



HAL
open science

Déviations organoleptiques sur vins dues à la flore fongique des raisins

L Guérin, R. Guérin-Schneider, F. Guyot, V. Lempereur, E. Meistermann, B. Vincent, L. Laforgue, Y. Le Digabel, F. Brossaud, F. Jourjon, et al.

► **To cite this version:**

L Guérin, R. Guérin-Schneider, F. Guyot, V. Lempereur, E. Meistermann, et al.. Déviations organoleptiques sur vins dues à la flore fongique des raisins. *Innovations Agronomiques*, 2011, 17, pp.263-275. 10.17180/cyhz-7f47 . hal-02651046

HAL Id: hal-02651046

<https://hal.inrae.fr/hal-02651046v1>

Submitted on 29 May 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Déviations organoleptiques sur vins dues à la flore fongique des raisins

Guérin L., Guérin-Schneider R., Guyot F., Lempereur V., Meistermann E., Vincent B., Laforgue R., Le Digabel Y.⁽¹⁾, Brossaud F., Jourjon F., Siret R.⁽²⁾, Lebrihi A.⁽³⁾, Bouix M.⁽⁴⁾, Bunner D., Panon M.L.⁽⁵⁾, Chatelet B.⁽⁶⁾, Mallier P.⁽⁷⁾, Badier M.⁽⁸⁾

- (1) Institut Français de la Vigne et du Vin – Domaine de l’Espiguette – 30240 Le Grau du Roi
- (2) Ecole Supérieure d’Agriculture d’Angers (ESA) 55, rue Rabelais – B.P. 748 – 49007 Angers
- (3) ENSAT-INP - Avenue de l'Agrobiopole BP 107 – 31326 Castanet Tolosan
- (4) AgroParisTech (ENSIA) 1, Avenue des Olympiades - 91744 Massy
- (5) CIVC - 5 rue Henri Martin - BP 135- 51204 Epernay Cedex
- (6) SICAREX Beaujolais - 210 boulevard Victor Vermorel - 69400 Villefranche/Saône
- (7) Chambre d’agriculture d’Indre-et-Loire - 38 Augustin Fresnel - BP 139 - 37171 Chambray Les Tours
- (8) Chambre d’agriculture du Loir-et-Cher - 11-13-15, rue Louis Joseph Philippe - Zone de l’Erigny - 41018 Blois

Correspondance : laurence.querin@vignevin.com

Résumé :

Ce projet vise à élaborer une stratégie de lutte contre la production des molécules néfastes à l’origine des ‘goûts moisi-terreux’ (GMT), et de l’arôme de champignon frais (ACF) sur les vins de plusieurs régions viticoles françaises, en caractérisant l’ensemble des espèces fongiques responsables de cette production et en établissant des descripteurs sensoriels simples correspondant aux défauts recherchés, ainsi que les méthodes analytiques pour les doser.

Le projet a abouti à la caractérisation et quantification des micro-organismes producteurs de ces molécules ainsi que le suivi de leur évolution, au cours de la maturité du raisin; la mise en place d’une collection de moisissures; la compréhension de l’effet des pratiques agro-viticoles sur la croissance des moisissures et sur la production de ces molécules; la définition et validation de descripteurs sensoriels associés aux défauts terreux, de même que les méthodes analytiques associées.

Mots clés : Goûts moisi-terreux (GMT), arôme champignon frais (ACF), flore fongique des raisins, descripteurs sensoriels, pratiques agroviticoles, pratiques œnologiques.

Abstract: Organoleptic deviations on wines due to the fungal flora of grapes

This project aimed at elaborating a strategy to control production of the molecules at the origin of the "mould" tastes on wines in several French wine-producing regions, by characterizing all the fungus species responsible for this production and by establishing simple sensory descriptors corresponding to these defaults. The project succeeded in i) the characterization and the quantification of microorganisms producing these molecules as well as the follow-up of their changes during the maturity of the grape; ii) implementation of a collection of molds; iii) understanding of the effect of the agro-wine practices on the growth of molds and on the production of these molecules; iv) definition and validation of sensory descriptors associated to the earthy defaults, and also the analytic methods associated.

Keywords: Taste mouldy-earthly (GMT), aroma of fresh mushroom (ACF), identification and quantification, sensory descriptors, agroviticoles and oenological practices.

Introduction:

Depuis plusieurs années, des déviations aromatiques décrites comme goûts « terreux », « moisi » et/ou « champignon » sont observées sur des vins de plusieurs régions viticoles françaises (Val de Loire, Bourgogne, Beaujolais et Champagne). Face au marché très concurrentiel d'aujourd'hui, les vins français se doivent d'être irréprochables sur le plan organoleptique et ceci nécessite une maîtrise accrue de la flore fongique au vignoble.

L'objectif de ce projet était de générer des connaissances et des références afin d'élaborer une stratégie de lutte, en utilisant les outils adéquats, contre la production de ces molécules néfastes. Ceci, afin de mieux connaître, en vue de maîtriser, les risques microbiologiques au vignoble. Dans ce cadre, les micro-organismes producteurs de ces molécules « néfastes » sont isolés et caractérisés par des méthodes métaboliques et moléculaires ; leur évolution, au cours de la maturité, est évaluée en fonction de différents paramètres physico-chimiques, climatiques et agro-viticoles. Leur suivi rapide est effectué par des techniques classiques et moléculaires (PCR-TTGE, Q-PCR). Les parcelles suivies sont également vinifiées pour permettre l'établissement de descripteurs sensoriels simples et pertinents, de même que l'identification de molécules à rechercher et/ou à doser, correspondant aux défauts recherchés (moisi, terreux et champignon), afin de pouvoir apporter un diagnostic rapide vers le vignoble via les organismes de transfert.

Grâce à l'expertise et au réseau expérimental des organismes techniques mis en présence : IFV (ex ITV France), chambres d'agriculture d'Indre-et-Loire, du Loir-et-cher et du Maine-et-Loire, Sicarex du Beaujolais, le CIVC, les organismes de recherche : le laboratoire de Génie chimique de l'ENSAT, le laboratoire Grappe de l'ESA et le département GMPA de l'AgroParistech (ex laboratoire de microbiologie de l'ENSIA) ont pu développer des outils et/ou des méthodes afin de répondre aux questions énumérées dans ce projet. L'expertise analytique de l'UMR-SPO de l'INRA de Montpellier, du département GMPA de l'AgroParistech et du laboratoire de cryptogamie du Muséum national d'histoire naturelle (MNHN) assurent la qualité et le respect des objectifs initiaux :

- Définir les espèces fongiques productrices des molécules préjudiciables à la qualité des vins et déterminer lesquelles sont les plus prépondérantes dans le vignoble.
- Comprendre l'impact des conditions agro-viticoles, climatiques et nutritionnelles sur la croissance des moisissures et sur leur production de molécules néfastes.
- Définir et valider les descripteurs sensoriels associés aux défauts terreux et développer les méthodes analytiques associées.

Afin de mieux connaître, en vue de mieux maîtriser, les risques microbiologiques au vignoble.

1. Démarche utilisée – méthode et outils

Afin de répondre aux questions posées précédemment, trois actions concomitantes ont été menées :

Action 1 : Etude de l'écosystème fongique des raisins

Action 2 : Etude des facteurs concourants à la production de ces molécules

Action 3 : Caractérisation des défauts organoleptiques et molécules associées

Action 1 : Etude de l'écosystème fongique des raisins

Constitution d'une souchothèque de micro-organismes, et particulièrement des espèces productrices des goûts terreux, moisi et champignon :

Des parcelles sont choisies, soit à partir d'un réseau pré-existant, soit d'un réseau nouvellement constitué, prenant en compte des parcelles ayant déjà rencontré des problèmes de déviations, et

également des parcelles indemnes. Forts de l'expérience acquise depuis 2002, les organismes techniques prennent en charge les prélèvements de raisins (protocole déjà éprouvé), qui sont ensuite analysés, par les laboratoires impliqués (IFV, ENSAT, AgroParistech). Ainsi, des isolats de micro-organismes sont préparés, conservés et utilisés comme référence pour la validation et/ou mise au point des méthodes de suivi au vignoble. Ces souches sont identifiées (ENSAT, IFV, AgroParistech), et caractérisées du point de vue de la production de métabolites, soit déjà prédéfinis (géosmine, IPMP, 2-MIB), soit nouvellement définis (fenchone, fenchol, octénols, octénones,...) (INRA Montpellier, ESA).

Mise au point de méthodes métaboliques (profil métabolique obtenu par HPLC et détection barrette diodes) et moléculaires pour la caractérisation des espèces fongiques productrices des goûts terreux :

Pour l'identification des genres et des espèces potentiellement productrices de géosmine et d'autres molécules incriminées, des méthodes d'identification reposant sur les travaux de phylogénie fondée sur les ITS (Internal Transcribed Spacer) des ARN ribosomiques, sont développées ainsi qu'une méthode basée sur la chemotaxonomie (taxonomie fondée sur les profils de métabolites secondaires spécifiques générés par les espèces fongiques), concept développé par J.C. Frisvad et O. Filtenborg (1983)

Etude de la dynamique des populations fongiques et plus particulièrement de celles productrices de molécules indésirables pour la qualité des vins à l'aide de l'outil TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) :

L'outil à disposition a demandé à être validé sur plusieurs millésimes, avec des échantillons complexes, et des souches isolées de régions viticoles différentes. Le référentiel utilisé a été enrichi, afin d'optimiser la détection et l'identification des souches détectées au vignoble. La méthode est utilisée conjointement par l'IFV et AgroParisTech, à partir des échantillons de raisins collectés par l'ensemble des organismes techniques. La précision de l'outil TTGE est apportée par les marqueurs utilisés : ITS, tubuline..., et conforte l'analyse apportée en 48 heures. En parallèle, des analyses dites classiques sont conduites par l'IFV. Ce point est sous l'expertise de l'AgroParisTech et du Muséum national d'histoire naturelle.

Détection spécifique et rapide des espèces productrices des goûts terreux et la quantification des espèces importantes au cours de la maturité des raisins à l'aide de techniques classiques et moléculaires comme la PCR quantitative (Q-PCR).

La quantification indirecte des molécules n'est possible que si une corrélation est rencontrée entre la quantité des molécules produites et la biomasse des champignons producteurs. Pour cela, une recherche de marqueurs génétiques spécifiques couplés à l'utilisation de la PCR en temps réel (Q-PCR) est nécessaire.

Les marqueurs les plus spécifiques à la production de la géosmine sont des gènes appartenant à la voie de biosynthèse. La géosmine appartient à la famille des terpènes. La première enzyme de la voie de biosynthèse de cette famille est la terpène synthétase. En s'inspirant des données disponibles dans les banques, ces oligonucléotides spécifiques peuvent être déduits.

Une fois les marqueurs définis et les amorces spécifiques obtenues, l'analyse par Q-PCR est mise au point pour la quantification de ces champignons. La validation se fait directement sur des échantillons provenant des parcelles retenues dans le cadre de cette étude.

Action 2 : Etude des facteurs concourants à la production de ces molécules

Une enquête est menée dans les différents vignobles afin de rassembler le maximum d'informations sur les différentes pratiques viticoles, sur la température, l'humidité et la

pluviométrie, afin de mettre en relation ces données et l'apparition des espèces incriminées et la production de géosmine :

Les partenaires ont établi un relevé d'informations qui doit permettre d'exploiter, de façon statistique, les facteurs relevés comme prépondérants : agro-viticoles, climatiques (température, hygrométrie, essentiellement), et la flore microbienne (fongique plus particulièrement). Ces informations sont recueillies à partir du réseau de parcelles constituées et ceci à partir de stations météorologiques permettant d'avoir des indications liées au macro-climat, mais également au micro-climat, à partir de l'ensemble des données de la première action liée à la dynamique des flores, et à partir des pratiques agro-viticoles existantes.

Des cultures en laboratoire des moisissures isolées de parcelles ayant conduit à des vins altérés sont réalisées dans différentes conditions (plan d'expérience) afin de comprendre les facteurs à l'origine de la production des molécules :

A partir, d'une part des souches isolées et de celles notamment définies par l'INRA de Montpellier et l'ESA comme productrices des molécules recherchées, et d'autre part, des facteurs relevés précédemment comme prépondérants, la limite de ces variables est testée en laboratoire, afin d'établir un diagnostic prédictif. Cette approche inclut une meilleure connaissance des souches productrices, et notamment au travers de leur état physiologique, étudié par cytométrie en flux (AgroParistech).

Action 3 : Caractérisation des défauts organoleptiques et molécules associées

Entraînement à la reconnaissance et à la détection des molécules identifiées dans la bibliographie en lien avec les goûts terreux (géosmine, 2-méthylisobornéol....) : Validation des seuils de détection sur molécules isolées. Entraînement sur vins dans lesquels les molécules auront été rajoutées : validation des seuils de détection.

Analyse descriptive et détection de ces défauts dans des vins sélectionnés par les partenaires des différentes régions impliquées dans le projet (Val de Loire, Beaujolais, Champagne, Bourgogne) : Séances d'entraînement sur les vins pour être familiarisé avec l'espace produit ; génération de descripteurs, établissement de la liste des descripteurs ; Séances d'analyse descriptive sur les échantillons sélectionnés

Analyse chimique par CPG : Identification et quantification des molécules identifiées dans la bibliographie sur les vins sélectionnés ; Relation entre résultats analyse sensorielle et analyse CPG

2. Résultats obtenus

Action 1 : Etude de l'écosystème fongique des raisins

Flore fongique des raisins

La pellicule de raisin présente naturellement à sa surface une population de micro-organismes multiples et variés appelée flore indigène ou microflore épiphytique. On retrouve notamment des levures, des bactéries acétiques et lactiques, des bactéries filamenteuses ou encore des moisissures.

Les genres les plus fréquemment rencontrés sont *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sp.* et *Penicillium sp.*. De nombreux facteurs géographiques, climatiques ou culturels font varier les quantités et les proportions de ces micro-organismes sur la pellicule de raisins. Le genre et l'espèce le plus communément rencontrés sont *Botrytis cinerea* (photo 1). Parmi le genre *Penicillium*, une espèce fréquemment retrouvée est *expansum*. Toutefois, des espèces telles que *aurantiigriseum*, *brevicompactum*, *citrinum*, *chrysogenum*, *crustosum*, *glabrum*, et *decumbens* sont rencontrées (Pitt et Hocking, 1999 ; La Guerche et al, 2003 a & b) (Photo 2). Parmi le

genre *Aspergillus*, l'espèce la plus communément rencontrée est *niger*, mais également *carbonarius* (photo 3), *alliaceus*, *fumigatus*... (Serra et al., 2003).

Photo 1 : Botrytis sur baies

Photo 2 : Penicillium sur baies

Photo 3 : Aspergillus sur baies



Capacité de production des moisissures isolées de baies de raisins

69 isolats effectués sur baies de raisins, ont été testés en milieu gélosé (CYA), afin de déterminer leurs capacités de production en composés susceptibles d'engendrer une déviation organoleptique comme spécifiée dans le Tableau n°4.

Seuls les résultats liés à la géosmine, et au 2-MIB (2-méthylisobornéol) sont présentés sous forme de groupes potentiels de production (Tableau 1).

Tableau 1 : Capacités de production des différentes moisissures testées (en 2-MIB, et en géosmine).

Potentiels de production (ng/Boite de Pétrie)	2- MIB (ng/Boite de Pétrie) (LDQ : 2,5 ng/l)	Géosmine (ng/Boite de Pétrie) (LDQ : 0,6 ng/l)
FORT (100-350)	<i>Botrytis cinerea</i> (2), <i>Cladosporium sp.</i> (2)	<i>Penicillium expansum</i> (14), <i>Penicillium minioluteum</i> (5), <i>Penicillium paraherquei</i> (1), <i>Penicillium sclerotiorum</i> (2)
MOYEN (10-100)	<i>Penicillium cecidicola</i> (2), <i>Chaetomium sp.</i> (1), <i>Talaromyces Flavus</i> (1)	<i>Penicillium cecidicola</i> (2), <i>Penicillium brevicompactum</i> (4), <i>Penicillium restrictum</i> (3), <i>Penicillium roquefortii</i> (2)
FAIBLE (2,5 ou 0,6-10)	<i>Penicillium minioluteum</i> (5), <i>Thermoascus aurantiacus</i> (2)	<i>Aspergillus niger</i> (1), <i>Aspergillus fumigatus</i> (10), <i>Botrytis cinerea</i> (2), <i>Chaetomium sp.</i> (1), <i>Cladosporium sp.</i> (2), <i>Penicillium biliae</i> (2), <i>Penicillium canescens</i> (3), <i>Penicillium Chrysogenum</i> (1), <i>Penicillium glabrum</i> (2), <i>Penicillium griseofulvum</i> (1), <i>Penicillium ochrochoron</i> (1), <i>Penicillium solitum</i> (1), <i>Penicillium spinulosum</i> (1), <i>Penicillium thomi</i> (1), <i>Talaromyces Flavus</i> (1), <i>Talaromyces trachyspermus</i> (1), <i>Thermoascus aurantiacus</i> (2), <i>Trichoderma atroviride</i> (2), <i>Trichotecium roseum</i> (1)

L'ensemble des souches testées a été identifié par séquençage (à l'aide d'amorces ITS et/ou bêta-tubuline). On remarque que seul le genre *Penicillium* est producteur de géosmine et les espèces pouvant occasionner une déviation prononcée dans les moûts, voire dans les vins résultants sont : *expansum*, *sclerotiorum*, *roquefortii*, *paraherquei*, *minioluteum*.

D'autres études confortent et/ou complètent les références sur les moisissures productrices de géosmine (La Guerche et al., 2004).

Méthodes d'études de la flore fongique utilisées dans le cadre des GMT

L'écologie et la biodiversité des micro-organismes présents à la surface des baies de raisins sont étudiées en utilisant des méthodes de microbiologie conventionnelle, d'une part, et/ou en utilisant des méthodes moléculaires d'autre part.

Les méthodes dites classiques font appel à des milieux de culture spécifiques, afin d'une part d'isoler les souches de moisissures présentes à la surface des baies de raisins, et d'autre part, afin de déterminer les critères microscopiques et macroscopiques de différenciation (photos 4 et 5).

Photo 4 : Penicillium sur boîte CYA



Photo 5 : Penicillium au microscope



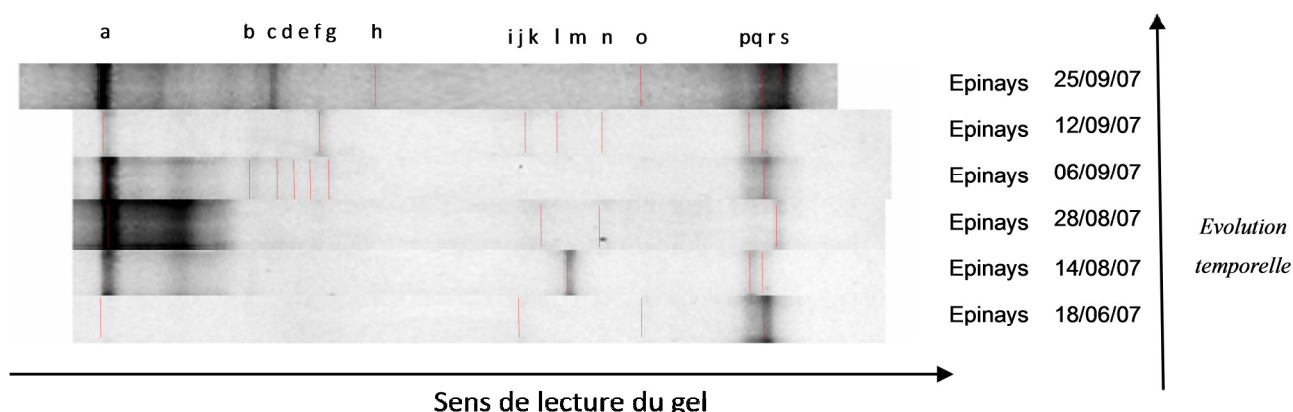
Les méthodes moléculaires telles la PCR-TTGE (électrophorèse couplée à un gradient de température) et/ou PCR-DGGE (électrophorèse couplée à un gradient chimique) reposent sur l'analyse directe de l'ADN, sans étapes préalables de culture.

Le pouvoir de discrimination de ces méthodes repose sur la variabilité des séquences amplifiées choisies, qui impliquent des comportements différents de migration dans le gel et qui induisent des profils différents (Lebrun et al., 2006 ; Guerin et al., 2006 ; 2007 ; 2009 ; Laforgue et al., 2007 ; 2008 ; 2009).

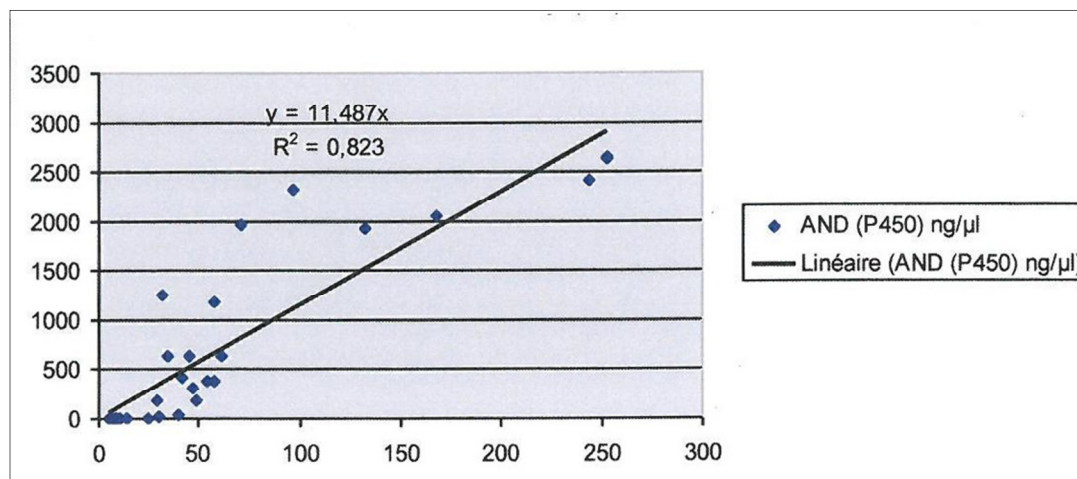
Ainsi, il a été possible de réaliser la dynamique des flores fongiques, sur les parcelles suivies dans les différents vignobles concernés (Tableau 2 et Figure 1).

Tableau 2 : Correspondance entre les bandes identifiées sur le gel et les espèces détectées

PARCELLE	DATE PRELEVEMENT	Espèces détectées et identification potentielle
Les Epinays	18/06/2007	a) <i>B. cinerea</i> ; i) <i>P. implicatum</i> ; o) <i>Sp. alborubescens</i> ; q) <i>inconnue</i>
	14/08/2007	a) <i>B. cinerea</i> ; m) <i>inconnue</i> ; p) <i>inconnue</i> ; q) <i>inconnue</i>
	28/08/2007	a) <i>B. cinerea</i> ; k) <i>P. herquei</i> , <i>P. purpurescens</i> ; n) <i>Kl. Thermotolerans</i> ; r) <i>inconnue</i>
	06/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> ; b) <i>inconnue</i> ; c) <i>P. italicum</i> , <i>P. spinulosum</i> ; d) <i>P. viridicatum</i> ; e) <i>P. expansum</i> ; g) <i>P. purpurescens</i> , <i>P. herquei</i> , <i>S. cerevisiae</i> ; q) <i>inconnue</i>
	12/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> ; f) <i>P. herquei</i> ; j) <i>inconnue</i> ; l) <i>inconnue</i> ; n) <i>Kl. Thermotolerans</i> ; p) <i>inconnue</i> ; q) <i>inconnue</i>
25/09/2007	a) <i>B. cinerea</i> ; c) <i>P. italicum</i> ; h) <i>P. thomii</i> ; o) <i>Sp. alborubescens</i> ; q) <i>inconnue</i> ; s) <i>A. japonicus</i>	

Figure 1 : Gel 20-70% de la parcelle Epinays aux différentes dates de prélèvements

Une approche complémentaire est liée à l'utilisation de la PCR quantitative (Q-PCR), en temps réel, qui permet une quantification indirecte des molécules, dont la géosmine, produites par la flore fongique présente sur les baies de raisins. La validation de la corrélation entre les teneurs de géosmine et les champignons producteurs est faite directement sur des échantillons provenant des parcelles d'études des différents vignobles concernés (Val de Loire, Bourgogne-Beaujolais), sur deux années : 2007 et 2008 (Figure 2).

Figure 2 : Courbe de corrélation entre la quantité d'ADN de *Penicillium*, analysé dans les échantillons et la quantité de géosmine rencontrée dans ces mêmes échantillons.

Ces outils d'étude de la flore fongique ont permis d'apporter des réponses sur un premier niveau de risques associé à la parcelle suivie, mais sans pour autant écarter la nécessité d'un suivi analytique (teneurs en géosmine, notamment) au cours du suivi de la maturité, et d'autant plus, au plus proche des vendanges.

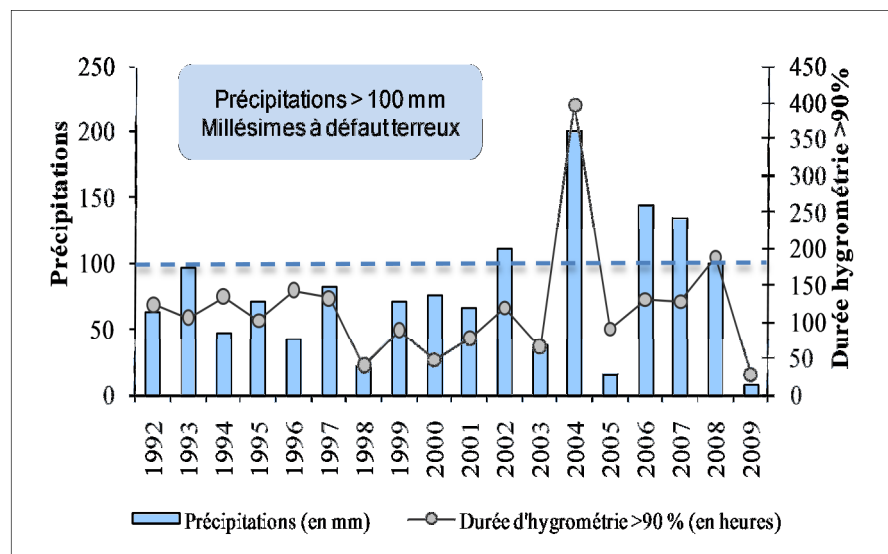
Action 2 : Facteurs concourants à la production de ces molécules

Pour les cépages Chenin et Gamay, en Touraine, La collecte des données agro-viticoles et climatiques a été réalisée pendant trois années. L'analyse comparative des pratiques culturales ne permet pas

d'expliquer les écarts de résultat sanitaire final entre les parcelles. De même que l'analyse comparative des données climatiques fournies par les stations Météo France, et ceci quelles que soient les périodes climatiques choisies, sur les trois années concernées. L'analyse statistique de ces données climatiques par parcelles (stations installées sur ces dernières), indique que le cumul de pluies ou la durée d'hygrométrie supérieure à 90% sont moyennement corrélés à la géosmine.

Cependant, pour le cépage Gamay en Beaujolais, la hiérarchie suivante est obtenue (classement par ordre décroissant des facteurs qui ont le plus d'impact sur le botrytis, hors lutte chimique) : enherbement permanent, transformation du gobelet attaché en cordon palissé, mise en place d'un palissage collectif, fertilisation azotée inférieure à 30 u/ha, effeuillage à la nouaison, éclaircissage physiologique. Un second point important a été la mise en évidence de l'impact du niveau des précipitations entre début véraison et récolte sur l'apparition de goûts moisis-terreux. Il y a un risque de GMT lorsque la pluviométrie dépasse 100 mm sur cette période (Figure 3).

Figure 3 : Précipitations et durée d'hygrométrie supérieure à 90% de 1992 à 2009 entre le stade début véraison et la récolte - Station de St Jean d'Ardières (69).



Conditions de croissance et de production des espèces productrices de géosmine

Essais en conditions contrôlées de facteurs influençant la croissance et la production de géosmine

Il a été modélisé, dans un premier temps, l'effet simple et/ou combiné de différents facteurs de croissance et de production de géosmine, du genre et espèce *Penicillium expansum*.

Les facteurs retenus ont été la température, la teneur en CO₂, et la disponibilité en eau, plus communément notée AW. Les essais ont été réalisés *in vitro* et sur baies et/ou grappes de raisins (photo 6).

Ainsi, il a été montré que la production de géosmine par cette espèce est fortement conditionnée par une activité de l'eau élevée (> 0,99) et une température sous-optimale (<15°C), et avec une teneur en CO₂ inférieure à 1,5 % (Judet et al., 2010).

De plus, il a été nécessaire d'occasionner des blessures aux baies de raisins, qui peuvent être physiques, et/ou occasionnées par la croissance antérieure de moisissures telles que *Botrytis cinerea*, qui ont la capacité de dégrader la pellicule des baies de raisins.

Photo 6 : Ensemencement sur grappe



Compte-tenu du décalage qui existe entre la présence des micro-organismes potentiellement producteurs et la production de géosmine elle-même, il a été fait l'hypothèse de la relation avec l'état physiologique des moisissures : spore, germination, mycélium. Les états physiologiques sont définis à partir d'observations visuelles (Figure 4) et de mesures de fluorescence à l'aide de la cytométrie en flux (Figure 5). Il a ainsi pu être mesuré que c'est lors de la phase active mycélienne du champignon que la géosmine serait produite, mais il n'a pas été possible d'aller plus loin pour des raisons méthodologiques.

Figure 4 : Différents stades de croissance de *Penicillium brevicompactum* M4069 sur CYA

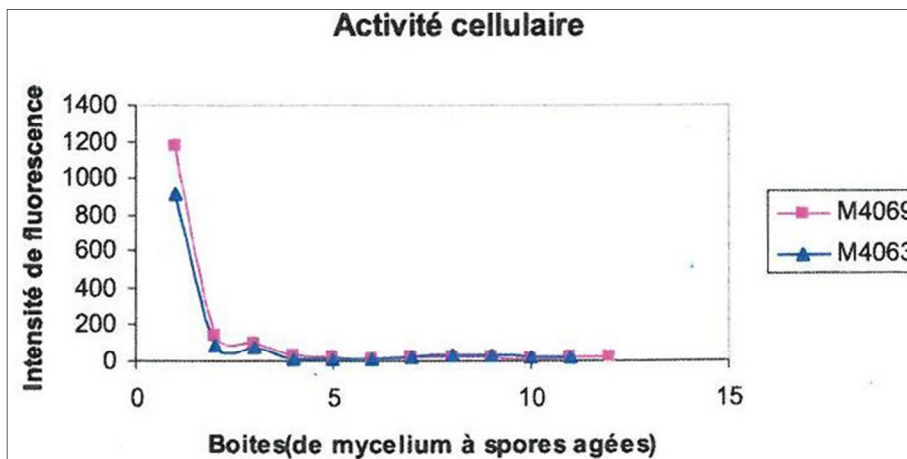


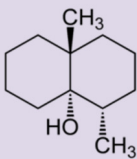
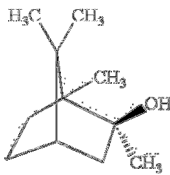
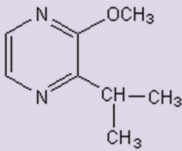
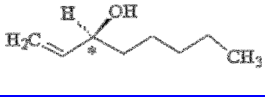
Figure 5 : Evolution de l'activité cellulaire globale au cours de la sporulation

Action 3 : Caractérisation des défauts organoleptiques et molécules associées

Les arômes et/ou précurseurs d'arômes sont produits au cœur de complexes fongiques en proportions variables.

En fonction des millésimes, des cépages et des situations géographiques, certaines molécules qui sont présentées dans le Tableau 3, peuvent être produites de façon majoritaire voire quasi exclusive par un complexe. C'est généralement le cas de la géosmine.

Tableau 3 : Principales déviations organoleptiques et molécules associées

Molécules	Structures	Seuils de perception en fonction de la structure du vin	Descripteurs	Moment de Détection
Géosmine		30 à 50 ng/L	Betterave rouge Terre	Grappe Moût Vin
2-méthyl-isobornéol		30 ng/l	Terre Camphre	Grappe Moût Dégradé en cours de FA. Produit de dégradation non caractérisé.
2-Isopropyl-3-Méthoxypyrazine		2 ng/L	Pomme de terre Petits poids	Grappe Moût Vin
Octénol/Octénone		10 µg/l et 50 ng/l resp.	Champignon de Paris	Grappe Moût Vin

La perception même de ces molécules est variable. Certaines molécules sont très fortement perçues dans les moûts mais leur intensité diminue au cours de la fermentation alcoolique (FA) (cas du MIB), ou à l'inverse se maintiennent ou augmentent légèrement. D'autres molécules sont absentes ou imperceptibles dans les moûts, mais leur présence se révèle en cours de FA pour altérer le produit fini.

Perception sensorielle associée

La perception de la géosmine n'est pas aisée à détecter et ceci pour plusieurs raisons.

Une partie des individus n'est pas sensible à cette molécule. Il est important que chaque vinificateur puisse connaître sa sensibilité à la géosmine. Les personnes non sensibles devront faire appel aux compétences d'une tierce personne pour les aider à identifier des cuvées à problèmes en cours de vinification et pour la réalisation d'assemblage.

La perception du défaut est fugace au nez et très persistante en bouche (le mauvais goût reste très longtemps après avoir recraché le vin) (Figures 6 et 7). En cas de suspicion, au cours d'une dégustation, les cuvées à défaut devront donc toujours être dégustées en dernier, ou bien à part, afin d'éviter les erreurs d'appréciation.

Le type de vin peut perturber la dégustation. Le défaut sera plus difficilement décelable dans les vins très structurés ou très aromatiques. Il peut également être masqué par un autre défaut (réduction, ...). Le vinificateur devra donc déguster les cuvées bien avant le décuvage, de façon régulière et dès l'encuvage.

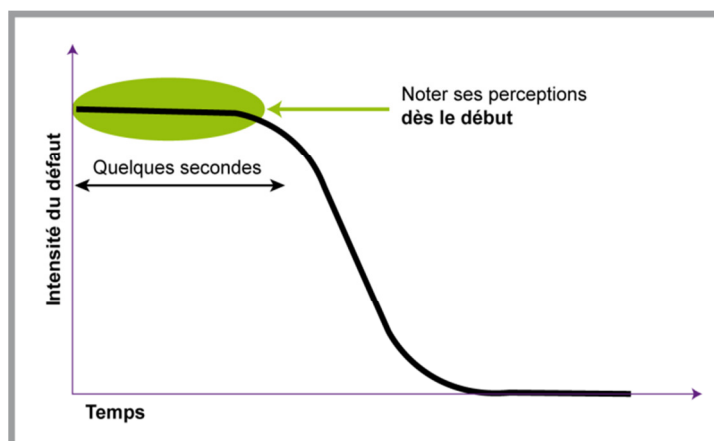


Figure 6 : Phénomène d'adaptation au nez

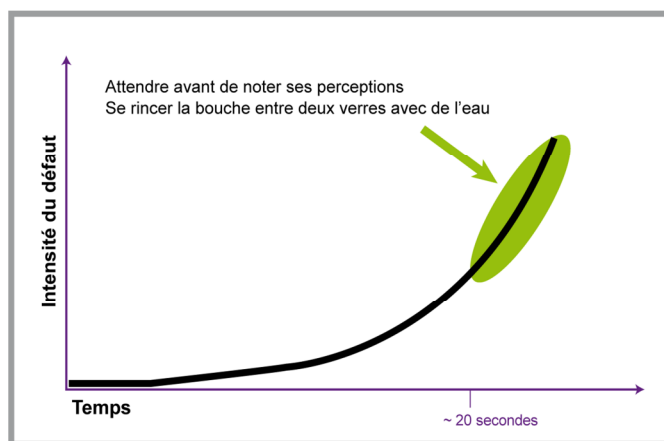


Figure 7 : Phénomène d'adaptation en bouche

Importance du développement analytique

Le développement analytique a été important, afin de mettre à disposition des méthodes de dosages, pour l'ensemble des molécules citées dans le Tableau 4. A ce jour, certains défauts n'ont pas trouvé leurs marqueurs, mais pour les défauts liés au caractère 'terreux', ce dernier est bien lié à la géosmine.

Ainsi, les analyses sont possibles à l'aide d'une méthode couplant SPME et GC-MS/MS ; l'échantillon est analysé, après passage en phase vapeur (SPME), par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à de l'identification structurale, la spectrométrie de masse (MS) (Schneider et al., 2005). Cette méthode est ainsi spécifique et permet de quantifier de faibles concentrations de produits (LDQ sur vin : 5 ng/L).

Un point doit faire l'objet d'une attention particulière : la préparation des échantillons. En effet, la présence des bourbes dans les jus perturbe les mesures. Il est donc préférable d'adopter toujours le même mode de préparation des échantillons : décantés (voir même centrifugés), ou bruts. De même, il est important de ne s'adresser qu'à un laboratoire d'analyses, tout au moins pour une même série d'échantillons, pour avoir des valeurs absolues comparables entre elles.

Au final, il a été possible d'associer les défauts suivants à des molécules et à un vocabulaire :

- **Champignon** : odeur de champignon, type de champignon, de souche (Paris) associé aux molécules 1-octen-3-ol et 1-octen-3-one
- **Moisi** : odeur de moisi, de bouchon, serpillère humide associé à la molécule MIB
- **Végétal** : poivron vert et asperge associé à la molécule IPMP
- **Terre humide** (salpêtre, tuffeau humide et jus de betterave rouge) et **terre sèche** (tuffeau sec, poussière écrasée) sont associées à la molécule géosmine.

Conclusions

Ce projet transversal a contribué à faire avancer d'une façon générale les connaissances sur la flore fongique et permis d'apporter des réponses concrètes à la vigne et à la cave. Il a également permis de fédérer beaucoup de partenaires d'origines et de compétences différentes et surtout, a permis de développer une méthodologie d'approche globale, pouvant être transposable à tous autres problèmes d'origine fongique.

Un travail sur les facteurs concourants à la production des métabolites secondaires a été entamé, mais demande un investissement sans doute plus important, sur les critères à prendre en compte à la vigne et sur les outils statistiques à utiliser, afin d'aboutir.

La problématique la plus récente, appelée Arômes Champignon Frais (ACF), demande encore des moyens complémentaires, afin de pouvoir déterminer la ou les moisissures responsables, de même, que la méthode analytique la plus adaptée à la recherche des molécules identifiées à ce jour (octénone, octénol, et nonénone)

Références bibliographiques

- Doaré-Lebrun E., El Arbi A., Charlet M., Guérin L., Pernelle J.J., Ogier J.C., Bouix M., 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis – potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1340-1350.
- Frisvad J.C., Filtenborg O., 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 46, 1301–1310.
- Guérin L., Lebrun E., Pernelle J.J., Bouix M., 2006 Caractérisation de la diversité fongique des raisins par électrophorèse dénaturante en gradient de température. 05-06 Décembre 2006. 8^{ème} Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, organisée par l'Agence Française de Protection des Plantes (AFPP).
- Guérin L., Guyot F., Vincent B., Lempereur V., 2007 Epidémiologie des moisissures responsables des goûts moisi-terreux. Symposium de Bordeaux Juin 2007. (Publication dans les actes du colloque, Vigne et Vin Publications Internationales éditeur, Juillet 2010, pp 76-78).
- Guérin L., Laforgue R., Pernelle J.J., Bouix M., 2009 Study of fungal diversity of grapes using the PCR-DGGE method. Colloque In Vino Analytica Scientia, organisé par l'UMT Vinitera, Angers, 02-04 Juillet 2009.
- Guérin L., Bouix M., Laforgue R., Poupault P., Mallier P., Mallet A., Dupont J., 2010. Différentiation de parcelles de chenin du Val de Loire à l'aide de l'étude des flores fongiques des raisins, en utilisant l'outil DGGE. XXXII^{ème} Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, 2010, Géorgie (Tbilisi), 20-27 Juin 2010.
- Judet D., Bollaert S., Duquenne A., Charpentier C., Bensoussan M., Dantigny P., 2010. Validation of predictive models when the water activity of the product cannot be changed easily: growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 142, 106-113.

Laforgue R., Ghorbal S., Guerin L., Pernelle J.J., Bouix M., 2007 Différenciation rapide des espèces de moisissures en mélange à l'aide d'un référentiel basé sur une empreinte moléculaire. Symposium de Bordeaux, Juin 2007. Actes du colloque, Vigne et Vin Publications Internationales éditeur, Juillet 2010, pp 247-249.

Laforgue R., Guérin L., Pernelle J.J., Bouix M., 2008. Study of fungal diversity of grapes using the PCR-DGGE method. Conférence "wine organoleptics" Grape bunch rot and associated organoleptic problems. Remich (Luxembourg). 24 - 25 Novembre 2008.

Laforgue R., Guérin L., Pernelle J.J., Monnet C., Dupont J., Bouix M., 2009. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. Journal of Applied Microbiology 107, 1208-18.

La Guerche S., Chamont S., Blancard D., Darriet P., 2003a. Arôme terreux des vins associé à la géosmine : les microorganismes impliqués et leurs potentialités aromatiques. AFPP - 7ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours 3-5 décembre.

La Guerche S., Blancard D., Chamont S., Dubourdieu D., Darriet P., 2003b. Origine de la géosmine, composé responsable d'un arôme terreux dans les vins : étude des microorganismes impliqués et de leur métabolisme. VIIème Symposium International d'œnologie de Bordeaux, 19-21 juin.

La Guerche S., Garcia C., Darriet P., Dubourdieu D., Labarère J., 2004. Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. Current Microbiology 48, 405-411.

Pitt J.I., Hocking A.D., 1999. Fungi and food spoilage. 2nd edition. Ed. An Aspen Publishers, Gaitesburgh, MD. 593 p.

Schneider R., Guérin L., Vincent B., Baumes R., 2005. Stable isotope dilution assay of 3-propyl-2-methoxy-pyrazine, 2-methylisoborneol and geosmin in Petri dishes, musts and wines using SPME and GC-MS/MS. In vino analytica scientia, 7/9 juillet 2005, Montpellier

Serra R., Abrunhosa L., Kozakiewicz Z., Venancio A., 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. Int. J. Food Microbiol. 88, 63-68.