

Le vignoble, première source de contamination par la géosmine et l'ochratoxine A : quels risques pour le vignoble méditerranéen ?

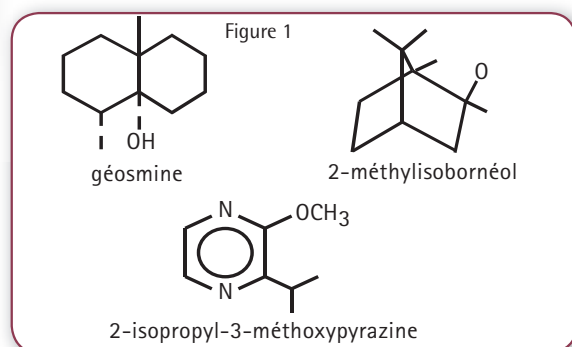
■ Monsieur Ahmed LEBRIHI

ENSAT, 1 avenue de l'Agrobiopole, 31326, Castanet-Tolosan, France
lebrihi@ensat.fr

Cas de la géosmine

Les défauts organoleptiques de goûts moisi-terreux sont signalés depuis quelques années dans différents vignobles.

Ces goûts sont donnés par des molécules telles que la géosmine avec un seuil olfactif dans l'eau de 0,01 mg/l, le 2-méthylisobornéol (MIB) avec un seuil olfactif de 0,012 mg/l et 2-isopropyl-3-méthoxy-pyrazine (IPMP) (figure 1).



Ces molécules peuvent être produites par des Actinomycètes appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardia*, *Microbispora* ou *Actinomadura*, ainsi que par des champignons comme *Penicillium* ou *Botrytis*. La géosmine et l'IPMP peuvent être considérés comme principaux composés de ce caractère terreux dans les vins, étant donné que l'MIB disparaît au cours de la fermentation alcoolique (au bout de 48h de fermentation).

D'autres molécules comme le fenchol (seuil olfactif= 50 mg/l) et le fenchone (seuil olfactif= 500 mg/l) peuvent être présentes dans les vins. Cependant ces molécules sont présentes dans les vins à des concentrations très inférieures aux seuils olfactifs.

Il n'est pas impossible que d'autres molécules, inconnues à ce jour ou peu étudiées, puissent être impliquées dans l'organoleptique des vins.

Plusieurs vignobles français sont concernés par cette problématique (Val de Loire, Beaujolais, Bourgogne, Alsace, Jura). Les vignobles méditerranéens ne semblent pas, à ce jour, touchés par ce phénomène. C'est l'inverse de ce qui se produit avec l'ochratoxine A, mycotoxine produite par des *Aspergillus* du groupe *Nigrii*.

Dans les vignobles Français, la géosmine est produite par plusieurs espèces *Penicillia* (*P. thomii* ou *glabrum*, *P. digitatum* ou *hirsutum*, *P. expansum*, *P. spinulosum*, *P. variabile*, *P. canescens*, *P. restrictum*, *P. minioluteum*, *P. brevicompactum*, *P. sclerotiorum*, *P. ochrochoron*, *P. gastrivorus*, *P. crustosum*, *P. paraherquei*).

Parmi ces espèces, *Penicillium expansum* reste la plus importante. Ceci dit, l'étude de l'écologie de ces espèces dans différents vignobles montre que le problème est très complexe et que, dans certaines conditions, d'autres espèces que *P. expansum* pourraient être fortement impliquées.

La production de la géosmine est fortement affectée par les conditions climatiques (hygrométrie de l'air, précipitations et températures). Les précipitations entre le début de la véraison et la récolte semblent déterminantes dans l'expression du goût moisi-terreux.

D'une façon globale, la géosmine est produite en quantité importante lorsque la température se situe entre 25 et 30°C.

Ces phénomènes climatiques peuvent aboutir à la fragilisation de la pellicule des baies, à la germination des spores et globalement à un mauvais état sanitaire du vignoble.

Les sols présentant un mauvais ressuyage ainsi que des pratiques culturales favorisant l'entassement aggravent l'expression des goûts moisi-terreux.

Parmi les espèces productrices, *P. expansum* présente un profil particulier. Certaines souches de cette espèce sont capables de produire la géosmine d'une façon autonome, alors que d'autres souches nécessitent une co-culture avec *B. cinerea*.

Le modèle *B. cinerea/P. expansum* a été souvent étudié ces dernières années. La production de certains métabolites par *B. cinerea* semble déterminante dans le déclenchement de la production de la géosmine par *P. expansum*.

En effet, certains isolats de *P. expansum* sont capables de produire la géosmine dans un milieu de laboratoire et non dans un jus de raisin. L'inoculation antérieure du jus de raisin par *B. cinerea* déclenche la production de la géosmine.

D'une façon globale, c'est la modification du milieu de culture par *B. cinerea* qui permet le déclenchement de la production de la géosmine. Deux facteurs sembleraient être importants pour l'induction de cette production. Il s'agit de l'épuisement du milieu en acides aminés et la production du mannitol.

Cependant le phénomène pourrait être plus complexe et d'autres études doivent être menées pour mieux comprendre ces interactions.

Pour la gestion de la présence de la géosmine dans la filière viti-vinicole, à ce jour, aucune action satisfaisante à elle seule ne peut être appliquée. Il faut donc combiner plusieurs outils couvrant surtout la prévention et le diagnostic rapide.

La prévention doit veiller à maintenir un état sanitaire satisfaisant du vignoble. Il est à rappeler que la présence de 0,1 % de grappe à odeur terreuse permet l'obtention de la géosmine à hauteur de 100 ng/l dans les moûts correspondants (le seuil de perception dans le jus de raisin est de 40 ng/l).

Ainsi l'utilisation de mesures prophylactiques appropriées contre la pourriture, le tri des grappes à la récolte, est déterminante.

Lors de l'élaboration des vins, l'utilisation de certains produits permet de réduire la quantité de géosmine finale.

En effet des produits comme les enzymes n'ont aucun effet,

l'utilisation de produits à base de charbon peut être efficace mais réduit fortement la couleur des vins.

L'utilisation du lait et surtout de l'huile de pépins de raisin semble donner des résultats satisfaisants. Le lait entier permet une réduction qui avoisine 48 % et l'huile de pépin de raisin permet une réduction d'environ 75 %.

La quantification des populations fongiques productrices de la géosmine est fastidieuse, consommatrice de temps et onéreuse. De plus, elle nécessite une expertise mycologique confirmée, d'autant plus que les espèces censées produire de la géosmine sont nombreuses. La quantification de la géosmine par les moyens disponibles actuellement reste également chère.

Pour s'affranchir de ces inconvénients, il est nécessaire de développer des outils rapides, peu onéreux, permettant de quantifier rapidement et globalement les populations productrices de la géosmine et d'en déduire indirectement la géosmine présente.

Au sein de notre laboratoire (LGC UMR5503) nous avons développé une technique moléculaire basée sur l'amplification de l'ADN fongique par Q-PCR. Le marqueur génétique identifié est un gène faisant partie de la voie de biosynthèse de la géosmine.

Environ 200 échantillons ont été utilisés pour valider la méthode.

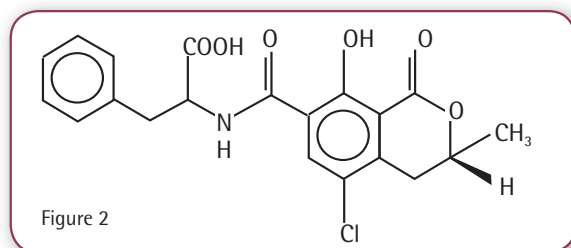
Le coefficient de corrélation entre la concentration de la géosmine et la quantité d'ADN obtenue dans chaque échantillon est d'environ 0,97.

Ces résultats n'ont pas encore fait objet de publication. Ils seront détaillés lors de l'exposé oral.

Cas de l'ochratoxine A

L'ochratoxine A (OTA) a été découverte il y a environ une trentaine d'années par un groupe de chercheurs sud-africains lors d'une recherche systématique de mycotoxines (Van der Merwe et al., 1965 a et b). Elle appartient à la famille des polykétocides. En effet, l'OTA est formée par un groupement isocoumarine substitué (7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine (OTA) lié à la L-b-phénylalanine par une liaison amide (Abarca et al., 2001). Le groupe isocoumarine est un squelette de pentakétide formé à partir d'acétate et de malonate.

La L-phénylalanine provient du métabolisme de l'acide shikimique et est liée à la structure générale à travers le groupement carboxyle (Moss, 1996 in Sweeny et Dobson, 1998) (figure 2).



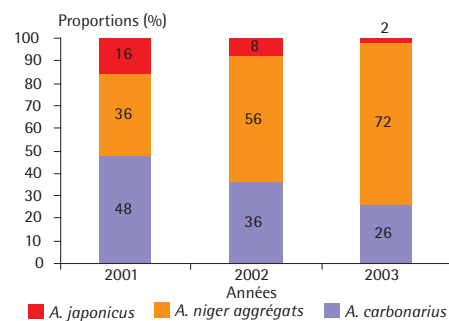
L'OTA est une mycotoxine toxique pour l'homme et les animaux. Elle a été rapportée néphrotoxique, tératogène, immunosuppressive et a été également classée carcinogène du groupe 2B (peut provoquer le cancer) (IARC, 1993).

L'ochratoxine A est principalement produite par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum* dans la filière céréales. Dès 1999, des espèces ochratoxinogènes : *A. carbonarius* et *A. niger* ont été isolées du raisin sec (Codex Alimentarius, 1999). Plus tard, il a été montré que la microflore responsable de la contamination du raisin par l'OTA se trouve essentiellement au niveau du vignoble, contrairement aux céréales où l'ochratoxine A est considérée comme une mycotoxine de stockage (Battilani et al., 2003).

Au niveau de la France, seuls les vignobles Méditerranéens sont concernés par la présence de l'OTA (environ une bande de 100 km de la mer).

Dans le cas des vignobles, seuls les *Aspergillus* appartenant au groupe *Nigrii* et particulièrement *A. carbonarius* et *A. niger* aggrégats sont capables de produire l'OTA. La répartition de ces espèces est représentée dans la figure suivante.

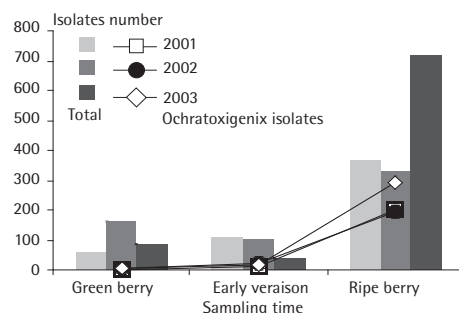
Figure 3 : Répartition des espèces du genre *Aspergillus* au sein de la section *Nigrii*



Dans cette figure on voit la présence prépondérante d'*A. niger aggrégats* (regroupant presque une dizaine d'espèces difficilement séparables par techniques microscopique et macroscopiques). On voit également en plus d'*A. carbonarius*, *A. japonicus*. Cette espèce, dite unisériée, n'est pas du tout productrice d'OTA.

A. carbonarius est la source principale d'OTA car il présente des capacités de production autrement plus élevées qu'*A. niger aggrégats*. Ces espèces productrices apparaissent dans les baies de raisin un peu avant la véraison et leur nombre continue à augmenter au cours de la maturité des baies pour exploser une dizaine de journées avant les vendanges (figure 4).

Figure 4 : Evolution du nombre d'isolats ochratoxinogéniques au cours de la maturité des raisins.



Comme dans le cas de la géosmine, la lutte contre la présence de l'OTA passe d'abord par la prévention au sein du vignoble. Le maintien d'un état sanitaire irréprochable (surtout l'absence du vers de la grappe) permet de réduire fortement la contamination par l'OTA.

Le diagnostic précoce et la capacité de quantification des populations fongiques productrices d'OTA (et donc indirectement la déduction de la quantité d'OTA) par des méthodes rapides, peu onéreuses permet également d'améliorer la capacité de gestion de la présence d'OTA. Ceci a été développé par la méthode d'amplification par PCR de gènes intervenant dans la voie de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*.

L'ensemble de ces points sera présenté oralement lors de la XXVI^{ème} Journée de Rencontres Œnologiques.