



13^{ième} FORUM ŒNOLOGIQUE DE DAVAYE – Mardi 4 février 2014

PROGRAMME

«Gestion des levures *Brettanomyces*, nouveaux enjeux qualitatifs»

- 8 h 15 Accueil Salle « Jules Chauvet »
- 8 h 45 Introduction du 13^e Forum Œnologique de Davayé
- 9 h 00 *Ecologie, facteurs de développement et méthodes de détection des levures
Brettanomyces sur raisins et sur vins (rouges et blancs)*
Hervé ALEXANDRE, Professeur, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules
Guyot, Dijon
- 09 h 35 *Contrôle des **Brettanomyces** en cave : solutions de maîtrise de l'hygiène vinaire*
Christophe DUPEROUX, Responsable Marché Viticulture, Sealed Air/Diversey
- 10 h 00 *Le chitosane et **Brettanomyces** : Origine, résultats et mode d'action*
Olivier PILLET, Chef de produit - Responsable Développement Biotechnologies, IOC
- 10 h 25 *Proportion et évolution des vins phénolés commercialisés : les chiffres des
observatoires interprofessionnels*
Bertrand CHATELET, Directeur SICAREX Beaujolais, IFV, Villefranche sur Saône
Dominique MELUC, Responsable Observatoire de la Qualité, BIVB, 520 avenue de
Lattre de Tassigny - 71000 MACON
- 10 h 50 Questions des participants
- 11 h 10 Pause
- 11 h 35 *Technologies de maîtrise des **Brettanomyces** et des phénols volatils*
Fabrice DELAVEAU, Directeur adjoint, Société Michaël PAETZOLD
- 12 h 00 *Les phénols volatils : analyse sensorielle et perception par le dégustateur*
Gilles de REVEL, Professeur à l'Université de Bordeaux, ISVV, Unité de Recherche
Œnologie, Villenave d'Ornon
- 12 h 25 *Questions des participants*
- 12 h 40 *Conclusions et synthèse de la matinée*
- 12 h 45 Remise des Prix d'Excellence et des Grands Prix d'Excellence des Vinalies aux
lauréats 2013
- 13 h 00 Apéritif et Déjeuner-buffet

Ecologie, facteurs de développement et méthodes de détection des levures *Brettanomyces* sur raisins et sur vins.

Hervé Alexandre

Laboratoire VALMIS, UMRPAM, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot
Université de Bourgogne
E-mail : rvalex@u-bourgogne.fr

Résumé :

Brettanomyces bruxellensis est une levure singulière en ce sens qu'elle est particulièrement adaptée pour se développer en milieu vin. Sa multiplication se traduit par la production de composés volatils comme l'acide acétique et les phénols volatils pour ne parler que des plus importants qui sont responsables de déviations organoleptiques. Par conséquent l'objectif de tout vinificateur est d'empêcher ou de limiter son développement. Pour y arriver, il faut bien connaître cette levure d'altération, son origine, les facteurs favorables à son développement, les bonnes pratiques œnologiques qui permettent de réduire les risques et connaître les outils qui permettent un suivi de la population et des métabolites. Grâce à l'ensemble de ces éléments des pratiques préventives ou curatives pourront être mises en place. Ce sont ces différents aspects qui seront développés dans cette présentation.

1-Introduction

Les levures *Brettanomyces* ont été décrites pour la première fois par Clausen en 1903, dans la production d'une bière anglaise spéciale (stock ales). En 1921, à partir de la bière belge « Lambic », a été isolée une espèce de levure appelée *Brettanomyces bruxellensis*. Par la suite, des levures *Brettanomyces* ont été isolées par de nombreux chercheurs. Elles ont été différenciées par des critères morphologiques, culturels et physiologiques comme la fermentation de treize sucres, leur capacité à assimiler trente-deux sources de carbone, l'utilisation de nitrate de potassium comme source unique d'azote.

La particularité de cette levure (Figure 1) qui explique que les chercheurs se soient intéressés à elle est sa capacité à produire des composés aromatiques particuliers appelés phénols volatiles, le fameux goût ou plus exactement odeur de « Brett ».

En concentration très faible, les composés d'arôme produits par *Brettanomyces bruxellensis* (4-éthyl-phénol et 4-éthyl gaïacol principalement) peuvent parfois être bénéfiques et contribuer favorablement à la flaveur des vins, en permettant un gain de complexité.

Cependant, dans la grande majorité des cas, l'effet de *Brettanomyces bruxellensis* sur le vin est négatif, l'altération allant d'une simple perte des arômes fruités à un caractère phénolé prononcé qui peut rendre le vin imbuvable.

Brettanomyces bruxellensis est une levure de contamination redoutable car elle est réellement adaptée au milieu vin. En fait cette levure est équipée pour se développer dans les vins en fin de fermentation alcoolique lorsque les autres microorganismes disparaissent et parmi ceux-ci *Saccharomyces* puisqu'il n'y a plus de sucres.

Ainsi, *Brettanomyces bruxellensis* est résistante à de fortes concentrations en éthanol, elle peut se développer en présence de très faibles concentrations en sucres et elle est résistante aux sulfites. Pour ces différentes raisons, actuellement, le développement de cette levure constitue un problème mondial qui n'épargne aucun vignoble.

Afin d'éviter ou de limiter les contaminations par *Brettanomyces bruxellensis*, il convient de connaître son origine, ces niches écologiques, les facteurs favorables à son développement, les

moyens pour quantifier sa présence. Ce sont ces aspects qui seront abordés dans cette présentation. Un autre aspect important est bien entendu les moyens d'éviter son développement ou de l'éliminer et fera l'objet d'autres présentations dans le cadre de cette matinée technique.

2-Ecologie de *Brettanomyces bruxellensis*

Dans la suite de la présentation pour des raisons de simplification, le terme *Brettanomyces* sera utilisé pour parler de *Brettanomyces bruxellensis* la seule espèce retrouvée dans les vins. Ce qui intéresse avant tout la filière c'est de connaître l'origine de la contamination. Aussi surprenant que cela puisse être malgré l'importance que revêt cette levure de contamination, nous avons assez peu d'informations. Tout naturellement, le raisin serait la niche écologique principale de *Brettanomyces bruxellensis*. En fait pendant de nombreuses années, bien que la présence de *Brettanomyces* sur raisin fût suspectée, celle-ci a rarement pu être mise en évidence. Ainsi, les scientifiques s'accordaient pour exclure la présence de *Brettanomyces* sur raisin. Il est intéressant de noter que la même problématique a existé pour *Saccharomyces cerevisiae*. Depuis, grâce à l'avènement de méthodes de détection plus sensibles comme la PCR puis la PCR quantitative ainsi que la mise au point de milieu d'enrichissement, *Brettanomyces* a été identifiée sur grappes de raisins (Renouf et Lonvaud, 2007 ; Barbin, 2006). Malgré tout, la présence de *Brettanomyces* sur raisin est rare. De plus, plus récemment une étude a montré que les souches trouvées sur raisins sont différentes de celles trouvées en cuves. En effet, l'étude de la biodiversité des levures *Brettanomyces* a permis de révéler l'existence de souches caractéristiques de cuveries plus que d'appellation (Vincent et al., 2009). De plus, des différences génétiques existent entre les levures du raisin et celles des vins correspondants.

Ces résultats semblent indiquer que les *Brettanomyces* responsables de l'altération des vins sont plutôt issues de la cave. Cependant, cette étude mérite d'être confortée car Barbin (2006) montre que dans la vigne la population de *Brettanomyces* est plus importante sur les raisins prélevés dans des zones ombragées, plus humides. Ainsi des conditions microclimatiques pourraient favoriser le développement de *Brettanomyces*. Or les zones les plus humides ou les plus ombragées sont celles où l'on trouve le plus de raisins abîmés qui favorise le développement de *Brettanomyces*.

Le raisin constitue donc un réservoir naturel pour *Brettanomyces*, même si celle-ci est difficile à isoler, en revanche ce ne sont pas forcément ces souches qui sont responsables des altérations, mais ce point mérite d'être clarifié.

Par contre, toutes les études s'accordent sur la présence de *Brettanomyces* en moût (Chatonnet et al. 1995; Shinoara et al., 2000). Cependant, une contamination par cette levure d'altération au cours de la fermentation alcoolique est très rarement observée. Tous les sites de vinification et d'élevage abritent des levures *Brettanomyces* (Chatonnet et al., 1999). Ces levures de contamination sont présentes dans le moût de raisin, dans les chambres froides, dans les cuves, sur les sols en béton et dans les barriques (Arvik, 2005). Les levures *Brettanomyces* sont présentes dans les chais et les caves, elles sont souvent localisées dans les vannes, les pompes et tout le matériel difficile à stériliser (Fugelsang, 1998). Le plus souvent les levures *Brettanomyces* présentes dans les chais, et sur le matériel vinaire, sont retrouvées dans les récipients en bois usagés.

Le Tableau 1 présente un récapitulatif des données disponibles à ce jour sur l'écologie des *Brettanomyces*.

Présence de <i>Brettanomyces</i> sur raisins	Présence de <i>Brettanomyces</i> dans la cuverie
Présence sur raisins souvent associée à celle de <i>Botrytis</i>	Sols, parois, cuves, fûts, ...
Présence sur les tas de marcs	
Peut être apporté par des mouches	

Les fûts constituent des foyers de prédilection pour le développement de *Brettanomyces*, mais ne constituent cependant pas une niche écologique naturelle. Par contre de par ses propriétés le bois peut favoriser le développement de *Brettanomyces* (voir paragraphe facteurs de développement).

3-Facteurs de développement

Les levures *Brettanomyces* sont de taille et de morphologie caractéristiques : ce sont de petites cellules ovales, groupées ou non par deux. La taille des cellules est très variable de 2 à plus de 20µ de longueur. Les cellules peuvent être sphéroïdes, ovales, cylindriques, allongées, en fonction des conditions de cultures, du niveau de stress. Cette levure est particulièrement bien adaptée pour survivre et se développer en milieu vin. Une étude réalisée sur trente-cinq souches de *Brettanomyces bruxellensis* sélectionnées dans diverses régions du globe, sur différents cépages, pour différents millésimes, a testé leur capacité à métaboliser un grand nombre d'hexoses. La plupart des souches ont pu utiliser le glucose, le galactose et le fructose. Grâce à une activité β -glucosidase la plupart des souches ont également pu croître sur du saccharose, du maltose, du tréhalose et du cellobiose (Conterno et al., 2006). Le cellobiose peut être apporté par le bois des fûts neufs.

Figure 1 : Photo de cellules *Brettanomyces* x1000



Outre sa capacité à utiliser un grand nombre de sources de carbones différentes, cette levure à de faibles besoins. En effet, des teneurs en sucres de 150 à 300mg/l suffisent à son développement et notamment pour atteindre une population suffisante pour générer une déviation organoleptique.

Le seuil au-delà duquel les risques de contaminations et de développement sont élevés est de 1000 cellules/ml. Cependant un tel seuil n'a pas beaucoup de sens. Un vin peut contenir 1000 cellules/ml et ne jamais développer de problème s'il est protégé et que les conditions de conservations sont réunies. Un autre vin contenant 1 cellule/ml peut permettre si les conditions sont réunies un développement important de *Brettanomyces* avec une altération. En fait le seuil est là pour nous inviter à la vigilance !

Les besoins en azotes sont faibles et un enrichissement du vin par un élevage sur lies suffit à favoriser le développement de *Brettanomyces* (Guilloux-Benatier et al., 2001).

L'oxygène est un facteur important pour le développement de cette levure. La présence d'oxygène stimule sa croissance, ce qui ne veut pas dire que sans oxygène il n'y a pas de croissance. C'est pourquoi l'élevage en fût peut dans certaines conditions poser des problèmes. En plus d'avoir lieu directement au niveau du bois de la barrique, l'échange d'oxygène se produit également au niveau de la bonde. Différentes positions de la bonde ont été testées, mais aucune ne permet une limitation suffisante de l'échange (Chatonnet, *et al.*, 1992). Le soutirage est également une étape critique, car elle apporte beaucoup d'oxygène dans le vin, ce qui stimule la croissance de la levure. Le risque de contamination par transfert est également accru lors du soutirage (Gilis, 1999); (Renouf, *et al.*, 2007). La microoxygénation et l'utilisation d'un cliqueur (appareil permettant un apport ponctuel d'oxygène dans la cuve) peuvent présenter des points critiques quant à la croissance de *Brettanomyces*. En effet, une étude menée en cuves (Gilis, 1999) a montré que l'oxygénation ponctuelle mais massive pouvait accélérer la croissance de *Brettanomyces* contrairement à une microoxygénation continue. En fût neufs de par des échanges favorisés par une porosité importante, les pertes en sulfites sont plus rapides qu'en fûts usagés, ainsi, des analyses régulières sont nécessaires pour ajuster le niveau de sulfite notamment dans les périodes à risques lorsque la température dans les caves augmente. D'autant que la diffusion de l'oxygène à travers le bois de la barrique augmente lorsque les températures s'élèvent, notamment lors des périodes chaudes de l'année. Cette augmentation de diffusion peut diminuer l'effet du sulfitage dans la barrique, et donc favoriser le développement de *Brettanomyces*. De plus, les températures supérieures à 20°C favorisent la croissance des levures *Brettanomyces*.

Un facteur primordial dans le développement de *Brettanomyces* est la présence de sulfites. Le SO₂ et notamment le SO₂ moléculaire constituait jusqu'à présent l'outil essentiel de lutte contre *Brettanomyces*. Cependant, son efficacité dépend bien entendu de la dose de sulfite utilisé mais aussi de la souche de *Brettanomyces*. Plusieurs études mettent en évidence la forte variabilité dans la résistance au SO₂ des souches de *Brettanomyces*. Parmi les 41 souches étudiées, Curtin et al. (2012) montrent qu'il existe un facteur 5 entre la souche la plus résistante et la plus sensible. A partir de cette étude et d'autres, les recommandations classiques sont de 30 mg/L de SO₂ libre à pH 3.5 (Ribéreau-Gayon et al., 2000) et de 0.625 mg/L de SO₂ moléculaire (Beech et al., 1979). Ces doses peuvent être efficaces contre les levures les moins tolérantes aux sulfites mais pas pour certains individus ou les concentrations devront être supérieures à 0.625 mg/l de SO₂ moléculaire (Figure 2). Cependant, ces concentrations sont difficiles à avoir pour des pH élevés et incompatibles avec les qualités sensorielles requises.

Il faut ajouter que l'ajout de SO₂ dans les vins induit l'entrée des cellules dans un état dit viable non cultivable (VNC). Dans cet état, les levures *Brettanomyces* ne peuvent pousser sur boîte de pétri mais possède toujours une activité métabolique et sont susceptibles de sortir de cet état lorsque les conditions de croissances deviennent favorables (Du Toit et al., 2005 ; Serpaggi et al., 2012). Ceci démontre l'intérêt d'une démarche préventive pour quantifier spécifiquement des levures et doser les phénols volatils au cours de l'élaboration des vins et plus spécifiquement durant l'élevage.

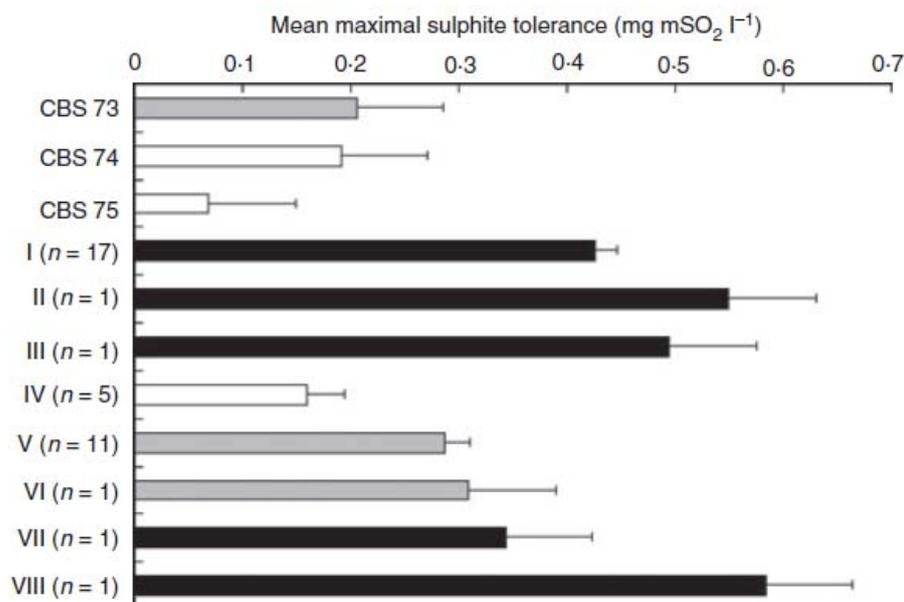


Figure 2 : Relation entre la tolérance aux sulfites et le génotype de *Brettanomyces bruxellensis*. CBS 73, 74, 75 correspondent à 3 souches de *Brettanomyces* différentes. Les chiffres I à VIII correspondent à des génotypes différents de souches de *Brettanomyces*. Pour chacun de ces groupes la tolérance aux sulfites a été testée. Par exemple pour le génotype III constitué d'une seule souche, la croissance est arrêtée pour des concentrations en sulfites supérieures à 0.450 mg/l de SO₂ moléculaire.

Les méthodes de microbiologies classiques telles que les milieux sélectifs ont été employées pour isoler, identifier et quantifier *Brettanomyces*. Pour cette levure, les critères les plus souvent retenus sont : l'acidification en aérobiose, la synthèse d'éthylphénol, l'assimilation de différentes sources de carbone comme l'éthanol, et surtout la résistance à l'actidione (cycloheximide). Ces cultures présentent l'avantage d'être quantitatives. Mais ce type de détection sélectif manque de spécificité. De plus, le temps nécessaire pour obtenir les résultats est souvent trop long pour permettre une réaction efficace en cas de contamination puisqu'il faut compter un délai supérieur à 7 jours. Cependant ces milieux possèdent l'avantage d'être peu coûteux et donc adaptés à un suivi régulier à l'échelle de l'entreprise. De très nombreuses techniques d'identification et de quantification de *Brettanomyces* existent et sont rappelées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les différentes méthodes d'identification et de quantification spécifique de la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*

Méthode	Référence
Nested PCR (identification)	Ibéas et al. (1996)
ADN mitochondrial et RAPD-PCR (identification)	Agnolucci <i>et al.</i> (2009); Martorell <i>et al.</i> (2005);
ITS-RFLP-PCR (identification)	Dias (2003) ; Esteve-Zarzoso <i>et al</i> (1999); Martorell <i>et al.</i> (2005)
PCR quantitative (Quantification spécifique)	Agnolucci et al. (2007); Phister and Mills (2003) ; Andorrà <i>et al.</i> (2010) ; Delaherche <i>et al.</i> (2004) ; Tessonnière, <i>et al.</i> , 2009
ISS-PCR (identification)	Vigentini <i>et al.</i> (2010); Oelofse <i>et al.</i> (2009)
PNA FISH (Quantification spécifique)	Dias (2003); Millet and Lonvaud-Funel (2000); Roder <i>et al.</i> (2007); Stender <i>et al.</i> (2001)
Cytométrie de flux (Quantification spécifique)	Serpaggi et al. (2010)
Chemiluminescent DNA sensor (Quantification spécifique)	Cecchini <i>et al.</i> (2011)

D'un point de vue pratique, la technique de Q-PCR est celle qui s'est le plus développée. La PCR quantitative ou Q-PCR, est une méthode spécifique et rapide, mais qui nécessite une formation du personnel technique (Phister & Mills, 2003; Tessonnière, *et al.*, 2009). Basée uniquement sur l'ADN, cette méthode détecte les *Brettanomyces* qu'elles soient vivantes ou non. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un agent fluorescent qui se fixe à l'ADN. Au cours des premiers cycles d'amplification de l'ADN, l'augmentation de la fluorescence suit une cinétique exponentielle. Le cycle qui correspond à un dépassement du seuil de détection de la fluorescence est utilisé, à l'aide d'une relation de proportionnalité, pour calculer la quantité de matrice initiale, donc de population de levures. Cette technique permet également de mettre en évidence les cellules en état VNC comme le montre l'étude de Tofalo et al., (2012), (Tableau 2). Cependant comme cette étude est basée sur une réaction avec l'ADN elle peut donner des faux positifs, liés à une amplification de l'ADN de cellules mortes.

D'autres méthodes permettent de ne visualiser que les cellules vivantes et en état VNC comme la technique de cytométrie développée par Gerbaux (2007). Mais la sonde fluorescente utilisée n'est pas spécifique de *Brettanomyces* et là encore des faux positifs peuvent apparaître. En utilisant une sonde spécifique de *Brettanomyces* qui se fixe sur les ARN, une méthode de détection et quantification spécifique par cytométrie a été développée (Serpaggi et al. 2010). Plus longue que la Q-PCR, 48-72h au lieu de moins de 12h mais plus abordable d'un point de vue technique, cette méthode a fait l'objet d'un développement sur échantillons vin qui a montré son réel intérêt et qui pourrait être utilisée par la profession.

Il n'y a actuellement aucune méthode parfaite sur tous les critères de spécificité, rapidité, coût économique,... mais les méthodes existant sont parfaitement adaptées à la détection et quantification de *Brettanomyces*. Il ne faut en effet pas oublier que les objectifs à la mise en bouteille sont différents suivants les opérateurs

Tableau 3: Détection de *Brettanomyces* dans des vins italiens par culture sur boîte ou par Q-PCR (D'après Tofalo et al. 2012)

Echantillon de vin	CFU/ml milieu DBM	Cellules/ml Q-PCR
Vin 1	ND	2.82×10^3
Vin 2	ND	ND
Vin 3	ND	ND
Vin 4	ND	2.13×10^2
Vin 5	2.52×10^3	1.71×10^4
Vin 6	1.24×10^3	9.22×10^3
Vin 7	ND	5.84×10^3

4-Conclusion

Bien que les professionnels souhaiteraient connaître des valeurs seuils en terme de populations microbiennes à risque, en terme de SO₂ moléculaire comme cela se fait beaucoup pour les paramètres analytiques, cela n'est pas possible en microbiologie actuellement. Il existe une forte variabilité au niveau des souches de *Brettanomyces* en termes de production de phénols volatiles, en termes de résistance aux sulfites et en termes d'optimum de croissance. Cette même diversité existe pour la matrice vin, ce qui rend complexe la détermination de seuil.

En l'état actuel des connaissances, il y a suffisamment d'outils pour limiter ou éliminer le risque de développement de *Brettanomyces*. Que ce soit au niveau de l'hygiène, des bonnes pratiques œnologiques, au niveau du contrôle. Le risque zéro n'existe pas lorsque l'on choisit de ne pas filtrer stérilement, de ne pas pasteuriser son vin et de ne pas sulfiter correctement. Dans ce cas l'objectif doit être de minimiser au maximum la population de *Brettanomyces* présente à la mise en bouteille et de se mettre dans des conditions défavorables au développement des levures résiduelles. Une faible population de levures résiduelles ne produira pas de phénols volatiles qui altéreraient le vin, en revanche elle pourrait se développer plus tard lorsque les conditions sont plus favorables et provoquer alors une altération. Ainsi une vigilance, un suivi des bonnes pratiques œnologiques et un effort en termes de contrôle des vins doivent permettre de réduire de façon significative les problèmes d'altérations par *Brettanomyces* comme cela a été le cas en Australie au début des années 2000.

D'un point de vue scientifique il reste des marges de progression importantes, non pas pour donner des seuils mais pour mieux cadrer, le niveau de population à risque. Quel est le lien entre le niveau de SO₂ moléculaire nécessaire pour supprimer les *Brettanomyces* et le niveau de population ? Est-il vraisemblable de penser qu'une faible population de levures résiduelles est éliminée avec des doses plus faibles de sulfites ? La quantification des précurseurs et la relation avec la production de phénols volatils peut-elle constituer un moyen d'évaluer le risque ? Quel est le risque de la présence de cellules en état viable non-cultivables ? Tous ces aspects doivent faire l'objet d'études et devraient permettre de réduire encore plus dans le futur en association avec de nouvelles méthodes d'élimination de cette levure le risque de contamination.

5-Références bibliographiques

Agnolucci, M., S. Scarano, F. Rea, A. Toffanin, and M. Nuti. 2007. Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed sangiovese grapes by real time PCR. Italian Journal of Food Science 19: 153-164.

Agnolucci, M., I. Vigentini, G. Capurso, A. Merico, A. Tirelli, C. Compagno, R. Foschino, and M. Nuti. 2009. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *International Journal of Food Microbiology* 130: 238–244.

Andorrà, I., B. Esteve-Zarzoso, J.M. Guillamón, and A. Mas. 2010. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 144: 257-262.

Arvik T. et Henick-Kling T. (2005) Synthèse: Apparition de *Brettanomyces bruxellensis*, multiplication et impact sur les arômes du vin. *31-ème New York Wine Industry Workshop Annuel, Vinidea.net, Wine Internet Technical Journal*, 1-9.

Barbin (2006) contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. Thèse de doctorat-INP Toulouse

Béatrice Vincent, Morvan Coarer, Aurélie Pain (2009) *Brettanomyces* : biodiversité et conséquences. *Revue Française d'œnologie*, 239, 2-5.

Beech, R.W., Burroughs, L.F., Timberlake, C.F. and Whiting, G.C. (1979) Progres recents sur l'aspect chimique et l'action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. *Bull OIV* 186, 1001–1022.

Cecchini, F., M. Manzano, Y. Mandabi, E. Perelman, and R.S. Marks. 2011. Chemiluminescent DNA optical fibre sensor for *Brettanomyces bruxellensis* detection. *Journal of biotechnology*. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.10.004

Chatonnet, P., Masneuf, I., Gubbiotti, M.-C., & Dubourdiou, D. (1999). Prévention et détection des contaminants par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage des vis. *Revue Française d'Oenologie*, 179, 20–24.

Conterno L., Joseph L.C.M., Arvik T.J., Henick-Kling T. and Bisson L. (2006) Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 139-147.

Curtin, C., Kennedy E and Henschke P.A (2012) Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* wine isolates. *Letters in Applied Microbiology*, 55, 56-61.

Delaherche, A., O. Claisse, and A. Lonvaud-Funel. 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by realtime polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97: 910–915.

Dias, L. 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20: 567-574.

du Toit, W., I. Pretorius, and A. Lonvaud-Funel. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* 98: 862-871.

Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburul, and A. Quero. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-337.

Fugelsang K. (1998) *Brettanomyces* : Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins ? *Biofutur*, 182, 22-23.

Gerbaux, V., 2007. Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans un vin rouge par cytométrie de flux. *Revue des Oenologues* 123, 21-24.

Guilloux-Benatier M., Chassagne D., Alexandre H., 2001 Influence de l'autolyse des levures après fermentation sur le développement de *Brettanomyces* dans le vin. *J Int Sci Vigne Vin*, 35, no3, pp157-164

Ibeas, J.I., I. Lozano, F. Perdignes, and J. Jimenez. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 998-1003.

Millet, V., and A. Lonvaud-Funel. 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30: 136-141.

Martorell, P., A. Barata, M. Malfeito-Ferreira, M. Fernandez-Espinar, V. Loureiro, and A. Querol. 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology* 106: 79-84.

Oelofse, A., A. Lonvaud-Funel, and M. Du Toit. 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiology* 26: 377-385.

Phister TG, Mills DA. 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl Environ Microbiol* 69:7430–4.

- Renouf V., Lonvaud-Funel A., 2007a Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol Research* 162:154-67
- Renouf V., Lonvaud-Funel A., Coulon J. (2007b) The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines : areview. *J. Int. Vigne Vin*, 41, 3, 161-173.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2000) Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Serpaggi V, Remize F, Sequeira-Le Grand A, Alexandre H (2010) Specific Identification and Quantification of the spoilage microorganism Brettanomyces in wine by Flow Cytometry: a useful tool for winemakers. *Cytometry A* 6: 496-499
- Roder, C., H. König, and J. Frolich. 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Research* 7: 1013-1026.
- Serpaggi, V., F. Remize, G. Recorbet, E. Gaudot-Dumas, A. Sequeira-Le Grand, and H. Alexandre. 2012. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30:438-447.
- Shinohara T., Kubodera S., Yanagida F., 2000 Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavours in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1), pp90-97.
- Stender, H., C. Kurtzman, J.J. Hyldig-Nielsen, D. Sorensen, A. Broomer, K. Oliveira, H. Perry-O'Keefe, A. Sage, B. Young, and J. Coull. 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 938.
- Tessonniere H, Vidal S, Barnavon L, Alexandre H, Remize F. 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int J Food Microbiol* 129:237–43.
- Tofalo R, Schirone M, Corsetti A, and Suzzi G (2012) Detection of *Brettanomyces* spp. in Red Wines Using Real-Time PCR. *Journal of Food Science*, 9, 545-549.
- Vigentini, I., C. Picozzi, and R. Foschino. 2010. Intron splice site PCR analysis as a tool to discriminate *Dekkera bruxellensis* strains. *Annals of Microbiology* 61: 153-157.

Contrôle des *Brettanomyces* en cave : Solutions de maîtrise de l'hygiène vinaire »

Christophe DUPEROUX
Responsable Marché Viticulture
Sealed Air/Diversey
E-mail : christophe.duperoux@sealedair.com

1. Origines et caractéristiques des Brettanomyces :

Cette levure est considérée comme une levure de contamination des vins en cours d'élevage par le biais d'un matériel de cave insuffisamment nettoyé et désinfecté. Son origine peut être détectée sur la surface du raisin.

Brettanomyces est une levure peu exigeante en milieu nutritif, qui peut s'adapter à des vins riches en alcool et à des pH faibles.

Ces caractéristiques lui permettent de s'adapter rapidement aux conditions d'un cave, de s'implanter à différents niveaux et de se développer dans les vins pendant les fermentations alcooliques et après d'autres stades.

Les souches de *Brettanomyces* produisent des Phenol-volatils (E4P ou E4G), molécules relativement stables, très odorantes et perceptibles à des seuils très faibles (100 µg/l. pour E4G).

La finalité étant la modification des profils aromatiques et des déviations sur des descriptifs tel que « gouache », « cuir », « écurie »
.....

2. La présence de Brettanomyces aux différents stades de l'élaboration du vin :

Si on reprend les 4 stades majeurs de l'élaboration du vin, on verra que la probabilité d'apparition du phénomène est présente partout :

Agent responsable	Conséquence Vin	Probabilité d'apparition du phénomène			
		Phase pré fermentaire	Phase fermentaire	Elevage	Conditionnement
Brettanomyces	Formation de phénols-volatils				



Faible



Moyenne



Fort

D'une manière générale, la prise en compte d'une hygiène stricte et raisonnée sera un moyen sûr aux différents stades de la chaîne technologique afin de limiter leur prolifération d'un matériel à un autre.

A/ Lors de la phase pré-fermentaire :

C'est l'ensemble des surfaces en contact avec le jus de raisin et le moût qui doivent être pris en compte pour éviter toute formation de Biofilm, qui pourrait être à l'origine de développement entre autres de levures d'altération.

En effet, au moment de la récolte, les conditions sont tout à fait favorables à la formation rapide de Biofilm (Température, milieu, humidité) et beaucoup d'étapes successives et de matériels vont être en contact.

La mise en place d'opérations de nettoyage et désinfection à fréquence régulière, permettra de contrôler et d'éviter ces formations à l'origine des contaminations.

Des solutions thermiques peuvent être mises en œuvre en cours de vinification avant FA (flash détente ou thermovinification) permettent de réduire les populations au moment du traitement.

B/ Lors des fermentations alcoolique (FA) et malo-lactique (FML) :

L'ensemencement des moûts par des levures sélectionnées (LSA) est un bon moyen non seulement d'assurer les FA mais de limiter les compétitions et d'éviter l'implantation et le développement des Brettanomyces.

De même, un sulfitage équilibré et raisonné sera également un élément indispensable, pour éviter toute période de latence ou non protection, qui serait propice au développement des Brettanomyces.

Il en sera de même pour la FML, qui passera également par une bonne gestion du SO₂.

A ce niveau-là, et nous le verrons par la suite, un état de surface parfait des contenants et des matériaux est indispensable.

C/Phase élevage :

La présence des Brettanomyces dans les lies , avec parfois de forts taux de phénols volatils, nécessite de recourir à des opérations de soutirage .

A ce stade, deux opérations physiques peuvent intervenir pour éliminer les Brettanomyces :

- Filtration avec des membranes < 1µ de porosité (MFT)
- Flash pasteurisation

Etat de surfaces des contenants et fréquences des opérations d'hygiène.

D/ Phase Conditionnement :

Le développement des Brettanomyces peut se faire sans problèmes, dès le moment où une ou quelques cellules sont présentes lors de la mise en bouteilles.

La filtration finale stérilisante adaptée sera un des moyens d'éliminer ces cellules.

Importance de l'hygiène (chimique et thermique) dans les circuits et sur les extérieurs des matériels.

3. Rôle et importance de l'hygiène à chaque étape :

A/ Définition Hygiène en Œnologie :

-->Ensemble des règles à observer et des pratiques à effectuer ,visant à restituer ou à maintenir **la propreté visuelle** et à **limiter les contaminations microbiennes**, sur **la totalité des surfaces en contact avec le moût et le vin**, ainsi que de **l'ensemble des locaux où se déroule la chaîne technologique du vin et pendant toute la durée de celle-ci** » (protection de l'utilisateur et de l'environnement).

On va raisonner hygiène en tenant compte bien sûr de la problématique Brettanomyces mais également des opérations de nettoyage à réaliser au préalable ainsi que les risques de développement autres tels que les bactéries acétiques et/ou les bactéries lactiques. Ce sera un raisonnement global.

Il faut tenir compte des matériels et matériaux en présence, de leurs configurations et états, des process et des produits à mettre en œuvre.

B/ Matériels et matériaux :

Deux points très importants à prendre en compte :

- **Il convient de distinguer 2 grandes catégories de revêtements de surfaces sur lesquels les souillures organiques ou autres peuvent adhérer :**

--> Surfaces lisses (acier inoxydable, revêtements époxydiques... = faible adhérence et opérations hygiène facilitées

→ Surfaces rugueuses (béton brut, bois)= forte adhérence et plus de difficultés à éliminer les souillures et les microorganismes

- **En plus de l'état de surfaces des matériels, 3 facteurs vont intervenir dans le choix du process de nettoyage/désinfection :**

--> Diversité des matériaux (inox, ciment, bois)

--> Diversité de l'état des matériaux (vieillesse, état de surface, corrosion...)

→ Diversité des matériels (surfaces ouvertes, circuits fermés, accessibilité, nettoyabilité)

- **Cuves en ciment brut : encore très utilisés en vinification. La problématique concerne l'état de surfaces des bétons, qui peuvent être à l'origine de foyers de contamination, souvent irréversibles (fissures)**
- **Contenants en fibre de verre ou polyester : facilité de nettoyage, attention à ne pas utiliser des températures trop élevées (>50°C) ou des pressions de rinçage trop fortes (>40 bars) pour éviter une déstructuration des fibres et la création de niches. Point sensible : la gorge du joint gonflable pour les chapeaux flottants.**
- **Contenants ou matériels en acier revêtu ou résine époxydique : s'assurer régulièrement de la qualité du revêtement pour éviter toute création de poches, favorisant un foyer potentiel.**
- **Elastomères et plastiques : ces matériaux sont présents à tous les niveaux (machine à vendanger, pompes, tuyaux, filtres). Ils se prêtent difficilement à un nettoyage ou à une désinfection efficace, sauf en cas de démontage facilité. Leur vieillissement dans le**

temps créé des fissures, des craquelures, des rayures qui vont être des points de contamination potentiels.

- Bois : milieu rugueux et poreux par excellence. Milieu favorable par excellence à la présence de Brettanomyces (présence jusqu'à 1 cm de profondeur !).
- Acier inoxydable : surface lisse, de neutralité chimique, bactériologique et organoleptique. Attention tout de même à la configuration de certains circuits, à la présence d'équipements ajoutés (exemple drapeaux pour maîtrise température) et aux points critiques : joints portes, robinet dégustation, jauge> mise en place d'une procédure adaptée
- Environnement de la chaîne technologique : sols, murs, extérieurs de cuves : les foyers de contamination sont nombreux

C/ Les différentes étapes à suivre :

Suivre une procédure complète par en 6 étapes par matériel en reprenant les paramètres du TACT (Température/Application/Concentration/Température)

1 ^e étape 	Démontage/Trempage/prélavage Eau (moyenne pression + débit)	Elimination des grosses souillures (débris végétaux, lies.)
2 ^e étape 	Nettoyage/Circuit / Brossage/Mousse Détergent alcalin complet	Elimination des souillures visibles (tartre, matière colorantes)
3 ^e étape 	Rinçage à l'eau moyenne pression	Elimination des souillures
4 ^e étape 	Désinfection : désinfectant	Destruction des microorganismes
5 ^e étape 	Rinçage	Elimination des traces de produits
6 ^e étape 	Contrôles (rinçage et efficacité)	Qualité rinçage/efficacité

Remarques: .Contrôles au papier pH pour le rinçage des surfaces

Prélèvements et recherche des Brettanomyces :

- **Milieu culture gélosé pour forme viable (seuil de détection pouvant aller jusqu'à 1 ufc/ml)**
- **PCR : non quantitatif (absence ou présence) ou 10 ufc/ml**
- **Sniff Brett : milieu liquide pour déterminer rapidement le niveau de population de Brettanomyces capables de produire des ethylphenols**
- **ATP Mètrie : non spécifique aux Brettanomyces intéressant dans le cadre d'une validation rapide (atp fortement présente dans les levures)**

D/ Produits détergents et désinfectants

Par définition, l'élimination des levures d'altération (ou de certaines bactéries acétiques ou lactiques) n'est pas une difficulté car la plupart des désinfectants présents sur le marché sont efficaces ; la difficulté restera dans la localisation dans les chais des foyers ou zones de contamination.

Autre élément également important, une phase détergente sera toujours le préalable à une bonne désinfection (notion d'interférence organique et d'efficacité).

Des formules adaptées (essentiellement alcaline ou alcalin+amine), en fonction de la nature de la souillure et du mode d'application, peuvent être utilisées.

Dans le cadre d'une opération de désinfection, il faut s'assurer de l'efficacité du produit non seulement en terme de bactéricide mais également de fongicide (exemple : suivant norme EN 1650). Il faut également s'assurer de l'efficacité sur des levures propres au milieu du vin.

RESUME ACTIVITE DESINFECTANTE

DIVOSAN PLUS VT53

ACTIVITE FONGICIDE

NORME D'ACTIVITE	LABORATOIRE D'ESSAI	MATIERES INTERFERENTES	TEMPERATURE	TEMPS DE CONTACT	SOUCHES TESTEES	RESULTATS
EN 1650	Laboratoire HygCen 06/02/02	Eau dure + albumine 0,3g/l (conditions de propreté)	20°C	15 minutes	<i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i>	4% 0,35%
	Laboratoire de Microbiologie JD Italie 16/06/2009	Eau dure + albumine 3g/l (conditions de saleté)	20°C	15 minutes	<i>Dekkera bruxellensis</i>	1%

E/ Mode opératoire adapté :

En plus d'une procédure adaptée à chaque matériel ou à chaque opération dans les chais, la lutte contre les Brettanomyces demandera de raisonner une procédure adaptée, qui prendra en compte la configuration des équipements.

----->Exemple adapté sur les joints, les raccords et robinets de dégustation avec opération de démontage, brossage et trempage des pièces.

CONCLUSION :

La présence de levures d'altération type Brettanomyces est un élément à prendre en compte tout au long de la chaîne technologique de transformation du raisin au vin.

Si la maîtrise des risques passe par des phases œnologiques majeures (maîtrise des phases FA/FML, contrôle SO₂ stabilisation des vins), c'est au travers d'une bonne maîtrise et rigueur dans les opérations de nettoyage et désinfection qu'il faudra également se tourner.

A chaque étape, de la récolte du raisin jusqu'au bouchage de la bouteille, un mode opératoire précis et raisonné doit être mis en place (procédure stricte ou procédure adaptée) afin de mettre toutes les chances de son côté pour éviter le développement des Brettanomyces.

Chitosane et *Brettanomyces* : origine, résultats et mode d'action

Olivier PILLET

Chef de produit - Responsable Développement Biotechnologies
Institut Œnologique de Champagne
e-mail : opillet@ioc.eu.com

Résumé :

Le chitosane, polymère d'origine naturelle dérivé de la chitine, présente sous certaines formes des propriétés anti-microbiennes. Sa production à partir d'une source fongique a permis son utilisation récente en œnologie pour lutter contre la levure de contamination *Brettanomyces bruxellensis*. Différentes expérimentations ont montré que son utilisation dans le vin à la dose de 4 g/hL était le plus souvent suffisante pour obtenir une mortalité rapide et totale des cellules contaminantes. D'autres travaux ont mis en évidence l'existence de populations de *Brettanomyces* à l'état sublétal après un traitement au chitosane, c'est-à-dire des cellules mourantes détectées par certaines méthodes analytiques mais incapables de se redévelopper ou de produire des phénols volatils. Ces faux-positifs restent parfois détectables après plus de 2 mois suivant le traitement. Des recherches ont également permis d'étayer des hypothèses quant au mode d'action du chitosane sur *Brettanomyces*, à la fois biologique et physique. Des interactions électrostatiques entre la membrane cellulaire de *Brettanomyces* et le chitosane sembleraient ainsi responsables d'une altération de l'intégrité membranaire, aboutissant à des pertes d'énergie et à la mortalité des cellules, mais aussi d'un phénomène d'adsorption et de collage qui accéléreraient la sédimentation des cellules. Enfin, des expérimentations mettant en œuvre des temps de contact plus longs ouvrent des perspectives pour la protection du vin durant d'élevage.

Introduction

Brettanomyces bruxellensis représente une menace constante pour la qualité des vins. Ces levures d'altération sont capables de se développer dans un milieu difficile, notamment durant les phases d'élevage des vins.

Aujourd'hui, pour lutter contre *Brettanomyces*, différents moyens sont mis en œuvre avec plus ou moins de succès mais ils ne suffisent pas toujours. Admis comme pratique œnologique par l'OIV en juillet 2009 et par l'Union Européenne en décembre 2010, le chitosane d'origine fongique représente un outil innovant de lutte contre *Brettanomyces*. Plusieurs travaux menés en laboratoire ont montré l'efficacité du chitosane sur *Brettanomyces*. Depuis 2008 des essais ont été réalisés en cave, confirmant ces résultats. Ces suivis ont également permis de déterminer les doses d'emploi, tout en mettant en exergue l'existence d'un état dit « sublétal » des populations de *Brettanomyces* traitées par le chitosane. Cette connaissance a permis d'affiner le choix des méthodes de contrôle de l'efficacité du traitement, de même qu'elle a contribué à la compréhension du mode d'action du chitosane sur les levures *Brettanomyces*.

Origine du chitosane employé en œnologie

Le chitosane est une molécule dérivée de la chitine. Chitine et chitosane font partie des polymères naturels les plus répandus sur Terre ; ils arrivent ainsi en seconde position après la cellulose. On trouve de la chitine notamment dans l'exosquelette des crustacés, des insectes mais également dans la paroi cellulaire des champignons.

Le chitosane, dérivé désacétylé obtenu à partir de la chitine, est un copolymère linéaire β 1-4 de N-acétyl D-glucosamine et de D-glucosamine (figure 1). Il est obtenu par soustraction de groupements acétyl ($\text{CH}_3\text{-CO}$). Cette opération libère des groupes amines primaires (R-NH_2) et confère aux chitosanes une nature "cationique".

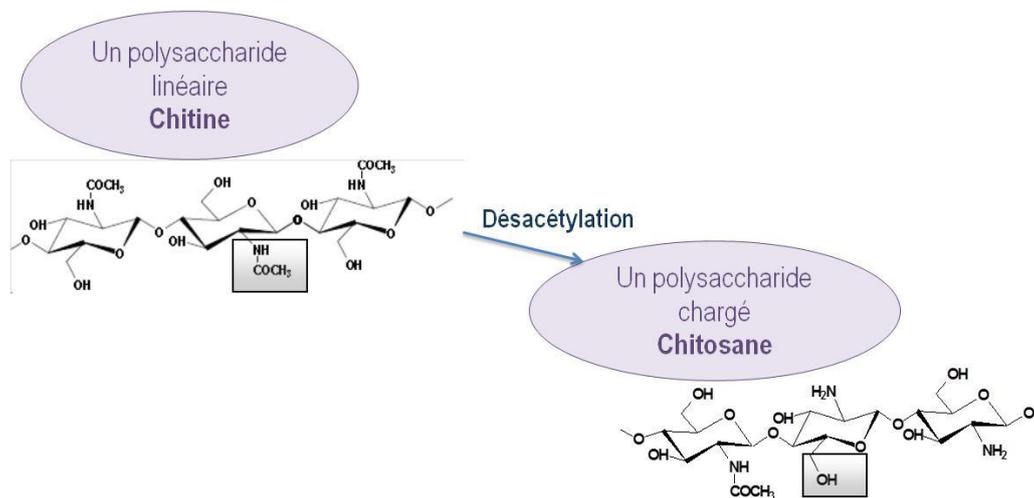


Figure 1 : Le chitosane, polymère dérivé de la chitine par désacétylation

On peut en effet considérer non pas un seul mais plusieurs chitosanes : les variations de degré de désacétylation, de poids moléculaire et de préparation des formulations (granulométrie notamment) donnent lieu à des molécules de propriétés et d'activités diverses.

L'innovation qui a permis l'usage du chitosane en œnologie est le process d'obtention de la chitine à partir d'une source non animale mais fongique : *Aspergillus niger*. Ce procédé, breveté par la société Kitozyme, fournit un chitosane d'origine naturelle, biodégradable et non allergène.

Le chitosane a été cité pour ses propriétés antimicrobiennes dans plusieurs travaux (Kumar, 2000; Eaton et al. 2008 ; Kong et al. 2010 ; Zakrzewska et al. 2005), aptitudes qui dépendent entre autres de son degré de désacétylation et de son poids moléculaire (Zuehlke et al., 2013).

Dans une fermentation mixte *Brettanomyces intermedius* / *Saccharomyces cerevisiae* de bioéthanol, le chitosane, utilisé à une dose de 2 g/L, a permis d'annihiler la population de *Brettanomyces* sans impact sur les *S. cerevisiae*, dévoilant une certaine sélectivité du pouvoir antimicrobien de ce polymère (Gomez-Rivas et al. 2004).

Bornet et al. (2008) ont ensuite travaillé sur les propriétés du chitosane en œnologie et notamment vis-à-vis de *Brettanomyces bruxellensis*, d'abord en laboratoire puis dans des exploitations viticoles du Languedoc-Roussillon (Blateyron-Pic et al., 2011) : 10 jours après traitement à 4 g/hL de chitosane, les populations *Brettanomyces* de vins initialement contaminés n'étaient généralement plus détectées sur milieux gélosés sélectifs. Dans le même temps, les mêmes vins non traités ont souvent montré une croissance ou un maintien des populations contaminantes. L'efficacité et l'intérêt du chitosane pour lutter spécifiquement contre *Brettanomyces bruxellensis* dans les vins sont ainsi devenus évidents.

Détermination de la dose d'emploi du chitosane

Figure 2 : Essais sur vins contaminés naturellement en *Brettanomyces*.
Dénombrement sur milieu gélosé spécifique des *Brettanomyces bruxellensis* à T=0 et T=10 jours après traitement avec **NO BRETT INSIDE™** (chitosane pur) à différentes doses (source: laboratoire IOC Nuits-Saint-Georges)

Désignation vin	Population Brett à T0	Pop T10 Témoin	Pop T10 NBI 2 g/hL	Pop T10 NBI 4 g/hL	Pop T10 NBI 8 g/hL
Bourgogne Rouge 2010 a	1,13.10 ³	2,4.10 ⁵	1.10 ¹	absence	absence
Bourgogne Rouge 2010 b	4,8.10 ⁴	1,6.10 ⁶	1.10 ³	absence	absence
AOC Village 2010	1,5.10 ⁴	2,5.10 ⁵	absence	absence	absence
AOC Grand Cru 2010	1,0.10 ⁵	3,7.10 ³	1,9.10 ³	absence	absence

Bornet et al (2008) ont montré sur des expérimentations réalisées en laboratoire que des doses allant de 2 à 6 g/hL étaient généralement suffisantes pour détruire complètement la population de *Brettanomyces* (dénommée par PCR quantitative) d'un vin contaminé.

Des essais réalisés au laboratoire IOC Nuits-Saint-Georges, en Bourgogne, confirment et affinent cette observation; une dose de 4 g/hL de No Brett Inside™ (produit commercialisé de chitosane pur d'origine fongique) a suffi dans tous les cas à décontaminer totalement le vin en *Brettanomyces* dénombrées sur milieu gélosé spécifique (figure 2).

Les travaux réalisés au laboratoire de génie chimique de l'ENSIACET par Jentzer en 2011 ont permis d'aller un peu plus loin dans cette détermination de la dose efficace. Sur matrice-modèle synthétique contaminée en *Brettanomyces* à une concentration de $4 \cdot 10^6$ cellules/mL, les effets de différentes doses (4, 10 et 40 g/hL) de chitosane ont été comparés à un témoin non traité.

La méthode utilisée pour les dénombrements est ici la cytométrie en flux, qui présente l'intérêt de pouvoir compter et différencier des cellules *Brettanomyces* vivantes ou mortes : les levures défilent à grande vitesse dans le faisceau d'un laser et sont identifiées et caractérisées grâce à l'utilisation de composés fluorophores. Les cellules marquées en rouge sont vivantes, celles marquées en vert sont mortes.

Dans le cas des traitements au chitosane, cette technique a permis de mettre en évidence l'existence de cellules à la fois colorées en vert et en rouge. Ces populations de *Brettanomyces*, dites « sub-létales », correspondraient à des cellules mourantes dont l'intégrité membranaire aurait été altérée.

Si on étudie uniquement les numérations de cellules mortes, cette expérience a montré qu'en moins de 5 heures, on a une mortalité maximale des *Brettanomyces*, mais qui n'atteint que 60% (dose 4 g/hL) à 80% (dose 40 g/hL). Augmenter la dose ne permet pas d'obtenir le résultat plus rapidement.

En revanche, si on s'intéresse à la somme des cellules mortes et des cellules sub-létales, on peut voir que cette numération atteint quasiment 100% et ce, juste après ajout du chitosane, quelle que soit la dose.

Au vu de ces résultats, il semble que la dose classique de 4 g/hL soit le plus souvent nécessaire et suffisante pour atteindre le maximum d'efficacité en quelques heures.

Pour autant, se pose la question des populations sub-létales qui peuvent former une partie importante des levures atteintes par le chitosane. Ces cellules sont-elles destinées à mourir ou sont-elles capables de se multiplier? Sont-elles encore aptes à produire des phénols volatils?

Populations sub-létales et détection de « faux positifs »

Ces populations sub-létales de *Brettanomyces* posent déjà un problème analytique lorsqu'on effectue des contrôles par PCR quantitative. En effet, autant la technique de cytométrie en flux permet de visualiser cet état ambivalent des cellules, autant la PCR quantitative (qPCR), technique qui amplifie l'ADN, ne permet pas à ce jour de faire la différence entre cellules vivantes et cellules en état sub-létal. En effet, d'après Chatonnet (2012), il s'écoule quelques jours à quelques semaines entre la mort, puis la perte d'intégrité d'une cellule, et la disparition totale de l'ADN amplifiable. Ainsi, on peut noter dans de nombreux cas la présence de cellules faux positifs, c'est-à-dire détectées vivantes alors qu'elles sont en état sub-létal, lorsqu'on réalise un contrôle par qPCR après un traitement au chitosane.

Dans le cas d'un contrôle par milieu gélosé sélectif, on a souvent conseillé d'attendre 10 jours après le soutirage du chitosane (lequel intervient 10 jours après l'incorporation homogène du produit dans le vin) pour réaliser le prélèvement et l'étalement. Dans le cas d'un contrôle par qPCR, il s'avère que bien souvent ces 10 jours sont loin d'être suffisants.

En effet, de nombreuses expérimentations de traitement avec No Brett Inside™ suivi d'un contrôle par qPCR ont été réalisées en Bourgogne, en Gironde et en Espagne (figure 3). On voit d'emblée sur ces suivis que ce n'est qu'au bout de 30 jours voire davantage, que certaines populations détectées comme vivantes finissent par ne plus être détectées comme telles.

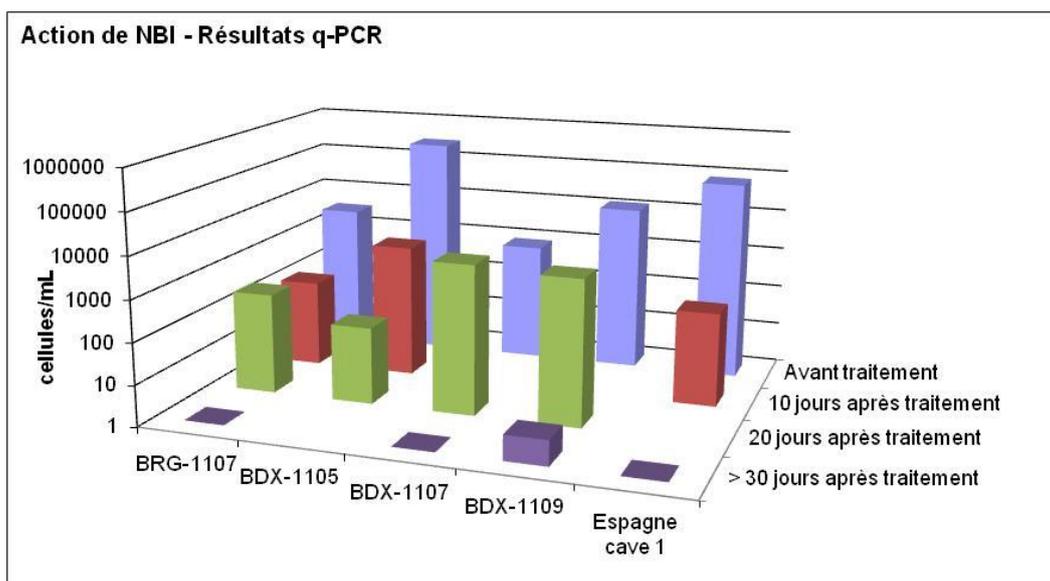


Figure 3 : Suivis de population Brettanomyces après traitement au No Brett Inside : mise en évidence des populations sub-létales détectées en qPCR.

D'autres suivis post-traitement au chitosane ont permis de comparer les résultats de dénombrement issus de différentes méthodes (figure 4) : on remarque que les populations détectées par qPCR restent très élevées au bout de 40 jours voire même de 60 jours alors que les numérations sur milieux gélosés sélectifs ne font apparaître aucune *Brettanomyces* et que les dénombrements par épifluorescence montrent que ces mêmes niveaux de populations correspondent à des cellules mortes.

		Dénombrement par PCR quantitative (UFC/ml)	Dénombrement sur milieu sélectif (UFC/ml)	Epifluorescence (UFC/ml)
Bordeaux Cave 1 (ref: BDX-1111)	Avant traitement	> 20 000	/	/
	60 jours après traitement	1.1 10 ⁶	<10	1.1 10 ⁶ cellules mortes
Bordeaux Cave 2 (ref: BDX-1108)	Avant traitement	1.8 10 ⁶	/	/
	40 jours après traitement	1.5 10 ⁶	< 10	5.7 10 ⁵ cellules mortes

Figure 4 : Comparaison des suivis de populations après traitement au chitosane en qPCR, milieu gélosé sélectif ou microscopie par épifluorescence

Nous avons mené d'autres expériences pour mieux analyser ce biais induit par la présence des cellules en état sub-létal et l'utilisation de la qPCR pour contrôler l'efficacité du traitement au chitosane.

Sur une exploitation viticole de Gironde, nous avons ainsi suivi sur plusieurs mois 2 caves contaminées par *Brettanomyces* et traitées au chitosane à 4 g/hL (figure 5). Les résultats obtenus montrent, encore une fois, des populations détectées très élevées même deux mois après le

traitement au chitosane. Par ailleurs, les populations détectées connaissent des variations importantes en « dents de scie » qui nous ont interpellés. Nous avons donc, 45 jours après le traitement, envoyé les mêmes échantillons de vin pour dénombrement par qPCR dans un second laboratoire indépendant. La technique utilisée par ce second laboratoire a donné des résultats beaucoup plus réguliers et surtout détecté des niveaux de populations considérées comme vivantes beaucoup plus faibles. Les faux-positifs détectés semblent donc varier suivant la technique de qPCR utilisée. Au final, ces populations ont fini par ne plus être détectées.

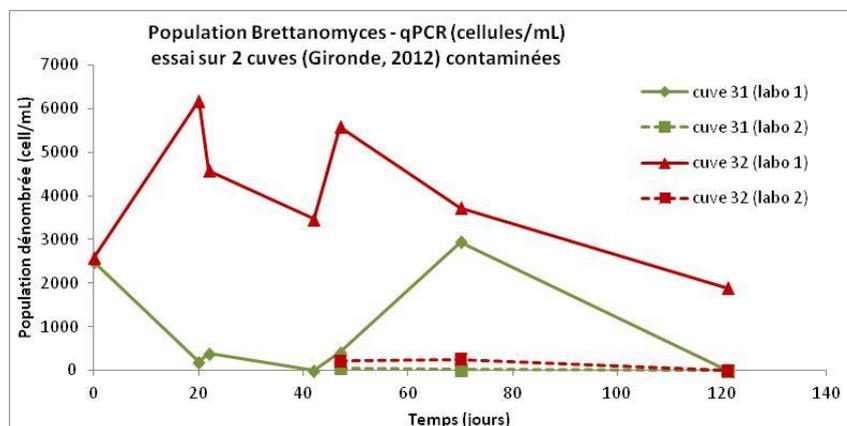


Figure 5 : Suivi sur le long terme de populations de Brettanomyces en q-PCR après traitement au chitosane : mise en évidence de faux-positifs.

Cependant, on peut s'interroger sur la capacité qu'auraient ces populations sub-létales à produire des phénols volatils. Nous avons donc, sur ces deux mêmes cuvées, réalisé un suivi des concentrations en éthyl-4-phénol et éthyl-4-guaiacol (figure 6). Les teneurs mesurées en fin de suivi sont identiques aux teneurs initiales avant traitement au chitosane : ces populations sub-létales n'ont donc pas produit de phénols volatils. Ce résultat est confirmé par une expérimentation menée en Espagne (données non présentées ici).

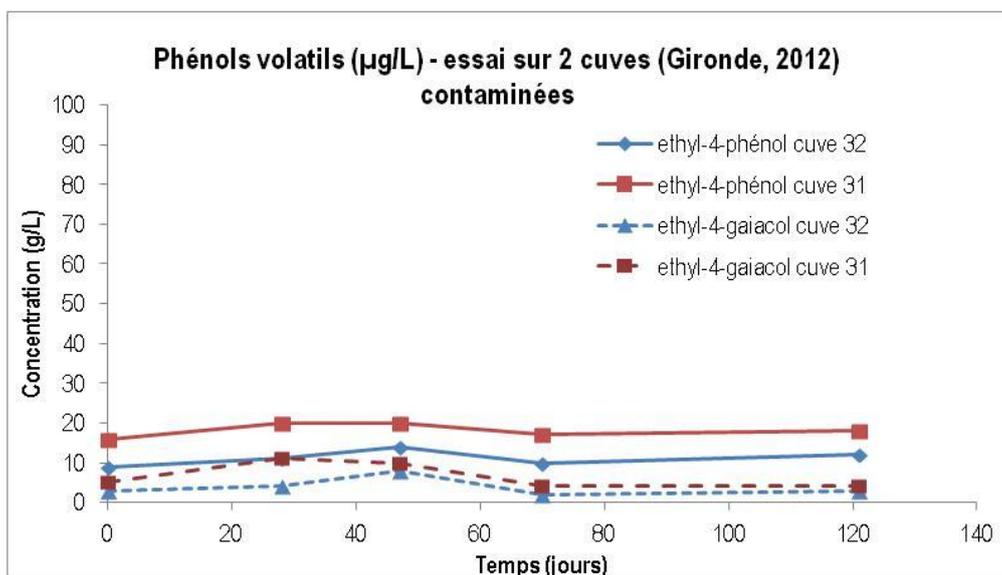


Figure 6 : Suivi sur le long terme des productions de phénols volatils après traitement au chitosane, en présence de faux positifs : mise en évidence d'une absence de production

Il faut retenir trois enseignements de ces différentes expérimentations :

- 1) La détection des populations sub-létales dépend fortement de la méthode d'analyse employée

- 2) Un délai parfois long est nécessaire pour ne plus détecter du tout ces populations, dont l'existence n'est cependant pas systématique
- 3) Ces populations ne représentent plus de risque pour la qualité du vin et elles finissent toujours par mourir.

Comment le chitosane agit-il?

La littérature scientifique (Kong et al., 2010; Eaton et al., 2008; Zakrzewska et al., 2005, Sudarshan et al., 1992; Savard et al., 2002; Rabea et al., 2003; Zivanovic et al., 2004) abonde pour nous donner des hypothèses sur les différentes interactions possibles entre *Brettanomyces* et le chitosane, et plus généralement sur le rôle antimicrobien de ce polymère :

- 1) Le chitosane, de par sa nature cationique, interagirait avec la paroi cellulaire des micro-organismes (interactions électrostatiques)
- 2) Le chitosane pourrait chélater des ions métalliques nécessaires à la croissance microbienne
- 3) Le chitosane pourrait former une liaison spécifique avec les macromolécules du micro-organisme (protéines, électrolytes, ADN...)

Ceci a conduit Jentzer (2011) à formuler l'hypothèse de travail suivante : il y aurait existence d'interactions électrostatiques formées entre le chitosane et la paroi cellulaire des micro-organismes ainsi que des phénomènes d'adsorption entraînant la mort des levures.

Différentes observations permettent d'étayer cette hypothèse. Blateyron-Pic et al. (2012) ont visualisé par microscopie classique et électronique à balayage des cellules avant et après traitement au chitosane. Ces observations mettent en évidence l'action physique du chitosane : les cellules de *Brettanomyces* sont adsorbées et s'agglomèrent autour des particules de chitosane. Elles peuvent être alors entraînées par celui-ci puis éliminées par soutirage.

Toutefois, ces interactions semblent aller plus loin qu'un simple collage des *Brettanomyces* par le chitosane. En effet, ces mêmes auteurs ont réalisé un suivi par ATPmétrie d'une matrice synthétique contaminée par *Brettanomyces* (à la teneur de 18.10^6 cellules/mL) puis traitée au chitosane (10 g/hL) en comparaison de la même matrice contaminée mais non traitée. Ces mesures de relargage d'ATP intracellulaire ont été réalisées durant 2 heures et montrent que la présence de chitosane engendre une libération de l'ATP dans le milieu. Ce phénomène traduit une forte perturbation de la perméabilité membranaire des *Brettanomyces*, très probablement corrélée à la mortalité des *Brettanomyces* observée.

Lequel des deux effets du chitosane, biologique ou chimique, est-il le plus important vis-à-vis de l'élimination de *Brettanomyces* ? D'autres techniques de collage existent et pourraient en effet se montrer suffisamment efficaces pour éliminer les populations de *Brettanomyces* si tel était l'effet principal du chitosane.

Pour répondre à cette question, nous avons effectué une expérimentation en laboratoire. Nous avons en effet comparé un vin témoin naturellement contaminé en *Brettanomyces* au même vin traité avec No Brett Inside™ à 4 g/hL et également au même vin traité uniquement avec deux gélatines (A et B) recommandées sur le terrain pour lutter contre *Brettanomyces*, aux doses prescrites dans ces cas-là. 65 jours après traitement, des qPCR ont été réalisés et précisent nettement la différence entre un traitement au chitosane et un traitement à la gélatine (figure 7).

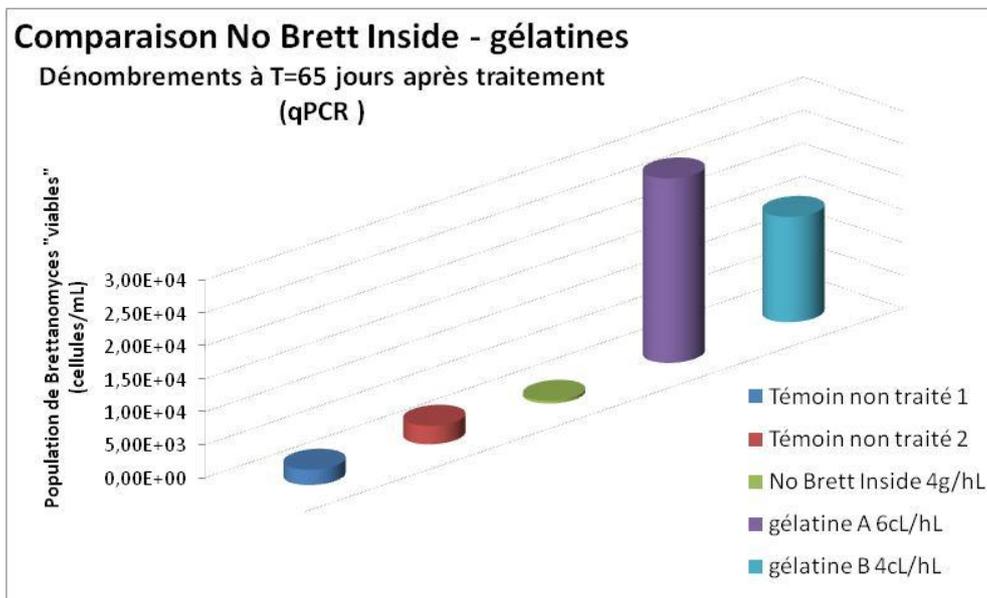


Figure 7 : Mise en évidence de l'effet combiné biologique + physique du chitosane en comparaison avec le seul effet de collage, ici représenté par l'utilisation de gélatine

En effet, on peut noter que si la population de *Brettanomyces* a chuté dans le vin témoin, cette diminution est plus importante avec l'utilisation de No Brett Inside™, alors qu'au contraire, les traitements à la gélatine ont causé, après une phase d'élimination partielle de la population contaminante, une recroissance très importante de celle-ci. Il ne s'agit pas de faux-positifs : le suivi des concentrations en phénols volatils montre que ces populations ont produit des phénols volatils, production qui s'est très peu manifestée dans un témoin, et absolument pas dans la modalité No Brett Inside (figure 8).

On retiendra de ces expérimentations que c'est bel et bien l'effet combiné des actions physiques et biologiques du chitosane sur *Brettanomyces* qui en assure l'efficacité.

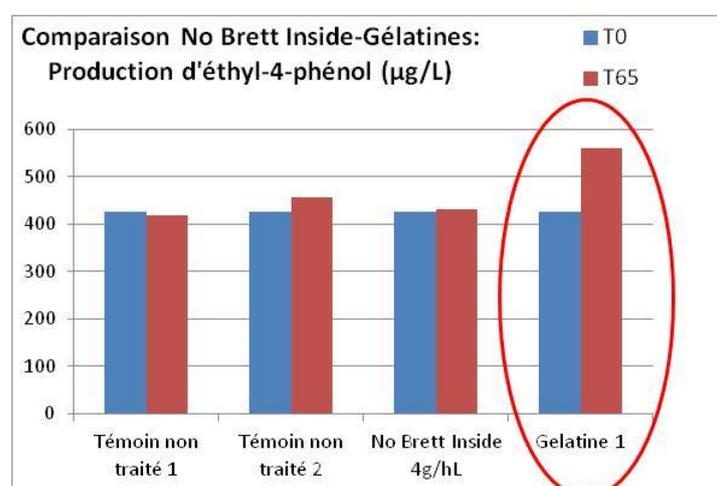


Figure 8 : Mise en évidence de l'absence de production de phénols volatils après traitement au chitosane et de la production de phénols volatils après collage à la gélatine

De cette connaissance découle le protocole recommandé pour l'emploi du chitosane. Liée à un contact intime entre le polymère cationique et les cellules de *Brettanomyces*, son efficacité repose sur une incorporation homogène dans le vin, qui commence par une remise en suspension du produit dans de l'eau ou du vin, puis son ajout dans la cuve lors d'un remontage du volume total de liquide à traiter. On évitera les raccords de collage qui en certaines occasions ont nuit à l'efficacité du traitement. Dans le cas d'utilisation sur vin en barrique, veiller à un bâtonnage sans incorporation démesurée d'oxygène. Si un volume de vin doit être sorti du contenant pour permettre le traitement par remontage sans débordement, ce volume, toujours contaminé, doit

également être traité avant réintégration dans la cuve. On attend ensuite une dizaine de jours puis on soutire le vin pour le séparer du chitosane et des *Brettanomyces* qui s'y seront adsorbés.

Perspectives : le chitosane durant l'élevage

Cette meilleure compréhension du mode d'action du chitosane ouvre de nouveaux horizons à explorer. Notamment, lors d'élevages longs, on peut s'intéresser à une durée de contact plus longue du chitosane, sans soutirage du vin 10 jours après incorporation. Les avantages seraient doubles :

- plutôt que de réaliser un soutirage non désiré, on peut profiter d'un soutirage classiquement réalisé pour éliminer le produit.
- surtout, on peut imaginer protéger le vin d'une éventuelle recontamination par *Brettanomyces*.

Une expérience a été réalisée en Italie (Sieczkowski et Nardi, 2012) pour éprouver ces hypothèses et optimiser la mise en œuvre du chitosane dans cette optique.

Un vin de merlot et un vin de sangiovese ont été inoculés en *Brettanomyces* (10^3 cellules/mL) et séparés chacun en 3 modalités :

- un témoin non traité, bâtonné 1 fois par semaine
- deux modalités traitées avec No Brett Inside™ (4 g/hL), sans soutirage du vin : l'une est bâtonnée 1 fois par semaine, l'autre est laissée sans bâtonnage.

L'expérimentation, sur chaque essai, est suivie durant 6 mois. Les vins ont tous été réajustés en SO₂ après 200 jours.

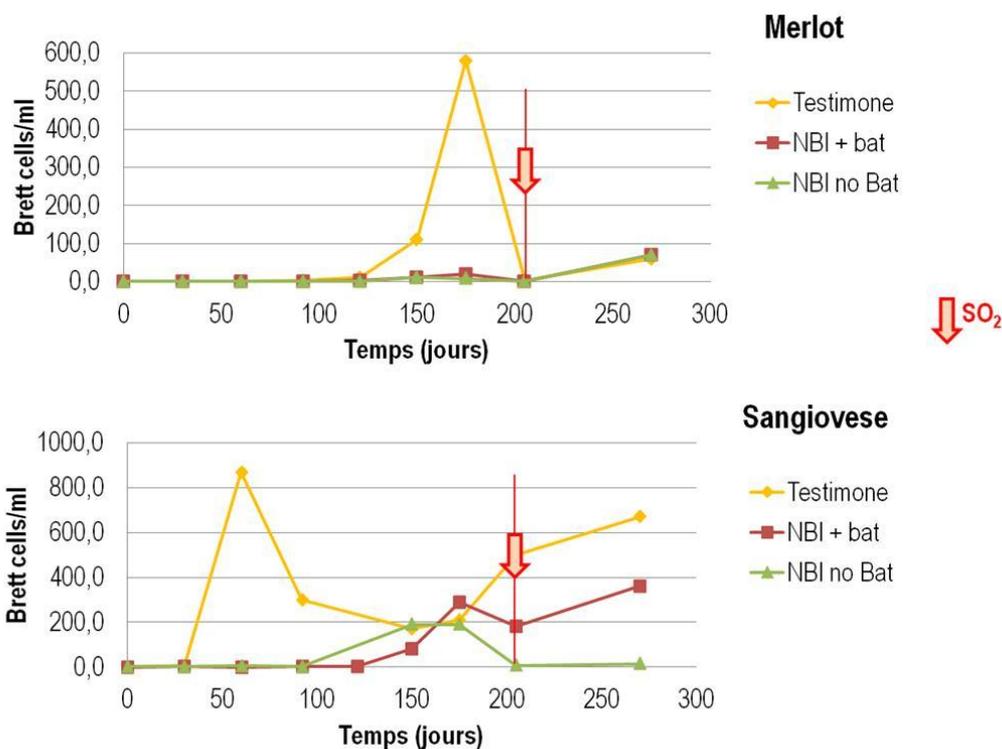


Figure 9 : Expérimentation de contact prolongé entre le vin et le chitosane, avec ou sans bâtonnage : impact sur la protection du vin contre *Brettanomyces*

Les résultats (figure 9) semblent montrer l'intérêt d'une mise en contact prolongée du chitosane pendant l'élevage. Cependant, c'est la modalité non bâtonnée qui paraît la plus efficace dans le cas du sangiovese alors qu'elle ne favorise pas un contact répété du produit avec les levures. Ces essais ne permettent pas de conclure de manière certaine, mais on peut imaginer deux explications :

- le bâtonnage a favorisé la reprise de croissance de *Brettanomyces* (remise en suspension des lies, incorporation d'oxygène...)

- le bâtonnage a entraîné un biais dans l'estimation de la concentration en *Brettanomyces* dans les vins, par remise en suspension et homogénéisation des cellules.

Il faut noter également le rôle important du SO₂, outil de contrôle qui reste ici nécessaire et entre en synergie avec l'action du chitosane.

D'autres expérimentations visant à préciser ces conclusions et à les compléter sont en cours.

Conclusions

Au travers des expérimentations réalisées par différentes équipes et en interne dans nos laboratoires ou sur le terrain, nous pouvons affirmer que le chitosane pur d'origine fongique représente un intérêt certain pour lutter contre les contaminations en *Brettanomyces*.

Son incorporation homogène dans le vin à traiter, garante de son efficacité, permet d'annihiler complètement ou dans certains cas de réduire très fortement les populations contaminantes.

On prendra soin de s'assurer d'un protocole de contrôle adapté à ces traitements, en considérant l'existence de populations sub-létales et de détection de faux-positifs par certaines méthodes de numération.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont permis d'éclaircir le mode d'action du chitosane vis-à-vis de *Brettanomyces*, tout en mettant en évidence sa rapidité d'action, tant sur la décroissance de population que sur la prévention de l'apparition des phénols volatils. Ainsi, le contrôle par suivi des teneurs en éthylphénols reste une assurance complémentaire pour valider la bonne mise en œuvre du traitement.

Non allergène, d'origine naturelle et sans impact négatif sur la qualité sensorielle des vins, le chitosane d'origine fongique apparaît comme un outil novateur et unique pour éviter les dépréciations engendrées par *Brettanomyces bruxellensis*.

Références bibliographiques :

Blateyron-Pic L. and al. 2011 : Chitosane : un nouvel outil pour lutter contre *Brettanomyces* et préserver les qualités aromatiques des vins. *Le IXème symposium international d'oenologie, 15-17 juin, Bordeaux, France*

Blateyron-Pic L., Bornet A., Brandam C., Jentzer J.B. Granes D., Heras J.M., Joannis-Cassan C., Pillet O., Sieczkowski N., Taillandier, P. 2012: Le chitosane d'origine fongique : un nouvel outil de choix pour lutter contre *Brettanomyces* dans les vins. *Revue des œnologues*. 143 : 27-28

Bornet A., Teisseidre P.L. 2008. Elimination des goûts terreux (la géosmine) et des *Brettanomyces* par l'utilisation d'un biopolymère fongique : le chitosane. *OIV Proceedings*

Chatonnet P. 2012 : *Brettanomyces*, mythes et réalités. *Revue des œnologues*. 144 : 42-48

Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Malcata FX. 2008. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy* 108:1128–34

Gomez-Rivas L, Escudero-Abarca B, Aguilar-Uscanga MG, Hayward-Jones PM, Mendoza P, Ramirez M. 2004. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31:16–22

Jentzer J.B. 2011: Effet anti-*Brettanomyces* du chitosane en vinification. Présentation de soutenance de stage, 14 septembre 2011, Toulouse, France.

Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144:51–63

Kumar MNVR. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 46:1–27

Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4:1457–65

Savard T, Beaulieu C, Coucher I, Champagne CP. 2002. Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. *J. Food. Protect.* 65:828–33

Sieczkowski N., Nardi T. 2013: Chitosan of fungal origin for anti-microbial applications - R&D and application results. Présentation interne, Lisbonne, Portugal.

Sudarshan NR, Hoover D, Knorr D. 1992. Antibacterial action of chitosan. *Food. Biotechnol.* 6:257–72

Zakrzewska A, Boorsma A, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM. 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot. Cell* 4:703–15

Zivanovic S, Basurto CC, Chi S, Davidson PM, Weiss J. 2004. Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions. *J. Food. Prot.* 67:952–59

Zuehlke J.M., Petrova B., Edwards C.G. 2013: Advances in the Control of Wine Spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4:4.1–4.22

Proportion et évolution des vins phénolés commercialisés : les chiffres des observatoires interprofessionnels

Bertrand CHATELET¹, Dominique MELUC²

¹ IFV, SICAREX Beaujolais, 210 Bd Vermorel BP 320 69661 Villefranche s/Saône - bertrand.chatelet@vignevin.com

² BIVB, 520 avenue de Lattre de Tassigny - 71000 MACON – dominique.meluc@bivb.com

INTRODUCTION

« Brett », « sueur de cheval », « cuir », « encre », « gouache »... le problème des déviations organoleptiques des vins de type phénolé est depuis quelques années clairement identifié (Chatonnet et al., 1992). Liés au développement des levures *Brettanomyces*, des composés comme certains phénols volatils (éthyl-4phénol et éthyl-4 gaïacol notamment) expliquent ce défaut sensoriel.

Dans plusieurs régions viticoles, les interprofessions s'appuient sur le Suivi Aval Qualité (SAQ) afin d'acquérir des références sur ce problème majeur pour piloter leurs actions d'expérimentation et de développement.

Le Suivi Aval de la Qualité, qui fait partie des missions des interprofessions, permet de contrôler les produits sur les circuits de distribution, donc au plus près du consommateur. Les vins peuvent être prélevés en France (grande distribution, caviste, vente directe,...) ou sur les marchés export. Ils sont ensuite dégustés par des jurys de professionnels de la région de production pour apprécier leur niveau qualitatif et qualifier les éventuels défauts rencontrés.

Pour compléter ces informations, des observatoires ponctuels de type cartographiques peuvent aussi être mis en place.

Les observations portent sur :

- l'estimation de la part des vins phénolés et leur évolution par rapport aux autres défauts au cours du temps,
- la détermination des concentrations en phénols volatils des vins jugés « phénolés » afin de mettre en relation la perception sensorielle de cette déviation et les marqueurs analytiques identifiés.

Cet article se propose de faire le constat objectif sur les données acquises dans le cadre de ces observatoires sur des vins commerciaux. Les résultats présentés sont principalement issus du BIVB et d'Inter Beaujolais (à travers plusieurs milliers de vins dégustés) et complétés par ceux d'Inter Rhône et d'Inter Loire.

1 PART DES VINS PHENOLES PARMIS LES DEFAUTS RENCONTRES

Les défauts rencontrés sur les vins rouges jugés « Non Conformés » (NC) dans les SAQ, c'est-à-dire présentant un défaut majeur, peuvent être regroupés en 5 familles (cf. tableau 1). Parmi celles-ci, les vins phénolés représentent une part importante des défauts. Pour les vins NC du SAQ bourguignon (de 2006 à 2013), le caractère phénolé est cité dans 39% des cas, mais peut-être ou non associé à d'autres défauts. Pour le Beaujolais (21%) ou le Val de Loire (34%), il s'agit du défaut principal identifié entraînant la non-conformité.

Les phénols volatils sont le 3^{ème} défaut cité sur les vins de Bourgogne « Non Conformés » lors des dégustations SAQ, sur vins rouges. Cette importance correspond d'une part à une réelle

présence de phénols volatils, mais aussi à des confusions faites par les dégustateurs entre phénols et d'autres faux goûts tels que la réduction. Ce constat est aussi fait en Val de Loire.

Tableau 1. Répartition des types défauts rencontrés sur vins rouges « Non Conformes » dans les SAQ de différentes régions (2008 à 2012). Part des vins phénolés.

	bouchonné	défauts de structure	oxydation	autres défauts ^{iv}	phénolé
BIVBⁱ	29 %	44 %	31 %	42 %	39 %
Inter Beaujolaisⁱⁱ	24 %	5 %	27 %	23 %	21 %
Inter Loireⁱⁱⁱ					34 %

i : Nombre moyen de défaut cité par vin = 2

ii : Défaut principal du vin non conforme

iii : Données issus d'un prélèvement en 2011 mais comprenant plusieurs millésimes

iv : Acescent, réduit, herbacé...etc

2 CARACTERISATION DES VINS ROUGES JUGES PHENOLES

Le seuil de perception moyen dans les vins rouges est de l'ordre de 450 µg/L pour les éthyl-phénols. Cette valeur dépend fortement de la matrice mais aussi du dégustateur (Tempère et al., 2013). Parmi les vins jugés phénolés, 45 à 67% des vins ont des teneurs en éthyl-phénols (éthyl-4-phénol et éthyl-4-gaïacol) inférieur à 450 µg/L (cf Tableau 2).. Dans 3 à 4 cas sur 10, cette valeur est même inférieure à 200 µg/L.

Tableau 2. Répartition des vins rouges jugés phénolés dans le cadre des SAQ de différentes régions selon leur concentration en phénols volatils (éthyl-4-phénol +éthyl-4-gaïacol).

Concentration en éthyl-phénols	Vins du Beaujolais	Vins de Bourgogne	Vins de la Vallée du Rhône
inférieures à 200 µg/L	28 %	42 %	46 %
de 200 à 449 µg/L	17 %	25 %	12 %
supérieures ou égales à 450 µg/L	55 %	33 %	42 %

Une étude sur les seuils de perception des éthyl-phénols sur les vins de Pinot Noir de Bourgogne, menée par le BIVB en partenariat avec le CESEO de Dijon, confirme que les éthyl-phénols modifient la perception sensorielle des vins de Pinot Noir à partir d'une teneur de 200 µg/L.

Sur les vins de Gamay du Beaujolais, des analyses réalisées sur des vins n'ayant pas été jugés phénolés montrent des teneurs faibles en éthyl-phénols (47 µg/L en moyenne) et toujours inférieures à celles des vins jugés phénolés (cf. figure 1). Ces déviations concernent l'ensemble des vins du Beaujolais, des vins nouveaux, aux crus sans distinction.

Le rapport entre éthyl-4-phénol et éthyl-4-gaïacol peut aussi impacter le profil du caractère phénolé. L'éthyl-4-phénol est décrit comme « cuir », « sueur de cheval » et l'éthyl-4-gaïacol plutôt « épice », « clou de girofle ». La présence d'éthyl-4-gaïacol tend à abaisser le seuil de perception du caractère phénolé dans les vins. Si dans la littérature, les proportions entre

l'éthyl-4-phénol et l'éthyl-4-gaïacol sont données dans un rapport 10:1, notamment pour les cépages bordelais, il semble que pour le Gamay et le Pinot, ce rapport soit différent et de l'ordre de 4:1.

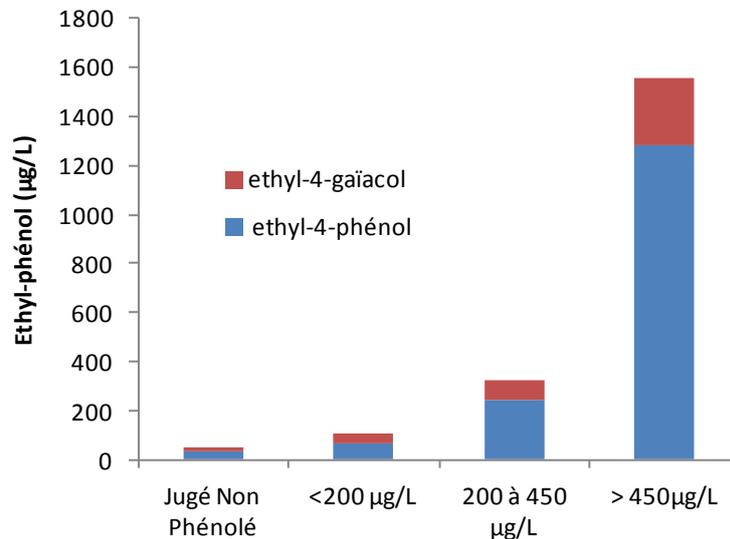


Figure 1. Teneur moyenne en éthyl-4-phénol et éthyl-4-gaïacol pour les vins du Beaujolais selon le niveau de concentration (source Inter Beaujolais)

Concernant les vinyl-phénols, précurseurs des éthyl-phénols, des mesures ont été faites sur les vins de Bourgogne pour lesquels le caractère phénolé était cité. Les teneurs en vinyl-phénols sur vins rouges varient de « non quantifiables » à plus de 1500 µg/L, avec une moyenne inférieure à 100 µg/L. Les plus fortes teneurs en vinyl-phénols sont observées sur les vins présentant des teneurs en éthyl-phénols élevées.

3 EVOLUTION DU CARACTERE PHENOLES DES VINS ROUGES AU COURS DES PROGRAMMES SAQ

Grâce au nombre important d'échantillons prélevés au cours des programmes successifs des SAQ du BIVB et d'Inter Rhône, l'évolution des déviations phénolées peut être étudiée. La fréquence de citation du caractère phénolé semble se maintenir pour les vins de Bourgogne depuis 2009 (cf. Figure 2). Les années représentent ici la campagne de prélèvement et non pas le millésime. Lors d'une campagne de prélèvement plusieurs millésimes sont d'ailleurs prélevés (3 à 4 majoritairement).

Pour la Vallée du Rhône, la proportion de vins dont les teneurs sont supérieures ou égales à 450 µg/l restent aussi assez stables au cours de ces dernières années (cf. Figure 3).

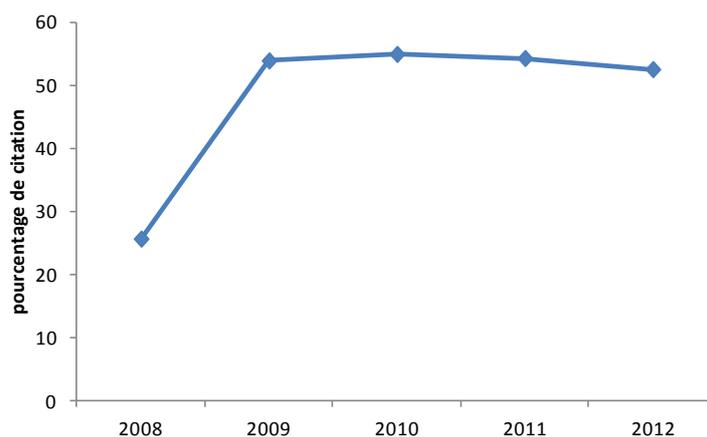


Figure 2. Evolution de la fréquence de citation du caractère phénolé pour les vins « Non Conformés » du SAQ de Bourgogne

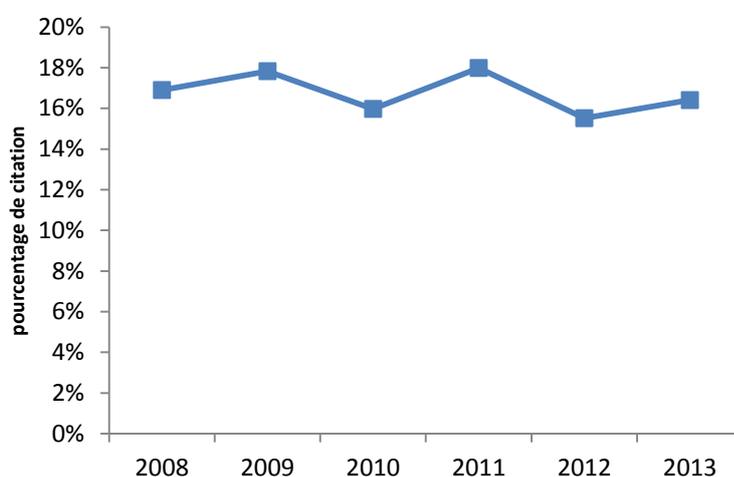


Figure 3. Evolution de la fréquence de citation du caractère phénolé (dont la teneur en éthyl-phénols est supérieure à 450 µg/L) pour les vins « Non Conformés » du SAQ d'Inter Rhône

4 CAS DES VINS BLANCS

Le caractère phénolé est parfois mentionné sur vins blancs. Ainsi des analyses ont aussi été réalisées sur blancs lors des programmes SAQ de Bourgogne. La répartition des teneurs en éthyl-phénols et vinyl-phénols est donnée par les figures 4 et 5.

Même si dans la grande majorité des cas les valeurs retrouvées sur blancs sont inférieures à celles des vins rouges (86 % des vins blancs <200µg/L contre 42 % des vins rouges), certains vins présentent des teneurs élevées en éthyl-phénols pouvant aller jusqu'à 950 µg/L. La même observation peut être faite pour les vinyl-phénols.

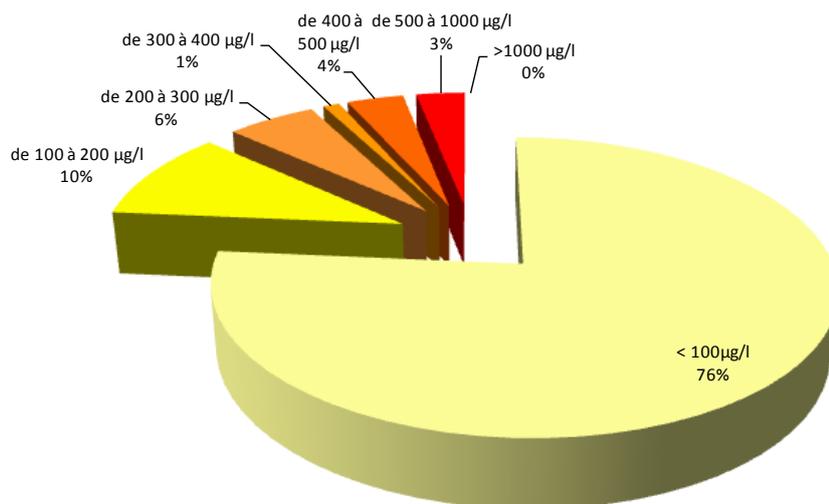


Figure 4. Répartition des teneurs en éthyl-4-phénol + éthyl-4-gaïacol pour les vins blancs de Bourgogne jugés phénolés. Source BIVB.

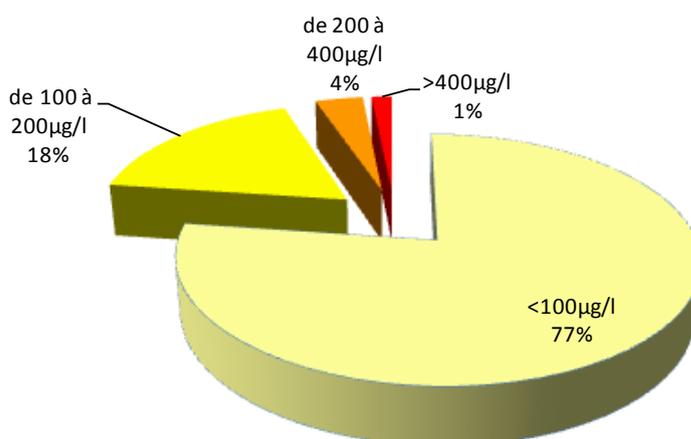


Figure 5. Répartition des teneurs en vinyl-4-phénol + vinyl-4-gaïacol pour les vins blancs de Bourgogne jugés phénolés. Source BIVB.

CONCLUSION

Les données sur les déviations phénolées des vins, et les teneurs en phénols volatils correspondantes, issues des observatoires interprofessionnels montrent qu'il s'agit d'un défaut majeur parmi ceux entraînant une perte de qualité (du même ordre que l'évolution oxydative ou les contaminations en chloroanisoles).

Si ce problème touche majoritairement les rouges, les vins blancs peuvent aussi être concernés.

La fréquence du caractère phénolé ne semble pas faiblir au cours de ces dernières années malgré une meilleure connaissance des origines et des facteurs de développement de *Brettanomyces*. La connaissance et la formation sensorielle des professionnels sur cette déviation d'une part et à l'inverse la confusion du caractère phénolé avec d'autres défauts

expliquent peut-être cet état de fait (Tempère et al., 2013). La part importante des valeurs basses des marqueurs analytiques le suggère.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brettanomyces et phénols volatils, prévenir et limiter les altérations, 2006, *Les cahiers itinéraires d'ITV France*, N°12, <http://www.vignevin.com/publications/collection-itineraires.html>

P. Chatonnet, D. Dubourdiou, JN. Boidron and M. Pons, 1992, The origin of ethylphenols in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 165–178.

S. Tempère, G. Sicard, E. Cuzange, G. de Revel, 2013, Perception du défaut phénolé : le problème du consensus, *Revue Française d'œnologie* N°261, 13-16.

Les déviations aromatiques du vin liées à *Brettanomyces*, Coffret pédagogique proposé par Inter Loire, contact : Charlotte Mandroux au 02 47 60 55 42 / c.mandroux@vinsdeloire.fr

TECHNOLOGIES DE MAÎTRISE DES *Brettanomyces sp.* ET DES PHÉNOLS VOLATILS

Fabrice Delaveau
MICHAEL PAETZOLD sarl – 3700 Avenue de Toulouse 33140 CADAUJAC- France
fdelaveau@michaelpaetzold.com

LA THERMOFLASH[®] : UNE TECHNOLOGIE DE MAITRISE DES *Brettanomyces sp.*

1. Historique

En 1999, la problématique et/ou la prise de conscience des développements microbiens non souhaités dans les vins grandissait. En tant que société au service des viticulteurs, nous nous sommes naturellement intéressés à cette problématique en essayant de lui apporter des solutions.

En tant que spécialiste de la filtration, nous aurions pu nous orienter vers des techniques de filtration mais nous avons estimé qu'il fallait exclusivement résoudre le problème microbiologique sans apporter dans le même temps la clarification, pas toujours souhaitée à certains moments de l'élevage du vin puisqu'elle peut être alors préjudiciable au produit.

Nous nous sommes alors orientés vers des technologies utilisées principalement dans l'agro-alimentaire mais peu utilisées en œnologie : les traitements thermiques.

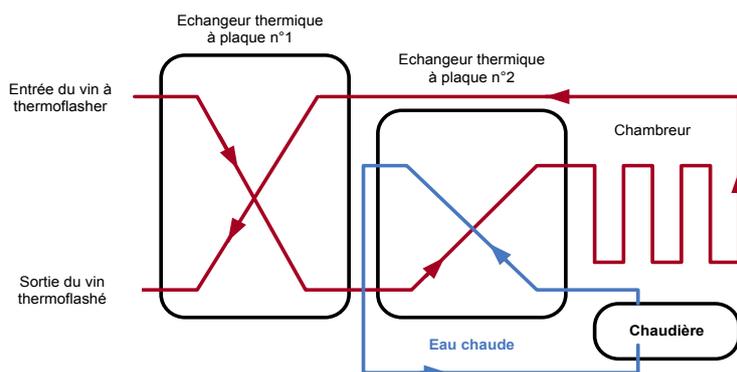
Nous avons testé la Pasteurisation « ordinaire » qui consiste à monter le vin à 60-65°C pendant une minute. Cette technique a été rejetée puisqu'elle fatigue le produit.

Nous avons ensuite testé la Thermolisation, ou mise en bouteille à chaud. Cette technique consiste à chauffer le vin entre 45 et 50°C et à le transférer à ces températures lors de la mise en bouteille. Ensuite, il y a une lente redescente en température du vin « chaud » en bouteille. Cette technique présente quelques avantages puisqu'elle assure la stérilisation de la bouteille et du bouchon, mais elle génère des phénol-oxydases et fatigue le vin avec la lente redescente en température. Cette technique est aussi très restrictive puisqu'elle n'est destinée qu'au vin au moment de la mise en bouteille.

Nous nous sommes alors orientés vers la Flash Pasteurisation. La Flash Pasteurisation consiste à monter très rapidement le vin à la température de Pasteurisation, puis de maintenir cette température durant un temps déterminé et ensuite de ramener le vin à la température initiale.

La Thermoflash[®] reprend ce principe général.

2. La Thermoflash® : schéma et description générale du fonctionnement



Le vin à thermoflasher traverse un échangeur à plaque, échange ses calories avec le vin sortant. Le vin circule ensuite à travers un deuxième échangeur à plaque ou circule à contre courant de l'eau chauffée par une chaudière. Une sonde de température mesure la température du vin en sortie du 2^{ème} échangeur afin de piloter une vanne 3 voies qui ajuste le volume d'eau chaude. Cette régulation permet d'amener le vin à la température de Thermoflash® souhaitée à $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$. Le vin traverse ensuite un chambreur (canalisation calorifugée) qui permet de maintenir parfaitement le vin à la température de traitement pendant 20 secondes. Il traverse ensuite le 2^{ème} échangeur pour échanger ses calories avec le vin entrant. L'augmentation de température de ce vin après traitement est d'environ 3 à 5°C par rapport à sa température initiale.

3. Les facteurs déterminants de la Thermoflash®

- Un barème temps-température approprié aux caractéristiques du produit à traiter :

Concrètement dans le vin, plus la turbidité est importante, plus les micro-organismes sont protégés de l'action de la chaleur. Il en est de même pour la concentration en sucre qui protège les micro-organismes. En revanche le phénomène est inversé avec l'augmentation de la concentration en alcool, les pH bas et la concentration en SO_2 libre actif.

A cela, il faut ajouter la capacité de chaque famille de micro-organismes à résister à la chaleur.

C'est pourquoi, nous avons développé nos propres barèmes de température et renommé ainsi la Flash Pasteurisation « Thermoflash® », qui est une adaptation de la Flash Pasteurisation aux problématiques viticoles.

La plage de traitement que nous avons choisi se situe entre 72 et 78°C, avec un temps de chambrage toujours égal à 20 secondes. Dans ce type de traitement, l'impact de la température est beaucoup plus important que l'impact temps.

La formule suivante permet de qualifier sur une souche définie le nombre d'unités de pasteurisation (U.P.) distribuées par un process :

$$\text{Nombre d'U.P.} = 10^{[(t^{\circ}(\text{C})-60)/Z]} \times \text{tps (min)}$$

Où Z caractérise la thermorésistance d'une souche. En général, on prend $Z=4,5$ ou 5 pour les levures du vin.

- Thermoflash® à 72 °C pendant 20 secondes : $\text{U.P.} = 10^{[(72-60)/4,5]} \times 0,33 = 153 \text{ U.P.}$
- Thermoflash® à 74 °C pendant 20 secondes : $\text{U.P.} = 10^{[(74-60)/4,5]} \times 0,33 = 426 \text{ U.P.}$
- Thermoflash® à 76 °C pendant 20 secondes : $\text{U.P.} = 10^{[(76-60)/4,5]} \times 0,33 = 1186 \text{ U.P.}$

On comprend ainsi l'importance de la température et la définition d'un barème.

- La précision de la température et du débit appliqués :

Les équipements de régulation de température et de débit doivent être extrêmement précis puisqu'ils sont le garant de la bonne qualité et ainsi de l'efficacité du traitement. Les équipements doivent donc être vérifiés et étalonnés régulièrement.

- L'homogénéité du traitement :

L'intégralité des volumes du vin doit être travaillée à la même température. C'est la raison pour laquelle les échangeurs à plaque sont souvent privilégiés aux échangeurs tubulaires avec lesquels il est difficile de traiter le centre du tube sans sur-traiter le vin à la surface.

- La méthodologie de travail :

Compte tenu de son process qui oblige à travailler en continu pour échanger les calories, il faut que la préparation du traitement soit parfaite, la cuve de réception prête et désinfectée, la longueur de tuyau définie au préalable et désinfectée, l'enchaînement des différents lots prévus à l'avance etc...

- La gestion de l'oxygène dissous :

Comme l'ensemble des traitements physiques du vin, l'oxygène dissous doit être maîtrisé. D'autant plus sur un traitement qui élève quelque peu la température et qui ainsi va permettre une consommation plus rapide de l'oxygène dissous au préalable. Il faut donc gérer, en amont et en aval de l'équipement l'oxygène dissous ; il faut tendre vers 0 apport d'oxygène dissous.

4. Le mode d'action de la chaleur sur les micro-organismes :

Chaque famille de micro-organismes a sa propre capacité à résister à la chaleur. En pratique, aux faibles températures, toute augmentation de température provoque une accélération de la croissance. Mais au-delà d'une certaine température, le résultat est inversé, toute augmentation de la température ralentit la cellule qui peut devenir létale.

« Les systèmes enzymatiques sont activés par la température jusqu'à un optimum au-delà duquel les protéines sont détériorées. Une température excessive inhibe, puis arrête, toute activité de transport de substrats et de transformation. En outre, les membranes cellulaires sont excessivement sensibles à l'action de la chaleur ; qu'il s'agisse de membranes cytoplasmiques de levures ou de bactéries, ou des membranes mitochondriales des levures, leur composition étant grossièrement identique. Deux couches de lipides renferment un ensemble complexe de protéines garantissant, pour les membranes plasmiques, une barrière isolant l'intérieur de la cellule du milieu environnant. Des fonctions vitales sont associées aux membranes (transporteurs, systèmes respiratoires, synthèse d'ATP, etc.). La fluidité membranaire est assurée par une composition bien ajustée de lipides à acide gras plus ou moins saturés, de lipides neutres et de protéines. L'augmentation de la température augmente la fluidité, modifie les interactions protéines-lipides et en conséquence change les propriétés biologiques de la membrane. Toutes les cellules disposent d'une certaine capacité d'adaptation et arrivent à réguler la composition de la membrane pour résister à l'agression. Mais si la température augmente trop vite à une valeur excessive et est maintenue, les membranes finissent par se détériorer complètement. La cellule privée de cette barrière et des activités associées meurt. »¹

¹ Lonvaud-Funel A., 1998, Principe de la stabilisation microbiologique des vins par la chaleur. Traitements physiques des moûts et des vins. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. Hors série, 147-153.

5. La Thermoflash® et les *Brettanomyces sp.*

Les *Brettanomyces sp.*, au même titre que les autres levures, sont sensibles à la température. Ainsi, un barème de 72 ou 74°C pendant 20 secondes suffit à descendre en dessous d'1 UFC/10 ml quel que soit le moment de l'attaque : de la fin de la vinification à la mise en bouteille.

Le tableau suivant présente l'impact de la Thermoflash® sur la population de *Brettanomyces sp.* viables, cultivables : culture sur milieu gélosé spécifique *Brettanomyces sp.* avec 7 jours d'incubation

<i>Brettanomyces sp.</i>					
Vin initial	2,8. 10 ⁴ UFC/ml	5,7. 10 ⁵ UFC/ml	7. 10 ³ UFC/ml	6,2 10 ⁶ UFC/ml	3,5 10 ⁶ UFC/ml
Vin thermoflashé	<1 UFC/10ml	<1 UFC/10ml	<1 UFC/10ml	<1 UFC/10ml	<1 UFC/10ml

Le gros atout des traitements physiques du vin, en particulier la Thermoflash®, c'est leur niveau de garantie d'efficacité du traitement pour être inférieure à 1 UFC/ml (99 %) et cela, quelque soit la population de départ des *Brettanomyces sp.*, contrairement à certains traitements œnologiques qui sont beaucoup plus dépendants de la composition du vin et de leur mise en œuvre.

6. Action de la Thermoflash® sur le vin

1- Analyses classiques

Analyses physico-chimiques	Pinot (lot 1)		Pinot (lot 2)		Gamay		Syrah (lot 1)		Syrah (lot 2)	
	Avant Thermoflash®	Après Thermoflash®								
TAV (% vol.)	12,65	12,75	12,65	12,65	12,60	12,60	12,95	12,90	12,70	12,65
AV (g/L acide sulfurique)	0,37	0,36	0,35	0,35	0,24	0,24	0,39	0,39	0,41	0,40
AT (g/L acide sulfurique)	5,30	5,30	5,25	5,25	4,75	4,75	3,35	3,35	3,10	3,10
pH	3,29	3,29	3,34	3,34	3,57	3,57	3,78	3,77	3,89	3,89
SO2 Libre (mg/L)	9	10	8	8	11	11	33	32	35	35
SO2 Total (mg/L)	15	16	15	15	19	19	58	57	79	75
DO280	55,0	56,0	47,0	47,0	77,0	78,0	61,0	62,0	57,0	57,0

2- Analyses spécifiques à la couleur

Analyses physico-chimiques	Pinot Noir		Gamay	
	Avant Thermoflash®	Après Thermoflash®	Avant Thermoflash®	Après Thermoflash®
IPT	54	51	41	42
DO420	1,734	1,723	1,843	1,842
DO520	1,972	1,960	2,253	2,260
DO620	0,442	0,436	0,500	0,500
Nuance	0,88	0,88	0,82	0,82

La Thermoflash® n'a pas d'incidence sur les « composants classiques » du vin ainsi que sur la couleur, à condition de maîtriser parfaitement l'oxygène dissous lors du traitement.

A contrario, la Thermoflash® crée comme tous les traitements thermiques des colloïdes protecteurs qui peuvent rendre les collages ou les sédimentations de particules plus délicates. Ils peuvent même parfois inhiber la cristallisation de bitartrate de potassium. La Thermoflash® peut aussi diminuer l'instabilité protéique. Mais en aucun cas, on ne peut garantir une stabilité tannique et protéique avec ce procédé.

7. Action de la Thermoflash[®] sur les éthyls-phénols :

Analyses physico-chimiques	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
	Avant Thermoflash [®]	10 jours après Thermoflash [®]	Avant Thermoflash [®]	10 jours après Thermoflash [®]	Avant Thermoflash [®]	10 jours après Thermoflash [®]
Ethyl-4-phénol [E4P]	353	333	623	600	123	156
Ethyl-4-gaïacol [E4G]	167	165	254	216	59	65
Ethyl phénols [E4P] + [E4G]	520	498	877	816	182	221

La Thermoflash[®] ne permet pas de diminuer les concentrations en éthyls-phénols. Nous n'observons pas non plus d'augmentation de ces éthyls-phénols à T + 10 jours de traitement et cela sur les 3 lots traités qui avaient une population de départ en *Brettanomyces sp.* différente.

PROCEDE DE DIMINUTION DES ETHYLS PHENOLS

1. Introduction et historique

Aucune des régions productrices de vins rouges n'est épargnée par le problème des éthyls-phénols. Cette problématique est en constante évolution puisqu'elle découle en partie de l'évolution des modes de vinification avec la vendange de raisins de plus en plus murs, des pH plus élevés, le changement climatique qui rendent le développement de *Brettanomyces sp.* plus facile et, par conséquent, la production d'éthyls-phénols extrêmement difficile à maîtriser. De plus en plus de vinificateurs sont confrontés à ce problème et/ou le seront à l'avenir.

On ne peut pas aujourd'hui considérer que la production d'éthyls-phénols est seulement engendrée par une œnologie médiocre. Une étude à la Faculté d'Œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, réalisée par V. Renouf, doctorant dans le laboratoire de Mme Prof Aline Lonvaud, a démontré en 2006 que les levures *Brettanomyces sp.* sont déjà présentes sur le raisin (Renouf et al., 2006). Ces mêmes levures se multiplient plus facilement lors du développement d'*Oenococcus Oeni* et lors de la consommation effective d'acide malique (Renouf et al., 2006), c'est-à-dire pendant la fermentation malolactique.

Certains millésimes, comme par exemple le millésime 2005, ont eu des fermentations alcooliques et malolactiques particulièrement languissantes. De ce fait, malgré un sulfitage correct de la vendange (5 à 6 g/hl), il n'était pas surprenant d'être confronté à des lots de vins nettement marqués par l'odeur animale des éthyls-phénols (niveaux de concentration atteignant 1800 microgrammes par litre, parfois plus) alors que ces vins ont à peine fini leur fermentation (Sources : faculté d'Œnologie de Bordeaux et laboratoire privé (33)). Une des conséquences des teneurs aussi élevées en éthyls-phénols réside dans la diminution de la complexité aromatique des vins et dans le masquage de leur caractère fruité.

C'est pourquoi, en 2006, il nous paraissait urgent et important d'être en mesure de proposer à nos clients, qui nous questionnaient quotidiennement, une solution curative à ce problème en attendant le développement de solutions préventives par les instituts de recherche.

Compte tenu de l'explosion de ce problème dans le monde vinicole, nous espérons secrètement que la technique de diminution des éthyls-phénols une fois développée, pourrait faire l'objet dans un premier temps d'une autorisation d'essai. Malheureusement, cela ne fut pas le cas mais la partie législation sera abordée plus loin dans la présentation.

2. Principe de fonctionnement du procédé de diminution des éthyls-phénols

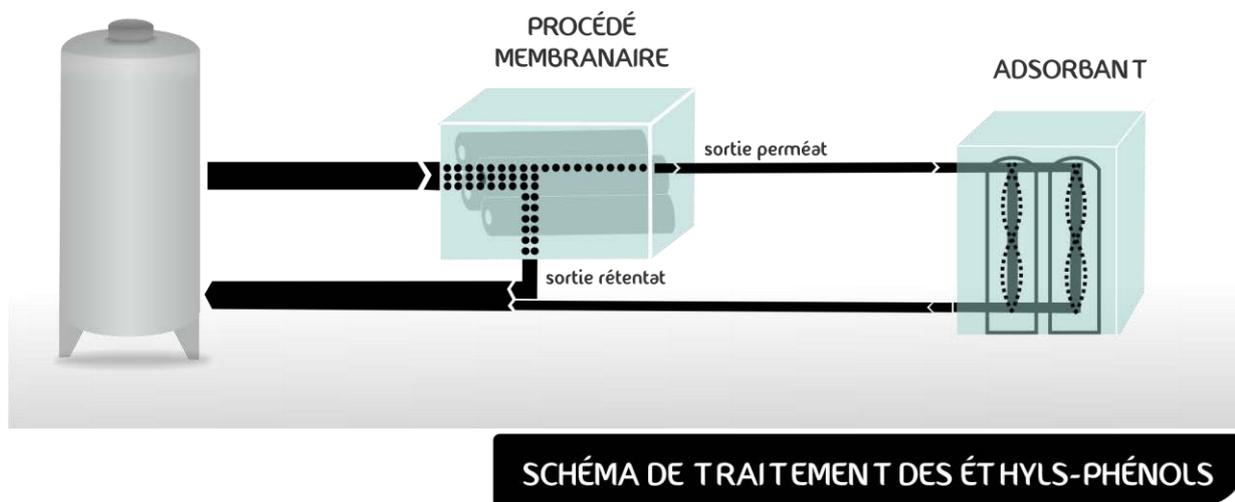
Nous avons axé notre travail de recherche sur la technologie membranaire puisqu'elle permet, lorsque celle-ci est bien maîtrisée, de ne pas altérer les matières nobles du vin (anthocyanes, tanins, polysaccharides acides, neutres etc...).

Cette technologie, couplée avec un milieu adsorbant les éthyls-phénols, permet d'envisager de les éliminer sélectivement sans toucher aux autres constituants du vin.

La réussite du procédé de traitement des éthyls phénols a donc consisté à sélectionner :

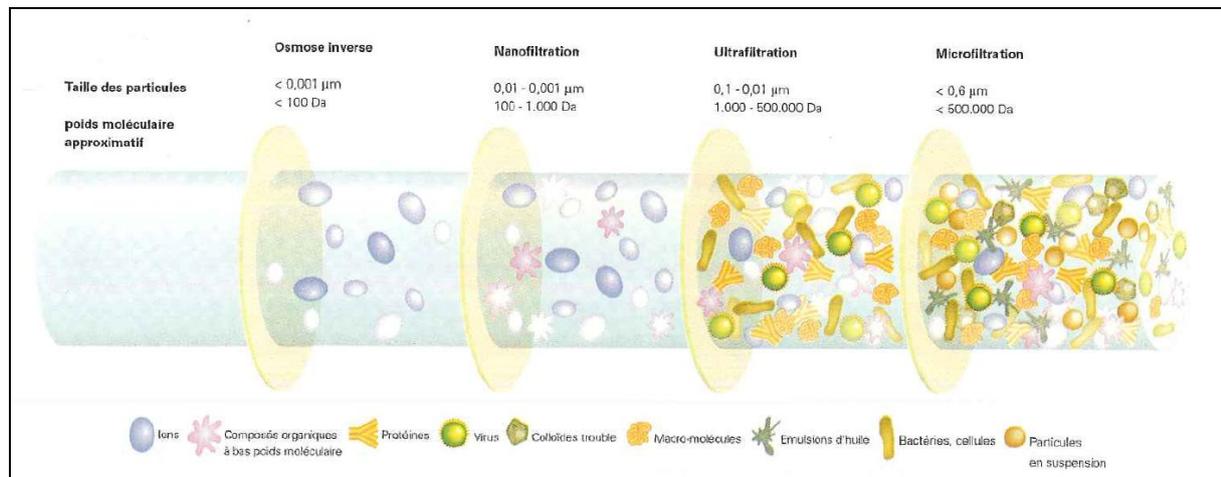
↳ Une membrane de travail laissant passer les molécules d'éthyls-phénols dans le perméat sans laisser passer aucune molécule noble du vin,

↳ un milieu adsorbant capable de capter de façon sélective les éthyls-phénols présents dans le perméat.



3. Le procédé membranaire

Pour illustrer notre recherche du procédé membranaire, le schéma suivant présente les différentes « gammes de rétentions » disponibles dans l'industrie de la membrane :



Comparaison de la rétention de différents éléments selon le type de filtration

Source – *Le Journal International de la Vigne et du Vin N° Hors Série 1998 – Vigne et Vin Publications Internationales*

Nous avons ainsi testé une cinquantaine de membranes afin de répondre aux exigences citées précédemment : la membrane doit laisser passer les molécules d'éthyls-phénols dans le perméat sans laisser passer aucune molécule noble du vin.

Une membrane a ainsi pu être sélectionnée. Cette membrane nous permet d'obtenir le perméat présenté dans le tableau suivant :

	TAV à 20°C	AT	AV	Acide L-Malique	Acide Tartrique	pH	SO ₂ libre	SO ₂ total	IPT(DO280)	E4P	E4G	E4P + E4G
Vin	13,33	3,13	0,38	0,01	1,71	3,73	30	91	77	689	96	785
Perméat	11,24	0,81	0,33	0,01	0,04	3,40	3	5	0	370	22	392

On constate que la concentration en éthyls-phénols est d'environ 50 % de celle du vin et il n'y a effectivement pas de matières nobles du vin (anthocyanes, tanins etc...). On peut ajouter à ce tableau que le goût du perméat est neutre, sans gras, si on enlève l'aspect brûlant de l'alcool. La dégustation du perméat avant et après traitement fait aussi partie du processus de sélection de la membrane.

Pour être mise en œuvre, une membrane doit être montée dans un support. Nous avons choisi comme support le module spiralé qui présente de nombreux avantages. Ce type de module permet :

- d'assurer au niveau de la membrane une circulation suffisante du liquide à traiter,
- de limiter les phénomènes de polarisation de concentration et des dépôts de particules,
- de proposer une grande surface d'échange par unité de volume,
- d'être monté et démonté facilement.

Par contre, il ne permet pas de travailler les produits très chargés.

4. L'adsorbant

L'adsorbant doit retenir sélectivement les éthyls-phénols sans capter les autres composants comme l'alcool, les acides, etc.....

Nous avons réalisé une étude afin de rechercher le matériau le plus efficace et sélectif pour servir d'adsorbant, en particulier les résines, les fibres de carbone, du charbon. L'efficacité de l'un d'entre eux a rapidement été établie.

Le tableau suivant présente la qualité de la sélectivité de l'adsorption et sa capacité à adsorber les éthyls-phénols.

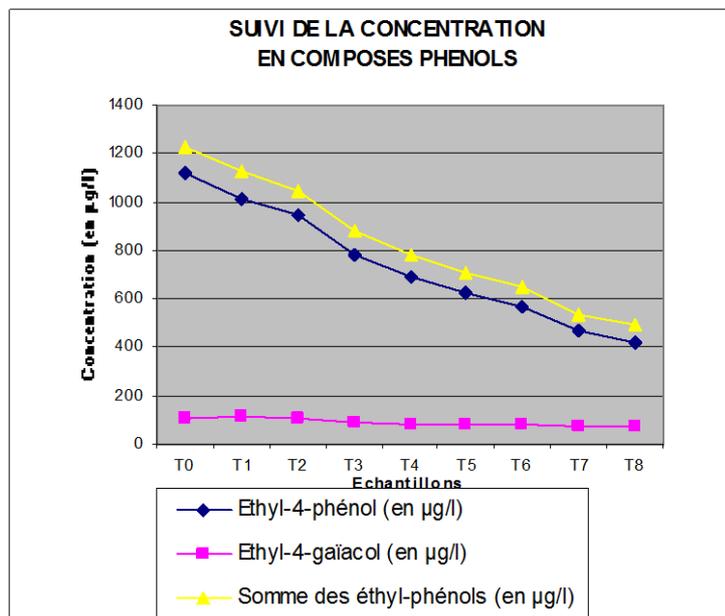
	TAV à 20°C	AT	AV	Acide L-Malique	Acide Tartrique	pH	SO ₂ libre	SO ₂ total	E4P	E4G	E4P + E4G
Perméat avant adsorbant	11,24	0,81	0,33	0,01	0,04	3,4	3	5	370	22	392
Perméat après adsorbant	10,34	0,81	0,32	0,01	0,03	3,4	2	4	< LQ	Non détecté	20

Pour arriver à ce niveau d'adsorption, il a fallu calculer et tester différentes vitesses d'écoulement et différents temps de contact adsorbant-perméat. L'étape suivante a consisté à tester la capacité maximum de l'adsorbant.

5. Résultats obtenus sur le vin avec le procédé de diminution des éthyls-phénols

Nous avons procédé à une série de tests du procédé de diminution des éthyls-phénols. Les résultats ci-dessous traduisent l'un de ces tests. Les différents échantillons ont été prélevés à intervalles réguliers de façon à pouvoir mesurer la diminution de la concentration en éthyls-phénols dans le temps, mais aussi mesurer les autres paramètres analytiques du vin.

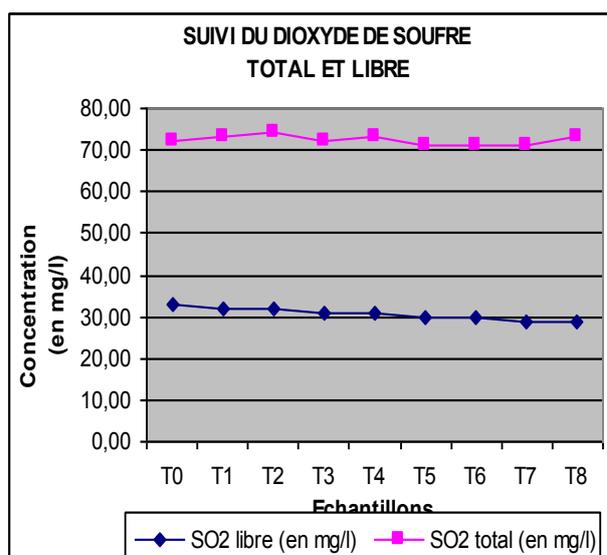
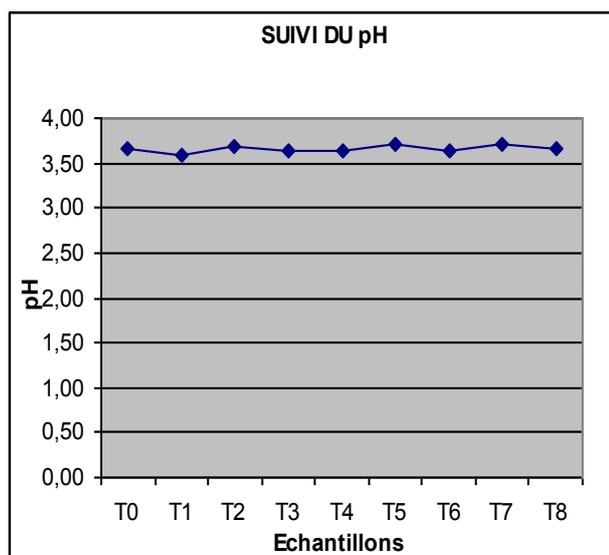
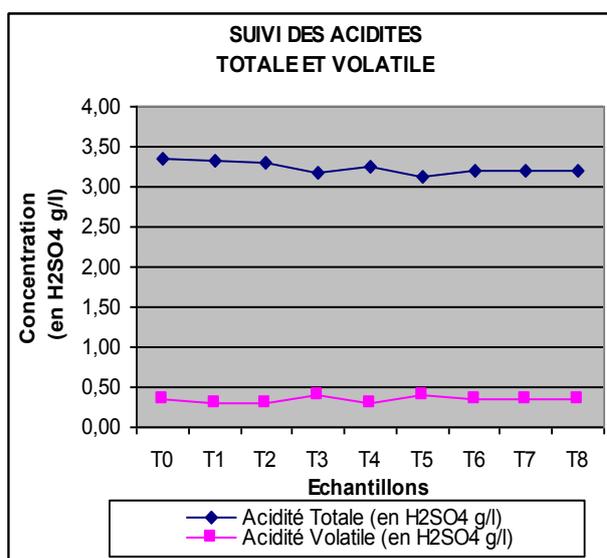
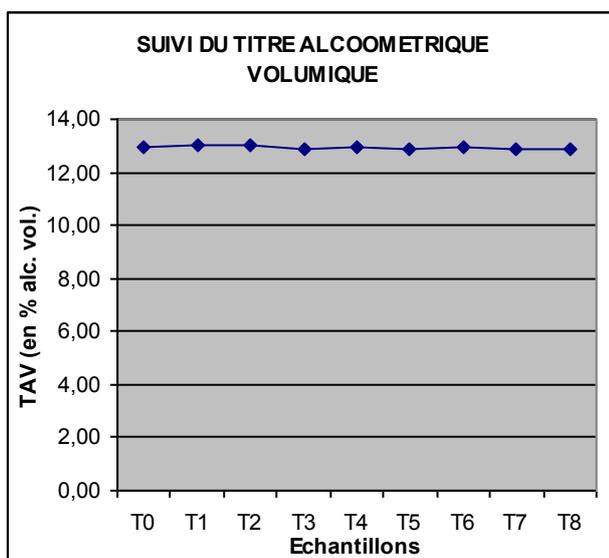
a. Le premier diagramme démontre les possibilités du traitement en termes de diminution des éthyls-phénols :

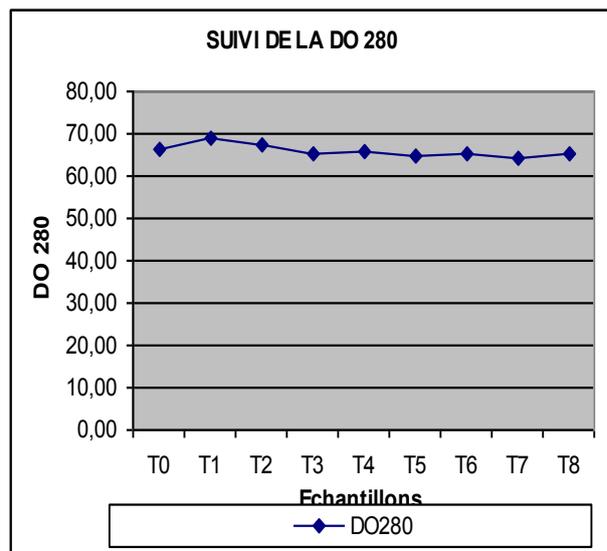
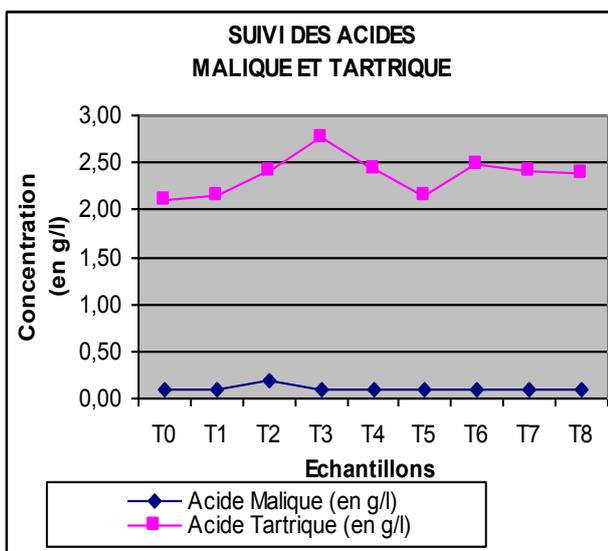


La concentration de départ d'un vin témoin diminue linéairement avec le traitement jusqu'à obtenir une valeur où les éthyls-phénols n'ont plus été considérés comme problématiques à la dégustation.

S'il avait été jugé lors de la dégustation que les éthyls-phénols étaient encore odorants à 450 microgrammes/litre et de ce fait masquaient les arômes naturels du vin, le traitement pouvait descendre en dessous de ces valeurs.

b. Les analyses effectuées dans le cadre de notre recherche ont consisté à doser le titre alcoométrique volumique, l'acidité totale, l'acidité volatile, le pH, le SO₂ libre, le SO₂ total, l'acide malique, l'acide tartrique et la DO 280 pour mesurer les composés phénoliques. Les diagrammes suivants présentent ces résultats :





Ces diagrammes montrent que le traitement n'a pas d'impact significatif sur les différents éléments mesurés. En effet, aucune des variations observées n'est supérieure à l'incertitude de mesure des analyses effectuées. On peut donc juger le traitement sur les paramètres mesurés sans **aucune** incidence analytique sur le produit.

c. Le tableau suivant présente les analyses d'un autre vin testé avec le procédé de diminution des éthyls-phénols.

Analyses physico-chimiques	TAV à 20°C	AT	AV	Acide L-Malique	Acide tartrique	pH	SO ₂ libre	SO ₂ total	Intensité colorante modifiée	DO 420	DO 520	DO 620	IPT (DO 280)	E4P	E4G	E4P + E4G
Avant traitement	13,33	3,13	0,38	0,01	1,71	3,73	30	91	14,26	5,270	7,210	1,780	77	689	96	785
Après traitement	13,35	3,18	0,39	0,01	1,74	3,73	30	90	14,27	5,270	7,180	1,820	76	275	80	355

Au travers de la première série d'analyses présentée précédemment, vous aurez bien compris que le procédé de diminution des éthyls-phénols n'est pas un procédé instantané comme une filtration, Thermoflash®, etc. C'est un procédé en continu qui nécessite un certain temps de travail. Le tableau suivant présente quelques exemples de modélisation de travail avec un débit de perméat de 300 l/h :

Vol. de vin (hl)	Concentration en éthyls-phénols de départ (en µg/l)	Concentration en éthyls-phénols souhaitée (en µg/l)	Temps de travail (h)
20	1200	300	14
75	900	300	42
100	650	300	39

6. La dégustation

En termes de dégustation, une fois la concentration en éthyls-phénols repassée en dessous du seuil de détection, le défaut odorant « écurie » disparaît et le caractère fruité est de nouveau présent dans le vin.

On peut dire avec certitude que les éthyls-phénols masquent le fruit mais ne le détruisent pas.

Il en est de même pour le caractère « brûlant » en bouche que l'on peut parfois observer avec des concentrations importantes d'éthyls-phénols, celui-ci diminue aussi parallèlement à la concentration des éthyls-phénols.

La qualité du traitement réside dans sa capacité à éliminer sélectivement et essentiellement la molécule souhaitée : les éthyls-phénols. Le traitement n'affecte absolument pas les autres composants du vin. Un collège de dégustateur a permis de mettre en évidence de façon statistique une révélation du caractère fruité et une disparition des odeurs d'écuries. Le procédé de diminution des éthyls-phénols permet au vin de retrouver son expression aromatique d'origine.

N'est-ce pas la condition essentielle et le signe de l'efficacité d'un traitement curatif ?

7. Quelques notions pratiques :

- il ne faut pas de particules solides donc pas de lies,
- il est souhaitable de travailler sur les vins avec des températures comprises entre 15 et 20°C,
- il faut travailler en circuit fermé avec refroidissement,
- il est primordial de gérer l'oxygène dissous.

8. Aspect législatif :

- En 2007, la société MICHAEL PAETZOLD a constitué un dossier avec pour partenaires la Faculté d'œnologie de Bordeaux et le CIVB, mais nos demandes d'autorisation d'essai dans le cadre des 50 000 hl, ont été refusées par l'INAO.
- Le traitement des éthyls-phénols est actuellement interdit en France, en Europe et au niveau de l'OIV.
- A ce jour, Patrick Vuchot (Responsable Recherche Expérimentation Inter Rhône et expert à l'OIV) a déposé pour la France une résolution pour autoriser le procédé de diminution des éthyls-phénols. En 2012, cette résolution est passée en étape 5. Il n'y a pas eu d'opposition forte, ni même moyenne de 3 à 5 (3 étant l'étape de dépôt de la résolution), mais simplement un amendement déposé pour élargir l'autorisation à tous les adsorbants et pas seulement au charbon.
- En mars 2014, se tiendra une assemblée de l'OIV où cette résolution sera discutée parmi d'autres. Ainsi, elle pourrait passer en étape 7 si tout est favorable.
- En novembre 2014, se tiendra l'assemblée générale de l'OIV qui clôturera le congrès. En amont de cette assemblée, la commission technique se réunira. S'il n'y a pas d'opposition, cela sera présenté le lendemain et ainsi devrait passer en étape 9 et être autorisé.
- Une fois la résolution adoptée par l'OIV, l'U.E. se base maintenant normalement sur la décision de l'OIV pour l'autoriser. Cela prend en général une année civile en plus.
- Ensuite, de fait, cela s'impose à la France, et comme c'est la délégation française qui porte et soutient cette résolution, il ne devrait pas y avoir de problème.
- Les AOC peuvent cependant être plus restrictives mais il faut alors interdire cette technique dans le cahier des charges de l'appellation concernée.

Attention, il faut prendre les choses au conditionnel mais si tout se passe comme présenté ci-dessus, on pourrait voir autoriser la technique en France en fin d'année 2015. A suivre....

Références bibliographiques :

Brugirard A., Rochard J., 1991, Aspects pratiques des traitements physiques des vins, Collection Avenir Œnologie, Bourgogne-Publications, Chaintré, 256 pages

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., 1998, Traité d'œnologie - tome 2 - Chimie du vin, stabilisation et traitements, Dunod, Paris, 519 pages

Renouf V., Gindreau E., Claisse O., Lonvaud-Funel A., 2005, Microbial changes during malolactic fermentation in red wine elaboration. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. 39, 179-190

Lonvaud-Funel A., 1998, Principe de la stabilisation microbiologique des vins par la chaleur. Traitements physiques des moûts et des vins. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. Hors série, 147-153.

Guimberteau G., Noilet P., 1998, Osmose inverse et vinification. Traitements physiques des moûts et des vins. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin. Hors série, 81-93

Les phénols volatils : analyse sensorielle et perception par le dégustateur

Pr. Gilles de Revel

ISVV, Université de Bordeaux
210 chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon
gilles.de-revel@u-bordeaux.fr

Les résultats présentés ici sont issus des travaux d'Andrea Romano et de Sophie Tempère, menés en collaboration avec le Dr. Gilles Sicard (CNRS).

Andrea Romano a bénéficié d'une bourse de post-doctorat de l'ISVV-Bordeaux-Aquitaine. Nous remercions le Comité Interprofessionnel des Vins de Bordeaux pour le soutien continu des travaux à l'ISVV de Sophie Tempère en doctorat et post-doctorat.

Bien que les professionnels développent leurs capacités sensorielles et définissent des références communes lors des dégustations ou formations auxquelles ils participent, on note une certaine hétérogénéité et un manque de consensus fort dans les commentaires de dégustations, c'est le cas en particulier pour le caractère phénolé des vins. Celui-ci est bien connu des professionnels, même s'il reste difficile à cerner dans son importance et sa nuisance selon les types de vins. Les interactions sensorielles entre les constituants sont peu décrites jusqu'à présent et semblent pourtant fondamentales dans ce cas. Nous nous intéressons premièrement à l'importance des molécules associées au développement de *Brettanomyces* compliquant sa signature olfactive. Dans un second temps, nous cherchons à mieux comprendre les capacités des dégustateurs vis-à-vis de ce défaut, y compris par l'étude de certains facteurs socio-professionnels.

La présence d'un défaut olfactif entraîne une déception vis-à-vis du produit, voire un rejet définitif par le consommateur. L'analyse de l'échantillon dégusté associée à la dégustation du produit permet généralement d'en déterminer la source. Parmi les défauts de type animal, la sensation de cuir voire d'écurie reste la principale préoccupation des professionnels. Dans ce cas, les molécules impliquées sont les phénols volatils. Ces composés ont des seuils de perception relativement bas (il est le plus souvent cité, 400 µg/L dans un mélange 10/1 d'éthyl-4-phénol et d'éthyl-4-gaiacol). L'éthyl-4-phénol peut être décrit comme évoquant le cuir, le cheval, l'écurie et l'éthyl-4-gaiacol comme fumé, épice, pharmaceutique. Dès que la concentration en phénols volatils se situe au-dessus de 200 µg/L, le caractère fruité et la complexité aromatique des vins rouges semblent alors diminués par la seule présence de ces molécules (effet masque). Mais, des vins contenant plus de 1 mg/l peuvent parfois ne pas être rejetés par le dégustateur, ou même par l'expert.

Seuil de détection et caractère phénolé des vins

Le concept de seuil de détection revêt un rôle très important dans le cas des éthyl-phénols, puisqu'il est souvent employé comme « ligne de démarcation » entre vins altérés et non-altérés. Ce concept est aussi important d'un point de vue économique dans la mesure où il constitue un critère d'un vin considéré « à risque » voir à rejeter dans le cas de contrôle de qualité.

Des observations répétées au cours de plusieurs millésimes nous ont amené à ré-évaluer la valeur pratique du concept de seuil. La corrélation entre teneurs en éthyl-phénols des vins et présence d'un caractère « phénolé » est parfois très faible. Beaucoup de vins décrits comme « phénolés » présentaient des teneurs en éthyl-phénols au dessous du seuil et surtout plus d'un tiers des vins décrits comme « non phénolés » contenaient plus

de 400 µg/l d'éthyl-phénols. Au-delà de la variabilité de sensibilité des dégustateurs, ces résultats maintes fois constatés, suggèrent que le "Goût de Brett" est une altération complexe qui n'est pas explicable sur la base des seules teneurs en éthyl-phénols. En effet, le développement de *B. bruxellensis* dans le vin entraîne la production d'un ensemble complexe de composés tels que les acides carboxyliques et leurs esters éthyliques. Contrairement aux éthylphénols, il ne s'agit pas de produits spécifiques du métabolisme de *B. bruxellensis*. Les notes olfactives liées à ces composés ne sont pas toujours désagréables : les acides évoquent bien des notes telles que «sueur» et «rance» mais leurs esters expriment plutôt des notes florales.

Le masque du masque

Dans le but de vérifier si les acides isobutyrique (iC4) et isovalérianique (iC5) avaient un effet sur la perception des notes « phénolées », le seuil de détection des éthyl-phénols a été calculé dans deux conditions différentes. Dans un premier temps, le seuil du mélange éthyl-4-phénol / éthyl-4-gaïacol (en proportion respectives de 10/1) a été mesuré dans un vin rouge de nature peu complexe. Dans un second temps, le seuil de détection a été calculé dans ce même vin supplémenté en acides isobutyrique et isovalérianique.

La comparaison entre leur seuil respectif nous a permis de démontrer que les acides isobutyrique et isovalérianique sont capables d'augmenter d'un facteur 3 le seuil de détection des éthyl-phénols dans le vin (figure 1). Il s'agit ici d'un véritable effet masquant des acides volatils sur la perception des phénols.

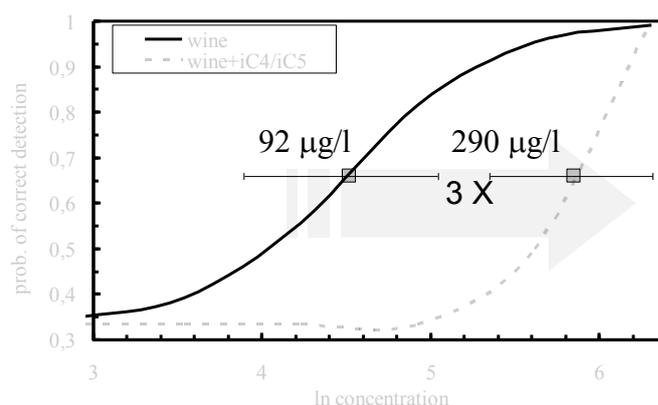


Figure 1 - Variation du seuil de perception du mélange éthyl-4-phénol/éthyl-4-gaïacol (rapport de concentration 10/1) dans un vin rouge en fonction de l'ajout des acides isobutyrique (iC4) et isovalérianique (iC5). Le seuil augmente d'un facteur 3 en présence de ces acides.

Outre les molécules précédemment citées, *B. bruxellensis* est aussi capable de transformer la lysine, une acide aminé toujours présent dans le vin, en produisant l'acétyl-tétrahydropyridine (ATHP). Il s'agit du marqueur d'un défaut connu, déjà décrit dans le vin comme « goût de souris » et associé à des notes olfactives de type animal/charcuterie fortement désagréables. La synthèse de l'ATHP par *B. bruxellensis* n'est possible dans le vin qu'en présence de concentrations importantes de sucres fermentescibles (au moins 20 g/l). Cela limite l'apparition de cette altération au cas relativement rare de développement de *B. bruxellensis* pendant la fermentation alcoolique. On observe alors la production concomitante d'ATHP et d'éthyl-phénols. L'impact sensoriel de l'ATHP est suffisant pour cacher celui des éthylphénols.

Ces résultats nous amènent à ré-évaluer le rôle des éthylphénols comme seuls marqueurs du « goût de Brett ». On démontre ainsi le caractère complexe de cette altération d'un point de vue sensoriel et d'un point de vue chimique. Du fait de cette complexité, l'analyse ne peut pas être le seul moyen de déclarer un vin, *phénolé* ; le jugement du dégustateur, même imparfait, doit être pris en compte. Peu d'études se sont cependant intéressées aux différences de perception entre professionnels du vin. Dans un travail récent, effectué avec un grand nombre de dégustateurs professionnels, Tempère et coll. ont démontré en 2011 qu'il existait de fortes variations inter-individuelles de sensibilité aux éthylphénols chez les dégustateurs. Cette étude entreprise sur 134 professionnels, révèle que 1 % d'entre eux présente une anosmie ou hyposmie spécifique aux éthylphénols, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas ou sont très peu sensibles à l'odeur de ces composés. De façon parallèle, 8 % de cette population de professionnels présente une hypersensibilité aux éthylphénols. En dehors de ces extrémités remarquables, tous ont des sensibilités différentes vis-à-vis de ces marqueurs, ce qui permet ainsi de mieux appréhender les débats entre dégustateurs.

Comparaison expérimentale entre le seuil de détection et le seuil de rejet des éthylphénols

Dans un premier temps, nous avons étudié la relation entre les capacités de détection des dégustateurs professionnels pour les éthylphénols dans le vin et l'acceptabilité de ce même vin. Pour cela nous avons mesuré les seuils de détection et de rejet aux éthylphénols ajoutés artificiellement dans un vin pour un grand nombre de professionnels (83 professionnels). Nous avons pu observer une forte diversité interindividuelle des seuils de détection et de rejet (figure 2).

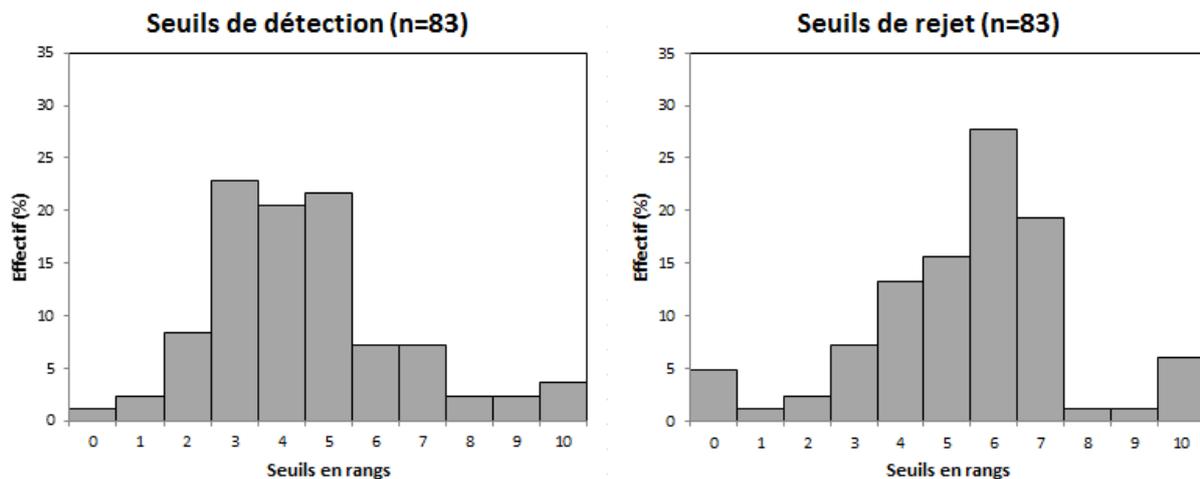


Figure 2 – Distribution des seuils de détection et des seuils de rejet pour les éthylphénols dilués dans le vin. Quarante-trois dégustateurs professionnels ont participé à ce test. L'indication « 0 » correspond aux concentrations les plus élevées. Dans cette classe on trouvera des sujets ayant un seuil de détection élevé ou des capacités de segmentation faibles. Notez que les concentrations des gammes pour les déterminations des seuils de détection et des seuils de rejet sont identiques. n = nombre de sujets testés.

On s'aperçoit aussi qu'il n'existe pas de corrélation entre le seuil de détection d'un sujet et son seuil de rejet (non montré). En effet, chez 59 % des sujets le seuil de rejet est inférieur au seuil de détection alors que dans 41 % des cas, il est égal ou supérieur. Cette inversion entre le seuil de rejet et le seuil de détection est clairement significative. Ainsi, on constate qu'un vin contenant des éthylphénols peut être rejeté alors que la concentration est inférieure au seuil de détection des sujets (figure 3). Un facteur de dilution de 3 est observé entre le seuil de rejet et le seuil de détection ; c'est-à-dire que le vin phénolé est rejeté de manière significative par les dégustateurs à une concentration 3 fois plus faible que le seuil de détection. Ce résultat est fortement lié au type de vin sélectionné, un facteur de 2 à 3 peut se rencontrer selon nos études sur des vins différents.

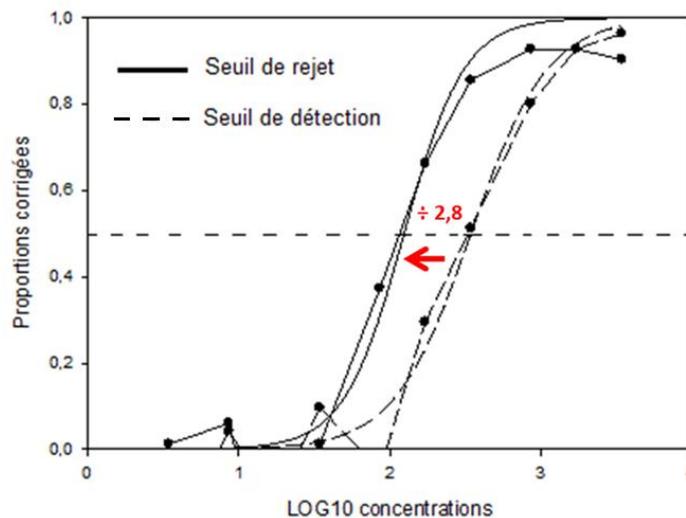


Figure 3 – Comparaison entre le taux de détection et le taux de rejet en fonction de la concentration en éthylphénols chez 83 dégustateurs professionnels. Un facteur de dilution de 2,8 est observé entre les deux seuils.

Facteurs sensoriels et socio-professionnels influençant la perception du défaut phénolé dans les vins

Dans cette seconde étude, 72 dégustateurs professionnels ont évalué olfactivement un vin contenant, après ajout, environ 380 µg/l d'éthylphénols (mélange 10:1 d'éthyl-4-phénol et d'éthyl-4-gaiacol). Les résultats obtenus lors de cette dégustation (intensité attribuée au défaut phénolé par le dégustateur) ont été mis en parallèle avec les mesures de seuil de détection individuel pour les éthylphénols dilués dans le même vin de départ, les mesures de seuil de rejet individuel aux éthylphénols ainsi qu'avec les données socio-professionnelles des dégustateurs (âge, genre, formation, profession). Parmi ces derniers, 49 % des dégustateurs ont été formés à la dégustation (DNO, DUAD). L'âge des dégustateurs étaient compris entre 21 et 62 ans (moyenne ± écart-type : 44,0 ± 10,2) et 31 % d'entre eux sont œnologues conseils.

Les résultats démontrent que l'âge des dégustateurs ou leur profession influence plus fortement l'appréciation du défaut phénolé dans le vin que le seuil de détection ou le seuil de rejet des dégustateurs. En effet, les sujets les plus âgés attribuent au vin dégusté une intensité de la note phénolée plus faible que les autres sujets. De plus, on note une différence de perception de l'intensité phénolée entre les œnologues conseils et les autres dégustateurs, mais aussi un meilleur consensus (écart-type réduit) est observé au sein de la profession des œnologues conseils (figure 4).

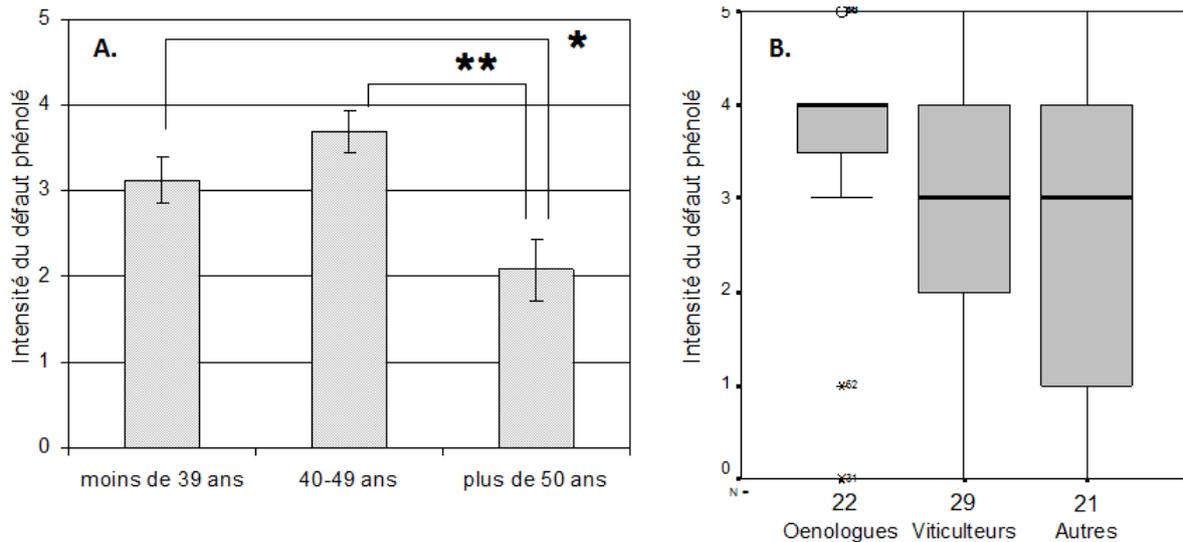


Figure 4 – A. Comparaison des intensités moyennes pour le défaut phénolé en fonction de l'âge des dégustateurs (moyenne ± erreur standard). Ages des dégustateurs : 20-39 ans (N = 26 sujets) ; 40-49 ans (N = 20 sujets) et 50-59 ans (N = 26 sujets). Les étoiles indiquent des différences significatives. B. Moyenne de l'intensité du défaut phénolé suivant la profession des dégustateurs (représentation en « boîtes à moustache » de Tukey) : œnologues (N = 22 sujets) et autres professions (viticulteurs et autres; N = 50 sujets).

Conclusion

Nous cherchons à mieux comprendre les différences observées dans le jugement des vins phénolés. Plusieurs études ont mis en évidence l'influence des caractéristiques culturelles au sens large sur la perception des odeurs et des caractéristiques organoleptiques d'un vin. Selon nos résultats, il semble bien que dans le cas du défaut phénolé, en plus des aptitudes perceptives, des facteurs non sensoriels tels que le statut professionnel et l'âge ont un impact sur le jugement d'un vin et s'ajoutent aux compétences sensorielles. Nos résultats indiquent une influence de l'âge et de la profession sur les capacités olfactives mais également sur des critères décisionnels (non montré) qui interviennent dans les jugements produits lors de la dégustation. L'influence conjointe de ces deux facteurs, nous permet d'envisager un effet de la connaissance ou de l'expérience sur le jugement de ce défaut. Dans le cas de l'âge, on supposera plutôt un effet cognitif, une différence de connaissance du défaut phénolé que d'un phénomène physiologique. Rappelons que les marqueurs du caractère phénolé ont été correctement définis dans les années 90 et c'est à partir de cette époque que ce caractère a été envisagé et enseigné comme défaut réhibitoire des vins.

Références

- A. Romano, M.C. Perello, G. de Revel and A. Lonvaud-Funel. 2008. Study on the development of "Brett character" in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1577-1585.
- A. Romano, M.C. Perello, A. Lonvaud-Funel, G. Sicard and G. de Revel. 2009. Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". *Food Chem.* 114, 15-19.
- S. Tempère, E. Cuzange, J. Malak, J.C. Bougeant, G. de Revel., G. Sicard. 2011. The training level of experts influences their ability to detect some wine key compounds. *Chemosens. Percept.* 4 (3): 99-115
- S. Tempère, G. Sicard, E. Cuzange, G. de Revel. 2013. Perception du défaut phénolé, le problème du consensus. *Revue Française d'Œnologie.* 261 : 13-16
- S. Tempère, E. Cuzange, M.H. Schaaper, R. de Lescar, G. de Revel., G. Sicard. 2014. "Brett character" in wine: Is there a consensus among professional assessors? A perceptual and conceptual approach. *Food Quality Preference.* 34: 29-36