

GRAND PRIX 2005

Stéphane LA GUERCHE

ETUDE

Les défauts moisiss terreux
des vins : la géosmine
identifiée comme
principale responsable.

PRÉFACE

Le Groupe Amorim, né du liège en 1870 au Portugal, a fondé les bases de son développement sur cette extraordinaire matière première, à travers la production de cet humble mais inséparable compagnon du Vin : le bouchon de liège.

Notre volonté de servir la cause du vin s'est toujours exprimée dans la recherche technologique sur la filière liège, base de notre activité.

En 1992, nous avons souhaité aller plus loin et nous engager davantage aux côtés des chercheurs en œnologie en créant l'Académie Amorim, un lieu de rencontre et d'échange entre œnologues, ingénieurs, professeurs, sommeliers, auteurs, artistes... tous animés d'une même passion du Vin.

Chaque année, notre Académie encourage et soutient la recherche en œnologie par la remise d'un Prix à un chercheur ou à une équipe de chercheurs ayant fait paraître des travaux significatifs qui concourent à la défense et à la promotion de la qualité du Vin. Que soient ici saluées les personnalités, membres de cette Académie, qui contribuent si généreusement à cette mission. Je formule le vœux que cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix de l'Académie, devienne, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin.

Americo Ferreira de AMORIM

Président du Groupe Amorim

LAURÉATS DE L'ACADÉMIE AMORIM

- Grand Prix 2004 - Michael JOURDES
"Réactivité, sythèse, couleur et activité biologique d'Ellagitannins C-Glycosidique et Flavano-Ellagitannins"
- Coup de Cœur 2004 - Cristina DEL VAL GOMEZ
"Le paradoxe juridique du vin"
~
- Grand Prix 2003 Dominique ROUJOU DE BOUBEE
"Recherches sur la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine dans les raisins et dans les vins"
~
- Grand Prix 2002 - Catherine PEYROT DES GACHONS
"Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L.cv Sauvignon"
~
- Grand Prix 2001 - René SIRET
"Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (Vitis vinifera L.) à l'aide de marqueurs microsatellites : application à la caractérisation des cépages dans les vins"
- Coup de Cœur 2001 - Frédéric BROCHET
"La dégustation. Etude des représentations des objets chimiques dans le champ de la conscience."
~
- Grand Prix 2000 - Takatoshi TOMINAGA
"Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin"
- Coup de Cœur 2000 - Jean-Pierre GOT
"Le verre de vin dans la peinture hollandaise de l'Age d'Or. Les vins de Bergerac et les Provinces-Unis"
~
- Grand Prix 1999 - Isabelle CUTZACH-BILLARD
"Etude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement. Son origine. Sa formation"
- Prix Chêne-Liège 1999 - Noël HEYES
"La Perméabilité à l'oxygène de la cire de paraffine macrocristalline et sa conséquence sur les traitements de surface des bouchons en liège naturel destinés aux vins tranquille"
- Coup de Cœur 1999 - Julien PILLOT & Jean-Christian LAMBORELLE
"Le décret du 1^{er} décembre 1936 dit "code du vin" : étude critique"
~
- Grand Prix 1998 - Virginie MOINE-LEDOUX
"Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins"
- Coup de Cœur 1998 - Marie-Laure CHAMUSSY-BOUTEILLE
"Colette : un vin d'écrivain"
~
- Grand Prix 1997 - Valérie LAVIGNE-CRUEGE
"Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et l'élevage des vins blancs secs"
~
- Grand Prix 1996 - Sylvie BIAU
"Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux"
- Prix Chêne-Liège 1996 - Guillem ROIG I JOSA - Héctor RIU SAVALL
Josep SANCHO I VALLS
"Traitement des résidus de l'industrie du liège par la culture des champignons"
~
- Mention d'Honneur du Jury 1995 - P.L. TEISSEBRE - A.L. WATERHOUSE
R.L. WALZEM - J.-B. GERMAN - E.N. FRANKEL - A.J. CLIFFORD
"Composés phénoliques du raisin et du vin et sant."
- Grand Prix 1995 - Samuel LUBBERS
"Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme"
~
- Grand Prix 1994 - Ziya GÜNATA
"Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique"
~
- Grand Prix 1993 - Pierre-Louis TEISSEBRE
"Le plomb, du raisin au vin"
~
- Grand Prix 1992 - Pascal CHATONNET
"Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques"

Odeurs de moisissures, goûts terreux ou autres mauvais goûts manifeste que l'on trouve dans les vins et que l'on appelle souvent à tort et par facilité des "goût de bouchons", sont au cœur de l'étude de Stéphane La Guerche.

En identifiant la géosmine, le champignon responsable de ces déviations organoleptiques, il met en évidence l'origine microbienne de ces défauts, révélant l'émergence dans nos vignobles, de diverses espèces de champignons considérés jusqu'à présent comme marginaux, mais qui participent au développement des altérations du vin.

Si la fermentation alcoolique permet la dégradation de certains de ces composés, d'autres défauts, notamment ceux liés à la géosmine, persistent et portent un préjudice durable à la qualité des vins.

Cette étude, Grand Prix 2005 de l'Académie Amorim apporte donc un nouvel éclairage sur la qualité de nos cépages et permet d'imaginer de futurs moyens de lutte contre les déviations organoleptiques dues à la géosmine.

Robert TINLOT

Président de l'Académie Amorim

Introduction

La récolte de vendanges botrytisées, marquées par des odeurs fongiques ou moisies n'est pas un phénomène récent (Bayonove, 1989; Ribéreau-Gayon & Peynaud, 1964). Cependant, au cours de ces dernières années, plusieurs défauts aromatiques à caractère fongique, moisi ou terreux associés au développement plus ou moins visible de pourritures sur les raisins ont été mis en évidence dans des vins de différentes régions viticoles (Bordelais, Beaujolais, Val de Loire, Bourgogne).

Les premiers travaux ont permis d'identifier dans les vins un composé présentant une forte odeur de terre humide, de betterave. Il s'agit de la (-)-géosmine, un composé bien connu comme polluant de l'eau (Gerber, 1979). Ce composé est retrouvé dans des moûts avant fermentation et sa présence est toujours associée à la récolte de vendanges au moins partiellement touchées par la pourriture grise (Darriet et al., 2000; Darriet et al., 2001).

Toutefois, la géosmine n'est pas le seul composé responsable du caractère moisi terreux des vins. D'autres défauts terreux sont également apparus dans de grandes appellations du vignoble bourguignon.

L'importance des préjudices causés par ces problèmes sur la qualité des vins de nombreux cépages (Cabernet Sauvignon, Sémillon, Gamay, Chenin, Pinot noir) a donc motivé une étude approfondie visant, d'une part, à caractériser la nature des défauts associés à ces odeurs fongiques ou terreuses et, d'autre part, à préciser leur origine biologique et les conditions de leur expression au vignoble.

I. Caractérisation de défauts fongiques et/ou terreux sur les raisins, dans les moûts et dans les vins

Deux types de défauts fongiques et/ou terreux peuvent être à l'origine de déviations organoleptiques. Certains sont retrouvés au niveau des raisins et des moûts, mais ne sont pas perçus dans les vins. D'autres, en revanche, sont présents dans les raisins et les moûts et vont persister après fermentation et nuire à la qualité du vin. Une bonne connaissance de la nature chimique des composés responsables de tels défauts est donc essentielle à la compréhension de leur origine au vignoble.

I.1. IDENTIFICATION DE DÉFAUTS FONGIQUES/TERREUX PRÉSENTS DANS LES RAISINS ET LES MOÛTS

Des raisins, jus de raisins et vins issus de cépages Cabernet Sauvignon, Gamay, Pinot, Sémillon obtenus à partir de raisins touchés au moins partiellement par la pourriture grise et marqués par des caractères fongiques et terreux ont donc été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un mode de détection olfactométrique (CPG-O). Cette technique a permis de mettre en évidence les zones odorantes les plus caractéristiques, puis les composés correspondants ont été identifiés. Une assez grande diversité des zones odorantes correspondant à des odeurs fongiques et terreuses peut être détectée (Tableau 1) (La Guerche et al., 2003b). La présence de ces composés est variable selon la nature du cépage, le stade de développement et le type de pourriture des baies. Parmi les composés fréquemment identifiés, le 1-octen-3-ol, la 1-octen-3-one, le 2-octen-1-ol et le 2-heptanol sont systématiquement associés aux odeurs de champignon présentes dans les raisins touchés par la pourriture grise. Ces composés sont les métabolites synthétisés par de nombreuses

espèces fongiques (Tressl *et al.*, 1982). D'autres composés possédant des notes camphrées et terreuses ont aussi été identifiés soit dans des raisins blancs (Sémillon, Sauvignon), soit dans des raisins noirs (Cabernet Sauvignon, Pinot noir, Gamay) issus de vendanges récoltées après développement de pourriture grise due à *Botrytis cinerea*.

Il s'agit du fenchol, de la fenchone, et du 2-méthylisoborneol. Ce dernier paraît être, parmi les composés à odeur terreuse, le principal responsable du défaut moisi terreux des raisins noirs atteints par *B. cinerea*.

Odeur	Composé	Civrage ^a	Seuil effectif (µg/l) ^b			Teneurs retrouvées dans des moûts (µg/l)	Contribution au caractère déficient des vins
			eau	selon moûts	vin		
camphrées	1-octen-3-one	CS - M - S	0,003	0,03	0,07	0 - 0,01	oui, parfois
	1-octen-3-ol	CS - M G - S	2	20	40	0 - 20	oui
	2-octen-1-ol	S	20	-	-	0 - 0,01	limité
	2-heptanol	S	70	-	-	0 - 0,06	limité
	non identifié	S	-	-	-	-	limité
	non identifié	S	-	-	-	-	limité
terreux ^c	2-méthylisoborneol	CS - M - PN	0,012	0,04	0,05	0 - 0,07	oui, limités dans le temps
	fenchol	S	50	-	-	0 - 0,01	oui, parfois
	fenchone	S	500	-	-	0 - 0,015	limité
	gibéranol	CS - M - G PN - C - S	0,01	0,04	0,05	0 - 1	oui
	non identifié	S	-	-	-	-	limité
moisi	non identifié	S	-	-	-	limité	

Tableau 1 : Principaux composés volatils à odeur fongique et/ou moisie terreuse fréquemment mis en évidence dans des moûts et des vins issus de vendanges altérées.

^a Ne sont pas évoquées dans ce tableau les zones odorantes associées aux défauts terreux des vins de Pinot noir

^b CS : Cabernet Sauvignon, M : Merlot, S : Sémillon, G : Gamay, PN : Pinot noir, C : Chenin

^c Références : (La Guerche, 2004)

La plupart de ces molécules sont dégradées au cours de la fermentation alcoolique en des composés beaucoup moins odorants. Ainsi, la 1-octen-3-one est réduite en 3-octanone dont le seuil de perception est 1000 fois moins odorant grâce à l'activité énone-réductase de la levure (Darriet *et al.*, 2002; Wanner & Tressl, 1998).

Le 2-méthylisoborneol (MIB) est aussi dégradé en quelques jours par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 1) ; il ne pollue pas l'arôme des vins. Par contre, les teneurs en fenchol et fenchone évoluent peu au cours de la fermentation alcoolique mais ces composés restent dans les vins à des concentrations inférieures au seuil de perception olfactive (La Guerche *et al.*, 2003b). Ils ne sont donc pas responsables de défauts terreux dans les vins.

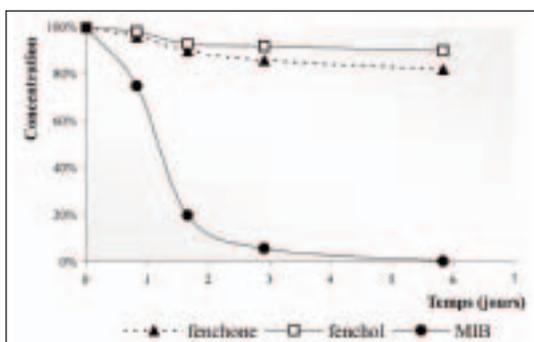


Figure 1 : Cinétique de dégradation de la fenchone, du fenchol et du 2-méthylisoborneol au cours de la fermentation d'un jus de raisin

1.2. ETUDE DE PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DE LA (-)-GÉOSMINE

La (-)-géosmine présente des seuils de perception de 10 ng/L dans l'eau, de 40 ng/L en solution modèle de composition proche du vin, de 40-50 ng/L dans un vin blanc et de 50-80 ng/L dans un vin rouge (seuils déterminés à la Faculté d'Oenologie de Bordeaux). C'est donc un composé très odorant. Son évolution en cours de fermentation alcoolique et pendant la conservation en solution modèle proche du vin a donc été étudiée. Ce composé est peu dégradé au cours de la fermentation alcoolique, seulement 20% dégradés en 2 semaines (Figure 2). Il est également relativement stable en cours de conservation, puisqu'il faut environ 2 mois à 20°C pour noter une diminution de 50% de la teneur initiale, et 8 mois à 10°C (Figure 3).

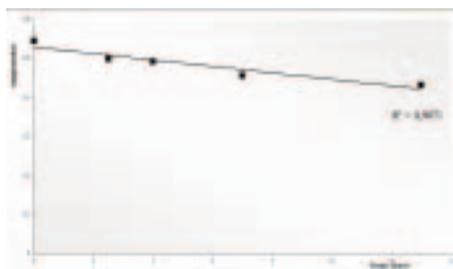


Figure 2 : Cinétique de dégradation de la géosmine au cours de la fermentation d'un moût botrytisé de Sémillon

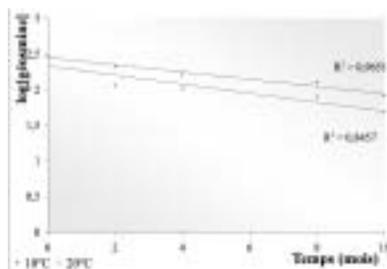


Figure 3 : Cinétique de dégradation de la géosmine dans une solution modèle proche du vin

La température est donc un paramètre déterminant dans la dégradation chimique de la géosmine dans le vin. Vu la stabilité de ce composé, de nombreux essais de traitements curatifs ont été réalisés afin d'éliminer la géosmine dans les vins (Tableau 2).

Le lait entier permet d'éliminer jusqu'à 60% des teneurs en géosmine d'un vin et l'huile de pépin de raisin jusqu'à 80%. Les traitements aux corps gras présentent donc une bonne efficacité vis-à-vis de la géosmine. Cependant, à l'heure actuelle, ils ne sont pas autorisés en œnologie. De plus, un traitement thermique à 70°C pendant 24 heures en bouteille fermée conduit à la dégradation de 80% de la géosmine. La volatilisation sous flux d'azote ou d'argon a également été envisagée, à différentes températures, mais n'a donné aucun résultat satisfaisant. Malgré une efficacité relative, ces traitements curatifs ne sont pas sélectifs vis-à-vis de la géosmine et engendrent des pertes d'arômes importantes dans les vins traités. Ils ne constituent donc qu'une mesure d'urgence et pas une solution durable. La maîtrise de ce problème passe donc par la prévention.

	Traitements			
	Lait entier (1,5l/hl de vin)	Huile de pépins de raisin (0,5l/hl de vin)	Chauffage (24h à 70°C)	Entraînement par un gaz (N ₂ à 3l/h de vin ; 1h à 25°C)
Géosmine (ng/l) avant traitement	290	320	700	310
après traitement	120	70	100	280
Efficacité	58,6%	78,1%	85,7%	9,7%

Tableau 2 : Efficacité de traitements curatifs sur les teneurs en géosmine retrouvées dans les vins

II. Origine de la géosmine, un composé responsable d'un arôme terreux dans les vins

II.1. CARACTÉRISATION DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS À LA GENÈSE DE GÉOSMINE AU VIGNOBLE

L'origine biologique de la géosmine est attestée depuis les travaux de Gerber et Lechevalier (1965). Ce composé a été initialement mis en évidence dans des cultures de bactéries Actinomycètes (*Streptomyces* sp.), puis sa production par des algues bleues (Blevins et al., 1995; Saadoun et al., 2001) et diverses espèces de *Penicillium* sp. (Börjesson et al., 1993; Larsen & Frisvad, 1995; Mattheis & Roberts, 1992; Pisarnitskii & Egorov, 1988) a été démontrée.

La géosmine n'a jamais été détectée dans les raisins sains issus de parcelles touchées par ce problème, ce qui signifie que la présence de ce composé est systématiquement associée à la pourriture des raisins. A partir d'octobre 1999, de nombreux isollements de microorganismes ont donc été effectués sur des raisins sains et sur des raisins touchés par la pourriture issus de nombreuses parcelles du vignoble bordelais, du Val de Loire, de Bourgogne et du Beaujolais concernées par le problème de géosmine et de cépages blancs et noirs (Cabernet Sauvignon, Sémillon, Gamay, Chenin, Pinot noir). La microflore des baies a été analysée et l'aptitude des microorganismes isolés à produire de la géosmine a été évaluée (La Guerche et al., 2003a). Les principaux suspects pouvant être à l'origine de la genèse de géosmine au vignoble ont été caractérisés grâce aux outils de la biologie moléculaire.

II.1.a. Analyse de la microflore des grappes

L'observation, au vignoble, des pourritures des baies de raisins à maturité montre la

prédominance de *B. cinerea* dans tous les sites, à l'origine d'une pourriture grise (Tableau 3). Une pourriture bleu verte, due à plusieurs *Penicillium* spp., n'est constatée que très ponctuellement, essentiellement sur le site de Sauternes. Par contre, ces champignons sont assez fréquemment associés aux foyers de pourriture grise au cœur des grappes, et ce sur tous les sites. Ils semblent se développer secondairement à *B. cinerea*, après qu'il ait colonisé les baies. Deux autres pourritures, assez mal connues au vignoble, sont retrouvées sur certains sites : une "pourriture verte à noire" due à un *Cladosporium* sp. sévissant dans les 3 parcelles du Médoc et une pourriture rose occasionnée par *Trichotecium roseum*, constatée uniquement sur un des 2 sites de Cissac.

Tableau 3 : Principales pourritures observées dans le vignoble bordelais

¹ M1, M2 et M3 : sites du Médoc ; S2 : site du Sauternais

² - : absence de foyer de pourriture ; + : foyers ponctuels ; ++ : foyers fréquents ; +++ : grand nombre de foyers

Type de pourriture	Champignons isolés	Sites ¹			
		M1	M2	M3	S2
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>	+++ ²	+++	++	+++
Complexe pourriture grise / pourriture bleue	<i>B. cinerea</i> + <i>Penicillium</i> sp.	++	+++	++	++
Pourriture bleue	<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	+
Pourriture vert-noir	<i>Cladosporium</i> sp.	+	+	+	-
Pourriture rose	<i>Trichotecium roseum</i>	-	-	+	-

Concernant spécifiquement les grappes présentant une odeur terreuse due à la géosmine, le genre *Penicillium* est bien représenté (Tableau 4). De nombreuses espèces sont ponctuellement présentes, avec moins de 5 isolats par parcelle, suivant le site et l'année. Il s'agit de *P. thomii*, *P. purpurogenum*, *P. frequentans*, *P. stoloniferum* et *P. carneum*. Quel que soit le site, aucun d'entre eux n'est retrouvé de manière systématique durant les 3 années suivies. En revanche, une seule espèce, *P. expansum*, caractérisée par biologie moléculaire, est toujours retrouvée sur les grappes contenant de la géosmine, sur toutes les parcelles concernées et durant toutes les années de prélèvement, avec en moyenne 5 à 10 isolats par parcelle pour les 4 sites bordelais étudiés de 1999 à 2004 et des fréquences élevées dans les autres vignobles français. Quelques isolats de *Streptomyces* sp. appartenant à 3 espèces majoritaires identifiés par biologie moléculaire ont été ponctuellement retrouvés sur les parcelles, mais la présence d'une espèce de *Streptomyces* sp. n'a jamais été répétée tous les ans sur un même site. *B. cinerea*, l'agent de la pourriture grise, est omniprésent et se trouve en quantité relativement abondante tous les ans et sur tous les sites étudiés, avec plus de 10 isolats par parcelle. De nombreux champignons et levures sont également présents sur les baies saines. Parmi les moisissures, nous avons rencontré le plus fréquemment *Aureobasidium pullulans* et plusieurs espèces d'*Alternaria* spp. *B. cinerea*, *Cladosporium* sp. et *Epicoccum nigrum* sont également bien représentés. Parmi les levures observées, *Rhodotorula* sp. est systématiquement retrouvée. D'autres champignons sont révélés plus ponctuellement : *Penicillium* spp., *Aspergillus niger*, *Coniothyrium* sp., *Phoma* sp., *Cephalosporium* sp., *Pestalotia* sp. et *Chaetomium* sp.

Tableau 4 : Principaux microorganismes retrouvés sur des grappes pourries contenant de la géosmine et prélevées dans 4 régions viticoles françaises

MICROORGANISMES	BORDELAIS				BEAUJOLAIS			BOURGOGNE	VAL DE LOIRE			
	M1 ¹	M2	S1	S2	BJ1	BJ2	BG1	VL1	VL2	VL3	VL4	
	1999 -2004	1999 -2004	1999 -2002	1999 -2001	2002	2002	2004	2002	2002	2002	2004	
<i>Botrytis cinerea</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
<i>P. expansum</i>	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	
<i>P. thomii</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	
<i>P. purpurogenum</i>	-	+	-	-	-	+	++	-	+	-	+	
<i>P. frequentans</i>	-	-	+	-	-	-	+	++	-	-	++	
<i>P. stoloniferum</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	
<i>P. carneum</i> (excl. <i>roqueforti</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Total <i>Penicillium</i> spp.	++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
<i>S. castellatus</i> ou <i>S. avidus</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	
<i>Streptomyces griseus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
<i>Streptomyces flavigineus</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	
Autres <i>Streptomyces</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	
Total <i>Streptomyces</i> spp.	-	+	-	+	+	+	-	-	++	++	++	

¹ M1 et M2 : sites du Médoc, Cabernet Sauvignon ; S1 et S2 : sites du Sauternais, Sémillon ; BJ1 et BJ2 : sites du Beaujolais, Gamay ; BG1 : site de Bourgogne, Pinot noir ; VL1 à VL4 : sites du Val de Loire, Gamay en 2002 et Chenin en 2004
² - : microorganisme non isolé ; + : peu d'isolats (<5) ; ++ : quelques isolats (5-10) ; +++ : grand nombre d'isolats (>10)

II.1.b. Aptitude des microorganismes à produire la géosmine

Les potentialités de production de la géosmine par les représentants de la microflore précédemment mis en évidence ont ensuite été évaluées, après culture sur boîte de Petri et extraction des composés volatils, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Deux milieux de culture ont été utilisés : le milieu Malt Agar (MA) et le milieu Czapek (CZA). Sur milieu MA, aucune des souches de *B. cinerea* testées ne produit la géosmine, mais certains isolats synthétisent un autre composé à odeur terreuse et camphrée (Tableau 5). Parmi les *Penicillium* spp. isolés, seuls les représentants de 2 espèces *phénotypiquement* caractérisées produisent de la géosmine sur milieu MA. Il s'agit de *P. expansum*, retrouvée sur tous les sites, et de *P. carneum*, ponctuellement retrouvé. Les autres *Penicillium* spp. isolés ne produisent pas la géosmine, malgré leur aptitude à synthétiser des odeurs variées (champignon, cave) sur milieu MA. Les *Streptomyces* spp., isolés très ponctuellement des baies pourries provenant des différentes parcelles étudiées, produisent l'odeur terreuse caractéristique de la géosmine sur milieu MA. Sur milieu CZA, les odeurs et composés produits par les représentants de la microflore sont identiques à ceux synthétisés sur milieu MA. Aucun des autres champignon testés ne produits de géosmine, ni sur milieu MA, ni sur milieu CZA.

Microorganismes	Nombre d'isolats testés	Odeur produite		Présence de géosmine
		sur MA	sur CZA	
<i>Botrytis cinerea</i>	3	terre	terre	-
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0	0	-
<i>Botrytis cinerea</i>	6	champignon	champignon	-
<i>Penicillium arenicola</i>	1	0	0	-
<i>Penicillium brevicompactum</i>	1	0	0	-
<i>Penicillium citreonigrum</i>	1	cave	cave	-
<i>Penicillium expansum</i>	37	terre	terre	+
<i>Penicillium frequentans</i>	1	0	0	-
<i>Penicillium purpurosorum</i>	3	cave	cave	-
<i>Penicillium carneum</i>	1	terre	terre	+
<i>Penicillium rugulosum</i>	1	0	0	-
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	1	champignon	champignon	-
<i>Penicillium</i> sp.	1	champignon	champignon	-
<i>Penicillium</i> sp. (série <i>nitrofulva</i>)	1	0	0	-
<i>Penicillium italicum</i>	5	0	0	-
<i>Streptomyces</i> spp.	4	terre	terre	+

Tableau 5 : Odeurs produites par des isolats de *Botrytis cinerea*, de *Penicillium* et de *Streptomyces* associés aux baies de raisin pourries, sur milieux Malt Agar (MA) et Czapek (CZA).

L'analyse de la microflore des baies de raisin saines ou pourries a ainsi permis de mettre en évidence l'omniprésence et l'abondance de *B. cinerea* sur les grappes contenant de la géosmine. De plus, en association avec ce dernier, *P. expansum* est systématiquement retrouvé tous les ans sur toutes les parcelles concernées par le problème de géosmine. Ce champignon et la bactérie du sol *Streptomyces* sp. sont capables de produire la géosmine. Nous avons donc débuté l'étude de leur métabolisme de production de la géosmine en fonction du temps et du milieu de culture.

II.1.c. Etude préliminaire du métabolisme de production de *P. expansum* et de *Streptomyces* sp., potentiellement responsables de la genèse de la géosmine au vignoble

Cinq types de milieux ont été inoculés avec des isolats de *P. expansum* ou de *Streptomyces* sp. : les milieux Malt Agar (MA) et "jus de raisin" (JR), à des pH allant de 3 à 7, des grappes entières, des baies de raisin et des rafles. Les bactéries filamenteuses produisent la géosmine sur milieu MA et JR à pH supérieur à 6, mais ne peuvent se développer sur le substrat acide que constitue la baie, le jus de raisin ou la rafle (pH 3-4). L'hypothèse qu'ils puissent être impliqués dans la genèse de la géosmine au vignoble, se produisant au moment de la maturité du raisin, peut donc être écartée. Les travaux se sont donc concentrés sur *P. expansum*. Paradoxalement, *P. expansum* se développe et produit de la géosmine sur milieu MA, quel que soit le pH, alors que sur jus de raisin sain et sur baies, le champignon croît mais la synthèse de géosmine n'est pas possible. Le métabolisme de production de ce composé par *P. expansum* a donc été étudié.

II.2. ETUDE DU MÉTABOLISME DE PRODUCTION DE LA GÉOSMINE PAR *P. EXPANSUM*

Dans un premier temps, l'étude métabolique s'est intéressée à l'influence de l'environnement et de la composition du jus de raisin sur la production de géosmine par *P. expansum*.

Pour cela, le champignon a d'abord été ensemencé sur boîtes de Petri contenant les milieux Malt Agar (MA) ou jus de raisin (JR) en faisant varier quelques facteurs abiotiques, à savoir le niveau d'intensité lumineuse, de température et de concentration en oxygène, afin de se placer dans les conditions les plus proches possibles de celles observées au vignoble. Ensuite, divers traitements ont été appliqués sur des jus de raisin afin d'évaluer leur éventuelle influence, activatrice ou inhibitrice, sur la production de géosmine par *P. expansum* (pH, polyphénols, acides gras), puis nous avons particulièrement étudié l'incidence de la composition azotée du milieu de culture. Enfin, une approche biochimique de la voie de biosynthèse de la géosmine a été envisagée. Parmi les facteurs environnementaux, seule la concentration en oxygène présente un effet stimulateur de la genèse de géosmine par *P. expansum* sur milieu MA, mais aucun des facteurs liés à l'environnement n'a d'effet direct sur le déclenchement de la production de géosmine du champignon. Parmi les composantes du raisin, l'acide linoléique, un acide gras présent dans la pruine du raisin, permet à *P. expansum* de produire la géosmine. De plus, des teneurs élevées en acides aminés, similaires à celles d'un jus de raisin sain, dans un milieu modèle permettent le développement du *Penicillium* mais inhibent la synthèse de géosmine (Figure 4), alors que le niveau de concentration en ion ammonium dans la baie favorise cette production, et ce de manière proportionnelle à la quantité ajoutée (Figure 5).

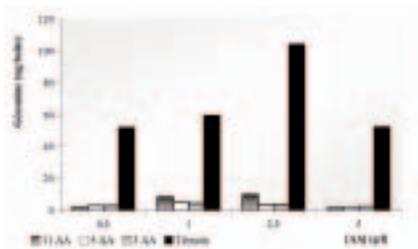


Figure 4 : Influence de mélanges d'acides aminés sur la production de géosmine par *P. expansum* sur CZA

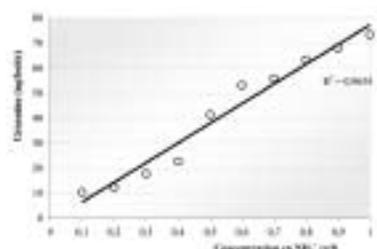


Figure 5 : Influence de la concentration en NH₄⁺ sur la production de géosmine par *P. expansum* sur milieu CZA

Une approche biochimique des mécanismes de biosynthèse de la géosmine chez *P. expansum* a été menée afin d'identifier des produits intermédiaires de cette voie. L'efficacité d'inhibiteurs d'enzymes clés a aussi été testée, ainsi que l'incidence de la supplémentation de substrats de la voie de synthèse des terpénoïdes. Cette étude a, entre autres, permis de démontrer que la présence de géosmine dans les milieux de culture de *P. expansum* était associée à celle du D-germacrène, un intermédiaire récemment décrit de la voie de biosynthèse de la géosmine.

II.3. INFLUENCE DE *BOTRYTIS CINEREA* SUR LA PRODUCTION DE GÉOSMINE PAR *P. EXPANSUM*

L'observation du phénomène au vignoble a permis de mettre en évidence que les grappes pourries contenant de la géosmine présentaient systématiquement, en association avec *P. expansum*, des foyers de pourriture dus à *B. cinerea*. Par ailleurs, il a été démontré que la carence azotée du jus de raisin avait un effet inducteur sur la production de géosmine par *P. expansum*, carence que *B. cinerea* est capable de générer lors de son développement sur la baie. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence de *B. cinerea* sur la synthèse de géosmine par *P. expansum* à travers deux démarches complémentaires, en étudiant d'abord le complexe *B. cinerea/P. expansum* dans des expériences de co-inoculations sur raisin, rafle ou jus de raisin, puis en évaluant plus précisément le rôle du métabolisme de *B. cinerea* sur le raisin.

II.3.a. Importance de l'association *B. cinerea* / *P. expansum* dans la genèse de géosmine sur jus et broyat de raisin

De nombreuses expériences de co-inoculations des champignons *B. cinerea* et *P. expansum* ont été réalisées sur grappe entière, sur baies, sur rafle, sur broyat de raisin et sur jus de raisin. Différents cépages, isolats, conditions environnementales et délais entre inoculations ont été testés. Nous avons pu démontrer l'aptitude de *P. expansum* à synthétiser la géosmine sur jus et broyat de raisin préalablement cultivés par *B. cinerea*.

Toutes les souches de *P. expansum* issues de différents sites sont capables de générer le

composé terreux après développement de *B. cinerea*, mais à l'inverse, seules trois souches de *B. cinerea* sur les 60 testés en association ont permis de modifier la composition du jus de raisin afin que *P. expansum* puisse y produire de la géosmine (Tableau 6) (La Guerche et al., 2005). Ce complexe entre 2 champignons nécessaire à la genèse d'un métabolite est un modèle original. Peu d'exemples sont cités dans la littérature. Différents métabolites de *B. cinerea* (acide gluconique, glycérol, mannitol, galactose) ont ensuite été supplémentés à des milieux de cultures à base de jus de raisin. Un effet inducteur du mannitol sur la genèse de géosmine est clairement démontré pour plusieurs souches de *P. expansum*, et de manière proportionnelle à la quantité ajoutée (Figure 6). L'effet inhibiteur des acides aminés du jus de raisin a également pu être confirmé.

<i>P. expansum</i>	<i>B. cinerea</i>		<i>SAS 56</i>		
	01BRM101 Jus de raisin	01BRM103 Jus de raisin	<i>B. cinerea</i> C77-4 Jus de raisin	Jus de raisin	Broyat de baies de raisin
99S436	-	NT	20 ± 1	NT	NT
00S101	-	NT	22 ± 1	NT	NT
01S101	-	33 ± 2	20 ± 1	NT	NT
01S102	-	38 ± 2	20 ± 1	21 ± 1	NT
01S203	-	32 ± 2	19 ± 1	NT	NT
01M102	-	36 ± 2	19 ± 1	49 ± 3	NT
01M206	-	37 ± 2	23 ± 1	24 ± 1	46 ± 3
02B103	-	NT	25 ± 2	NT	NT
02VL115	-	NT	20 ± 1	NT	NT

Tableau 6 : Teneurs en géosmine produites (ng/l) par diverses souches de *P. expansum* inoculées sur jus et broyat de raisins après pré-culture par diverses souches de *B. cinerea* (NT : Association non testée).

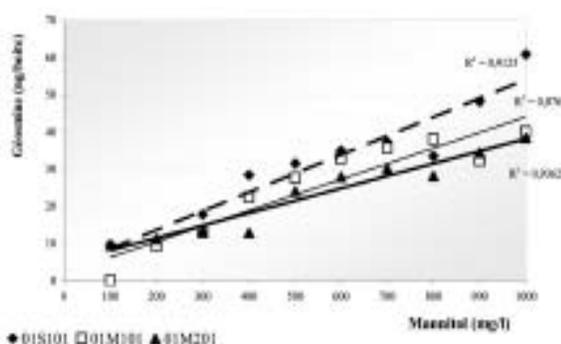


Figure 6 : Teneurs en géosmine produites par trois souches de *P. expansum* sur milieu "jus de raisin" supplémenté avec des concentrations croissantes en mannitol (100 à 1000 mg/l)

L'action essentielle de *B. cinerea* s'interprète donc par la dégradation des acides aminés, inhibiteurs de cette genèse. De plus, le mannitol, un polyol produit par *B. cinerea*, permet également à *P. expansum* de produire ce composé. Il pourrait donc avoir un rôle stimulateur sur la genèse de géosmine.

II.3.b. Interprétation de la variabilité intraspécifique de *B. cinerea* dans son aptitude à préparer le raisin pour la synthèse de géosmine par *P. expansum*

Après avoir mis en évidence le rôle joué par l'association entre les deux champignons que sont *B. cinerea* et *P. expansum* dans la genèse de la géosmine au vignoble, nous avons démontré que le métabolisme de certaines souches de *B. cinerea* pouvait influencer de manière positive sur l'expression de géosmine par *P. expansum*. Nous avons donc cherché à savoir quelle(s) différence(s) pouvaient exister entre les quelques souches de *B. cinerea* dites "favorables" à la genèse de géosmine par *P. expansum* sur jus de raisin (nommées "bot +") et celles dites "non favorables" (nommées "bot -"). Les concentrations en acides aminés, ion ammonium et mannitol de plusieurs jus de raisin pré-cultivés avec des souches "bot +" ou "bot -" ont été comparées. Aucune différence n'a été observée. La nature activatrice des souches "bot +" ou inhibitrice des souches "bot -" a été évaluée par culture de *P. expansum* sur différents mélanges de jus pré-cultivés (de 0% bot - / 100% bot + à 100% bot - / 0% bot +). La genèse de géosmine par le champignon est inhibée pour un pourcentage de jus pré-cultivé par une souche "bot -" de *B. cinerea* supérieur ou égal à 5%. Les souches "bot -" synthétisent donc un composé inhibiteur de la production de géosmine par *P. expansum*. Des étapes de purification ont ensuite permis de déterminer quelques caractéristiques de ce(s) composé(s) inhibiteur(s) : il(s) est(sont) thermorésistant(s), acide(s), de taille comprise entre

30 et 50 kDa et de nature polysaccharidique. La caractérisation de ce(s) composé(s) se poursuit par des techniques de chromatographie liquide haute performance. Ces résultats suggèrent donc que toutes les souches de *B. cinerea* possèdent la capacité à "préparer" le jus de raisin, en en modifiant spécialement le contenu aminé, pour permettre à *P. expansum* de produire la géosmine mais que la grande majorité des souches de *B. cinerea* synthétisent simultanément un inhibiteur de cette genèse.

Conclusion

En conclusion, ce travail a contribué à la caractérisation de défauts organoleptiques fongiques et terreux retrouvés dans les raisins, les moûts et les vins grâce aux nouveaux outils d'analyse chromatographique et à la sensibilité accrue des détecteurs de masse. Si la fermentation alcoolique permet la dégradation de certains de ces composés, d'autres défauts, notamment ceux liés à la présence de la (-)-géosmine, persistent et altèrent durablement la qualité organoleptique des vins. Il a permis de démontrer l'origine microbienne de certains de ces défauts et révélé ainsi l'émergence dans nos vignobles de climats tempérés d'associations entre *Botrytis cinerea* et diverses espèces fongiques considérées jusqu'à présent comme marginales, notamment *P. expansum*. Une étude approfondie de l'origine de la (-)-géosmine a permis d'établir la présence systématique du complexe *B. cinerea* - *P. expansum* sur les grappes contenant ce composé et la possibilité de sa genèse, sur jus et broyat de raisins, par développement successif de souches de *B. cinerea* puis de *P. expansum*. Des éléments d'explication du phénomène ont pu être apportés, qui trouvent notamment leur origine dans la carence en azote aminé du jus de raisin due au développement de *B. cinerea*. Ce travail a également mis en évidence une variabilité intraspécifique des populations de souches de *B. cinerea* dans leur aptitude à synthétiser une macromolécule polysaccharidique capable de réprimer la genèse de géosmine par *P. expansum*. Une connaissance accrue non seulement de la nature chimique des défauts organoleptiques et de leur origine mais aussi de l'écologie des espèces fongiques au vignoble paraît indispensable dans l'avenir pour faire face le plus rapidement et le plus efficacement possible à ces problèmes.

Bibliographie

- Bayonove, C. (1989). Incidences des attaques parasitaires fongiques sur la composante qualitative du raisin et des vins. *Revue Française des Oenologues* 116, 29-39.
- Blevins, W. T., Schrader, K. K. & Saadoun, I. (1995). Comparative physiology of geosmin production by *Streptomyces halstedii* and *Anabaena* sp. *Water Science and Technology* 31, 127-133.
- Börjesson, T. S., Stollman, U. M. & Schnürer, J. L. (1993). Off-odorless compounds produced by molds on oatmeal agar: identification and relation to other growth characteristics. *J Agric Food Chem* 41, 2104-2111.
- Darriet, P., Pons, M., Lamy, S. & Dubourdieu, D. (2000). Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J Agric Food Chem* 48, 4835-4838.
- Darriet, P., Lamy, S., La Guerche, S., Pons, M., Dubourdieu, D., Blancard, D., Steliopoulos, P. & Mosandl, A. (2001). Stereodifferentiation of geosmin in wine. *Eur Food Res Technol* 213, 122-125.
- Darriet, P., Pons, M., Henry, R., Dumont, O., Findeling, V., Cartolaro, P., Calonne, A. & Dubourdieu, D. (2002). Impact odorants contributing to the fungus typa aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); Incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 50, 3277-3282.
- Gerber, N. N. & Lechevalier, H. A. (1965). Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl Microbiol* 13, 935-938.
- Gerber, N. N. (1979). Volatile substances from actinomycetes: their role in the odor pollution of water. *CRC Crit Rev Microbiol* 7, 191-214.
- La Guerche, S., Blancard, D., Chamont, S., Dubourdieu, D. & Darriet, P. (2003a). Origine de la géosmine, composé responsable d'un arôme terreux dans les vins - étude des microorganismes impliqués et de leur métabolisme. In *Enologie 2003 - 7th International Symposium of Enology*, pp. 22-25. Edited by A. Lonvaud, G. De Revel & P. Darriet. Paris: Tec & Doc.
- La Guerche, S., Pons, M. & Darriet, P. (2003b). Étude de composés volatils associés à la pourriture des raisins et responsables de défauts olfactifs dans les moûts et les vins. In *Enologie 2003 - 7th International Symposium of Enology*, pp. 433-436. Edited by A. Lonvaud, G. De Revel & P. Darriet. Paris: Tec & Doc.
- La Guerche, S. (2004). Recherches sur les déviations organoleptiques des moûts et des vins associées au développement de pourritures sur les raisins - étude particulière de la géosmine. In *Doctorat Sciences Biologiques et Médicales: Université Victor Segalen Bordeaux 2*.
- La Guerche, S., Chamont, S., Blancard, D., Dubourdieu, D. & Darriet, P. (2005). Origin of (-)-geosmin on grapes. On the complementary action of two fungi, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Antonie Van Leeuwenhoek, Sous presse*.
- Larsen, T. O. & Frisvad, J. C. (1995). Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycology Research* 99, 1153-1166.
- Mattheis, J. P. & Roberts, R. G. (1992). Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Appl Environ Microbiol* 58, 3170-3172.
- Pisarnitskii, A. F. & Egorov, I. A. (1988). Low molecular weight metabolites produced by various *Penicillium* species. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 24, 760-764.
- Ribéreau-Gayon, J. & Peynaud, E. (1964). Tome 1 : Maturation du raisin, fermentation alcoolique, vinification. Paris: Béranger.
- Saadoun, I., Schrader, K. K. & Blevins, W. T. (2001). Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Anabaena* sp. *J Basic Microbiol* 41, 51-55.
- Tressl, R., Bahri, D. & Engel, K. H. (1982). Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *J Agric Food Chem* 30, 89-93.
- Wanner, P. & Tressl, R. (1998). Purification and characterization of two enone reductases from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 255, 271-278.

ACADEMIE  MORIM

11, Villa Wagram Saint-Honoré - 75008 Paris - France
Tel : 01 58 05 10 70 - Fax : 01 58 05 10 71 - Email : contact@academie-amorim.com
www.academie-amorim.com

 GREENWICH