

# Synthèse des travaux en cours sur la rotundone, un composé aromatique puissant responsable des notes poivrées dans les vins

M.J. Herderich<sup>1</sup>, T.E. Siebert<sup>1</sup>, M. Parker<sup>1</sup>, D.L. Capone<sup>1</sup>, C. Mayr<sup>1</sup>, P. Zhang<sup>2</sup>, O. Geffroy<sup>3</sup>, P. Williamson<sup>1</sup>, I.L. Francis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Australian Wine Research Institute, PO Box 197, GLEN OSMOND, SA 5064, Australie

<sup>2</sup>School of Land and Environment, University of Melbourne, Grattan Street, PARKVILLE, Vic 3010, Australie.

<sup>3</sup>Institut Français de la Vigne et du Vin Pôle Sud-Ouest, 81 310 LISLE SUR TARN, France.

Email : markus.herderich@awri.com.au

## Introduction

La Syrah fait partie des 6 premiers cépages mondiaux avec le Merlot, le Cabernet Sauvignon, le Pinot Noir, le Sauvignon et le Chardonnay. La surface plantée en Syrah a progressé très rapidement, de moins de 10.000 ha au début des années 1980, à plus de 140.000 ha en 2004/2005. 50 % de la Syrah mondiale est produite en France, et 25% en Australie. Le reste se répartit entre l'Argentine, l'Afrique du Sud, la Californie, le Chili, les USA, l'Italie, la Nouvelle-Zélande, la Grèce, l'Espagne, la Suisse et d'autres petits pays producteurs.

La Syrah est le cépage emblématique de l'Australie et représente 380.000 tonnes soit 45% des raisins rouges et 22.9% des 1,66 million de tonnes de raisins produits dans le pays en 2011/2012. La Shiraz (le nom utilisé par beaucoup de pays producteurs de nouveau Monde pour désigner le cépage connu en France sous le nom de Syrah) est un cépage ancien, et on estime qu'il a émergé à partir de la Mondeuse Blanche et du Dureza dans le Nord de la Vallée du Rhône 100 ans avant JC (1) ; Il s'agit également de l'un des premiers cépages à être arrivé en Australie en 1832. A ce jour, des raisins provenant de plants de vigne plantés il y a plus de 120 à 160 ans dans la Hunter Valley dans le Victoria et dans la Barossa Valley, continue à être productif. Les vins de Shiraz possèdent une vaste et intéressante palette aromatique en fonction des régions, allant de la prune aux fruits rouges, en passant par le chocolat, la liqueur ou les épices. La Shiraz est un cépage très versatile et peut être utilisé seul ou en assemblage avec du Cabernet Sauvignon, du Grenache, du Mourvèdre ou du Viognier. Parmi les différents styles de Shiraz rencontrés en Australie, on peut citer les vins très poivrés des régions à climat froid (comme par exemple Adelaide Hills ou les Grampians), les vins plus aromatiques et épicés aux arômes parfois mentholés de Margaret River, de Coonawarra ou de Clare Valley ; les vins chocolatés au fruit très mûr (Barossa Valley, Maclareen Vale), et les vins riches aux notes de cuir de la Hunter Valley.

Malgré l'importance de la Shiraz pour la filière vitivinicole australienne, très peu de connaissances étaient disponibles jusqu'à récemment sur les composés aromatiques contribuant à la perception sensorielle de ses vins. Empiriquement, à travers les commentaires de dégustation, les contre-étiquettes des bouteilles de Shiraz australiennes, on peut réaliser à quel point le caractère épicé ou poivré est essentiel pour les Shiraz australiennes de qualité. Ce caractère poivré fait partie quelque part de la quintessence australienne, et peut même être considéré comme faisant partie du terroir d'un vin donné, et ce même lorsque le composé responsable de ces arômes particuliers n'avait pas encore été identifié. Il était aussi très fondamental de pouvoir isoler et de mieux comprendre un composé aromatique aussi important pour nos raisins et nos vins.

## 1. Identification de la rotundone comme composé aromatique clé dans les raisins et dans le vin

Lors d'expérimentations ultérieures, des extraits de raisin de Shiraz ont été étudiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à

de l'olfactométrie (GC-O) et par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Aucune région de composés connus ne correspondait au caractère épicé ou poivré. Cependant, ces arômes poivrés pouvaient être perçus sensoriellement dans les baies de raisin, et dans les homogénats de raisins de Shiraz épépinés. A partir des observations empiriques montrant l'existence de parcelles « poivrées » produisant de manière régulière des vins « poivrés », spécialement lors de millésimes frais, des échantillons de raisins potentiellement « poivrés » ont été prélevés dans 12 vignobles d'Australie méridionale et du Victoria. 18 échantillons de raisin ont ainsi été caractérisés à l'aide de descripteurs aromatiques, incluant le caractère poivré. **Ce caractère « poivre noir » était indépendant des notes végétales ou de raisins secs également présent.** L'étude sensorielle a révélé une forte corrélation entre l'intensité de l'arôme poivré et l'intensité du caractère poivré en bouche. Ceci nous a permis de nous focaliser sur l'étude des composés volatils du raisin pour les expérimentations à venir. Les analyses chimiques classiques de ces échantillons de raisins ont porté sur le pH, l'acidité totale, et le degré potentiel (TSS=total suspended solids). **Aucune tendance permettant de relier la maturité des raisins, leur qualité aux notes sensorielles du caractère poivré n'a pu être mise en évidence.**

Afin d'étudier tous les métabolites volatils du raisin d'une manière compréhensive, non limitative, des échantillons d'homogénats de raisin ont été analysés par GC-MS avec espace de tête statique. Pour les expériences de la métabolomique, un système d'entrée froide a été utilisé. Il nous a permis d'atteindre un enrichissement des composés aromatiques volatils présent à l'état de trace, améliorer les limites de détection dans des très basses valeurs exprimées en ppb, d'éviter des phénomènes de discrimination indésirables et des éventuels effets de matrice à partir de techniques d'échantillonnage tels que la SPME. Cette analyse par GC-MS nous a donné plus de 13000 spectres de masse individuelle pour chaque échantillon de raisins. Avant de procéder à une analyse multivariée, les données ont été prétraitées en utilisant un lissage et une procédure de normalisation. Afin d'expliquer l'intensité de la note du caractère « poivré », une analyse en composantes principales et une régression par la méthode des moindres carrés ont été utilisées afin d'élaborer des modèles multivariés basés sur les spectres de masse et les descripteurs aromatiques. L'optimisation de cette méthodologie nous a permis de sélectionner **une seule région du chromatogramme GC-MS permettant la prédiction de l'intensité de l'arôme «poivre»** avec un coefficient de corrélation > 0,98. Ceci a conduit à l'identification de l' $\alpha$ -ylangene, un sesquiterpène tricycliques, qui a été confirmé par co-injection à l'aide d'un composé de référence. Bien que n'étant pas un composé aromatique majeur en soi, l' $\alpha$ -ylangene était un très bon marqueur de l'arôme «poivré», et ses concentrations dans les vins permettaient de discriminer sur le caractère «poivré» vignobles et millésimes de la même manière que les modèles multivariés (2).

Dans le même temps nous avons manqué la détection du composé arôme clé d'impact en raison de sa très faible concentration et de son bas seuil de perception. **L'identification de la rotundone, le composé clé responsable des notes «poivrées» dans les extraits de Piper nigrum et les raisins de Shiraz,** a nécessité des expériences traditionnelles de GC-MS-O, s'est avéré possible seulement après

optimisation complexe de la préparation des échantillons et enrichissement assistés sensoriellement, (3). La chose a été d'autant plus compliquée que le temps d'éluion était particulièrement long et que le composé sortait en fin de l'analyse par GC-MS-O. Finalement, la présence de rotundone a été mise en évidence dans du poivre enrichi et des extraits de raisin par GC-MS-O et co-injections avec des quantités croissantes du composé synthétisé.

## 2. Propriétés sensorielles de la rotundone

Une fois identifiée la rotundone comme composé aromatique, nous avons développé une méthode robuste d'analyse afin de la quantifier par analyse par dilution isotopique (SIDA) et GC-MS (4). Plus récemment, l'analyse quantitative de la rotundone a été redéfinie en utilisant une chromatographie en phase gazeuse en deux dimensions qui nous a permis de résoudre le problème lié aux composés co-élus. Ceci nous a permis de mener des expériences sensorielles afin de mieux comprendre les propriétés aromatiques de la rotundone, et de comparer ces résultats sensoriels aux concentrations très faibles de la molécule dans les raisins et les vins. Une très bonne corrélation a ainsi pu être observée entre la concentration en rotundone et les notes moyennes du caractère poivré observé par les dégustateurs, à la fois dans les raisins et dans les échantillons de vin. Ceci nous indique que la rotundone, à de très faibles concentrations de l'ordre du ng/kg, est un contributeur important au caractère poivré des raisins et des vins de Shiraz. **Au delà, le seuil de perception de la rotundone a été évalué à 8 ng/L dans l'eau, et de 16 ng/L dans le vin rouge (3).**

**Fait majeur: approximativement 20% des dégustateurs n'ont pas été en mesure de détecter la rotundone lors du test de détermination de son seuil, même lorsque sa concentration était 500 fois supérieure à son seuil de détection dans l'eau (3). Par conséquence l'expérience sensorielle de deux consommateurs en train de déguster le même verre de Shiraz peut être très différente.** Pour continuer ces observations, une étude sensorielle a permis d'étudier l'effet de la rotundone (poivre noir) en association avec l'eucalyptol (menthe, camphre, eucalyptus) et du gäïacol (fumé), lorsque celle-ci était rajoutée à des niveaux moyens à élevés dans des vins rouges. Cette étude a permis d'explorer les préférences et les tolérances des consommateurs vis à vis des composés aromatiques naturellement présents et décrits comme « poivrés », « eucalyptus » et « fumée », et a permis de comprendre les niveaux indésirables de ces composés dans les vins. Les propriétés sensorielles ont été déterminées de manière descriptive par un panel sensoriel de dégustateurs, et par un jury de 104 consommateurs de la région d'Adélaïde qui à la suite de la dégustation des vins, leur ont attribué des notes de préférence. L'étude descriptive a permis de démontrer que les descripteurs « fruits rouges », « fruits noirs », « vanille », « fumée », « poivre », « menthe/eucalyptus », « vanillé en bouche », « fumée en bouche », « menthe/eucalyptus en bouche » et « poivre en bouche » étaient significativement différents parmi les échantillons. A travers le test de préférence, trois groupes différents de consommateurs avec des préférences similaires ont pu être identifiés par analyse de cluster : l'addition de rotundone possède un effet positif sur 1/3 des consommateurs, et est neutre sur le reste sur le reste du panel. Afin d'évaluer l'effet de la rotundone sur la qualité ressentie par les consommateurs, des études complémentaires sont nécessaires en utilisant d'autres vins de base, en présence d'autres composés influençant l'acidité, le caractère végétal et le caractère fruité.

## 3. Fréquence de la rotundone dans les vins commerciaux

Grâce à cette identification et au développement de méthodes analytiques, nous avons pu commencer à étudier plusieurs facteurs qui peuvent contribuer aux caractères poivrés, comme par exemple le cépage, le clone et la région. Pour connaître la distribution de la

rotundone et orienter les études à venir, des analyses ont été réalisées sur une large sélection de vins commerciaux australiens (137 vins rouges sélectionnés chez des cavistes locaux) de différents cépages et millésimes en provenance de plusieurs régions (5). La majorité d'entre-eux étaient bouchés à l'aide de capsules à vis et de liège naturel, et comprenaient de la Shiraz, du Merlot, du Durif, du Pinot Noir, du Cabernet Sauvignon et plusieurs autres vins intéressants, en provenance de régions viticoles populaires. Les millésimes de la sélection variait du début des années 1990 jusqu'en 2006. La figure n°1 représente les concentrations en rotundone analysées, le cépage et la région des échantillons où la molécule était présente. Pour la grande majorité des vins (81%) la molécule n'a pu être détectée et parmi les vins qui contenaient de la rotundone, 62% étaient des vins de Shiraz. Au travers de la figure n°1, **il apparaît clairement que des niveaux de rotundone supérieurs au seuil de perception (< 16 ng/L) sont fréquemment mis en évidence dans les vins provenant de régions ou de millésimes frais et ne sont pas limités aux vins de Shiraz.** Cette fréquence importante de rotundone dans le vin, est en accord avec des observations réalisées précédemment (3,6) et des résultats récents obtenus par l'équipe de recherche de Mattivi sur les cépages Schoppettino, Vespolina et Grüner Veltiner. En collaboration avec l'IFV Sud-Ouest, il a également été mis en évidence que la rotundone était un contributeur clé dans l'arôme des vins de Duras et de Pineau d'Aunis. La molécule a également été mise en évidence dans des vins de Graciano et de Gamay à des concentrations voisines du seuil de perception. Au-delà des raisins et des vins, la rotundone a également été retrouvée à des concentrations nettement supérieures dans d'autres herbes et épices courantes, particulièrement le poivre noir et blanc où elle a été retrouvée à des niveaux d'environ 10.000 fois ceux des vins poivrés (3).

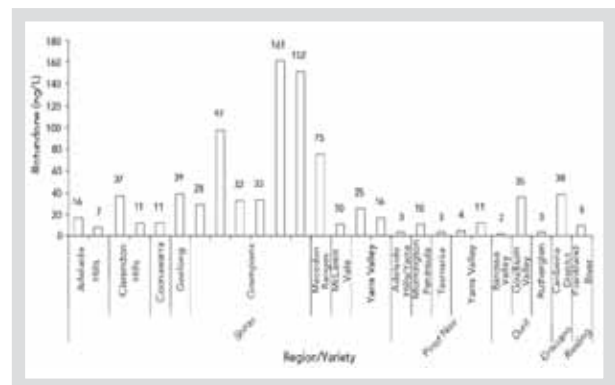


Figure 1. Concentrations en rotundone dans des échantillons commerciaux de vins australiens (5)

Afin de caractériser la stabilité de la molécule dans les vins pendant le vieillissement, nous avons étudié les effets de plusieurs obturateurs sur le niveau en rotundone des vins en bouteille (5).

Afin de mener à bien cette étude, des vins de Shiraz ont été dopés en rotundone à un niveau d'environ 100 ng/L. Des bouteilles (750 ml - 24 répétitions pour chaque obturateur), ont été obturés avec soit du liège naturel, du bouchon synthétique de la capsule à vis ou bien un obturateur en verre, et ont servi de témoin au moment de l'embouteillage. Trois échantillons par modalité ont été analysés après 0, 6, 12 et 39 mois. Aucune modification du niveau de rotundone des vins n'a été observée jusqu'à 39 mois, même si une légère perte a pu être observée sur le bouchon synthétique (environ 6% par rapport à la concentration originale). **La stabilité de la rotundone dans les conditions œnologiques et l'absence d'évolution dans le temps,** indiquent que les caractéristiques poivrées d'un vin donné à la mise en bouteille sont peu enclines à changer dans le temps au cours du stockage. Un vin de Shiraz de la région des Grampians possédant le niveau le plus élevé en rotundone (161 ng/L), comme le montre la figure n°1, provenait du millésime 2002 alors qu'un autre vin de Shiraz de la même région du millésime 1999 présentait toujours un niveau de 152 ng/L, 10 ans après sa mise en bouteille.

## 4. Facteurs influençant la concentration en rotundone des raisins et des vins

La rotundone est un composé aromatique plutôt inhabituel puisqu'il fait partie du petit groupe des arômes à fort impact (de la même manière que l'isobutyl-méthoxy-pyrazine et les monoterpènes) qui proviennent directement des raisins. Nous assumons le fait que la rotundone présente dans le vin peut être extraite sans aucune transformation chimique ou biochimique au cours de la vinification. Ceci contraste avec de nombreux composés volatils qui sont libérés à partir de précurseurs inodores (glycosylés ou conjugués à la cystéine) ou produits entièrement par la levure au cours de la fermentation. Etant donné la relation directe raisin-vin existante pour la rotundone (3,8), le faible seuil de perception de ce composé (3) et sa stabilité dans le vin (5), cela rend envisageable le pilotage des concentrations en rotundone dans le vin grâce à la sélection clonale, aux techniques viticoles et aux process de vinification.

Tout d'abord, il nous a fallu déterminer comment se développait la rotundone dans la baie, où elle était localisée et quel pourcentage était extrait des raisins au cours de la vinification. Afin d'étudier la formation, la localisation et l'extraction de la rotundone, et étant donné que le rôle majeur du climat sur la concentration des raisins et des vins en rotundone (3,5), un vignoble de la région d'Adélaïde Hills planté à l'aide de deux clones de Shiraz (1127 et 2626) a été choisi pour son climat frais et sa production régulière de raisins modérément poivrés. Afin de suivre les niveaux de rotundone dans les raisins pendant la maturation, des échantillons de grappes ont été prélevés sur des rangs comparables des deux clones à la mi-véraison, entre la mi-véraison et la récolte et un jour avant la récolte commerciale. Au début de la maturation, des niveaux très faibles de rotundone dans les raisins (typiquement en-dessous de 5 pg/baie) ont été mis en évidence. La majorité de la rotundone s'accumule les 6 dernières semaines de la maturation. A la récolte, des niveaux supérieurs en ce composé (20 pg/baie) ont été mis en évidence dans les clones 2626, ce qui est en accord avec la croyance empirique que le clone 2626 et un clone épicé (9). Des études réalisées dans plusieurs régions australiennes, néo-zélandaises sur Shiraz et en France sur Duras ont confirmé que **la concentration en rotundone des raisins augmentait de façon significative à l'approche de la récolte**, et atteignait un plateau ou diminuait très légèrement avec la surmaturité (donnée non publiée).

Afin d'étudier la localisation de la rotundone dans les raisins de Shiraz, nous avons analysé des échantillons de raisins frais à la récolte, séparé les pellicules de la pulpe, le jus des pépins et la pulpe du jus en éliminant les pépins. **La rotundone a été uniquement retrouvée dans les pellicules de raisins de Shiraz mais n'a pas pu être détectée dans la pulpe, dans le jus ou dans les pépins après séparation.** Même si cette expérimentation concerne une quantité limitée d'échantillons et que des travaux complémentaires sont nécessaires avant de pouvoir en tirer des conclusions définitives, la conclusion que la rotundone est localisée dans les pellicules est en accord avec d'autres résultats de recherche (8). L'extraction de la rotundone des raisins dans le vin a été étudiée en mesurant sa concentration dans des échantillons prélevés tous les jours pendant la fermentation dans un chai commercial sur deux clones, du moût initial avant fermentation jusqu'au décuvage. Des clones de Shiraz 1127 et 2626 ont été récoltés le même jour à une maturité similaire et les process œnologiques mis en œuvre étaient identiques entre les deux modalités. Dans cet essai, **la plupart de la rotundone a été extraite des raisins entre le 2ème et 5ème jour et le niveau de ce composé a atteint un plateau dans toutes les fermentations avant le décuvage.** D'une manière générale, ces données sont cohérentes avec une rapide extraction de la rotundone à partir des pellicules au cours de la fermentation. La phase de latente entre l'encuvage le jour 0 et le jour 2 (jour 3 pour la fermentation du clone 1127) indique que les concentrations en éthanol et/ou tout autre effet en lien avec les levures peuvent interagir et faciliter l'extraction de ce composé.

Dans les pellicules des clones de Shiraz 1127, la rotundone a été quantifiée à une concentration de 24.7 ng/kg, et à 49.5 ng/kg dans le clone 2626. Ceci démontre que le clone peut jouer rôle très important puisque des niveaux supérieurs en rotundone ont été trouvés dans les clones de Shiraz 2626 (9). Plus récemment, d'autres effets clonaux sur Shiraz ont pu être mis en évidence par une étude néo-zélandaise. Cependant, les travaux réalisés sur des raisins de Shiraz en provenance de 35 origines du conservatoire de SARDI situé dans la Barossa Valley en Australie, ont montré des concentrations faibles en rotundone et aucun effet clonal n'a pu être observé (donnée non publiée). Ces résultats peuvent refléter les conditions particulièrement chaudes et sèches du millésime 2008 dans la Barossa Valley, peu favorables à la formation de rotundone. Dans tous les cas, les raisins des millésimes chauds ont en général montré des niveaux très faibles dans ce composé. **Ces résultats incohérents sur l'étude des clones de Shiraz** ont certainement soulevé l'importance des conditions climatiques du millésime, et potentiellement le site d'implantation du vignoble. Ces deux facteurs semblent interagir et accentuer fortement la biosynthèse de rotundone et par conséquent le caractère poivré des vins.

Alors que l'effet clonal semble jouer un rôle fondamental sur la concentration en rotundone des vins de Shiraz, les données observées jusqu'à présent indiquent que la biosynthèse de la rotundone semble être associée à une interaction du génome de la vigne avec son environnement : cette hypothèse est basée sur les concentrations supérieures observées sur cépage Shiraz (ceci soulève la dépendance d'un facteur génétique lié au cépage), avec des teneurs significativement supérieures mises en évidence lors de certains millésimes, dans certains vignobles et pour des raisins produits dans des climats plus frais. Il a également été démontré sur d'autres plantes que l'induction de la biosynthèse des sesquiterpènes était une réponse commune des végétaux à des stress environnementaux (10). De manière assez évidente, ceci ouvre de nombreuses voies de recherche pour permettre aux vignerons et œnologues de mieux piloter les teneurs en rotundone des raisins et des vins, et ses effets sensoriels. Afin d'atteindre cet objectif, des études sont actuellement en cours en Australie afin de caractériser les effets climatiques et la variation des concentrations en rotundone au sein d'un même cépage, ou parmi les différents clones de Shiraz. Les recherches menées par les français (sur Duras) et les néo-zélandais (sur Shiraz) portant sur la gestion des pratiques viticoles comme l'effeuillage, l'exposition des raisins, l'éclaircissage ou l'irrigation sont des points de départ importants.

## Remerciements

Nous remercions tous les collègues de l'AWRI et les panels de dégustation, passé et présent, ainsi que tous nos partenaires en Australie, Nouvelle-Zélande et en France qui ont contribué à ces recherches sur la rotundone. Nous avons particulièrement apprécié le soutien et l'intérêt de nombreuses entreprises viticoles australiennes (spécialement les équipes de Mount Langi Ghiran et Shaw and Smith Wines). Nous tenons également à mentionner les nombreuses discussions enrichissantes et la fourniture de matériel de référence par Symrise et Charles Cornwall de l'Australian Botanical Product. Ces recherches menées par l'AWRI, membre du Wine Innovation Cluster ont été supportées financièrement par les vignerons et œnologues australiens, à travers leur organisme d'investissement, le Grape and Wine Research and Development Corporation, financé lui-même en partie par le gouvernement australien.

### Références bibliographiques

1. Bowers, J. E.; Siret, R.; Meredith, C. P.; This, P.; Boursiquot, J.-M. *Acta Hort.* (ISHS), 2000, 528, 129-132.
2. Parker, M.; Pollnitz, A. P.; Cozzolino, D.; Francis, I. L.; Herderich, M. J. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 5948-5955.
3. Wood, C.; Siebert, T. E.; Parker, M.; Capone, D. L.; Eley, G. M.; Pollnitz, A. P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vossing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M. A.; Herderich, M. J. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 3738-3744.
4. Siebert, T. E.; Wood, C.; Eley, G. M.; Pollnitz, A. P. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 3745-3748.
5. Jeffery, D. W.; Siebert, T. E.; Capone, D. L.; Pardon, K. H.; Van Leeuwen, K. A.; Solomon, M. R. *Technical Review No. 180* (2009), pp 11-16.
6. Iland, P.; Gago, P. *Discovering Australian Wine - A Taster's Guide*; Patrick Iland Wine Promotions: Adelaide, Australia, 1995.
7. Mattivi, F.; Caputi, L.; Carlin, S.; Lanza, T.; Minozzi, M.; Nanni, D.; Valenti, L.; Vrhovsek, U. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2011, 25, 483-488.
8. Caputi, L.; Carlin, S.; Ghiglieno, I.; Stefanini, M.; Valenti, L.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59, 5565-5571.
9. Siebert, T.; Solomon, M. R. In *Proceedings of the 14th Australian Wine Industry Technical Conference*; Blair, R., Lee, T., Pretorius, S., Eds.; 2011; pp 307-308.
10. Chen, F.; Tholl, D.; Bohlmann, J.; Pichersky, E. *The Plant Journal*, 2011, 66, 212-229.