

Un effet non intentionnel positif pour les fongicides !



SIVCBD

Maryline ABERT, Philippe Olivier COULOMB et Philippe Jean COULOMB

SARL ENIGMA, 84 190 Beaumes de Venise.

Le raisin et le vin renferment une multitude de polyphénols (plus de 200 composés) qui, grâce à leur puissante activité antioxydante, permettent à l'organisme de lutter contre les agressions de l'oxygène qui sont à l'origine d'un grand nombre de maladies.

La qualité d'un vin rouge dépend étroitement de la qualité de son contenu phénolique(13). Il est donc indispensable de tenter de comprendre l'effet des traitements fongicides, (de contact, systémiques ou pénétrants), sur la qualité et la composition phénolique du produit transformé.

Parmi les polyphénols, le Resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène) a un rôle particulier. C'est une molécule induite (phytoalexine) par un stress (physique ou chimique) ou par l'action de certains pathogènes (champignons). Principalement localisé dans la pellicule des grains de raisin, sa synthèse résulte de l'activation de la stilbène synthétase. Nous avons choisi des cépages colorés pour pouvoir apprécier « l'effet resvératrol ».

Les phytoalexines sont en général aussi toxiques pour les pathogènes que pour la plante elle-même. L'effet

intentionnel de cette dernière est de la produire vite et en grande quantité afin que le processus biochimique de défense mis en jeu soit efficace et se traduise par une résistance. L'effet non intentionnel positif est que cette molécule se retrouve dans le vin et, de par sa nature, a une action anti-cholestérol, diminue les risques cardiaques et possède un pouvoir anti-cancéreux. C'est l'une des substances du « French paradox » (3)! Or il se trouve que les produits du phytosanitaire sont des agents qui peuvent être très traumatisants pour les plantes et donc inducteurs de resvératrol...

Les travaux que nous présentons dans le cadre de cet article ont porté sur deux vins monocépages réalisés à partir de Mourvèdre et de Cabernet Sauvignon, ils mettent l'accent sur :

- Le comportement du pool polyphénolique (phénols totaux et anthocyanes) des vins dont les vignes ont été traitées par cinq matières actives de référence : le sulfate de cuivre, le mancozèbe, l'azoxystrobinurine, le fosétyl Al associé au folpel et le mancozèbe associé au cymoxanil.
- La variation des anthocyanes en fonction des mêmes critères.
- Le cas particulier de l'induction du resvératrol.

La réaction des polyphénols totaux

L'essai a été mis en place sur deux cépages, le Mourvèdre et le Cabernet Sauvignon, situés dans la région Languedoc-Roussillon. Le dispositif expérimental adopté est celui qui correspond à la méthode CEB N°143 (Méthode d'étude des effets non intentionnels des produits phytopharmaceutiques sur l'élaboration et la qualité des vins et eaux de vie de vin).

Les produits de référence ont été employés à leur dose respective d'homologation et appliqués dans un volume de bouillie de 100l/ha. Les raisins utilisés pour la vinification ont été prélevés de façon homogène sur les deux rangs centraux.

L'évaluation globale du contenu phénolique a été faite selon la formulation de Lamadon (9). L'indice des Phénols totaux ou IPT est donné par la lecture de la DO, pour $\lambda=280$ nm, d'un extrait dilué cent fois.

Le Tableau 1 montre que les teneurs en polyphénols totaux sont supérieures pour les vins de Cabernet-Sauvignon et que le vin le plus riche correspond au vin issu du lot traité par le mancozèbe + cymoxanil. Le Mourvèdre réagit plus faiblement.

Tableau 1-Indices de Polyphénols Totaux (IPT)

		Bouillie Bordelaise Sulfate de cuivre	Dithane DG mancozèbe	Quadris azoxystrobinurine	Mikal Flash fosétyl Al + folpel	Rémiltine Pepite mancozèbe + cymoxanil)
MOURVEDRE	IPT	29.2	29.6	27.9	30.6	30.1

CABERNET-	IPT	32.9	34.2	33.5	37.8	41.5
SAUVIGNON						

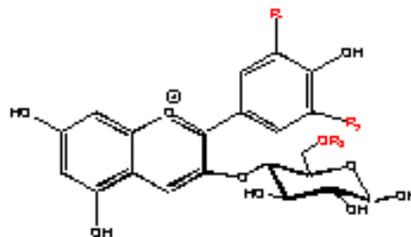
Celle des anthocyanes

Les anthocyanes, responsables de la couleur du vin, comme les tannins qui lui confèrent sa structure, s'accumulent dans la pellicule des baies au cours de la phase de maturation du raisin. Elles ont été caractérisées par chromatographie de gradient (12).

Les sept anthocyanes libres majoritaires dans le vin sont les monoglucosides de cinq anthocyanidines appelées delphinidine, cyanidine, pétunidine, péonidine et malvidine, et deux esters, acétique et coumarique, de la malvidine monoglucoside.

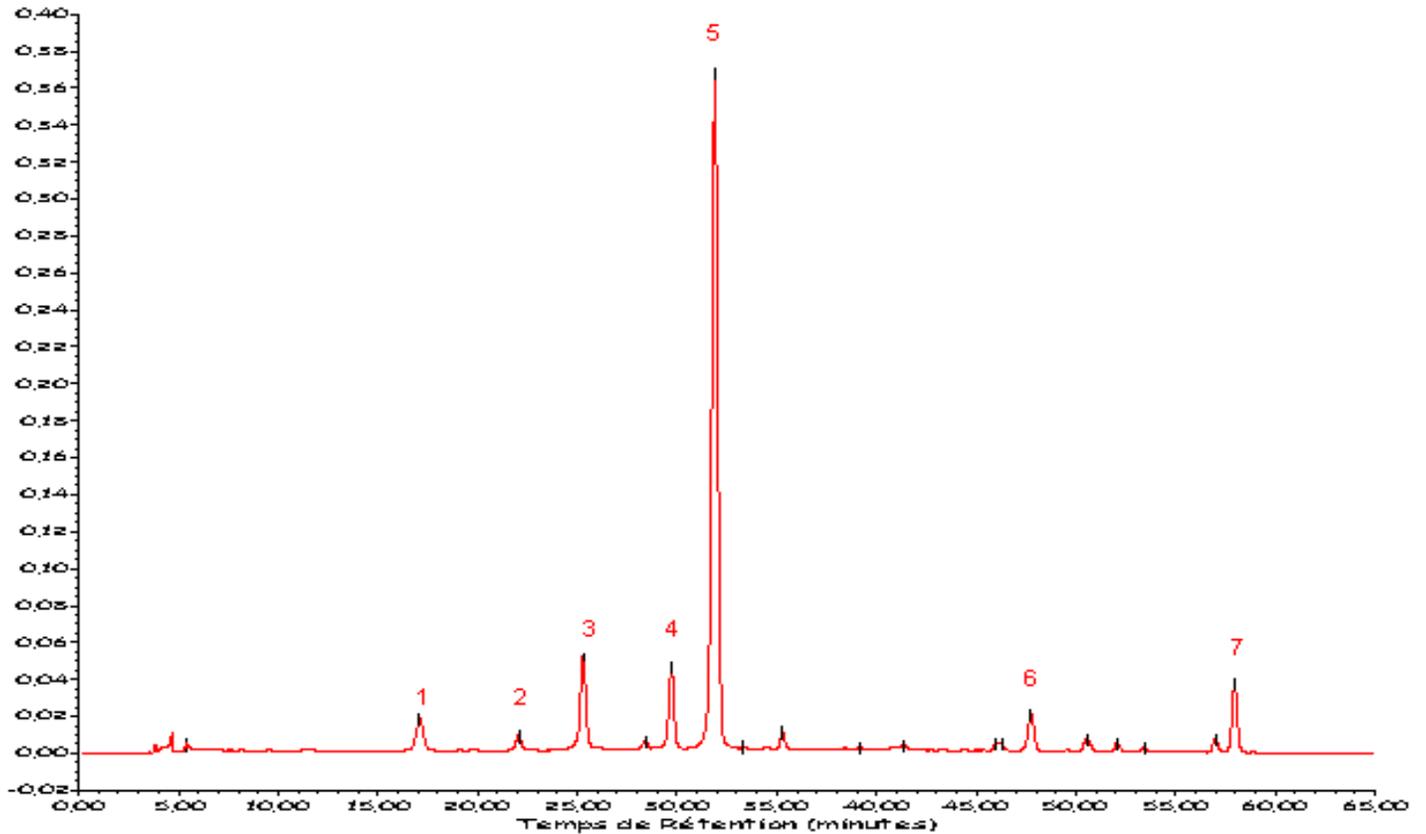
Le Tableau 2 consigne leurs propriétés respectives :

Pic	t _R (min)	Anthocyane	Abbréviation	R ₁	R ₂	R ₃
1	16.05	Delphinidine-3-glucoside	Df-3-glc	-OH	-OH	-H
2	21.02	Cyanidine-3-glucoside	Cy-3-glc	-OH	-H	-Acetyl
3	24.19	Petunidine-3-glucoside	Pt-3-glc	-OH	-OCH ₃	Coumaryl
4	28.50	Paeonidine-3-glucoside	Pn-3-glc	-H	-OCH ₃	
5	30.59	Malvidine-3-glucoside	Mv-3-glc	-OCH ₃	-OCH ₃	
6	46.12	Malvidine-3-acetylglucoside	Mv-3-Acglc	-OCH ₃	-OCH ₃	
7	56.04	Malvidine-3-coumarylglucoside	Mv-3-Couglc	-OCH ₃	-OCH ₃	



Formule d'une anthocyane-glucoside

Chromatogramme type (CPLH) des anthocyanes du ?



Pour l'identification des pics, se référer au tableau 2.

Dans le tableau 3 l'analyse en chromatographie en phase liquide à haute pression a permis de constater que :

- les vins de Mourvèdre et de Cabernet Sauvignon renferment un pourcentage important de malvidine-3-glucoside, qui est l'anthocyane majeur.
- Par contre, si la Malvidine-3-acetylglucoside arrive nettement en deuxième position pour le Mourvèdre, les pourcentages sont plus répartis dans le cas du Cabernet Sauvignon pour lequel on peut noter une nette augmentation de la cyanidin-3-glucoside
- Les traitements à base de mancozèbe + cymoxanil et de fosétyl Al + folpel augmentent significativement les teneurs en anthocyanes présentes dans les vins de Mourvèdre.
- La plus forte concentration en anthocyanes totaux, dans le cas du Mourvèdre, est induite par le traitement effectué avec la Rémitline Pépité. Pour le Cabernet Sauvignon c'est le Dithane puis la Rémitline (tous les deux à base de mancozèbe).

Tableau 3-Teneurs en anthocyanes libres

(en mg/l par litre de vin)

		Bouillie		Dithane DG		Quadris		Mikal Flash		Rémitline Pepite	
		Bordelaise	Sulfate de cuivre	mancozèbe	%	azoxystrobinurine	%	fosétyl Al + folpel	%	mancozèbe + cymoxanil	%
MOURVEDRE	Df-3-glc	3.4	2,95	4.1	2,92	4.3	3,15	4.1	2,69	6	3,64
	Cy-3-glc	0.3	3,7	0.3	3,71	0.5	3,66	0.3	3,35	0.6	4,24
	Pt-3-glc	4.3	2,95	5.2	2,78	5	3,29	5.1	2,63	7	3,03
	Pn-3-glc	3.4	61,2	3.9	59	4.5	59,67	4	59,44	5	59,89
	Mv-3-glc	70.4	25,5	83.3	27,57	81.4	26,97	90.3	28,37	98.7	25,54
	Mv-3-Acglc	29.4	3,3	38.6	3,2	36.8	2,85	43.1	3,29	42.1	3,27
	Mv-3-Couglc	3.8		4.6		3.9		5		5.4	
	Total	115		140		136.4		151.9		164.8	
CABERNET- SAUVIGNON	Df-3-glc	5.6	3,68	7.7	4,83	5.6	3,90	5.9	4,90	7.6	4,85
	Cy-3-glc	1.9	1,25	2.5	1,56	2.1	1,46	2	1,66	2.5	1,59
	Pt-3-glc	13.1	8,62	15.1	9,47	12.9	8,99	12.8	10,63	15.7	10,01
	Pn-3-glc	11.4	7,50	10.9	6,84	11.4	7,94	9.3	7,72	12.8	8,16
	Mv-3-glc	106.5	70,11	107.5	67,48	98.8	68,89	80.6	66,94	105.4	67,26
	Mv-3-Acglc	5.9	3,88	5.8	3,64	5.2	3,62	3.9	3,23	5.3	3,38
	Mv-3-Couglc	7.5	4,93	9.8	6,15	7.4	5,16	5.9	4,90	7.6	4,85
	Total	151.9		159.3		143.4		120.4		156.7	

Le tableau 4 indique les teneurs des différentes formes du resvératrol (exprimées en mg par litre de vin) identifiées sur les chromatogrammes (CPLH) de chacun des échantillons.

Tableau 2-Evaluation des concentrations des différentes formes moléculaires du resvératrol (en mg par litre de vin)

Dans le Mourvèdre et le Cabernet-Sauvignon en réponse à l'action de cinq fongicides.

		Bouillie Bordelaise Sulfate de cuivre	Dithane DG mancozèbe	Quadris azoxystrobinurine	Mikal Flash fosétyl Al + folpel	Rémiltine Pepite mancozèbe + cymoxanil
MOURVEDRE	trans-picéide	1.32	0.74	0.95	1.49	1.82
	trans-resvératrol	0.17	0.04	0.02	0.13	0.43
	cis-picéide	2.57	4.14	4.12	3.66	3.91
	cis-resvératrol	0.88	1.3	0.77	1.11	1.38
	Resvératrol total	3.32	4.19	3.75	4.25	5.16
CABERNET- SAUVIGNON	trans-picéide	0	0	0.01	0.05	0.02
	trans-resvératrol	0.04	0.02	0.03	0.02	0.03
	cis-picéide	0.02	0.05	0	0.06	0.07
	cis-resvératrol	0.22	0.38	0.3	0.26	0.33
	Resvératrol total	0.27	0.43	0.33	0.34	0.41

L'analyse des résultats permet de constater que :

- Pour le Mourvèdre, la concentration en resvératrol total, sous forme aglycone, est d'environ 4 mg/l et 0.4 mg/l pour le Cabernet-Sauvignon et une proportion de picéide nettement plus importante que le resvératrol dans le Mourvèdre. Ces résultats caractéristiques du cépage confirment les résultats obtenus par Roggero et Garcia-Parilla (11).
- Les concentrations en resvératrol sont donc nettement plus importante pour le Mourvèdre.
- **Dans le cas du Mourvèdre, le mélange mancozèbe + cymoxanil est très « inducteur »**
- Le sulfate de cuivre, produit de contact, induit une concentration significativement plus faible.
- Enfin l'azoxystrobinurine semble être le fongicide induisant le moins de « stress ».

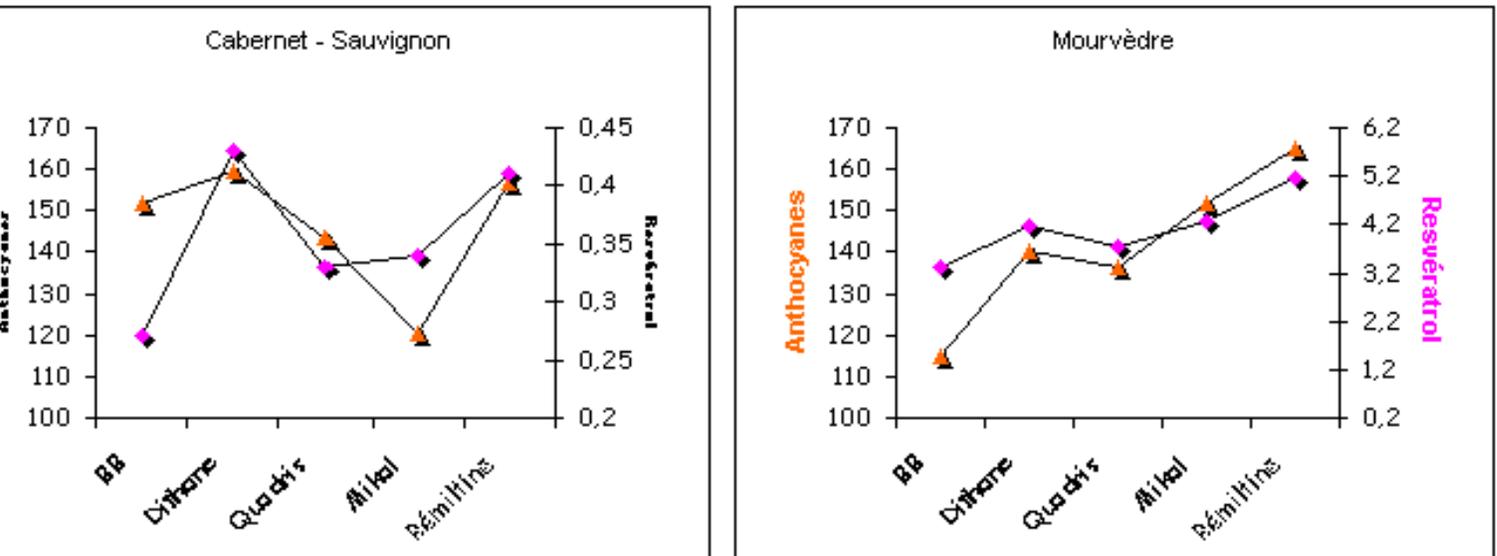
Pour le Cabernet-Sauvignon, nous remarquons que c'est le mancozèbe qui induit la concentration la plus élevée.

La plante répond ainsi différemment suivant le type de traitement appliqué ou le type de cépage mis en jeu. Cela donne lieu ainsi à des teneurs en Resvératrol fluctuant en fonction de la nature chimique des substances utilisées.

Corrélations entre le resvératrol et les anthocyanes

La représentation sur le même graphique des teneurs en anthocyanes et en resvératrol met en évidence une

tendance d'évolution concomitante pour un même cépage. Le stimulus provoqué par l'application de la matière active sur la plante déclenche simultanément la biosynthèse des pigments anthocyaniques et des molécules de défense telles que le resvératrol. Cette affinité entre les anthocyanes et le resvératrol semble plus prononcée pour le Mourvèdre avec un maximum de stimulation pour l'association mancozèbe et cymoxanil (rémittine).



DISCUSSION

Malgré les travaux de recherche réalisés (1,2,4,5,6,7,8,10) le rôle des composés phénoliques naturels est particulièrement complexe et difficile à appréhender au niveau de la dynamique moléculaire impliquée dans les mécanismes de défense mis en place par les plantes. D'une façon générale, ils existent dans les compartiments cellulaires sous la forme hétérosidique ou éventuellement sous la forme d'esters. Lors de la mort d'une cellule, l'apparition d'un mictoplasme entraîne immédiatement une hydrolyse enzymatique qui fait apparaître les formes aglycones.

Les composés phénoliques sont présents dans quatre compartiments cellulaires : le système endoplasmique où ils sont synthétisés, le plastidome où ils sont synthétisés et accumulés sous la forme de plastoglobules (stérinoplastes), le système vacuolaire où ils sont accumulés et dans le système pariétal où ils ont, outre une implication dans la mise en place des infrastructures architecturales, un rôle de défense active à l'encontre des pathogènes fongiques.

Du point de vue tissulaire, les phénols et les flavones sont localisés dans les vacuoles de la pellicule, les acides phénols sont concentrés dans la pulpe et les tanins dans les pépins (2).

Lors de la véraison, la vigne mobilise une importante quantité de glucides, en grande partie provenant de l'hydrolyse de l'amidon plastidial. Cette mobilisation s'accompagne d'une forte synthèse d'anthocyanes. Les meilleurs millésimes correspondent à un arrêt de croissance précoce et à une teneur élevée en sucres (9).

Le rôle des anthocyanes dans la physiologie de la vigne est très complexe.

Tous les travaux confirment l'effet négatif des températures trop hautes ou trop basses sur la coloration et sur la

maturation. Un excès d'azote diminue leur synthèse, une carence provoque la coloration des tissus normalement peu ou pas colorés. La qualité de la lumière ou l'application de l'Étephon (par libération d'éthylène) augmentent la concentration en anthocyanes (2). Le vieillissement des feuilles, ou un stress comme une attaque précoce d'araignées rouges peuvent induire la synthèse d'anthocyanes.

Les phénols interviennent donc dans des mécanismes de physiologie cellulaire endogènes classiques, mais ils peuvent aussi être induits quantitativement et qualitativement par des agressions physicochimiques ou biologiques extérieures. Dans ce dernier cas ils constituent un arsenal de molécules de défense non négligeable dont les effets commencent à être compris.

Nos travaux montrent qu'il existe un effet cépage et un effet traitement.

L'effet cépage est lié au potentiel génétique qui exprimera une réaction (qualitative et quantitative) plus ou moins rapide. Si les phénols totaux traduisent de faibles différences, les anthocyanes (malvidine-3-acetylglucoside) et le resvératrol (très forte induction dans le Mourvèdre) révèlent des différences plus significatives et plus nuancées. D'où la nécessité, pour un œnologue, de bien appréhender les qualités phénoliques de chaque cépage s'il veut obtenir un produit final de qualité.

L'effet traitement par application de fongicides n'est pas innocente et le comportement des anthocyanes montre bien une évidence : la sensibilité différentielle aux produits appliqués. Dans le cas des deux cépages l'induction est nettement plus forte avec le mancozèbe que pour la bouillie Bordelaise. Les anthocyanes dans ce cas répondent à un « effet stress » et il paraît clair qu'un produit qui pénètre, systémique ou intrant localisé, stresse davantage la vigne qu'un produit de contact. La relation entre la simultanéité des inductions de resvératrol et des anthocyanes au sein d'un même cépage ouvre une voie possible de recherche. Cette corrélation, qui n'est pas le fait du hasard, pourrait déboucher sur l'existence de synergies intéressantes impliquées dans la mise en place de systèmes de défense rapides et efficaces.

Nous avons démontré, dans un précédent numéro (6), par des contrôles cytologiques, que le cuivre a un effet éliciteur de surface en épaississant la pellicule du grain de raisin, lui conférant ainsi une excellente résistance au mildiou et au botrytis.

Les systémiques, association de molécules aux propriétés hydrophiles et lipophiles, génèrent de plus grandes perturbations dans le métabolisme cellulaire et leurs effets non intentionnels sont mal connus.

Une partie du voile est cependant levée en ce qui concerne le resvératrol. Outre l'effet cépage signalé plus haut, dans le cas du mourvèdre l'induction de cette phytoalexine traduit bien un important « effet stress ». Le resvératrol constitue un indicateur précieux et incontournable. Il semble cependant indiquer que l'utilisation des systémiques et des pénétrants entraîne, compte tenu des propriétés bien connues sur la santé de la molécule induite, un effet non intentionnel particulièrement positif. Pour rassurer les viticulteurs « bio », la Bouillie Bordelaise donne en la matière, des résultats satisfaisants. Le resvératrol transforme le vin en un alicament de première grandeur, lorsque, bien sûr il est consommé avec modération !

SUMMARY : *A positive side effect for fungicides !*

The role of phenolics in plants is not well understood, but their involvement in defence mechanisms and other reactions essential to the normal functioning of the plant is well documented; Our results show differential approaches concerning systemic and contact fungicides at ultrastructural and biochemical levels after treatments

of vine.

Phenolics, and especially anthocyanes and resveratrol, in two red wines : Mourvèdre and Cabernet Sauvignon, reveal their good elicitation induced by these pesticides. A positive side effect is the great induction of that phytoalexin which contributes to give positive contribution to the health preservation. This compound is known to enhance antioxidant activity and to reduce thrombotic tendency. A synergic action concerning anthocyanes and resveratrol could be determined.

Bibliographie

- 1- ALIBERT G., RANJEVA R. et BOUDET A. – 1977 – *Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques, Physiologie Végétale, 15, 279-301.*
- 2-CHAMPAGNOL F.- 1984 – *Eléments de Physiologie de la vigne et de viticulture générale, imp. Dehan.*
- 3-ABERT M., COULOMB Ph.O., COULOMB Ph.J., *La phytothérapie européenne, à paraître en Nov 2002.*
- 4-COULOMB C. et COULOMB Ph.J.-1984 - *Etude de l'activité peroxydasique dans les feuilles de Capsicum annuum (Piment) infesté par le Phytophthora capsici 'Mildiou) Annales des Sciences Naturelles, 6, 227-235*
- 5- COULOMB C., COULOMB Ph.J., SAIMMAIME I., LIZZI Y. et POLIAN C.- 1988- *Caractérisation ultrastructurale d'une résistance induite par un éliciteur d'origine fongique, chez un cultivar sensible de Piment. Canadian Journal of Botany, 68, 381-390.*
- 6-COULOMB C., COULOMB Ph.J., ROGGERO J.P., COULOMB Ph.O. et AGULHON O, 199 , *Le Cuivre a-t-il un effet éliciteur ? Phytoma*
- 7-LIZZI Y, ROGGERO J.P. et COULOMB Ph.J.- 1995 – *Behaviour of the phenolic compounds on Capsicum annuum leaves infected with Phytophthora capsici, Journal of Phytopathology, Berlin, 143, 619-627.*
- 8-LIZZI Y., COULOMB C., POLIAN C., COULOMB Ph.J. et COULOMB Ph.O., 199 , « *L'Algue face au Mildiou : quel avenir ?* ». *Phytoma,*
- 9-LAMADON F., 1995, *Revue des œnologues, 76, 37-38.*
- 10-RANJEVA R., ALIBERT G. et BOUDET A. – 1977 – *Métabolisme des composés phénoliques chez le pétunia. Plant Science Letters, 10, 225-234.*
- 11-ROGGERO J.P , GARCIA PARILLA C., 1995 – *Science des aliments, 15, 411-422.*
- 12-ROGGERO J.P , ARCHIER P., COEN S., 1992 – *Science des aliments, 12, 37-46.*
- 13-RIBEREAU-GAYON P. 1968 - *Les composés phénoliques des végétaux, Dunod.*