

Modifications de la composition des moûts et des vins issus de raisins parasités par *Aspergillus carbonarius*. Évaluation rapide de la contamination du raisin et de la teneur en ochratoxine A dans les moûts et les vins par Infrarouge à Transformée de Fourier.

DUBERNET Matthieu ⁽¹⁾, DUBERNET Marc ⁽¹⁾ et SAGE Lucile ⁽²⁾

(1) Laboratoires Dubernet Œnologie, 9 quai d'Alsace, 11100 Narbonne

(2) Laboratoire LECA, Université J. Fourier, 38041 Grenoble cedex 9

1. Étude analytique de substrats contaminés par *Aspergillus carbonarius*

1.1- Introduction

Aspergillus carbonarius est présent sous forme sporulée dans de nombreux vignobles des zones chaudes et sèches. Cette écologie, paradoxale pour un champignon, est expliquée par le fait que, dans les vignobles plus frais et plus humides, il est fortement concurrencé, par *Botrytis cinerea* qui possède une activité parasitaire beaucoup plus vigoureuse. En particulier, *Aspergillus* ne présente pas d'activité enzymatique exogène lui permettant d'attaquer la barrière biologique que constitue la pellicule de la baie de raisin. Ainsi, il ne se développe qu'à la faveur d'une blessure, d'une piqûre ou d'un éclatement de la baie de raisin. Le développement du champignon s'accompagne d'un métabolisme qui lui est propre et dont nous avons recherché les traces dans les moûts et les vins.

1.2- Matériel et méthode

1.2.1- Étude in vitro

Cette étude a été réalisée après la mise en culture de souches d'*Aspergillus carbonarius* ochratoxinogènes, isolées de vignobles du sud de la France, sur des milieux de culture à base de moût de raisin naturel. Cinq moûts différents ont été suivis, ensemencés avec des souches différentes d'*Aspergillus carbonarius*. La composition en acides organiques des milieux de culture a été suivie par analyse sur électrophorèse capillaire Beckman P/ACE MDQ

system, selon le protocole suivant :

- capillaire : 61 cm, 50 µm de diamètre
- température d'analyse : 30°C
- tension : 15 kV
- tampon :
 - 5 mM acide 2,6-pyridinedicarboxylique
 - 0,5 mM cetyltriméthylammonium bromide
 - pH ajusté à 5,8 avec NaOH 1N
- standard interne : chlorate de sodium 2 g/L

7 acides organiques sont recherchés, il s'agit de :

- acide tartrique
- acide malique
- acide lactique
- acide acétique
- acide succinique
- acide citrique
- acide gluconique

1.2.2- Étude in vivo

1.2.2.1- Étude sur raisins

Le niveau de contamination de lots de raisins issus de différents cépages a été établi par observation visuelle directe, et évaluation du pourcentage de baies présentant le feutrage noir caractéristique d'*Aspergillus carbonarius*. Après extraction des moûts par pressurage, les principaux acides organiques ont été déterminés par électrophorèse capillaire et, le glycérol par mesure enzymatique manuelle (kit enzymatique).

Vinification

1.2.2.2- Étude sur vins

Une étude similaire a été réalisée sur des vins pour lesquels la teneur en OTA a été mesurée, en plus de la composition en acides organiques. Les teneurs en OTA ont été réalisées par dosage immunocolorimétrique précédé d'une concentration sur colonne d'immunoaffinité.

1.3- Résultats in vitro

Les dosages des acides organiques présents dans les milieux de culture sont regroupés dans la figure 1 pour les acides organiques de base, et dans la figure 2 pour l'acide gluconique. Un seul résultat est représenté ici, car ils sont similaires sur les différents essais réalisés. On constate que les modifications du milieu investi par *Aspergillus carbonarius* se produisent dans les cinq premiers jours de culture : baisse significative de l'acide malique, production d'acide citrique et d'acide gluconique. On a observé que les acides tartrique, lactique,

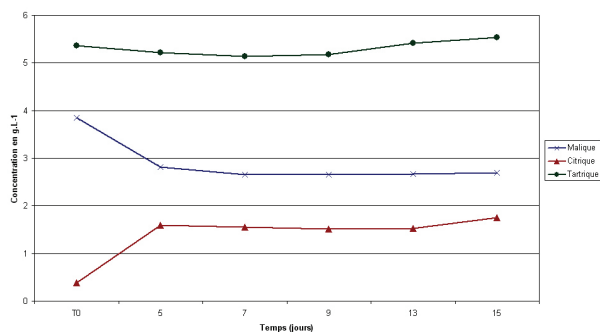


Figure 1- Evolution des teneurs en acides malique, citrique et tartrique d'un milieu (moût) ensemencé avec *Aspergillus carbonarius*

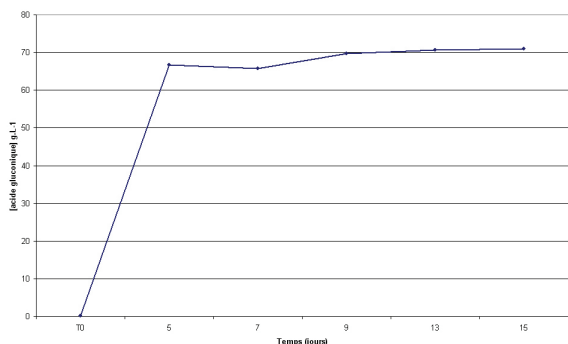


Figure 2- Evolution des teneurs en acide gluconique d'un milieu (moût) ensemencé avec *Aspergillus carbonarius*

acétique et succinique ne sont pas affectés. On observe une acidification nette du milieu avec une baisse sensible du pH.

1.4- Résultats in vivo

1.4.1- Étude sur raisins

Les relations statistiques existant entre les niveaux de contamination apparente des raisins et la composition des moûts correspondants ont été étudiées sur 214 prélèvements lors des récoltes 2004 et 2005. Elles sont représentées sur les figures 3, 4 et 5 suivantes.

Ces résultats confirment la production d'acide gluconique et d'acide citrique par *Aspergillus carbonarius*, et montrent, par ailleurs, une production de glycérol. Nous n'avons pas mis en évidence de production d'acide succinique, d'acide lactique ni d'acide acétique.

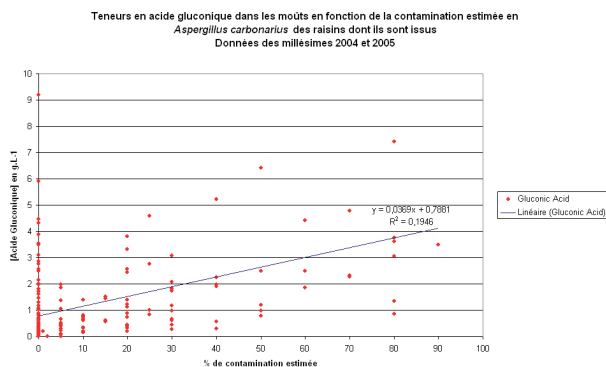


Figure 3- Relation entre la teneur en acide gluconique et la contamination par *Aspergillus carbonarius*

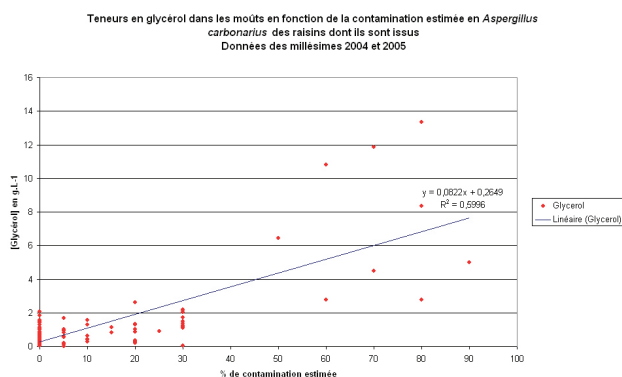


Figure 4- Relation entre la teneur en glycérol et la contamination par *Aspergillus carbonarius*

Vinification

Teneurs en acide citrique dans les moûts en fonction de la contamination estimée en *Aspergillus carbonarius* des raisins dont ils sont issus
Données des millésimes 2004 et 2005

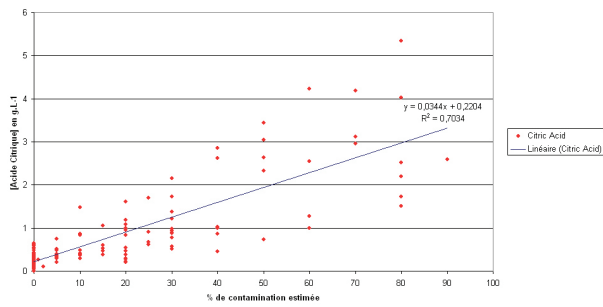


Figure 5- Relation entre la teneur en acide citrique et la contamination par *Aspergillus carbonarius*

1.4.2- Étude sur vin

Les études statistiques de même nature ont été réalisées pour étudier les relations pouvant exister entre la teneur en OTA des vins, et leurs teneurs en acides organiques. Les résultats obtenus sur 114 vins différents sont représentés sur les figures 6 et 7.

On constate qu'il existe des corrélations nettes entre l'acide citrique et l'acide gluconique présents dans les vins et leurs teneurs en OTA. Il apparaît cependant nettement que, si ces

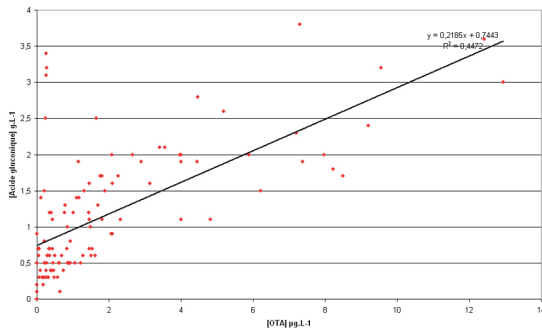


Figure 6- Relation entre la teneur en acide gluconique et la teneur en OTA des vins

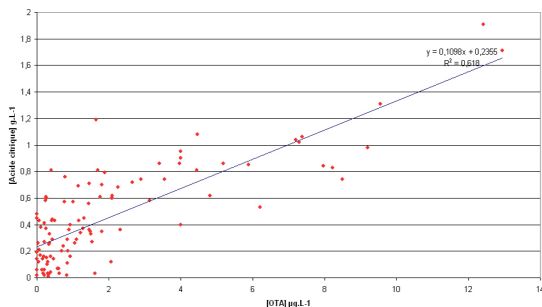


Figure 7- Relation entre la teneur en acide citrique et la teneur en OTA des vins

corrélations sont globalement significatives, elles ne suffisent pas à expliquer, à elles seules, la teneur en OTA, surtout pour des valeurs d'OTA faibles, en dessous de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cela est dû au fait que ces acides organiques, et notamment l'acide gluconique, ne sont pas exclusivement produits par *Aspergillus carbonarius*.

Dans les vins, la corrélation entre le glycérol et la teneur en OTA n'est pas vérifiée, en raison de son importante production par les levures au cours de la fermentation alcoolique. On constate cependant que les vins issus de raisins attaqués par *Aspergillus carbonarius* sont plus riches en glycérol.

1.5- Discussion

Ces études ont porté sur 3 substrats différents : des jus de culture d'*Aspergillus carbonarius*, des moûts issus des raisins contaminés par *Aspergillus carbonarius* et des vins dosés en OTA.

Les résultats obtenus nous permettent de faire les constats suivants :

- L'acide gluconique, présent en quantité peu significative dans les raisins sains, est produit en quantités importantes par *Aspergillus carbonarius*. Décrit comme métabolite de *Botrytis cinerea* ou encore *Gluconobacter aceti*, il s'avère qu'*Aspergillus carbonarius* est susceptible d'en produire des quantités souvent largement supérieures (de 2 à 3 fois plus). Dans le cas de forte contamination des raisins par *Aspergillus carbonarius*, l'acide gluconique peut même constituer l'acide majoritaire des moûts et des vins correspondants.

- L'acide citrique est présent naturellement dans les moûts de raisins, à des quantités faibles, généralement inférieures à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. *Aspergillus carbonarius* peut produire des quantités d'acide citrique pouvant être de 3 à 4 fois plus importantes. Cette production, qui ne semble pas avoir été signalée précédemment, n'est cependant pas surprenante. En effet la production d'acide citrique par *Aspergillus niger*, proche d'*Aspergillus carbonarius*, est un fait connu et exploité pour la production industrielle de l'acide citrique. Dans ce cas aussi, il serait hasardeux de corréler directement la teneur en acide citrique des vins et leur teneur en OTA. En effet, la présence d'*Aspergillus niger* non ochratoxinogène a été signalée sur les raisins et

il est probable, que dans ce cas, il soit responsable d'une production significative d'acide citrique. Une étude plus poussée concernant ce point précis est nécessaire. Par ailleurs, on observe fréquemment une attaque de l'acide citrique par les bactéries lactiques en fin de fermentation malolactique. Dans ce cas, la corrélation n'est plus existante. La présence de quantités élevées d'acide citrique dans les vins issus de raisins attaqués par *Aspergillus carbonarius* (et/ou *Aspergillus niger*), peut expliquer l'augmentation

significative d'acidité volatile, observée sur ces vins en fin de fermentation malolactique.

- Le glycérol est produit par *Aspergillus carbonarius*. Des quantités similaires peuvent être produites par *Botrytis cinerea* ou lors de phénomènes de métabolisme anaérobie du raisin, observés en situation de stress (hydrique ou thermique).
- L'acide malique est en partie consommé par *Aspergillus carbonarius*. Le métabolisme n'est pas connu.

2. Évaluation rapide de la contamination du raisin par *Aspergillus carbonarius* et de la teneur en OTA des vins, par Infrarouge à Transformée de Fourier.

2.1- Introduction

La technique d'analyse par Infrarouge à Transformée de Fourier (I.R.T.F.) est appliquée pour l'analyse œnologique de routine depuis plus de 7 ans. Elle a fait les preuves de sa grande performance et de sa grande fiabilité, à condition que sa maîtrise soit complète. Elle offre des cadences analytiques élevées, avec des coûts de réalisation réduits. Elle est utilisée pour le dosage de nombreux composés organiques mais aussi pour celui d'éléments non organiques, mais dont la concentration est corrélée avec celle des composés organiques présents (potassium, pH). Il a été démontré qu'elle pouvait, aussi, permettre d'accéder à des indices permettant d'évaluer quantitativement un phénomène biologique ayant laissé une marque métabolique dans les vins (indice d'attaque du *Botrytis cinerea* par exemple).

Étant donné les teneurs très faibles d'OTA présentes dans les vins, la lecture quantitative directe de ce composé dans le spectre infrarouge des moûts et des vins n'est pas envisageable. En revanche, comme cela est décrit dans le paragraphe 1, *Aspergillus carbonarius* laisse une empreinte métabolique significative, identifiable par analyse du spectre infrarouge.

Cette approche ne peut pas être réduite aux seuls composés dont nous avons établi la présence.

Nous avons, en effet, vu que, même s'ils apportent une information certaine, ils peuvent être sécrétés par d'autres microorganismes (glycérol, acide gluconique) ou qu'ils peuvent être dégradés ultérieurement par voie microbiologique (acide citrique). Ainsi, un modèle prédictif simplement basé sur l'acide citrique et l'acide gluconique, même s'il peut apporter une information, ne sera pas satisfaisant.

L'I.R.T.F., et les techniques chimométriques de traitement des données, permettent une approche plus globale, fondée sur une étude mathématique de l'ensemble des aspects corrélatifs pouvant être lus dans le spectre infrarouge. Il suffit, ainsi, qu'il y ait suffisamment d'informations corrélées à la concentration en OTA, et lisibles dans le spectre infrarouge, pour que les outils statistiques mis en œuvre puissent permettre d'obtenir une réponse quantitative.

Ainsi, il est parfaitement légitime de penser que les métabolites produits par l'activité biologique d'*Aspergillus carbonarius*, identifiés ou non, influent de façon globale, suffisamment significative et proportionnellement à la teneur en OTA, sur le profil du spectre infrarouge du moût et du vin. Dans ces conditions, il devient envisageable de construire des modèles de prédiction de la teneur en OTA des vins et des moûts, ou de la contamination de la vendange par *Aspergillus carbonarius*.

Vinification

2.2- Modèle de détermination de la teneur en OTA dans les vins

2.2.1- Matériel et méthode

2.2.1.1- Matériel

Le matériel Infrarouge à Transformée de Fourier (I.R.T.F.) utilisé est le FT120 de la société Foss. Il offre l'avantage d'une bonne stabilité, et permet de transférer les données et les modèles de calibrage facilement d'un instrument à l'autre.

L'ochratoxine A dans les vins est dosée par immunocolorimétrie après concentration sur colonne d'immunoaffinité. Cette méthode est entièrement validée et raccordée. La méthode présente une incertitude élargie ($k=2$) de $\pm 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$, pour une concentration de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'OTA.

2.2.1.2- Méthode

La méthode consiste à créer une base de données en réalisant le spectre infrarouge d'un nombre élevé de vins présentant une teneur connue en OTA. Un calibrage PLS est alors réalisé, en utilisant les méthodes de chimiométrie classiques associées à l'I.R.T.F.

- Base de données

La qualité d'un calibrage I.R.T.F. dépend très fortement de la qualité de la base de données utilisée pour sa réalisation. Celle-ci repose sur le nombre et la représentativité des échantillons qui la composent, ainsi que sur la qualité des valeurs obtenues pour le composé recherché par la méthode de référence. En outre, cette banque de données doit recouvrir, d'une façon uniforme, toute la gamme de mesure envisagée et les échantillons doivent représenter toutes les matrices différentes qui pourront être soumises à l'essai.

La base de données de référence mise en œuvre comprend plus de 300 vins, blancs, rosés et rouges, issus de la grande variété des cépages des vignobles méridionaux français. La base de données couvre un domaine de concentrations allant de 0 à $12 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Les spectres de la base de données ont été acquis sur deux instruments I.R.T.F. distincts, pour s'affranchir d'un éventuel "effet instrument", et pour améliorer la robustesse et la transférabilité du calibrage.

- Etablissement du modèle

La première étape est la sélection des bandes

passantes pertinentes dans le spectre infrarouge. 30 bandes passantes significatives ont ainsi été sélectionnées à partir d'un algorithme mathématique de recherche de corrélations.

La seconde étape consiste à réaliser un modèle en régression PLS entre les valeurs de concentration en OTA et les 30 bandes passantes.

Le modèle obtenu est de la forme suivante :

$$C_{(\text{teneur en OTA})} = \alpha + \beta \cdot (\text{somme des } k_i \Lambda_i + B_0)$$

où :

Λ_i absorbance de la $i^{\text{ème}}$ bande passante

K_i coefficient de la $i^{\text{ème}}$ bande passante

B_0 biais du modèle

α pente d'ajustement du modèle

β biais d'ajustement du modèle

2.2.2- Résultats, validation du modèle

2.2.2.1- Comparaison de deux méthodes

L'étude de comparaison de la méthode classique et du modèle I.R.T.F. a été réalisée avec 69 nouveaux échantillons n'ayant pas été utilisés pour la création du modèle.

L'écart moyen, et l'écart type de l'écart moyen, sont utilisés pour représenter de façon numérique les différences relevées entre les deux méthodes.

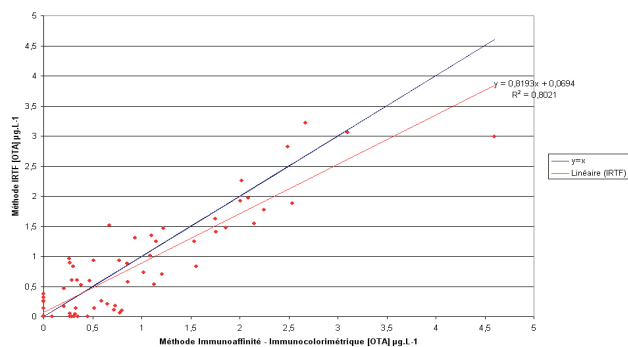


Figure 8- Comparaison des teneurs en OTA obtenues par la méthode I.R.T.F. et par la méthode immunocolorimétrique

Le test statistique simple du Z_{score} est appliqué sur ces résultats pour tester l'hypothèse suivante : "les écarts entre les deux méthodes sont significatifs".

Ecart moyen (Md) : -0,079

Ecart type des écarts (Sd) : 0,408

Z_{score} : - 0,2

La valeur du Z_{score} est inférieure en valeur absolue à 2, le test rejette donc l'hypothèse "les deux méthodes fournissent des résultats différents".

L'écart type obtenu est de 0,408, ceci signifie que la différence absolue entre les deux méthodes sur un vin, ne sera pas supérieure à $0,82 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans plus de 5 % des cas.

2.2.2.2- Étude de l'erreur aléatoire

L'approche de l'erreur aléatoire est réalisée par la l'estimation de la répétabilité intrasérie, et par celle de la reproductibilité intralaboratoire.

- Répétabilité intrasérie

44 matériaux d'essais ont été analysés en double dans des conditions de répétabilité. Les teneurs en OTA se situaient entre 0 à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les résultats trouvés sont les suivants :

Ecart type de répétabilité (Sr) : 0,12

Répétabilité (r) : 0,34

La différence absolue entre deux déterminations I.R.T.F. indépendantes de l'OTA, réalisées sur le même matériau d'essai, à l'intérieur d'une même série analytique, ne sera pas supérieure à $0,34 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans plus de 5 % des cas.

- Reproductibilité intralaboratoire

37 mesures du même vin ont été réalisées à des jours différents, par des opérateurs différents, des équipements différents, dans le même laboratoire. La valeur moyenne du matériau d'essai étudiée est $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'OTA.

Les résultats sont les suivants :

Ecart type de reproductibilité (SR) : 0,25

Reproductibilité (R) : 0,69

La différence absolue entre deux déterminations I.R.T.F. indépendantes de l'OTA, réalisées sur le même matériau d'essai, à des moments différents, par des opérateurs et des équipements différents, dans le même laboratoire, ne sera pas supérieure à $0,69 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans plus de 5 % des cas.

2.2.3- Discussion sur le modèle

Les résultats de validation montrent que la méthode I.R.T.F. apporte des résultats cohérents et significatifs de la teneur des vins en OTA. La méthode montre ainsi son aptitude à apporter une information pertinente. Les performances de la méthode I.R.T.F. ne sont cependant pas au niveau des méthodes classiques du dosage de l'OTA dans les vins et

elle ne peut prétendre s'y substituer. Par contre, elle offre la possibilité de criblages judicieux sur des produits à risques de manière rapide et à moindre coût.

2.3- Modèle de détermination sur moûts du niveau de contamination par *Aspergillus carbonarius* des raisins d'origine

2.3.1- Matériel et méthode

La méthode de travail employée suit les mêmes principes que précédemment.

Les valeurs de référence de la base de données sont constituées de l'évaluation visuelle experte de la contamination par *Aspergillus carbonarius*, réalisée à l'échelle d'une grappe de raisin. Le spectre infrarouge enregistré est celui du jus issu du broyage des baies, après avoir retiré la rafle.

Une base de données de 100 échantillons a ainsi été acquise.

Un modèle PLS a été construit dans les mêmes conditions que précédemment.

2.3.2- Résultats

Le modèle PLS a été testé par la méthode de validation croisée, sur la base de données utilisée pour le calcul du modèle.

Les résultats de la validation croisée montrent des résultats tout à fait significatifs et cohérents.

Le modèle PLS est capable d'estimer le niveau de contamination par *Aspergillus carbonarius* des raisins dont sont issus les moûts analysés. L'écart, entre l'estimation visuelle experte et le modèle I.R.T.F., avec un niveau de confiance de 95 %, est de +/- 10 %, selon les données du test de validation croisée.

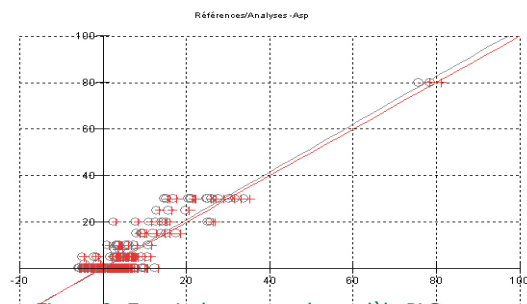


Figure 9- Extrait du rapport du modèle PLS

3. Conclusion

Lorsque *Aspergillus carbonarius* se développe sur des raisins destinés à l'élaboration de vins, il produit différents métabolites parmi lesquels l'ochratoxine A vient de faire l'objet de limites réglementaires européennes. Le champignon laisse, dans les moûts et les vins, une empreinte métabolique complexe comprenant, en particulier, l'acide citrique, l'acide gluconique et le glycérol, et très probablement d'autres composés non identifiés à ce jour.

Cette empreinte est identifiable dans le spectre infrarouge des vins. Elle est en outre, porteuse d'informations exploitables pour estimer objectivement le niveau de contamination des raisins par *Aspergillus carbonarius* par analyse des moûts correspondants. De même, il existe une corrélation forte entre les informations présentes dans leur spectre infrarouge et la teneur en OTA des vins. L'application de l'I.R.T.F. apporte une réponse nouvelle et originale pour aider la filière vitivinicole à gérer le problème posé par l'OTA. Ce nouvel outil ne peut se substituer aux méthodes de dosage classique de l'OTA dont il est complémentaire. Il doit être considéré comme une méthode économique d'identification des produits (vendange ou vin) à risques pouvant être appliquée en amont et permettant de recourir plus rapidement et plus efficacement à des solutions préventives.

Bibliographie

DEDIEU F., NOUADJE G., PUIG P., 1994. Contribution de l'électrophorèse capillaire à l'analyse des ions de faibles poids moléculaires contenus dans les moûts et les vins. *Revue des Œnologues*, 72, 7-10.

DROUILLARD J.-B., SAGE L., PLADEAU V., DUBERNET M., 2003. Ochratoxine A dans les vins - Un partenariat filière pour des solutions pratiques au vignoble. *Phytoma - La Défense des Végétaux*, 565, 30-35.

DUBERNET M., DUBERNET M., 1999. Utilisation de l'analyse Infrarouge multiparamétrique à Transformée de Fourier en œnologie de routine. *Revue Française d'Œnologie*, 181, 10-13.

DUBERNET M., DUBERNET M., DUBERNET V., LERCH M., COULOMB S., TRINEAU I., 2000. Analyse objective de la qualité des vendanges par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier et réseaux de neurones, *Revue Française d'Œnologie*, 185, 18-21.

DUBERNET M., DUBERNET M., CAILLAUD P., 2003. Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique usuelle. *Feuillet vert O.I.V.*, n°1189.

MINGUEZ S. M., CANTUS J.-M., PONS A., MARGOT P., CABANES F.-X., MASQUE C., ACCENSI F., ELORDUY X., GIRALT L.-L., VILAVELLA M., RICO S., DOMINGO C., BLASCO M., CAPDEVILA J., 2004. Influence of the fungus control strategy in the vineyard on the presence of ochratoxin A in the wine. *Bulletin de l'O.I.V.*, 77, 821-831.

SAGE L., KRIVIBOK S., DELBOS E., SEIGLE-MURANDI F., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agric. Food Chem.*, 50(5), 1306-1311.

SAGE L., GARON D., SEIGLE-MURANDI F., 2004. Fungal microflora and ochratoxin A risk in french vineyards. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5764-5768.

TUSSEAU D., FENEUIL A., 2003. Le dosage des acides organiques du moût et du vin par électrophorèse capillaire. *Feuillet vert O.I.V.*, n°1131.

Vitiviniculture