

Haloanisoles et halophénols dans le bois de chêne

Essais interlaboratoires

Caterina Mazzone¹, Anne Tirard², Abdelkader Boubetra³

¹ Attachée scientifique et technique – BIPEA – Paris.

² Chargée d'études statistiques expert – BIPEA – Paris.

³ Manager scientifique et technique – BIPEA – Paris.

Introduction

Un vin peut être défini comme altéré lorsqu'un composé indésirable est présent à une concentration supérieure au seuil de détection. Cette dernière peut être très variable selon la substance, dont la concentration peut se mesurer en grammes, milligrammes, microgrammes, voire nanogrammes par litre.

Les molécules qui peuvent altérer un vin ont différentes origines [1]. Certains défauts proviennent directement du raisin et des anomalies résultant de la maturité du raisin et/ou de maladies fongiques, comme : – les métoxy-pyrazines qui confèrent au vin des notes herbacées (poivron vert, lierre) et le 1-hexanol, que l'on retrouve dans le vin suite à l'écrasement mécanique des peaux et qui apporte également des notes distinctes d'herbe coupée ; – la géosmine, le 2-isopropyl-3-métossipirazine et le 2-méthyl-isoborneol, responsables des odeurs et des goûts de terre humide, moisi-terreux et champignon, trouvent leur origine par des facteurs agroviticoles, comme les baies à peau fragile et les attaques indésirables de moisissures ;

– l'1-octen-3-one confère aux vins une odeur de champignons frais. Bien que difficile à éliminer, sa présence peut être éphémère ; – les crésols sont responsables d'odeurs et de goûts camphrés et iodés provenant de raisins altérés.

D'autres défauts, liés aux techniques utilisées, aux opérations de pré-fermentation ou à la fermentation alcoolique, peuvent être attribués aux principaux produits des levures et du métabolisme bactérien ou être directement associés au métabolisme bactérien :

– l'acide acétique, qui produit une odeur âcre et piquante au nez et un goût amer dans la bouche, est un des défauts les plus connus. Cette molécule peut se développer grâce à la présence de pourriture acide sur les grappes ou de contamination par des levures indigènes. Elle peut être produite aussi lors de la fermentation alcoolique, par des levures ou des bactéries lactiques ou, en phase de raffinage, par des bactéries acétiques ;

– l'acétate d'éthyle, responsable des odeurs de colle, verni à ongles et/ou solvant, est principalement attribuable à la microflore des levures indigènes présentes sur les raisins. Il est produit par des levures et des bactéries acétiques lors de la fermentation alcoolique ou encore par des bactéries acétiques dans la phase de vieillissement et de stockage du vin ;

– l'acétaldéhyde, qui confère au vin une odeur de pomme blette d'éventé et/ou de rancio, est le résultat du métabolisme des levures ou des bactéries et du processus oxydant du vin au contact de l'oxygène. Si dans les vins rouges sa présence en petites quantités est positive, car elle favorise la stabilisation de la couleur et la polymérisation des

composés phénoliques, en excès ou dans les vins blancs cela peut être considéré comme un défaut ; – le diacétyl (attribuant aux vins une odeur lactique, beurré, butyrique) est une molécule produite par des bactéries lactiques lors de la fermentation malolactique. Des arômes fermentaires de même type sont également donnés par d'autres composés tels que le lactate d'éthyle, l'acétoïne, le butanediol et la pentandione ; – l'ensemble des défauts associés aux bactéries lactiques sont des molécules telles que les tétrahydropyridines, responsables du « goût de souris », l'histamine, la tyramine, la putrescine et la cadavérine, amines biogènes responsables des odeurs de viande avariée et de putréfaction.

Les composés sulfonés volatils, responsables des odeurs d'œuf pourri, de gaz, d'ail, de choux sont principalement générés par les levures lors de la fermentation alcoolique. Parmi ces molécules on retrouve éthanethiol, mercaptan et H₂S.

Les défauts dus au vieillissement en cave sont imputables au métabolisme des *Brettanomyces spp.*, levures contaminantes capables de dénaturer les caractéristiques, le fruité et les arômes variétaux des vins. Ces levures se développent en présence d'un minimum de sucre résiduel dans le vin et se nichent dans l'environnement de la cave, notamment au fond des cuves et des barriques. Comme elles ont très peu de besoins nutritionnels, elles peuvent se développer

facilement et sont également résistantes au soufre.

Le 4-éthylgaiacol est un composé phénol aromatique que l'on retrouve dans les vins rouges contaminés par les *Brettanomyces spp.* Il ne s'agit pas d'une substance particulièrement désagréable en soi, car fumée et épicée, mais sa présence est souvent associée à celle du 4-éthyl-phénol. Ce dernier affecte principalement la note fruitée et le vin est plus astringent à la dégustation. Dans tous les vins élevés en bois, la perception du 4-éthyl-phénol diminue, mais il est considéré comme l'une des substances les plus redoutées. Il dérive des acides phénoliques, constituants du raisin, qui se transforment en 4-éthyl-phénol par une double action de décarboxylation et de réduction. Les *Brettanomyces spp.* produisent aussi de l'acide acétique, de l'acétate d'éthyle, des acides gras tels que l'acide isovalérique et également de la tétrahydropyridine. Le benzaldéhyde peut être présent dans le vin en raison de la concomitance de deux facteurs différents : le stockage du vin dans des cuves en béton vitrifié dans lesquelles la résine n'a pas été appliquée correctement et l'affectation les raisins d'origine par *Botrytis*. Les résines utilisées pour les revêtements des cuves en béton contiennent l'alcool benzylique qui peut contaminer le vin. En cas de présence de *Botrytis*, cela produit l'enzyme alcool benzylique oxydase qui, associée à alcool benzylique, donne au vin une note dominante d'amande amère.

Les substances responsables des défauts liés au vieillissement des bouteilles peuvent provenir de facteurs très différents :

– le diméthylsulfure, à l'origine de l'odeur du chou, est généré par l'exposition du vin à la fréquence des radiations lumineuses qui entrent dans le spectre bleu et ultraviolet ;

– l'o-aminocétophénone est responsable de l'odeur foxée. Les mécanismes biochimiques qui provoquent sa formation n'ont pas encore été complètement élucidés. On constate que, lors de la phase de vieillissement en bouteille, certains vins blancs secs présentent des signes de vieillissement prématuré, comme le changement de couleur vers des tons orangés et la perte des arômes fruités typiques des vins jeunes.

Les défauts de « goût de bouchon » sont considérés parmi les plus nocifs car ils ne peuvent pas être éliminés. Cet effet, nuisible au goût, est généralement perçu comme un arôme de moisi-terreux (moisi-poussière, renfermé et/ou cave humide) qui peut masquer les nuances naturelles du vin et en affecter irréversiblement la qualité [2].

Bien que différents composés aient été identifiés en relation avec cette altération [3, 4], la plupart des auteurs en littérature conviennent que les haloanisoles (HA), en particulier les chloroanisoles, sont les principaux composés responsables de ce problème [5, 6]. Chacun de ces composés, 2,4,6-trichloroanisole (TCA), 2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA), pentachloroanisole (PCA) et 2,4,6-tribromoanisole (TBA), possède une odeur similaire avec un seuil de perception très faible, de l'ordre du ng/L.

Ces molécules sont issues de la transformation par des moisissures des halophénols (HP) non odorants en haloanisoles odorants par méthylation dans une atmosphère humide et dans une ambiance confinée [7, 8]. Traditionnellement, de façon erronée, la contamination du vin par

Tableau 1 : Résumé des paramètres statistiques des essais de décembre 2017 et de mars 2018.

Composé	Essai	Analyse	p(x _{pt}) ¹	x _{pt} ² (ng/g)	u(x _{pt}) ³ (ng/g)	σ _{pt} ⁴ (ng/g)	CV ⁵ (%)	Ps ⁶	Pa ⁷	Pu ⁸	Rapport x _{pt} ⁹
TBA	Déc. 17	Comp.	9	1,35	0,15	0,36	27	8	1	0	12,6
		Migr.	6	0,17	0,02	0,05	29	6	0	2	
	Mars 18	Comp.	8	1,97	0,28	0,63	32	9	0	0	12,2
		Migr.	6	0,24	0,05	0,09	38	8	0	0	
TCA	Déc. 17	Comp.	9	0,95	0,17	0,41	43	9	0	0	20,0
		Migr.	6	0,19	0,01	0,03	16	5	0	3	
	Mars 18	Comp.	7	3,67	0,91	1,92	52	9	0	0	31,3
		Migr.	6	1,15	0,09	0,18	16	5	1	2	
TeCA	Déc. 17	Comp.	8	1,79	0,1	0,24	13	8	1	0	11,7
		Migr.	6	0,21	0,03	0,07	33	6	1	2	
	Mars 18	Comp.	8	2,21	0,29	0,66	30	10	0	0	13,6
		Migr.	5	0,30	0,09	0,15	50	8	0	0	
PCA	Déc. 17	Comp.	7	2,54	0,42	0,88	35	6	2	1	5,9
		Migr.	4	0,15	0,03	0,05	33	5	1	2	
	Mars 18	Comp.	8	18,11	3,88	8,78	48	10	0	0	5,9
		Migr.	5	1,07	0,29	0,51	48	8	0	0	
TBP	Déc. 17	Comp.	9	35,81	4,39	10,53	29	9	0	0	12,4
		Migr.	6	4,43	0,56	1,1	25	6	0	1	
	Mars 18	Comp.	8	4,22	0,79	1,79	42	10	0	0	16,1
		Migr.	5	0,68	0,18	0,32	47	8	0	0	
TCP	Déc. 17	Comp.	8	26,29	3,93	8,89	34	8	1	0	21,8
		Migr.	6	5,72	0,94	1,84	32	6	0	1	
	Mars 18	Comp.	7	5,19	0,67	1,42	27	9	0	1	24,5
		Migr.	6	1,27	0,38	0,74	58	8	0	0	
TeCP	Déc. 17	Comp.	9	17,60	1,64	3,93	22	7	1	1	13,9
		Migr.	6	2,45	0,22	0,42	17	5	1	1	
	Mars 18	Comp.	8	8,11	1,31	2,97	37	10	0	0	20,1
		Migr.	4	1,63	0,17	0,28	17	6	0	2	
PCP	Déc. 17	Comp.	7	17,76	2,01	4,25	24	6	3	0	8,5
		Migr.	5	1,51	0,71	1,28	85	5	0	1	
	Mars 18	Comp.	7	70,51	9,08	19,22	27	9	0	1	
		Migr.	Aucune valeur assignée n'a pu être estimée à cause de la dispersion des résultats.								

¹ p(x_{pt}) : nombre de résultats pris en compte pour le calcul de la valeur assignée.

² x_{pt} : valeur assignée. ³ u(x_{pt}) : incertitude-type de la valeur assignée : u(x_{pt}) = 1,25*s*/√(p(x_{pt})).

⁴ σ_{pt} : écart-type pour l'évaluation de l'aptitude σ_{pt} = s*. ⁵ CV : coefficient de variation.

⁶ Ps : nombre de résultats satisfaisants. ⁷ Pa : nombre de résultats douteux. ⁸ Pu : nombre de résultats insatisfaisants.

⁹ Rapport x_{pt} : rapport des valeurs assignées (x_{pt} migration) / (x_{pt} extraction).

l'odeur de moisi a été associée aux bouchons, et par conséquent l'utilisation inappropriée du terme « goût de bouchon » a contribué à répandre l'idée que la contamination par les chloroanisoles est toujours attribuée au bouchon. Des données scientifiques ont montré que la véritable origine de la contamination du vin par les HP et les HA est en fait un problème de contamination environnementale et implique toute la chaîne de production du vin [9]. La source principale du TeCA et du PCA est constituée par le traitement fongicide des bois contenant TeCP et PCP. Très utilisés par le passé, ces fongicides

sont aujourd'hui interdits [10], mais fréquemment retrouvés sur les matériaux en bois anciens. Le TCP peut être généré par l'utilisation de produits chlorés, qui peuvent être utilisés, par exemple, lors du nettoyage de contenants vinaires. En ce qui concerne le TBP, il peut être présent dans la composition de composants électriques ou de matériaux de construction isolants étant un retardateur de flamme. Dans ce cadre, plusieurs matériaux en bois de chêne, dont les barriques, les douelles et les copeaux, peuvent être contaminés et libérer ces molécules dans le vin : prévenir la présence accidentelle de ces composés dans le bois est depuis quelques années un défi technique et économique majeur pour le secteur de la tonnellerie. Quelle que soit sa forme d'utilisation, le bois de chêne doit garantir son innocuité et sa pureté [11, 12] et assurer sa qualité aromatique.

Dans ce contexte, le besoin des tonneliers pour les analyses d'HA et d'HP dans le bois de chêne a augmenté significativement. Cependant, la profession trouve des difficultés dans l'interprétation des résultats à cause de l'absence de méthodes et de protocoles normalisés même si différentes méthodes d'analyse, plus ou moins comparables, ont été mises au point par les laboratoires. Pour répondre à cette

problématique, un programme d'essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) a été mis en place. L'objectif principal de ces EILA est d'évaluer la performance des laboratoires, en considérant que les laboratoires peuvent effectuer deux typologies d'analyse dont le principe est différent et les résultats ne sont pas équivalents: l'extraction (ou composition) et la migration. Les deux méthodes présentent des avantages et des inconvénients; l'analyse de migration est plus proche des conditions réelles de migration dans les barriques, car elle reflète l'équilibre thermodynamique des HA et des HP entre les copeaux de bois et la solution de vin modèle. Cependant, les temps de migration sont inconnus et longs.

Du point de vue du tonnelier, ce retard est problématique puisque la mise en place d'éventuelles mesures correctives est également retardée. Les analyses d'extraction sont plus rapides que celles de migration et les résultats sont généralement plus précis. Par ailleurs, l'interprétation des résultats est difficile car les conditions de migration et d'équilibre des composés organohalogénés dans le bois et dans le vin ou dans une solution alcoolique ne sont pas, à ce jour, bien définies.

Conception et développement

Un EILA implique l'analyse par chaque laboratoire d'un même échantillon pour la détermination de critères analytiques donnés. D'une façon générale, la conception d'un EILA peut être résumée en trois étapes principales: la préparation des échantillons, l'analyse par les laboratoires et le traitement statistique des données.

La préparation des échantillons a été mise en place avec l'objectif d'obtenir un équilibre stable entre les molécules libres et absorbées dans le bois. Avant d'expédier les échantillons aux laboratoires, l'homogénéité et la stabilité du lot fabriqué sont vérifiées par des études expérimentales conformément aux exigences de la norme ISO 13528 [13].

Les résultats des laboratoires sont collectés via un formulaire de réponse. Les données d'analyses de migration et d'extraction sont évaluées séparément: afin d'harmoniser les analyses de migration entre tous les laboratoires, les participants doivent effectuer l'analyse selon les conditions suivantes (inspirées de la norme ISO 20752 [14]):

- solvant: solution de vin modèle (éthanol 20 % en volume, ajusté à pH 3,4 avec de l'acide tartrique);
- température: ambiante (20 °C ± 2 °C), sans agitation;
- temps de trempage: 24 heures;
- rapport des copeaux de bois dans la solution: 50 g/L.

Les traitements statistiques des résultats obtenus sont effectués conformément à la norme ISO 13528 [13]. Les valeurs assignées (x_{pt}) sont estimées à l'aide des moyennes robustes des résultats des participants.

Les performances de chaque laboratoire sont évaluées à l'aide d'écart-types robustes (s^*). Ces valeurs sont utilisées pour identifier un intervalle autour des valeurs assignées. Pour chaque

critère analytique, les résultats qui rentrent dans cet intervalle sont jugés satisfaisants.

Résultats et discussion

Les résultats des EILA de décembre 2017 et mars 2018 sont analysés en détail et comparés. Le **tableau 1** résume les données statistiques de ces essais pour chaque composé analysé.

Neuf laboratoires ont rendu leurs résultats pour l'essai de décembre 2017, ce qui a permis d'estimer les valeurs assignées (x_{pt}) pour tous les composés. Les incertitudes, $u(x_{pt})$, qui permettent de quantifier la confiance qui peut être accordée à la valeur assignée, ont été calculées comme indiqué dans la norme ISO 13528 [13]. Pour l'essai de mars 2018, 8 laboratoires ont présenté leurs résultats pour les analyses de migration et 10 pour les analyses d'extraction. Dans ce cas, aucune valeur assignée n'a pu être estimée pour l'analyse de migration du PCP en raison de la forte dispersion des résultats.

Il est à noter que les résultats des laboratoires obtenus pour les analyses de migration et de composition sont sensiblement différents et reflètent l'approche différente de ces deux méthodes. Le pourcentage de migration des HA et HP du bois dopé à la solution de vin modèle a été estimé pour chaque composé en tenant compte des différences entre les valeurs assignées des analyses de composition et de migration (rapport x_{pt}). Ce pourcentage, qui peut être comparé au taux de relargage de ces composés dans la solution hydroalcoolique

à une concentration de copeaux de 50 g/L, varie selon la molécule de 26 % en moyenne pour le TCA à 6 % pour le PCA. Les valeurs obtenues montrent une cohérence entre les deux essais et ne semblent pas directement liées aux niveaux de contamination de la matière première, en tenant toutefois compte qu'il s'agit d'un bois surchargé en ces composés.

Conclusion

En l'absence de méthode normalisée, les EILA sur les analyses des HA et des HP dans les copeaux de chêne permettent aux laboratoires de comparer leurs résultats et d'obtenir la validation de leurs procédures analytiques par les tonneliers et, surtout, par les organismes d'accréditation selon la norme ISO 17025 [15].

De plus, l'implication constante dans les EILA aide les laboratoires à améliorer leurs procédures analytiques et à avoir un point de vue critique sur les résultats obtenus par les analyses d'extraction et de migration. Ces deux méthodes analytiques sont en fait complémentaires et doivent être utilisées en parallèle en fonction des résultats attendus et des besoins analytiques des clients. ■

Remerciements: BIPEA remercie la Fédération des tonneliers de France (FFT) et tous les laboratoires qui ont participé aux essais interlaboratoires.

NDLR: Les références bibliographiques indiquées dans cet article de [1] à [15] sont disponibles sur le site internet de la Revue des Œnologues: search.oeno.tm.fr



ŒNOLOGIE : ANALYSES

Un ouvrage collectif sous la direction de **Dominique Delanoé**, ingénieur agronome œnologue et **Nathalie Suberville**

Troubles et Dépôts des Boissons fermentées et des Jus de fruits
Aspects pratiques du diagnostic

Pour la première fois, l'exhaustivité des thèmes liés à chaque trouble physico-chimique: l'origine, les tests de stabilité, les moyens de prévention, les méthodes générales d'identification des troubles et dépôts des boissons fermentées vins, cidres, bières... Une présentation concrète intégrant des fiches techniques, des exemples illustrés par des schémas et des photographies.

Franco France: 67 € TTC
Franco tous pays: 82 €

collection **Avenir Œnologie**

Livres de la collection Avenir Œnologie disponibles sur www.oeno.tm.fr
Bulletin de commande en page 1 de la revue.