrique, l'importation et le métabolisme des sucres peuvent être réduits, et ainsi le carbone disponible pour la synthèse des composés secondaires est plus faible (Dai et al., 2010; Pastenes et al., 2014). Cependant, il est aussi bien admis qu'en cas de croissance végétative continue, ces flux carbonés sont distribués préférentiellement aux organes végétatifs plutôt qu'aux baies. Ainsi, en cas de non-limitation hydrique (comme c'est le cas de 2017 et 2018), une partie des flux carbonés sont utilisés en permanence pour la croissance des rameaux, et non pour la biosynthèse et la maturation des baies (Dai et al., 2010). Au

contraire, en 2016, alors que la contrainte hydrique s'est installée progressivement et durablement à partir de la véraison, l'arrêt de croissance végétatif a pu être marqué et les flux carbonés préférentiellement redirigés vers les baies (il est important ici de noter que nous ne sommes jamais en « stress ») favorisant ainsi la synthèse des métabolites secondaires. **Ainsi, en année avec contrainte hydrique modérée, qui favorise l'arrêt de croissance précoce et la synthèse d'ABA, le métabolisme des tanins est favorisé au travers d'une stimulation des gènes et d'une meilleure répartition des assimilas carbonés vers les baies, permettant ainsi d'augmenter les teneurs en proanthocyanidines.** Cette hypothèse sera vérifiée dans le chapitre suivant qui s'intéresse à l'étude de l'expression des gènes *VvLAR1*, *VvLAR2* et *VvANR*, codant les enzymes clés de la synthèse des flavanols. En revanche, en ce qui concerne l'effet millésime sur le pourcentage de galloylation, nous ne sommes pas en mesure d'émettre une hypothèse en raison de l'absence d'études autres que celle-ci sur le pépin.

Un autre point abordé dans ce chapitre concerne l'effet parcelle qui a été évalué à partir de la mise en place du suivi du profil de la composante tanique supplémentaire en 2018, sur cépage Merlot à partir d'une parcelle différente de celle utilisée au cours des trois premières années. Les caractéristiques qui changent sont principalement la nature du sol (sol de graves mais avec une proportion argileuse un peu plus importante, limitant encore plus la contrainte hydrique). Les pratiques culturales sont quasiment similaires avec une densité de plantation proche de la parcelle de collection et un mode de palissage identique (même si la surface foliaire est légèrement supérieure). Les résultats obtenus montrent que **le profil d'évolution des teneurs en flavanols et proanthocyanidines est conservé alors que la répartition des unités terminales et d'extension est fortement modifiée**. Ces résultats sont en accord avec ceux de Chira et al., (2009) qui avait montré que la nature des sols et les pratiques culturales étaient les facteurs les plus impactants pour ce critère. Malheureusement, il aurait fallu réaliser une année de mesures supplémentaires sur cette parcelle pour bien vérifier que le profil obtenu en 2018 se reproduise en 2019, et ainsi confirmer l'effet parcelle. Au cours de cette partie du travail, le pourcentage de galloylation a été légèrement modifié et a pu être relié avec les conditions climatiques de 2018 et particulièrement à l'absence de contrainte hydrique liée à la pluviométrie et à la nature du sol. **Ainsi, nous confirmons l'implication de l'effet parcelle sur la répartition des unités flavanols et celle de l'effet parcelle mixée avec celle de l'effet millésime pour le pourcentage de galloylation.**

Enfin, nos travaux ont, pour la seconde fois dans la littérature, mis en évidence par approche microscopique la localisation des tanins au sein des différents tissus des pépins. Toutefois, nos résultats sont en contradiction avec Cadot et al. qui estimait que dès le début de la synthèse, les tanins colonisaient toutes les enveloppes du pépin. En effet, dans ce travail, nous observons une installation progressive des tanins dans le pépin avec un début d'accumulation dans la zone du bec puis une progression de l'autofluorescence à l'ensemble du pourtour du pépin jusqu'à la véraison et ceci des

tissus extérieurs vers les tissus intérieurs. Les tissus contenant ces tanins sont ceux déjà décrits par Cadot et al., (2006), à savoir épiderme, testa et tegmen ; mais, en plus, nous avons potentiellement trouvé, de manière assez étonnante, la présence de tanins dans l'albumen. **Il semble donc, en accord avec les mesures des teneurs, que le pépin s'enrichisse progressivement en tanins avec une progression du « remplissage » des tissus des plus externes vers les plus internes, et du bec vers le corps du pépin.** Ces données sont nouvelles et jamais n'ont jamais été reportées dans la littérature. A ce stade du manuscrit, aucune hypothèse de biosynthèse, diffusion ou migration ne peut être émise. Ainsi dans le second chapitre, une approche complémentaire d'immunomarquage, mettant en évidence la présence des enzymes clés de la voie de biosynthèse des tanins au sein des différents tissus, nous permettra d'apporter des données complémentaires. Ces données nous permettront d'émettre des hypothèses métaboliques sur la construction de la composante tanique du pépin. De plus, ce premier travail de microscopie nous a permis de voir, comme Lacampagne (2010) l'avait déjà observé au niveau des pellicules, que les tanins de pépins pouvaient être localisés dans la paroi ou les zones proches, avec potentiellement des liaisons avec les composés pariétaux plus ou moins fortes, impactant possiblement leur extractibilité.

V. Conclusion générale

En résumé, dans ce chapitre, nous avons mis en évidence que le profil d'évolution des tanins de pépins était conservé entre cépages et entre millésimes pour les vignes cultivées à Bordeaux, mais que certains critères pouvaient être modulés par le cépage, le millésime *via* la contrainte hydrique et la nature de la parcelle. Ainsi, le millésime modulerait particulièrement la teneur finale en tanins condensés et le pourcentage de galloylation ; le cépage impacterait principalement le DPm et les teneurs en flavanols et la parcelle modifieraient fortement la proportion des différentes sous unités.

Néanmoins, cette caractérisation de la composante tanique doit toujours être reliée au mode d'expression de la teneur en composés phénoliques utilisé, car nous avons montré que le pépin en tant qu'organe de conservation ne présentait pas de spécificité au niveau du profil et des teneurs finales en tanins à la récolte. Or, il est couramment admis que la composante tanique d'un lot de vendange varie énormément en fonction de l'année, du cépage ou du terroir. Cette observation serait préférentiellement due au nombre de pépins et à leur poids qui varient entre cépages et entre année, entraînant ainsi une modulation de la composante tanique de la vendange.

D'un point de vue pratique, nos travaux ont mis en évidence que la composante tanique des pépins était fixée bien avant la date de récolte et que les tanins des pépins étaient en partie liés aux parois cellulaires. Ces deux aspects nous conduisent donc à mener une réflexion autour de la

définition de la maturité phénolique des pépins ainsi que sur l'extractibilité potentielle de leurs tanins. Cette extractibilité jouera un rôle clé sur les teneurs et la nature des composés extraits au moment des analyses chimiques (sur extraits de pépins ou sur vin).

L'ensemble de ces premières données pose maintenant la question des voies de biosynthèse et des modes de régulation de ces mécanismes au niveau du pépin et en fonction du cépage, du millésime ou de la parcelle.

Le chapitre suivant se propose donc, par une étude de l'expression des gènes *VvLAR1, VvLAR2 et VvANR* complétée par une approche d'immunomarquage, d'apporter quelques éléments pour mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse des tanins de pépins en lien avec leurs teneurs et leur localisation dans cet organe.

CHAPITRE IV : CARACTÉRISATION ET LOCALISATION DE LA VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES TANINS DE PÉPINS DE RAISIN

La biosynthèse des composés phénoliques de la baie de raisin est assurée par la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Stafford, 1990). La biosynthèse des flavanols est assurée par deux enzymes clés :

- La leucoanthocyanidine réductase (LAR), qui permet la transformation des leucoanthocyanidines en flavanols (Bogs et al., 2005; Stafford, 1990; Stafford et al., 1992).
- L'anthocyanidine réductase (ANR), qui catalyse la conversion des anthocyanidines en flavanols (Bogs et al., 2005; Stafford, 1990; Stafford et al., 1992).

Au sein du laboratoire, l'activité et l'expression de ces deux enzymes clés ont été suivies de la fleur à la baie mûre (Gagné, 2007), ainsi que dans la pellicule de raisin (Lacampagne, 2010). Même si ces résultats ont permis d'apporter de nouvelles informations sur les mécanismes de biosynthèse des flavanols, aucun travail n'a porté sur ces mécanismes au sein du pépin de raisin. L'étude consacrée à la pellicule (Lacampagne, 2010) a également abordé la localisation subcellulaire des tanins et a mis en évidence la synthèse *in situ* des tanins pariétaux et la synthèse des tanins intracellulaires au niveau du complexe réticulum endoplasmique-noyau et des plastes. Toutefois, aucun travail n'a été mené sur le pépin de raisin.

Le premier objectif de ce chapitre est donc de caractériser l'évolution de l'expression des gènes codant les deux enzymes clés de la voie de biosynthèse des tanins (LAR et ANR), en lien avec l'évolution et la structure des flavanols libres et des tanins condensés de pépins au cours de leur développement. Le second objectif de cette partie concerne la localisation cellulaire des enzymes clés LAR1, LAR2 et ANR, en lien avec la localisation tissulaire et cellulaire des tanins abordée au chapitre précédent.

Ainsi, la première partie de ce chapitre sera dédiée à l'étude de l'expression des gènes *VvLAR1*, *VvLAR2* et *VvANR* dans les pépins de raisin au cours de leur développement. Ce travail a été réalisé sur les pépins dont les teneurs en flavanols libres et tanins condensés ont été présentées dans le chapitre III. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à la localisation des enzymes LAR1, LAR2 et ANR dans les cellules de pépins de raisin issus des baies de Cabernet Sauvignon du millésime 2017. Cette approche, réalisée par immunomarquage en microscopie électronique à transmission permettra, pour la première fois, de mettre en évidence les lieux cellulaires de biosynthèse des flavanols dans les pépins de raisins et d'émettre les premières hypothèses quant aux mécanismes de transport cellulaire des tanins.

I. Étude des enzymes clés de la voie de biosynthèse des flavanols

Les expressions des gènes *VvLAR1*, *VvLAR2* et *VvANR* ont été étudiées dans les pépins dont les teneurs et les structures en tanins ont été présentées dans le Chapitre III. Cette étude moléculaire a porté dans un premier temps uniquement sur les pépins de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot de la parcelle de collection pour les millésimes 2015, 2016 et 2017 à cinq stades de développement. Dans un second temps, cette étude a porté sur la seconde parcelle de Merlot, en 2018, à vingt dates de prélèvement différentes. L'expression relative des gènes présentée au cours de cette partie est calculée à partir de la variation d'expression entre le premier stade de prélèvement et les suivants. Toutes les expressions relatives correspondent donc à la variation d'expression entre le stade fermeture de grappe et les suivants.

Au cours de cette partie, nous discuterons de l'établissement du profil type d'expression de l'évolution de l'expression relative des gènes *VvLAR1*, *VvLAR2* et *VvANR* dans le pépin de raisin au cours de son développement. Nous détaillerons également les éventuels effets millésime et cépage sur cette expression relative. Enfin, nous regarderons le lien existant entre le profil d'expression des gènes *VvLAR1 et VvLAR2* et l'évolution de la teneur en catéchine, et le profil d'expression du gène *VvANR* et l'évolution de la teneur en épicatéchine des pépins de raisin tout au long de son développement.

I.1. La leucoanthocyanidine réductase (LAR)

La leucoanthocyanidine réductase (LAR) catalyse la transformation des leucoanthocyanidines en flavanols. Au cours de ce travail, les deux isoformes *VvLAR1* et *VvLAR2* du gène codant la LAR chez *Vitis vinifera* ont été étudiées. Le substrat préférentiel de la LAR étant la leucocyanidine, la principale réaction catalysée par l'enzyme aboutit à la formation de la catéchine.

I.2. Étude de l'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*

Les profils d'expression relative des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* des pépins issus de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot des millésimes 2015, 2016 et 2017 sont représentés **Figure 59**.

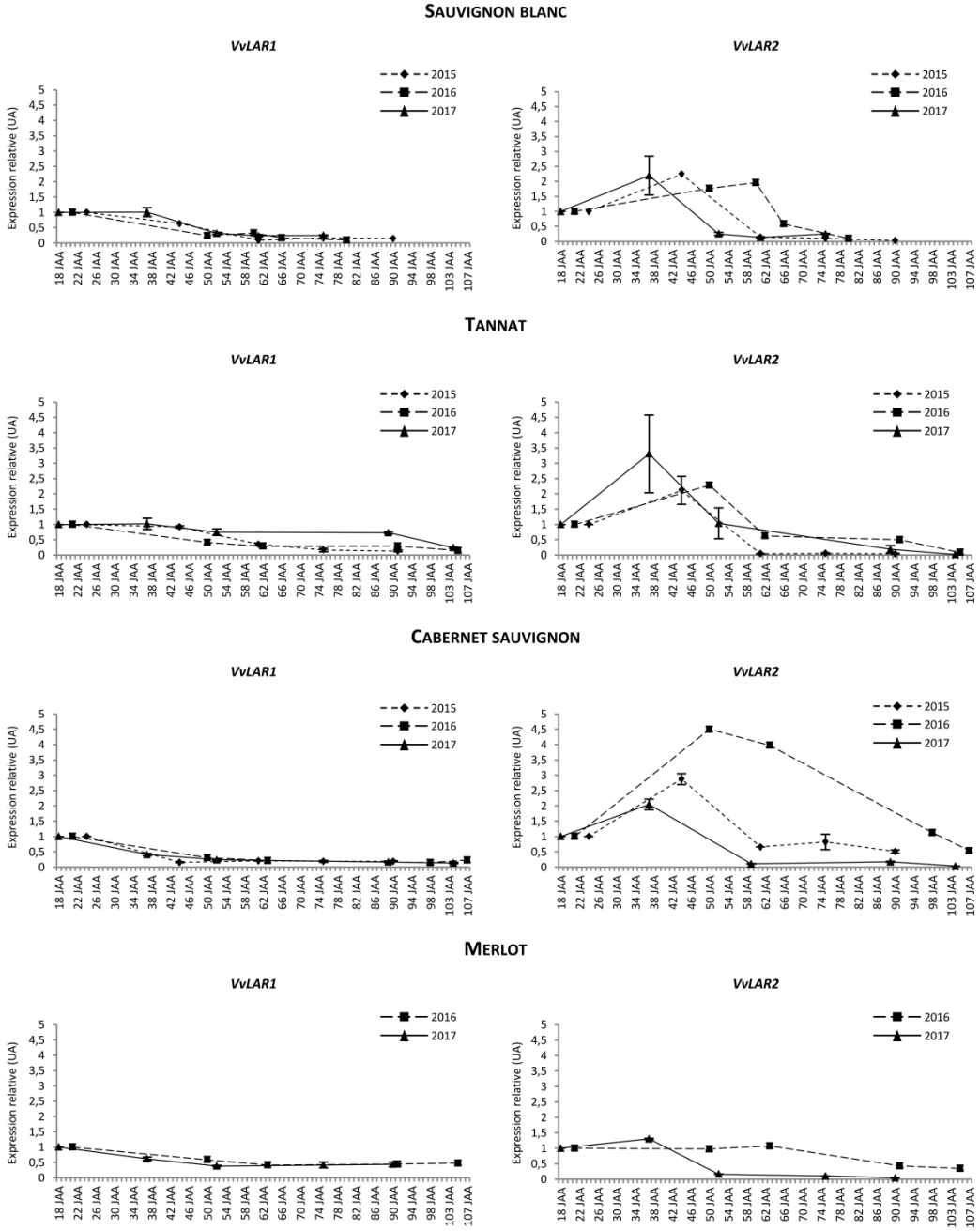


Figure 59 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimées en unité arbitraire (UA), dans les pépins issus des baies de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot des millésimes 2015, 2016 et 2017.

Nos résultats permettent d'établir des profils types d'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*. Ainsi, pour tous les cépages et tous les millésimes confondus, l'expression relative du gène *VvLAR1* dans le pépin de raisin diminue tout au long du développement tandis que celle du gène *VvLAR2* augmente des premiers stades de développement jusqu'au début de la véraison (37 JAA pour le millésime 2017, 50 JAA pour le millésime 2016 et 44 JAA pour le millésime 2015) puis diminue jusqu'à la fin du cycle. Ces données sont en accord avec la seule publication à ce jour décrivant le métabolisme phénolique du pépin de raisin (Bogs et al., 2005).

Si l'on compare le niveau d'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* entre eux, on remarque que l'expression de *VvLAR1* apparaît toujours plus faible que celle de *VvLAR2*. Ces résultats confirment ceux obtenus par Bogs et al. (2005) et Génebra et al. (2014) qui ont chacun observé un niveau d'expression *VvLAR2* pouvant être jusqu'à dix fois plus important que celui de *VvLAR1* dans le pépin. En revanche, ces résultats sont contraires à ceux obtenus par Lacampagne (2010) sur pellicule et Gagné (2009) sur baie entière qui avaient montré un niveau d'expression de *VvLAR1* plus important que celui de *VvLAR2*. De ce fait, il existerait potentiellement des voies de régulation de la biosynthèse des flavanols différentes entre pépin et péricarpe.

Nos résultats permettent de définir un profil type de l'évolution de l'expression relative des gènes VvLAR1 et VvLAR2 dans le pépin de raisin pour les quatre cépages et les trois millésimes étudiés : une diminution constante de l'expression relative de VvLAR1 au cours du développement du pépin ; une augmentation de l'expression de VvLAR2 des stades verts à véraison, suivie d'une diminution de la véraison jusqu'à la fin du cycle.

En ce qui concerne l'effet millésime, il semble difficile de dégager une tendance quant à l'expression relative des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*. En effet, à l'exception du Cabernet Sauvignon en 2016 où l'expression du gène *VvLAR2* est significativement plus élevée qu'en 2015 et 2017, les pépins issus de chacun des millésimes présentent des niveaux d'expressions relatives de *VvLAR2* semblables. Ainsi, en ***dépit de régimes hydriques différents, nos résultats ne permettent pas d'établir un effet millésime sur l'expression des gènes VvLAR1 et VvLAR2, confirmant donc la conservation des profils types d'expression de ces deux gènes clés.*** Ces résultats peuvent sembler contradictoires à ceux de Génébra *et al*., qui sur les pépins de Tempranillo, avaient démontré qu'un régime hydrique sévère entraînait une surexpression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* (Genebra et al., 2014). Nous pouvons donc supposer que les contraintes hydriques observées au cours de notre étude n'ont pas permis la mise en place d'un stress hydrique assez important pour entraîner une surexpression de *VvLAR1* et *VvLAR2*.

En ce qui concerne l'effet cépage, aucun effet ne peut être dégagé pour *VvLAR1* dont les niveaux d'expression sont comparables entre cépages et entre millésimes. Pour *VvLAR*2, le niveau d'expression est toujours plus faible pour le Merlot et plus important pour le Cabernet Sauvignon, alors que les niveaux pour le Tannat et le Sauvignon blanc sont intermédiaires et similaires. Ainsi pour la première fois, en raison d'une comparaison dans des conditions de cultures similaires, il est possible de ***mettre en évidence un potentiel effet variétal sur l'expression relative du gène VvLAR2.***

Afin de compléter les hypothèses précédemment émises, les profils d'expression relative de *VvLAR1* et *VvLAR2* au cours du développement, ont également été réalisés sur les pépins de Merlot du millésime 2018 cultivés sur une parcelle commerciale (**Figure 60**). Comme en 2015, 2016 et 2017, le niveau d'expression du gène *VvLAR1* diminue tout au long du développement ; et le profil

d'expression de *VvLAR2* est comparable à celui obtenu précédemment avec un maximum d'expression à la véraison (entre 42 JAA et 63 JAA), suivi d'une diminution jusqu'à la fin du cycle. De la même manière que pour les essais précédents, le niveau d'expression de *VvLAR2* est toujours supérieur à celui de *VvLAR1*. Enfin, si l'on compare les résultats obtenus pour les pépins de Merlot 2017 issus de la parcelle de collection et les pépins de Merlot 2018 issus de la parcelle commerciale, il n'y a pas de différences de niveau d'expression notable, suggérant aucun effet sol.

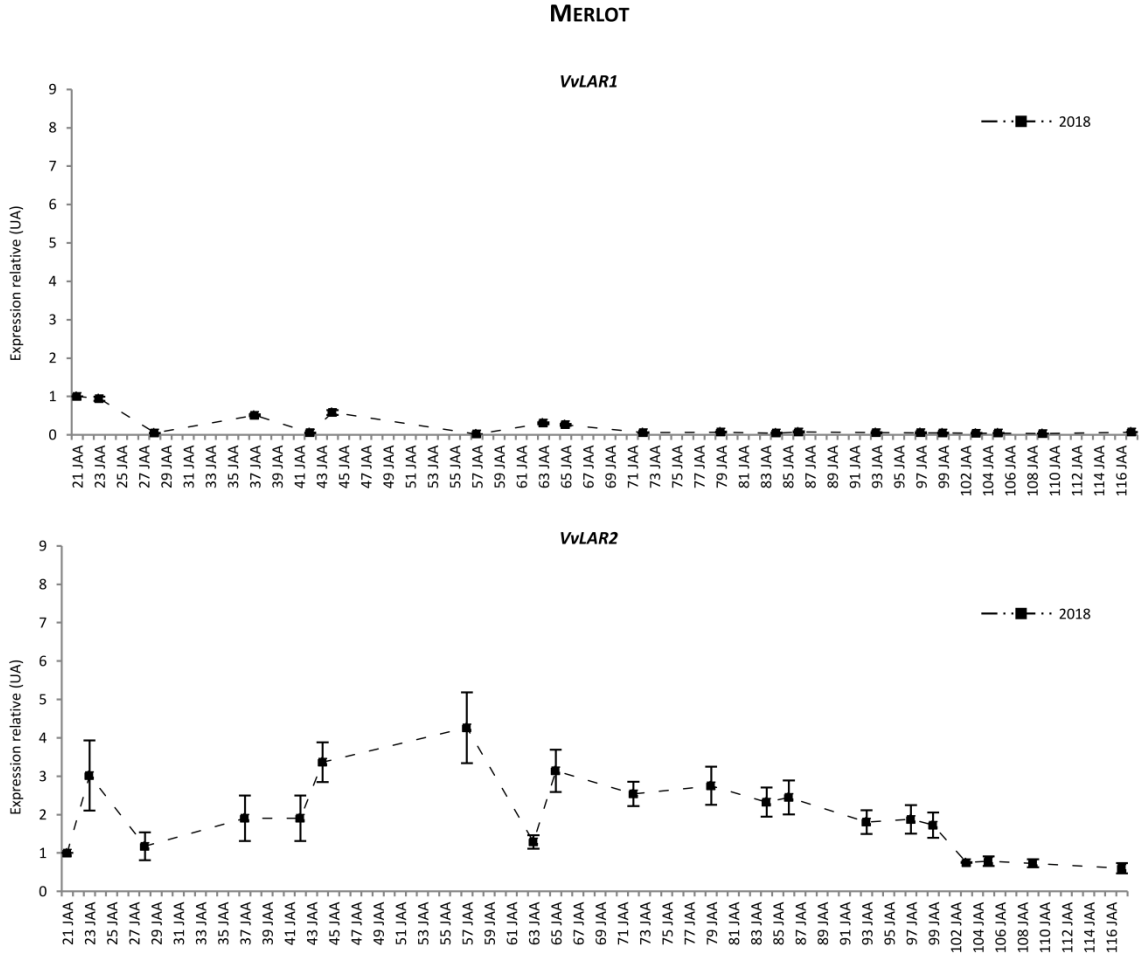


Figure 60 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimées en unité arbitraire (UA), dans les pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018.

Ces résultats permettent donc de mettre en évidence un profil d'expression conservé des gènes VvLAR1 et VvLAR2 entre cépages, millésimes et parcelles. Dans tous les cas, l'expression du gène VvLAR2 est plus forte que celle de VvLAR1, comme cela a déjà été observé par d'autres auteurs dans le pépin. Néanmoins, ces résultats apparaissent contraires à ceux obtenus sur la pellicule, laissant supposer l'existence d'une régulation du métabolisme phénolique spécifique au pépin et à la pellicule.

I.2.a. Liaison entre l'expression des gènes VvLAR1 et VvLAR2 et les teneurs en catéchine des pépins de raisin

La principale réaction catalysée par la LAR est la transformation de la leucoanthocyanidine en (+)-catéchine. Afin de mieux comprendre les modalités de la régulation de la voie de biosynthèse des tanins, la comparaison de l'évolution des teneurs en catéchine (unités libres, unités terminales et unités d'extension) et des variations de niveau d'expression de *VvLAR1* et *VvLAR2* dans le pépin de raisin est nécessaire. Ainsi, les profils de teneurs en catéchine et de niveau d'expression relative de *VvLAR1* et *VvLAR2* des pépins sont superposés et présentés **Figure 61**, **Figure 62** et **Figure 63**.

Quel que soit le cépage et le millésime étudié, nos résultats mettent en évidence une parfaite concordance d'évolution des profils des teneurs en catéchine et de l'expression du gène *VvLAR2*, ce qui n'est pas toujours le cas pour *VvLAR1* (Sauvignon blanc 2016, Tannat 2016, Cabernet Sauvignon tous millésimes et Merlot 2017, 2018). De plus, étant donné que le niveau d'expression de *VvLAR2* est de manière générale plus important que celui de *VvLAR1*, il est possible de supposer que l'isoforme LAR2 soit privilégiée pour la synthèse de catéchine dans le pépin. Ces résultats confirment ceux de Bogs et al., (2005) et de Génébra et al., (2014) qui avaient montré que *VvLAR2* était potentiellement l'isoforme spécifique dans les pépins. Génébra et al., a également démontré la forte liaison entre les teneurs en catéchine et l'expression de *VvLAR2* avec des coefficients de corrélation R entre ces deux variables allant de 0,662 à 0,834 selon les années étudiées, appuyant nos résultats (Genebra et al., 2014).

Ainsi, nos résultats permettent donc de valider l'importance du gène VvLAR2 dans les mécanismes de régulation de la synthèse de catéchine lors du développement du pépin de raisin à partir du stade fermeture de grappe.

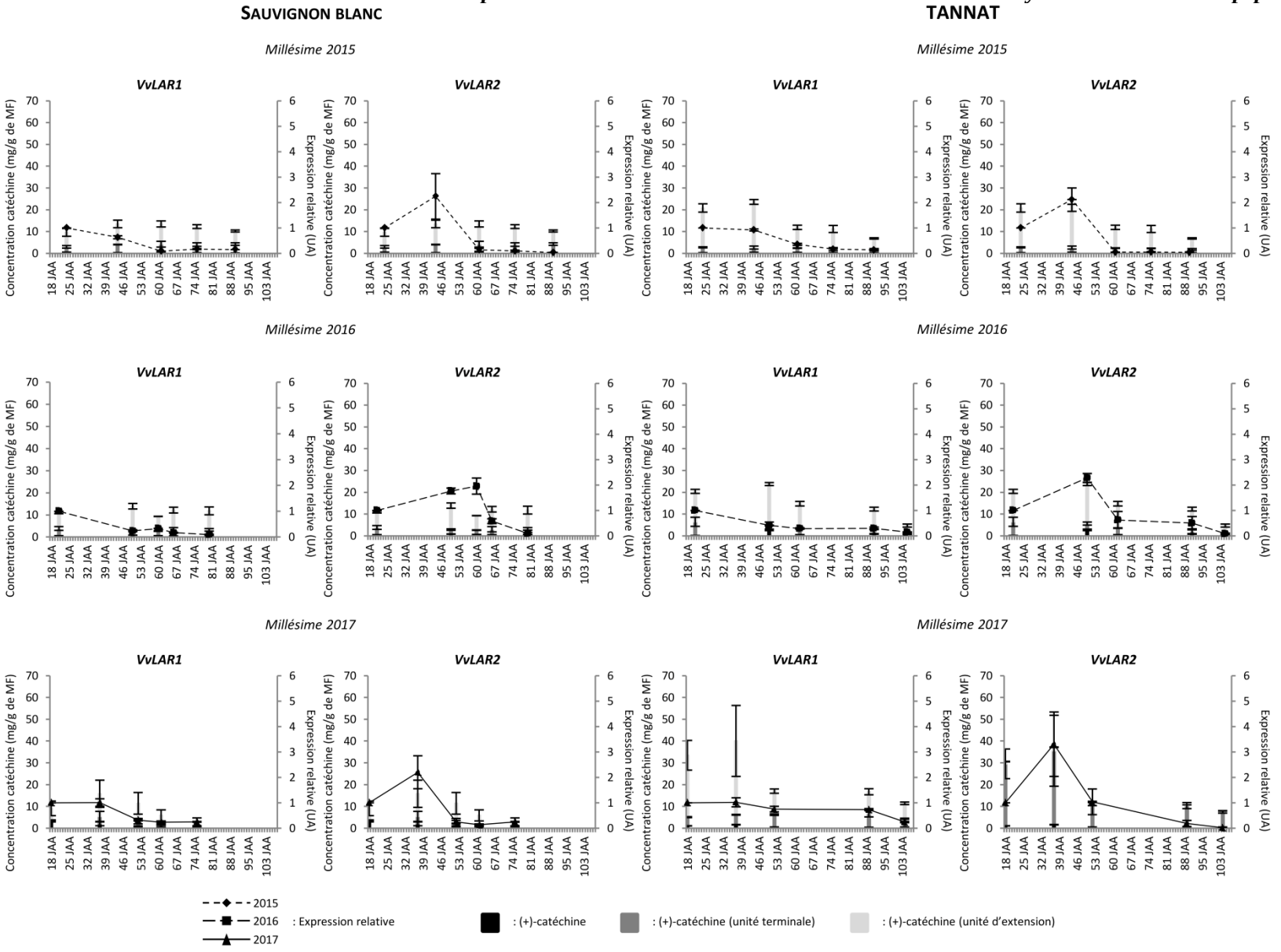


Figure 61 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimée en unité arbitraire (UA) et de la teneur en catéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Sauvignon blanc et Tannat au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017.

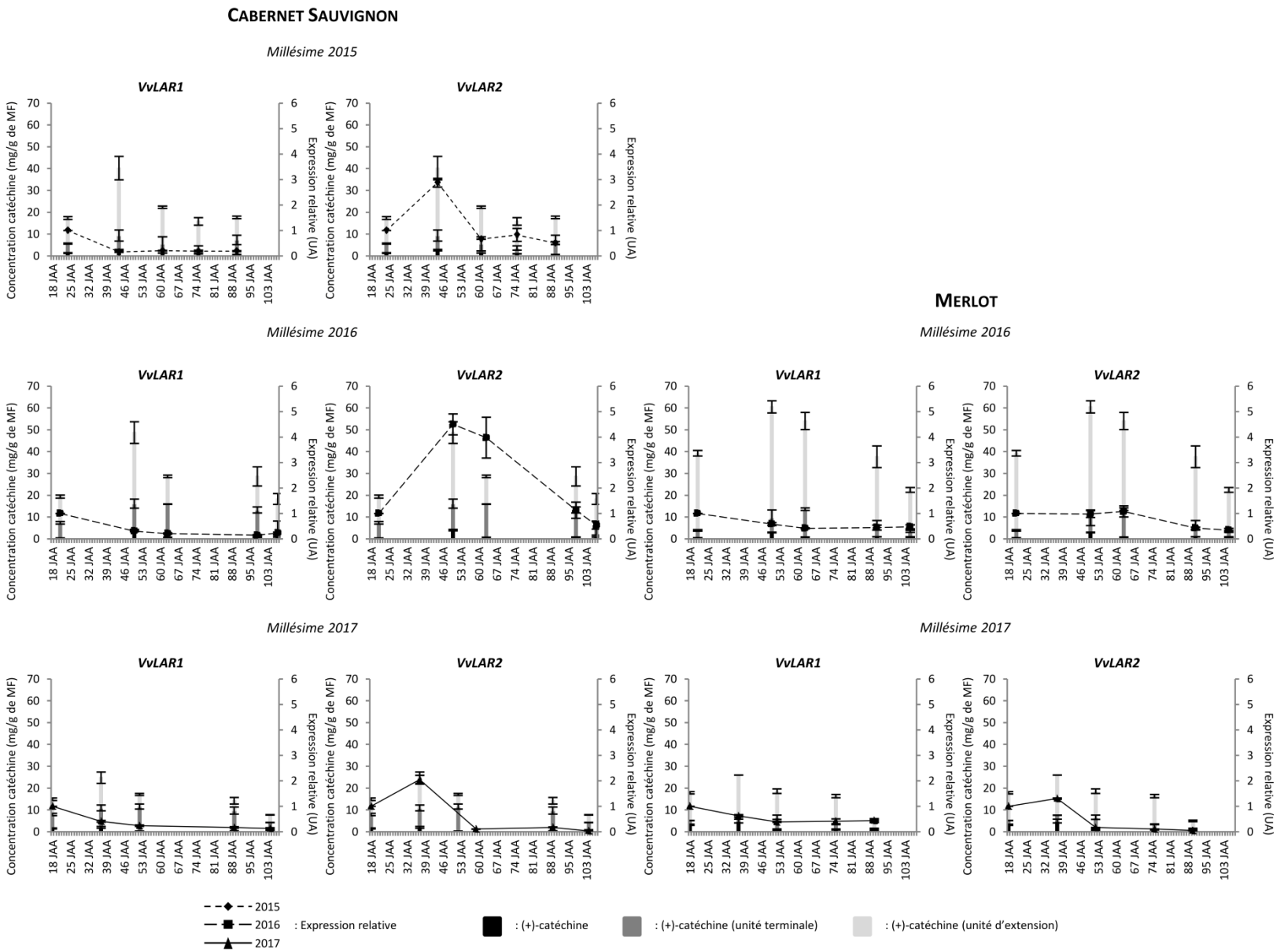


Figure 62 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimée en unité arbitraire (UA) et de la teneur en catéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Cabernet Sauvignon et Merlot au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017.

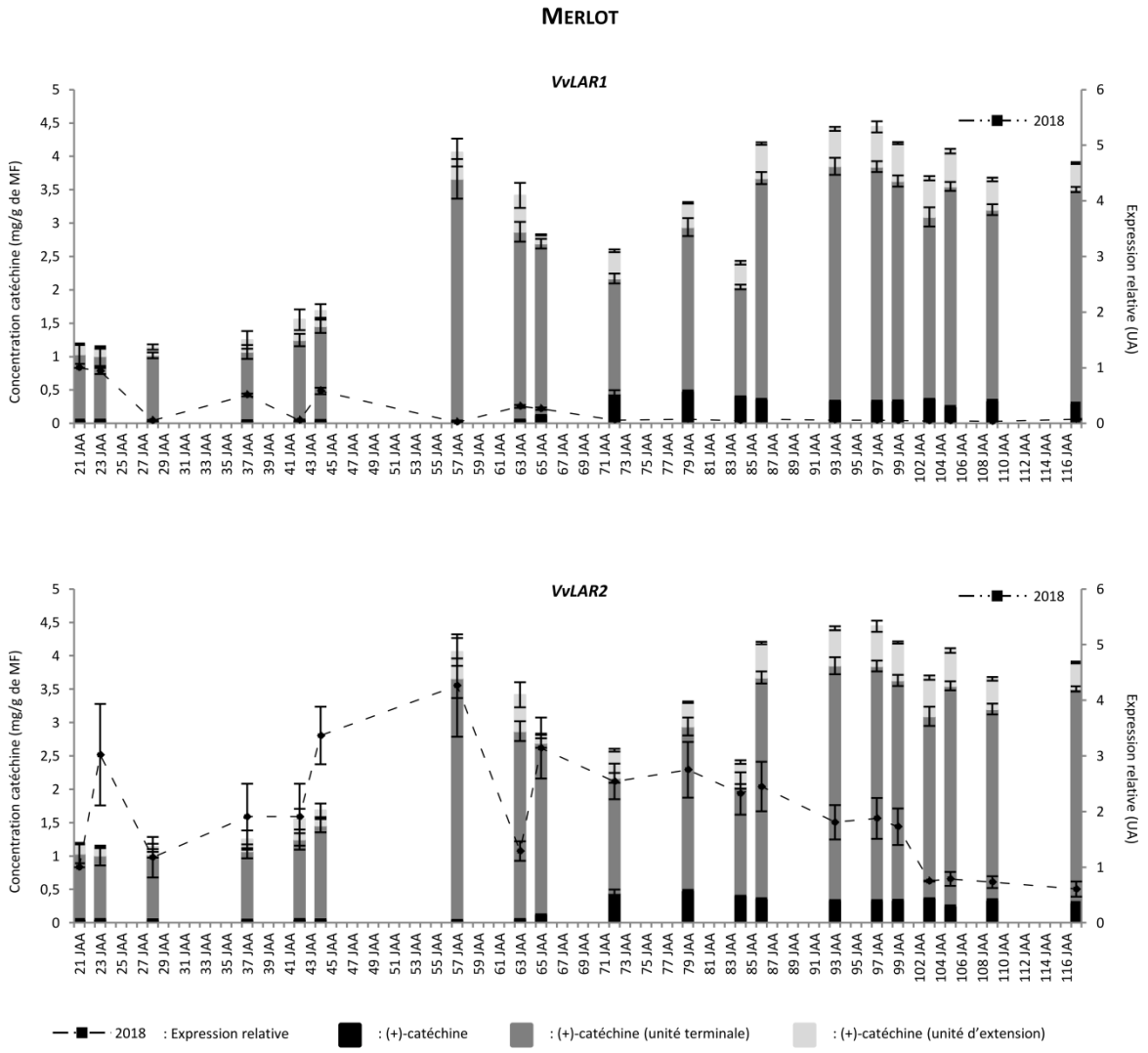


Figure 63 : Évolution des expressions relatives des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, exprimée en unité arbitraire (UA) et de la teneur en catéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018.

Néanmoins, pour valider de manière définitive cette hypothèse, il aurait fallu étudier l'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* dans les pépins de raisin juste après la floraison, dès lors qu'il est possible de séparer le pépin du péricarpe. En effet, au vu des teneurs importantes de catéchine aux stades verts des pépins, nous ne sommes pas certains que cet isoforme soit toujours la plus importante. Au vu des travaux de Gagné (2007), il est probable que *VvLAR1* soit majoritairement exprimé pendant les stades très précoces du développement du pépin. Pour cet auteur, les deux isoformes sont exprimées à deux périodes différentes : *VvLAR1* au début du développement et *VvLAR2* à partir de la véraison. De plus, pour valider cette hypothèse, il faudrait également vérifier qu'il n'y ait pas un phénomène d'autorégulation entre gènes ou de régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle qui pourrait moduler le niveau d'activité enzymatique de la LAR et au final la teneur en catéchine.

Pour cela, la mesure des activités enzymatiques LAR1 et LAR2 aurait pu être intéressante et apporter des éléments supplémentaires pour mieux comprendre pourquoi les niveaux d'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* sont plutôt conservés entre millésimes alors que les teneurs en catéchine varient en fonction des millésimes, et ce potentiellement en lien avec la contrainte hydrique. Selon Gagné et al. (2007), un traitement avec de l'ABA provoquerait une augmentation de 900% de l'activité LAR. Ainsi, dans le cas des millésimes 2015 et 2016 où la contrainte hydrique a été la plus marquée et les teneurs en ABA possiblement augmentées, les plus fortes teneurs en catéchine observées dans les pépins de ces millésimes ne seraient pas dues à une surexpression des gènes, mais à une stimulation de l'activité enzymatique.

Ainsi, la synthèse de la catéchine dans le pépin après le stade fermeture de grappe serait préférentiellement liée au gène VvLAR2 dont le profil d'expression est conservé entre cépages, millésimes et parcelles ; gène qui ne régulerait pas entièrement les teneurs finales en raison d'une régulation de l'activité de l'enzyme LAR par les conditions environnementales.

I.3. L'anthocyanidine réductase (ANR)

L'anthocyanidine réductase (ANR) catalyse la transformation des anthocyanidines en flavanols. Le substrat préférentiel de l'ANR étant la cyanidine, la principale réaction catalysée par l'enzyme aboutit à la formation de l'(-)-épicatéchine.

I.3.a. Étude de l'expression du gène VvANR

Les profils d'expression relative du gène *VvANR* des pépins issus de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot des millésimes 2015, 2016 et 2017 sont présentés **Figure 64**.

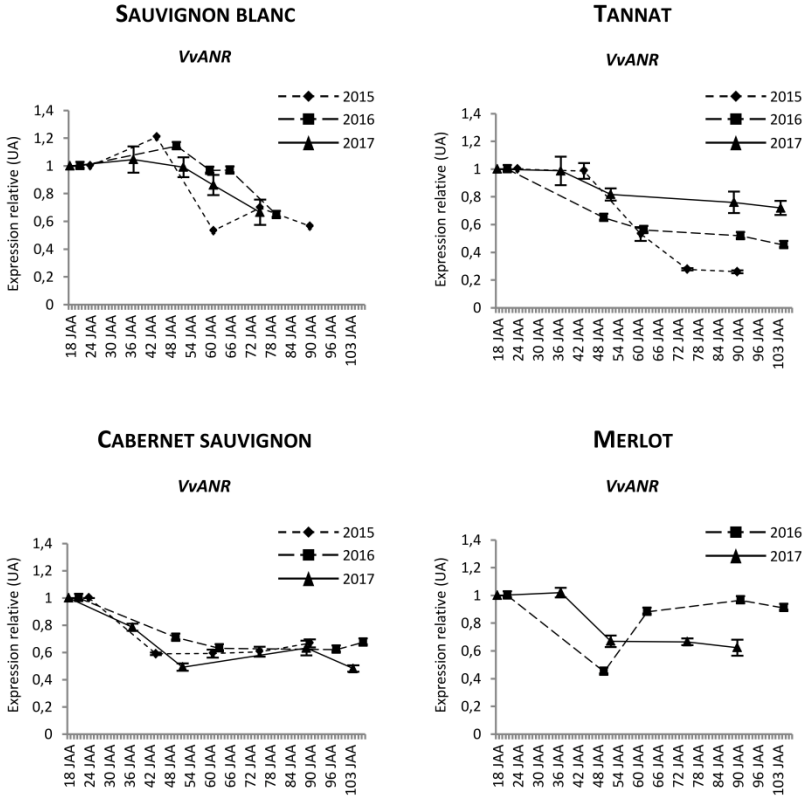


Figure 64 : Évolution de l'expression relative du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA) des pépins issus des baies de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017.

Contrairement aux profils de *VvLAR1 et VvLAR2*, le profil d'expression du gène *VvANR* ne semble pas être conservé entre les cépages et notamment entre cépages blanc et rouge. Pour les cépages rouges, le profil type d'expression montre une diminution de l'expression jusqu'à véraison suivie d'une phase de plateau jusqu'à la fin du cycle, alors que pour le Sauvignon blanc, le niveau d'expression augmente jusqu'à véraison puis chute sans stabilisation jusqu'à la fin du cycle. Ces résultats ne concordent pas avec ceux de Bogs et al., qui avaient décrit, pour les pépins de Shiraz, une faible diminution de l'expression du gène des stades verts jusqu'à deux semaines avant véraison, suivi d'une légère augmentation à véraison, puis d'une diminution drastique pour atteindre une expression nulle deux semaines après la véraison (Bogs et al., 2005). Cette forme de profil a également été notée dans les pellicules par Gagné et al. en 2009. En revanche, nos résultats sur les pépins de Sauvignon blanc sont similaires à ceux de Génébra et al. (2014) qui avaient noté pour des pépins de Tempranillo une augmentation du niveau d'expression de *VvANR* jusqu'à véraison suivie d'une chute jusqu'à la récolte.

Nos résultats mettent en évidence un profil d'expression type de l'expression du gène VvANR pour les trois cépages rouges étudiés au cours des trois millésimes : une diminution de l'expression des stades verts jusqu'à la véraison suivie d'une phase de plateau jusqu'à la fin du cycle de développement de la baie.

En ce qui concerne l'effet millésime, tout comme l'expression de *VvLAR1* et *VvLAR2*, il est difficile de dégager une tendance d'expression en fonction du millésime. En effet, en fin de cycle, pour le Merlot il semble que l'expression soit plus forte en 2016, alors que pour le Tannat, c'est en 2017. Pour le Cabernet Sauvignon et le Sauvignon blanc, l'expression au cours des trois millésimes est similaire. Ces résultats corrèlent avec ceux de Génebra et al., qui montrent que la surexpression de *VvANR*, n'est observée qu'en cas de stress hydrique important. Dans notre cas, même si les millésimes présentent des contraintes hydriques différentes, il n'y a jamais eu de stress hydrique suffisant pour augmenter de manière significative le niveau d'expression de *VvANR*. De plus, une simulation de stress hydrique par application d'ABA sur les baies ne provoque pas une augmentation, mais un décalage dans le temps, de l'expression de *VvANR* (Lacampagne, 2010).

Ainsi, tout comme les gènes VvLAR1 et VvLAR2, malgré des millésimes présentant des régimes hydriques distinguables, aucun effet millésime n'est observé sur l'expression du gène VvANR, probablement en lien avec l'absence de stress hydrique.

En ce qui concerne l'effet cépage, il n'est pas possible de distinguer des différences significatives de niveau d'expression pour ce gène ***et aucun effet variétal sur l'expression du gène VvANR ne peut être mis en évidence dans nos conditions d'expérimentation.***

Afin de compléter le profil d'expression relative du gène *VvANR* précédemment observé, l'analyse de l'expression du gène a également été réalisée sur les pépins de Merlot en 2018 à partir de la parcelle commerciale (**Figure 65**).

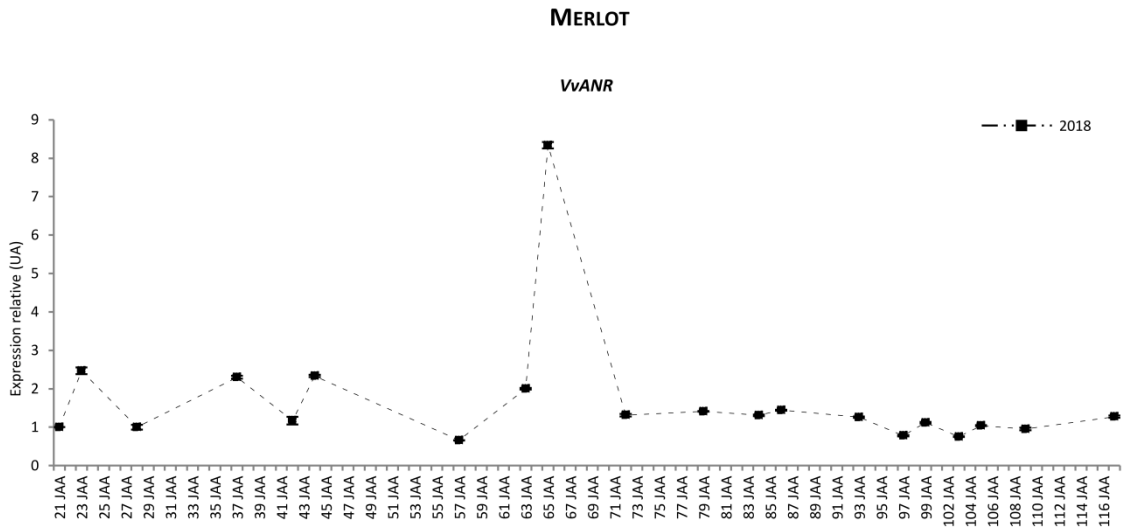


Figure 65 : Évolution de l'expression relative du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA), des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018.

Contrairement à *VvLAR1* et *VvLAR2*, le profil d'expression du gène *VvANR* caractérisé ici est totalement différent de ceux observés en 2016 et 2017 pour le Merlot de la parcelle de collection. Tout d'abord, on observe un niveau d'expression 5 à 40 fois plus important selon les stades. Ensuite, le niveau d'expression semble quasi stable tout le long du cycle sauf vers la fin de la véraison (entre 63 et 67 JAA) où un pic brutal d'expression apparaît. Cette forme de profil n'ayant jamais été observé dans nos essais précédents ni décrite dans la bibliographie, il nous est difficile sans avoir fait de répétition avec un second millésime de savoir s'il y a un effet parcelle et d'émettre une quelconque hypothèse sur cette forme. Notons néanmoins que ce type de profil a été observé par Gagné et al. (2009) sur la pellicule de Cabernet Sauvignon.

Ces résultats ne permettent donc pas de mettre en évidence un profil d'expression conservé du gène VvANR entre cépages et millésimes. Des variations de niveau et de forme de profil apparaissent et doivent être mises en relation avec les teneurs en epicatéchine pour mieux expliquer le rôle potentiel de ce gène dans la biosynthèse des tanins de pépins.

I.3.b. Liaison entre l'expression du gène VvANR et la teneur en épicatéchine des pépins de raisin

La principale réaction catalysée par l'ANR est la transformation de la cyanidine en épicatéchine. Afin de mieux comprendre les modalités de la régulation de la voie de biosynthèse des tanins, la comparaison de l'évolution des teneurs en épicatéchine (unités libres, unités terminales et unités d'extension) détaillée lors du chapitre précédent et des variations de niveau d'expression de *VvANR* dans le pépin de raisin est nécessaire. Ainsi, les profils de teneurs en épicatéchine et de niveau d'expression relative du gène codant l'ANR et le profil de *VvANR* des pépins sont superposés et présentés **Figure 66** et **Figure 67**.

Globalement, nos résultats de 2015, 2016 et 2017 montrent qu'il existe une relation entre le profil des teneurs en épicatéchine et le profil d'expression du gène *VvANR*, malgré les différences observées entre cépages. Pour l'essai 2018, si l'on superpose expression du gène et teneurs en épicatéchine, on observe globalement des profils similaires avec une augmentation des teneurs et de l'expression autour de la véraison. Néanmoins, si l'on examine de manière plus attentive les dates, on peut noter que le pic d'expression du gène *VvANR* est légèrement postérieur au pic d'accumulation de l'épicatéchine (57 JAA pour le maximum de teneur et 65 JAA pour le maximum d'expression) ; observations que l'on ne pouvait pas faire pour les autres millésimes en raison des prélèvements trop espacés dans le temps. Pendant les deux périodes pré- et post-véraison, où les teneurs sont relativement stables, les variations de niveau d'expression sont, elles aussi très faibles. Ces premières observations, qui auraient mérité d'être réitérées en 2019, laissent supposer qu'il puisse y avoir d'autres facteurs de régulation tels que les facteurs de transcription *VvMYB5a* et *VvMYBPA1* (Gagné et al., 2009).

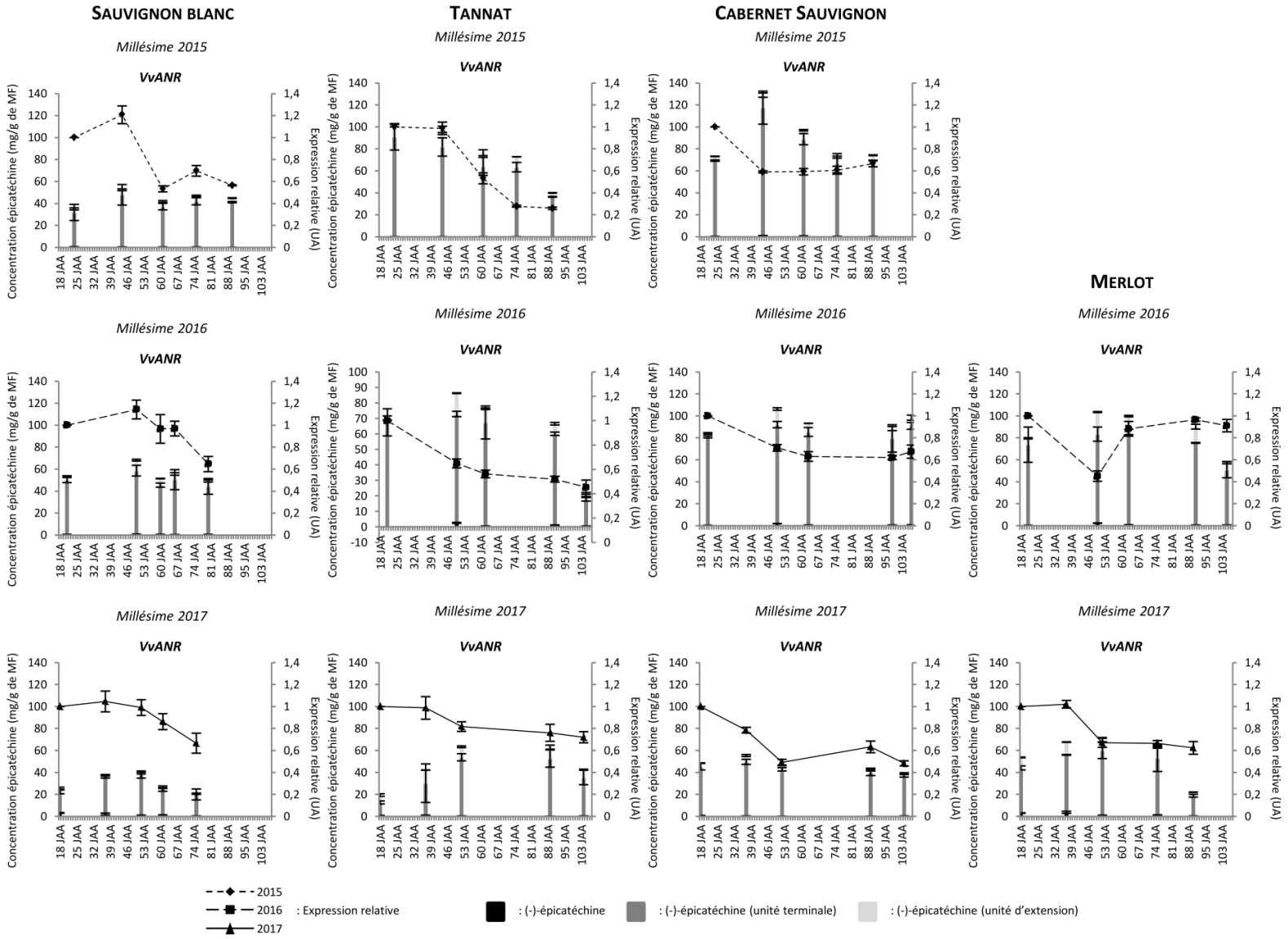


Figure 66 : Évolution de l'expression du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA), et de la teneur en épicatéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Sauvignon blanc, Tannat, Cabernet Sauvignon et Merlot au cours des millésimes 2015, 2016 et 2017.

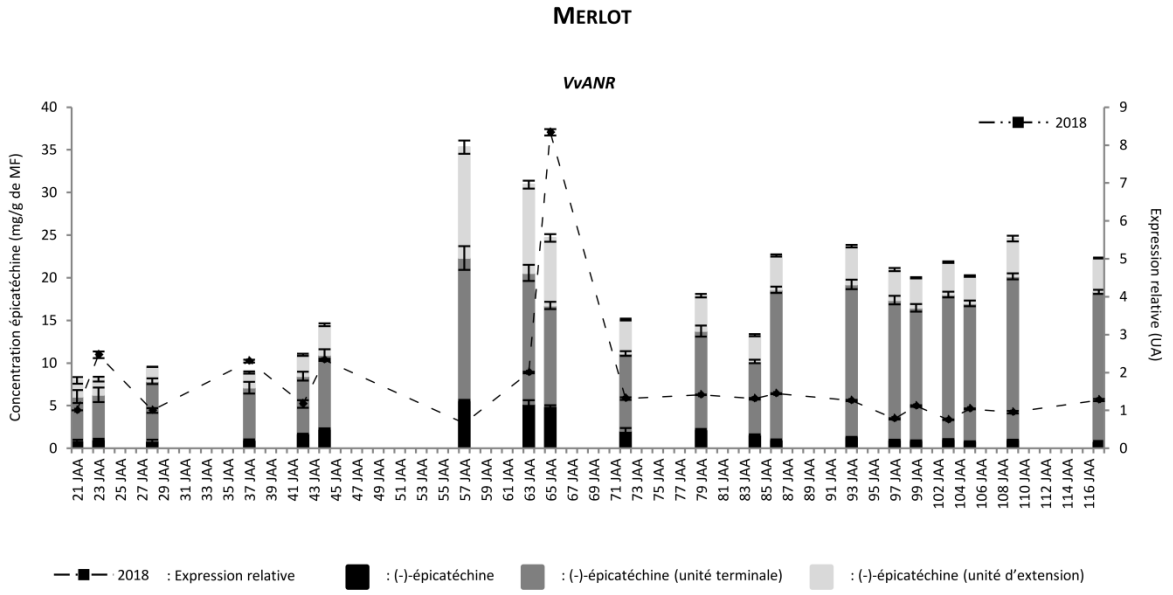


Figure 67 : Évolution de l'expression du gène *VvANR*, exprimée en unité arbitraire (UA), et de la teneur en épicatéchine, exprimée en mg/g de MF, des pépins issus des baies de Merlot du millésime 2018.

Ainsi la synthèse de l'épicatéchine dans le pépin après le stade fermeture de grappe est globalement liée à l'expression de VvANR dont le profil d'expression est conservé entre cépages et millésimes ; mais, comme pour la synthèse de la catéchine, il semblerait qu'il existe d'autres acteurs du métabolisme intervenant sur la régulation de la teneur en épicatéchine tels que les facteurs de transcription.

I.4. Conclusion

Cette étude a permis d'apporter des données nouvelles concernant les voies de biosynthèse des tanins dans les pépins en :

- **Caractérisant les profils d'expression des gènes responsables de la synthèse de la catéchine (*VvLAR1* et *VvLAR2*) et de l'épicatéchine *(VvANR) ;***
- **Montrant les relations possibles entre expression des gènes et teneurs finales en tanins.**

Le métabolisme de la catéchine est un métabolisme relativement bien conservé avec un profil d'expression de *VvLAR1 et VvLAR2* comparables entre les cépages, les millésimes et les parcelles. Dans le pépin à partir du stade fermeture de grappe, contrairement au péricarpe, la synthèse de la catéchine est préférentiellement due à la prédominance du transcrit *VvLAR2* alors qu'avant ce stade *VvLAR1* pourrait être le transcrit le plus important. En revanche, si le profil des teneurs est bien lié au profil d'expression du transcrit, les teneurs finales ne sont pas systématiquement corrélées, ce qui laisse supposer divers mécanismes de régulation soit au

niveau de l'activité enzymatique LAR , soit au niveau du transport des tanins, soit au niveau des mécanismes de polymérisation.

Le métabolisme de l'épicatéchine est moins conservé que celui de la catéchine et il apparaît difficile d'établir un profil d'expression type du gène *VvANR* commun à tous les cépages et tous les millésimes, sous-entendant l'existence d'un potentiel effet variétal et/ou millésime sur l'expression du gène *VvANR*.

II. Localisation cellulaire des enzymes impliquées dans la biosynthèse des flavanols du pépin de raisin

La caractérisation de l'expression des gènes clés de la voie de biosynthèse des flavanols *VvLAR1, VvLAR2 et VvANR* de pépins a permis de mettre en évidence leurs profils d'expression distincts au cours du développement. Par ailleurs, la localisation tissulaire des tanins de pépins a permis de montrer l'existence d'un enrichissement progressif du pépin en tanins avec une progression du remplissage allant du bec vers le corps du pépin, et des tissus les plus externes vers les plus internes. Néanmoins, ces premières approches de microscopie ne nous ont pas permis de déterminer si la progression des tanins dans le pépin était due à (i) des mécanismes de transport à l'intérieur de la cellule et/ou intertissulaires, (ii) une évolution des lieux de synthèse au cours du développement du pépin, (iii) une évolution des mécanismes de polymérisation ou (iv) un mélange de ces diverses hypothèses. Par conséquent, la connaissance des lieux de synthèse des flavanols du pépin à travers la localisation des enzymes LAR et ANR apparaît primordiale afin de compléter le schéma de biosynthèse des tanins de pépins de raisin.

Ainsi, après avoir réalisé des coupes ultra-fines de pépins de raisin, un immunomarquage couplé à l'or dirigé vers les enzymes LAR et ANR a été entrepris. Ces coupes, réalisées au niveau du bec du pépin, nous ont permis de conserver une structure cellulaire intacte au niveau de l'épiderme externe et du parenchyme du tégument externe du pépin. En effet, l'éclatement des cellules des couches inférieures à celle du parenchyme du tégument externe dû à la technique de l'HPF a constitué un frein à cette étude, ne nous permettant pas de réaliser l'immunomarquage dans ces couches cellulaires. Par ailleurs, au vu de la densité tanique très importante des cellules de l'épiderme externe du tégument externe, il a été impossible de localiser les billes d'or au sein de ces cellules. Ainsi, la localisation des enzymes ANR et LAR par immunomarquage n'a pu être efficiente qu'au niveau du parenchyme du tégument externe et les hypothèses émises pour expliquer les mécanismes de biosynthèse et de transport concernent uniquement ce tissu.

Notre étude a porté sur la localisation des enzymes LAR1, LAR2 et ANR des pépins issus des baies du Cabernet Sauvignon du millésime 2017. Au vu des pics d'expression des gènes codant les

enzymes LAR et ANR, deux stades de développement ont été choisis : fermeture de grappe et véraison.

II.1. Planches d'images

Toutes les images sont répertoriées dans les pages suivantes et le lexique des abréviations utilisées est la suivante :

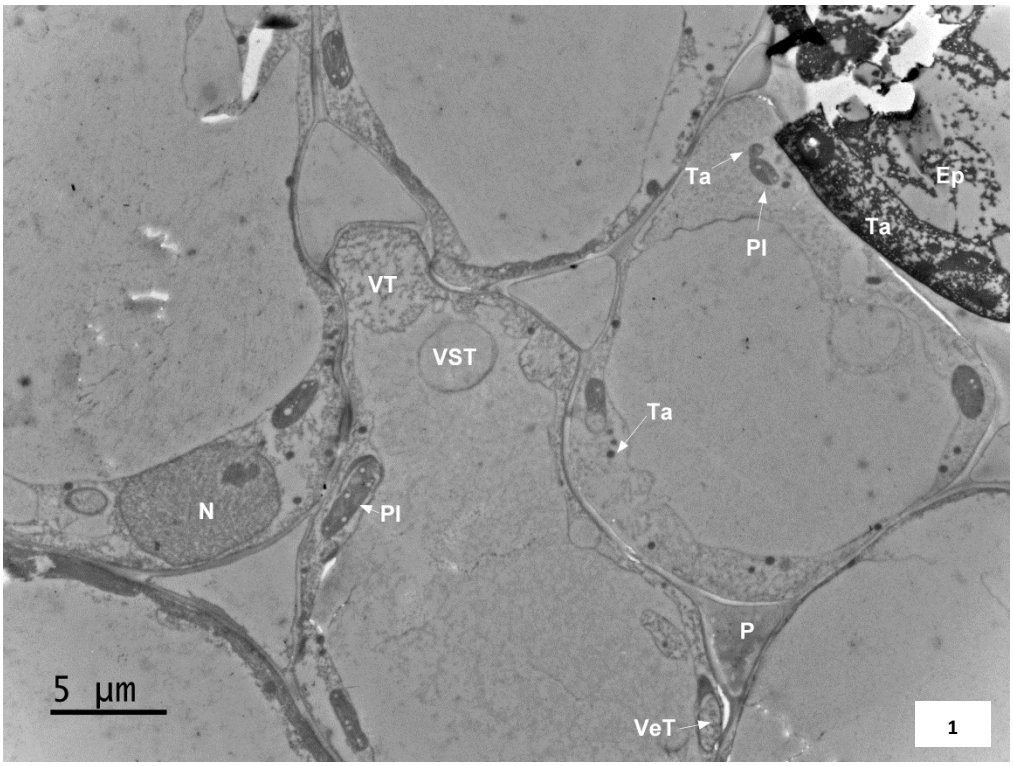
- **Cyt**: Cytoplasme
- **Ep**: Epiderme
- **N**: Noyau
- **P**: Paroi cellulaire
- **Pl**: Plastes
- **T**: Tonoplaste
- **Ta**: Tanins
- **V**: Vacuole
- **VT**: Vacuole Tanique
- **VST**: Vacuole Sans Tanins
- **VeT**: Vésicule Tanique

ULTRASTRUCTURE

Fermeture de grappe – Observation des cellules du parenchyme et de l'épiderme du tégument externe

Remarquez les différences structurales entre les cellules de l'épiderme et celles du parenchyme

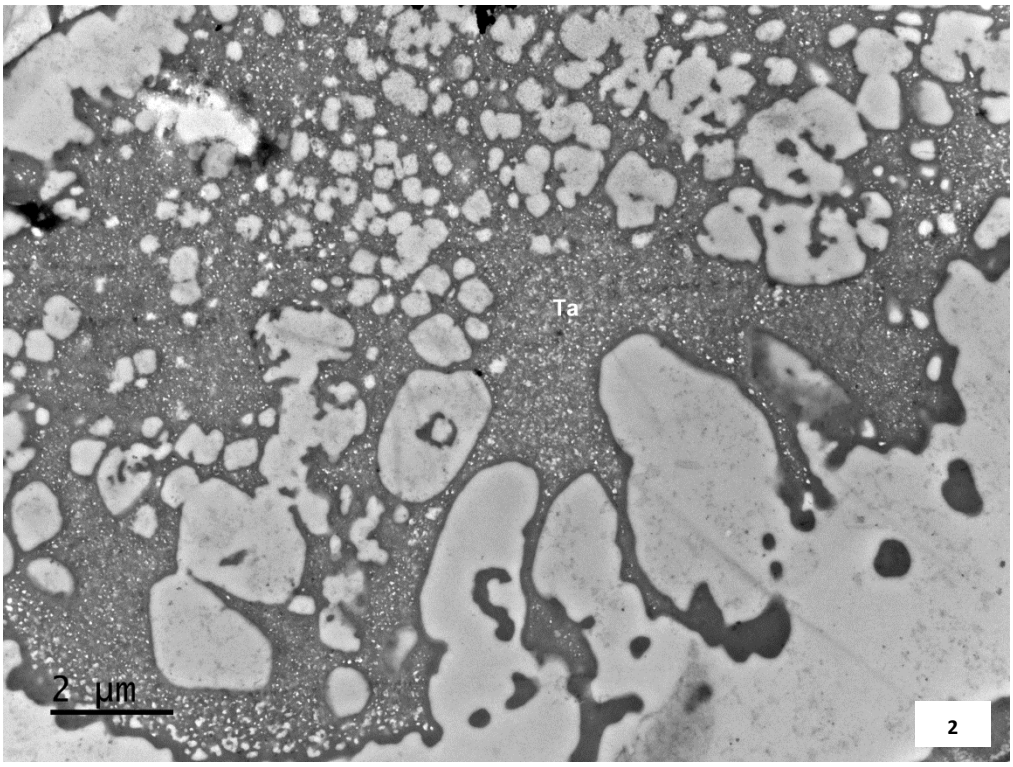
Remarquez la présence de vésicules taniques et non taniques au sein d'une même cellule – Cellule à tanins de type D8+1



ULTRASTRUCTURE

Fermeture de grappe – Observation des tanins des cellules de l'épiderme externe du tégument externe

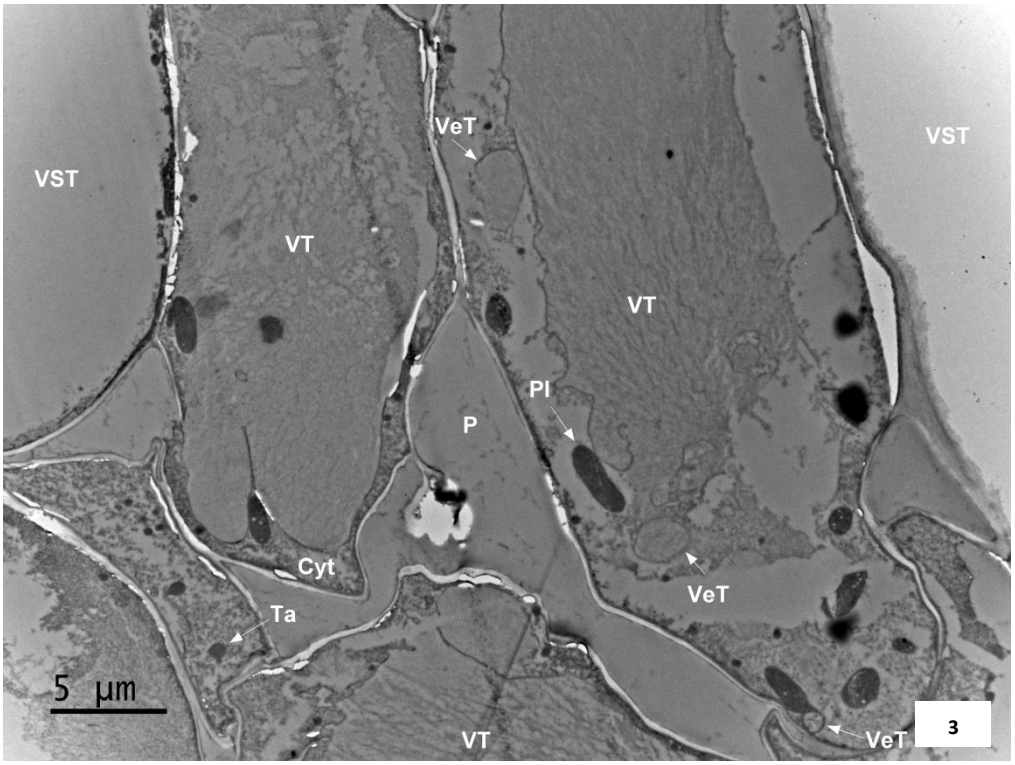
Remarquez la densité des tanins alvéolés – Cellule à tanins de type A3



ULTRASTRUCTURE

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

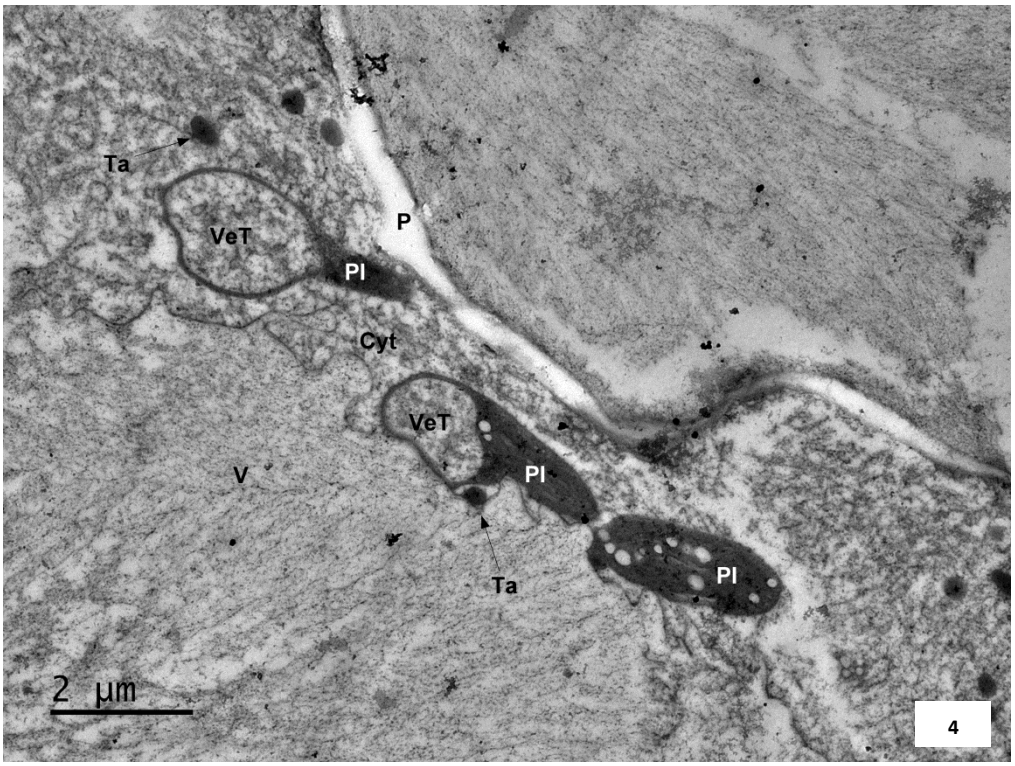
Remarquez les vacuoles taniques et les vésicules taniques bourgeonnant des plastes - Cellules de type D8+1



ULTRASTRUCTURE

Fermeture de grappe – Observation des plastes des cellules du parenchyme du tégument externe

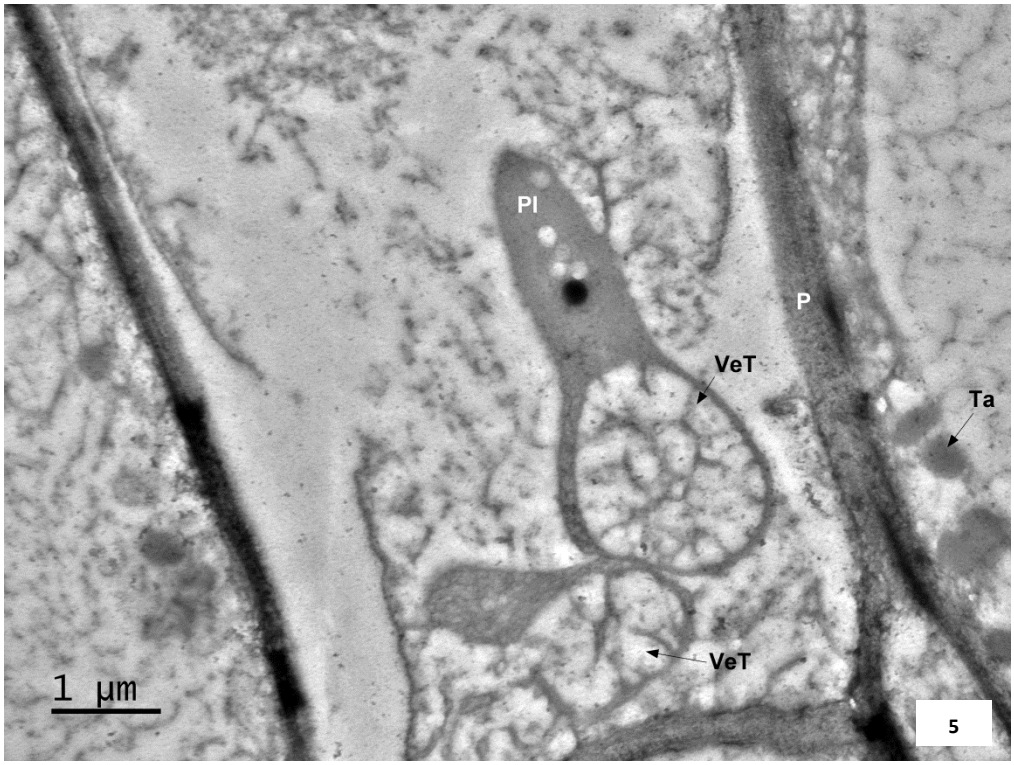
Remarquez les bourgeonnements des plastes qui adoptent une forme de « raquette »



ULTRASTRUCTURE

Fermeture de grappe – Observation des plastes des cellules du parenchyme du tégument externe

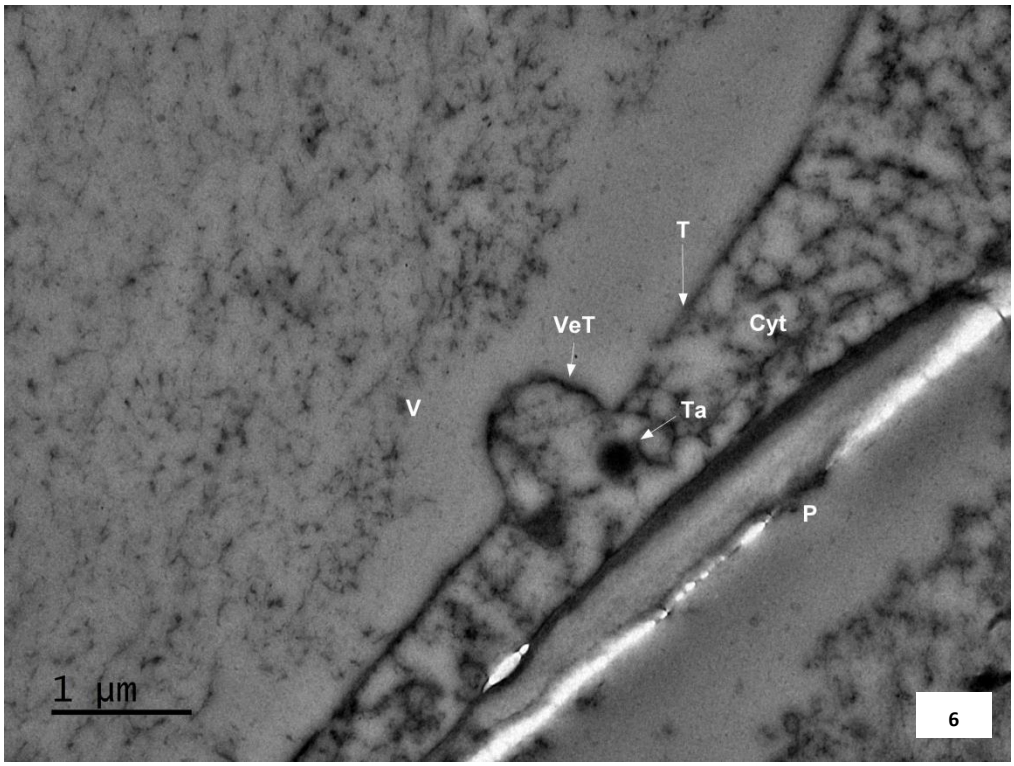
Remarquez les deux types de bourgeonnements des plastes: « sain » et « déchiré »



ULTRASTRUCTURE

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

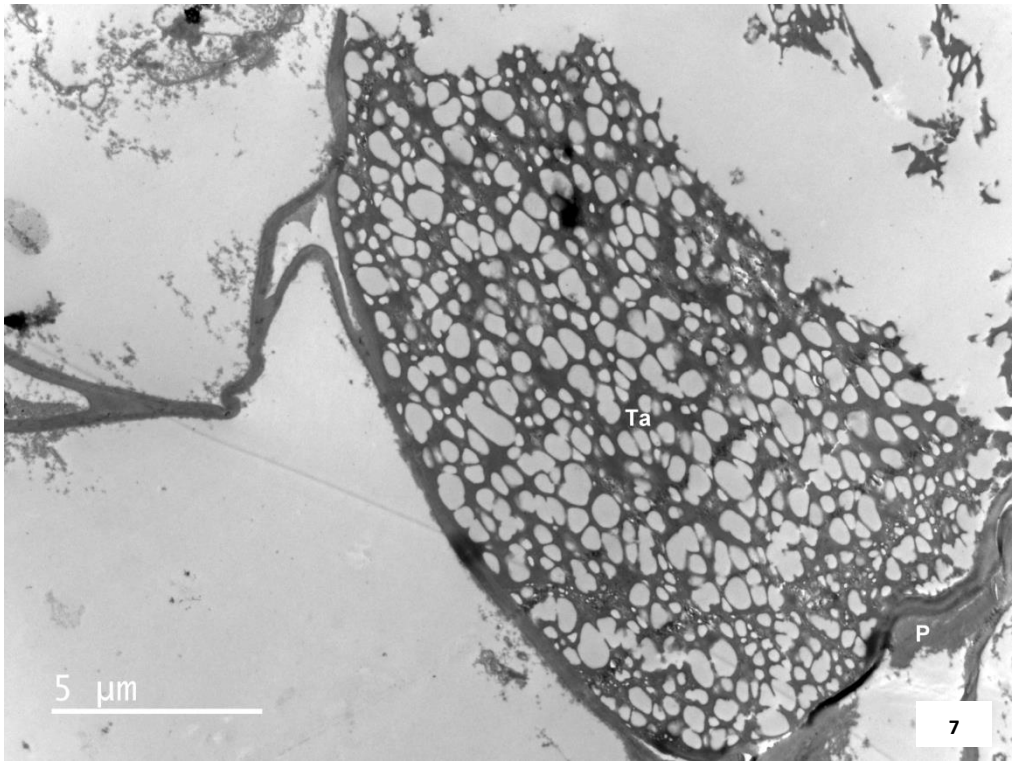
Remarquez la fusion d'une vacuole tanique de type D1 avec le



ULTRASTRUCTURE

Véraison– Cellules de l'épiderme externe du tégument externe

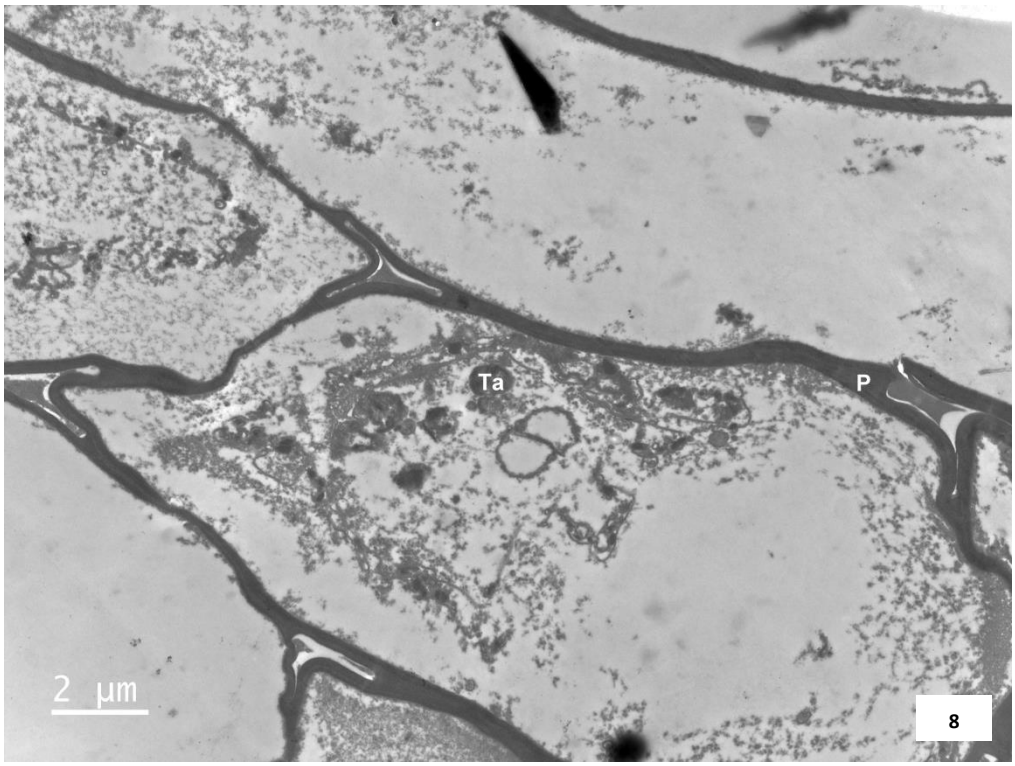
Remarquez la densité des tanins alvéolés – Cellule à tanins de type A3



ULTRASTRUCTURE

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

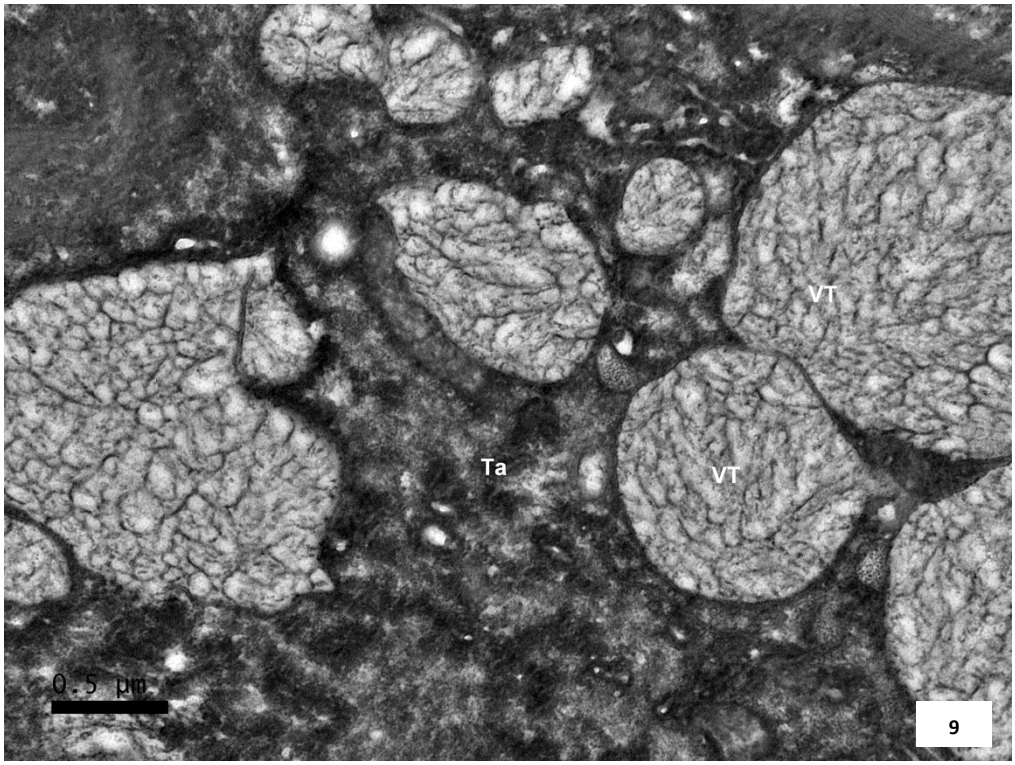
Remarquez la densité des parois et la disparition des plastes – Cellules à tanins de type D8+1



ULTRASTRUCTURE

Véraison– Cellules du parenchyme du tégument externe

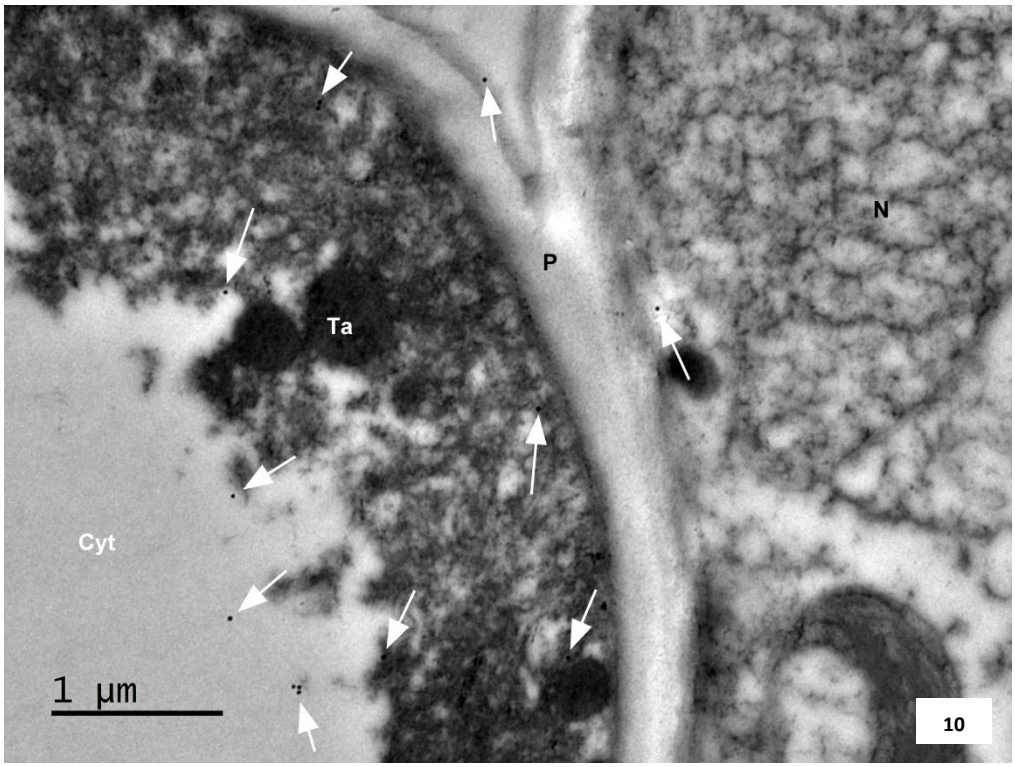
Remarquez les vésicules taniques peu denses de type – type D8



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR1

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

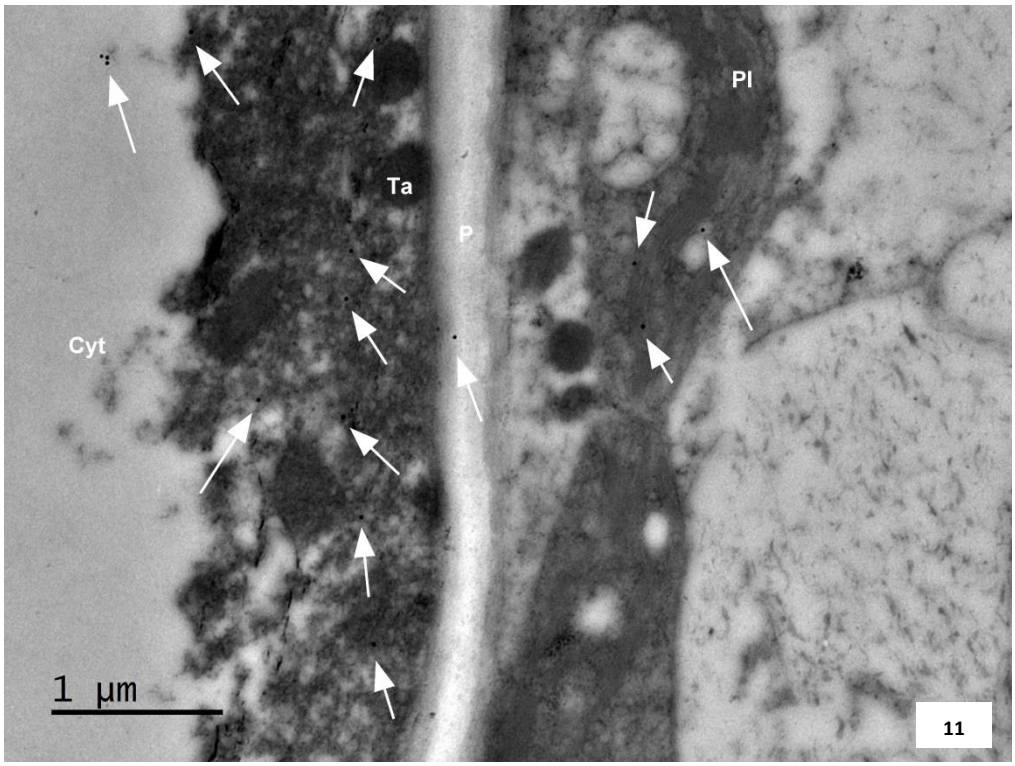
Remarquez la présence de billes d'or à proximité du noyau et des parois



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR1

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

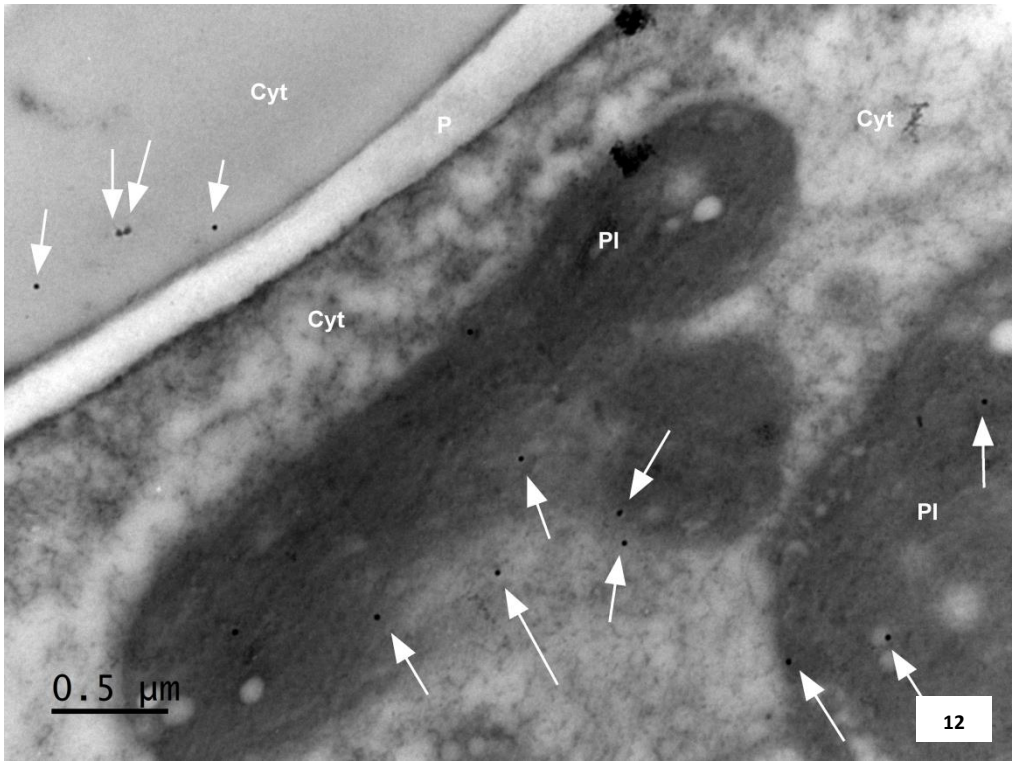
Remarquez la présence de billes d'or dans les plastes et les amas de tanins denses de type D1



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR1

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

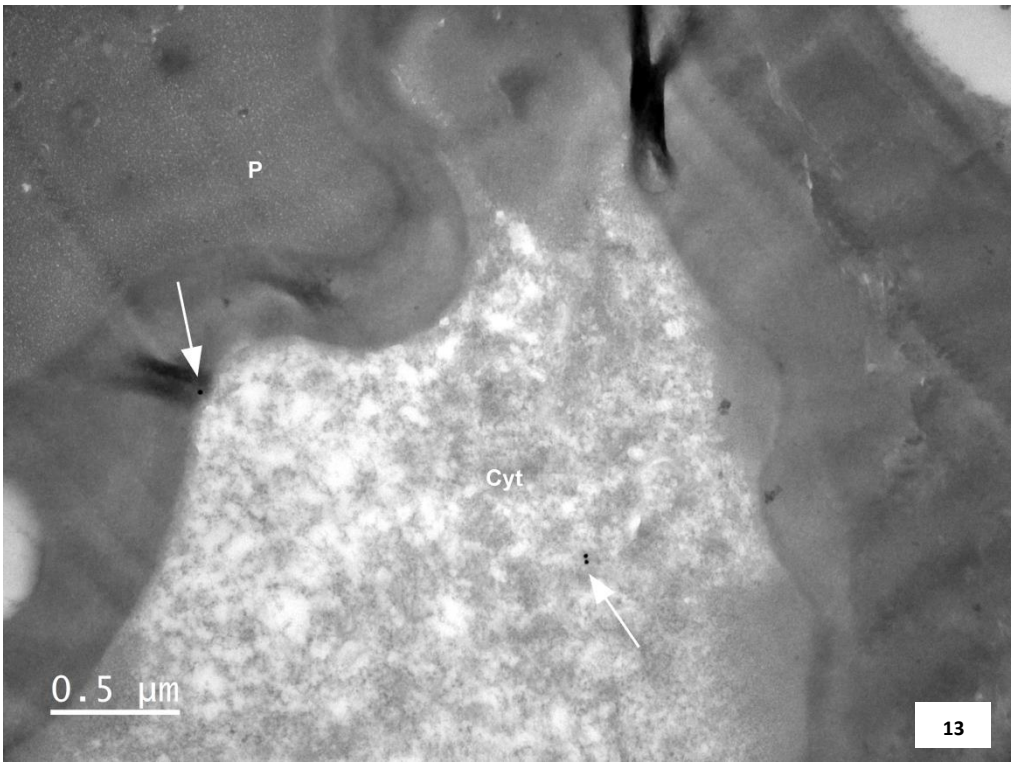
Remarquez la présence de billes d'or dans les plastes et le cytoplasme de la cellule



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR1

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

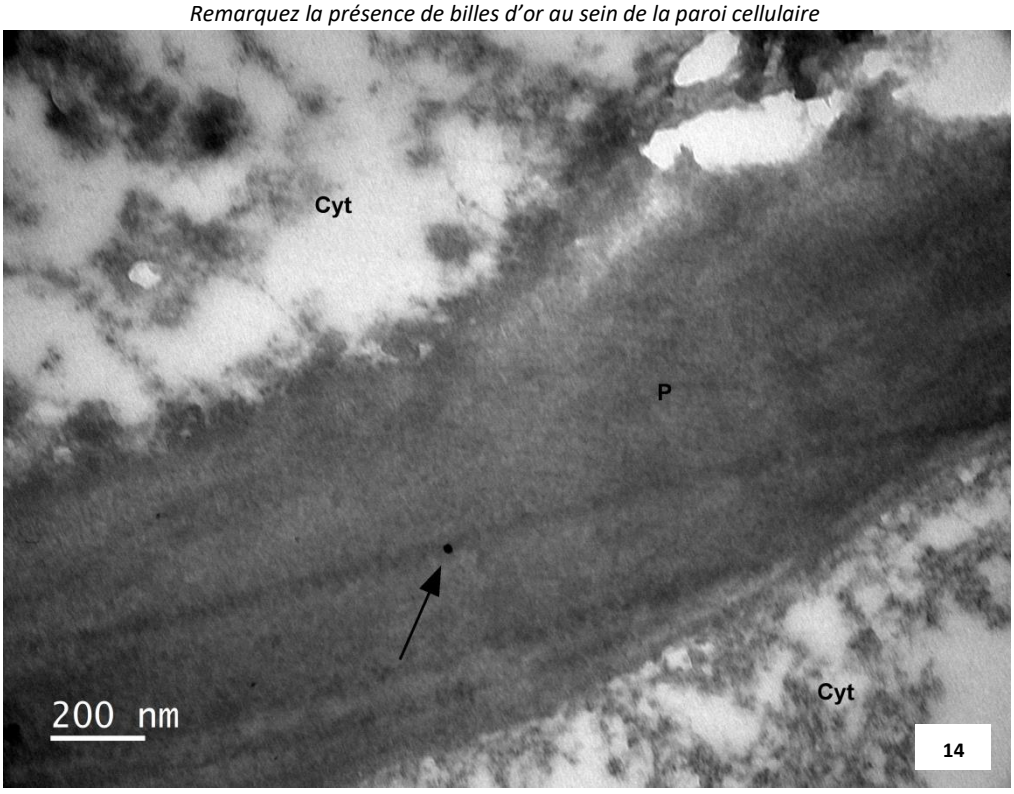
Remarquez la présence de billes d'or au sein de la paroi cellulaire et dans le cytoplasme de la cellule



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR1

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or au sein de la paroi cellulaire

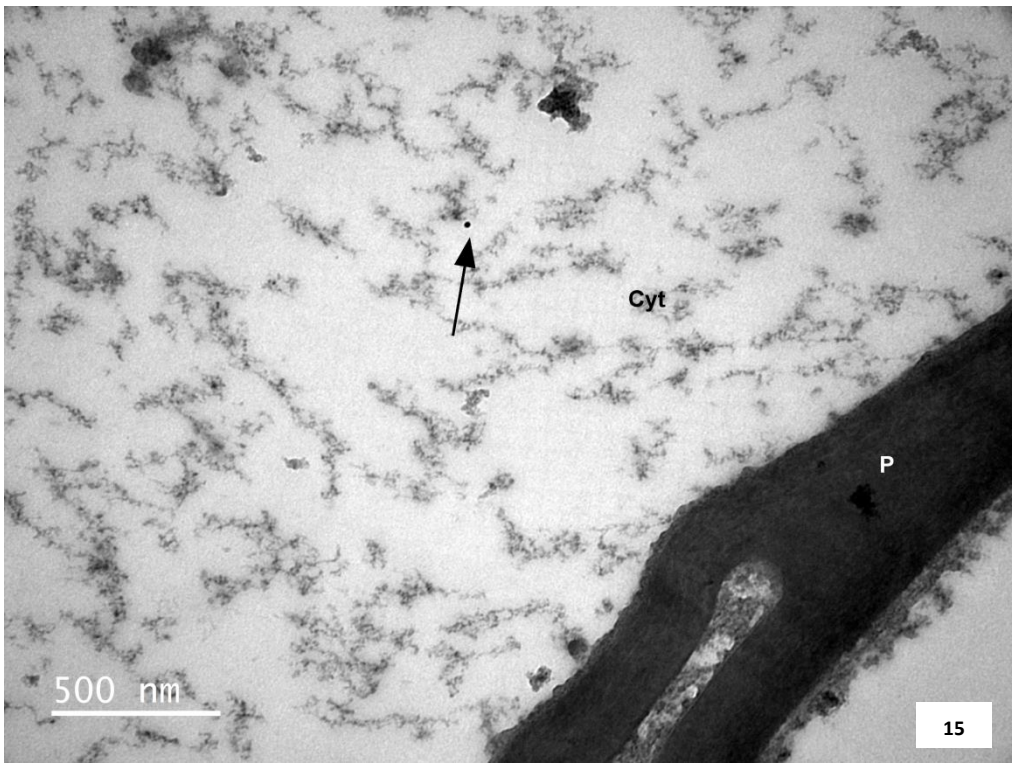


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR1

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme de la cellule

Remarquez les fins précipités taniques peu denses

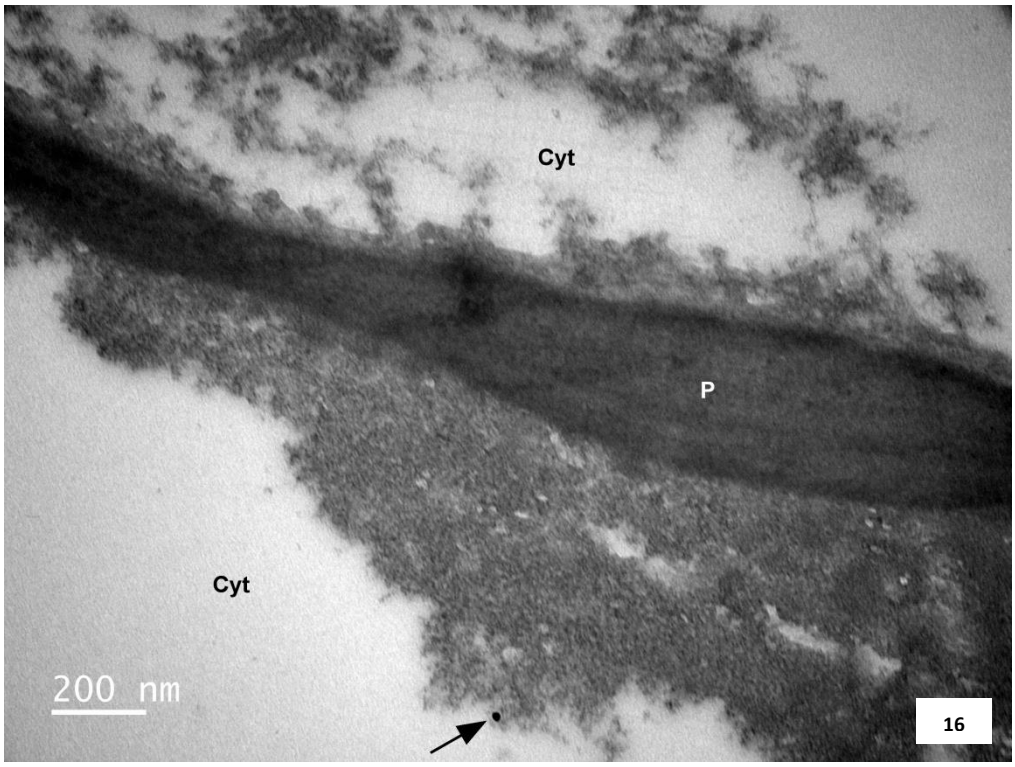


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR1

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme de la cellule

Remarquez la densité des tanins

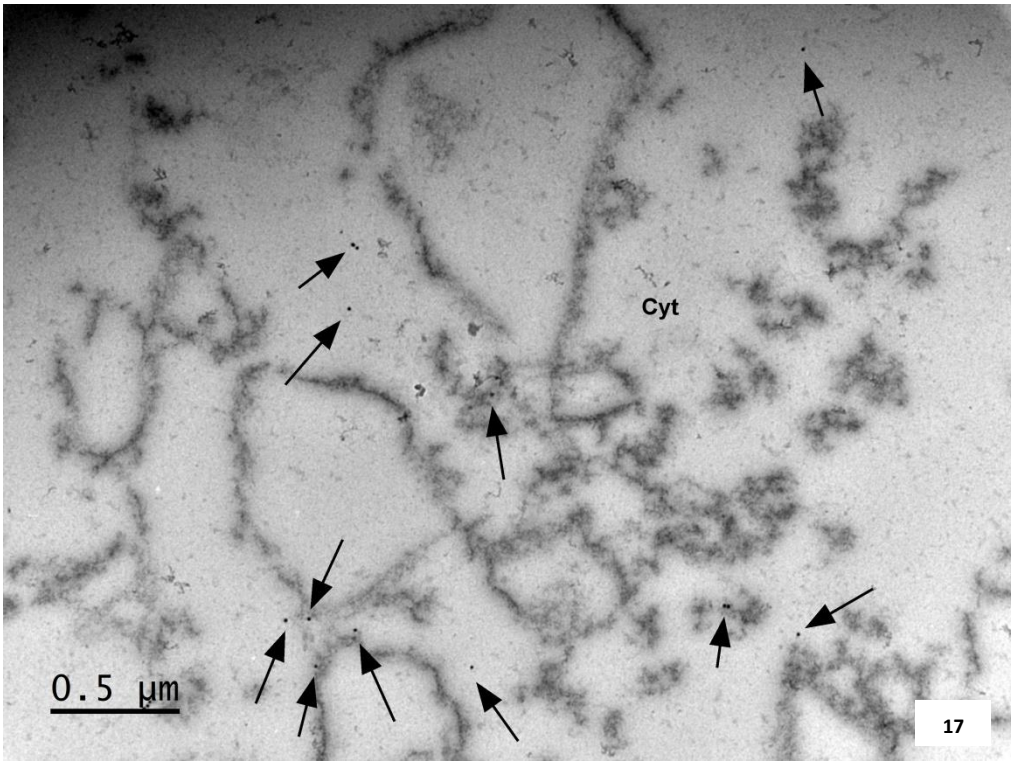


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme de la cellule

Remarquez les tanins sous forme de fins précipités peu denses

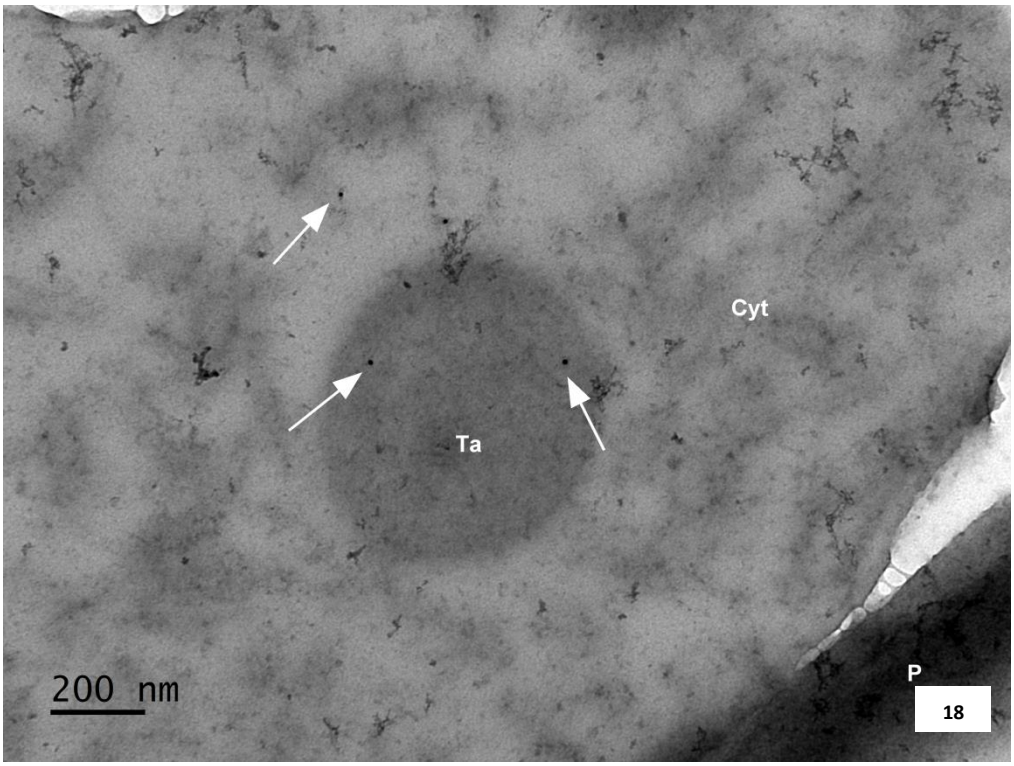


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme de la cellule et dans la vésicule de tanins denses

Remarquez la vésicule de tanins denses de type D1 au sein du cytoplasme

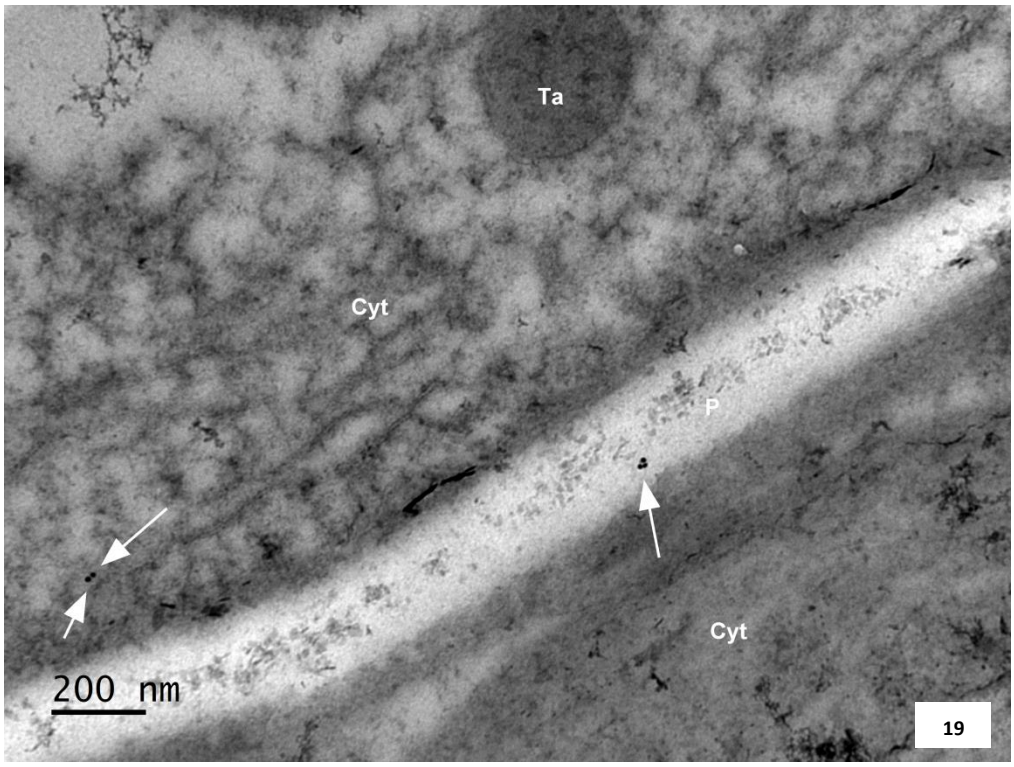


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme et dans la paroi cellulaire

Remarquez les tanins sous forme de fins précipités peu denses et remarquez la vésicule de tanins denses

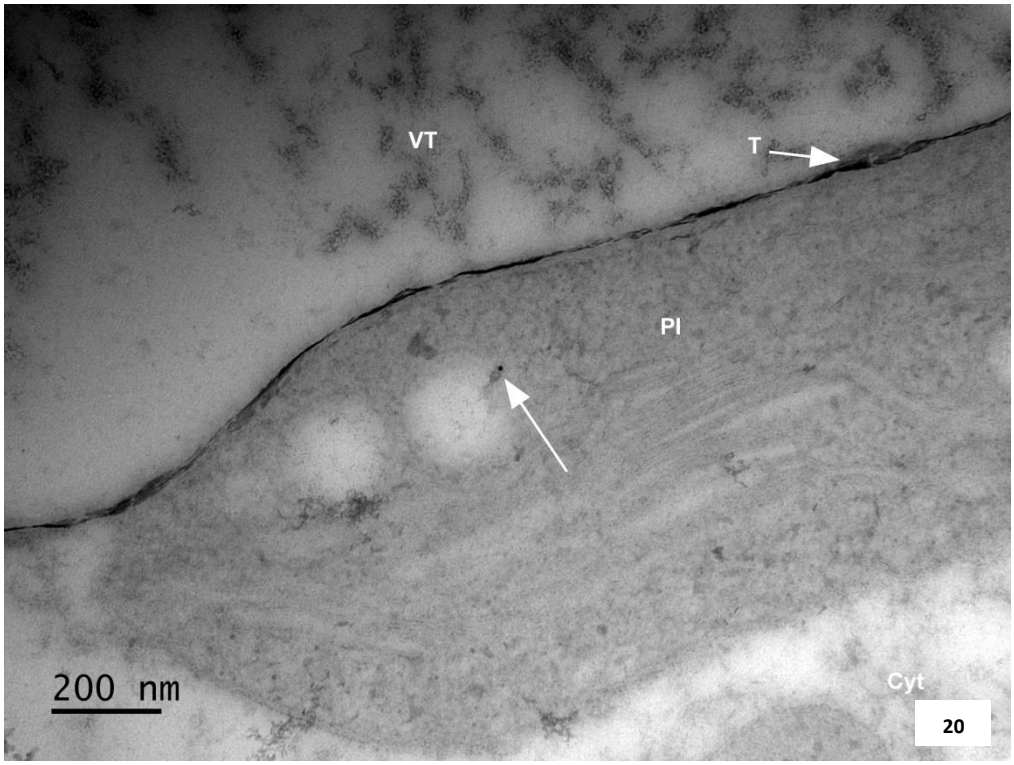


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le plaste

Remarquez l'aspect « précipité » des tanins vacuolaires

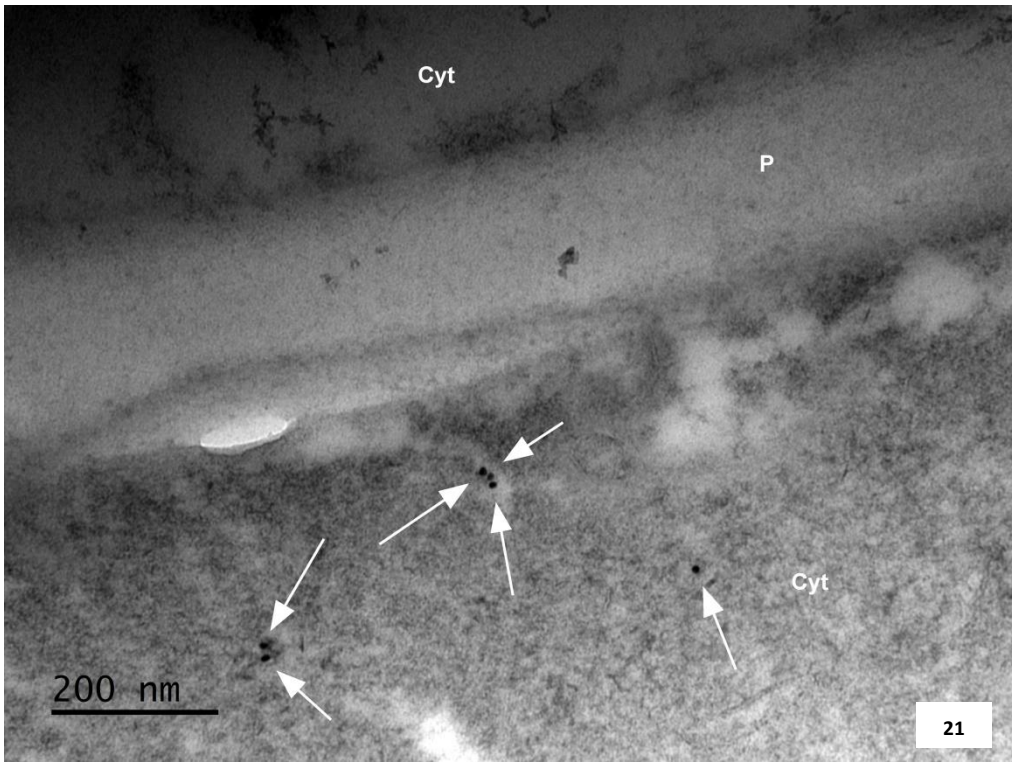


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme de la cellule

Remarquez l'aspect dense des tanins vacuolaires

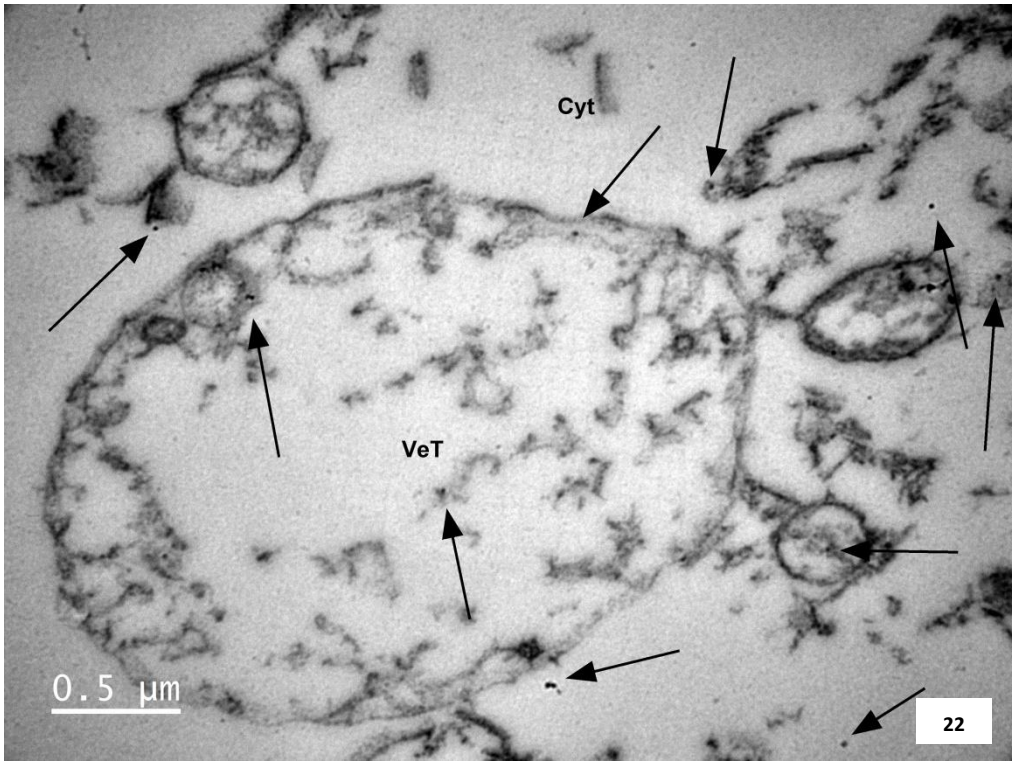


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme et dans les vacuoles tanique peu denses

Remarquez les vacuoles taniques peu denses de taille variable – cellule de type D8

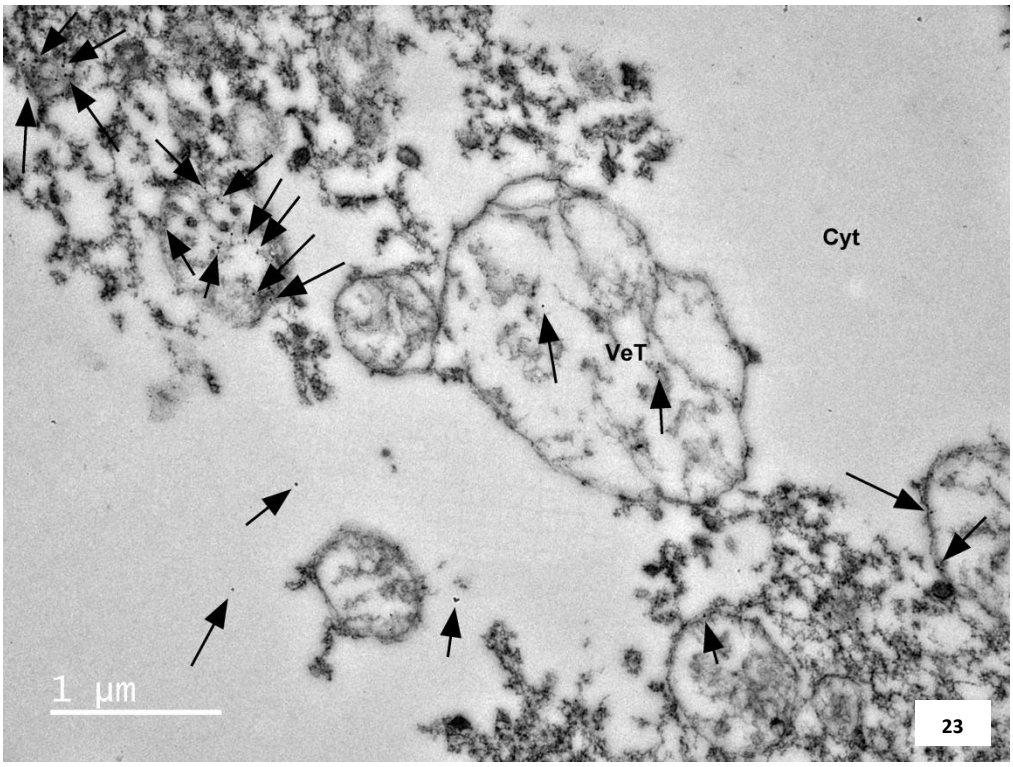


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme et dans les vacuoles tanique peu denses

Remarquez la fusion de deux vacuoles taniques peu denses de type D8

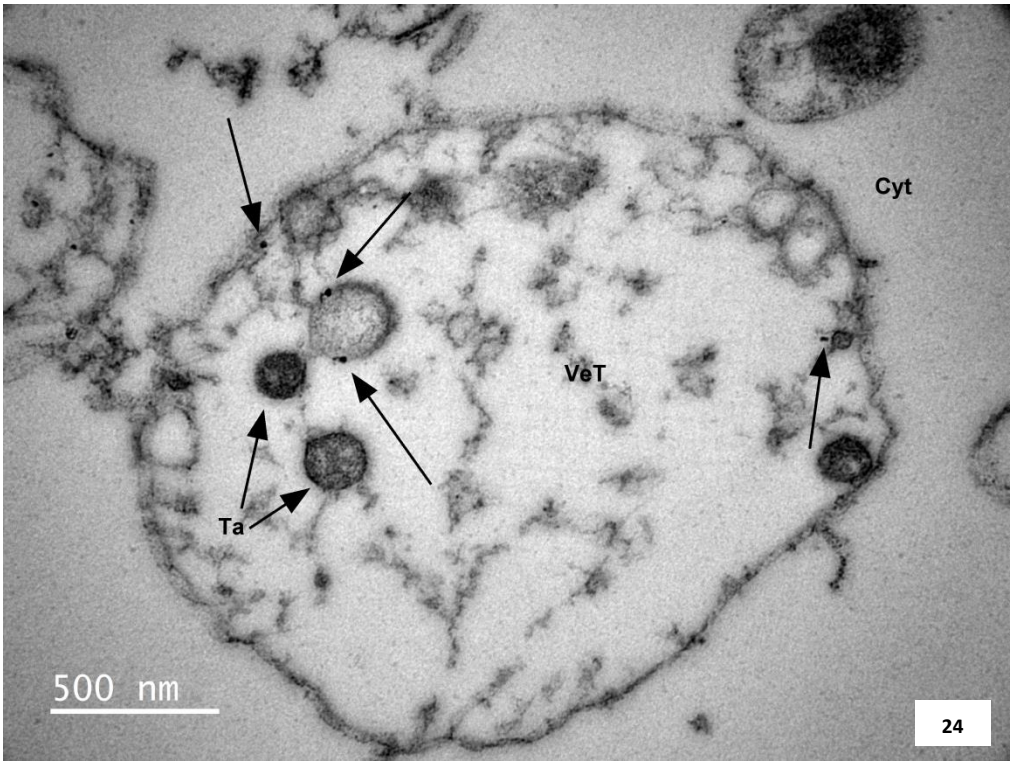


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2

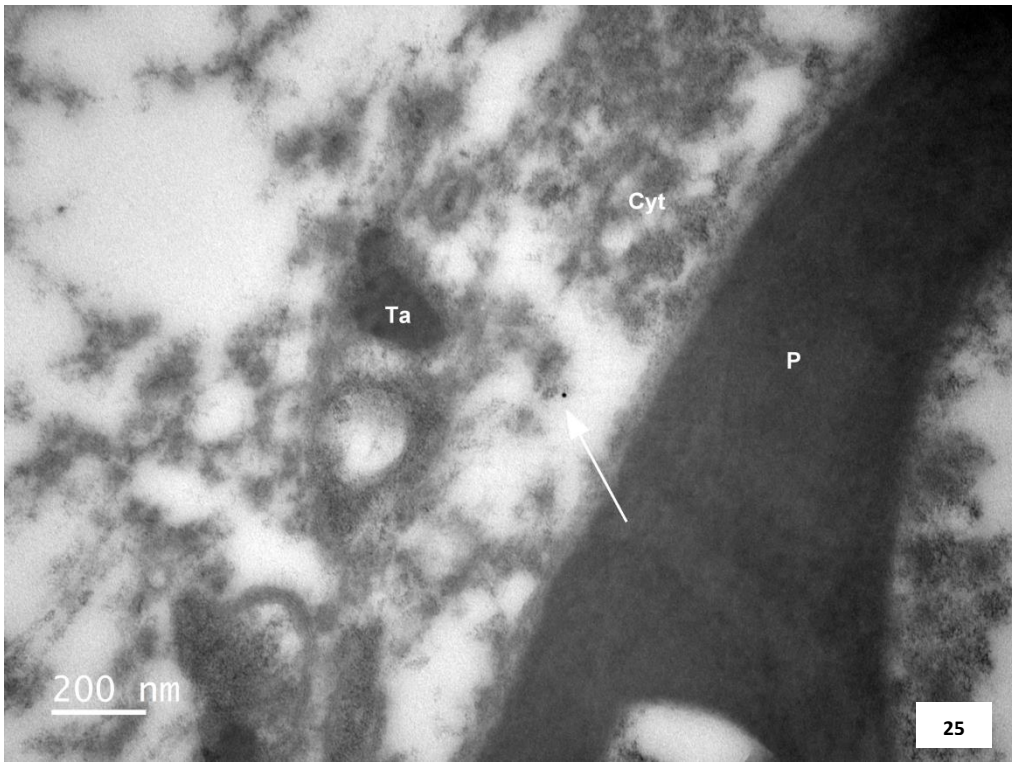
Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme et dans les vacuoles tanique peu denses et dans les amas de tanins denses

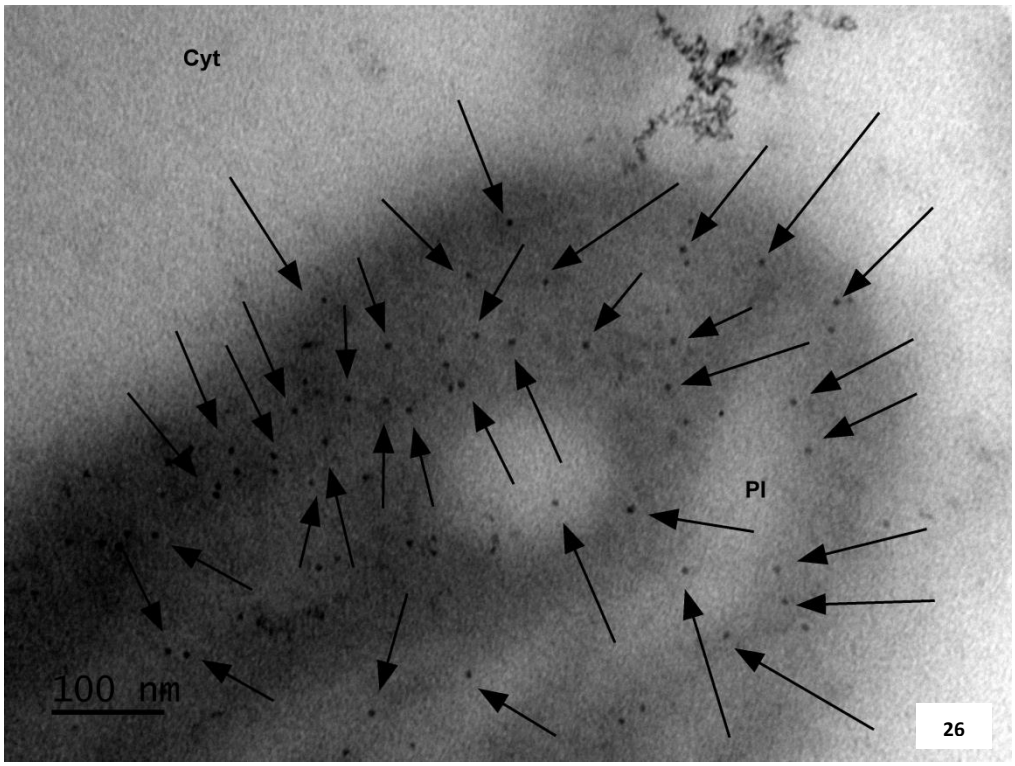
Remarquez la vacuole tanique peu dense contenant des amas de tanins denses – Cellule de type D8+6



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE LAR2
Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe
Remarquez les billes d'or à proximité de tanins cytoplasmique peu denses



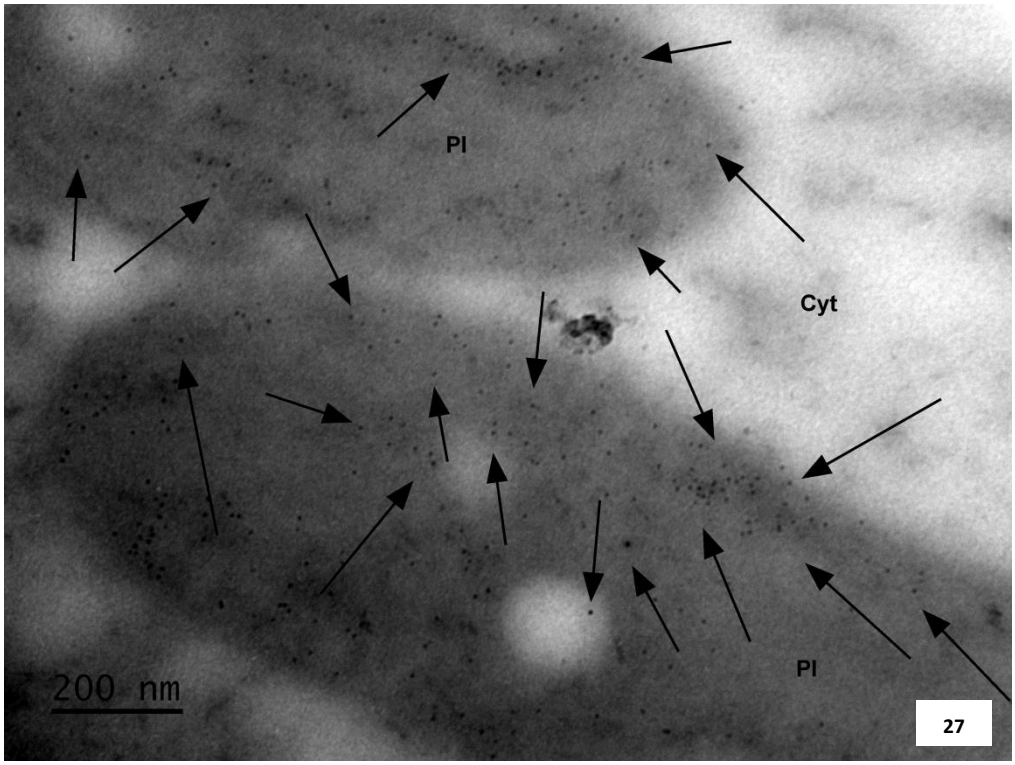
LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE ANR
Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe
Remarquez la forte densité de billes d'or au sein des plastes



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE ANR

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la forte densité de billes d'or au sein des plastes

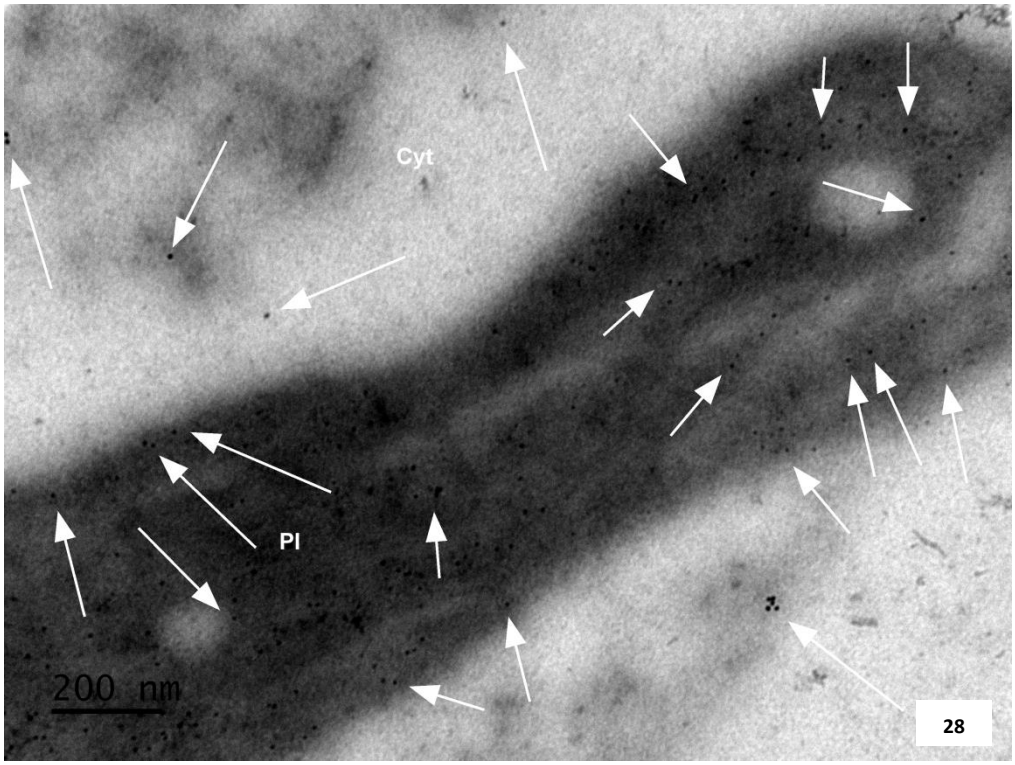


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE ANR

Fermeture de grappe – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la forte densité de billes d'or au sein du plaste

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme

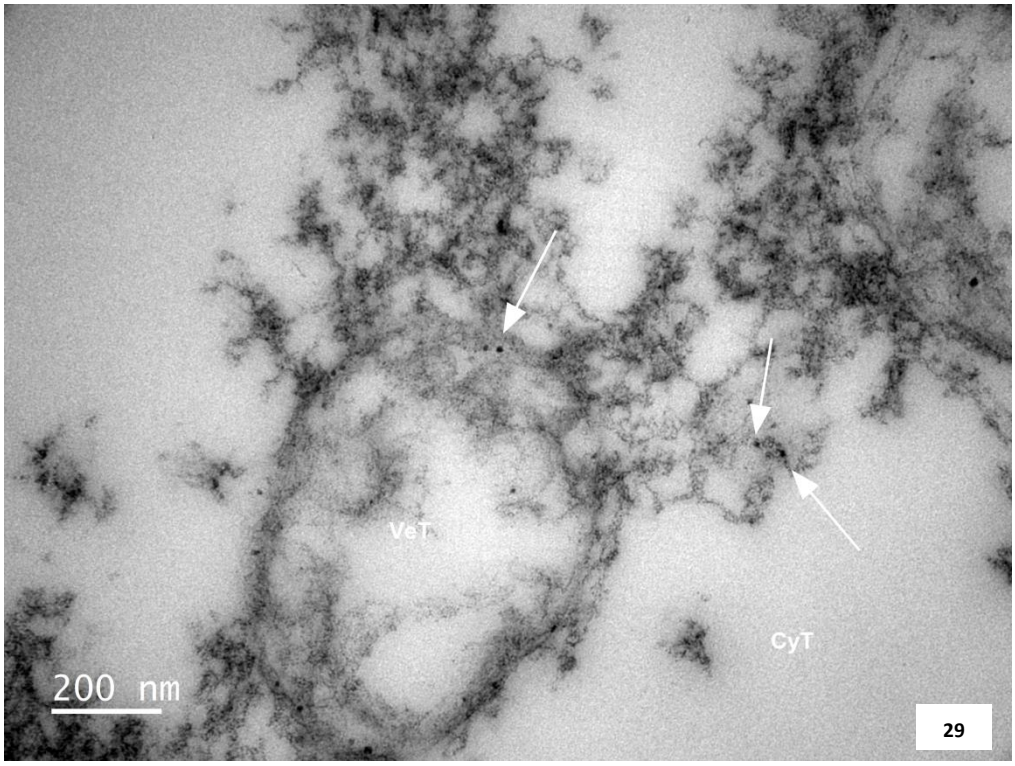


LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE ANR

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans le cytoplasme et dans les vacuoles tanique peu denses

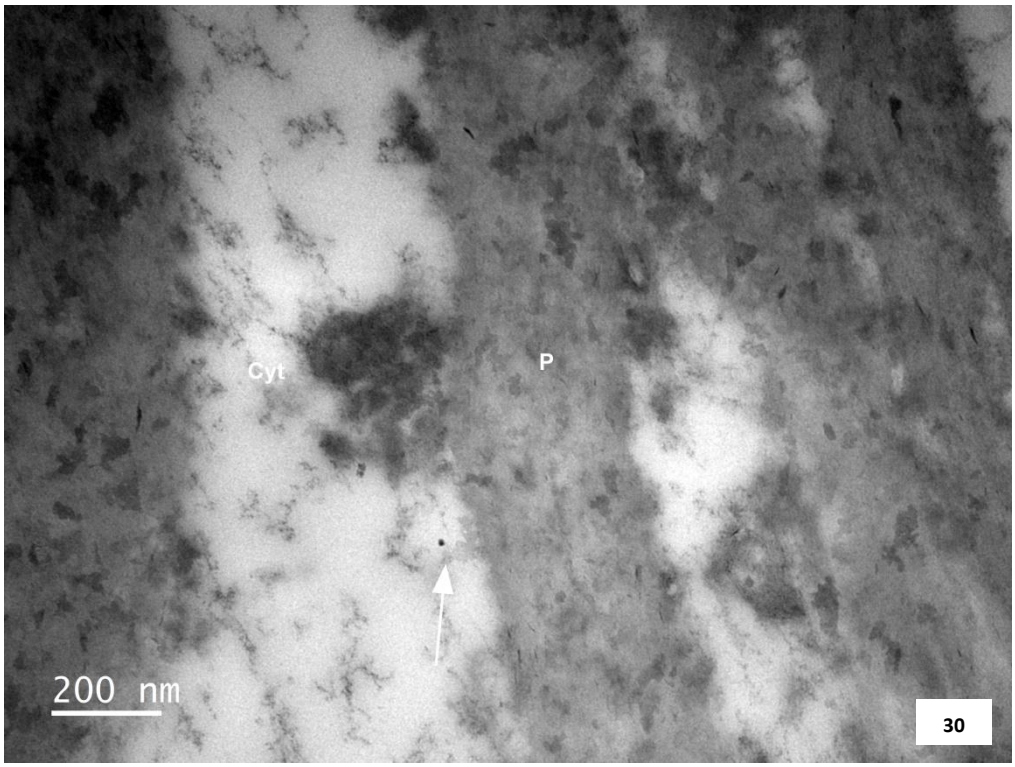
Remarquez la vacuole tanique au contenu peu dense



LOCALISATION CELLULAIRE – PROTEINE ANR

Véraison – Cellules du parenchyme du tégument externe

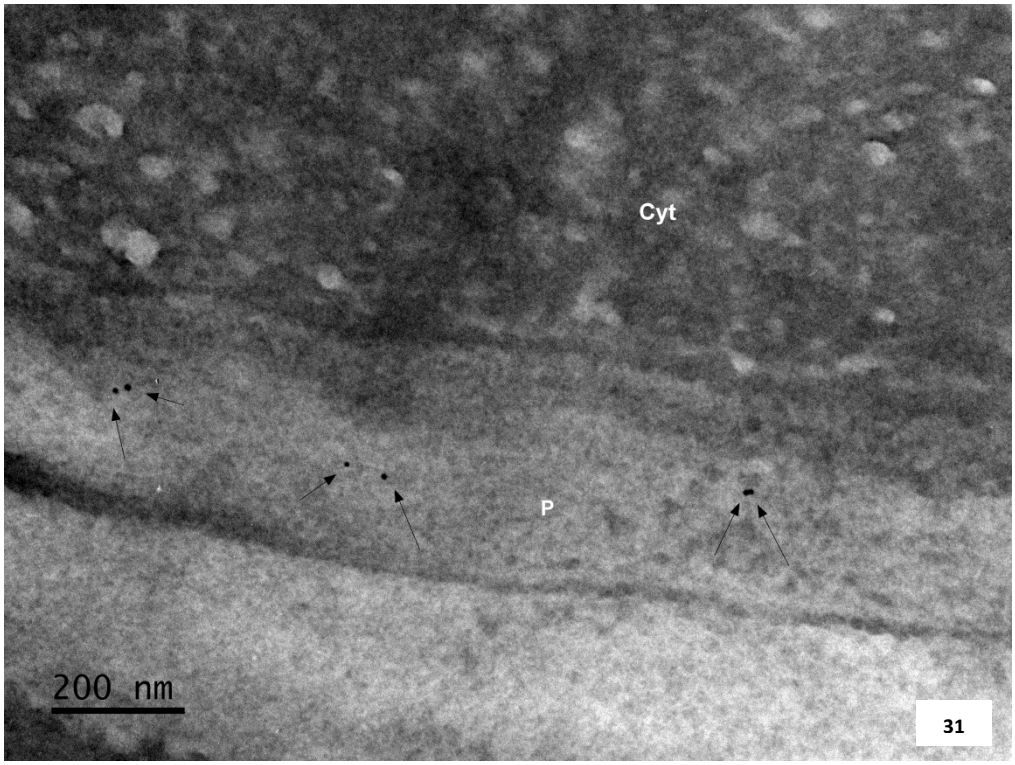
Remarquez les billes d'or à proximité de tanins cytoplasmique peu denses



CONTROLE POSITIF LM20

Fermeture de grappe - Cellules du parenchyme du tégument externe

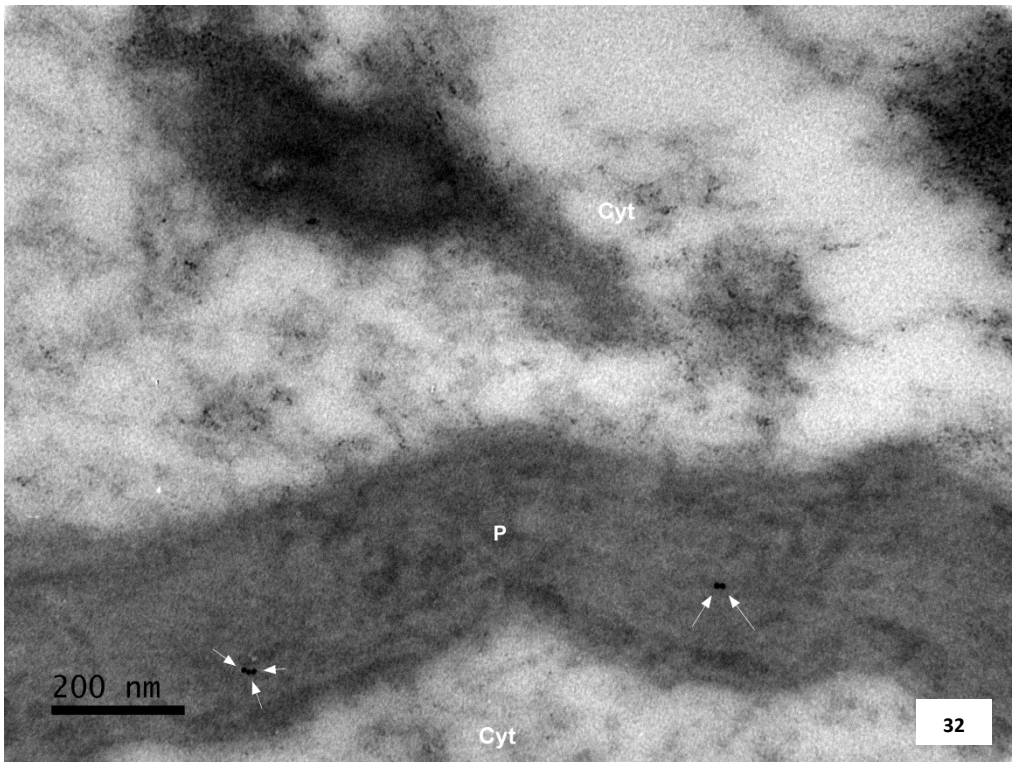
Remarquez la présence de billes d'or dans la paroi cellulaire



CONTROLE POSITIF LM20

Véraison - Cellules du parenchyme du tégument externe

Remarquez la présence de billes d'or dans la paroi cellulaire



II.2. Ultrastructure

L'observation de l'ultrastructure des cellules de l'épiderme externe et du parenchyme du tégument externe montre en termes de composés taniques (i) des différences d'ultrastructure entre les deux stades étudiés et (ii) des différences d'ultrastructure entre les deux types de tissus.

Au niveau de l'épiderme externe du tégument externe :

- Au stade fermeture de grappe, on retrouve des tanins dans des vacuoles occupant quasiment tout le volume cellulaire. Dans ces vacuoles, les tanins sont alvéolés, mais très denses, ce qui nous permet de caractériser ces cellules comme appartenant au type A3 décrit dans le Chapitre III. (**Image 2**).
- Au stade véraison, les cellules de l'épiderme ont changé d'aspect avec une densification de l'aspect des tanins dans les vacuoles, mais peuvent toujours être caractérisées comme étant du type A3 (**Image 7**).

Au niveau du parenchyme du tégument externe :

- A fermeture de grappe, le contenu tanique des cellules du parenchyme du tégument externe apparaît moins dense que celui des cellules de l'épiderme et ces tanins sont visibles dans plusieurs types de structures (**Image 3**). On peut distinguer :
    - des vacuoles taniques de type D1, avec dans certaines zones, l'inclusion d'une structure vésiculaire plus ou moins ouverte au niveau du tonoplaste contenant des tanins (**Image 6**) ;
    - dans le cytoplasme, des vésicules de tanins denses de type D8 et/ou des amas de tanins denses de type D1 (**Image 3**) ;
    - dans le cytoplasme, des structures de type « plastes » contenant des tanins. Ces plastes peuvent être retrouvés sous différentes formes : de plastes de forme ovoïde avec une structure classique (enveloppe, stroma et structure membranaire interne) incluant des amas de tanins denses, des plastes présentant à leur extrémité un bourgeonnement contenant des tanins granuleux et des plastes dont le bourgeonnement est éclaté semblant libérer du matériel tanique dans le cytoplasme (**Images 1,3,4,5**).
- A véraison, les plastes ne sont plus visibles (**Image 8**). En revanche, plusieurs types de structures contiennent des tanins :
    - dans le cytoplasme, des vésicules de tanins denses et/ou des amas de tanins denses (**Image 8**) ;
    - des vacuoles de taille variable avec un contenu tanique peu dense de type D8 (**Image 9**) ;

- des vacuoles de taille variable avec un contenu tanique peu dense et des amas/vésicules de tanins denses de type D8+6 (**Image 24**) ;
- des vacuoles de taille plutôt importante avec des vésicules « branchées »/« adossées » de taille plus petite et de contenu tanique peu dense de type D8 (**Images 22 et 23**).

Par ailleurs, une densification tanique des parois cellulaires est nettement observable au stade véraison (**Image 8**) par comparaison au stade fermeture de grappe (**Image 1**).

A l'image des travaux de Park en 1995 sur les cellules taniques de la pellicule de raisin, nos résultats montrent une grande hétérogénéité d'apparence des tanins cellulaires. Par ailleurs, nos travaux mettent également en évidence une importante variété structurale des vacuoles/vésicules taniques, laissant penser que les tanins pourraient être synthétisés dans différentes zones cellulaires.

II.3. Localisation cellulaire de la protéine LAR1

Les observations des billes d'or couplées aux anticorps dirigés contre la protéine LAR1 montrent que :

Au stade fermeture de grappe, la protéine LAR1 est présente dans :

- le noyau, suggérant, comme l'avait observé Lacampagne (2010) dans les pellicules de raisin, que le complexe réticulum endoplasmique-noyau est un lieu de synthèse des flavanols (**Image 10**);
- les plastes (**Images 11 et 12**);
- le cytoplasme, où elle est à proximité et/ou dans les amas de tanins denses de type D1 (**Images 11 et 12**);
- la paroi (**Images 10 et 11**).

Au stade véraison, la localisation de la protéine LAR1 évolue, elle est retrouvée dans :

- la paroi cellulaire (**Images 13 et 14**) ;
- le cytoplasme où elle est associée à de fins précipités peu denses (**Images 13 et 15**) ou très denses (**Image 16**).

Ainsi, nos résultats montrent une évolution de la localisation cellulaire de la protéine LAR1 au cours du développement du pépin, sous-entendant une évolution du lieu de synthèse cellulaire de la catéchine.

II.4. Localisation de la protéine LAR2

De la même manière que pour la protéine LAR1, la localisation de la protéine LAR2 a été entreprise dans les coupes de pépins au stade fermeture de grappe et véraison.

Au stade fermeture de grappe, la protéine LAR2 est retrouvée dans :

- les plastes (**Image 20**) ;
- le cytoplasme où elle est associée à de fins précipités peu denses (**Image 17**) ou très denses (**Images 19 et 21**) ;
- les parois cellulaires (**Image 19**) ;
- les amas de tanins denses de type D1 (**Image 18**).

Au stade véraison, la localisation de LAR2 évolue, elle est retrouvée dans :

- le cytoplasme, où elle est associée à de fins précipités peu denses (**Images 22, 23 et 25**) ;
- les vacuoles taniques de type D8+6 (**Image 24**) ;
- les vacuoles taniques de type D8 (**Image 23**).

Ainsi, tout comme la protéine LAR1, nos résultats montrent une évolution de la localisation cellulaire de LAR2 au cours du développement du pépin, confirmant la modification du lieu de synthèse cellulaire de la catéchine.

II.5. Localisation de la protéine ANR

Au stade fermeture de grappe, la protéine ANR est retrouvée dans :

- les plastes de manière très abondante (**Images 26, 27 et 28**) ;
- le cytoplasme où elle semble associée à de fins précipités peu denses (**Image 28**).

Au stade véraison, la protéine ANR a été localisée dans :

- le cytoplasme, où elle est associée à de fins précipités peu denses (**Image 30**) ;
- les vacuoles taniques de type D8 (**Image 29**).

A l'image des protéines LAR1 et LAR2, la localisation cellulaire de la protéine ANR évolue pendant le développement du pépin, démontrant l'évolution du lieu de synthèse cellulaire de la épicatéchine

II.6. Conclusion

Notre travail a permis pour la première fois de localiser les trois enzymes clés de la voie de biosynthèse des flavanols, LAR1, LAR2 et ANR dans le pépin de raisin au cours de son

développement. Cette localisation met en évidence l'évolution de la localisation de ces enzymes au cours du développement du pépin, mais également montre les spécificités de localisation propre à chaque enzyme. Par ailleurs, ces observations microscopiques laissent envisager l'existence de mécanismes de transport des flavanols dans le pépin de raisin.

Le tableau suivant récapitule la localisation cellulaire des différentes enzymes en fonction des stades de développement :

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des localisations cellulaires des enzymes LAR et ANR en fonction du stade de développement des pépins

	Fermeture de grappe					
	Paroi cellulaire	Cytoplasme	Plastes	Vésicules / vacuoles peu denses	Petits amas très denses	Noyau
LAR1	x	x	x	-	x	x
LAR2	x	x	x	-	x	-
ANR	-	x	xxx	-	-	-
	Véraison					
	Paroi cellulaire	Cytoplasme	Plastes	Vésicules / vacuoles peu denses	Petits amas très denses	Noyau
LAR1	x	x	-	-	-	-
LAR2	-	x	-	x	-	-
ANR	-	x	-	x	-	-

III. Discussion générale

Ce second chapitre a pour objectif de caractériser le profil d'évolution d'expression des gènes principaux de la voie de biosynthèse des tanins (*VvLAR1, VvLAR2 et VvANR*) et d'identifier les zones cellulaires de biosynthèse des flavanols de pépins afin de :

- Définir les phases clés du métabolisme des flavanols et des tanins condensés en lien avec les teneurs,
- Identifier l'existence d'une voie de biosynthèse privilégiée et potentiellement des mécanismes de régulation,
- Définir l'importance du millésime et/ou du cépage sur la régulation des voies de biosynthèse dans le but de mieux comprendre les différences de teneurs observées,
- Localiser les zones cellulaires de biosynthèse des flavanols afin d'apporter, pour la première fois, des données sur les mécanismes fins du métabolisme phénolique des pépins de raisin.

La première étape de ce travail a été de caractériser le profil d'expression des gènes *VvLAR1, VvLAR2 et VvANR* tout au long du cycle de développement du pépin.

Comme pour les teneurs, le fait d'avoir comparé quatre cépages pendant trois millésimes, nous a permis de définir un **profil type de l'évolution de l'expression relative des gènes *VvLAR1* et**

VvLAR2 dans les pépins de raisin issus de vignes cultivées à Bordeaux : une diminution constante de l'expression relative de *VvLAR1* du stade fermeture de grappe jusqu'à la fin du développement de la baie de raisin ; une augmentation de l'expression de *VvLAR2* des stades verts à véraison, puis une diminution de la véraison jusqu'à la fin du cycle. Ces données, en accord avec la seule publication à ce jour décrivant le métabolisme phénolique du pépin de raisin, confirment les résultats obtenus par Bogs et al. (2005). En revanche, contrairement aux profils de *VvLAR1* et *VvLAR2*, **nos résultats n'ont pas permis d'établir un profil d'expression type pour le gène *VvANR***. Pour les cépages rouges, le profil type d'expression montre une diminution de l'expression jusqu'à véraison suivie d'une phase de plateau jusqu'à la fin du cycle. Pour le Sauvignon blanc, le niveau d'expression augmente jusqu'à véraison puis chute sans stabilisation jusqu'à la fin du cycle. Ces résultats ne concordent pas avec ceux observés par Bogs et al., qui avait décrit sur des pépins de Shiraz, une faible diminution de l'expression du gène des stades verts jusqu'à deux semaines avant véraison, suivie d'une légère augmentation à véraison, puis d'une diminution drastique pour atteindre une expression nulle deux semaines après la véraison (Bogs et al. 2005). Cette forme de profil a également été notée dans les pellicules par Gagné et al. en 2009. Néanmoins, le profil établi d'expression obtenu pour les pépins de Sauvignon blanc corrèle avec les résultats obtenus par Genebra et al., (2014) sur des pépins issus du cépage Tempranillo. En effet, ils avaient noté une augmentation du niveau d'expression de *VvANR* à véraison suivie d'une chute de l'expression jusqu'à la récolte.

Nos travaux ont établi un profil type d'expression des gènes VvLAR1 et VvLAR2 au cours du développement de pépin, conservé entre cépages, millésimes et parcelles. En revanche, aucun profil d'expression n'a pu être mis en évidence pour le gène VvANR.

La seconde étape de ce travail a été d'identifier les potentiels mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des flavanols en lien avec le profil d'expression des gènes clés, leurs niveaux d'expression et la teneur en tanins des pépins de raisin.

En ce qui concerne la voie de biosynthèse de la catéchine, nos résultats ont permis de montrer que **l'expression du gène *VvLAR2* était plus forte que celle de *VvLAR1***, confirmant les données de Bogs et al. (2005) et Génebra et al. (2014) dans le pépin; mais infirmant celles de Lacampagne (2010) sur pellicules et celles de Gagné (2009) sur baie entière. Ces résultats laissent donc supposer qu'il y aurait une régulation des voies de biosynthèse différente entre pépin et péricarpe. Par ailleurs, nos travaux ont également démontré la concordance entre les profils d'évolution de la catéchine et de l'expression du gène *VvLAR2* au cours du développement du pépin. Cette observation suggère **que la biosynthèse de catéchine dans le pépin serait préférentiellement régulée par le gène *VvLAR2* à partir du stade fermeture de grappe**, confirmant les résultats de Bogs et al., (2005) et Genebra et al., (2014). Ainsi, après le stade fermeture de grappe, le gène *VvLAR2* serait prédominant sur le gène *VvLAR1*, laissant supposer qu'à de ce stade, la protéine LAR2 serait préférentiellement utilisée pour la

biosynthèse de catéchine. Notre travail ne permettant pas de valider cette hypothèse dans les stades très précoces du pépin de raisin, des questions restent en suspens. En effet, les travaux de Gagné (2007) sur la pellicule de raisin avaient permis de mettre en évidence un pic d'expression du gène *VvLAR1* au début du développement de la baie, et un pic d'expression du gène *VvLAR2* à véraison, laissant suggérer l'importance de ces deux isoformes. C'est pourquoi il est envisageable que le gène *VvLAR1* soit exprimé dans les stades de développement du pépin les plus précoces. De plus, afin d'évaluer l'importance de la régulation génétique dans les teneurs finales en catéchine, il aurait fallu réaliser des mesures d'activités enzymatiques LAR1 et LAR2. En effet, les niveaux d'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* étant plutôt conservés entre millésimes, et les teneurs en catéchine variant sous l'effet de la contrainte hydrique, il semble que l'activité enzymatique joue un rôle notable dans la synthèse de catéchine. Selon Gagné et al. (2007), un traitement des baies à l'ABA provoque une augmentation de 900% de l'activité de la LAR. Ainsi, dans le cas des millésimes 2015 et 2016 où la contrainte hydrique a été la plus marquée et les teneurs en ABA possiblement augmentées, les plus fortes teneurs en catéchine observées dans les pépins de ces millésimes ne seraient pas dues à une stimulation de l'expression des gènes, mais à une stimulation de l'activité enzymatique.

Ainsi, après le stade fermeture de grappe, la synthèse de la catéchine dans le pépin serait préférentiellement liée au gène VvLAR2 dont le profil d'expression est conservé entre cépages, millésimes et parcelles. Cependant, en raison d'une régulation de l'activité LAR par les conditions environnementales, les variations de teneurs en catéchine des pépins ne peuvent être seulement attribuées aux variations d'expression de ce gène.

Concernant la voie de biosynthèse de l'épicatéchine**, nous n'avons pas pu établir de profil conservé d'expression du gène *VvANR***. Néanmoins, malgré les différences d'expression variétales observées, nos résultats montrent un lien entre le profil des teneurs en épicatéchine et le profil d'expression du gène *VvANR.* Nos résultats du millésime 2018, montrent un pic d'expression du gène *VvANR* légèrement postérieur au pic d'accumulation de la épicatéchine (57 JAA pour le maximum de teneur et 65 JAA pour le maximum d'expression), laissant supposer que les teneurs finales en épicatéchine puissent être modulées par d'autres facteurs de régulation tel que les facteurs de transcription *VvMYB5a* et *VvMYBPA1* (Gagné et al., 2009).

Ainsi, à partir du stade fermeture de grappe, la synthèse de l'épicatéchine est globalement liée à l'expression de VvANR, dont le profil d'expression apparaît conservé entre cépages et millésimes. Cependant, comme pour la synthèse de catéchine, il semblerait qu'il existe d'autres acteurs du métabolisme pouvant intervenir sur la régulation de la teneur en épicatéchine tels que les facteurs de transcription MYB.

Comme pour les teneurs, le troisième point abordé dans ce travail a porté sur l'évaluation de l'effet cépage et millésime sur les profils d'expression des gènes *VvLAR1, VvLAR2 et VvANR*.

En ce qui concerne l'effet millésime, quels que soient les gènes étudiés, aucun effet millésime n'a pu être clairement mis en évidence. Ces résultats peuvent paraitre étonnants, car divers auteurs (Génebra et al., 2014, Lacampagne et al., 2010) observent des modifications d'expression de gènes dans le cas de stress hydriques ou d'application d'ABA. De ce fait, nous supposons que lors de notre étude, les différentes contraintes hydriques observées n'ont pas permis de mettre en place un stress hydrique assez important pour moduler le niveau d'expression des gènes clés de la voie de biosynthèse des flavanols. En dépit de ce constat, nous avons tout de même observé des variations de teneurs en tanins entre chaque millésime, soulevant la question de l'impact des conditions environnementales sur l'activité enzymatique LAR et ANR. En ce qui concerne l'effet cépage, un seul effet a été mis en évidence pour *VvLAR2*, mais dans le cadre de ce travail aucune hypothèse ne peut être émise.

Enfin le dernier point présenté dans ce chapitre a été la caractérisation de la localisation cellulaire des tanins et des enzymes LAR1, LAR2 et ANR au cours du développement de pépin.

Notre travail a permis de localiser les trois enzymes clés (LAR1, LAR2 et ANR) de la voie de biosynthèse des flavanols dans le pépin de raisin au cours de son développement. Cette approche a permis de mettre en évidence des spécificités de localisation cellulaire propres à chaque enzyme, ainsi qu'une évolution de cette localisation au cours du développement de pépin. D'autre part, ces observations microscopiques ont également permis d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes de transport des flavanols dans le pépin de raisin. Au vu de la localisation cellulaire des enzymes, **trois principales hypothèses peuvent être émises sur la localisation de la voie de biosynthèse des tanins de pépins : une biosynthèse *in situ* dans chaque compartiment cellulaire, une biosynthèse privilégiée dans les plastes suivie d'un transport cellulaire, ou bien une synthèse *in situ* couplée à une biosynthèse dans les plastes suivie d'un transport cellulaire.**

Hypothèse 1 : Biosynthèse *in situ*

Au stade fermeture de grappe, nous avons retrouvé les enzymes LAR et ANR dans quasiment tous les compartiments cellulaires (paroi cellulaire, plastes, cytoplasme, noyau), ce qui rend l'hypothèse d'une biosynthèse *in situ* des tanins complètement envisageable. Pour autant, nous n'avons pas retrouvé d'enzyme ANR au sein de la paroi cellulaire, ce qui, dans le cas d'une synthèse purement *in situ* des tanins, signifierait que les tanins pariétaux de pépins de raisin soient exclusivement composés de catéchine. Or, d'après les travaux de Geny et al., les tanins pariétaux de pépins de raisin contiennent de la catéchine et de la épicatéchine (Geny et al., 2003), posant ainsi la question du transport cellulaire des tanins de pépin. Par ailleurs, le fait d'observer une évolution des structures taniques au cours du développement de pépin (disparition des plastes, apparition de vésicules peu denses contenant des petits amas denses de tanins), concorde avec l'hypothèse d'un transport cellulaire des tanins de pépins.

Hypothèse 2 : Biosynthèse privilégiée dans les plastes, suivie d'un transport cellulaire

Nos observations ont permis de montrer la présence importante des enzymes dans les plastes, en accord avec les données de la littérature (Brillouet, 2014, 2015; Brillouet et al., 2013). En effet, selon cet auteur, les flavanols libres seraient polymérisés au niveau des thylakoïdes des chloroplastes, conduisant à la formation de petits amas très denses de tanins, qu'il nomme tannosomes. Au fur et à mesure du développement du pépin, les plastes, sous l'effet de l'accumulation de ces petits amas denses, se déformeraient et expulseraient ces amas dans le cytoplasme de la cellule, entraînant la dégradation des plastes. Ces petits amas denses de tanins (ou tannosomes) seraient ensuite transportés à l'aide d'une vésicule vers la vacuole de la cellule (**Figure 68**) (Brillouet, 2014, 2015; Brillouet et al., 2013).

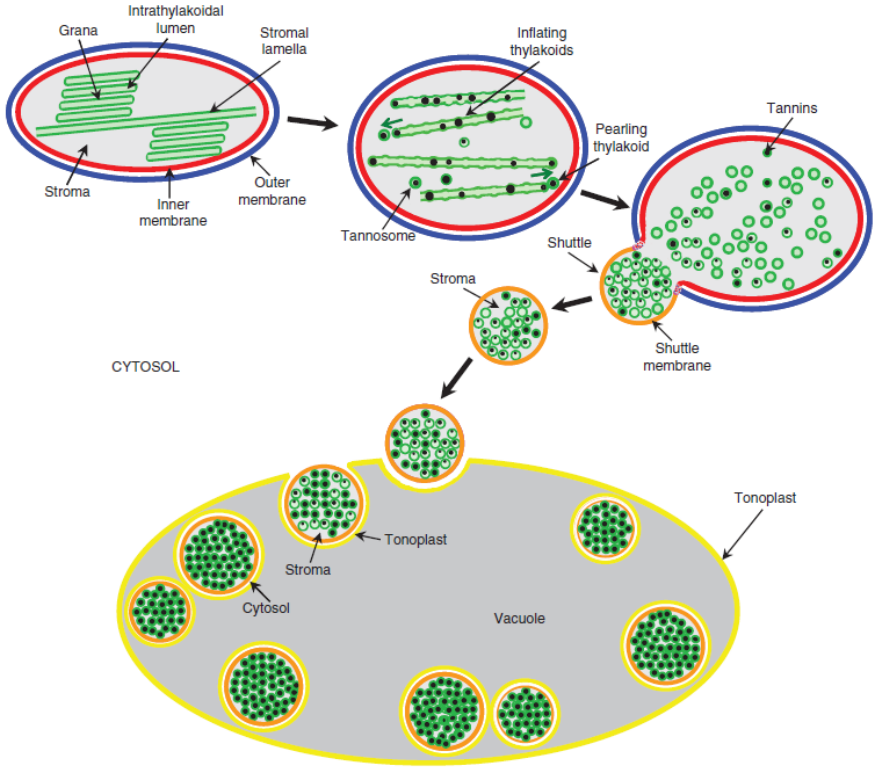


Figure 68 : Le transport cellulaire des tanins selon Brillouet et al., 2014

Dans notre cas, nous n'observons pas de petites vésicules contenant de petits amas denses de tanins expulsés par les plastes. En revanche, nous observons des bourgeonnements de plastes, pouvant être associés à des vésicules contenant des tanins sous forme de structures taniques peu denses. Ces bourgeonnements pourraient avoir deux « avenirs » différents puisque, nous avons observé un éclatement de ce bourgeonnement (**Image 5**), mais également des vésicules peu denses dans le cytoplasme de la cellule pouvant potentiellement être des vésicules golgiennes, ou bien des bourgeonnements de plastes (**Images 22 et 24**). Ainsi, les tanins seraient synthétisés dans les plastes, entraînant une déformation des plastes, conduisant à un bourgeonnement renfermant les tanins. Ce

bourgeonnement pourrait alors soit éclater, libérant son contenu tanique dans le cytoplasme de la cellule, soit se détacher du plaste pour transporter le contenu tanique vers d'autres structures cellulaires.

Hypothèse 2.1 : Éclatement du plaste

Après éclatement du bourgeonnement du plaste, le contenu tanique (dense ou peu dense) ainsi que le matériel enzymatique sont alors libérés dans le cytoplasme expliquant la présence de tanins peu denses, des amas taniques denses et des enzymes dans cette zone cellulaire (**Images 5, 29**). En revanche, si l'on ne considère que cette hypothèse, alors comment expliquer la présence des tanins et d'enzymes dans la paroi et dans les vacuoles ? En effet, le passage de ces molécules à travers les structures phospholipidiques de la membrane plasmique ou du tonoplaste *via* un transport passif semble peu envisageable. Ainsi, l'hypothèse de « transporteurs actifs » intégrés dans ces structures membranaires semble être plus vraisemblable. Toutefois, à notre connaissance, seule l'existence de transporteurs de flavonoïdes au sein de ces structures membranaires a été rapportée dans la littérature, la présence de transporteur de tanins condensés n'a jamais été démontrée. Néanmoins, il pourrait être intéressant de les considérer et de les envisager. Le premier type de transporteur concerne un transport actif primaire, piloté par les protéines ABC, souvent impliquées dans l'accumulation de flavonoïdes et d'aglycones xénobiotiques glycosylés *via* une activité non covalente. Ce type de transporteurs permet aux pigments d'être stockés en tant qu'inclusions anthocyaniques vacuolaires (Frangne et al., 2002; Goodman et al., 2004; Klein et al., 1996). La seconde modalité proposée utilise un transport actif secondaire dû à un «antiporteur», permettant l'absorption vacuolaire de fragments conjugués à des flavonoïdes (liés à des sucres ou à des résidus acyles) (Klein et al., 1996). Le troisième type de transport utilise un homologue de protéine membranaire à la bilitranslocase de mammifère (BTL), capable d'effectuer un transport secondaire des produits de dégradation de l'hème (bilirubine) et des anthocyanes, notamment les aglycones, les mono- et di-lipides (Braidot et al., 2008). Même si rien n'a été démontré pour les cellules du pépin, le transport actif des métabolites secondaires dans les cellules de l'exocarpe et du mésocarpe du raisin après véraison permet le transport d'un large éventail de molécules (terpènes, benzénoïdes et phénylpropanoïdes). Ce transport est souvent réalisé avec une faible spécificité, et est assuré par une multiplicité de mécanismes encore mal compris. C'est pourquoi il est important d'étudier en détail ce sujet, car les flavonoïdes et les tanins pourraient représenter un cas paradigmatique, utile pour mieux comprendre l'ensemble de ces phénomènes.

Hypothèse 2.2 : Éclatement du plaste et libération de vésicules issues du plaste contenant les tanins et les enzymes (cellules « raquette »)

Dans ce cas, certains bourgeonnements éclatent et libèrent leurs contenus (tanins et enzymes) dans le cytoplasme, et d'autres, sont séparés du plaste sans déchirure pour se retrouver dans des structures vacuolaires libres au sein du cytoplasme. Ces bourgeonnements (aussi appelés dans le paragraphe

précédent vésicules/vacuoles) peuvent fusionner ensemble pour former des vacuoles de taille variable (**Images 9, 22, 23 et 24**). Ils peuvent aussi fusionner avec le tonoplaste (**Image 6**), laissant supposer l'existence soit d'un phénomène d'exocytose des tanins vacuolaires vers le cytoplasme, soit un phénomène d'endocytose des tanins cytoplasmiques vers la vacuole. Dans tous les cas, ce phénomène nous pousse à envisager l'exocytose de tanins vacuolaires/cytoplasmiques vers la paroi cellulaire, ce qui expliquerait la présence de l'épicatéchine au sein de la paroi, malgré l'absence de l'enzyme ANR.

Au-delà de ces hypothèses, il reste quelques points à éclaircir concernant les amas de tanins condensés que l'on retrouve dans les plastes, dans le cytoplasme et dans les vésicules/vacuoles. Selon Brillouet et al., (2014), les tanins synthétisés dans les plastes seraient la forme privilégiée de transport, or dans notre cas il est impossible d'identifier clairement si ces zones globuleuses foncées correspondent vraiment à des amas de tanins fortement agglomérés et/ou polymérisés ou à des structures vésiculaires contenant des tanins. Se pose alors la question de leur mobilité et de leur rôle. Sont-ils exocytés ou endocytés dans la vacuole ? Peuvent-ils être considérés comme des zones de réserve, de stockage ou de détoxification ? Résultent-ils de phénomènes de polymérisation à partir des tanins granuleux peu denses du cytoplasme ou de la vacuole ? Peu de bibliographie porte sur ces mécanismes. On connait néanmoins chez *A. thaliana* des mécanismes de transport spécifiques impliqués dans l'activité d'extrusion de médicaments multiples et toxique (MATE) (Debeaujon et al., 2001) laissant penser qu'ils pourraient donc traverser les structures membranaires comme cela a été démontré pour les anthocyanes acylées de la vigne (Gomez et al., 2009).

D'autre part, l'existence d'accumulation de tanins dans le réticulum endoplasmique lisse, les vésicules, et les vacuoles a été démontrée dans des cellules de *Pinus elliotti* obtenues par cultures de tissus. La présence de telles structures serait en lien avec une dégénérescence du cytoplasme et des organelles dans la cellule, laissant penser que la présence de telles structures pourrait être liée à des mécanismes de vieillissement cellulaire (Baur et al., 1974). Pour autant, d'après les travaux de Fougère-Rifot et al., il ne semble pas que ces différents aspects correspondent à des états de vieillissement cellulaires, car les tanins peuvent se présenter sous des configurations différentes dans deux vacuoles voisines d'une seule et même cellule (Fougère-Rifot et al., 1993). Néanmoins, il est concevable d'envisager une évolution des tanins vacuolaires qui passeraient par des formes plus ou moins dispersées, ou à l'inverse plus ou moins associées, et ce, potentiellement en lien avec leur degré de polymérisation.

Hypothèse 3 : Biosynthèse *in situ* dans chaque compartiment cellulaire avec un transport cellulaire

Cette troisième hypothèse correspond à un compromis entre les deux hypothèses précédentes en mixant l'ensemble des phénomènes. Mais malheureusement, notre travail n'a pas été suffisant, car (1) il ne s'est appuyé que sur des observations au niveau de l'épiderme externe et du parenchyme du

tégument externe soulevant la question de la synthèse et de la localisation cellulaire des tanins dans les tissus les plus internes du pépin de raisin et (2) nous n'avons pu étudier que deux stades de développement, ce qui ne permet pas de confirmer ou infirmer nos hypothèses. Il faudrait donc poursuivre ce travail en étudiant l'ensemble des assises cellulaires et ceci à plusieurs stades au cours du développement.

IV. Conclusion générale

Pour résumer, au cours de ce chapitre, nos résultats ont permis de mettre en évidence :

- **Un profil d'expression relative des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* conservé entre cépages, millésimes et parcelles, ainsi que la prédominance du transcrit *VvLAR2* sur le transcrit *VvLAR1* à partir du stade fermeture de grappe.**
- **L'existence d'un potentiel effet variétal, millésime ou parcelle sur le profil d'expression du gène *VvANR*.**
- **L'importance des conditions environnementales, en lien avec le métabolisme hormonal (ABA), sur la teneur en flavanols des pépins de raisin.**
- **Le rôle clé des plastes dans la synthèse des tanins de pépins.**
- **Pour les tanins pariétaux : une synthèse *in situ* couplée à un transport des tanins synthétisés dans la cellule mettant en évidence un transport vésiculaire des tanins.**
- **Pour les tanins intracellulaires : une synthèse à la fois dans le cytoplasme, dans les plastes et potentiellement au niveau du complexe RE-noyau, couplée à un transport de tanins grâce à différents types de vésicules.**

Ainsi, la synthèse des tanins semble être confirmée au niveau des parois et du cytoplasme en lien avec leur localisation cellulaire. En fonction de leur lieu d'accumulation et du stade de développement, les tanins présentent des formes plus ou moins denses laissant penser qu'ils pourraient avoir des degrés de polymérisation variables. Ainsi en fonction de leur « taille » et de la structure cellulaire qui les contient, leur pouvoir d'extractibilité au cours de la vinification est peut-être variable, nécessitant alors de mener un travail d'évaluation de l'extractibilité des tanins de pépins dans le vin en fonction de leur niveau de maturité.

CHAPITRE V : ÉTUDE DE L'EXTRACTIBILITÉ DES TANINS DE PÉPINS DE RAISIN EN FONCTION DE LA DATE DE RÉCOLTE

L'extraction des composés phénoliques de la baie de raisin dans le vin diffère selon le tissu d'origine de ces derniers (Bindon et al., 2014). Il est communément admis que les tanins pelliculaires sont plus facilement extraits dans le vin que les tanins de pépins. En effet, l'éclatement des parois cellulaires pendant le pressurage facilite la libération du contenu vacuolaire des cellules de la pellicule, entraînant une libération quasiment spontanée des tanins pelliculaires (Bindon et al., 2014; Cerpa-Calderón et al., 2008; Kennedy, 2008). Néanmoins, au vu des travaux de Lacampagne (2010) qui montrent la présence de flavanols et de tanins condensés dans les parois cellulaires des cellules de pellicules, ce raisonnement de libération spontanée des tanins pelliculaires dans le vin devrait être plus nuancé. En ce qui concerne les pépins, il est communément admis que l'extraction des tanins de pépins dans le vin requiert plus de temps que celle des tanins pelliculaires, mais peu de travaux scientifiques le démontrent réellement et plusieurs hypothèses ont été émises. Pour certains, l'extraction des tanins de pépins serait en lien avec l'apparition de l'éthanol au cours de la fermentation, pour d'autres les tanins de pépins ne pourraient être extraits qu'après réhydratation de ces derniers, enfin pour une troisième catégorie de scientifiques, les différences d'extractibilité seraient dues au degré de maturité du pépin : un pépin vert extrairait plus facilement ses tanins dans la matrice qu'un pépin surmûri (Bindon et al., 2014; Canals et al., 2005; Casassa et al., 2013; Hernandez-Jimenez et al., 2012). Ainsi, cette problématique de l'extraction des tanins de pépins dans le vin apparaît sujette à de nombreuses controverses.

Par ailleurs, nous avons vu dans les chapitres précédents qu'en fonction du stade de développement du pépin, les tanins se présentaient sous des formes plus ou moins denses et étaient localisés dans différents compartiments tissulaires et cellulaires, posant la question de l'impact de leur densité cellulaire et de leur localisation cellulaire et tissulaire sur leur extractibilité. Il est donc nécessaire de regarder d'un œil nouveau cette problématique de l'extractibilité des tanins de pépins afin de mieux définir la part du pépin dans la composante tanique des vins ; car il semble difficile, au vu de nos travaux, de penser que le simple dosage des tanins d'un lot de pépin puisse refléter de manière fiable les teneurs en tanins issus de ces pépins dans un vin. De plus, nos travaux ont montré que les tanins de pépins étaient localisés dans des couches plus ou moins profondes des téguments de pépins, laissant penser que (i) leur capacité de diffusion pouvait être plus ou moins facilité selon le tissu de localisation et (ii) que leur vitesse de diffusion pouvait donc varier selon ces couches. Il est donc important, en plus de la capacité d'extractibilité, d'évaluer la cinétique d'extractibilité des tanins au cours de la vinification en fonction des différentes phases de la vinification.

L'objectif de ce chapitre est donc de caractériser le potentiel et la cinétique d'extractibilité des tanins de pépins dans le vin en fonction de leur stade de développement afin d'apporter des informations concrètes aux vinificateurs quant aux mécanismes d'extractibilité des tanins de pépins mis en jeu lors des vinifications en fonction de la date de vendanges.

Afin de répondre à cette problématique, une approche originale de nano-vinification a été conduite à partir des baies de Merlot du millésime 2018 récoltées à trois dates différentes, pouvant représenter, comme le décrivent les vinificateurs, trois « niveaux de maturité des pépins ». Pour chaque date de récolte, trois types de vins ont été produits : un vin dit de pépins produit à partir de jus et de pépins uniquement, un vin dit de pellicules produit avec le jus et les pellicules uniquement et un vin témoin produit avec l'ensemble des compartiments de la baie (Chapitre II, paragraphe V.1.). Ainsi pour ces trois types de vins, la composante tanique dans les vins mais aussi dans les pépins du vin de pépins a été évaluée à quatre étapes de la vinification : deux étapes pendant la fermentation alcoolique (Mi FA lorsque la densité était de d=1,030 et Fin FA à d=0,990), et deux étapes au cours de la macération post-fermentaire (Mi-Macé, 7 jours après la fin de la fermentation alcoolique et Fin-Macé, 15 jours après la fin de fermentation alcoolique) (**Figure 39**).

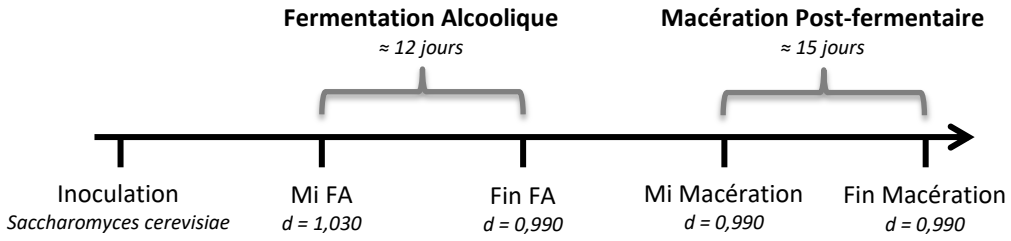


Figure 39 : Méthode d'échantillonnage mise en place au cours des nanovinifications

I. Caractérisation des baies

I.1. Niveau de maturité

Au cours de ce travail, trois dates de vendanges ont été choisies pour encadrer la date de récolte du vinificateur : une modalité appelée « sous-maturité » (récoltée le 12 septembre soit 13 jours avant la date des vendanges), une modalité « maturité » (récoltée le 25 septembre, le jour de la vendange par le château) et une modalité « sur-maturité » (récoltée le 3 octobre, soit 8 jours après la récolte du château). Le moût de 300 baies issues de chacun de ces lots a été analysé par WineScan (Foss, Hilleroed, Danemark), et les caractéristiques biochimiques de chaque lot sont répertoriées dans le **Tableau 23**.

Tableau 23 : Caractéristiques biochimiques des baies de Merlot 2018 vendangées à 3 dates différentes

	Dates des vendange		
Paramètres physiologiques	Sous-maturité 12/09	Maturité 25/09	Sur-maturité 03/09
Poids moyen des baies (g)	2,20	1,76	1,53
Poids moyen des pépins frais (mg)	42,4	35,6	43,1
Poids moyen des pellicules fraîches (g)	0,29	0,23	0,40
Nombre moyen de pépins par baie	1,8	1,65	1,85
Volume de jus pour 100 baies (ml)	112	80	71
°Brix	18,3	19,2	20,1
Concentration en sucres (g/L)	199,9	209,2	220,1
Potentiel d'alcool	11,9	12,4	13,1
pH	3,3	3,4	3,5
Acidité totale (g/L H_2SO_4)	3,9	3,1	2,9
Acide malique	2,06	1,75	1,70

Les analyses montrent une diminution du poids des baies au cours de la maturité, en lien avec la perte d'eau du fruit causé par des phénomènes de transpiration, de reflux d'eau de la baie vers la plante (*back flow*), ou encore par une interruption ou une limitation des flux phloémiens (Carbonneau et al., 2015). Cette perte de poids moyen des baies entre les différents niveaux de maturité explique également la diminution du volume de jus obtenu à partir de 100 baies fraîches au cours de la maturation et l'enrichissement en sucres entraînant *de facto* une augmentation du potentiel alcoolique. Cette augmentation de la teneur en sucres étant en partie due à la dégradation de l'acide malique, nous observons une chute de ces teneurs, une baisse de l'acidité totale au cours de la maturation et une augmentation du pH.

I.2. Teneurs en tanins des pépins frais

Au cours de cette partie le terme pépin « frais » sera employé pour nommer les pépins avant vinification, par opposition aux pépins prélevés au cours des différentes étapes de la vinification.

Avant de déterminer le potentiel d'extractibilité des tanins de pépins en fonction de la date de récolte, la caractérisation des tanins de pépins frais a été réalisée (**Tableau 24**).

Nos résultats montrent que les teneurs en flavanols diffèrent légèrement selon les trois dates considérées et sont maximales au moment de la date de vendange choisie par le viticulteur (maturité). En revanche en ce qui concerne les teneurs en tanins condensés (qui sont majoritaires), il n'y a aucune différence significative entre les trois dates de prélèvement. Ainsi, en raison des proportions de chaque catégorie, nous pouvons conclure que les teneurs en tanins de pépins ne sont pas significativement différentes entre les trois dates de récolte, confirmant les résultats obtenus Chapitre III. Si l'on considère maintenant les différentes sous unités, aucune différence significative de teneurs n'est observée entre les dates de prélèvement. Par ailleurs, l'épicatéchine est l'unité d'extension et l'unité

terminale privilégiée (comme nous l'avions déjà démontré Chapitre III). Enfin, nous observons une augmentation du DPm pour la date de récolte la plus tardive sans modification du % de galloylation, encore une fois, à l'image de ce que nous avions noté précédemment.

Tableau 24 : Teneurs en flavanols et proanthocyanidines, exprimées en mg/g de pépins frais, des pépins de Merlot 2018 aux 3 dates de prélèvement.

a, b et c pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre moyennes de teneurs (ANOVA,Test de Tukey, $p < 0,05$)

		Sous-maturité	Maturité	Sur-maturité
		Fraction monomérique		
	Teneur en monomères totaux	2,37 ± 0,017 a	2,68 ± 0,070 b	1,96 ± 0,098 c
	C	0,36 ± 0,006 a	0,37 ± 0,010 a	0,30 ± 0,009 b
	EC	1,48 ± 0,017 a	1,70 ± 0,044 b	1,25 ± 0,074 c
	ECG	0,54 ± 0,007 a	0,61 ± 0,026 b	0,42 ± 0,018 c
		Fraction polymérique		
	Teneurs en PAs	56,77 ± 1,999 a	60,11 ± 1,478 a	57,55 ± 1,405 a
	DPm	5,7 ± 0,07 a	5,6 ± 0,07 a	6,3 ± 0,10 b
	%G	36,0 ± 0,37 a	36,3 ± 0,31 a	35,3 ± 0,52 a
Sous-unités d'extension (%)	C	7,3 ± 0,1 a	5,9 ± 0,1 b	6,9 ± 0,1 c
	EC	58,8 ± 0,4 a	59,8 ± 0,4 a	59,2 ± 0,5 a
	ECG	33,9 ±0,4 a	34,3 ± 0,5 a	33,8 ± 0,6 a
Sous-unités terminales (%)	C	3,8 ± 0,1 a	3,9 ± 0,4 a	4,3 ± 0,3 a
	EC	50,8 ± 1,1 a	50,9 ± 0,1 a	53,2 ± 0,3 b
	ECG	45,3 ± 1,2 a	45,2 ± 0,4 a	42,6 ± 0,1 b

Ainsi, en dépit de baies de niveaux de maturité différents et d'une qualification par le vinificateur de maturité des pépins différente, aucune différence de structure et de teneurs en tanins de pépins n'est observée, soulevant donc plusieurs questions :

- ***Que signifie la notion de « maturité des pépins » pour le vinificateur ?***
- ***Est-ce que la teneur finale en tanins du vin est liée à la teneur intrinsèque des tanins dans les pépins ?***
- ***Est-ce que les pépins présentent des capacités d'extractibilité des tanins variables en fonction de la date de récolte ?***

Pour répondre à ces questions, il est donc important de mettre en place des expérimentations permettant d'évaluer conjointement « l'apparition » des teneurs en tanins dans le vin au cours de la vinification et la « vidange » des tanins des compartiments de la baie et en particulier dans les pépins.

II. « Apparition » des tanins dans le vin au cours des étapes de la vinification

II.1. Influence du compartiment de la baie

Les cinétiques d'apparition des tanins dans les vins de pellicules, de pépins et témoins sont représentées **Figure 69**. Au cours de cette partie, nous avons caractérisé les profils d'apparition des tanins dans les vins selon le compartiment de la baie utilisée pour la vinification (pépins, pellicules, baies entières) mais également les différences de teneurs finales en tanins des vins en fonction du type de compartiment utilisé (vin pépins, vin pellicules et vin témoin).

Le profil d'apparition des tanins dans le vin diffère en fonction du compartiment utilisé pour les vinifications. En effet, dans le vin de pépins, nous observons une augmentation des teneurs en tanins progressive tout au long de la vinification alors que dans le vin de pellicules les teneurs en tanins mesurées à mi-fermentation sont quasiment similaires à celles observées dans le vin fini. Ces observations montrent, qu'au cours de la vinification, l'apparition des tanins de pépins dans le vin est plus tardive que celle des tanins de pellicules, laissant donc penser que la diffusion des tanins dans le vin nécessite plus de temps pour les pépins que pour les pellicules. Ces observations concordent avec la plupart des données bibliographiques, même si les raisons de cette apparition progressive sont mal établies (apparition de l'éthanol, temps de réhydratation du pépin, désorganisation des couches cellulaires…) (Amrani Joutei et Glories, 1994; Miller et al., 2019; Sparrow et al., 2015; Sun et al., 1999). En ce qui concerne les pellicules, nous observations sont en accord avec celles de la littérature qui montrent que la « vidange » des tanins pelliculaires dans la matrice jus est rapide, en raison de leur localisation vacuolaire et de l'aptitude des cellules de la pellicule à se rompre sous l'effet du pressurage (Busse-Valverde et al., 2012; Miller et al., 2019). Enfin, pour la modalité témoin, nous observons un profil d'apparition des tanins dans le vin comparable à celui de la modalité pépins, ce qui apparaît logique au vu des proportions de tanins de chaque compartiment dosé ; sous-entendant l'importance de la contribution des tanins de pépins à la composante tanique du vin. Néanmoins, nous aurions pu penser que la teneur finale en tanins du vin témoin correspondrait à la somme des teneurs retrouvées dans le vin de pépins + le vin de pellicules, or ce n'est pas le cas. Cette observation, nous amène dans un premier temps à considérer l'importance de la surface de contact de la partie solide avec le jus pour la diffusion des composés ainsi que l'importance de la constitution de la matrice vin. En effet, comment expliquer que dans une vinification contenant une quantité plus importante de matériel végétal (pepins+pellicules), nous retrouvions des teneurs en tanins légèrement plus faibles que dans une vinification contenant moins de quantité de matière ?

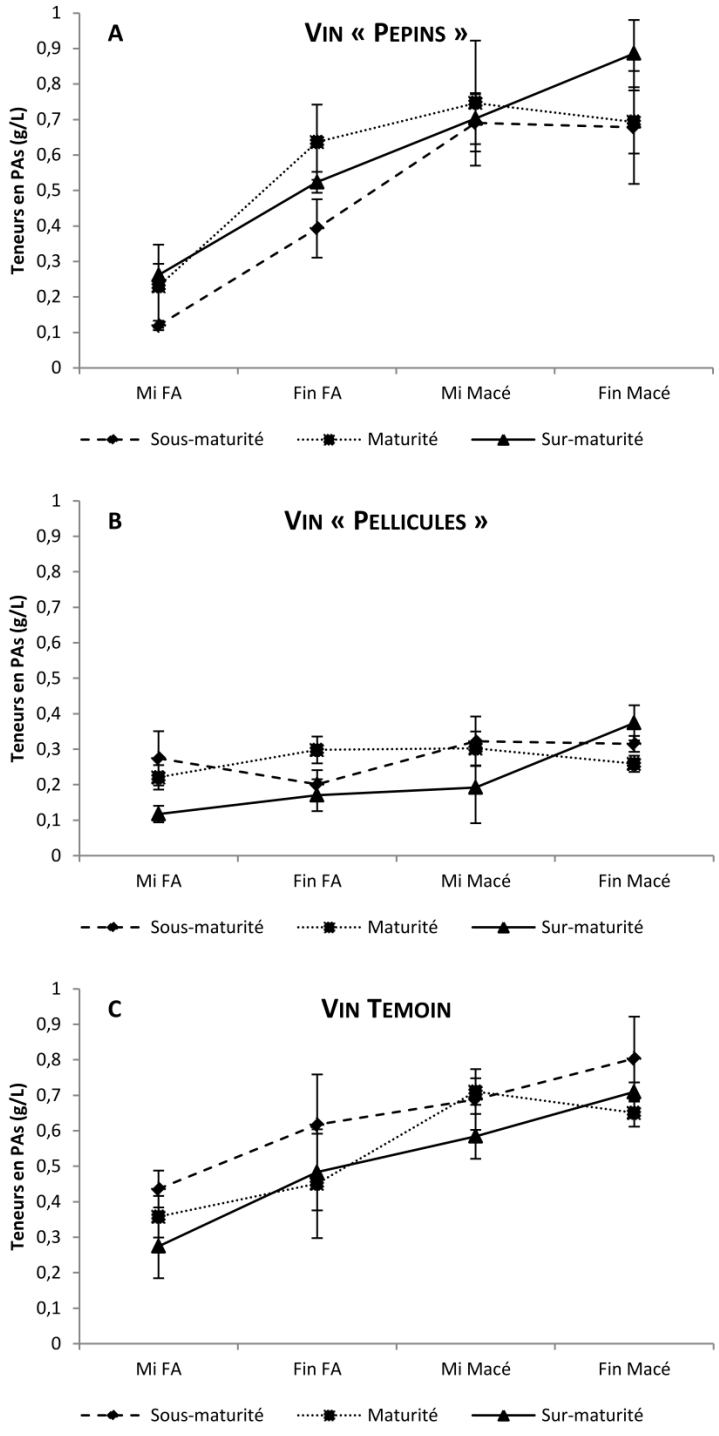


Figure 69 : Cinétiques d'apparition des tanins dans la matrice vin, exprimée en g/L, en fonction des compartiments de la baie utilisés pour la vinification : pépins (A), pellicules (B), et baies entières (C), et pour 3 dates de vendanges (sous-maturité, maturité, sur-maturité)

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. La première est liée à la surface de contact du pépin avec le jus : le pépin étant directement en contact avec le jus dans la modalité vin de pépins, serait plus apte à libérer son contenu tanique dans le vin (Setford et al., 2017).

Dans le cas de la modalité vin témoin, les pépins sont en partie emprisonnés dans les pellicules et donc beaucoup moins en contact avec le jus, les pellicules formant alors une sorte de barrière à la diffusion. La deuxième hypothèse est liée à la capacité des tanins à s'associer aux polysaccharides, aux protéines et aux anthocyanes (Bindon et al., 2010a, 2010b; Hanlin et al., 2010; Le Bourvellec et al., 2004; Renard et al., 2017; Sparrow et al., 2015). Dans la modalité témoin, la présence de la pellicule qui se dégrade plus ou moins pendant la vinification entraine la présence de nombreux débris cellulaires (notamment des débris pariétaux) et la libération des anthocyanes qui pourraient piéger les tanins libérés par les pépins (Bindon et al., 2010a, 2010b; Hanlin et al., 2010; Le Bourvellec et al., 2004; Renard et al., 2017; Sparrow et al., 2015). En effet, les tanins s'adsorbant sur la plupart de ces débris, ils se retrouvent piégés dans la partie pelliculaire du marc ou dans les lies en formation et *de facto* ne se retrouvent pas dans le vin au moment de l'analyse. Enfin, un mélange de ces deux hypothèses peut également expliquer nos observations.

Les teneurs finales en tanins des vins présentent également de grandes différences. Indépendamment de la date de vendange, la teneur en tanins finale des vins de pépins (≈ 0,9 g/L) représente plus du double de celle des vins de pellicules (≈ 0,3 g/L), révélant, dans notre cas, la contribution majeure des tanins de pépins dans la composante tanique du vin. Cette observation corrèle avec les travaux de Kennedy et al., qui avait estimé, sur un vin issu de baies de Pinot Noir, qu'environ 60 % des tanins du vin provenaient des pépins (Kennedy, 2008). Par ailleurs, le vin témoin présente une teneur finale en tanins très similaire à celle du vin de pépins (≈ 0,9 g/L). Cette teneur, bien que légèrement plus faible de celle retrouvée dans la littérature pour les vins produits en cuverie classique reste dans les mêmes ordres de grandeur, validant notre mode de vinification en petit volume (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

Nos résultats montrent deux profils distincts d'apparition des tanins dans le vin en fonction du compartiment de provenance des tanins : une apparition progressive des tanins de pépins tout au long de la vinification et une apparition quasi immédiate des tanins pelliculaires dès les premiers jours de fermentation alcoolique. Par ailleurs, ces résultats permettent également de démontrer l'importance de la contribution des pépins aux tanins du vin.

II.2. Influence du niveau de « maturité » des pépins

Au-delà de la contribution de chaque compartiment de la baie dans la composante tanique des vins, un point important à étudier est l'impact de la « maturité des pépins » dans cette composante. En effet, nous avons démontré que les teneurs finales en tanins dans les pépins aux dates proches de la vendange ne variaient pas ; et pour autant, dans la pratique, de nombreux vinificateurs essayent de qualifier un « niveau de maturité des pépins » en fonction de leur composante tanique ou du moins de ce qu'elle pourrait avoir comme impact sur la composante tanique du futur vin. Nous avons donc cherché à évaluer dans cette partie du travail, l'impact de la date de vendange (correspondant aux

différents niveaux de maturité du pépin décrits selon le vinificateur) sur la composante tanique des vins de pépins finis (**Figure 69A**).

Nos résultats montrent que la concentration finale en tanins dans le vin de pépins varie selon la date de récolte : 0,67 ± 0,16 g/L dans le vin produit au stade dit sous-maturité, 0,7 ± 0,09 g/L pour le stade dit maturité et 0,88 ± 0,1 g/L pour le stade dit sur-maturité. Ainsi, il semblerait que le décalage de la récolte jusqu'au stade dit « surmaturité » permet l'obtention de vin plus riche en tanins de pépins. Par ailleurs, si l'on regarde la cinétique d'apparition des tanins dans les vins, nous pouvons observer que la totalité des tanins du vin sont obtenus à partir de la phase de mi-macération pour les modalités sous-maturité et maturité ; alors que dans la modalité sur-maturité l'apparition des tanins dans le vin est quasi-continue jusqu'à la fin de la macération. Les profils d'apparition des tanins de pépins dans le vin semblent donc varier selon le « niveau de maturité » de ces derniers.

Ainsi, pour la première fois, malgré des teneurs en tanins des pépins similaires entre dates de vendanges, nous montrons de manière certaine que les teneurs en tanins de pépins des vins varient en fonction de la date de vendange et que la cinétique d'apparition de ces tanins dans les vins est modifiée.

En ce qui concerne, la cinétique de diffusion des tanins de pépins dans le vin, deux hypothèses peuvent expliquer cette apparition plus lente et plus continue dans le cas de la modalité sur-maturité : soit il existe des différences d'extractibilité réelle (capacité de diffusion) des tanins de pépins en relation avec leur localisation ou leur structure, soit l'apparition des tanins dans le vin est liée à des différences de surface de contact pépins/liquide variable entre les modalités.

En effet, nous avons démontré aux Chapitres III et IV qu'au cours du développement du pépin le DPm réaugmentait en fin de cycle et que les parois des différents tissus du pépin se densifiaient en tanins. Ainsi, même si aucune différence significative en teneurs en tanins n'est observée dans les pépins frais par l'analyse après broyage et extraction, nous pouvons supposer que l'évolution de cette localisation cellulaire et tissulaire, ainsi que l'évolution de la taille et de l'aspect des tanins au cours du développement pourrait impacter de manière significative leur extractibilité dans le vin quand les pépins sont maintenus entiers ; étayant ainsi l'hypothèse d'une différence d'extractibilité des tanins de pépins en fonction du niveau de maturité.

Cependant, une seconde hypothèse est envisageable et concerne le fait que la diffusion des tanins du pépin vers le vin soit directement liée à la surface de contact entre les parties solides et liquides, facilitant plus ou moins les phénomènes de réhydratation des tissus et les échanges moléculaires. En effet, il faut être conscient que lors de nos expérimentations nous avons voulu conserver toujours le même volume de jus entre les modalités (900 ml). Le poids frais des pépins ainsi que le volume de jus pour 100 baies varient entre les trois modalités comme nous l'avons vu précédemment avec une

diminution du poids au cours de la maturation. Ainsi, pour obtenir le même volume de jus, nous avons dû, pour chaque modalité utiliser un nombre de baies variable, modifiant ainsi le nombre de pépins. La quantité de pépins utilisée pour chacune des vinifications était donc différente avec 67 grammes de pépins/ litre de jus pour la modalité dite sous-maturité, 74 grammes de pépins/litre de jus pour la modalité maturité et 112 grammes de pépins/litre de jus pour la modalité sur-maturité (**Tableau 25**).

Tableau 25 : Ratios marc /jus des nanovinifications aux trois dates de récolte

	Date de vendange		
	Sous-maturité 12/09	Maturité 25/09	Sur-maturité 03/09
Quantité réelle de matériel végétal nécessaire à l'obtention d'un volume de jus de 900 ml dans le fermenteur			
Poids des pépins (g)	60	67	101
Poids des pellicules (g)	233	259	507
Poids des baies (g)	293	326	608
Nombre de baies	804	1125	1267
Ratio solide/liquide pour 1L de jus (g/L)			
Ratio pépins/jus (g/L)	67	74	112
Ratio pellicule/jus (g/L)	259	288	563
Ratio baies/jus (g/L)	325	362	675
Quantité totale de tanins évaluée dans les pépins frais			
g PAs/ fermenteur	3,4	4	5,8
g PAs/Litre jus	3,8	4,5	6,4

L'analyse de ces données permet donc de voir qu'il y a une augmentation importante du ratio pépin/jus pouvant modifier les surfaces d'échanges entre la partie solide et liquide et pouvant expliquer les différences de teneurs observées, comme évoqué par Setford et al. (2017). Mais, à l'inverse de ce que l'on pouvait imaginer (augmentation de la surface de contact car le nombre de pépin utilisé augmente), nous observons un effet inverse avec la formation d'une « couche » de pépins superposés sur la partie basale du fermenteur, de plus en plus dense en fonction de la date de vendange, limitant alors le contact entre le jus et le pépin. De ce fait, il semble que le transfert de composés entre un pépin et le jus de raisin diminue : pour un même pépin, la surface de contact avec le jus est plus faible dans la modalité sur-maturité que dans les modalités maturité et sous-maturité (**Figure 70**).

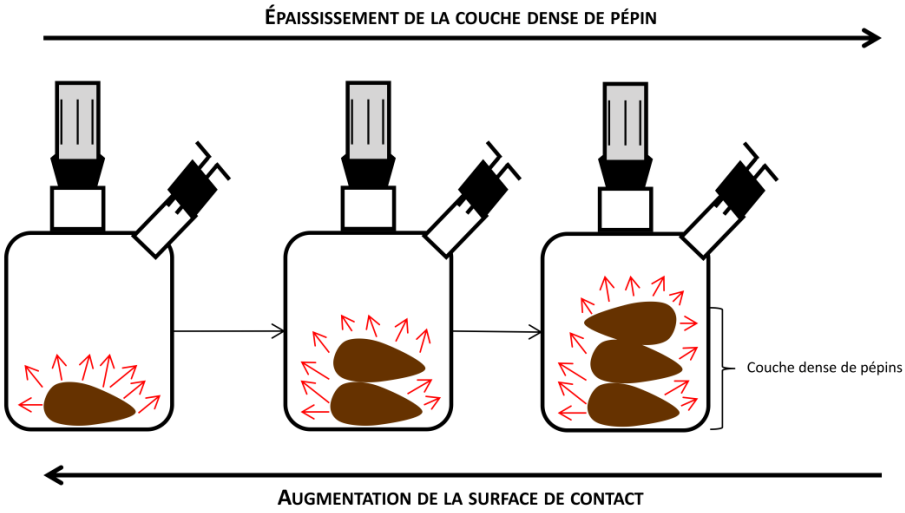


Figure 70 : Représentation schématique de la diminution de la surface de contact par pépin avec le jus en lien avec le ratio pépin/jus

En ce qui concerne, la teneur finale en tanins de pépins dans le vin qui est plus importante dans la modalité dite sur-maturité, deux hypothèses peuvent également être envisagées. La première rejoint celle émise pour expliquer les différences de cinétique. A savoir, au cours du développement du pépin, les tanins sont localisés dans des tissus différents et leur taille varie, pouvant modifier ainsi leur extractibilité. Les pépins se déshydratant et se lignifiant, la texture des tissus faciliterait alors cette diffusion. La seconde hypothèse, est en relation directe avec la quantité totale de tanins dans initialement contenue dans la masse de pépins utilisée dans le fermenteur. En effet, le poids des baies diminuant, pour conserver le volume de jus, nous avons dû utiliser plus de pépins donc au départ une quantité intrinsèque de tanins plus importante (**Tableau 25**), ainsi au-delà des mécanismes de diffusion, des surfaces de contact, la quantité finale peut tout simplement être liée à la quantité initiale.

Afin de valider ou infirmer ces hypothèses, le contenu tanique des pépins a été caractérisé aux quatre stades de vinification pour les trois niveaux de maturité.

II.3. Conclusion

Au cours de cette partie, nos résultats montrent deux profils d'apparition des tanins dans le vin en fonction du compartiment de provenance des tanins :

- **une apparition progressive des tanins de pépins au fur et à mesure du déroulement de la vinification ;**
- **une apparition *quasi* immédiate des tanins pelliculaires dès les premiers jours de fermentation alcoolique.**

Par ailleurs, en dépit d'une teneur en tanins similaires des pépins aux trois niveaux de maturité étudié, nos résultats montrent que les teneurs en tanins de pépins des vins varient

en fonction de la date de vendange et que la cinétique d'apparition de ces tanins dans les vins est modifiée.

III. Évolution de la teneur intrinsèque en tanins des pépins au cours de la vinification

III.1. Résultats

Le **Tableau 27** et le **Tableau 26** présentent les teneurs et les caractéristiques structurales des tanins dans les pépins du vin de pépins à chaque étape de la vinification. Nous discuterons dans un premier temps du profil de l'évolution des teneurs en tanins des pépins au cours de la vinification en fonction de la date de vendange, puis dans un second temps des teneurs en tanins retrouvées dans les pépins en fonction de la date de vendange.

Les dosages de flavanols réalisés dans les pépins au cours des étapes de vinification montrent que, quelle que soit la date de récolte, le profil de « vidange » des tanins de pépins dans le vin est globalement comparable, les teneurs diminuent constamment au cours de la vinification (**Tableau 26**).

Néanmoins, plus la date de récolte est tardive, plus les flavanols ont tendance à être extraits du pépin rapidement. Ainsi à l'étape fin macération, il reste encore 25% des flavanols dans les pépins issus de la date de récolte la plus précoce, contre 13% dans les pépins récoltés à maturité et 8% dans les pépins récoltés à sur-maturité. Si l'on regarde plus en détail le profil d'évolution des différents types de flavanols (**Tableau 26**), nous retrouvons, pour chacun des types de flavanols et indépendamment de la date de vendange, une diminution constante de la teneur au cours de la vinification. Néanmoins, nous pouvons distinguer deux profils distincts : un profil d'évolution spécifique à la catéchine et un profil d'évolution spécifique à l'épicatéchine et à l'épicatéchine gallate (**Tableau 26**). La libération de la catéchine est plus lente que celle des deux autres flavanols. En effet, si l'on prend l'exemple des pépins récoltés à sous-maturité, nous pouvons observer à l'étape mi-fermentation alcoolique que les pépins contiennent encore 88 % de leur teneur en catéchine initiale, alors qu'ils ne contiennent plus que 30 % de leur teneur initiale en épicatéchine et épicatéchine gallate. Ainsi, il semblerait que l'extraction de la catéchine soit plus difficile que l'extraction des deux autres flavanols. Nous avons vu lors du chapitre précédent que la protéine LAR, responsable de la synthèse de catéchine était en partie localisée dans les parois cellulaires, à l'inverse de la protéine ANR, responsable de la synthèse de l'épicatéchine. On pourrait donc imaginer que la catéchine serait moins extractible que l'épicatéchine en raison de sa présence dans les parois cellulaires. Cette hypothèse nous amène à penser que la localisation cellulaire des composés phénoliques du pépin pourrait donc jouer un rôle important dans leur potentiel d'extractibilité.

Tableau 26 : Evolution des teneurs en flavanols et PAs, exprimées en mg/g de pépin, des pépins de Merlot du millésime 2018 au cours de la vinification en fonction de la date de récolte
C : Catéchine ; EC : Epicatéchine ; ECG : Epicatéchine gallate

a, b et c pour chaque ligne indiquent les différences significatives entre moyennes (ANOVA, Test de Tukey, $p < 0,05$)

		Natif	Mi FA	Fin FA	Mi Macé	Fin Macé
		Fraction monomérique				
Sous-maturité	Teneurs en flavanols	2,37 ± 0,017 a	0,92 ± 0,116 b	0,60 ± 0,058 c	0,54 ± 0,060 c	0,39 ± 0,089 d
	C	0,36 ± 0,006 a	0,32 ± 0,054 a	0,21 ± 0,016 b	0,22 ± 0,009 b	0,18 ± 0,024 b
	EC	1,48 ± 0,017 a	0,45 ± 0,035 b	0,29 ± 0,028 c	0,26 ± 0,039 c	0,16 ± 0,056 d
	ECG	0,54 ± 0,007 a	0,16 ± 0,028 b	0,09 ± 0,015 c	0,07 ± 0,012 cd	0,05 ± 0,011 d
Maturité	Teneurs en flavanols	2,68 ± 0,070 a	0,77 ± 0,015 b	0,37 ± 0,111 c	0,26 ± 0,067 c	0,22 ± 0,017 c
	C	0,37 ± 0,010 a	0,24 ± 0,029 b	0,12 ± 0,039 c	0,12 ± 0,033 c	0,12 ± 0,006 c
	EC	1,70 ± 0,044 a	0,41 ± 0,008 b	0,19 ± 0,029 bc	0,11 ± 0,029 c	0,08 ± 0,014 c
	ECG	0,61 ± 0,026 a	0,10 ± 0,004 b	0,05 ± 0,005 bc	0,03 ± 0,005 c	0,02 ± 0,006 c
Sur-maturité	Teneurs en flavanols	1,96 ± 0,098 a	0,59 ± 0,003 b	0,17 ± 0,003 c	0,16 ± 0,018 c	0,15 ± 0,040 c
	C	0,30 ± 0,009 a	0,28 ± 0,001 a	0,11 ± 0,008 b	0,10 ± 0,011 b	0,11 ± 0,016 b
	EC	1,25 ± 0,074 a	0,25 ± 0,001 b	0,05 ± 0,004 c	0,05 ± 0,005 c	0,02 ± 0,021 c
	ECG	0,42 ± 0,018 a	0,07 ± 0,002 b	0,02 ± 0,003 c	0,01 ± 0,002 c	0,01 ± 0,005 c
		Fraction polymérique				
Sous-maturité	Teneurs en PAs	56,77 ± 1,999 a	21,05 ± 0,885 b	15,99 ± 1,032 c	17,47 ± 4,162 bc	14,11 ± 1,477 c
	DPm	5,7 ± 0,07 ab	5,5 ± 0,09 b	6,0 ± 0,23 a	6,6 ± 0,25 c	6,9 ± 0,19 c
	%G	36,0 ± 0,37 ab	37,5 ± 0,64 ac	37,7 ± 0,71 c	35,9 ± 0,87 b	35,7 ± 1,03 b
Maturité	Teneurs en PAs	60,11 ± 1,478 a	15,05 ± 1,542 b	13,61 ± 2,953 bc	11,57 ± 0,899 c	10,92 ± 1,793 c
	DPm	5,6 ± 0,07 a	6,0 ± 0,25 ab	7,0 ± 0,51 b	8,5 ± 1,10 c	8,2 ± 0,15 c
	%G	36,3 ± 0,31 a	32,7 ± 3,22 a	34,3 ± 1,86 a	35,7 ± 1,03 a	35,4 ± 1,21 a
Sur-maturité	Teneurs en PAs	57,55 ± 1,405 a	14,40 ± 1,151 b	6,47 ± 0,606 c	5,64 ± 0,978 c	5,42 ±0,758 c
	DPm	6,3 ± 0,10 a	6,2 ± 0,28 a	8,6 ± 0,36 b	9,6 ± 0,68 c	8,8 ± 0,52 b
	%G	35,3 ± 0,52 a	34,5 ± 1,45 a	33,8 ± 1,40 a	33,3 ± 2,40 a	32,9 ± 3,11 a

En ce qui concerne les teneurs en flavanols libres (**Tableau 26**), à la fin de la macération post-fermentaire, les pépins de la modalité sur-maturité présentent les teneurs en flavanols totaux plus faibles que les pépins des autres modalités. Si l'on regarde le rapport des flavanols extraits au cours de la vinification, on s'aperçoit que les flavanols sont extraits à hauteur 83% dans les pépins dits en sous-maturité, 91% dans les pépins récoltés à maturité et 94% dans les pépins récoltés à sur-maturité.

Ainsi, il semblerait que la catéchine soit le monomère le moins extractible des pépins de raisin quel que soit la date de récolte. En revanche, nos résultats montrent que le niveau de maturité influe à la fois sur le taux et la vitesse d'extraction des flavanols libres : plus le pépin mûrit, plus ses flavanols s'extraient rapidement et facilement réduisant alors les teneurs de tanins non extraits dans les pépins.

Si l'on regarde maintenant le profil d'évolution de la teneur en tanins condensés des pépins au cours de la vinification en fonction de la date de récolte, nous observons les mêmes tendances que celles obtenues avec les flavanols : une diminution des teneurs en tanins condensés des pépins au cours de la vinification et une « vidange » des tanins condensés plus rapide et plus importante au fur et à mesure que l'on avance dans la maturité (**Figure 71**).

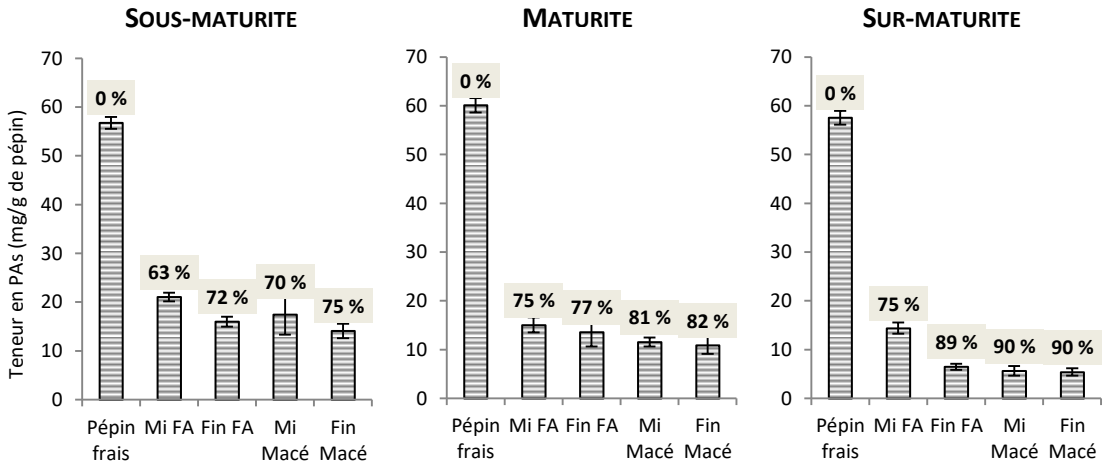


Figure 71 : Evolution de la teneur en tanins condensés des pépins de raisin (exprimée en mg/g de pépin) et pourcentage de « vidange» des tanins de pépins, au cours de la vinification en fonction de la date de vendange

Les pourcentages de« vidange » des tanins de pépins représentent le % de perte de tanins par rapport à la teneur initiale
ex : à la mi FA, les pépins de la modalité sous-maturité ont perdu 63 % de leur tanins initiaux

En ce qui concerne les teneurs en tanins condensés, tout comme pour les flavanols, à la fin de la macération post-fermentaire, les pépins issus de la modalité sur-maturité sont ceux qui présentent la teneur en tanins la plus faible, suivis par les pépins de la modalité maturité puis ceux de la modalité sous-maturité. Ainsi, l'extractibilité des tanins condensés est modifiée par l'état de maturité alors que les teneurs initiales dans les pépins frais sont comparables.

Par ailleurs, la structure des tanins condensés au cours de la vinification évolue peu (**Tableau 26**). Pour un niveau de maturité donné, les pépins issus de chaque étape de vinification présentent des pourcentages de galloylation, des sous-unités d'extension et terminales comparables. En revanche, pour chaque étape de la vinification et indépendamment du niveau de maturité, le DPm des tanins contenus dans les pépins augmente, en accord avec les résultats de Fournand et al., sur les tanins pelliculaires (Fournand et al., 2006). Ainsi, l'importance de la taille des molécules sur le potentiel d'extractibilité des tanins doit être prise en compte pour expliquer les phénomènes d'extractibilité.

Tableau 27 : Caractérisation des sous-unités d'extension et terminales, exprimée en %, des tanins de pépins de Merlot du millésime 2018 au cours de la vinification en fonction de la date de vendange
C : Catéchine ; EC : Epicatéchine ; ECG : Epicatéchine gallate

			Pépin frais	Mi FA	Fin FA	Mi Macé	Fin Macé
Sous-unité d'extension	Sous-maturité	C	7,3 ± 0,01 a	6,8 ± 0,3 b	6,2 ± 0,2 c	6,3 ± 0,1 c	6,6 ± 0,2 bc
		EC	58,8 ± 0,4 a	56,5 ± 0,6 b	56,8 ± 0,5 b	58,5 ± 1,1 a	58,5 ± 1,2 ab
		ECG	34,0 ± 0,4 a	36,7 ± 0,9 b	37,0 ± 0,5 b	35,3 ± 1,0 ab	34,9 ± 1,3 ab
	Maturité	C	5,9 ± 0,05 a	7,2 ± 0,7 b	7,0 ± 0,6 b	6,5 ± 0,3 b	6,5 ± 0,2 b
		EC	59,8 ± 0,4 a	61,2 ± 3,6 a	59,1 ± 1,3 a	58,1 ± 1,0 a	58,4 ± 1,3 a
		ECG	34,3 ± 0,4 a	31,6 ± 4,3 a	33,9 ± 1,9 a	35,4 ± 1,2 a	35,1 ± 1,2 a
	Sur-maturité	C	7,0 ± 0,1 a	8,0 ± 0,1 b	6,4 ± 0,4 ac	6,1 ± 0,8 ac	5,2 ± 0,5 c
		EC	59,2 ± 0,5 a	58,0 ± 1,4 a	60,6 ± 1,0 a	60,9 ± 2,3 a	62,8 ± 3,9 a
		ECG	33,9 ± 0,6 a	34,0 ± 1,4 a	33,0 ± 1,4 a	33,0 ± 2,8 a	32,0 ± 4,0 a
Sous-unités terminales	Sous-maturité	C	3,9 ± 0,1 a	4,8 ± 1,2 ab	5,7 ± 0,6 b	6,6 ± 1,9 b	5,3 ± 0,5 b
		EC	50,8 ± 1,1 a	53,9 ± 0,8 b	53,5 ± 2,4 ab	54,1 ± 2,6 ab	54,4 ± 1,6 b
		ECG	45,3 ± 1,2 a	41,4 ± 1,1 b	40,9 ± 1,9 b	39,3 ± 0,7 b	40,4 ± 2,0 b
	Maturité	C	3,9 ± 0,4 a	7,1 ± 1,3 ab	6,7 ± 1,6 ab	5,1 ± 1,0 b	5,6 ± 1,5 ab
		EC	50,9 ± 0,05 a	55,2 ± 1,0 b	57,1 ± 0,5 c	57,0 ± 1,1 bc	57,2 ± 0,4 c
		ECG	45,3 ± 0,4 a	37,7 ± 2,0 b	36,2 ± 1,4 b	37,9 ± 0,7 b	37,2 ± 1,4 b
	Sur-maturité	C	4,3 ± 0,3 a	6,8 ± 0,5 b	10,6 ± 1,5 c	11,0 ± 2,3 c	12,7 ± 1,6 c
		EC	53,2 ± 0,3 a	55,9 ± 2,4 a	49,6 ± 1,5 b	52,9 ± 4,4 ab	48,0 ± 2,5 b
		ECG	42,6 ± 0,1 a	37,3 ± 2,2 b	39,7 ± 1,5 b	36,1 ± 3,1 b	39,3 ± 3,9 ab

Ce travail montre clairement pour la première fois que les tanins condensés de pépins sont extraits, dans leur très grande majorité, de la matrice solide extrêmement rapidement dès le début de la fermentation alcoolique. Cette extraction est facilitée par l'augmentation du niveau de maturité et la « vidange » des tanins par le pépin est d'autant plus rapide et importante que le pépin semble « mûr ».

Ces observations ne corroborent pas forcément les données de la bibliographie, car beaucoup de travaux portant sur l'extractibilité des tanins de pépins n'ont pas étudié la « vidange » des pépins et ont porté sur l'analyse de l'augmentation des tanins dans le vin ou la matrice liquide dans laquelle avaient « trempés » les pépins. Nos données permettent alors de soulever plusieurs hypothèses quant aux mécanismes régulant l'extractibilité vraie des pépins, c'est-à-dire cette capacité de « vidange » des tanins. Au vu de nos résultats, on peut penser que les différences d'extractibilité des tanins observées

pourraient : (i) soit être liées à des caractéristiques physico-chimiques des pépins autres que leurs teneurs intrinsèques (taille des tanins et degré de polymérisation, teneurs en polysaccharides, structure des parois, nature de la couche cuticulaire, teneurs en eau des tissus…), (ii) soit être liées à la différence de composition des jus de raisin en fonction des différents niveaux de maturité de la baie.

Une des caractéristiques majeures du développement du pépin est la perte de sa teneur en eau en fin de cycle, au moment de l'entrée en dormance (Adams et al., 1980; Egli, 2017). Ainsi, les pépins dits sur-mûrit présentent une hydratation plus faible que les pépins à maturité ou sous-maturité. Ne pourrions-nous pas comparer nos pépins à des éponges : une éponge très sèche absorbe beaucoup plus rapidement de l'eau qu'une éponge en partie humide. Est-ce qu'un pépin très sec ne pourrait pas se réhydrater de manière beaucoup plus rapide qu'un pépin peu sec et de ce fait entraîner une diffusion des composés plus rapide ?

III.2. Conclusion

Au cours de cette partie, nous avons pu montrer que le niveau de maturité du pépin influe à la fois sur le taux et la vitesse d'extraction des flavanols libres et des tanins condensés du pépin de raisin. Ainsi, il semblerait que plus le pépin mûrit, plus ces composés s'extraient rapidement et facilement, réduisant alors les teneurs de tanins non extraits dans les pépins.

IV. Étude du lien probable entre les teneurs finales en tanins dans les vins de pépins en fonction du potentiel d'extractibilité des tanins de pépins

IV.1. Résultats

Dans les paragraphes précédents, nous avons caractérisé séparément les mécanismes d'apparition des tanins dans les vins et les mécanismes de « vidange » des tanins des pépins. Mais existe-t-il une cohérence entre ces mécanismes ? Peut-on relier directement la teneur en tanins des pépins à celle des vins ? Pourrait- on imaginer un outil prédictif de la teneur en tanins des pépins des vins à partir d'une évaluation de la teneur en tanins de pépins ? Pour répondre à ces questions, les courbes de « vidange » des tanins» et d'apparition des tanins dans les vins ont été superposées (**Figure 72**) et analysées.

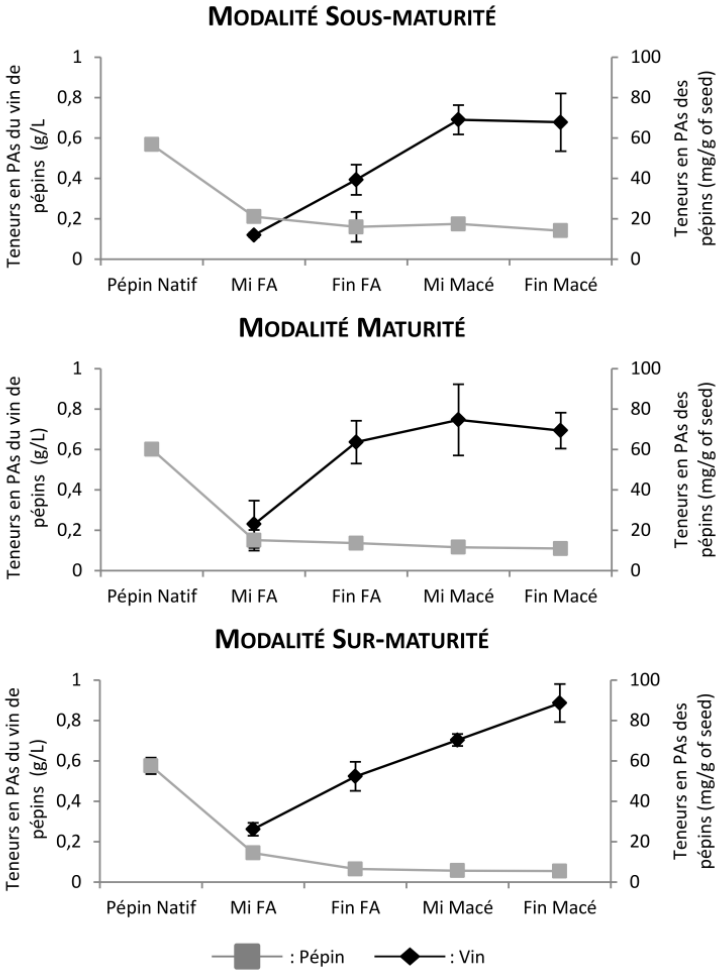


Figure 72 : Evolution de la teneur en PAs des pépins de Merlot 2018, exprimée en mg/g de pépin, et de la teneur en PAs des vins de pépins, exprimée en g/L, au cours de la vinification

Assez logiquement, la superposition de ces courbes montre quelle que soit la date de récolte, que la « vidange » en tanins des pépins entraine une augmentation des teneurs en tanins dans les vins. En revanche, à notre grande surprise, les deux courbes ne sont pas directement opposables puisqu'à l'étape mi-fermentation où les pépins ont relargué plus de 60% de leurs tanins, les teneurs en tanins dans les vins sont extrêmement faibles. Ces tanins apparaissent progressivement dans les vins jusqu'à l'étape de mi-macération pour les modalités sous-maturité et maturité et fin macération pour la modalité sur-murie alors que l'extraction réelle des tanins de pépin est quasiment terminée. Il apparait donc un délai entre le moment où les tanins sont extraits du pépin et où ils sont dosables dans le vin. A notre connaissance, nous sommes les premiers à démontrer ce phénomène, qui semble pourtant essentiel pour comprendre et apporter des explications aux concepts d'extractibité et d'extraction des composés taniques de pépins.

Il parait donc important dans un premier temps de bien clarifier la sémantique autour de ces notions et de bien différencier les types de tanins qui peuvent être issus du pépin dans le vin (**Figure 73**). Il est nécessaire de bien comprendre que dans un pépin il y a d'une part des tanins non

extractibles qui resteront contenus dans les tissus du pépin et d'autre part des tanins extractibles qui vont être relargués dans la matrice liquide contenant les pépins. Cependant, tous ces tanins extractibles ne sont pas retrouvés dans la matrice liquide du vin, certains sont extraits dans le vin (donc dosables) et d'autres sont non extraits dans le vin (non détectables).

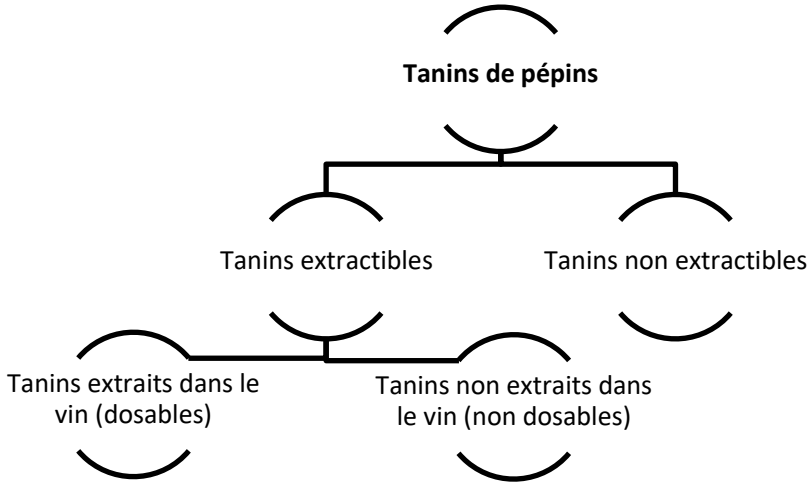


Figure 73 : Représentation schématique des types de tanins de pépins dans le pépin et dans le vin en fonction de leur capacité d'extractibilité

Nos résultats montrent pour la première fois qu'il existe un laps de temps, plus ou moins long selon le niveau de maturité du pépin, entre le moment où le pépin relargue ses tanins extractibles et le moment où ces tanins peuvent être dosés dans le vin. Ces observations, essentielles à notre sens, soulèvent alors deux questions :

- ***Quelle est l'importance de la composition de la matrice vin dans les phénomènes d'extractibilité des tanins de pépins et l'enrichissement en tanins des vins ?***
- ***Est-ce que la notion d'extractibilité des tanins telle qu'elle est utilisée actuellement par les vinificateurs est appropriée à partir du moment où l'on doit considérer qu'elle est fonction à la fois de la capacité du pépin à libérer ses tanins et de la matrice dans laquelle les pépins macèrent ?***

Nos résultats montrent donc qu'il existe un délai entre le moment de « vidange » presque total des tanins du pépin et le moment d'apparition de ces molécules dans le vin. Mais où sont-ils passés et pourquoi apparaissent-ils progressivement dans le vin ?

La première hypothèse est qu'en raison de leur forte capacité à se lier aux polysaccharides, aux anthocyanes et aux protéines (Bindon et al 2010a, 2010b; Hanlin et al., 2010; Le Bourvellec et al., 2004; Renard et al., 2017; Sparrow et al., 2015), ces tanins seraient dans un premier temps piégés par ces composés. Cela est tout à fait envisageable dans le vin témoin, mais pas dans le cas des vins de pépins où il n'y a *a priori* pas ou très peu de polysaccharides et d'anthocyanes issus des pellicules. Il

existerait donc d'autres composés dans notre vin de pépins qui pourraient piéger les tanins. Parmi ces composés, les seuls identifiés dans notre expérimentation comme pouvant capter ces tanins sont les levures. Ainsi la seconde hypothèse pour expliquer ce délai entre « vidange » des tanins du pépin et apparition des tanins dans le vin serait un « piégeage » éphémère des tanins par la levure. Par conséquent, après avoir prélevé des levures aux différentes étapes de la vinification de la modalité vin de pépins, nous les avons observés au nanozoomer sous filtre FITC (**Figure 74**).

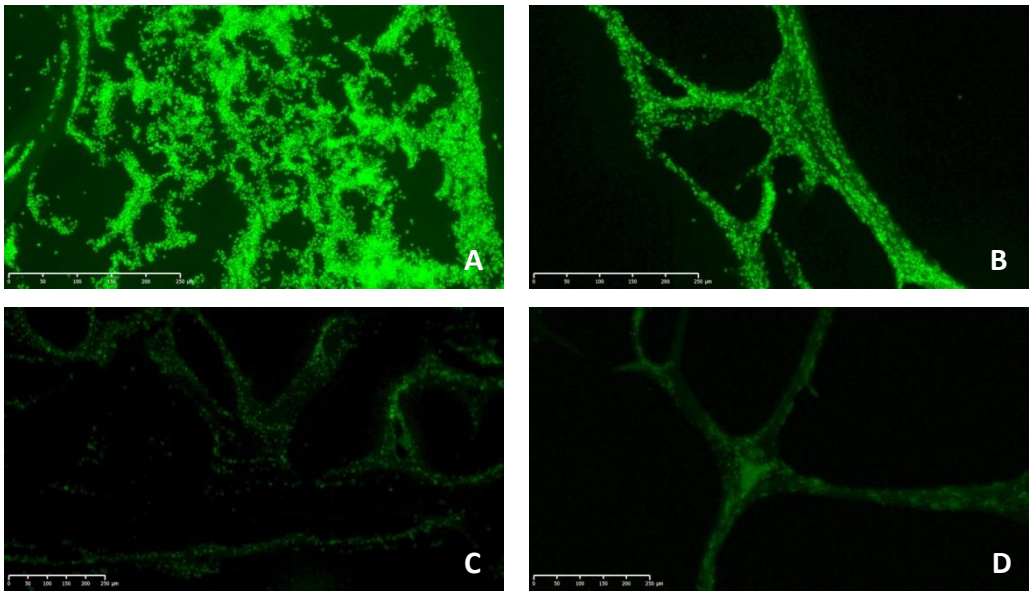


Figure 74 : Observations au Scan de lames des levures de fermentation du vin de pépins à différentes étapes de la vinification sous filtre FITC (A : Mi FA ; B : Fin FA ; C : Mi Macé ; D : Fin Macé), Barre = 250 µm

Nous observons clairement une diminution de l'intensité de l'autofluorescence des levures au fur et à mesure du déroulement de la vinification, laissant penser que les tanins pourraient être captés par les levures, puis relargués au cours de la vinification. L'impact de la composition du vin, et plus particulièrement l'impact des souches de levures de fermentation sur la composition finale du vin a été étudié par plusieurs auteurs. Il a été démontré qu'à la fin de la fermentation alcoolique et en présence de composés phénoliques, les levures ne s'autolysent pas et conservent leurs intégrités cellulaires *via* des interactions possibles entre composés phénoliques et parois des levures (Salmon, 2006; Salmon et al., 2003). Ce phénomène amène donc à imaginer que l'interaction des composés phénoliques avec les parois cellulaires levuriennes est primordiale pour la conservation de leur intégrité cellulaire. Néanmoins, ces travaux, réalisés avec un mélange de composés phénoliques œnologiques, ne permettent pas de distinguer quel type de polyphénol interagit avec la paroi cellulaire des levures, ou tout du moins, si un type de polyphénol interagit de manière plus forte qu'un autre. En complément, les travaux de Morata et al., et de Vasserot et al., ont décrit, dans le vin, l'adsorption réversible des anthocyanes sur les parois cellulaires de levures par le biais d'interactions hydrophobes. Ils ont également pu décrire les différences d'aptitude d'adsorption en fonction des souches de levures utilisées : certaines souches pouvant adsorber jusqu'à deux fois plus d'anthocyanes que d'autres

(Morata et al., 2003; Vasserot et al., 1997). Plus récemment, Carrew et al., ont montré que l'emploi de différentes souches de levures de fermentation affecte la composition et la teneur finale en tanins de vins issus de baies de Pinot Noir avec des modifications de teneurs d'environ 50 % en fonction de la souche de levures utilisée (Carew et al., 2013). La même observation a été réalisée par Mekoue Nguela et al., sur des solutions modèles de vins. Ces auteurs ont décrit une diffusion des proanthocyanidines ayant un degré de polymérisation moyen inférieur à 21 à travers la paroi cellulaire des levures, aboutissant à une accumulation de ces composés dans l'espace périplasmique de la levure (Mekoue Nguela et al., 2015). Ils montrent également que les flavanols interagissent avec la paroi cellulaire, mais de manière plus faible que les proanthocyanidines (Mekoue Nguela et al., 2015). D'autre part, il semble que les polyphénols n'interagissent pas uniquement avec la paroi cellulaire des levures, mais peuvent pénétrer à l'intérieur de la levure. En effet, par le biais d'observations en microscopie électronique à transmission, Nguela et al., montre une densification importante du contenu cytoplasmique des levures après contact prolongé avec une solution de tanins pelliculaires. Cette observation suggère donc que non seulement les tanins sont capables d'interagir avec la paroi cellulaire des levures, mais également capables de diffuser à travers leur membrane plasmique (Mekoue Nguela et al. 2015).

Nos résultats montrent donc, pour la première fois en conditions réelles de vinification, le potentiel impact des levures de fermentation sur l'apparition des tanins dans le vin, soulevant la question de l'importance de la matrice vin dans la composante tanique du vin.

IV.2. Conclusion

Au cours de cette partie, nos résultats montrent qu'il existe un laps de temps entre le moment où les tanins relargue leur tanins dans le vin et le moment où ces tanins apparaissent dans le vin, soulevant la question de l'impact de la matrice vin sur l'extractibilité des tanins de pépins. Ainsi, nous avons pu montrer le potentiel impact des levures de fermentation sur l'apparition des tanins dans le vin.

V. Discussion générale

Ce troisième chapitre avait pour objectif de caractériser les mécanismes d'extractibilité des tanins de pépins dans les vins au cours de la vinification afin de :

- mieux comprendre quelle est la part du pépin dans la composante tanique des vins ;
- caractériser l'impact de la date de récolte et potentiellement le niveau de maturité du pépin sur l'extractibilité des tanins de pépins ;
- définir les cinétiques d'extraction des tanins de pépins au cours de la vinification en lien avec l'enrichissement des tanins dans le vin ;

- établir un lien entre teneurs initiales des tanins de pépins et teneurs finales en tanins dans les vins.

Afin de répondre à cette problématique, une approche originale de nano-vinification a été réalisée. Il a s'agit d'évaluer conjointement les teneurs en tanins dans les vins et dans les pépins au cours de la vinification, ceci pour trois dates de vendanges représentant trois niveaux de « maturité des pépins » et pour trois types de vins , à savoir vins produits avec des baies entières, vins produits avec du jus + des pellicules uniquement et vins produits avec du jus + des pépins uniquement. Grâce à cette approche, nous avons réussi pour la première fois (i) à caractériser de manière fine les cinétiques d'extractibilité des tanins de pépins en fonction de la date de vendange et (ii) à caractériser les cinétiques d'enrichissement en tanins de la matrice vin. L'originalité de cette approche réside dans le fait que nous avons réalisé un « vin de pépins » ce qui n'a jamais été décrit dans la bibliographie, nous permettant d'être sûr que les tanins retrouvés dans ce vin étaient bien des tanins de pépins. Jusque-là, les travaux précédents avaient utilisé soit des vins produits avec des baies entières soit des macéras de pépins dans des solutions hydroalcooliques ne reproduisant pas exactement la matrice vin puisque le phénomène de fermentation ne pouvait pas y être réalisé.

La comparaison des composantes taniques des différents types de vins et nos premières mesures ont permis de mettre en évidence la part importante des tanins de pépins dans les vins**,** puisque ces derniers peuvent représenter **jusqu'à 80% des tanins contenus dans le vin** dans le cas de nos essais. Les tanins retrouvés dans les vins sont majoritairement les **tanins condensés et la catéchine est toujours retrouvée de façon moins importante que l'épicatéchine et l'épicatéchine gallate.** Ainsi, au vu de cette prépondérance, il est donc important pour le vinificateur de prendre en compte le pépin comme source potentielle de tanins et de pouvoir mieux caractériser son contenu et sa capacité à diffuser des tanins dans le vin.

Pour autant, les résultats obtenus au Chapitre III complétés par ceux obtenus lors de ces essais de nano-vinification, montrent que **les teneurs en tanins des pépins ne varient quasiment pas à la fin de la maturation** et qu'entre les trois dates de récoltes, pourtant espacées de 21 jours pour les plus éloignées, les teneurs et la composition sont comparables. Seul le DPm augmente légèrement lors de la troisième date de récolte. Le suivi des teneurs au cours de la fermentation montre des profils d'apparition des tanins de pépins dans le vin variables selon le « niveau de maturité » des pépins avec une apparition plus lente des tanins dans les vins produits à partir de fruits sur muris. Cette approche a permis d'envisager deux hypothèses auxquelles nous n'avons pas pu apporter de réponse par nos essais. La première concerne le fait qu'il existe des **différences d'extractibilité réelle** (capacité de diffusion) des tanins de pépins en relation avec leur localisation ou leur structure du fait qu'au cours du développement du pépin, il y a de plus en plus de tanins dans les parois (Chapitre III) et que leur DPm augmente (Chapitre III) modifiant la diffusion de ces molécules plus grosses et « fixées » aux

composés pariétaux. La seconde hypothèse est basée sur l'idée qu'il y aurait des **différences de surface de contact pépins/liquide** entre les modalités, limitant ainsi les capacités de réhydratation des pépins et de circulation des fluides. En effet, dans notre cas, afin de conserver toujours la même quantité de jus, un nombre différent de baies donc de pépins a été utilisé entre les trois modalités, la modalité dite surmurie ayant utilisée plus de pépins que les autres. Ce nombre plus important de pépins a provoqué une « couche de dépôt» de pépins au fond du fermenteur limitant ainsi les surfaces d'échanges entre le jus et les parties solides, pouvant alors réduire la vitesse d'apparition des tanins dans le vin. Pour confirmer cette hypothèse, il aurait fallu soit que nous agitions nos fermenteurs afin de faire baigner en permanence des pépins dans le liquide, soit que nous choisissions de considérer pour nos essais un rapport marc/jus constant et non un volume de jus identique. De plus, si l'on compare les teneurs finales de tanins dans les vins, les vins de pépins produits au stade dit sur-maturité sont plus riches en tanins condensés laissant penser que **les récoltes tardives permettent l'obtention de vins plus riches en tanins de pépins**. Pour expliquer ces différences, deux hypothèses ont été envisagées. La première, comme pour expliquer les cinétiques de diffusion, se base sur les résultats du Chapitre III, à savoir, au cours du développement du pépin, les tanins sont localisés dans des tissus différents et leur taille varie, pouvant **modifier ainsi leur extractibilité**. Les pépins se déshydratant et se lignifiant, la texture des tissus faciliterait alors cette diffusion. La seconde hypothèse est en relation directe avec la **quantité totale de tanins** initialement contenue dans la masse de pépins utilisée dans le fermenteur. En effet, le poids des baies diminuant, pour conserver le volume de jus, nous avons dû utiliser plus de pépins donc au départ une quantité intrinsèque de tanins plus importante, ainsi au-delà des mécanismes de diffusion, des surfaces de contact, la quantité finale peut tout simplement être liée à la quantité initiale. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait fallu réaliser des vinifications avec la même quantité de tanins au départ, mas faisant alors varier la quantité de pépins selon les stades, donc potentiellement les surfaces de contact. **Ainsi, il est maintenant clair, que la date de récolte, caractéristique d'un état physico-chimique des pépins, impacte la quantité finale des tanins dans le vin et leur cinétique de diffusion. Plus le pépin est dit « mûr » plus les teneurs dans le vin final semblent importantes, avec une diffusion plus rapide sans lien apparent avec la teneur intrinsèque en tanins du pépin.**

Au-delà, de la teneur en tanins dans les vins, cet essai innovant, nous a permis d'établir deux profils distincts d'apparition des tanins dans le vin en fonction du compartiment de provenance des tanins: une apparition progressive des tanins de pépins tout au long de la vinification et une apparition *quasi* immédiate des tanins pelliculaires dès les premiers jours de fermentation alcoolique. Ces différences de profils, ont déjà été observées par de précédents auteurs sans pouvoir expliquer les mécanismes (Amrani Joutei et al., 1994; Miller et al., 2019; Sparrow et al., 2015; Sun et al., 1999) attribués à la fois à la localisation cellulaire spécifique des tanins dans le pépin par rapport à la pellicule, ou à la non-capacité du pépin à être désagréger au cours de la vinification comme peut l'être

la pellicule pendant cette étape (Busse-Valverde et al., 2012; Miller et al., 2019). Notre approche a néanmoins permis d'apporter des éléments nouveaux et à envisager d'autres hypothèses en ce qui concerne l'apparition progressive des tanins de pépins dans le vin. En effet, grâce au dosage combiné des tanins dans le vin et des tanins dans les pépins aux différentes étapes de la vinification nous avons pu démontrer que **la matrice vin jouait un rôle essentiel dans la teneur en tanins finale des vins, indépendamment des capacités d'extractibilité des tanins et de leur teneur initiale dans les pépins. Nos résultats mettent en évidence deux points nouveaux et essentiels pour mieux comprendre la composante tanique des vins en lien avec la « maturité du pépin » :**

- **l'extraction des tanins de pépins vers le vin au cours de la vinification n'est pas liée avec les teneurs initiales, mais liée avec son niveau de maturité qui permet une extractibilité facilitée ;**
- **l'extraction des tanins dans le vin est ultra rapide (dès le début de la fermentation) mais une partie de ces tanins sont retenus par divers composés/composants de la matrice vin qui vont petit à petit « relarguer » les tanins dans le vin.**

La réalisation du vin de pépins permet de montrer de manière certaine **l'implication des levures dans ces mécanismes de piégeage des tanins au cours de la vinification** en plus des autres composés comme les anthocyanes ou les polysaccharides déjà connus et cités dans la bibliographie (Bindon et al. 2010a, 2010b, 2017; Hanlin et al. 2010; Sparrow et al. 2015). Ces résultats, inattendus dans le cadre de notre travail, doivent être approfondis afin d'apporter plus d'information sur les mécanismes impliqués dans ces phénomènes pour mieux (i) comprendre quels sont les facteurs qui pourraient réguler ces phénomènes de piégeage (teneurs en sucres et/ou alcool au cours de la fermentation, souche de levures, potentiel osmotique des jus, caractéristiques intrinsèques de l'enveloppe des pépins) et (ii) identifier des actions œnologiques possibles pour une meilleure gestion du piégeage de ces tanins par la matrice non liquide du vin. **Ainsi, il est important de prendre conscience que les notions d'extractibilité, d'extraction et de maturité des tanins de pépins doivent être redéfinies et mieux caractérisées, car (i) elles ne sont pas liées aux teneurs intrinsèques en tanins des pépins en fin de développement, mais plutôt aux caractéristiques tissulaires des enveloppes du pépin et (ii) elles sont dépendantes de la composition du moût dans lequel les pépins macèrent.**

VI. Conclusion générale

En résumé, dans ce chapitre nous avons mis en évidence :

- **l'impact de la localisation tissulaire des tanins sur leur extractibilité dans le vin,**
- **l'impact de la maturité du pépin sur la vitesse d'extractibilité des tanins de pépins dans la matrice vin,**

- **l'importance de la composition de la matrice vin sur l'apparition des tanins de pépin dans le vin au cours de la vinification.**

Ces résultats ouvrent de nombreux champs de réflexion quant aux aspects pratiques de l'utilisation de ces données au cours de la vinification, mais également concernant la définition de la maturité tanique des pépins. En effet, jusqu' à ce jour, l'outil le plus connu, et le plus couramment utilisé par le viticulteur est le MP% issus de la méthode Glories qui est basé uniquement sur le dosage des teneurs en tanins, ce qui au vu de nos résultats n'est absolument pas pertinent pour évaluer les deux seuls aspects qui intéressent le vinificateur :

- **Quelle quantité de tanins y aura-t-il dans mon vin au final ?**
- **Comment puis-je réguler mes teneurs en tanins dans le vin final ?**

Il manque donc un outil d'aide à la décision fiable, robuste et simple d'utilisation.

CHAPITRE VI : VERS UN NOUVEL OUTIL D'ÉVALUATION DE LA MATURATION DU PÉPIN DE RAISIN : SCANPEP

L'ensemble des résultats obtenus lors de notre travail de thèse démontrent :

- la méconnaissance du métabolisme des tanins de pépins ;
- la difficulté de pouvoir définir correctement et simplement la notion de maturité du pépin ;
- l'absence d'outil simple, fiable et utilisable pour le vinificateur.

Dans la pratique, le pépin est considéré comme étant important dans la composante tanique et organoleptique des vins, cependant le vinificateur a du mal à définir les caractéristiques idéales de cet organe et ne dispose pas d'outil d'aide à la décision fiable et utilisable. De plus, dans l'inconscient collectif des vinificateurs, la définition de la maturité du pépin est souvent réduite à une définition de la maturité phénolique ou tanique (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2017).

Ainsi à ce jour, le seul outil d'aide à la décision pour ce paramètre est l'évaluation de la quantité de tanins de pépins à partir des dosages réalisés lors de l'évaluation de la maturité phénolique des baies par la méthode Glories (Ribéreau-Gayon et al., 2017). Cette évaluation permet d'établir l'indice appelé MP% (maturité des pépins) qui représente la contribution de tanins des pépins à la richesse polyphénolique totale de la baie. Cet indicateur ne mesure donc pas directement les teneurs en tanins exclusifs des pépins et ne donne aucune indication ni sur leurs caractéristiques physico-chimiques ni sur leur extractibilité potentielle.

Or nous avons démontré dans les chapitres précédents que :

- la teneur en tanins condensés dans les pépins était fixée très tôt pendant la phase de maturation, bien avant la date de récolte; ne permettant pas de différencier lors des dernières semaines avant récolte des lots de pépins juste par un simple dosage de leurs tanins ;
- la composition en tanins de pépins était peu influencée par le cépage, mais au contraire était modulée par le contexte pédoclimatique ;
- l'extractibilité des tanins de pépins dans le vin dépendait à la fois de la caractéristique physique des enveloppes du pépin, mais également de la composition de la matrice liquide dans laquelle macéraient les pépins ;
- la teneur finale en tanins dans les vins ne pouvait pas être reliée directement à la teneur finale intrinsèque des tanins dans les pépins.

Ainsi, il apparaît que la définition de la maturité phénolique des pépins telle qu'elle est utilisée aujourd'hui et que le seul outil analytique utilisé pour la définir ne permettent pas d'appréhender les problèmes auxquels le vinificateur doit faire face.

Ce dernier chapitre a donc pour objectif de réfléchir au développement d'un nouvel outil d'aide à la décision prenant en compte les nouvelles données, apportées par notre travail, sur le métabolisme des tanins de pépins et les mécanismes d'extractibilité de ces tanins dans le vin.

Pour répondre à cette problématique, trois questions doivent être posées.

La première question posée lors du développement d'un tel outil est : « Qu'est-ce qu'un bon indicateur? »

Un bon indicateur adapté aux besoins doit disposer de trois qualités essentielles : Simplicité, Représentativité et Opérationnalité. Par ailleurs, il se doit d'être compris et maîtrisé par le plus grand nombre, de ce fait il convient donc de privilégier les modes d'emploi les plus simples. Enfin, la mesure fournie par un indicateur ne doit pas être discutable, par conséquent l'indicateur doit être à la fois objectif, exhaustif et quantifiable.

La seconde question posée est « Que signifie maturité du pépin » pour le vinificateur et comment l'évalue-t-il généralement dans sa pratique ?

Les professionnels de la filière ont tous été unanimes sur ce sujet-là : même si l'évaluation de la composante tanique par le critère MP% est souvent réalisée dans le cadre des suivis maturité, peu de viticulteurs arrivent à le définir correctement et l'utilisent dans le choix de la date des vendanges ou la gestion des macérations. En revanche, ils réalisent pratiquement tous des dégustations de baies et de pépins pour évaluer un « potentiel niveau qualitatif ». Lors de ces dégustations, les critères organoleptiques évalués sont l'astringence, l'amertume, le croquant et les notes aromatiques. Mais avant tout, le premier critère regardé avant la mise en bouche est la couleur. Lorsque les pépins sont verts ou présentent des nuances de vert, ils sont systématiquement écartés de la dégustation par le praticien qui les décrit comme non mûrs. Au contraire, plus ils sont marron, plus ils sont qualifiés de mûrs. Ainsi, dans l'idée que se fait le vinificateur de la maturité de pépin, plus un pépin est vert, plus il contient de tanins, et plus il relarguera de tanins, augmentant alors l'amertume et l'astringence du vin. Au contraire, plus le pépin est marron, moins il est astringent et meilleurs seront les tanins contenus dans le vin. Ainsi, selon les professionnels il existerait un lien fort entre la couleur du pépin, la quantité de tanins du pépin, l'extractibilité des tanins de pépins et le goût du vin (**Figure 75**).

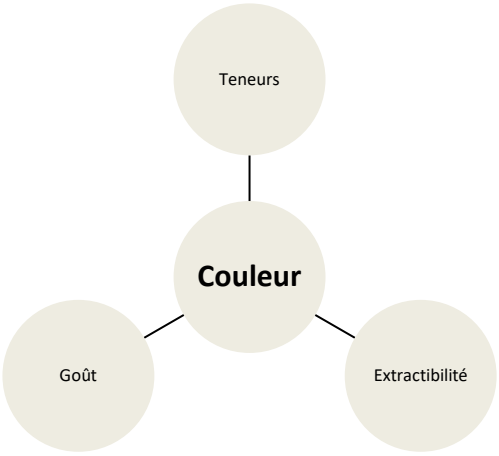


Figure 75 : Représentation schématique des éléments clés de la maturité phénolique du pépin de raisin selon l'idée des professionnels

La troisième question posée est « D'où partons-nous ? Quels sont les données et/ou critères mesurables qui pourraient être utilisés et intégrés dans cet outil ? »

Nous avons vu dans les chapitres précédents qu'il était difficile, voire impossible, de qualifier la notion de maturité phénolique des pépins uniquement par le dosage intrinsèque des teneurs, car il n'y avait pas ensuite de lien fort et conservé entre les teneurs dans les pépins et dans le vin. De plus, la définition d'un pépin mûr selon le vinificateur ne se rapporte pas uniquement à la teneur en tanins, mais également aux notes aromatiques, à la texture et à la couleur du pépin. Enfin, le seul indicateur actuel (MP%) est peu utilisé par les viticulteurs ; et au vu de l'ensemble de nos travaux, nous pouvons en déduire que sa faible utilisation est due au fait (i) qu'il est trop restrictif dans la caractérisation de la notion de maturité, car il ne s'intéresse qu'aux tanins et (ii) qu'il ne peut décrire la maturité des pépins uniquement par le biais des teneurs en tanins de ces derniers, car au cours des dernières semaines avant la vendange, elles n'évoluent quasiment pas. De ce fait, si l'on considère objectivement les données dont nous disposons et les critères potentiellement mesurables objectivement pour caractériser la maturation du pépin, nous avons à notre disposition : la teneur et composition fine en tanins, la couleur extérieure des pépins, la teneur et la composition en composés aromatiques si toutefois ils sont connus, le pourcentage d'eau, la structure des enveloppes et la capacité d'extractibilité dans le vin en fonction de la matrice.

Il semble donc très difficile d'intégrer tous ces critères dans le développement d'un outil d'aide à la décision, dont on a défini les critères essentiels suivants: Simplicité, Représentativité et Opérationnalité. De ce fait, nous avons choisi d'utiliser comme critère de mesure, non plus les teneurs intrinsèques en tanins, mais la couleur, qui contrairement aux teneurs évolue de manière constante au cours du développement du pépin. Pour valider cette approche, nous avons donc dans un premier temps développé une méthodologie pour mesurer cette couleur à partir d'un lot de pépins puis dans un second temps comparer l'évolution de cette couleur aux différents critères de maturation des pépins évoqués par les viticulteurs (teneurs, extractibilité, notes aromatiques et qualité des tanins dans le vin) afin de développer un outil d'aide à la décision d'évaluation de la maturité des pépins. De par la méthodologie de mesure utilisée, cet outil a été nommé SCANPEP.

Cet outil a été développé en parallèle de nos travaux de thèse au sein du laboratoire à partir d'échantillons issus de différents réseaux de maturité et des échantillons utilisés pour nos travaux fondamentaux (Rabot et al., 2017). Les résultats présentés ici ne porteront que sur les analyses produites à partir des pépins issus des baies de Merlot des millésimes 2017 et 2018.

I. SCANPEP : comment ça fonctionne ?

L'analyse bibliographique de l'ensemble des démarches utilisées dans l'industrie semencière pour trier les graines fait ressortir l'utilisation massive de la vision artificielle comme méthode alternative pour le contrôle de la qualité et le tri des semences (Ooms, 2012). À ce jour, plusieurs logiciels d'analyse de la forme et/ou de la couleur des graines ont été développés, notamment SmartGrain (Tanabata et al., 2012) ou GrainScan (Whan et al., 2014) qui se basent sur le principe qu'il existe une corrélation entre la couleur des graines et leur composition, leur aptitude à la germination ou leur entrée en dormance. Après avoir scanné à l'aide d'un simple scanner bureautique, des lots de graines, le logiciel permet à travers l'analyse de ces images de différencier des lots de graines en fonction de leur couleur, mais également de leur forme (Tanabata et al. 2012; Whan et al. 2014). Ces deux logiciels ont été mis au point sur des grains de blé, ainsi que des pépins *d'Arabidopsis thaliana*, mais peuvent convenir, selon les auteurs, à l'analyse des graines de toutes autres espèces végétales. Adapté de cette idée, un logiciel spécifique aux pépins de raisin a été développé par Rodríguez-Pulido et al. (2012) afin de faire le lien entre la couleur et la maturité du pépin. Cette fois-ci, pour numériser les images de pépins, un autre système a été adopté : une sorte de chambre noire reliée à l'ordinateur à l'intérieur de laquelle se trouvent une caméra et des lampes à des intensités lumineuses variables. Après avoir analysé les images, à travers l'utilisation d'un algorithme, la couleur du pépin est reliée à une valeur numérique elle-même reliée à une échelle de brunissement développée par ces auteurs. Ils prouvent ainsi une bonne corrélation de la valeur de brunissement à la maturité du pépin de raisin (R^2 = 0,98) (Rodríguez-Pulido et al. 2012), mais dans ce travail, la notion de maturité du pépin n'est pas avec une vision œnologique. À l'image de ces différents travaux, nous avons décidé d'utiliser la vision artificielle comme crible de tri et de relier la couleur des pépins aux différents critères de maturité des pépins que nous avons décrits précédemment. De plus, notre idée de départ étant de développer un outil simple et facile d'utilisation pour le viticulteur, nous avons décidé d'utiliser le scanner optique pour l'acquisition des images, cet outil étant maintenant largement généralisé dans les exploitations viticoles.

Ainsi est née l'idée de SCANPEP : nouvel outil de caractérisation des pépins, grâce à l'utilisation d'un scanner optique de bureau et d'un logiciel d'acquisition d'image permettant de différencier les nuances de couleur marron invisibles à l'œil nu et de réaliser des lots de pépins.

Le principe de ScanPep est basé sur l'acquisition d'images de pépins au cours de leur développement. Il comporte 5 étapes résumées **Figure 76**.

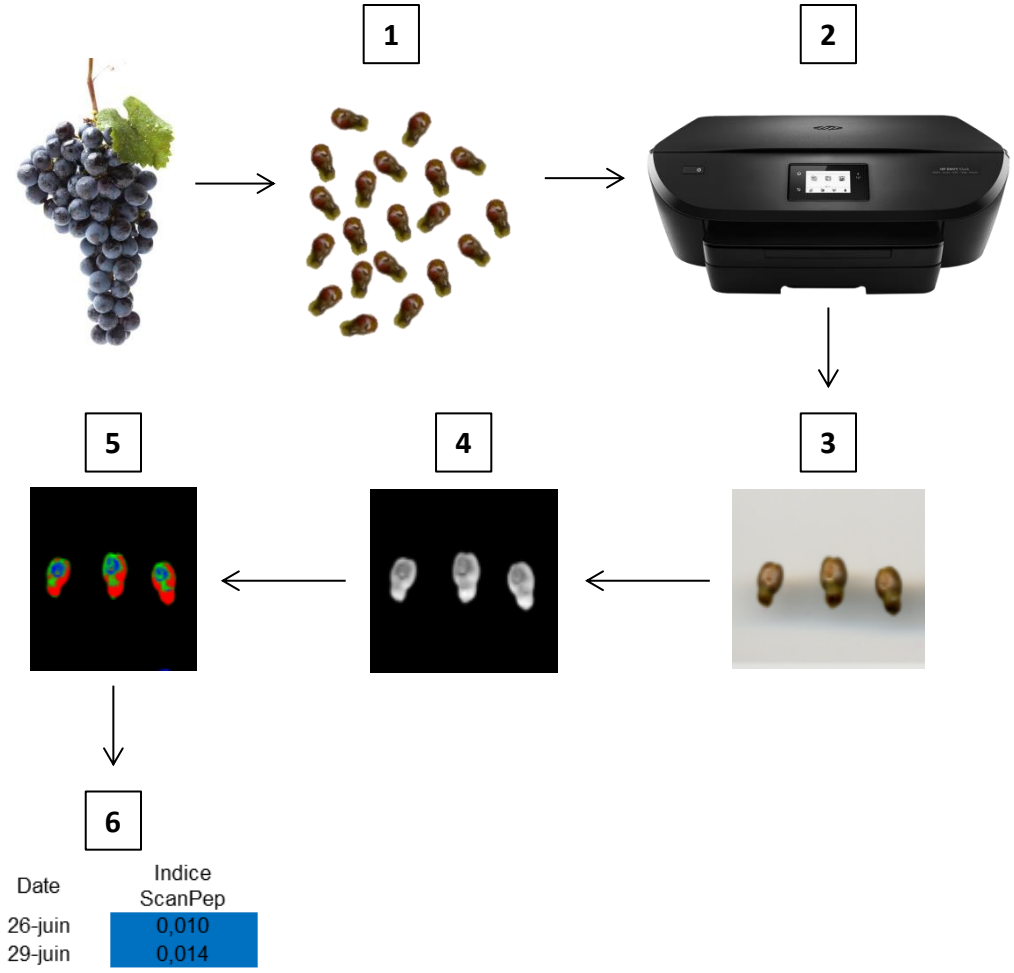


Figure 76 : Principe de fonctionnement de ScanPep

- Étape 1 : Dans un lot de baies prélevées au cours de la maturité des baies, 20 pépins sont prélevés de manière aléatoire et sont essuyés de toute pulpe ou autres résidus de baie à l'aide de papier absorbant.
- Étape 2 : Les pépins sont disposés sur la vitre d'un scanner bureautique (Epson Perfection 3200 Photo) de manière aléatoire sur la face dorsale ou la face ventrale, puis sont scannés.
- Étape 3 : Les images numérisées des pépins sont traitées *via* le logiciel d'analyse statistique R (R Development Core Team, 2008) et lues avec le package R EBImage et rtiff (Rabot et al., 2017).
- Étape 4 : L'image RGB 24 bits est ensuite transformée en une image en niveaux de gris grâce au développement d'un SCRIPT spécifique (**Annexe 2**)
- Étape 5 : Chaque pixel de l'image RGB 24 bits est défini par un triplet de valeurs rouges, vertes et bleues. Ainsi, à chaque niveau de gris est réassociée une couleur bleu, vert et rouge selon le SCRIPT spécifique (**Annexe 2**)

- Étape 6 : En fonction des couleurs obtenues précédemment, à chaque lot de pépins sont associées une couleur prédominante et une valeur numérique basée sur le rapport rouge/bleu. C'est l'indice SCANPEP.

Ainsi, les lots de pépins peuvent être réalisés en fonction de leurs couleurs et de cet indice. Les analyses réalisées au sein du laboratoire en 2017 et 2018 sur les pépins de Merlot et de Cabernet Sauvignon issus du réseau maturité de l'ISVV (**Figure 77**) permettent de valider cet outil. Nous observons au cours du développement du pépin, une évolution de l'indicateur due à une augmentation numérique du rapport rouge/bleu, ce qui se traduit par une évolution de la couleur prédominante du bleu intense au rouge sang en passant par le vert. La comparaison des deux millésimes à partir des données du réseau maturité de l'ISVV montre que l'évolution de l'indicateur varie selon les millésimes, les cépages et les parcelles permettant de bien distinguer les lots entre eux. De plus, ces résultats montrent qu'en 2017 la valeur de l'indicateur à la récolte était beaucoup plus faible que celle de 2018, traduisant donc le fait que la proportion de couleur bleue était plus importante en 2017 qu'en 2018 en lien avec les descripteurs de niveau de maturité des pépins utilisés par les viticulteurs de ces parcelles. Ainsi, il est possible de penser que cet outil pourrait être utilisé comme nouvel outil de caractérisation de la maturité des pépins en lien avec l'image que se font les viticulteurs de la notion de pépin « mûr ».

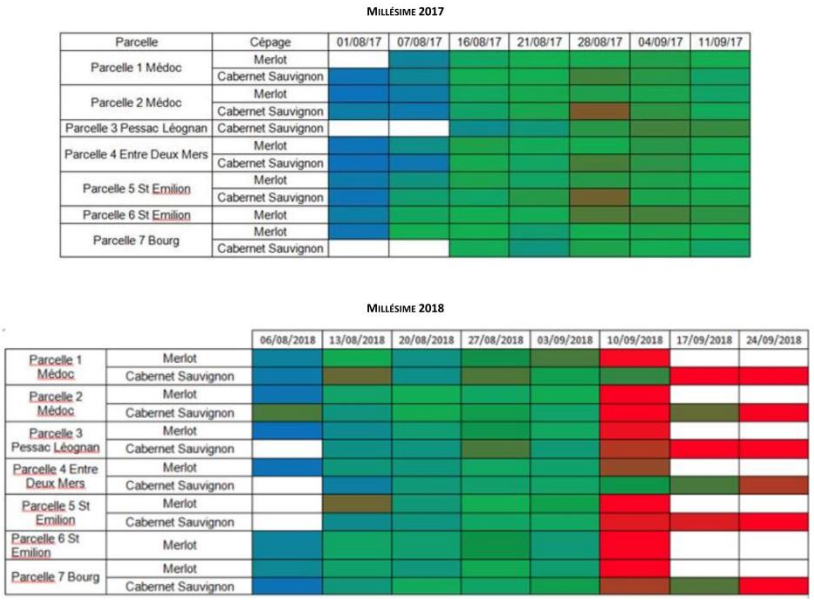


Figure 77 : Évolution de l'indice SCANPEP au cours des millésimes 2017 et 2018 pour les parcelles du réseau maturité de l'ISVV
Source : www.bordeauxraisins.fr

En ce qui concerne nos échantillons (**Tableau 28**), comme attendu au regard des résultats obtenus sur le réseau maturité de l'ISVV, l'indice SCANPEP mesuré en 2017 et 2018 sur les pépins de Merlot évolue, et les différents lots (correspondant à différents stades de développement) présentent des couleurs variables du bleu jusqu'au rouge (uniquement en 2018) en passant par les diverses nuances de bleu-vert. Si l'on compare l'indice à date équivalente entre 2017 et 2018, les pépins de

Merlot 2017 n'ont jamais atteint le stade « rouge » et l'évolution de la couleur vers le vert est beaucoup plus lente qu'en 2018, laissant penser à une maturité inachevée des pépins.

Tableau 28 : Indices SCANPEP des pépins de Merlot du millésime 2017 et 2018

		2018	2017		
Stade de développement	Date	Indice ScanPep	Indice ScanPep	Date	Stade de développement
-	21 JAA	**0,010**		-	--
FG	23 JAA	**0,014**	**0,075**	21 JAA	FG
-	28 JAA	**0,014**		-	-
-	37 JAA	**0,189**		-	-
DV	42 JAA - DV	**0,698**	**0,170**	50 JAA	DV
-	44 JAA	**0,696**		-	-
-	57 JAA	**1,871**		-	-
FV	63 JAA - FV	**2,003**	**0,430**	63 JAA	FV
-	65 JAA	**3,238**		-	-
-	72 JAA	**5,332**		-	-
-	79 JAA	**5,879**		-	-
-	84 JAA	**6,213**		-	-
-	86 JAA	**6,235**		-	-
-	93 JAA	**6,723**		-	-
-	97 JAA	**8,867**		-	-
-	99 JAA	**9,002**		-	-
-	103 JAA	**8,886**		-	-
-	105 JAA	**9,745**		-	-
M	109 JAA - M	**9,804**	**0,290**	91 JAA	M
SM	117 JAA - SM	**12,340**	**2,580**	105 JAA	SM

Ainsi cet indicateur permet de séparer de manière fine, des lots de pépins à partir de leurs couleurs. Il permet notamment de différencier des nuances de marrons que l'œil seul n'est pas capable de faire. Mais peut-on réellement relier ces variations de couleur aux critères de maturité du pépin tels que nous les avons définis précédemment ?

Pour répondre à cette question, l'indice SCANPEP a tout d'abord été comparé à l'évolution des teneurs en tanins intrinsèques des pépins analysées au Chapitre III puis dans un second temps relié aux capacités d'extractibilité que nous avons mis en évidence Chapitre V.

II. Lien entre l'indice SCANPEP et les teneurs intrinsèques en tanins des pépins de raisins

Pour faire cette étude, nous avons directement corrélé les teneurs en composés phénoliques (flavanols et tanins condensés) des pépins analysées au Chapitre III et l'indice SCANPEP (**Figure 78**).

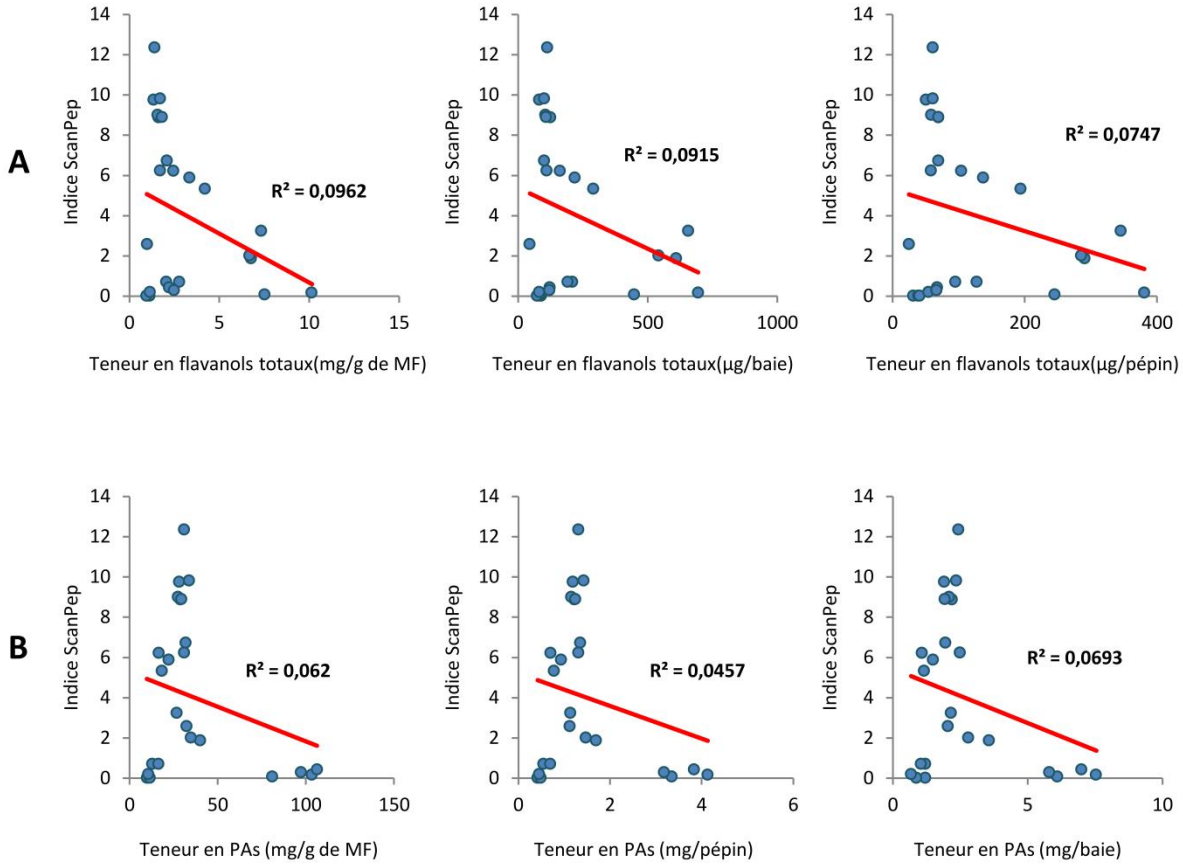


Figure 78 : Représentation schématique de la corrélation entre les teneurs en flavanols totaux (A) ou en proanthocyanidines (B) et l'indice SCANPEP pour l'ensemble des stades étudiés en 2017 et 2018

Nos résultats montrent qu'il n'existe aucune corrélation entre les teneurs en tanins condensés ou les teneurs en flavanols totaux et l'indice SCANPEP. Ce résultat corrèle avec les résultats du Chapitre III, où plus aucune évolution de la teneur en tanins condensés n'était observable à partir du 31 Août (86 JAA). Mais en revanche, nos résultats vont à l'encontre de ceux de Ristic et al., qui avait montré une corrélation entre la teneur en tanins du pépin et sa couleur (Ristic et al., 2005). Ces différences de résultats semblent principalement provenir des méthodes d'évaluation de la couleur. En effet, la méthode d'évaluation de la couleur utilisée par Ristic et al. est basée uniquement sur une appréciation visuelle des nuances de vert, jaune et marron des faces ventrales et dorsales d'un lot de 20 pépins à partir d'une grille comptant 12 nuances allant du vert au brun (**Annexe 1**). À chaque face du pépin, une note sera attribuée, puis la moyenne de ces notes sera établie pour caractériser la couleur du lot. Au vu des différences d'appréciation de couleur bien connues chez l'homme (Boeglin, 2003), nous pouvons nous interroger sur la pertinence de cette échelle et sur les corrélations statistiques qui ont pu être établies entre une appréciation de couleur et la valeur réelle en tanins qui a été mesurée objectivement. Ristic et al., indiquent eux-même qu'à l'approche de la récolte, des confusions entre les dernières nuances de marron (nuances 10, 11 et 12) peuvent être faites, et que donc par principe la note de 11 est attribuée aux pépins. De plus, si l'on regarde de manière précise l'évolution des teneurs

en tanins des pépins aux trois derniers stades de maturité de l'essai de Ristic et al., comme nous, ils n'observent pas de différence significative dans les teneurs ; interrogeant encore plus sur la méthode utilisée (Ristic et al., 2005). C'est pour cette raison, entre autres, que dans le choix des méthodes d'analyse de la couleur pour le développement de SCANPEP, nous avons opté pour une approche d'analyse d'image avec développement d'un script, qui peut être discutable sur l'attribution des nuances de bleu, vert et rouges, mais qui est toujours réalisée de manière identique, quel que soit le stade considéré, car réalisé par le scanner.

Nos résultats montrent donc qu'il n'existe pas de corrélation entre la couleur du pépin et sa composition en tanins. L'outil SCANPEP qui permet de réaliser des lots de pépins à travers l'évolution de la couleur ne permet donc pas de réaliser des lots de pépins en fonction de leur teneur intrinsèque en tanins.

Ainsi, contrairement à la pensée commune de la profession, la couleur du pépin n'est pas reliée à sa composition en tanins. De ce fait, il apparaît difficile de corréler la couleur avec uniquement la notion de maturité phénolique du pépin en rapport avec ses quantités intrinsèques, et d'autres critères doivent être retenus. Parmi les critères déjà évoqués par les vinificateurs quand ils évaluent la maturité du pépin, ceux qui reviennent le plus souvent sont le goût et l'extractibilité des tanins dans le vin.

III. Lien entre l'indice SCANPEP et l'extractibilité des tanins de pépins dans le vin

Nous avons déjà discuté de l'intérêt des vinificateurs de pouvoir estimer à partir d'un lot de vendange les teneurs finales en composés phénoliques des vins issus de cette vendange. À ce jour, aucun indicateur n'existe pour les tanins, qu'ils soient issus des pépins ou des pellicules. Le seul indicateur mis à disposition de la profession est l'indicateur EA% (Extractibilité des anthocyanes) qui traduit le pourcentage des anthocyanes totales contenues dans la pellicule pouvant potentiellement se retrouver dans le vin (Ribéreau-Gayon et al., 2017).

L'outil SCANPEP et nos résultats démontrent qu'il n'est pas pertinent d'utiliser la notion de teneurs en tanins pour développer un outil d'aide à la décision intéressant pour le vinificateur. De ce fait, l'objectif de la seconde partie de ce travail a été l'étude du lien entre l'outil SCANPEP et le potentiel d'extractibilité des tanins des pépins dans le vin. D'autant plus que nous avons montré Chapitre V que, contrairement aux teneurs qui n'évoluent plus aux alentours de la vendange, l'extractibilité des tanins de pépins et les teneurs finales en tanins dans les vins fluctuaient en fonction de la date de vendange.

Cette approche a été menée en doublon au sein du laboratoire : une partie sur nos essais de nano-vinification millésime 2018 et une autre partie par Amélie RABOT en collaboration avec l'IFV (Institut Français du Vin) sur des essais en plus grands volumes à partir de lots de vendanges de Cabernet Sauvignon millésime 2017. Les résultats rapportés ici ne sont que des résultats préliminaires afin de démontrer l'intérêt de l'outil SCANPEP pour l'évaluation de l'extractibilité des tanins de pépins, car le nombre de vinifications est trop faible pour en tirer des conclusions généralisables à l'ensemble des cépages, des millésimes et des modalités de vinification. D'autant plus que nous avons bien démontré Chapitre V, l'importance de la matrice vin dans les phénomènes d'enrichissement en tanins des vins au cours de la vinification.

En ce qui concerne, les essais menés avec l'IFV en 2017, l'évaluation de la couleur des pépins *via* SCANPEP a été réalisée au cours du suivi de maturité pour deux parcelles de Cabernet sauvignon qualifiées par le vinificateur comme étant deux parcelles de maturité très différente (une parcelle dite tardive M- et une parcelle dite précoce M+). Pour ces deux parcelles, en plus du suivi maturité classique, des vendanges ont été réalisées à trois dates différentes date 1 (25 septembre), date 2 (29 septembre) et date 3 (4 octobre) présentant chacune des niveaux de maturité, et des indices SCANPEP contrastés. Pour chaque vendange, les vinifications ont été réalisées par l'IFV à partir de 50 kg de raisin, sans répétition, dans des cuves de 30 litres et des échantillons de vin ont été prélevés à différentes étapes de la vinification (sur moût avant levurage, après levurage, à la fin de la fermentation alcoolique, à l'écoulage et sur le vin fini) afin d'établir le profil d'apparition des tanins dans les vins au fur et à mesure de la vinification.

Les résultats obtenus montrent dans un premier temps que l'outil SCANPEP permet comme précédemment d'évaluer le changement de couleur des pépins au cours de leur développement et de distinguer, *via* l'indicateur, les pépins issus de la parcelle dite tardive de celle précoce (**Figure 79**).

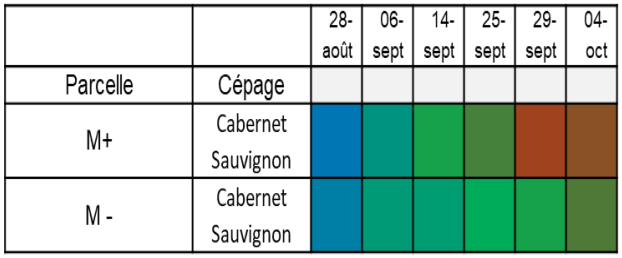


Figure 79 : Profil d'évolution de la maturité des pépins des deux parcelles d'essai : la parcelle précoce M+ et la parcelle tardive M-

Dans un second temps, le profil tanique des vins a été décrit à partir de l'analyse des flavanols à différents moments de la vinification (**Figure 80**).

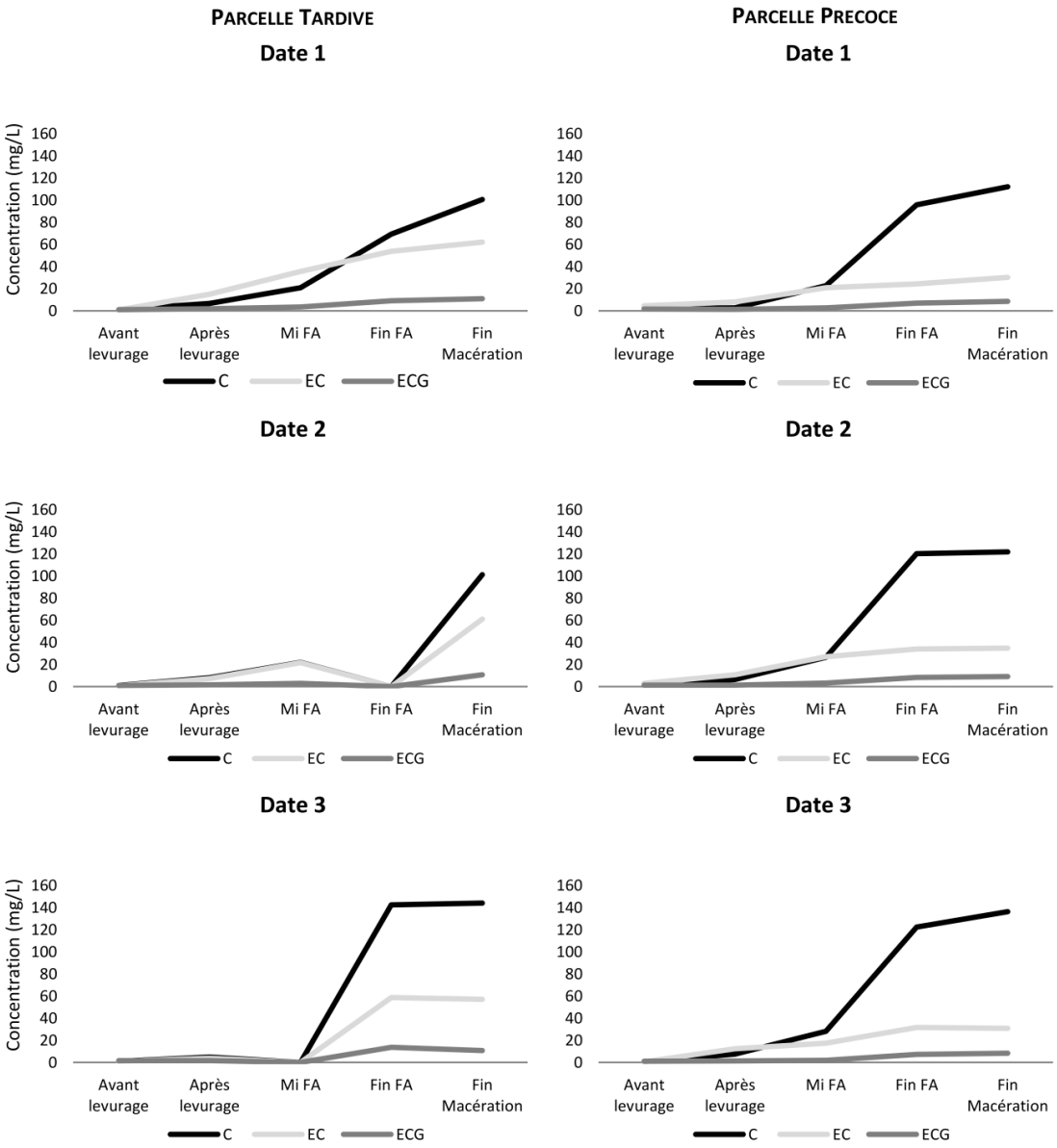


Figure 80 : Profil d'évolution de la teneur en flavanols des vins, exprimée en mg/L au cours de la vinification pour 3 dates de récoltes et pour 2 parcelles à maturité contrastée.
C : Catéchine ; EC : Epicatéchine ; ECG : Epicatéchine gallate

Ces résultats mettent en évidence, comme nous l'avons fait au Chapitre V, que la composante tanique des vins est influencée à la fois par la date de vendange et par le type de parcelle. Les deux paramètres d'apparition des tanins dans le vin sont retrouvés ici, à savoir :

- teneurs finales en tanins plus importantes dans les vins issus de vendanges plus tardives ;
- vitesse d'apparition de ces tanins dans le vin facilitée au cours de la vinification lorsque la vendange est plus tardive.

Ainsi, la parcelle caractérisée comme tardive à la fois par le viticulteur et par l'évaluation SCANPEP voit sa composante tanique des vins plus faible avec une cinétique d'apparition des tanins au cours de la vinification plus lente. Ce phénomène est atténué par des vendanges plus tardives présentant des pépins dont l'indice SCANPEP est plus évolué, mais sans jamais rattraper le profil de la parcelle dite précoce.

Par une approche différente, ces résultats confirment l'apparition progressive des flavanols au cours de la vinification, corrélant avec les résultats du Chapitre V ; apparition des flavanols dans le vin facilitée avec la maturité. Mais surtout, ces résultats semblent indiquer un premier lien entre indicateur SCANPEP et la potentialité d'extraction des tanins de pépins en lien avec la composante tanique des vins finis.

Afin de vérifier cette tendance, nous avons mené des essais sur les vendanges de Merlot 2018. Pour cela, nous avons compilé les données issues du Chapitre III et du Chapitre V en lien avec l'indice SCANPEP mesuré sur les lots de pépins de Merlot du millésime 2018. La **Figure 81** représente les corrélations entre les teneurs en composés phénoliques (flavanols et tanins condensés) des pépins de Merlot du millésime 2018 à chaque étape de la vinification et les indices SCANPEP. Nos résultats montrent une TRÈS FORTE CORRÉLATION entre l'indice SCANPEP et la teneur en tanins des pépins au cours de la vinification. Ainsi à défaut d'être reliée à la teneur en tanins du pépin frais, la couleur du pépin est négativement corrélée avec la teneur en tanins des pépins en cours de vinification, et donc, par extrapolation avec l'extractibilité des tanins de pépin dans le vin. Ainsi, plus l'indice SCANPEP est élevé (donc vers le rouge), moins les pépins en cours de vinification contiennent de tanins et plus ces tanins s'extraient rapidement dans la matrice vin.

Nos résultats confirment donc la présomption eut après les essais réalisés par l'IFV, à savoir une forte corrélation entre la couleur mesurée par SCANPEP et l'extractibilité des tanins de pépins dans le vin. Notre outil semble donc efficient pour évaluer cette notion d'extractibilité des tanins et est le premier de ce type.

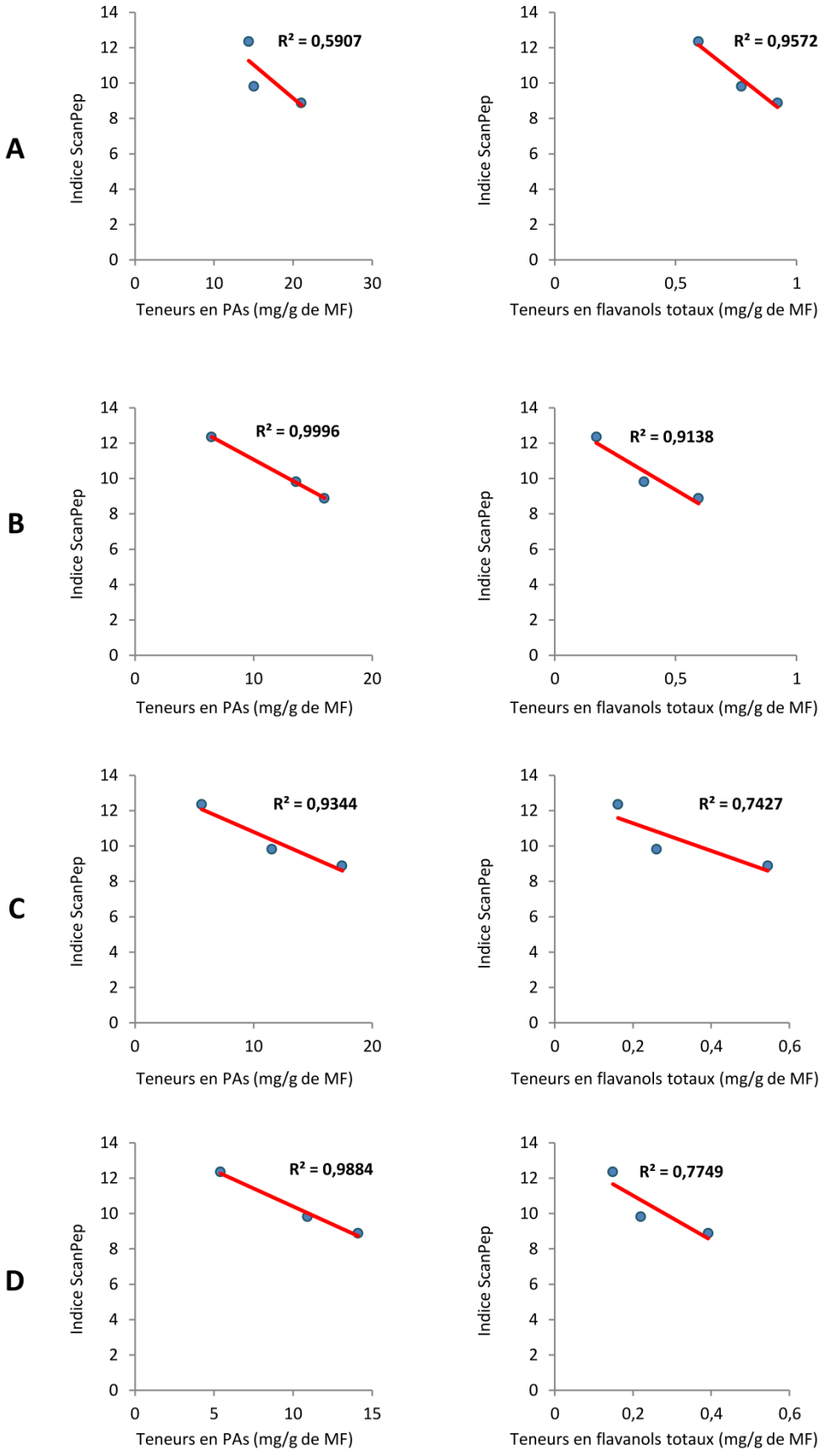


Figure 81 : Représentation schématique de corrélation entre les teneurs en proanthocyanidines (colonne de gauche) et en flavanols totaux (colonne de droite) et l'indice SCANPEP à chaque étape de la vinification
A : Mi fermentation ; B : Fin fermentation ; C : Mi Macération et D : Fin Macération.

IV. Discussion générale

Ce dernier chapitre, plus appliqué avait pour objectif le développement d'un outil d'aide à l'évaluation de la maturité du pépin afin de :

- mieux définir les critères liés à la notion de maturité du pépin dans le sens de la définition donnée par les vinificateurs ;
- faire le lien entre les critères de maturation recherchés par les vinificateurs et les données nouvelles sur le métabolisme des tanins de pépins obtenues au cours de la partie de recherche fondamentale;
- commencer à développer un outil d'aide à la décision simple, fiable et utilisable pour le vinificateur.

Les objectifs ont été partiellement atteints, dans le sens où nous avons montré que :

- la notion de maturité du pépin définie par le vinificateur dépassait largement celle communément utilisée;
- l'évaluation de teneur en tanins à la récolte ne peut être un bon indicateur ;
- la couleur pouvait être utilisée pour classer des lots de pépins, et que cette notion de couleur pouvait être reliée à l'extractibilité des tanins et donc aux teneurs finales dans les vins, validant ainsi la preuve de concept de l'outil SCANPEP.

En revanche, les expérimentations pour la validation définitive de l'outil et son développement à grande échelle étant très lourdes, nous n'avons pu réaliser dans le cadre de ce travail qu'une année de vinification (complétée par les vinifications réalisées au sein du laboratoire avec l'IFV), ce qui est bien évidemment insuffisant. De plus, le troisième critère souvent évoqué par les vinificateurs qui est en rapport avec le goût n'a pas pu être évalué.

Nous sommes donc les premiers à proposer une nouvelle définition pour la maturité phénolique des pépins dans le cadre de l'œnologie. Nous considérons, qu'elle ne doit plus être restreinte à la seule notion de composition tanique, mais doit englober plus largement les notions d'extractibilité et de texture du pépin qui vont impacter directement sur les cinétiques d'apparition des tanins dans le vin et potentiellement aussi les composés aromatiques. Nous devrions maintenant parler de **maturité oenologique des pépins**.

L'ensemble des indicateurs utilisés actuellement et basés sur le seul critère des teneurs en tanins finales des pépins au moment de la vendange est obsolète, voire faux et tout au moins sans intérêt, car (i) les teneurs en tanins dans le pépin sont fixées bien avant la vendange et (ii) les teneurs finales en tanins des pépins ne reflètent pas les teneurs en tanins dans le vin. **Ainsi, attendre que le pépin**

mûrisse dans le but d'augmenter sa teneur en tanins apparaît désuet. La légitimité de l'indicateur MP% de la méthode Glories est remise en cause par notre travail.

En revanche, l'évolution de la structure des enveloppes ainsi que de la matrice liquide dans laquelle macèreront les pépins au cours de la vinification va impacter sur les teneurs finales en tanins dans les vins, car elle va moduler leur extractibilité. **Ainsi, dans la définition de la maturité œnologique du pépin le critère « extractibilité » doit être considéré comme le critère majeur**.

Enfin, l'utilisation de l'approche de vision artificielle, déjà largement utilisé dans l'industrie semencière, nous a permis de développer un concept original et inédit dans le domaine de l'œnologie pour trier facilement et de manière fiable des lots de pépins en fonction de leur couleur. Cette couleur, contrairement aux idées reçues, n'est absolument pas en lien avec les teneurs en tanins des pépins mais est reliée à l'extractibilité de ces derniers dans le vin. **Ainsi pour la première fois, même si l'outil SCANPEP développé à partir de ce concept, doit être amélioré pour être utilisé de manière constante par l'ensemble des viticulteurs, la profession dispose d'un indicateur fiable, facile et compréhensible pour évaluer l'extractibilité des tanins de pépins dans le vin et adapter ses pratiques de vinification**.

Par rapport à cet outil, trois étapes restent encore à faire :

- améliorer l'ergonomie et la diffusion des résultats obtenus après l'analyse d'image afin que cela soit automatique pour le viticulteur ;
- développer et tester l'outil pour d'autres cépages, d'autres types de vins et d'autres millésimes ;
- compléter l'intérêt de l'outil en intégrant la troisième notion explicitée par les viticulteurs, à savoir le goût.

V. Conclusion générale

En résumé, dans ce chapitre nous avons abordé le développement d'un nouvel outil d'aide à la décision pour mieux définir la maturité œnologique des tanins en lien avec les données nouvelles issues de notre approche fondamentale pour mieux comprendre le métabolisme des tanins de pépins.

Cet outil, nommé SCANPEP et basé sur l'analyse d'image, a été validé et développé en parallèle de ce travail de thèse au sein du laboratoire.

Actuellement utilisé dans le cadre du réseau maturité de l'ISVV, il permet de donner des indications fiables et reproductibles sur l'évolution de la couleur des pépins au cours de leur développement en lien avec l'extractibilité et l'idée que ce font les viticulteurs de la qualité des

tanins. Encore à l'état de prototype, il demande à être enrichi en abordant les critères de « goût » des pépins et à être amélioré en termes de développement du logiciel pour qu'il soit utilisé en autonomie par les viticulteurs.

Conclusion générale et Perspectives

L'objectif premier de ce travail de recherche était d'approfondir les connaissances sur le métabolisme phénolique des pépins de raisin durant le développement de la baie afin d'une part de pouvoir caractériser la maturité des pépins et d'autre part de développer un outil d'aide à la décision de pratiques œnologiques afin de tirer le meilleur parti des tanins de pépins.

Pour mener à bien ce projet, nous avons opté pour une approche multi-disciplinaire faisant appel à des techniques chimiques, biochimiques, moléculaires, microscopiques et œnologiques. Aussi, au cours de cette conclusion, nous nous attacherons à résumer chacune de ces approches afin de rassembler les données nouvelles issues de notre travail sur la maturité phénolique des pépins de raisin puis nous proposerons de nouvelles perspectives de travail à court et moyen terme afin de compléter cette étude.

CARACTÉRISATION DES TANINS DE PÉPINS DE RAISIN

Après avoir comparé la teneur et la structure en flavanols et tanins condensés des pépins de raisin de quatre cépages sur trois millésimes différents, nos résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'un profil type d'évolution des tanins de pépins pour les vignes cultivées à Bordeaux. Nous avons ainsi pu décrire pour la première fois cinq étapes couvrant l'ensemble du cycle de développement du pépin à Bordeaux : une première étape juste après la nouaison, pendant laquelle les teneurs en tanins sont constantes ; une seconde, d'une durée d'environ dix jours débutant au début de la véraison, durant laquelle l'accumulation des tanins s'intensifie pour atteindre des valeurs maximales ; une troisième, encadrant la véraison, avec des teneurs en tanins très élevées et stables ; une quatrième d'environ vingt jours, post-véraison, durant laquelle une chute rapide des teneurs est observée ; et enfin une cinquième, correspondante aux trois dernières semaines avant récolte, où les teneurs en tanins restent stables. Ce profil caractéristique a permis de démontrer que, contrairement aux idées de la majorité des viticulteurs, la composition tanique définitive des pépins était établie bien en amont de la récolte (environ trois semaines avant), remettant en cause la notion de maturité phénolique du pépin de raisin, telle que l'œnologue l'utilise actuellement.

Par ailleurs, au vu de l'absence de variations importantes de teneurs en tanins de pépins au moment de la récolte, nous avons pu supposer que la contribution tanique des pépins dans le vin serait plus liée au poids moyen des pépins, ainsi qu'au nombre moyen de pépins par baie, plutôt qu'à la teneur intrinsèque en tanins du pépin.

D'autre part, cette partie de l'étude confirme l'impact du niveau d'alimentation hydrique sur la composante tanique du pépin : en cas d'absence de contrainte hydrique, les teneurs en tanins condensés et le pourcentage de galloylation diminuent ; en cas de contrainte hydrique modérée, où un arrêt de la croissance précoce ainsi qu'une synthèse d'acide abcissique peuvent être supposés, le métabolisme des tanins est favorisé au travers d'une stimulation de l'expression des gènes, de l'activation des activités enzymatiques et d'une meilleure répartition des assimilas carbonés vers les baies, menant alors à une augmentation de la teneur en tanins dans les pépins.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence des effets parcelles/sols, ainsi que des effets cépages non pas sur la teneur en tanins, mais sur la structure des tanins condensés. L'effet cépage serait surtout déterminant pour le degré de polymérisation moyen ainsi que sur le pourcentage de galloylation des tanins condensés de pépins alors que l'effet sol/parcelle lui, influerait plus sur la répartition des différentes sous-unités flavanols des tanins condensés.

Et après ?

D'un point de vue purement expérimental…

Dans un premier temps, afin de confirmer le profil type d'évolution de la teneur en composés phénoliques en cinq phases, ces résultats doivent être répétés. En effet, ce profil n'a pu être mis en évidence que pour un seul millésime et un seul cépage, il est donc nécessaire de réitérer ce suivi fin avec des raisins issus d'autres cépages, mais également d'autres millésimes. Par ailleurs, il faudrait également envisager cette étude sur plusieurs cépages blancs, en effet, seul le Sauvignon blanc a été étudié au cours de ce travail, ce qui ne permet pas de conclure avec certitude sur les résultats obtenus.

Dans un second temps, afin de mieux comprendre l'impact des conditions environnementales, notamment en lien avec l'alimentation hydrique, sur la teneur en tanins, il est nécessaire de coupler une étude similaire à la nôtre avec des données de mesures de potentiel hydrique et de teneurs en hormones telles que l'acide abcissique.

Du point de vue du viticulteur…

Ces résultats nous permettent de réaliser que la teneur en tanins des pépins à maturité est définie bien en amont de la date de récolte (environ 3 semaines), « chamboulant » alors les idées reçues de la profession. Par ailleurs, il semblerait qu'à maturité, en termes de teneurs en composés phénoliques (flavanols et tanins condensés), un pépin de Merlot ne soit pas différent d'un pépin de Cabernet Sauvignon ou bien de Tannat. Par conséquent, il est absurde de penser qu'un pépin de Tannat apporte plus de tanins au vin qu'un pépin de Merlot, ou inversement. De ce fait, un des critères majeurs que le viticulteur doit prendre en compte pour estimer l'apport tanique de ses pépins dans le vin qu'il produit, est le nombre moyen de pépins par baie, ainsi que le poids de ces pépins. Ces aspects sont alors

extrêmement liés à la qualité de la fécondation qui jusqu'à ce jour n'est pas un paramètre suffisamment pris en compte dans l'évaluation de la qualité finale de la vendange.

D'autre part, au vu des changements climatiques actuels et de l'adaptation nécessaire des pratiques culturales qui en découlent (taille, effeuillage etc…), il serait également pertinent d'analyser des pépins issus de parcelles où une évolution des pratiques culturales a été observée. En effet, cela nous permettrait dans un premier temps de voir si le profil type d'évolution de la teneur en tanins est bien conservé ou si ces pratiques pourraient être utilisées pour moduler la teneur et/ou la composition en tanin.

VOIE DE BIOSYNTHÈSE DES TANINS DE PÉPINS

L'objectif de cette partie était (i) de définir les phases clés du métabolisme phénolique du pépin en lien avec les teneurs en tanins (flavanols et proanthocyanidines) décrites lors de ce travail, (ii) d'identifier l'existence d'une voie de biosynthèse privilégiée et potentiellement des mécanismes de régulation de cette voie et (iii) de définir l'importance du millésime sur la régulation de la voie de biosynthèse.

Pour cela, les gènes codant pour les deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse des tanins, la leucoanthocyanidine réductase et l'anthocyanidine réductase, permettant respectivement la synthèse de catéchine et d'épicatéchine, ont été étudiés dans le pépin de raisin au cours du développement de la baie.

Cette approche a permis de mettre en évidence un profil type de l'évolution de l'expression relative des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2*, conservé entre cépages, millésimes et parcelles. Ainsi, une diminution constante de l'expression de *VvLAR1* est observée du stade fermeture de grappe jusqu'à la fin du développement du pépin. En ce qui concerne l'expression relative de *VvLAR2*, une augmentation est observée des stades verts jusqu'à la véraison, puis une diminution de véraison jusqu'à la fin du cycle est notée. Par ailleurs, après le stade fermeture de grappe, nos résultats montrent que la synthèse de catéchine dans le pépin serait préférentiellement liée à la protéine LAR2. Cependant, en raison d'une régulation de l'activité LAR par les conditions environnementales, les variations de teneurs en catéchine des pépins ne peuvent être seulement attribuées aux variations d'expression de ce gène.

En revanche, nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence un profil type de l'expression relative de *VvANR* conservé entre cépages, millésimes et parcelles. Néanmoins, un lien a été observé

entre le niveau d'expression du gène et les teneurs en épicatéchine, mais ne permet pas d'expliquer toutes les variations de teneur en épicatéchine observées, laissant supposer que d'autres acteurs du métabolisme interviennent sur la régulation de la synthèse de l'épicatéchine.

Et après ?

D'un point de vue purement expérimental…

Dans un premier temps, il semblerait pertinent d'analyser l'expression des gènes *VvLAR1* et *VvLAR2* aux stades les plus précoces du pépin de raisin, dès lors qu'il est possible de séparer le pépin de la pulpe. Ainsi, cette analyse nous permettrait de confirmer, ou d'infirmer la prédominance du gène *VvLAR2* sur le gène *VvLAR1* dans le pépin de raisin. En effet, à l'image des travaux de Gagné sur la pellicule, il serait possible que l'isoforme *VvLAR1* soit l'isoforme prédominant au cours des stades précoces du développement du pépin de raisin, et que le l'isoforme *VvLAR2* prenne le relais à partir du stade fermeture de grappe.

Par ailleurs, dans le but d'analyser les différents niveaux de régulation de la voie de biosynthèse des flavanols, l'analyse des activités enzymatiques des enzymes LAR et ANR serait à réaliser. De la même façon, l'analyse de l'expression des principaux facteurs de transcription MYB nous aiderait à mieux comprendre les différences de teneurs en flavanols et tanins condensés observés au cours de ce travail. Enfin, il serait pertinent d'étudier l'impact des conditions environnementales, et en particulier du stress hydrique, sur les différents acteurs du métabolisme phénolique du pépin de raisin, et notamment au niveau du métabolisme hormonal.

Du point de vue du viticulteur…

Ces résultats, très fondamentaux, sont indispensables à la bonne conduite de ce travail de recherche, néanmoins, exprimés en l'état, ils ne peuvent apporter de nouvelles informations, ou indications dans la conduite de la vinification, ou dans le choix de la date de vendanges.

LOCALISATION DES TANINS DE PÉPIN ET DE LEURS LIEUX CELLULAIRES DE SYNTHÈSE

Lieux de synthèse des tanins de pépins

Au cours de ces approches de microscopie, ce travail a permis de mettre en évidence la synthèse *in situ* des tanins pariétaux et de soulever plusieurs hypothèses quant aux lieux et mécanismes de

transport des tanins intracellulaires. Dans le cas des tanins intracellulaires, il apparait très distinctement que les plastes jouent un rôle privilégié dans la synthèse cellulaire des tanins.

Par ailleurs, nous avons pu montrer qu'en fonction de leur lieu d'accumulation, et du stade de développement, les tanins se présentent sous des formes plus ou moins denses, laissant potentiellement penser qu'ils présentent des degrés de polymérisation moyens variables.

Au cours de cette approche, notre travail s'est uniquement focalisé sur les cellules de l'épiderme et du parenchyme du tégument externe, soulevant la question des lieux de synthèse cellulaires des tanins dans les autres tissus du pépin. Est-ce que cette synthèse se déroulerait de la même façon dans les autres tissus ? Ou bien observe-t-on les mêmes modalités de synthèse cellulaire des tanins dans les différents tissus du pépin ? Au vu des différentes structures observées, tant au sein d'une même cellule (vésicule tanique, vésicule non tanique, vacuole tanique, vacuole non tanique), qu'au sein de cellules issues du même tissu, il est légitime de se poser cette question.

Et après ?

D'un point de vue purement expérimental…

Dans un premier temps, il apparaît primordial de réaliser des observations en microscopie électronique à transmission dans les autres couches cellulaires du tégument externe, mais également des autres tissus (tégument interne et albumen) afin de visualiser les potentielles différences d'aspect des tanins. Sur ces mêmes couches, il apparaît également intéressant de réaliser les immunomarquages des protéines LAR et ANR afin de confirmer, ou infirmer nos hypothèses de synthèse. Par ailleurs, ces techniques devraient être réalisées sur différents stades du développement du pépin, notamment sur les cinq phases que nous avons décrites au cours du Chapitre III, afin de potentiellement visualiser et expliquer les différences de polymérisation des tanins condensés du pépin de raisin au cours de son développement.

Néanmoins, en raison de la structure difficile du pépin de raisin due à la succession de tissus « durs » (tegmen) et de tissus « mous » (albumen), de nouvelles techniques de microscopie (et notamment de fixation des tissus) doivent être développées pour visualiser les cellules des tissus les plus internes du pépin. La microdissection laser, sur les tissus les plus internes du pépin, serait une alternative judicieuse afin de valider ou infirmer la présence de tanins dans les parois cellulaires des cellules de l'albumen. Enfin, un des freins majeurs relatif à cette étude est la prise en compte de la structure 3D du pépin. En effet, la visualisation de coupes en 2D ne nous permet pas d'affirmer la forme exacte des structures décrites lors de notre analyse (plastes raquettes/vésicules taniques/vésicules non taniques). Par conséquent, des approches en tomographie électronique analytique pourraient être judicieuses.

Localisation tissulaire des tanins de pépins

Concernant la localisation tissulaire des tanins de pépin, ce travail a permis de mettre en évidence, et ce en accord avec le profil d'évolution des teneurs décrit précédemment, que le profil d'enrichissement en tanins du pépin suivait deux phases distinctes : une première phase de « remplissage » où les tanins progressent du bec vers le corps du pépin ; et une seconde phase où les tanins semblent progresser des tissus les plus externes vers les plus internes.

Et après ?

D'un point de vue purement expérimental…

D'un point de vue expérimental, ces analyses doivent être affinées, notamment en définissant le spectre d'émission des tanins pelliculaires par une approche en microscopie confocale. Néanmoins, l'obtention d'un spectre d'émission assez spécifique des tanins de pépins s'avère être un défi *quasi* impossible à réaliser en raison du grand nombre de composés aromatiques fluorescents au sein du pépin (stilbène, lignine, etc…). De ce fait, afin de réaliser une cartographie assez spécifique, et précise des composés phénoliques du pépin de raisin, une approche expérimentale plus fine doit être envisagée avec par exemple l'utilisation de techniques d'imagerie en spectrométrie de masse, qui nous permettraient d'établir la carte des composés phénoliques 2D du pépin de raisin, et de visualiser l'évolution de cette carte tout au long du développement de la baie. Pour aller encore plus loin, des techniques de tomographie couplée à ces techniques d'imagerie en spectrométrie de masse pourraient être pertinentes : une cartographie 3D des composés phénoliques du pépin de raisin pourrait être réalisée aux différents stades du développement de la baie.

Du point de vue du viticulteur…

Concernant la profession, ces résultats, bien qu'à première vue purement fondamentaux, peuvent fournir de nouvelles informations sur l'extractibilité des tanins de pépins en fonction de leur localisation tissulaire. En effet, la réalisation de cette cartographie des composés phénoliques sur des pépins en cours de vinification nous permettrait d'une part d'évaluer où se situent les tanins extractibles des pépins de raisin, et d'autre part de visualiser leur structure. En effet, le degré de polymérisation moyen, ainsi que le pourcentage de galloylation des tanins influençant grandement les propriétés organoleptiques apportées par ces composés, savoir dans quel(le)s tissus/cellules ils se trouvent, permettrait certainement une meilleure maîtrise des étapes de la vinification.

EXTRACTIBILITÉ DES TANINS DE PÉPINS

L'objectif de cette partie, plus pratique, était d'étudier l'extractibilité des tanins de pépins en fonction de la date de récolte des baies de raisin, afin de (i) mieux comprendre l'apport de la composante tanique du pépin dans le vin ; (ii) caractériser l'impact de la date de récolte, et potentiellement le niveau de maturité du pépin sur l'extractibilité des tanins de pépin ; (iii) définir des cinétiques d'extraction des tanins de pépins au cours de la vinification en lien avec l'enrichissement des tanins dans le vin ; et enfin (iv) établir un lien entre les teneurs initiales des tanins de pépins et les teneurs finales en tanins dans les vins.

Dans le cadre de ce travail, nos résultats ont montré la part importante des tanins de pépins dans les vins, pouvant représenter jusqu'à 80 % des tanins contenus dans le vin. D'autre part, en dépit d'une absence de variation de la teneur en tanins des lots de pépins de maturité contrastée, des différences de teneurs, ainsi que de diffusion de tanins dans le vin sont observées. Ainsi, plus un pépin est dit « mûr », plus la diffusion dans le vin des tanins est rapide, et plus la teneur finale en tanins du vin est importante. Nos résultats ont également permis de mettre en évidence le rôle essentiel que jouait la matrice vin dans la teneur finale en tanins des vins, et ce indépendamment des capacités d'extractibilité des tanins et de leur teneur initiale dans les pépins. Ces résultats permettent donc de soulever deux nouveaux points essentiels pour mieux comprendre la composante tanique des vins en lien avec la maturité du pépin : l'extraction des tanins de pépins dans le vin n'est pas liée à la teneur intrinsèque en tanins du pépin, mais avec les caractéristiques physiques des téguments (que l'on peut traduire par niveau de maturité) qui permettent une facilitation de l'extractibilité. L'extraction des tanins dans le vin apparaît très rapide, et ce en dépit d'une apparition lente des tanins dans la matrice, ainsi une partie de ces tanins seraient retenus par divers composés/composants de la matrice pour être relâchés au fur et à mesure de la vinification.

Et après ?

D'un point de vue purement expérimental…

D'un point de vue purement expérimental, ces expériences nécessitent d'être répétées, dans un premier temps sur des cépages et des millésimes différents, mais également sur des volumes différents afin de valider ou infirmer les hypothèses précédemment décrites. Par ailleurs, l'évaluation de la teneur en tanins des pépins au cours de la vinification doit être réalisée sur des raisins vinifiés en conditions « classiques ». En effet, dû au fait que le marc de nos vins était uniquement composé de pépins de raisin, nos résultats pourraient être en partie biaisés, mais cette approche nous a permis de caractériser de manière certaine les tanins issus uniquement des pépins.

Par ailleurs, l'impact de la matrice vin sur l'extractibilité des tanins de pépins, doit être étudié de manière plus approfondie. Dans un premier temps, l'utilisation de différentes souches de levures pourrait être envisagée, afin de visualiser d'éventuelles différences d'apparition des tanins dans le vin. Dans un second temps, l'impact de la teneur en sucre et en alcool de la matrice doit également être étudié, car ces composés pourraient modifier les structures cellulaires des enveloppes et favoriser la diffusion des tanins dans le liquide.

Du point de vue du viticulteur…

Du point de vue du viticulteur, ces résultats peuvent constituer une avancée majeure dans l'approche de l'évaluation de la maturité du pépin, et ce pour plusieurs raisons.

Dans un premier temps, savoir avec certitude qu'un pépin vert libère son contenu phénolique plus lentement qu'un pépin surmûri peut aider le viticulteur dans le choix de sa date de vendange : après tout, si les baies sont mûres, et que les pépins sont empiriquement considérés comme non mûrs, pourquoi attendre pour vendanger, si ce n'est de prendre le risque d'avoir un pourcentage élevé de pourriture ?

Dans un second temps, si la confirmation de la rétention des tanins par les levures est établie, ces dernières pourraient être utilisées comme un véritable outil de la gestion de la composante tanique des vins, autant pour les tanins de pépins, que les tanins pelliculaires. En effet, des souches « plus rétentrices » de tanins pourraient être choisies dans le cadre de l'élaboration de vin dont on ne recherche pas une structure tanique importante, et des souches « moins rétentrices » de tanins pourraient être choisies lors de l'élaboration de vin au fort potentiel de garde. De la même façon, en fonction de la maturité de la vendange, notamment en cas de vendanges précoces, ces différentes souches de levures pourraient s'avérer extrêmement utiles dans la conduite de la vinification.

SCANPEP

Dans ce chapitre nous avons abordé le développement d'un nouvel outil d'aide à la décision pour mieux définir la maturité œnologique des tanins en lien avec les données nouvelles issues de notre approche fondamentale.

Cet outil, nommé SCANPEP et basé sur l'analyse d'image, a été validé et développé en parallèle de ce travail de thèse au sein du laboratoire.

Actuellement utilisé dans le cadre du réseau maturité de l'ISVV, il permet de donner des indications fiables et reproductibles sur l'évolution de la couleur des pépins au cours de leur développement en lien avec l'extractibilité et l'idée que ce font les viticulteurs de la qualité des tanins.

Et après ?

D'un point de vue purement expérimental et du point de vue du viticulteur…

Encore à l'état de prototype, il demande à être enrichi en abordant les critères de « goût » des pépins et à être amélioré en termes de développement du logiciel pour qu'il soit utilisé en autonomie par les viticulteurs.

À court terme, afin de valider la corrélation entre l'extractibilité des tanins de pépins dans le vin et l'indice SCANPEP, nos essais sur vins de pépins devront être réitérés avec des raisins issus de cépages différents, et des niveaux de maturité différents. Puis, une fois cette corrélation établie, des expériences sur vins classiques (baies entières, volumes industriels) doivent également être menées pour vérifier d'éventuelles déviations liées à l'effet matrice. Enfin, des dégustations de pépins et des vins issus de ces vinifications devront être mis en place pour corréler l'indice SCANPEP au goût potentiel du vin.

À plus long terme, l'extractibilité des tanins de pépins évaluée par l'indice SCANPEP pourrait être étudiée dans le cadre des procédés de vinification afin d'établir des itinéraires de vinification permettant une extraction plus ou moins importante des tanins de pépins.

Cet outil présente un fort potentiel, et à terme il pourrait fournir des éléments de réponses à au moins deux questions que se pose le viticulteur à la récolte :

Quelle quantité de tanins y aura-t-il dans mon vin au final ?

Comment puis-je réguler mes teneurs en tanins dans le vin final ?

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, C. A., et R. W. Rinne. 1980. « Moisture Content as a Controlling Factor in Seed Development and Germination ». *In International Review of Cytology*, Elsevier, **68**: 1-8.

Aleixandre-Tudo, J. L., et W. du Toit. 2018. « Cold Maceration Application in Red Wine Production and Its Effects on Phenolic Compounds: A Review ». *LWT-Food Science and Technology*, **95**: 200-208.

Ameisen, D., G. Le Naour, et C. Daniel. 2012. « Technologie des lames virtuelles: De la numérisation à la mise en ligne ». *Médecine/sciences*, **28**(11): 977-82.

Amrani Joutei, K., et Y. Glories. 1994. « Etude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges ». *OENO One*, **28**(4): 303-17.

Amrani Joutei, K., Y. Glories, et M. Mercier. 1994. « Localisation des tanins dans les pellicules de baie de raisin ». *Vitis*, **33**(3): 133-38.

Andersen, C. L., J. L. Jensen, et T. F. Ørntoft. 2004. « Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets ». *Cancer Research*, **64**(15): 5245-50.

Anneraud, C., et E. Vinsonneau. 2009. « Maturité technologique et maturité phénolique des raisins: des références analytiques utiles, des méthodes simples et des matériels pratiques et prometteurs. » Banque de données des matériels viti-vinicoles, Lettre actualités n°41.

Aron, P. M., et J. A. Kennedy. 2007. « Compositional Investigation of Phenolic Polymers Isolated from Vitis Vinifera L. Cv. Pinot Noir during Fermentation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**(14): 5670-80.

Baur, P. S., et C. H. Walkinshaw. 1974. « Fine Structure of Tannin Accumulations in Callus Cultures of Pinus Elliotti (Slash Pine) ». *Canadian Journal of Botany*, **52**(3): 615-19.

Bautista-Ortín, A. B., N. Busse-Valverde, J. I. Fernández-Fernández, E. Gómez-Plaza, et R. Gil-Muñoz. 2016. « The extraction kinetics of anthocyanins and proanthocyanidins from grape to wine in three different varieties ». *OENO One*. **50**(2): 91-100.

Bautista-Ortín, A. B., E. Jiménez-Pascual, N. Busse-Valverde, J. M. López-Roca, J. M. Ros-García, et E. Gómez-Plaza. 2013. « Effect of Wine Maceration Enzymes on the Extraction of Grape Seed Proanthocyanidins ». *Food and Bioprocess Technology*, **6**(8): 2207-12.

Bavaresco, L., S. Pezzutto, M. Gatti, et F. Mattivi. 2007. « Role of the Variety and Some Environmental Factors on Grape Stilbenes ». *Vitis*, **46**(2): 57-61.

Bertolini, A., C. Peresson, E. Petrussa, E. Braidot, S. Passamonti, F. Macri, et A. Vianello. 2009. « Identification and Localization of the Bilitranslocase Homologue in White Grape Berries (Vitis Vinifera L.) during Ripening ». *Journal of Experimental Botany*, **60**(13): 3861-71.

Bewley, J. D., K. J. Bradford, H. W. M. Hilhorst, et H. Nonogaki. 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. Third edition. New York, NY: Springer.

Bindon, K. A., S. Kassara, W. U. Cynkar, E. M. C. Robinson, N. Scrimgeour, et P. A. Smith. 2014. « Comparison of Extraction Protocols to Determine Differences in Wine-Extractable Tannin and Anthocyanin in Vitis Vinifera L. Cv. Shiraz and Cabernet Sauvignon Grapes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(20): 4558-70.

Bindon, K. A., S. Kassara, et P. A. Smith. 2017. « Towards a Model of Grape Tannin Extraction under Wine-like Conditions: The Role of Suspended Mesocarp Material and Anthocyanin Concentration: Toward a Model of Tannin Extraction ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **23**(1): 22-32.

Bindon, K. A., P. A. Smith, et J. A. Kennedy. 2010a. « Interaction between Grape-Derived Proanthocyanidins and Cell Wall Material. 1. Effect on Proanthocyanidin Composition and Molecular Mass ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(4): 2520-28.

Bindon, K. A., P. A. Smith, H. Holt, et J. A. Kennedy. 2010b. « Interaction between Grape-Derived Proanthocyanidins and Cell Wall Material. 2. Implications for Vinification ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(19): 10736-46.

Birtić, S., et I. Kranner. 2006. « Isolation of High-Quality RNA from Polyphenol-, Polysaccharide- and Lipid-Rich Seeds ». *Phytochemical Analysis*, **17**(3): 144-48.

Boeglin, J. A. 2003. La vision des couleurs. Perception et Réalité. De Boeck Supérieur.

Bogs, J., M. O. Downey, J. S. Harvey, A. R. Ashton, G. J. Tanner, et S. P. Robinson. 2005. « Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves ». *Plant Physiology*, **139**(2): 652-63.

Bordiga, M., F. Travaglia, M. Locatelli, J. D. Coïsson, et M. Arlorio. 2011. « Characterisation of Polymeric Skin and Seed Proanthocyanidins during Ripening in Six Vitis Vinifera L. Cv ». *Food Chemistry*, **127**(1): 180-87.

Boussetta, N., E. Vorobiev, L. H. Le, A. Cordin-Falcimaigne, et J.-L. Lanoisellé. 2012. « Application of Electrical Treatments in Alcoholic Solvent for Polyphenols Extraction from Grape Seeds ». *LWT - Food Science and Technology*, **46**(1): 127-34.

Braidot, E., E. Petrussa, A. Bertolini, C. Peresson, P. Ermacora, N. Loi, M. Terdoslavich, S. Passamonti, F. Macri, A. Vianello. 2008. « Evidence for a Putative Flavonoid Translocator Similar to Mammalian Bilitranslocase in Grape Berries (Vitis Vinifera L.) during Ripening ». *Planta*, **228**(1): 203-13.

Braidot, E., M. Zancani, E. Petrussa, C. Peresson, A. Bertolini, S. Patui, F. Macrì, et A. Vianello. 2008. « Transport and Accumulation of Flavonoids in Grapevine (Vitis Vinifera L.) ». *Plant Signaling & Behavior*, **3**(9): 626-32.

Brillouet, J.-M. 2014. « Plasticity of the Tannosome Ontogenesis in the Tracheophyta ». *Journal of Plant Sciences*, **2**(6): 317.

———. 2015. « On the Role of Chloroplasts in the Polymerization of Tannins in Tracheophyta: A Monograph ». *American Journal of Plant Sciences*, **6**(9): 1401-9.

Brillouet, J.-M., C. Romieu, B. Schoefs, K. Solymosi, V. Cheynier, H. Fulcrand, J.-L. Verdeil, et G. Conéjéro. 2013. « The Tannosome Is an Organelle Forming Condensed Tannins in the Chlorophyllous Organs of Tracheophyta ». *Annals of Botany*, **112**(6): 1003-14.

Buer, C. S., N. Imin, et M. A. Djordjevic. 2010. « Flavonoids: New Roles for Old Molecules ». *Journal of Integrative Plant Biology*, **52**(1): 98-111.

Busse-Valverde, N., A. B. Bautista-Ortín, E. Gómez-Plaza, J. I. Fernández-Fernández, et R. Gil-Muñoz. 2012. « Influence of Skin Maceration Time on the Proanthocyanidin Content of Red Wines ». *European Food Research and Technology*, **235**(6): 1117-23.

Busse-Valverde, N., E. Gómez-Plaza, J. M. López-Roca, R. Gil-Muñoz, et A. B. Bautista-Ortín. 2011. « The Extraction of Anthocyanins and Proanthocyanidins from Grapes to Wine during Fermentative Maceration Is Affected by the Enological Technique ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(10): 5450-55.

Busse-Valverde, N., E. Gómez-Plaza, J. M. López-Roca, R. Gil-Muñoz, J. I. Fernández-Fernández, et A. B. Bautista-Ortín. 2010. « Effect of Different Enological Practices on Skin and Seed Proanthocyanidins in Three Varietal Wines ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(21): 11333-39.

Cáceres-Mella, A., M. I. Talaverano, L. Villalobos-González, C. Ribalta-Pizarro, et C. Pastenes. 2017. « Controlled Water Deficit during Ripening Affects Proanthocyanidin Synthesis, Concentration and Composition in Cabernet Sauvignon Grape Skins ». *Plant Physiology and Biochemistry*, **117**: 34-41.

Cadot, Y., M. T. Miñana-Castelló, et M. Chevalier. 2006. « Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from Vitis Vinifera L. Cv Cabernet Franc during Fruit Development ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(24): 9206-15.

Canals, R., M. C. Llaudy, J. Valls, J. M. Canals, et F. Zamora. 2005. « Influence of Ethanol Concentration on the Extraction of Color and Phenolic Compounds from the Skin and the Seeds of Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10): 4019-25.

Cardebat, J-M. 2017. Économie du vin. Paris : La Découverte.

Carbonneau, A., A. Deloire, L. Torregrosa, B. Jaillard, A. Pellegrino, A. Métay, H.Ojeda, E. Lebon et P. Abbal. 2015. Traité de la vigne: physiologie, terroir, culture. Paris: Dunod.

Carew, A. L., P. Smith, D. C. Close, C. Curtin, et R. G. Dambergs. 2013. « Yeast Effects on Pinot Noir Wine Phenolics, Color, and Tannin Composition ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(41): 9892-98.

Casassa, L., C. W. Beaver, M. S. Mireles, et J. F. Harbertson. 2013. « Effect of Extended Maceration and Ethanol Concentration on the Extraction and Evolution of Phenolics, Colour Components and Sensory Attributes of Merlot Wines: Extended Maceration and Ethanol Concentration ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **19**(1): 25-39.

Casassa, L., M. Keller, et J. Harbertson. 2015. « Regulated Deficit Irrigation Alters Anthocyanins, Tannins and Sensory Properties of Cabernet Sauvignon Grapes and Wines ». *Molecules*, **20**(5): 7820-44.

Castellarin, S. D., M. A. Matthews, G. Di Gaspero, et G. A. Gambetta. 2007. « Water Deficits Accelerate Ripening and Induce Changes in Gene Expression Regulating Flavonoid Biosynthesis in Grape Berries ». *Planta*, **227**(1): 101-12.

Cayla, L., P. Cottereau, et R. Renard. 2002. « Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V standard. » *Revue Française d'œnologie*, (193): 10-16.

Cayla, L., et R. Renard. 2007. « Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode ITV standard ». *Revue Internet de viticulture et d'œnologie*, **20**: 1-14.

Cerpa-Calderón, F. K., et J. A. Kennedy. 2008. « Berry Integrity and Extraction of Skin and Seed Proanthocyanidins during Red Wine Fermentation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(**19): 9006-14.

Chapman, S., K. J. Oparka, et A. G. Roberts. 2005. « New Tools for in Vivo Fluorescence Tagging ». *Current Opinion in Plant Biology*, **8**(6): 565-73.

Chira, K., B. Lorrain, I. Ky, et P.-L. Teissedre. 2011. « Tannin Composition of Cabernet-Sauvignon and Merlot Grapes from the Bordeaux Area for Different Vintages (2006 to 2009) and Comparison to Tannin Profile of Five 2009 Vintage Mediterranean Grapes Varieties ». *Molecules*, **16**(2): 1519-32.

Chira, K., G. Schmauch, C. Saucier, S. Fabre, et P. L. Teissedre. 2009. « Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(2): 545-53.

Cholet, C. 2001. « Particularités histocytologiques, histochimiques et biochimiques des baies millerandées de Vitis vinifera. Influence des polyamines sur le développement de la baie. » Bordeaux 2.

Cholet, C., C. Delsart, M. Pétrel, E. Gontier, N. Grimi, A. L'Hyvernay, R. Ghidossi, E. Vorobiev, M. Mietton-Peuchot et L. Geny-Denis. 2014. « Structural and Biochemical Changes Induced by Pulsed Lectric Field Treatments on Cabernet Sauvignon Grape Berry Skins: Impact on Cell Wall Total Tannins and Polysaccharides ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(13): 2925-34.

Clérivet, A., I. Alami, F. Breton, D. Garcia, et C. Sanier. 1996. « Les Composés Phénoliques et La Résistance Des Plantes Aux Agents Pathogènes ». *Acta Botanica Gallica*, **143**(6): 531-38.

Coffelt, R. J., et H. W. Berg. 1965. « Color extraction by heating whole grapes ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**(3): 117-28.

Coombe, B. G., et M. G. McCarthy. 2000. « Dynamics of Grape Berry Growth and Physiology of Ripening ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **6**(2): 131-35.

Ćurko, N., K. Kovačević Ganić, L. Gracin, M. Đapić, M. Jourdes, et P. L. Teissedre. 2014. « Characterization of Seed and Skin Polyphenolic Extracts of Two Red Grape Cultivars Grown in Croatia and Their Sensory Perception in a Wine Model Medium ». *Food Chemistry*, **145**: 15-22.

Dai, Z. W., P. Vivin, F. Barrieu, N. Ollat, et S. Delrot. 2010. « Physiological and Modelling Approaches to Understand Water and Carbon Fluxes during Grape Berry Growth and Quality Development: A Review ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **16**(1): 70-85.

Debeaujon, I., A. J. M. Peeters, K. M. Léon-Kloosterziel, et M. Koornneef. 2001. « The TRANSPARENT TESTA12 Gene of Arabidopsis Encodes a Multidrug Secondary Transporter-like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium ». *The Plant Cell*, **13**(4): 853-71.

Delsart, C., C. Cholet, R. Ghidossi, N. Grimi, E. Gontier, L. Gény, E. Vorobiev, et M. Mietton-Peuchot. 2014. « Effects of Pulsed Electric Fields on Cabernet Sauvignon Grape Berries and on the Characteristics of Wines ». *Food and Bioprocess Technology*, **7**(2): 424-36.

Delsart, C., R. Ghidossi, C. Poupot, C. Cholet, N. Grimi, E. Vorobiev, V. Milisic, et M. Mietton Peuchot. 2012. « Enhanced Extraction of Phenolic Compounds from Merlot Grapes by Pulsed Electric Field Treatment ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **63**(2): 205-11.

Deluc, L., F. Barrieu, C. Marchive, V. Lauvergeat, A. Descendit, T. Richard, J-P. Carde, J-M. Mérillon et S. Hamdi. 2006. « Characterization of a Grapevine R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway ». *Plant Physiology*, **140**(2): 499-511.

Deluc, L., J. Bogs, A. R. Walker, T. Ferrier, A. Decendit, J.-M. Merillon, S. P. Robinson, et F. Barrieu. 2008. « The Transcription Factor VvMYB5b Contributes to the Regulation of Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in Developing Grape Berries ». *Plant Physiology*, **147**(4): 2041-53.

Dewick, P. M. 1995. « The Biosynthesis of Shikimate Metabolites ». *Natural Product Reports*, **12**(2): 101-33.

Deytieux, C. 2005. « Maturation du raisin: étude de la relation entre l'équilibre hormonal et les facteurs impliqués dans l'évolution des parois cellulaires de la pellicule. » Université Bordeaux 2.

Deytieux-Belleau, C., A. Vallet, B. Donèche, et L. Geny. 2008. « Pectin Methylesterase and Polygalacturonase in the Developing Grape Skin ». *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**(7): 638-46.

Dixon, R. A., L. Achnine, P. Kota, C.-J. Liu, M. S. S. Reddy, et L. Wang. 2002. « The Phenylpropanoid Pathway and Plant Defence-a Genomics Perspective ». *Molecular Plant Pathology*, **3**(5): 371-90.

Dixon, R. A., et C. L. Steele. 1999. « Flavonoids and Isoflavonoids – a Gold Mine for Metabolic Engineering ». *Trends in Plant Science*, **4**(10): 394-400.

Dixon, R. A., D. Y. Xie, et S. B. Sharma. 2004. « Proanthocyanidins - a Final Frontier in Flavonoid Research?: Tansley Review ». *New Phytologist*, **165**(1): 9-28.

Downey, M. O., J. S. Harvey, et S. P. Robinson. 2003. « Analysis of Tannins in Seeds and Skins of Shiraz Grapes throughout Berry Development ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **9**(1): 15-27.

Dubos, C., R. Stracke, E. Grotewold, B. Weisshaar, C. Martin, et L. Lepiniec. 2010. « MYB Transcription Factors in Arabidopsis ». *Trends in Plant Science*, **15**(10): 573-81.

Durand. A-A. 2016. Pourquoi le vin compte autant pour la France, en sept graphiques. *Le Monde*.

Düring, H., et P. R. Dry. 1995. « Osmoregulation in Water Stressed Roots: Responses of Leaf Conductance and Photosynthesis. » *Vitis*, **34**(1): 15-17.

Ebadi, A., M. Sedgley, P. May, et B. G. Coombe. 1996. « Seed Development and Abortion in Vitis Vinifera L., Cv. Chardonnay ». *International Journal of Plant Sciences*, **157**(6): 703-12.

Egli, D. B. 2017. Seed Biology and Yield of Grain Crops. Second Edition. Oxfordshire: CAB International (CABI).

El Darra, N., H. N. Rajha, M. A. Ducasse, M. F. Turk, N. Grimi, R. G. Maroun, N. Louka, et E. Vorobiev. 2016. « Effect of Pulsed Electric Field Treatment during Cold Maceration and Alcoholic Fermentation on Major Red Wine Qualitative and Quantitative Parameters ». *Food Chemistry*, **213**: 352-60.

Errea, P., M. Gutmann, et W. Feucht. 2000. « Physiological implications of flavan-3-ols in apricot-rootstock combinations ». *Advances in Horticultural Science*, **14**(3): 126-34.

Federico Casassa, L., C. W. Beaver, M. S. Mireles, et J. F. Harbertson. 2013. « Effect of Extended Maceration and Ethanol Concentration on the Extraction and Evolution of Phenolics, Colour Components and Sensory Attributes of Merlot Wines: Extended Maceration and Ethanol Concentration ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **19**(1): 25-39.

Ferrer, J.-L., M. B. Austin, C. Stewart, et J. P. Noel. 2008. « Structure and Function of Enzymes Involved in the Biosynthesis of Phenylpropanoids ». *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**(3): 356-70.

Ferrier, T. 2008. « Les facteurs de transcription MYB et la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes dans la baie de raisin: analyse fonctionnelle et identification de nouveaux candidats. » Université de Bordeaux I.

Fia, G., V. Canuti, et I. Rosi. 2014. « Evaluation of Potential Side Activities of Commercial Enzyme Preparations Used in Winemaking ». *International Journal of Food Science & Technology*, **49**(8): 1902-11.

Finch-Savage, W. E. 2003. « Seed Development | Onset of Desiccation Tolerance ». In Encyclopedia of Applied Plant Sciences, Elsevier, 1279-84.

Fleet, G. H., éd. 2002. Wine: Microbiology and Biotechnology. London: Taylor & Francis.

Fougère-Rifot, M., J.-J. Delavaux, N. Benharbit El Alami, J. Bouard, et O. Brun. 1993. « Importance des tanins vacuolaires dans le développement des ovaires et des ovules de la vigne ». *Vitis*, **32**: 127-36.

Fournioux, J.-C., et M. Adrian. 2011. Morphologie et anatomie de la vigne. Bordeaux: Féret.

Francisco, R. M., A. Regalado, A. Ageorges, B.J. Burla, B. Bassin, C. Eisenach, O. Zarrouk, S. Vialet, T. Marlin, M.M. Chaves, E. Martinoia et R. Nagy. 2013. « ABCC1, an ATP Binding Cassette Protein from Grape Berry, Transports Anthocyanidin 3-O-Glucosides ». *The Plant Cell*, **25**(5): 1840-54.

Frangne, N., T. Eggmann, C. Koblischke, G. Weissenböck, E. Martinoia, et M. Klein. 2002. « Flavone Glucoside Uptake into Barley Mesophyll and Arabidopsis Cell Culture Vacuoles. Energization Occurs by H + -Antiport and ATP-Binding Cassette-Type Mechanisms ». *Plant Physiology*, **128**(2): 726-33.

Fraser, C. M., et C. Chapple. 2011. « The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis ». *The Arabidopsis Book*, **9**(e0152):1-19.

de Freitas, V., Y. Glories, et A. Monique. 2000. « Developmental Changes of Procyanidins in Grapes of red *Vitis vinifera* Varieties and Their Composition in Respectives Wines ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **51**(4): 397-403.

Fuleki, T., et J. M. Ricardo da Silva. 1997. « Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**(4): 1156-60.

Gagné, S. 2007. « Implication de l'équilibre hormonal dans les mécanismes de maturation phénolique du raisin: étude du rôle de l'acide abscissique sur la compositon et la biosynthèse des tanins de la pellicule. » Bordeaux.

Gagné, S., S. Lacampagne, O. Claisse, et L. Gény. 2009. « Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase Gene Expression and Activity in Flowers, Young Berries and Skins of *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet-Sauvignon during Development ». *Plant Physiology and Biochemistry*, **47**(4): 282-90.

Gambino, G., I. Perrone, et I. Gribaudo. 2008. « A Rapid and Effective Method for RNA Extraction from Different Tissues of Grapevine and Other Woody Plants ». *Phytochemical Analysis*, **19**(6): 520-25.

Gang, D. R., H. Kasahara, ZQ. Xia, K. Vander Mijnsbrugge, G. Bauw, W. Boerjan, M. Van Montagu, LB. Davin et NG. Lewis.1999. « Evolution of plant defense mechanisms relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases ». *Journal of Biological Chemistry*, **274**(11): 7516–7527.

Gargouri, M., C. Manigand, C. Maugé, T. Granier, B. Langlois d'Estaintot, O. Cala, K. Bathany, J. Chaudière et B. Gallois. 2009. « Structure and epimerase activity of anthocyanidin reductase from Vitis vinifera ». *Acta Crystallographica*, **65**(9): 989-1000.

Gargouri, M., J. Chaudière, C. Manigand, C. Maugé, K. Bathany, J. M. Schmitter, et B. Gallois. 2010. « The epimerase activity of anthocyanidin reductase from Vitis vinifera and its regiospecific hydride transfers ». *Biological Chemistry*, **391**(2/3): 219-27.

Gargouri, M., B. Gallois, et J. Chaudière. 2009. « Binding-Equilibrium and Kinetic Studies of Anthocyanidin Reductase from Vitis Vinifera ». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **491**(1-2): 61-68.

Gawel, R. 1998. « Red Wine Astringency: A Review ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **4**(2): 74-95.

Genebra, T., RR. Santos, R. Francisco, M. Pinto-Marijuan, R. Brossa, AT. Serra, CM. Duarte, MM. Chaves et O. Zarrouk. 2014. « Proanthocyanidin Accumulation and Biosynthesis Are Modulated by the Irrigation Regime in Tempranillo Seeds ». *International Journal of Molecular Sciences*, **15**(7): 11862-77.

Geny, L., C. Saucier, S. Bracco, F. Daviaud, et Y. Glories. 2003. « Composition and Cellular Localization of Tannins in Grape Seeds during Maturation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(27): 8051-54.

Gil, M., N. Kontoudakis, E. González, M. Esteruelas, F. Fort, J. M. Canals, et F. Zamora. 2012. « Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color, Polyphenolic Composition, and Polysaccharide Content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**(32): 7988-8001.

Giribaldi, M., L. Geny, S. Delrot, et A. Schubert. 2010. « Proteomic Analysis of the Effects of ABA Treatments on Ripening Vitis Vinifera Berries ». *Journal of Experimental Botany*, **61**(9): 2447-58.

Gomez, C., N. Terrier, L. Torregrosa, S. Vialet, A. Fournier-Level, C. Verriès, J-M. Souquet, J-P. Mazauric, M. Klein, V. Cheynier et A. Ageorges. 2009. « Grapevine MATE-Type Proteins Act as Vacuolar H+-Dependent Acylated Anthocyanin Transporters ». *Plant Physiology*, **150**(1): 402-15.

González-Manzano, S., J. C. Rivas-Gonzalo, et C. Santos-Buelga. 2004. « Extraction of Flavan-3-Ols from Grape Seed and Skin into Wine Using Simulated Maceration ». *Analytica Chimica Acta*, **513**(1): 283-89.

Goodman, C. D., P. Casati, et V. Walbot. 2004. « A Multidrug Resistance–Associated Protein Involved in Anthocyanin Transport in Zea Mays ». *The Plant Cell*, **16**(7): 1812-26.

Hanlin, R. L., et M. O. Downey. 2009. « Condensed Tannin Accumulation and Composition in Skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon Grapes during Berry Development ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **60**(1): 13-23.

Hanlin, R. L., M. Hrmova, J. F. Harbertson, et M. O. Downey. 2010. « Review: Condensed Tannin and Grape Cell Wall Interactions and Their Impact on Tannin Extractability into Wine ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **16**(1): 173-88.

Harbertson, J. F., J. A. Kennedy, et D. O. Adams. 2002. « Tannin in skins and seeds of cabernet sauvignon, syrah, and pinot noir berries during ripening ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**(1): 54-59.

Harbertson, J. F., M. S. Mireles, E. D. Harwood, K. M. Weller, et C. F. Ross. 2009. « Chemical and Sensory Effects of Saignée, Water Addition, and Extended Maceration on High Brix Must ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **60**(4): 450-60.

Harbertson, J. F., G. P. Parpinello, H. Heymann, et M. O. Downey. 2012. « Impact of Exogenous Tannin Additions on Wine Chemistry and Wine Sensory Character ». *Food Chemistry*, **131**(3): 999-1008.

Harrison, R. 2018. « Practical Interventions That Influence the Sensory Attributes of Red Wines Related to the Phenolic Composition of Grapes: A Review ». *International Journal of Food Science & Technology*, **53**(1): 3-18.

Hazak, J. C., J. F. Harbertson, C. H. Lin, B. H. Ro, et D. O. Adams. 2005. « The phenolic components of grape berries in relation to wine composition ». *Acta Horticulturae*, **689**: 189-96.

He, F., N. N. Liang, L. Mu, Q. H. Pan, J. Wang, M. J. Reeves, et C. Q. Duan. 2012. « Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression ». *Molecules*, **17**(2): 1571-1601.

Hernández-Jiménez, A., E. Gómez-Plaza, A. Martínez-Cutillas, et J. A. Kennedy. 2009. « Grape Skin and Seed Proanthocyanidins from Monastrell × Syrah Grapes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(22): 10798-803.

Hernandez-Jimenez, A., J. A. Kennedy, A. B. Bautista-Ortin, et E. Gomez-Plaza. 2012. « Effect of Ethanol on Grape Seed Proanthocyanidin Extraction ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **63**(1): 57-61.

Herrmann, K. M., et L. M. Weaver. 1999. « The Shikimate Pathway ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**(1): 473-503.

Huang, Y. F., S. Vialet, J. L. Guiraud, L. Torregrosa, Y. Bertrand, V. Cheynier, P. This, et N. Terrier. 2014. « A Negative MYB Regulator of Proanthocyanidin Accumulation, Identified through Expression Quantitative Locus Mapping in the Grape Berry ». *New Phytologist*, **201**(3): 795-809.

Jaakola, L. 2013. « New Insights into the Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Fruits ». *Trends in Plant Science*, **18**(9): 477-83.

Jin, H., et C. Martin. 1999. « Multifunctionality and Diversity within the Plant MYB-Gene Family ». *Plant Molecular Biology*, **41**(5): 577-85.

Jun, J. H., X. Xiao, X. Rao, et R. A. Dixon. 2018. « Proanthocyanidin Subunit Composition Determined by Functionally Diverged Dioxygenases ». *Nature Plants*, **4**(12): 1034-43.

Kallberg, Y., U. Oppermann, H. Jörnvall, et B. Persson. 2002. « Short-Chain Dehydrogenases/Reductases (SDRs): Coenzyme-Based Functional Assignments in Completed Genomes ». *European Journal of Biochemistry*, **269**(18): 4409-17.

Kennedy, J. A., G.J. Troup, J.R. Pilbrow, D.R. Hutton, D. Hewitt, C.R. Hunter, R. Ristic, P.G. Iland et G.P. Jones. 2000. « Development of Seed Polyphenols in Berries from Vitis Vinifera L. Cv. Shiraz ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **6**(3): 244-54.

———. 2008. « Grape and Wine Phenolics: Observations and Recent Findings ». *Ciencia e investigación agraria*, **35**(2): 107-20.

Kennedy, J. A., et G. P. Jones. 2001. « Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(4): 1740-46.

Kennedy, J. A., M. A. Matthews, et A. L. Waterhouse. 2000. « Changes in Grape Seed Polyphenols during Fruit Ripening ». *Phytochemistry*, **55**(1): 77-85.

———. 2002. « Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **53**(4): 268-74.

Kigel, J., et G. Galili, éd. 1995. Seed development and germination. New York: M. Dekker.

Kitamura, S., N. Shikazono, et A. Tanaka. 2004. « Transparent Testa 19 Is Involved in the Accumulation of Both Anthocyanins and Proanthocyanidins in Arabidopsis ». *The Plant Journal*, **37**(1): 104-14.

Klein, M., G. Weissenböck, A. Dufaud, C. Gaillard, K. Kreuz, et E. Martinoia. 1996. « Different Energization Mechanisms Drive the Vacuolar Uptake of a Flavonoid Glucoside and a Herbicide Glucoside ». *Journal of Biological Chemistry*, **271**(47): 29666-71.

Koeduka, T., G.V. Louie, I. Orlova, C.M. Kish, M. Ibdah, C.G. Wilkerson, M.E. Bowman, T.J. Baiga, J.P. Noel, N. Dudareva et E. Pichersky. 2008. « The Multiple Phenylpropene Synthases in Both Clarkia Breweri and Petunia Hybrida Represent Two Distinct Protein Lineages ». *The Plant Journal*, **54**(3): 362-74.

Koundouras, S., E. Hatzidimitriou, M. Karamolegkou, E. Dimopoulou, S. Kallithraka, J.T. Tsialtas, E. Ziozou, N. Nikolaou et Y. Kotseridis. 2009. « Irrigation and Rootstock Effects on the Phenolic Concentration and Aroma Potential of Vitis Vinifera L. Cv. Cabernet Sauvignon Grapes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(17): 7805-13.

Koundouras, S., V. Marinos, A. Gkoulioti, Y. Kotseridis, et C. van Leeuwen. 2006. « Influence of Vineyard Location and Vine Water Status on Fruit Maturation of Nonirrigated Cv. Agiorgitiko (Vitis Vinifera L.). Effects on Wine Phenolic and Aroma Components ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(14): 5077-86.

Koyama, K., M. Numata, I. Nakajima, N. Goto-Yamamoto, H. Matsumura, et N. Tanaka. 2014. « Functional Characterization of a New Grapevine MYB Transcription Factor and Regulation of Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapes ». *Journal of Experimental Botany*, **65**(15): 4433-49.

Kyraleou, M., S. Kallithraka, N. Theodorou, P.-L. Teissedre, Y. Kotseridis, et S. Koundouras. 2017. « Changes in Tannin Composition of Syrah Grape Skins and Seeds during Fruit Ripening under Contrasting Water Conditions ». *Molecules*, **22**(9): 1453.

Lacampagne, S. 2010. « Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin: Etude de l'impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante tanique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux. » Université de Bordeaux.

Lacampagne, S., S. Gagné, et L. Gény. 2010. « Involvement of Abscisic Acid in Controlling the Proanthocyanidin Biosynthesis Pathway in Grape Skin: New Elements Regarding the Regulation of Tannin Composition and Leucoanthocyanidin Reductase (LAR) and Anthocyanidin Reductase (ANR) Activities and Expression ». *Journal of Plant Growth Regulation*, **29**(1): 81-90.

Le Bourvellec, C., S. Guyot, et C. M. G. C. Renard. 2004. « Non-Covalent Interaction between Procyanidins and Apple Cell Wall Material ». *Biochimica et Biophysica Acta*, **1672**(3): 192-202.

Lepiniec, L., I. Debeaujon, J. M. Routaboul, A. Baudry, L. Pourcel, N. Nesi, et M. Caboche. 2006. « Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids ». *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 405–430.

Li, S., K. Bindon, S. E. P. Bastian, V. Jiranek, et K. L. Wilkinson. 2017. « Use of Winemaking Supplements to Modify the Composition and Sensory Properties of Shiraz Wine ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65**(7): 1353-64.

Li, X. 2009. « Glutathione and Glutathione-S-Transferase in Detoxification Mechanisms », dans General and Applied Toxicology, Chichester, UK: John Wiley & Sons.

Lin, Y., N. G. Irani, et E. Grotewold. 2003. « Sub-cellular Trafficking of Phytochemicals Explored using Auto-fluorescent Compounds in Maize Cells ». *BMC Plant Biology*, **3**(10):1-12.

Liu, C., X. Wang, V. Shulaev, et R. A. Dixon. 2016. « A Role for Leucoanthocyanidin Reductase in the Extension of Proanthocyanidins ». *Nature Plants*, **2**(12): 16182.

Liu, J., A. Osbourn, et P. Ma. 2015. « MYB Transcription Factors as Regulators of Phenylpropanoid Metabolism in Plants ». *Molecular Plant*, **8**(5): 689-708.

Liu, X., R. Xie, Y. Fan, J. Hu, T. Luo, H. Li, et Z. Deng. 2014. « Polymerization of Proanthocyanidins Catalyzed by Polyphenol Oxidase from Lotus Seedpod ». *European Food Research and Technology*, **238**(5): 727-39.

Liu, Y., Z. Shi, S. Maximova, M. J. Payne, et M. J. Guiltinan. 2013. « Proanthocyanidin Synthesis in Theobroma Cacao: Genes Encoding Anthocyanidin Synthase, Anthocyanidin Reductase, and Leucoanthocyanidin Reductase ». *BMC Plant Biology*, **13**(202): 1-19.

Livak, K. J., et T. D. Schmittgen. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method ». Methods, **25**(4): 402-8.

Livne, A., et V. Vaadia. 1972. « Water deficits and hormone relations. » dans Water Deficits and plant growth, New-York: T.T KOZLOWSKI.

López, N., E. Puértolas, S. Condón, I. Álvarez, et J. Raso. 2008. « Effects of Pulsed Electric Fields on the Extraction of Phenolic Compounds during the Fermentation of Must of Tempranillo Grapes ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9**(4): 477-82.

Lorrain, B., K. Chira, et P. L. Teissedre. 2011. « Phenolic Composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon Grapes from Bordeaux Vineyard for the 2009-Vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 Vintages ». *Food Chemistry*, **126**(4): 1991-99.

Marinova, K., L. Pourcel, B. Weder, M. Schwarz, D. Barron, J.-M. Routaboul, I. Debeaujon, et M. Klein. 2007. « The Arabidopsis MATE Transporter TT12 Acts as a Vacuolar Flavonoid/H + -Antiporter Active in Proanthocyanidin-Accumulating Cells of the Seed Coat ». *The Plant Cell*, **19**(6): 2023-38.

Mattivi, F., U. Vrhovsek, D. Masuero, et D. Trainotti. 2009. « Differences in the Amount and Structure of Extractable Skin and Seed Tannins amongst Red Grape Varieties ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **15**(1): 27-35.

Maugé, C., T. Granier, B. Langlois d'Estaintot, M. Gargouri, C. Manigand, J. M. Schmitter, J. Chaudière, et B. Gallois. 2010. « Crystal Structure and Catalytic Mechanism of Leucoanthocyanidin Reductase from Vitis Vinifera ». *Journal of Molecular Biology*, **397**(4): 1079-91.

Mekoue Nguela, J., N. Sieczkowski, S. Roi, et A. Vernhet. 2015. « Sorption of Grape Proanthocyanidins and Wine Polyphenols by Yeasts, Inactivated Yeasts, and Yeast Cell Walls ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**(2): 660-70.

Mekoue Nguela, J., A. Vernhet, N. Sieczkowski, et J.-M. Brillouet. 2015. « Interactions of Condensed Tannins with Saccharomyces Cerevisiae Yeast Cells and Cell Walls: Tannin Location by Microscopy ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**(34): 7539-45.

Miller, K., R. Noguera, J. Beaver, C. Medina-Plaza, A. Oberholster, et D. Block. 2019. « A Mechanistic Model for the Extraction of Phenolics from Grapes During Red Wine Fermentation ». *Molecules*, **24**(7): 1275.

Min, T., H. Kasahara, DL. Bedgar, B. Youn, PK. Lawrence, DR. Gang, SC. Halls, H. Park, JL. Hilsenbeck, LB. Davin, NG. Lewis et C. Kang. 2003. « Crystal Structures of Pinoresinol-Lariciresinol and Phenylcoumaran Benzylic Ether Reductases and Their Relationship to Isoflavone Reductases ». *Journal of Biological Chemistry*, **278**(50): 50714-23.

Monagas, M., C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, O. Laureano, et J. M. Ricardo da Silva. 2003. « Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-Ol Composition of Wines and Grapes from Vitis Vinifera L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(22): 6475-81.

Morata, A., M. C. Gómez-Cordovés, J. Suberviola, B. Bartolomé, B. Colomo, et J. A. Suárez. 2003. « Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14): 4084-88.

Morel-Salmi, C., J. M. Souquet, M. Bes, et V. Cheynier. 2006. « Effet of Flash Release Treatment on Phenolic Extraction and Wine Composition ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(12): 4270-76.

Moreno-Arribas, M. V., et M. C. Polo. 2005. « Winemaking Biochemistry and Microbiology: Current Knowledge and Future Trends ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**(4): 265-86.

Moreno-Pérez, A., J. I. Fernández-Fernández, A. B. Bautista-Ortín, E. Gómez-Plaza, A. Martínez-Cutillas, et R. Gil-Muñoz. 2013. « Influence of Winemaking Techniques on Proanthocyanidin Extraction in Monastrell Wines from Four Different Areas ». *European Food Research and Technology*, **236**(3): 473-81.

Mueller, L. A., C. D. Goodman, R. A. Silady, et V. Walbot. 2000. « AN9, a Petunia Glutathione S-Transferase Required for Anthocyanin Sequestration, Is a Flavonoid-Binding Protein ». *Plant Physiology*, **123**(4): 1561-70.

Nel, A. P. 2018. « Tannins and anthocyanins: from their origin to wine analysis – a review ». *South African Journal of Enology & Viticulture*, **39**(1): 1-17.

Neuffer, M. G., E. H. Coe, et S. R. Wessler. 1997. Mutants of maize. Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Obreque-Slier, E., R. López-Solís, L. Castro-Ulloa, C. Romero-Díaz, et Á. Peña-Neira. 2012. « Phenolic Composition and Physicochemical Parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc Grape Seeds (Vitis Vinifera L.) during Ripening ». *LWT - Food Science and Technology*, **48**(1): 134-41.

Obreque-Slier, E., Á. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora-Marín, J. M. Ricardo-da Silva, et O. Laureano. 2010. « Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds and Skins from Carménère and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (Vitis Vinifera L.) during Ripening ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(6): 3591-99.

Ojeda, H. 1999. « Influence de la contrainte hydrique sur la croissance du péricarpe et sur l'évolution des phénols des baies de raisin (Vitis vinifera L.) cv. Syrah ». Ecole Nationale supérieure Agronomique de Montpellier.

Ollat, N., J.-P. Carde, J.-P. Gaudillère, F. Barrieu, P. Diakou-Verdin, et A. Moing. 2002. « Grape berry development : A review ». *OENO One*, **36**(3): 109-131.

Ooms, D. 2012. « Amélioration du tri de semences de chicorée industrielles (Cichorium intybus L.) sur base d'attributs mesurés par vision artificielle. » Université de Liège.

Pacottet, P. 2012. Viticulture. Rungis: Maxtor.

Panprivech, S., L. Lerno, C. Brenneman, D. Block, et A. Oberholster. 2015. « Investigating the Effect of Cold Soak Duration on Phenolic Extraction during Cabernet Sauvignon Fermentation ». *Molecules*, **20**(5): 7974-89.

Park, H.-S. 1995. « Le péricarpe des baies de raisin normales et millerandées: ontogénèse de la structure et évolution de quelques constituants biochimiques, notamment des tanins. » Université de Bordeaux I.

Pascual, O., E. González-Royo, M. Gil, S. Gómez-Alonso, E. García-Romero, J. M. Canals, I. Hermosín-Gutíerrez, et F. Zamora. 2016. « Influence of Grape Seeds and Stems on Wine Composition and Astringency ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**(34): 6555-66.

Pastenes, C., L. Villalobos, N. Ríos, F. Reyes, R. Turgeon, et N. Franck. 2014. « Carbon Partitioning to Berries in Water Stressed Grapevines: The Role of Active Transport in Leaves and Fruits ». *Environmental and Experimental Botany*, **107**: 154-66.

Pérez-Díaz, R., J. Madrid-Espinoza, J. Salinas-Cornejo, E. González-Villanueva, et S. Ruiz-Lara. 2016. « Differential roles for VviGST1, VviGST3, and VviGST4 in proanthocyanidin and anthocyanin transport in *Vitis vinífera* ». *Frontiers in Plant Science*, **7**(8): 1-13.

Petropoulos, S., A. Kanellopoulou, I. Paraskevopoulos, Y. Kotseridis, et S. Kallithraka. 2017. « Characterization of Grape and Wine Proanthocyanidins of Agiorgitiko (Vitis Vinifera L. Cv.) Cultivar Grown in Different Regions of Nemea ». *Journal of Food Composition and Analysis*, **63**: 98-110.

Petrussa, E., E. Braidot, M. Zancani, C. Peresson, A. Bertolini, S. Patui, et A. Vianello. 2013. « Plant Flavonoids: Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses ». *International Journal of Molecular Sciences*, **14**(7): 14950-73.

Peynaud, E. 1996. Le vin et les jours. Paris : Payot & Rivages.

Peyrot des Gachons, C., et J. A. Kennedy. 2003. « Direct Method for Determining Seed and Skin Proanthocyanidin Extraction into Red Wine ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(20): 5877-81.

Plaxton, W. C. 1996. « The organization and regulation of plant glycolysis ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**(1): 185-214.

Poitras, E., et A. Houde. 2002. « La PCR en temps réel: principes et applications ». *Reviews in Biology and Biotechnology*, **2**(2): 2-11.

Pourcel, L., J.-M. Routaboul, M. Kerhoas, M. Caboche, L. Lepiniec, et I. Debeaujon. 2005. « Transparent Testa 10 Encodes a Laccase-like Enzyme Involved in Oxidative Polymerization of Flavonoids in Arabidopsis Seed Coat ». *The plant cell online*, **17**(11): 2966-80.

Poustka, F., N. G. Irani, A. Feller, Y. Lu, L. Pourcel, K. Frame, et E. Grotewold. 2007. « A Trafficking Pathway for Anthocyanins Overlaps with the Endoplasmic Reticulum-to-Vacuole Protein-Sorting Route in Arabidopsis and Contributes to the Formation of Vacuolar Inclusions ». *Plant Physiology*, **145**(4): 1323-35.

Pratt, C. 1971. « Reproductive Anatomy of cultivated grapes - A review ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **22**(2): 92-109.

Prieur, C., J. Rigaud, V. Cheynier, et M. Moutounet. 1994. « Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds ». *Phytochemistry*, **36**(3): 781-84.

Rabot, A., C. Rousseau, A. Li-Mallet, L. Antunes, A. Osowski, et L. Geny. 2017. « Using of a combined approach by biochemical and image analysis to develop a new method to estimate seed maturity stage for Bordeaux area grapevine ». *OENO One*, **51**(1): 29-35.

Renard, C. M. G. C., A. A. Watrelot, et C. Le Bourvellec. 2017. « Interactions between Polyphenols and Polysaccharides: Mechanisms and Consequences in Food Processing and Digestion ». Trends in Food Science & Technology, **60**: 43-51.

Reynier, A. 2012. Manuel de viticulture: guide technique du viticulteur. Paris: Tec & Doc.

Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud, P. Darriet et G. De Revel. 2017. Traité d'oenologie -Tome 1, Microbiologie du vin, Vinifications. Paris : DUNOD.

Ribéreau-Gayon, P., Y. Glories, A. Maujean, et D. Dubourdieu. 2017. Traité d'oenologie -Tome 2, Chimie Du Vin, Stabilisation et Traitements. Paris : DUNOD.

Ristic, R., et P. G. Iland. 2005. « Relationships between Seed and Berry Development of Vitis Vinifera L. Cv Shiraz: Developmental Changes in Seed Morphology and Phenolic Composition ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11**(1): 43-58.

Roby, G., J. F. Harbertson, D. A. Adams, et M. A. Matthews. 2004. « Berry Size and Vine Water Deficits as Factors in Winegrape Composition: Anthocyanins and Tannins ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **10**(2): 100-107.

Rodríguez Montealegre, R., R. Romero Peces, J. L. Chacón Vozmediano, J. Martínez Gascueña, et E. García Romero. 2006. « Phenolic Compounds in Skins and Seeds of Ten Grape Vitis Vinifera Varieties Grown in a Warm Climate ». *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**(6-7): 687-93.

Romeyer, F. M., J. J. Macheix, et J. C. Sapis. 1985. « Changes and Importance of Oligomeric Procyanidins during Maturation of Grape Seeds ». *Phytochemistry*, **25**(1): 219-21.

Rousseau, J., et D. Delteil. 2000. « Présentation d'une méthode d'analyse sensorielle des baies de raisin. Principe, méthode, interprétation. » *Revue Française d'œnologie*, (183): 10-13.

Rousserie, P., A. Rabot, et L. Geny-Denis. 2019. « From Flavanols Biosynthesis to Wine Tannins: What Place for Grape Seeds? » *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **67**(5):1325-43.

Sacchi, K. L., L. F. Bisson, et D. O. Adams. 2005. « A Review on the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **56**(3): 197-206.

Salmon, J. M., P. Vuchot, T. Doco, et M. Moutounet. 2003. « Maintenance and Protection of Yeast Morphology by Contact with Wine Polyphenols During Simulation of Wine Aging on Lees ». *Journal of Food Science*, **68**(5): 1782-87.

Salmon, J.-M. 2006. « Interactions between Yeast, Oxygen and Polyphenols during Alcoholic Fermentations: Practical Implications ». *LWT - Food Science and Technology*, **39**(9): 959-65.

Salzman, R. A., T. Fujita, K. Zhu-Salzman, P. M. Hasegawa, et R. A. Bressan. 1999. « An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates ». *Plant Molecular Biology Reporter*, **17**(1): 11-17.

Sancher-Mundo, M. L., V. M. Escobedo-Crisantes, S. Mendoza-Arvizu, et M. E. Jramillo-Flores. 2016. « Polymerization of Phenolic Compounds by Polyphenol Oxidase from Bell Pepper with Increase in Their Antioxidant Capacity ». *CyTA - Journal of Food*, **14**(4): 594-603.

Savoi, S., Wong D.C.J., P. Arapitsas, M. Miculan, B. Bucchetti, E. Peterlunger, A. Fait, F. Mattivi et S.D. Castellarin. 2016. « Transcriptome and Metabolite Profiling Reveals That Prolonged Drought Modulates the Phenylpropanoid and Terpenoid Pathway in White Grapes (Vitis Vinifera L.) ». *BMC Plant Biology*, **16**(67):1-17.

Savoi, S., DCJ. Wong, A. Degu, JC. Herrera, B. Bucchetti, E. Perterlunger, A. Fait, F. Mattivi et SD. Castellarin. 2017. « Multi-Omics and Integrated Network Analyses Reveal New Insights into the Systems Relationships between Metabolites, Structural Genes, and Transcriptional Regulators in Developing Grape Berries (Vitis vinifera L.) Exposed to Water Deficit ». Frontiers in Plant Science, **8**(1124):1-19.

Setford, P. C., D. W. Jeffery, P. R. Grbin, et R. A. Muhlack. 2017. « Factors Affecting Extraction and Evolution of Phenolic Compounds during Red Wine Maceration and the Role of Process Modelling ». *Trends in Food Science & Technology*, **69**: 106-17.

Shi, J., J. Yu, J. E. Pohorly, et Y. Kakuda. 2003. « Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality ». *Journal of Medicinal Food*, **6**(4): 291-99.

Singleton, V. L., et P. Esau. 1969. « Phenolic Substances in Grapes and Wine, and Their Significance ». *Advances in Food Research*, **1**: 1-261.

Smith, P. A., J. M. McRae, et K. A. Bindon. 2015. « Impact of Winemaking Practices on the Concentration and Composition of Tannins in Red Wine: Impact of Winemaking Practices on Tannins ». *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **21**: 601-14.

Sparrow, A. M., R. G. Dambergs, K. A. Bindon, P. A. Smith, et D. C. Close. 2015. « Interaction of Grape Skin, Seed, and Pulp on Tannin and Anthocyanin Extraction in Pinot Noir Wines ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **66**(4): 472-81.

Stafford, H. A. 1974. « Possible Multienzyme Complexes Regulating the Formation of C6-C3 Phenolic Compounds and Lignins in Higher Plants » dans Recent Advances in Phytochemistry, Elsevier.

Stafford, H. A. 1990. Flavonoid metabolism. Boca Raton, Fla: CRC Press.

Stafford, H. A., et R. K. Ibrahim, éd. 1992. Phenolic Metabolism in Plants. Boston: Springer US.

Staudt, G., W. Schneider, et J. Leidel. 1986. « Phases of Berry Growth in Vitis Vinifera ». *Annals of Botany*, **58**(6): 789-800.

Stracke, R., M. Werber, et B. Weisshaar. 2001. « The R2R3-MYB Gene Family in Arabidopsis Thaliana ». *Current Opinion in Plant Biology*, **4**(5): 447-56.

Su, C. T., et V. L. Singleton. 1969. « Identification of three flavan-3-ols from grapes ». *Phytochemistry*, **8**(8): 1553-58.

Sun, B. S., T. Pinto, M. C. Leandro, J. M. Ricardo-Da-Silva, et M. I. Spranger. 1999. « Transfer of Catechins and Proanthocyanidins From Solid Parts of the Grape Cluster Into Wine ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **50**(2): 179.

Takaoka, M. 1939. « The Phenolic Substances of white Hellebore (Veratrum Grandiflorum Loes fil.) II ». *Nippon kagaku kaishi*, **60**(12): 1261-64.

Tanabata, T., T. Shibaya, K. Hori, K. Ebana, et M. Yano. 2012. « SmartGrain : High-Throughput Phenotyping Software for Measuring Seed Shape through Image Analysis ». *Plant Physiology*, **160**(4): 1871-80.

Tanner, G. J., K. T. Francki, S. Abrahams, J. M. Watson, P. J. Larkin, et A. R. Ashton. 2003. « Proanthocyanidin Biosynthesis in Plants: Purification of Legume Leucoanthocyanidin Reductase and Molecular Cloning of Its CDNA ». *Journal of Biological Chemistry*, **278**(34): 31647-56.

Tarascou, I. 2005. « Synthèse et caractérisation de procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin. » Université de Bordeaux I.

Thorngate, J. H., et V. L. Singleton. 1994. « Localization of Procyanidins in Grape Seeds ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**(2): 259-62.

Tokuyasu, K. T. 1973. « A Technique for Ultracryotomy of Cell Suspensions and Tissues ». *The Journal of Cell Biology*, **57**(2): 551-65.

Tombesi, S., A. Nardini, T. Frioni, M. Soccolini, C. Zadra, D. Farinelli, S. Poni, et A. Palliotti. 2015. « Stomatal Closure Is Induced by Hydraulic Signals and Maintained by ABA in Drought-Stressed Grapevine ». *Scientific Reports*, **5**(12449):1-12.

Treutter, D. 1989. « Chemical Reaction Detection of Catechins and Proanthocyanidins with 4-Dimethylaminocinnamaldehyde ». *Journal of Chromatography A*, **467**: 185-93.

Tzin, V., et G. Galili. 2010. « The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in Arabidopsis Thaliana ». *The Arabidopsis Book*, **8**(e0132) :1-18

Vasserot, Y., S. Caillet, et A. Maujean. 1997. « Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **48**(4): 433.

Vivas, N. 2007. Les composés phénoliques et l'élaboration des vins rouges. Féret.

Vogt, T. 2010. « Phenylpropanoid Biosynthesis ». *Molecular Plant*, **3**(1): 2-20.

Wagener, G. W. W. 1981. « The Effect of Different Thermovinification Systems on Red Wine Quality ». *American Journal of Enology and Viticulture*, **32**(3): 179-84.

Wang, X., X. He, J. Lin, H. Shao, Z. Chang, et R. A. Dixon. 2006. « Crystal Structure of Isoflavone Reductase from Alfalfa (Medicago Sativa L.) ». *Journal of Molecular Biology*, **358**(5): 1341-52.

Whan, A. P., A. B. Smith, C. R. Cavanagh, J.-P. F. Ral, L. M. Shaw, C. A. Howitt, et L. Bischof. 2014. « GrainScan: a Low Cost, Fast Method for Grain Size and Colour Measurements ». *Plant Methods*, **10**(23): 1-10.

Williams, C. A., et R. J. Grayer. 2004. « Anthocyanins and Other Flavonoids ». *Natural Product Reports*, **21**(4): 539-73.

Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, et J. A. L. Van Kan. 2007. « *Botrytis Cinerea*: The Cause of Grey Mould Disease ». *Molecular Plant Pathology*, **8**(5): 561-80.

Winkel-Shirley, B. 2001. « Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology ». *Plant Physiology*, **126**(2): 485-93.

Xie, D. Y., S. B. Sharma, et R. A. Dixon. 2004. « Anthocyanidin Reductases from Medicago Truncatula and Arabidopsis Thaliana ». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **422**(1): 91-102.

Xie, D.-Y., S. B. Sharma, N. L. Paiva, D. Ferreira, et R. A. Dixon. 2003. « Role of Anthocyanidin Reductase, Encoded by BANYULS in Plant Flavonoid Biosynthesis ». *Science*, **299**(5605): 396-99.

Xu, W., C. Dubos, et L. Lepiniec. 2015. « Transcriptional Control of Flavonoid Biosynthesis by MYB–BHLH–WDR Complexes ». *Trends in Plant Science*, **20**(3): 176-85.

Yu, K., J. H. Jun, C. Duan, et R. A. Dixon. 2019. « VvLAR1 and VvLAR2 Are Bi-Functional Enzymes for Proanthocyanidin Biosynthesis in Grapevine ». *Plant Physiology*, **180**(3):1362-74.

Zhang, H., L. Wang, S. Deroles, R. Bennett, et K. Davies. 2006. « New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals ». *BMC Plant Biology*, **6**(29):1-14.

Zhao, J. 2015. « Flavonoid Transport Mechanisms: How to Go, and with Whom ». *Trends in Plant Science*, **20**(9): 576-85.

Zhao, J., et R. A. Dixon. 2009. « MATE Transporters Facilitate Vacuolar Uptake of Epicatechin 3′- O -Glucoside for Proanthocyanidin Biosynthesis in Medicago Truncatula and Arabidopsis ». *The Plant Cell*, **21**(8): 2323-40.

Zhao, J., et R. A. Dixon. 2010. « The ‘Ins’ and ‘Outs’ of Flavonoid Transport ». *Trends in Plant Science*, **15**(2): 72-80.

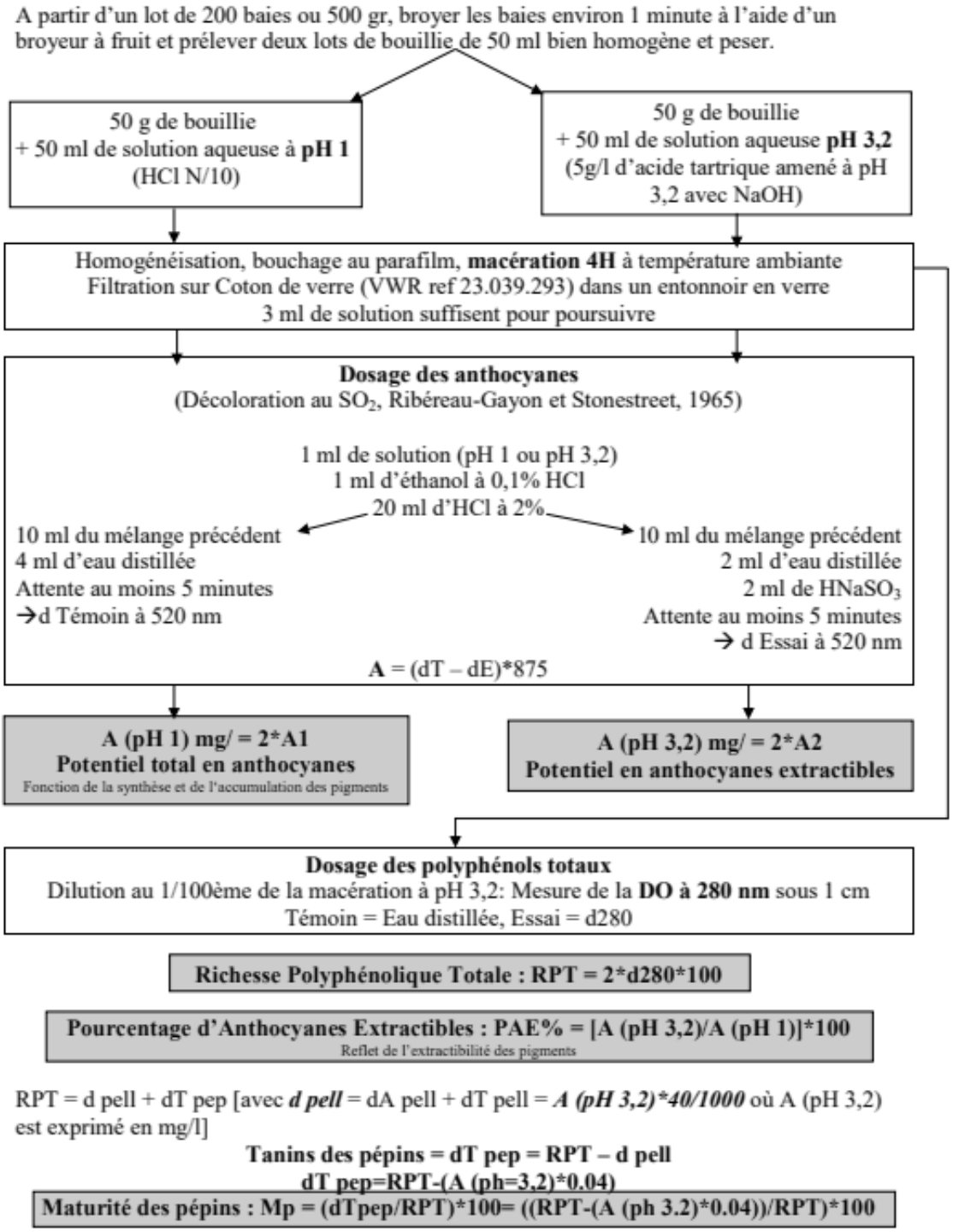
Zhao, J., Y. Pang, et R. A. Dixon. 2010. « The Mysteries of Proanthocyanidin Transport and Polymerization ». *Plant Physiology*, **153**(2): 437-43.

Zimmermann, U., G. Pilwat, et F. Riemann. 1974. « Dielectric Breakdown of Cell Membranes ». *Biophysical Journal*, **14**(11): 881-99.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Les méthodes d'évaluation de la maturité phénolique des raisins

La méthode Glories (d'après Ribéreau-Gayon et al., 2017)



RPT = d pell + dT pep [avec ***d pell*** = dA pell + dT pell = ***A (pH 3,2)*40/1000*** où A (pH 3,2) est exprimé en mg/l]

Tanins des pépins = dT pep = RPT – d pell

dT pep=RPT-(A (ph=3,2)*0.04)

Maturité des pépins : Mp = (dTpep/RPT)*100= ((RPT-(A (ph 3.2)*0.04))/RPT)*100

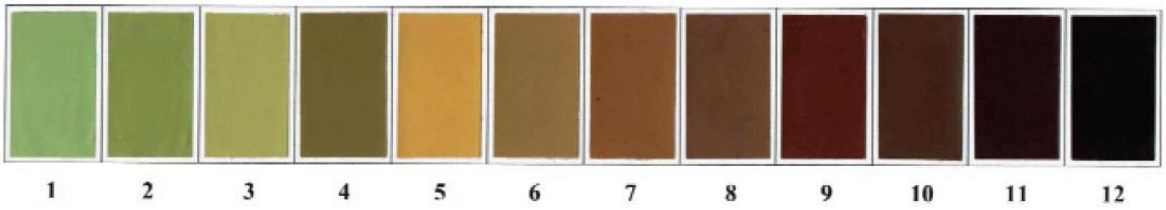
Approche sensorielle – Grille d'évaluation de la maturité phénolique des raisins (d'après Rousseau et al., 2000)

Analyse		Descripteurs	Note	Définitions	Évaluation
Dégustation de la pellicule	7	**Arômes de la pellicule :** *Mastiquer 10-12 fois les pellicules entre les molaires, puis noter les arômes dominants*	1	Herbacé (gazon coupé, pomme verte)	
			2	Neutre	
			3	Fruité (cépages rouges : framboise, cassis ; cépages blancs : pomme, poire)	
			4	Confiture (cépages rouges : mûre, bleuet, cuits ou non ; cépages blancs : abricot, pêche, cuits ou non)	
	8	**Résistance des pellicules :** *Examiner l'aspect du broyat.*	1	Pellicule très dure : présence de fragments grossiers en fin de mastication	
			2	Pellicule dure : présence de fragments fins en fin de mastication	
			3	Pellicule se broyant assez facilement, pâte presque homogène, présence de quelques fragments fins	
			4	Pellicule se broyant très facilement, formation d'un broyat homogène rapidement	
	9	**Astringence de la pellicule (tanins) :** Passer le broyat sur le palais puis *évaluer la difficulté à passer la langue sur le palais et à resaliver*	1	La langue glisse avec grande difficulté, difficulté à resaliver pendant quelques secondes	
			2	La langue glisse avec difficulté, difficulté à ressaliver	
			3	La langue est légèrement accrochée, pas de difficulté à resaliver	
			4	La langue glisse sans effort sur le palais, pas de difficulté à resaliver	
Examen visuel et gustatif des pépins	10	**Couleur des pépins**	1	Blanc ou jaune-vert	
			2	Brun pâle, légèrement vert	
			3	Brun gris, début de coloration rouge (certains cépages rouges)	
			4	Marron foncé ou rouge foncé	
	11	**Résistance des pépins :** *À l'aide de l'échelle, noter la sensation perçue lors de l'écrasement des pépins entre les incisives.*	1	Nécessité d'une forte pression des incisives pour écraser le pépin	
			2	Pépin encore humide, s'écrasant après une forte pression	
			3	Pépin encore dur, légèrement craquant	
			4	Pépin craquant facilement	
	12	**Arômes des pépins :** *Noter l'arôme dominant au cours du broyage des pépins entre les dents.*	1	Pépins encore verts : inapte à la dégustation	
			2	Vert, herbacé (gazon coupé)	
			3	Grillé (noix de Grenoble)	
			4	Torréfié (noisettes, amandes, aucun arôme herbacé résiduel)	
	13	**Astringence des pépins (tanins) :** *Passer le broyat sur le palais, puis la langue. Noter la sensation.*	1	La langue glisse avec grande difficulté	
			2	La langue glisse avec difficulté	
			3	La langue reste légèrement accrochée	
			4	La langue glisse sans effort sur le palais	

Type de maturité	Niveau de maturité				Anomalies ou particularités
	1	2	3	4	
Maturité texturale	Baies dures, parfois difficiles à égrener (selon le cépage), pellicules dures	Baies encore dures, parfois difficiles à égrener (selon le cépage), pellicules encore dures	Baies relativement élastiques, plus facile à égrener (selon le cépage), pellicules plus molles (fragments fins)	Baies relativement élastiques, plus facile à égrener (selon le cépage), pellicules plus molles (fragments fins, broyat presque en pâte)	Les pellicules demeurent assez rigides chez les cépages rustiques, comparativement aux *V. vinifera*.
Maturité technologique	Pulpe peu sucrée et très acide	Pulpe moyennement sucrée, acide	Pulpe sucrée, peu acide	Pulpe sucré, faiblement acide	**Frontenac :** pulpe à la fois acide et sucrée, même à maturité.
Maturité aromatique (pulpe et pellicule)	Arômes herbacés (pulpe, pellicules, pépins)	Arômes herbacés à neutre (pulpe, pellicules, pépins)	Arômes fruités (pulpe, pellicules) ; grillés, noix de Grenoble (pépins)	Arômes confiturés (pulpe, pellicules) ; grillés, noisettes (pépins)	Les **goûts terreux et/ou de moisi** sont anormaux ; faite évaluer vos raisins par un agronome afin de traiter adéquatement une maladie fongique, le cas échéant. Faites des évaluations sensorielles du raisin assez fréquemment afin de déceler toute progression. Les pellicules des cépages Frontenac et Marquette ont peu d'arômes comparativement à la pulpe et aux pépins.
Maturité phénolique	Reflets verts (cépages blancs) ou roses (cépages rouges)	Jaune paille (cépages blancs), rouge foncé (cépages rouges)	Jaune paille à ambrée (cépages blancs), rouge foncé à rouge sombre (cépages rouges), pinceau rouge sur le pédicelle	Jaune ambrée (cépages blancs), rouge sombre à noir (cépages rouges), pinceau rouge sur le pédicelle	
	Pépins verts ou jaune vert : ne pas déguster (fortement astringents)	Pépins gris-bruns, astringence	Pépins bruns ou rougeâtres, peu ou pas d'astringence	Pépins bruns foncés ou rouges, aucune astringence	

Approche visuelle (d'après Ristic et Iland, 2005)

Exemple de calcul



- <u>Etape 1 : 20 pépins</u>
- <u>Etape 2 : Moyenne des valeurs de la face dorsale</u>

5 pépins à couleur 9, 11 pépins à couleur 10, 4 pépins à couleur 11

$$\text{Couleur moyenne de la face dorsale} = \frac{(5 \times 9) + (11 \times 10) + (4 \times 11)}{20} = 10$$

- <u>Etape 3 : Moyenne des valeurs de la face ventrale</u>

5 pépins à couleur 8, 12 pépins à couleur 9, 3 pépins à couleur 10

$$\text{Couleur moyenne de la face ventrale} = \frac{(5 \times 8) + (12 \times 9) + (3 \times 10)}{20} = 8{,}9$$

- <u>Etape 4 : Estimation de la couleur moyenne des pépins</u>

$$\text{Couleur moyenne du pépin} = \frac{10 + 8{,}9}{2} = 9{,}5$$

- <u>Etape 5 : Pourcentage de coloration brune des pépins</u>

$$\text{Pourcentage de coloration brune des pépins} = \frac{9{,}5}{11} = 86\ \%$$

ANNEXE 2 : Script du logiciel ScanPep

```
library(EBImage)
library(rtiff)
library(mclust)
library(ggplot2)
library(grid)
library(stringr)


# _____ Fonctions _____

exclusion <- function(img_g, img_b) {
 y <- autoThreshold(img_b)
 img_thresh <- img_b
 img_thresh[img_b >= y[4]] <- 1
 img_thresh[img_b < y[4]] <- 0
 img_thresh <- fillHull(img_thresh)

  #intensites
  intensites <- imageData(img_thresh)
  intensites <- round(intensites,0)

  #image exclusion
  im_finale <- rotate(img_g * intensites, 0)
  display(im_finale, method="raster", all=T)

  return(im_finale)
}

recolorer <- function(intensites, Probas) {
  #matrices RGB vierges
  red   <- matrix(data = 0, nrow = nrow(intensites), ncol = ncol(intensites))
  green <- matrix(data = 0, nrow = nrow(intensites), ncol = ncol(intensites))
  blue  <- matrix(data = 0, nrow = nrow(intensites), ncol = ncol(intensites))
  ls_mat <- list(red, green, blue)

  #coloration des clusters
  for (i in 1 : 3) {
    values <- Probas[Probas[,ncol(Probas)] == i, 1]
    if (length(values) > 0) {
      min <- min(values)
      max <- max(values)
    } else {
      min <- 0
      max <- 0
    }
    ls_mat[[i]][intensites >= min & intensites <= max ] <- 1
  }


  #faire apparaitre l image segmentee
  recolo = rgbImage(ls_mat[[3]], ls_mat[[2]], ls_mat[[1]])
  display(recolo, method='raster')
```

```
  display(recolo)
  names(ls_mat) <- c("blue", "green", "red")
  return(ls_mat)
}

extrac_coord <- function(im_exclu){
  im_bw <- bwlabel(im_exclu )
  s = computeFeatures.shape(im_bw)
  m = computeFeatures.moment(im_bw)
  features <- data.frame(area = s[,"s.area"], radius = s[,"s.radius.max"], x = m[,"m.cx"], y = m[,"m.cy"])
  features <- features[order(features$y), ]
  d <- dim(im_exclu)
  g <- 0
  coord <- data.frame(group = integer(0), c1 = numeric(0), c2 = numeric(0), l1 = numeric(0), l2 = numeric(0))
  for(i in 1 : nrow(features)){
    if (features$area[i] > 900){
      # calcul des coordonnees des lignes entourant un pepin
      c1 <- features$x[i] - (features$radius[i] + features$radius[i] * 0.10)
      c2 <- features$x[i] + (features$radius[i] + features$radius[i] * 0.10)
      l1 <- features$y[i] - (features$radius[i] + features$radius[i] * 0.10)
      l2 <- features$y[i] + (features$radius[i] + features$radius[i] * 0.10)

      # verif que les coordonnees soient dans les dimensions de l'image
      if (c1 < 0){
        c1 <- 0
      }
      if (l1 < 0){
        l1 <- 0
      }
      if (c2 > d[1]){
        c2 <- d[1]
      }
      if (l2 > d[2]){
        l2 <- d[2]
      }

      g <- g+1

      # ajout du groupe et des coordonn?es
      b <- data.frame(group = paste("P", g, sep = ""), c1 = c1, c2 = c2, l1 = l1, l2 = l2)
      coord <- rbind(coord, b)
    }
  }
  return(coord)
}

multiplot <- function(plots, plotlist=NULL, file, cols=1, layout=NULL, pepin) {
  require(grid)

  # Make a list from the... arguments and plotlist
  numPlots = length(plots)

  # If layout is NULL, then use 'cols' to determine layout
```

```
  if (is.null(layout)) {
    # Make the panel
    # ncol: Number of columns of plots
    # nrow: Number of rows needed, calculated from number of cols
    layout <- matrix(seq(1, cols * ceiling(numPlots/cols)),
                     ncol = cols, nrow = ceiling(numPlots/cols))
  }

  # Set up the page
  grid.newpage()
  pushViewport(viewport(layout = grid.layout(nrow(layout)+1, ncol(layout))))

  # Make each plot in the correct location
  for (i in 1:numPlots) {
    # Get the i,j matrix positions of the regions that contain this subplot
    matchidx <- as.data.frame(which(layout == i, arr.ind = TRUE))

    print(plots[[i]], vp = viewport(layout.pos.row = matchidx$row+1,
                                    layout.pos.col = matchidx$col))
  }

} # end of function multiplot


# _____________ Programme _______



clustering_pepins <- function(image) {

  verif_coord = FALSE
  nombre_clusters <- 3
  setwd(dirname(image))

  im <- readImage(image) #lire l image
  display(im, method='raster')
  display(im)
  img_g <- channel(im, 'green')
  img_b <- channel(im, 'blue')
  display(img_g, method='raster')
  display(img_b, method='raster')
  im_brute <- imageData(img_g)

  #inverse car le background doit etre noir
  img_g = 1 - img_g
  img_b = 1 - img_b

  # ----- exclusion (enleve fond)
  im_exclu <- exclusion(img_g = img_g, img_b = img_b)
  display(im_exclu , method="raster", all=T)

  # recupere cluster de la BDD

  ##############################################
  ##############################################
```

```
# Changer le chemin d'acces au fichier de donnees

Probas <- read.table("~/Documents/maturite_pepin/scanpep/script/val_2014_2015.txt")

###############################################
###############################################


# recolorer
intensites <- imageData(im_exclu)
image_recolo <- recolorer(intensites, Probas)

#extraire les infos pour chaque pepin
#matrice des coordonnes
coord <- extrac_coord(im_exclu)

#matrice de resultats
couleurs <- c("rouge", "vert", "bleu")
matrice <- matrix(data=NA, ncol=nombre_clusters, nrow=nrow(coord)+1)
rownames(matrice) <- c(coord[,1], "P")
colnames(matrice) <- couleurs[1:nombre_clusters]

#extraire le nombre de pixels appartenant a chaque cluster
plots <- NULL
red <- 0
green <- 0
blue <- 0
for (i in 1:nrow(coord)) {
  if (verif_coord == TRUE) {
    Im <- im_brute[coord[i,2]:coord[i,3], coord[i,4]:coord[i,5]]
    g <- rasterGrob(Im, interpolate=TRUE)

    base <- qplot(1:7, 1:7, geom = "blank") +
      labs(title=coord[i,1])+
      theme(
        panel.grid=element_line("transparent"),
        panel.grid.major=element_line("transparent"),
        panel.grid.minor=element_line("transparent"),
        axis.ticks=element_line("transparent"),
        axis.text.x=element_blank(),
        axis.text.y=element_blank(),
        axis.title.x=element_blank(),
        axis.title.y=element_blank(),
        legend.position="none",
        panel.background=element_rect(fill="transparent"),
        plot.title = element_text(size = 9)
      ) +
      annotation_custom(g, xmin=-Inf, xmax=Inf, ymin=-Inf, ymax=Inf)
    plots <- c(plots, list(base))
  }

  #lire sur le canal 1
  selection <- image_recolo$red[coord[i,2]:coord[i,3], coord[i,4]:coord[i,5]]
  matrice[i, "rouge"] <- sum(selection)
  red <- red + sum(selection)
```

```
   #lire sur le canal 2
   selection <- image_recolo$green[coord[i,2]:coord[i,3], coord[i,4]:coord[i,5]]
   matrice[i, "vert"] <- sum(selection)
   green <- green + sum(selection)

   #lire sur le canal 3
   selection <- image_recolo$blue[coord[i,2]:coord[i,3], coord[i,4]:coord[i,5]]
   matrice[i, "bleu"] <- sum(selection)
   blue <- blue + sum(selection)
  }
  matrice[i+1, "rouge"] <- (red / (red+green+blue)) * 100
  matrice[i+1, "vert"] <- (green / (red+green+blue)) * 100
  matrice[i+1, "bleu"] <- (blue / (red+green+blue)) * 100

  if (verif_coord == TRUE) {
   cat("verification des coordonnees", "\n")
   multiplot(plots,cols=ceiling(sqrt(length(plots))))
  }

  write.table(matrice, paste("clustering_", basename(image), ".txt", sep=""), sep=";")
  moys  <- colMeans(matrice)
  pie(moys, labels = NA, col = c("red", "green", "blue"), main=basename(image))
}



# _____
```

De la biosynthèse des flavanols aux tanins du vin : quelle place pour les pépins de raisin ?

La maturité phénolique de la baie tient compte de la teneur en composés phénoliques de la baie, mais également de leur potentiel d'extractibilité dont dépend leur diffusion dans le vin. Même si ce phénomène commence à être assez bien connu, et maîtrisé pour les parties charnues de la baie, très peu de travaux portent sur la maturité phénolique du pépin. Or, la teneur en tanins des pépins pouvant, dans certains cépages, représenter jusqu'à dix fois celle de la pellicule, ils constituent une part importante des tanins de la baie. Ainsi, la connaissance parfaite de la composition tanique des pépins, de leur biosynthèse, de leur localisation ainsi que la maîtrise de leur extraction durant la vinification constituent des enjeux majeurs pour maitriser la qualité du vin fini.

Notre travail, combinant des approches chimiques, moléculaires, microscopiques et œnologiques, apporte de nouvelles connaissances sur les teneurs, la biosynthèse, la localisation et l'extractibilité des tanins de pépins permettant d'élaborer un outil d'évaluation de la maturité des pépins (dénommé SCANPEP) pour aider le viticulteur dans le choix de la date de vendange et le vinificateur dans ses choix d'itinéraires de vinification.

Ainsi, nos travaux ont mis en évidence une conservation du métabolisme phénolique des pépins de raisin commun à tous les cépages étudiés. Les teneurs en tanins des pépins présentent un profil en cloche jusqu'à véraison, suivie d'une période de dégradation et/ou perte d'extractibilité jusqu'à environ 3 semaines avant la vendange. Le millésime, le cépage et la nature du sol ne modifient pas ce profil mais peuvent impacter soit le degré de polymérisation, soit le pourcentage de galloylation, soit les teneurs finales en proanthocyanidines. La synthèse des flavanols, réalisée au niveau des plastes et des parois cellulaires, conduit à une accumulation tissulaire progressive des tanins, partant du bec jusqu'au corps du pépin, et des tissus les plus externes vers les plus internes. Enfin, par une originale approche de nano-vinification, nos résultats ont permis de démontrer que les variations du potentiel d'extractibilité des tanins de pépins ne pouvaient s'expliquer uniquement par les variations de maturité de ce dernier, soulevant ainsi l'importance de la composition de la matrice vin dans le phénomène d'extractibilité des tanins de pépins.

Mots clés : Maturité phénolique, Pépin de raisin, Tanin, Biosynthèse, Localisation, Extractibilité

From flavanols synthesis to wine tannins: what place for grape seed?

In oenology, the notion of berry phenolic maturity is related to the phenolic content of the berry, but although to their extractability capacity in wine. Nowadays, this phenomena starts to be well understood for berry fleshy parts. Nevertheless, despite the fact that seed tannins content can be ten-fold higher than the skin one, there is few works facing seed phenolic maturity. In this context, it appears clear that the perfect knowledges of the evolution of seed tannins content, biosynthesis, location and extractability all along the berry development will be helpful to control finale wine quality.

Our work, which is combining chemistry, molecular, microscopy approaches bring knew knowledges in order to better characterize the seed phenolic maturity. Drawing on this expertise, we have elaborated a new indicator of seed phenolic maturity (ScanPep), useful to estimate the harvest date, but although to choose winemaking itinerary.

This study brings to light that seed phenolic metabolism is conserved through vine species. Indeed, the evolution of seed content all along the berry development seems to be shared by all the studied seeds: an augmentation of seed tannins content until veraison, followed by a period of degradation/ loss of extractability until three weeks before harvest. Vintages, species or soil natures seems to not affect this profile, but can affect structural tannins characteristics such as the percentage of galloylation, the degree of polymerisation or the finale tannins content. The flavanols synthesis which is realized in plastids and cell walls leads to a progressive tissue accumulation of tannins in seed: from seed beak to seed body, and from extern to intern tissues. Finally, by an original approach of nano-vinification, we have proved that variations of seed tannins extractability cannot be explained only by variations of seed maturity, raising the importance of wine matrix content in seed tannins extractability.

Keywords: Phenolic maturity, Grape seed, Tannin, Biosynthesis, Location, Extractability

---

Unité de Recherche Oenologie, EA 4577, USC 1366 INRA,
Institut des Sciences de la Vigne (ISVV) et du Vin, Université de Bordeaux,
F33882 Villenave d'Ornon