

Ochratoxine A dans les vins : un partenariat filière pour des solutions pratiques au vignoble.

DROUILLARD J.-B. ⁽¹⁾, SAGE Lucile ⁽²⁾, PLADEAU Valérie ⁽³⁾, KALANQUIN D. ⁽⁴⁾

(1) Syngenta Agro, 20 rue Marat 78210 Saint-Cyr l'Ecole

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

(3) Viti Oeno Services, Château de Jonquières 11100 Narbonne

(4) Laboratoire Dubernet, 9 quai d'Alsace 11100 Narbonne

L'ochratoxine A a été isolée initialement de cultures d'*Aspergillus ochraceus* par van der Merwe en 1965. Produite par plusieurs espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus*, cette mycotoxine est naturellement présente dans de nombreux produits végétaux du monde entier comme les céréales, le cacao, le café, les fruits secs, les épices, la bière mais également dans le vin, ce qui justifie l'intérêt que lui porte la communauté scientifique. A ce jour, au niveau international, seuls, les céréales et leurs produits dérivés ainsi que les raisins secs sont soumis à réglementation (5 µg d'OTA/kg pour les céréales, 3 µg/kg pour leurs produits dérivés et 10 µg/kg pour les raisins secs).

La C.E.E. demande à tous les États membres et toutes les parties intéressées de concentrer leurs efforts en matière de recherche afin de déterminer les différents facteurs impliqués dans la formation de l'OTA et de définir les mesures de prévention à prendre en vue de réduire sa présence dans les denrées alimentaires, tout devant être mis en œuvre pour réduire autant que possible le risque en attendant la fixation de limites maximales.

La détermination de la concentration maximale autorisée en OTA dans le vin, qui devait être fixée initialement au 31/12/2002, a été reportée à fin 2003. Pour le moment, seul l'O.I.V. a pris une position de principe visant à ramener les teneurs dans les vins sous le seuil de 2 µg/l d'ici 2005. C'est dans ce contexte que le Groupement des Vignerons du Val d'Orbieu, premier exportateur de vins français, le Laboratoire d'Œnologie Dubernet, l'Université J. Fourier de Grenoble et Syngenta ont mis en place un Engagement de Partenariat Filières visant à trouver des solutions pratiques pour mieux maîtriser les teneurs en OTA dans les vins.

1 Toxicité de l'OTA

On lui attribue des propriétés néphrotoxiques (effet sur le fonctionnement des reins), cancérigènes, tératogènes (effet sur le développement des fœtus), immunotoxiques et lymphotoxiques. Cette mycotoxine retrouvée dans le sang humain et animal est probablement impliquée dans la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) et les tumeurs associées. Dans les pays européens, aucune pathologie liée à l'OTA n'a jamais été détectée, alors que dans le Nord de l'Afrique (particulièrement en Tunisie, Algérie et Egypte), un certain nombre de personnes dont le sang contient de l'OTA, souffrent de néphropathies interstitielles chroniques ressemblant à la NEB.

Classée comme molécule potentiellement cancérigène (2B) pour l'homme, le principe de précaution a été appliqué pour la définition de la dose journalière acceptable (DJA). Elle est fixée à 5 ng/kg/jour, soit 0,30 µg/jour pour un individu moyen de 60 kg.

2 Vins et ochratoxine A

2.1- Découverte et présence dans les vins

C'est en 1996 qu'une équipe suisse (1) mentionne pour la

première fois la présence d'OTA dans le vin (et les jus de raisins). Depuis, les pays producteurs du bassin méditerranéen comme la France (2), l'Italie (3), l'Espagne (4), le Maroc (5) mais également plusieurs pays de l'hémisphère sud, comme l'Afrique du Sud (6) et l'Australie (7) ont détecté de l'OTA, en quantités variables, dans certains de leurs vins.

Le caractère largement ubiquiste des champignons ochratoxinogènes laisse supposer que bien d'autres pays producteurs puissent être concernés par ce problème.

Cependant, on peut constater une grande variabilité entre les zones viticoles. Une enquête conduite par l'Onivins sur l'ensemble du vignoble français a montré que les vins du pourtour méditerranéen sont plus fréquemment contaminés par l'OTA que les vins des zones septentrionales plus froides. En outre, l'analyse de la cartographie du risque OTA en Languedoc, réalisée sur la base d'une centaine de dosages (effectués sur 2 campagnes successives) permettrait de relier la présence d'OTA à certains facteurs climatiques. Ces premières conclusions méritent encore confirmation.

2.2- Origine dans le vin

L'OTA est produite par des champignons ochratoxinogènes contaminant les grappes de raisins en cours de maturation. Le champignon a été mis en évidence très tôt sur le raisin (dès la nouaison) sous forme de spores mais la teneur en OTA des jus n'est significative qu'après la véraison, en fonction du développement du champignon et de la colonisation des baies. Elle augmente régulièrement avec la maturation des raisins.

2.3- Évolution des teneurs dans le vin

La quantité d'OTA présente dans le moût est fonction du taux de contamination par le champignon au moment des vendanges, mais semble également liée au temps de contact durant les phases de macération pré-fermentaire.

La molécule d'OTA est stable et ne semble pas significativement métabolisée ni par les levures ni par les bactéries lactiques.

Si certaines études ont fait état de baisses des teneurs durant l'élevage, généralement, les quantités d'OTA retrouvées dans les vins sont voisines de celles mesurées sur moût avant vinification.

2.4- Essais de réduction des teneurs par collage

Des essais de collage de vins fortement contaminés donnent des résultats assez divers : des collages parfois énergiques avec plusieurs types de colles sont sans effet (8) alors que des traitements combinés (silice, charbon et gélatine) diminuent les valeurs de manière significative (9). La filtration semble également avoir un effet atténuateur.

Ces méthodes curatives ont cependant l'inconvénient de ne pas pouvoir s'appliquer dans tous les cas (le charbon n'est pas autorisé sur vin rouge), d'affecter sensiblement la qualité du vin et d'être d'une efficacité relative dans les cas de forte contamination.

3.1- Travaux réalisés par le Laboratoire de mycologie de l'Université J. Fourier (1999 et 2000)

La présence d'ochratoxine A dans le vin de table a déclenché en 1999 une enquête européenne inter-laboratoires.

Un premier contrat de recherche avec l'Onivins (Office National Interprofessionnel des Vins) et le Professeur E. Creppy de l'Université de Bordeaux concernait l'identification de souches productrices d'OTA sur les raisins destinés à la vinification.

Nous avons analysé la flore de surface de 11 lots de raisins non protégés contre le botrytis en provenance de 2 vignobles expérimentaux de la région de l'Aude, représentant 9 cépages.

59 espèces fongiques différentes ont été identifiées parmi lesquelles 27 étaient citées dans la bibliographie comme potentiellement ochratoxinogènes. *In vitro*, seules les souches d'*Aspergillus carbonarius* produisaient de l'OTA. Les dosages d'OTA effectués sur les moûts correspondant à nos prélèvements nous ont permis d'établir une relation étroite entre le niveau de contamination des raisins par *Aspergillus carbonarius* et la teneur en OTA des moûts.

En 2000, l'étude a été poursuivie avec l'Onivins, en liaison avec l'Inra et les Chambres d'Agriculture ; les travaux ont porté sur une large étendue du vignoble français. Elle visait à déterminer les conséquences de méthodes prophylactiques ou de différents traitements anti-botrytis sur la microflore des raisins et en particulier sur les souches potentiellement ochratoxinogènes.

Sur les 60 lots de raisins issus de prélèvements effectués en fin de véraison et au moment des vendanges, on retrouve une flore variée (53 espèces) mais les taux de contamination sont relativement faibles en raison (probablement) des conditions climatiques clémentes de l'automne 2000. En conséquence, on n'a pas pu démontrer cette année-là l'efficacité d'anti-botrytis sur la flore potentiellement ochratoxinogène des raisins.

Aspergillus carbonarius a été isolé exclusivement au moment des vendanges sur un seul site (région Languedoc) et de manière très épisodique. C'est la seule espèce qui, dans nos conditions expérimentales, ait secrété de l'OTA (en quantité limitée) et les taux d'OTA dans les moûts correspondants n'ont pas dépassé 0,43 µg/l.

En conclusion de ces travaux, il semblait judicieux de centrer une étude ultérieure sur une région ciblée, avec un échantillonnage plus représentatif, en limitant les conditions expérimentales mises en jeu (parcelles, cépages, protection phytosanitaire, ...).

3.2- Travaux réalisés par le groupe de travail en 2001

L'expérimentation vise à déterminer l'influence de traitements

anti-botrytis sur la flore ochratoxinogène de vignobles de la région Languedoc. Deux sites ont été choisis en fonction des teneurs en OTA relevées dans les vins lors des récoltes précédentes.

Analyse mycologique des grappes :

Des grappes ont été prélevées à 3 stades : fermeture de la grappe, fin de la véraison et vendange. Leur flore a été déterminée.

On constate que, même si le développement proprement dit du champignon est plus tardif, des spores d'*Aspergillus carbonarius* peuvent être présentes sur les grains dès la fermeture de grappe. Les teneurs en OTA sont faibles à la fermeture de la grappe et en fin de véraison (sauf dans un lot non traité où la valeur atteint presque 3 µg/l), puis augmentent nettement au cours de la maturation du fruit et ce en fonction de son état sanitaire. Les foyers d'*Aspergillus carbonarius*, localisés au cœur de grappes (souvent extérieurement saines) sont généralement liés à la présence de vers de la grappe.

Les premiers résultats semblent indiquer un effet bénéfique de certains traitements anti-botrytis sur les teneurs en OTA des moûts au moment des vendanges mais les résultats sont assez variables, en partie à cause de l'hétérogénéité des situations parcelles. (figure 1)

Screening de fongicides au laboratoire :

10 souches d'*Aspergillus carbonarius* fortement productrices d'OTA isolées au vignoble ont été utilisées pour tester *in vitro* l'efficacité de fongicides de différentes familles. Celle-ci est définie par la concentration inhibant 50 % de la germination des spores et celle inhibant 50 % de la croissance mycélienne (CI50). Les résultats sont regroupés dans la figure 2, page suivante.

3.3- Travaux réalisés par le groupe de travail en 2002

Les enseignements des essais au vignoble de 2001 et les résultats des tests *in vitro* ont permis d'élaborer un protocole d'essai en micro-parcelles. Il vise à comparer d'une part, plusieurs fongicides appliqués au stade D, 3 semaines avant vendange, et d'autre part, 3 stades d'application (B, C et D) avec l'un de ces fongicides. L'expérimentation porte sur 3 vignobles de l'Aude ayant présenté de fortes teneurs en OTA en 2001.

Afin de tenter une caractérisation des parcelles à risque, l'étude inclut l'analyse de la flore des ceps de vigne hors période de végétation et le suivi de la flore du sol au cours de la maturation des grappes, la détermination de la période de contamination des raisins par *Aspergillus carbonarius*, l'activité ochratoxinogène des souches *in vitro* et le dosage d'OTA dans les moûts.

En avril 2002, *Aspergillus carbonarius* est détecté sur les écorces des ceps des 3 parcelles.

Les dénombrements des spores (*Aspergillus niger* et *carbonarius*) effectués sur le sol montrent une contamination permanente qui

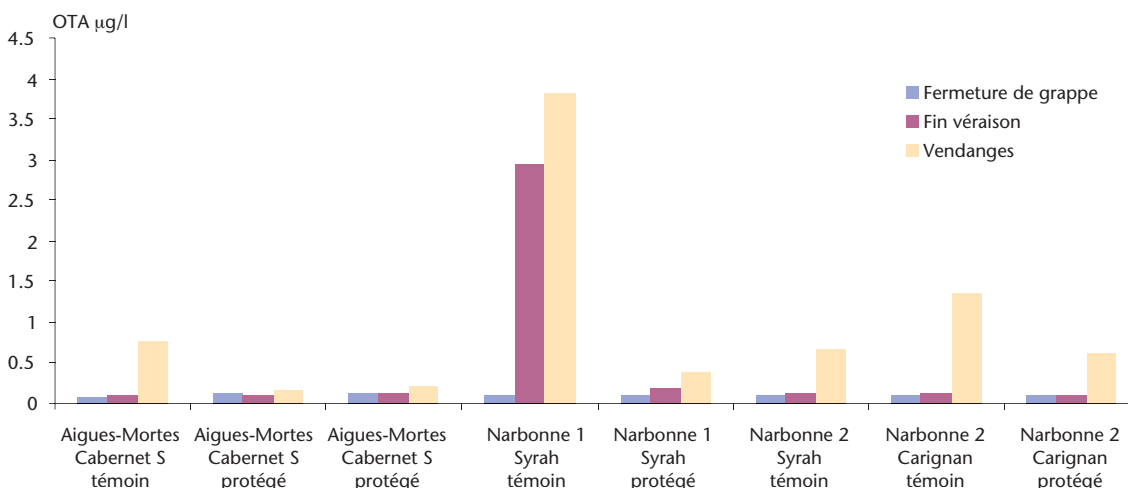


Figure 1- Teneurs en OTA des moûts en 2001 suivant les parcelles

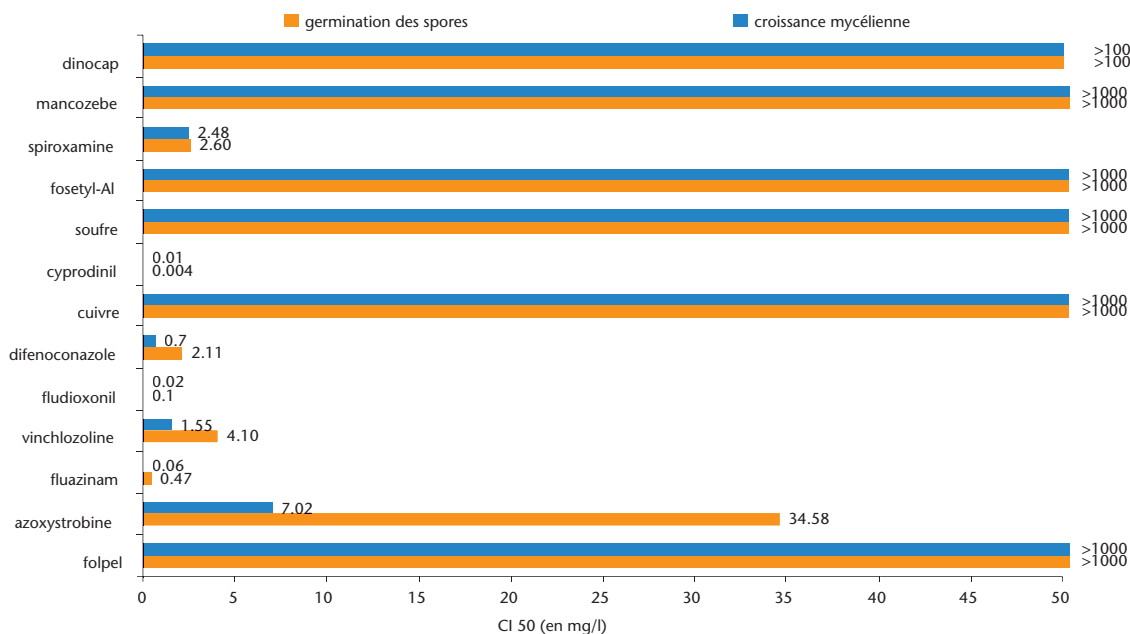


Figure 2- Activité *in vitro* de fongicides sur *Aspergillus carbonarius* (moyenne des CI 50 des 10 souches testées)

augmente notablement en période de maturation des grappes. (figure 3)

L'observation des grappes confirme le développement tardif d'*Aspergillus carbonarius* (fin de véraison) sur des grains préalablement blessés. Les souches d'*Aspergillus carbonarius* cultivées *in vitro* présentent un pouvoir ochratoxinogène généralement inférieur à celui des souches isolées durant l'année 2001 et semblent plus virulentes en fin de véraison. Par contre, au laboratoire, on n'a pas pu établir de corrélation entre activité toxigène *in vitro* et teneur en OTA des grappes. En outre, on a constaté *in vitro* que certains fongicides pouvaient diminuer (voire supprimer) le potentiel ochratoxinogène des souches.

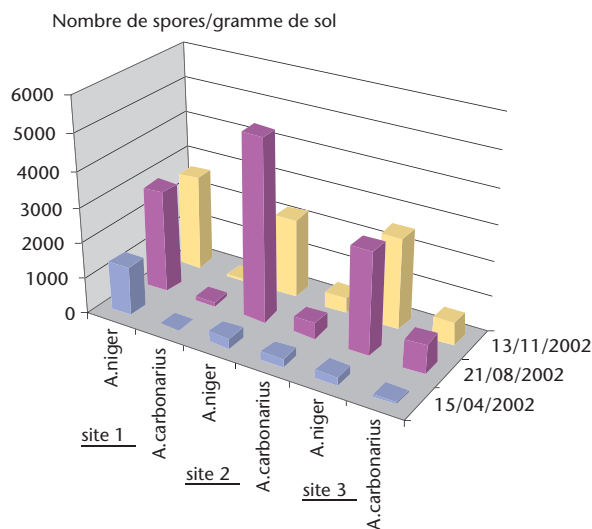


Figure 3- Dénombrements de spores d'*Aspergillus niger* et *carbonarius* dans 3 sols

En ce qui concerne les teneurs en OTA rencontrées, on constate une augmentation avec la maturation des baies, confirmée par des analyses en post-maturité. Toutefois, sur des essais grappe à grappe, on note une grande variabilité des teneurs (jusqu'à 14 µg d'OTA dans une seule grappe contaminée). Les résultats de cet essai sont présentés dans la figure 4.

Cet essai montre :

- qu'il existe une bonne corrélation entre la fréquence de baies contaminées et la teneur en OTA,
- que les fongicides les plus actifs *in vitro* le sont aussi au vignoble,
- qu'une application tardive donne la meilleure efficacité,
- et que les fongicides ayant une activité faible *in vitro* n'ont pas d'effet sur la teneur en OTA.

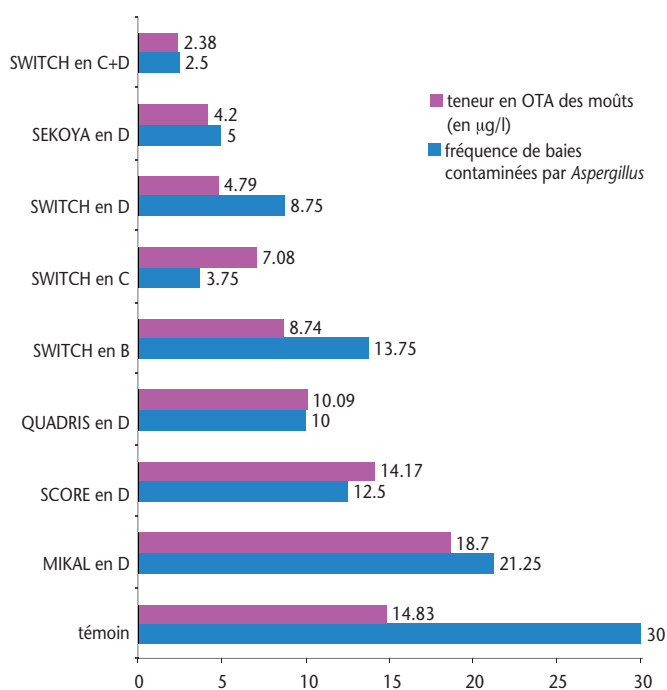


Figure 4- Incidence de différentes protections fongicides sur la fréquence de baies contaminées et la teneur en OTA des moûts (région de Narbonne, 2002)

Ces résultats ont été confirmés par des essais "grandes parcelles". Ils ont permis de tester l'efficacité de différents fongicides en condition réelle de culture. 22 couples de parcelles ont été mis en place. A la lecture des résultats, on constate l'efficacité des traitements tardifs avec les anti-botrytis SWITCH (fludioxonil + cyprodinil) et SEKOYA (fluazinam) (cf. tableau 1).

Tableau 1- Résultats des essais "grandes parcelles" (pour des teneurs en OTA > 0,3 µg/l)

Fongicide	Essai	Stade d'application	OTA (µg/l)
SEKOYA	Témoin		0.4
	Protégé	C (véraison)	0.26
SWITCH	Témoin		0.55
	Protégé	C (véraison)	0.15
SWITCH	Témoin		8.6
	Protégé	D (3 semaines avant vendanges)	1.56

D'autre part, l'incidence de l'état sanitaire des grappes a été clairement mise en évidence dans un essai en micro-parcelles mis en place dans la région de Béziers. La bonne maîtrise des tordeuses par des insecticides régulateurs de la croissance des insectes a permis une réduction importante de la teneur en OTA (cf. tableau 2)

Tableau 2- Incidence d'une protection préventive contre les tordeuses de la grappe sur la teneur en OTA des moûts (région de Béziers, 2002)

	Nombre moyen de tordeuses/grappe	Teneur en OTA dans les moûts (en µg/l)
Témoin insecticide	2.99	4.67
LUFOX (lufénuron + fénoxycarbe) 1l/ha*	0.33	1.07
FUORO (lufénuron) 1l/ha*	0.25	0.50

* : 2 applications en début de vol de la 2^{ème} et de la 3^{ème} génération

Les tordeuses de la grappe sont probablement dans cette région une des principales sources de dégradation de l'intégrité de la baie par les morsures exploratoires et les perforations dont elles sont responsables. D'autres facteurs peuvent probablement avoir des effets similaires : oïdium, pourriture grise, pourriture acide, blessures mécaniques, flétrissement en sur-maturité, grêle...

Dans tous les sites expérimentaux où des teneurs élevées en OTA ont été trouvées, une présence importante de tordeuses a été notée. Et même si l'OTA peut être détectée dans des baies apparemment saines, ces blessures seraient un facteur essentiel pour le développement du champignon et la synthèse d'OTA.

Des insecticides préventifs ovicides comme les régulateurs de croissance des insectes lufénuron et fénoxycarbe permettent probablement de limiter beaucoup plus fortement leurs dégâts, que des insecticides larvicides appliqués plus tardivement sur chenilles déjà actives.

Pour compléter l'étude 2002, une enquête a été réalisée pour tenter de mettre en évidence l'influence des pratiques culturales et des caractéristiques environnementales sur les teneurs en OTA. Nous avons montré l'incidence des pratiques à travers un test d'analyse de variance.

Nous avons mené l'enquête auprès de viticulteurs sur 80 parcelles d'horizons géographiques différents. La sélection des parcelles a été faite sur des objectifs qualitatifs de production, permettant d'atteindre une maturité suffisante répondant aux conditions optimales de développement de *Aspergillus carbonarius*.

L'effet terroir :

On constate généralement une diminution des teneurs en OTA avec l'altitude (figure 5). Cette tendance est confirmée entre deux zones climatiques régionales : l'une semi-aride douce à teneurs en OTA faibles et l'autre, semi-aride plus chaude, caractérisée par des entrées maritimes, à teneurs plus élevées.

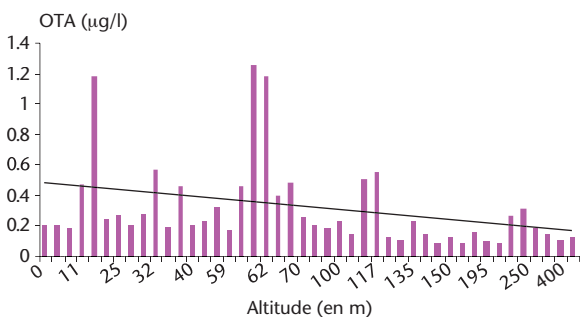


Figure 5- Evolution des teneurs en OTA avec l'altitude

La pluviométrie semble avoir une influence. Ainsi, l'augmentation des pluies totales d'été et de veille de vendanges est bien corrélée à des teneurs plus faibles en OTA (figure 6).

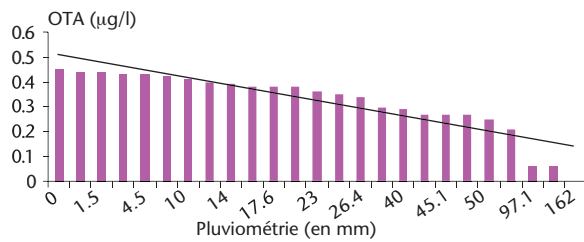


Figure 6- Variabilité des teneurs en OTA avec la pluviométrie totale (mai aux vendanges)

L'effet état sanitaire des grappes :

L'observation de l'état sanitaire à la veille des vendanges montre une influence prépondérante des attaques de tordeuses de la grappe de 2^{ème} et 3^{ème} génération (figure 7). Il est à noter que même dans les secteurs sensibles aux tordeuses, si les attaques ont été maîtrisées avec des insecticides, les risques de contamination en OTA sont restés faibles.

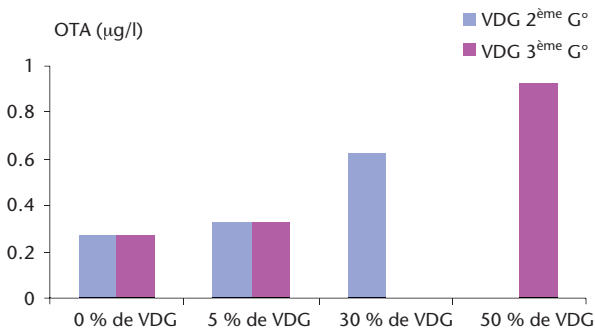


Figure 7- Evolution des teneurs en OTA en fonction de la fréquence de vers de grappes (VDG) de 2^{ème} et 3^{ème} génération (G°) dans les parcelles

Les maladies telles l'oïdium et la pourriture acide ont été négligeables durant cette campagne, et ressortent sans influence sur les teneurs en OTA.

Les effets de la protection phytosanitaire :

Etant donné le grand nombre de spécialités et la diversité des stades d'applications, il est difficile d'en analyser l'influence sur les teneurs en OTA. Par contre, la qualité de pulvérisation (liée au matériel et aux conditions de traitement) s'avère essentielle.

L'effet des paramètres de maturité et des cépages :

Les contrôles de maturité des échantillons à la veille des vendanges montrent que les teneurs élevées en OTA sont souvent liées à un pH acide et à une teneur importante en azote aminé. D'autres caractéristiques comme le degré, l'acidité totale, l'acide malique, l'acide tartrique, le NH₃ et le potassium ne sont pas influencées. La date de vendange (variable et non représentative du degré d'avancement de la maturité) ainsi que la nature du cépage n'influent pas sur les teneurs en OTA.

L'effet des pratiques de vendanges :

Le tri des vendanges abîmées (quelque soit la maladie constatée), ainsi que la vendange manuelle qui permet aussi une sélection des grappes contrairement à la vendange mécanique, contribuent à une nette diminution des teneurs en OTA (figures 8 et 9).

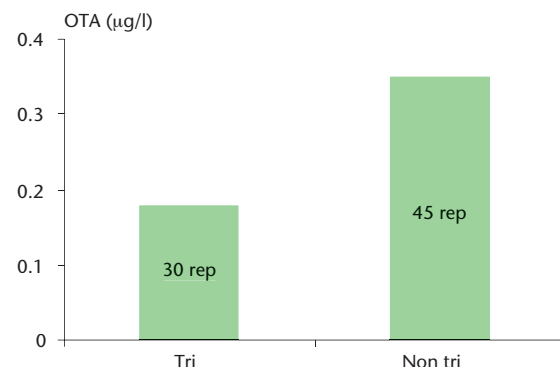


Figure 8- Influence du tri de la vendange sur les teneurs en OTA

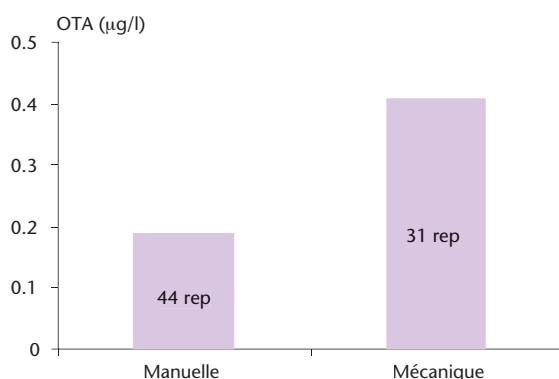


Figure 9- Influence du type de vendange sur les teneurs en OTA

4 Synthèse et propositions

Développement d'*Aspergillus* et production d'OTA :

Après ces 4 années d'étude, les conclusions suivantes peuvent être retenues :

- *Aspergillus carbonarius* est le seul agent responsable de la présence d'OTA dans le vin de la région Languedoc,
- thermophile et xérophile, il est présent, en toutes saisons, sous forme de spores dans le sol et sur les écorces des ceps des parcelles à risque,
- la souche s'implante tardivement et se développe à la faveur d'une blessure de la baie en cours de maturation,
- les foyers de contamination sont souvent internes et associés à la présence de vers de la grappe,
- les potentiels ochratoxinogènes des souches cultivées *in vitro* sont très variables et peuvent être réduits par l'application de fongicides.

Recommandations pratiques :

Les résultats de l'ensemble de ces travaux ont permis au groupe de travail d'élaborer des recommandations de protection intégrée visant à maîtriser les teneurs en OTA.

Globalement, il est primordial de maintenir un bon état sanitaire des raisins jusqu'à la vendange (en particulier si une maturité phénolique optimale est recherchée) et dans certaines situations de fortes contaminations, de mener en complément une lutte directe contre le champignon ochratoxinogène.

L'effet altitude nous amène à distinguer deux zones :

- < 200 m : zones à risque potentiel élevé
- > 200 m : zones à risque potentiel plus faible

Dans les zones à risque potentiel élevé, les recommandations sont les suivantes :

- mesure pour la qualité de pulvérisation : importance de s'assurer d'une bonne pulvérisation des grappes.
- mesure de maîtrise de tordeuses : utilisation de RCI évitant les morsures et les perforations qui favorisent fortement le développement d'*Aspergillus carbonarius*.
- mesures de lutte directe contre le champignon : dans les secteurs les plus touchés, applications d'anti-botrytis efficaces : fluazinam, fludioxonil, cyprodinil au stade D ou C (à l'heure actuelle, seul le fluazinam possède un délai avant récolte compatible).
- mesures correctives sur vendanges : en cas de mauvais état sanitaire, tri à la vendange ou isolement des lots.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) ZIMMERLI B., DICK R., 1996. Ochratoxin A in table wine and grape juice : occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants 13, 655-668.

(2) OSPITAL M., CAZABEIL J.-M., BETBEDER A.-M., TRICARD I., CREPPY E., MEDINA B., 1998. L'ochratoxine A dans les vins. Revue Française d'Œnologie 169, 16-18.

(3) PIETRI A., BERTUZZI T., PALLARONI L., PIVA, G., 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. Food Additives and Contaminants 18, 647-654.

(4) BÚRDASPAL, P.-A., LEGARDIA, T.-M., 1999. Ochratoxina A en vinos mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. Alimentaria 36, 299 107-113.

(5) FILALI A., OUAMMI L., BETBEDER A.-M., BAUDRIMONT I., SOULAYMANI R., BENAYADA A., CREPPY E., 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco : a preliminary survey. Food Additives and Contaminants 18, 565-568.

(6) STANDER M.-A., STEYN P.-S., 2002. Survey of ochratoxin A in South African wines. South African Journal of Enology and Viticulture 23, 9-13.

(7) RUEDIGER G.-A., BOEHM D.-R., 2002. Ochratoxin A in wines. Proceedings of the Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, South Australia, (Australian Wine Industry Technical Conference Inc. : Urrbrae, SA) p. 262.

(8) BLATEYRON L., MICHEL G., DELTEIL D., 2001. Essai de réduction de la teneur en Ochratoxine A par collage sur des vins rouges naturellement riches en cette molécule. <http://www.icv.fr/kiosque/actu/actu6.htm>

(9) DUMEAU F., TRIONÉ D., 2000. Influence de différents traitements sur la concentration en ochratoxine A des vins rouges. Revue des Œnologues 95, 37-38.

(10) SAGE L., KRIVOBOK S., DELBOS E., SEIGLE-MURANDI F., CREPPY E., 2002. Fungal flora and Ochratoxin A production in grapes and musts from France. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 1306-1311.

EN RÉSUMÉ ...

A l'approche de la fixation d'une norme européenne concernant l'ochratoxine A (OTA) dans les vins, un partenariat a été engagé entre le Groupement des Vignerons du Val d'Orbieu, le laboratoire d'œnologie Dubernet, le laboratoire LECA et Syngenta. *Aspergillus carbonarius* a été identifié comme étant le champignon responsable de la production d'OTA. Son mode de développement et les conditions de la toxino-génèse ont été précisés. La présence de tordeuses de la grappe s'est révélée être le principal facteur aggravant. L'application de régulateurs de croissance des insectes comme le lufenuron et le fénoxycarbe a permis de réduire fortement la teneur en OTA. L'efficacité sur le champignon ochratoxinogène de certains fongicides, comme le fluazinam, le cyprodinil et le fludioxonil, a été démontrée *in vitro* puis par des essais au vignoble. Une enquête a permis d'appréhender les facteurs agronomiques favorisant. Ce partenariat a débouché sur des recommandations pratiques de protection intégrée contre l'OTA.

Mots-clés : ochratoxine A, vin, *Aspergillus carbonarius*, fluazinam, fludioxonil, cyprodinil, lufenuron, fénoxycarbe