



LES AMINES BIOGÈNES : SYMPTÔMES DES ERRANCES MICROBIOLOGIQUES ACTUELLES

Vincent Renouf, Laboratoire EXCELL, 25 rue Aristide Berges, 33270 Floirac

Les amines biogènes sont de petits composés azotés présents dans des aliments et notamment les boissons fermentées. Ils résultent de la décarboxylation de certains acides aminés principalement sous l'action de bactéries lactiques. L'amine biogène la plus connue est l'histamine produite à partir de l'histidine. Le corps humain produit également de l'histamine qu'il utilise comme médiateur chimique notamment lors des réactions d'allergie. Les antihistaminiques sont ainsi des médicaments connus de tous et très largement utilisés. Leur rôle est de bloquer la synthèse d'histamine et ainsi éviter les effets désagréables des allergies : gonflement, les rougeurs, les démangeaisons, les éternuements, etc.).

En oenologie les travaux sur les amines biogènes remontent aux années 1970. Initialement ce furent les bactéries *Pediococcus* qui furent incriminées mais très vite les chercheurs ont démontré qu'il s'agissait principalement des bactéries lactiques hétérofermentaires : *Oenococcus oeni* et les *Lactobacilles*. Parmi les travaux liminaires à cette thématique, certains très intéressants remarquaient un lien entre les fumures azotées utilisées au vignoble, la constitution en acides aminés des raisins puis des moûts et les risques de présence d'amines biogènes dans les vins. **Ces trois aspects : précurseurs, matrice et flore microbienne sont toujours intimement liés dans tous les processus de déviations microbiologiques.**

Outre l'histamine plusieurs amines biogènes peuvent être retrouvées dans les vins. Le tableau ci-dessous présente les amines biogènes et les acides aminés à partir desquels ils peuvent être produits.

Amines biogènes	Acides aminés
Histamine	Histidine
Tyramine	Tyrosine
Putrescine	Ornithine/ Agmatine
Cadavérine	Lysine
Ethylamine	Alanine
Phényléthylamine	Phénylalanine
Méthylamine	Glycine

Lorsque, à partir des années 2000, les analyses génétiques ont intégré les travaux des microbiologistes du vin les voies de production des amines biogènes ont été mieux caractérisées. Il a été ainsi démontré que les gènes codant pour l'histidine décarboxylase et pour la tyramine décarboxylase faisaient partie de clusters très complets comprenant aussi les gènes codant pour les transporteurs, les antiports acide aminé/amine biogène et des régulateurs.

Globalement ce qu'il est important de retenir c'est que lorsque les phénomènes évolutifs aboutissent à de tels arrangements moléculaires c'est que l'ensemble constitue assurément un avantage adaptatif pour l'organisme qui les possède. C'est effectivement le cas pour la production des amines biogènes puisque l'échange acide aminé/amine biogène au niveau de la membrane crée une différence de potentiel qui associée au gradient de pH dû à la décarboxylation constitue une force proton motrice qui génère de l'ATP et donc de l'énergie pour les cellules. **Les bactéries lactiques productrices d'amines biogènes sont donc parfaitement armées pour se développer quand les conditions deviennent contraignantes pour d'autres cellules.**

Dans les années 2000-2010, l'histamine fut sous la sellette car le spectre d'une réglementation uniformisant le vin et les boissons aux exigences existant dans certains pays sur les denrées alimentaires pointait. A l'époque le seuil qui était appliqué dans certaines denrées alimentaires solides était de 10 mg/Kg. La transposition fut donc faite par certains acheteurs ou globalement par des pays importateurs en fixant un seuil à 10 mg/L pour l'histamine (dans certains pays parmi les plus drastiques des cahiers des charges fixaient même 2 mg/L). A cette même période la maîtrise microbiologique était au centre des attentions et les industriels amplifiaient considérablement leurs voies de recherche et leur performance dans la sélection des souches d'intérêt. La connaissance des gènes impliqués dans la production de l'histamine et de tyramine devenait ainsi un crible incontournable dans la sélection des levains malolactiques. Chez les vignerons le recours au sulfitage de la vendange était plus uniformément et significativement pratiqué. Ces aspects ont concouru à faire qu'au moment donc où l'histamine commençait à être regardé, il était finalement extrêmement peu présent dans les vins car les industriels fournissaient des levains malolactiques incapables de les produire et les vignerons et œnologues maîtrisaient leurs fermentations avec moins de contingence d'interventionnisme. Ces bons résultats ont fait que finalement les exigences sur l'histamine se sont dissipées.

Depuis la performance des industriels à sélectionner des souches performantes à continuer de progresser en revanche de nombreuses voies chez les vignerons et œnologues se sont élevées pour réduire les intrants, notamment le SO₂ et parfois les levains malolactiques. Force est de constater qu'après des années de maîtrises croissantes en matière de microbiologie certaines problématiques sont réapparues, notamment celles liées aux développements des flores bactériennes d'altération.

Au laboratoire EXCELL nous communiquons fréquemment sur la pertinence du dosage de l'acide-D-lactique. Cet acide ne peut être produit dans le vin par la dégradation des sucres par des bactéries lactiques hétérofermentaires ce qui dans un processus de fermentations maîtrisées ne doit jamais intervenir car les sucres doivent rester la panacée des levures durant la fermentation alcoolique et donc ces dernières doivent être totalement hégémoniques face aux bactéries durant cette période. La progression régulière de l'acide-D-lactique dans les vins montrent donc bien des dérives croissantes en matière de gestion des flores bactériennes. Récemment au laboratoire, en traitant nos bases de données nous avons observé le même phénomène concernant les amines biogènes. Mais cette fois les conséquences sont bien plus risquées car si un peu d'acide-D-lactique s'accompagne inexorablement d'un peu d'acidité volatile, la présence d'amines biogènes renvoie aux possibilités de réapparition de doses maximales évoquées précédemment mais également car certaines amines biogènes présentent une odeur très forte qui nuit très fatalement à la qualité des vins, c'est notamment le cas de la putrescine dont le nom très évocateur renvoie parfaitement au défaut qu'elle provoque. **Entre 2018 et 2024, le taux de récurrence de détection de la putrescine a été multiplié par 10 au laboratoire !** Il n'est désormais pas rare de voir des teneurs en putrescine dépasser les 15, 20 mg/L voire même plus (Figure 1). C'est considérable et très inquiétant ! Souvent le vigneron a conscience d'un défaut aromatique et des confusions peuvent avoir lieu avec d'autres types d'altérations (goûts de souris, *Brettanomyces*...) et ce n'est qu'en analysant finement la microflore que nous pouvons constater alors l'intrusion de bactéries (généralement des *Lactobacilles*) et leur production des amines biogènes déviants.

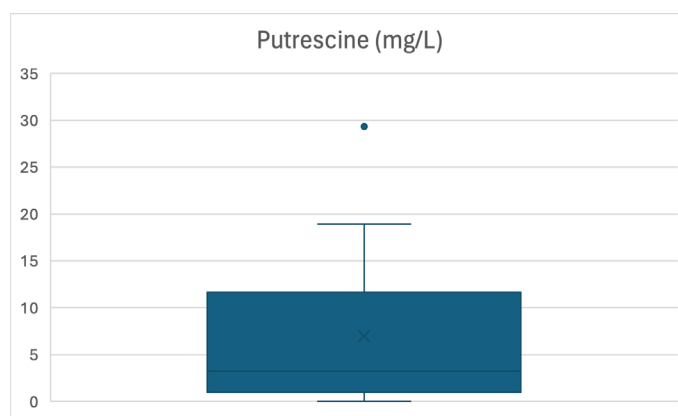


Figure 1 : Illustration sous forme d'un graphique de type « boîtes à moustache » des dosages de putrescine faites au laboratoire EXCELL sur des vins en 2024.

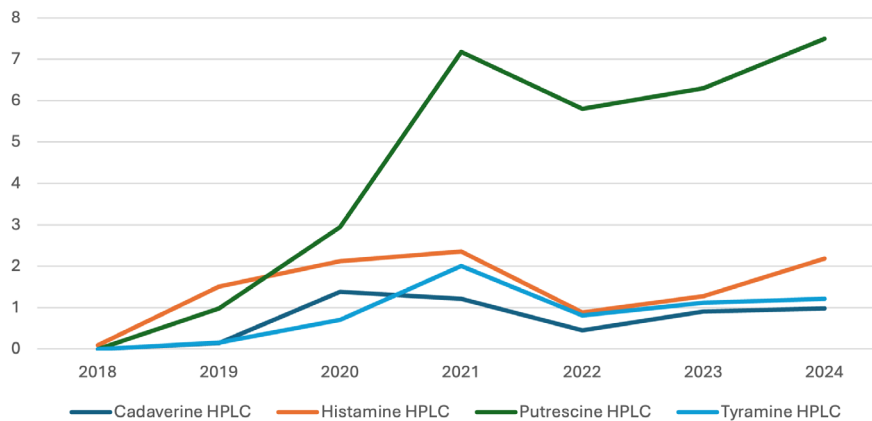


Figure 2 : Evolution des concentrations moyennes des différents amines biogènes analysées au laboratoire EXCELL entre 2018 et 2024 (sur environ 500 analyses/an).

Dans la grande majorité des cas, la production de la putrescine apparaît lors du dernier tiers de la fermentation alcoolique. Ce phénomène est alors la conjonction de trois dérives :

- Premièrement la baisse de l'activité des levures, après la fin de la phase de croissance exponentielle de la population qui intervient lors de la phase de respiration des levures (très brèves, quelques heures seulement), la population de levures va se maintenir puis baisser. Lorsque les levures déclinent, elles consomment moins de nutriments qui sont alors plus facilement accessibles à d'autres flores.
- Deuxièmement la prolifération des bactéries lactiques souvent issues du raisin qui ont survécu au début de la fermentation alcoolique et qui profitent alors du ralentissement du métabolisme des levures.
- Troisièmement et cela concerne plus particulièrement les fermentations en phase solide, certains composés présents dans les pellicules ne sont relargués que tardivement dans la phase liquide où ils peuvent être catabolisés par les microorganismes. C'est notamment le cas de l'azote organique naturellement présent dans la pellicule des raisins. Lorsque ces acides aminés diffusent qu'en fin de fermentation dans un milieu où les levures ne sont plus les prompts à les utiliser, les bactéries peuvent profiter pleinement. En effectuant des suivis précis au laboratoire, nous avons l'impression que la proportion de l'azote présent dans les pellicules des raisins versus l'azote présent dans la pulpe a progressé ces dernières années. Cela découle peut-être de voies d'adaptation de la vigne à des contraintes, notamment hydriques ou cryptogamiques car certains dérivés azotés sont impliqués dans ces mécanismes de résistance. Les

pectines des pellicules des raisins ont également évolué en termes de quantité mais également de niveau de méthylation. Or le niveau de méthylation des pectines associés aux teneurs en calcium (elles-mêmes aussi en croissance) sont la base des phénomènes de gélification des pectines. Globalement tout se passe donc comme si les pellicules étaient plus cohésives. Cette cohésion ralentit les cinétiques de relargage dans le jus des composés contenus dans les pellicules. Si en plus tout cela est associé à des travaux d'extraction plus modérés (comme cela est généralement la tendance), il faut donc avoir bien conscience que l'immense majorité des composés présents dans les pellicules ne sortiront que bien après que les levures puissent en bénéficier et que donc le risque est alors réel que cela soit des bactéries lactiques (ou des *Brettanomyces*) qui en profitent. C'est notamment le cas des acides aminés (on considère qu'environ 20 à 30% de l'azote présent dans les raisins est sous forme d'acides aminés présents dans la pellicule).

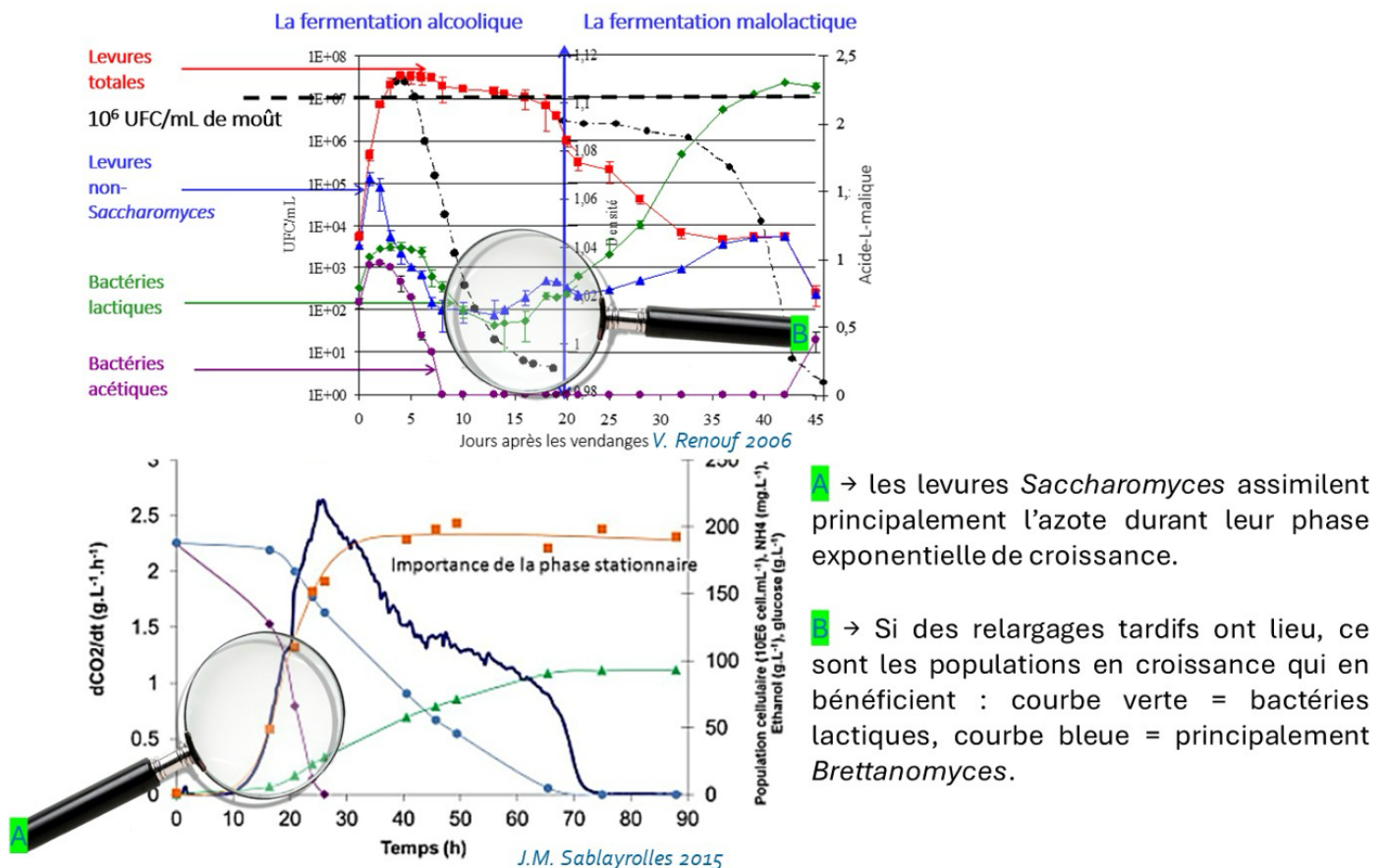


Figure 3 : Mise en parallèle de deux cinétiques de référence durant les fermentations afin de bien appréhender que les relargages tardifs, notamment d'azote, sont la « porte ouverte » à l'usage de ces composés par des flores d'altération.

La compréhension de ces mécanismes permet d'envisager clairement des voies d'amélioration :

- Pour éviter un déclin trop précoce de la population de levures, il faut optimiser les phases de multiplication initiale (optimisation de l'inoculation, de l'aération, de l'apport très précoce de nutriments). Il est aussi possible de pratiquer des traitements de détoxification aux écorces de levures dès la mi-fermentation pour réduire l'effet contraignant de certains composés sur les levures et donc leur déclin trop précoce. Enfin, confrontés à des degrés de plus en plus haut à fermenter, certains vignerons pratiquent déjà des doubles inoculations en levures. Une première inoculation a lieu dès l'encuvage, elle lance la fermentation puis une seconde est réalisée vers 1050 de densité pour apporter une population capable d'utiliser les nutriments potentiellement relargués tardivement par les phases solides. Ces protocoles fonctionnent très bien.

- Pour limiter la pression en bactéries lactiques, il est important que le sulfitage de la vendange joue un rôle prépondérant. Même si le raisin est sain visuellement lors des vendanges, il faut garder à l'esprit que chaque baie est recouverte de plusieurs

centaines de milliers de cellules de bactéries au moment des vendanges. Si aucune pression de sélection n'est apportée, certaines bactéries seront très véloces à se développer dès lors que les levures ralentiront.

- Pour éviter le relargage de composés de la pellicule, la meilleure voie d'action est l'usage d'enzymes pectolytiques. Ces enzymes dégradent la pellicule des raisins et assurent la diffusion des composés hydrophiles, parmi lesquels les acides aminés, dans le moût en tout début de fermentation. Parfois l'usage de telles enzymes est redouté par crainte de voir aussi diffuser des tanins, rappelons ici que les tanins sont des composés hydrophobes qui sans l'action de l'effet solvant de l'éthanol ne peuvent pas diffuser dans le moût. En d'autres termes, l'usage d'enzyme pectolytique n'accélère pas l'extraction des tanins dont le processus aura préférentiellement lieu en fin de macération. Il est donc parfaitement adapté d'utiliser des enzymes pectolytiques pour optimiser la mise à disposition de l'azote (et des sucres) présent dans les pellicules aux levures et d'éviter que ce soit des bactéries d'altération qui en bénéficient plus tard sans influencer l'extraction des tanins.

La coordination de ces trois actions permet généralement de réduire considérablement le risque de production d'amines biogènes par les bactéries lactiques sur la fin de la fermentation alcoolique. La protection suivante est évidemment l'usage de levains malolactiques sélectionnés incapables de produire des aminés biogènes pour le déroulement de la fermentation malolactique.

En conclusion, cette petite note technique vise avant tout à sensibiliser sur les recrudescences de dérivés bactériologiques durant les phases de fermentation alcooliques. Les phénomènes décrits ici sur les amines biogènes sont globalement les mêmes que ceux qui concernent deux autres problématiques de plus en plus constatées : la problématique des goûts de souris (https://labexcell.com/images/ArticlesTechniques/AT_FR_Le_gout_de_souris_dans_les_vins.pdf), et les cas de maladie de la tourne (<https://www.vitisphere.com/actualite-97360-la-maladie-de-la-tourne-en-recrudescence-dans-les-vins.html>).

Dans le cas des goûts de souris, l'analogie avec la problématique des amines biogènes est flagrante : il s'agit de développement de bactéries lactiques sur la base d'utilisation d'acides aminés (les précurseurs des goûts de souris sont aussi des acides aminés) qui

« normalement » devraient être consommés par les levures. Remarquons même que les acides aminés à l'origine des métabolites déviants sont les mêmes : l'ornithine et la lysine. Ainsi il est extrêmement fréquent de trouver des concentrations records en putrescine ou en cadaverine dans les vins sourissés ou inversement... Pour la maladie de la tourne, le phénomène est légèrement différent mais il est très probable aussi que cela soit des relargages tardifs de sucres qui favorisent le développement de bactéries lactiques enclenchant alors le métabolisme de dégradation de l'acide tartrique (pouvant aussi intervenir tardivement par relargage des parties solides).

Pour finir, indiquons donc que les nouvelles modes de vinification, notamment celles visant à abaisser l'usage du soufre à la vendange et/ou celles visant à réduire l'extraction en phase solide (certains parlent désormais d'infusion et non d'extraction) ne doivent pas balayer les principes essentiels de la vinification : les levures doivent agir dans un milieu où elles disposent rapidement (pour ne pas dire immédiatement) de tous les nutriments nécessaires à la progression de leur population et le vigneron doit s'efforcer de contrecarrer chaque possibilité d'intrusion de flore contaminante dont les bactéries lactiques.

Pour mieux appréhender la problématique :

- Dénombrement des populations de bactéries lactiques sur raisins pour estimer la pression bactérienne initiale
- Le dosage des acides aminés et de l'azote total (notion plus représentative du contenu azoté global que celle de l'azote assimilable) pour éventuellement observer des différences de teneurs en précurseurs des amines biogènes
- Le dosage des pectines pour appréhender les dynamiques de relargage des composés venant des pellicules
- Suivi de l'acide-D-lactique durant la fermentation alcoolique, normalement la concentration n'a aucune raison de progresser, si tel est le cas c'est que des bactéries lactiques hétérofermentaires s'immiscent et viennent contrecarrer l'hégémonie de *Saccharomyces*
- Contrôle par Q-PCR des *Lactobacilles* et ou des *Oenococcus oeni* pour spécifiquement rechercher les principales espèces de bactéries productrices d'amines biogènes
- Dosage des amines biogènes