



Mieux comprendre
la **biodiversité levurienne**
à la vigne et à la cave

Matinée Technique
Avril 2015

SOMMAIRE

BIODIVERSITE LEVURIENNE ET IMPACTS DES ACTIVITES ANTHROPIQUES DE LA VIGNE A LA CAVE.....	p 1
INTRODUCTION.....	p 2
PROTOCOLE	p 3
RESULTATS : IMPACTS DE LA PROTECTION PHYTOSANITAIRE SUR LA BIODIVERSITE LEVURIENNE DES BAIES.....	p 4
RESULTATS : EFFETS DES PRATIQUES ŒNOLOGIQUES SUR LA BIODIVERSITE LEVURIENNE EN MOÛTS	p 6
FLORE DES RAISINS / FLORE DE CAVE ET INTERET DES NON-<i>Saccharomyces</i>.....	p 10
INTRODUCTION.....	p 11
ORIGINE DES SOUCHES DE <i>Saccharomyces</i> SUR LE MILLESIME 2012	p 11
QU'EN EST-IL DES NON- <i>Saccharomyces</i> ?.....	p 13
ORIGINE DES SOUCHES DE <i>Candida</i> SUR LES MILLESIMES 2012 et 2013	p 14
ORIGINE DES SOUCHES DE <i>Hanseniaspora</i> SUR LES MILLESIMES 2012 et 2013	p 16
APPROCHES TECHNIQUES ET RISQUES LIES A LA FLORE LEVURIENNE.....	p 19
INTRODUCTION.....	p 20
<i>Kloeckera apiculata</i>	p 20
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p 23
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	p 24
CONCLUSIONS.....	p 29

BIODIVERSITE LEVURIENNE ET IMPACTS DES ACTIVITES ANTHROPIQUES DE LA VIGNE A LA CAVE

Sandrine Rousseaux
Equipe VALMiS (Vin Aliment Microbiologie et Stress)
UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques)
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin « Jules Guyot »
Université de Bourgogne

Ce travail a été mené dans le cadre de la thèse de Cédric Grangeteau dans l'équipe du professeur Hervé Alexandre, sous la responsabilité de Sandrine Rousseaux et Michèle Guilloux-Bénatier, avec le soutien financier du Conseil Régional de Bourgogne et du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne

INTRODUCTION

L'objectif de la thèse est de répondre à la question suivante : « la protection phytosanitaire a-t-elle un impact sur la biodiversité levurienne présente sur les baies et dans les moûts de raisins ? ». Si la réponse est positive, et qu'il existe une différence de biodiversité levurienne selon la protection phytosanitaire, se maintient-elle suite à différentes pratiques œnologiques (pressurage, débourbage, ajout de SO₂...) ? Et quelle est l'influence de la flore résidante de cave ?

Il existe de multiples produits phytosanitaires sur le marché. Les traitements de protection de la vigne sont appliqués à différents moments et les pratiques phytosanitaires sont variables et dépendantes de nombreux facteurs. Quels sont les impacts de ces pratiques ?

Par exemple, les traitements fongicides appliqués pour lutter contre le mildiou et l'oïdium ont, sans doute, un impact sur les levures d'intérêt présentes sur les baies.

Que sait-on ?

Au début des années 2000, beaucoup d'études ont été réalisées sur les effets de différentes protections phytosanitaires sur la biodiversité microbienne des baies. Il apparaît qu'en effet les traitements ont un impact mais les résultats sont contradictoires selon les études. Certaines révèlent une biodiversité supérieure en viticulture bio et d'autres concluent à l'inverse. Les contextes pédoclimatiques et les cépages diffèrent selon les études, de même que les modalités de traitement, ce qui peut expliquer ces résultats contradictoires.

(Comitini and Cianni – 2008, Cadez et al. – 2010, Tofalo et al. – 2011, Cordero-Bueso et al. – 2011, Schmid et al. – 2011, Tello et al. – 2012, Milanovic et al. – 2013, Martins et al. – 2014...).

La majorité de ces résultats sont obtenus par « méthode cultivable » : analyse de la diversité après mise en culture. Là encore, ces « méthodes cultivables » peuvent induire des biais dans les interprétations des résultats selon les études. Une seule étude utilise la méthode globale d'analyse de la diversité *(David et al. – 2014)*.

A priori, aucune étude visant la biodiversité levurienne de la baie de raisin au vin n'a été menée en utilisant une méthode globale d'analyse : il n'y a donc pas de données sur le maintien ou non dans la cuve, des levures présentes sur baies.

Que sait-on sur l'impact de certaines pratiques œnologiques ?

Le SO₂, du fait de ses propriétés antiseptiques, antibactériennes et antifongiques... a un impact largement étudié sur les populations de levures. *(Cocolin et al. – 2003, Andorra et al. – 2008, Takahashi et al. – 2014)*

Une seule étude a été réalisée sur l'effet du débourbage sur moût de raisins *(Cavazza et al. – 2011)*.

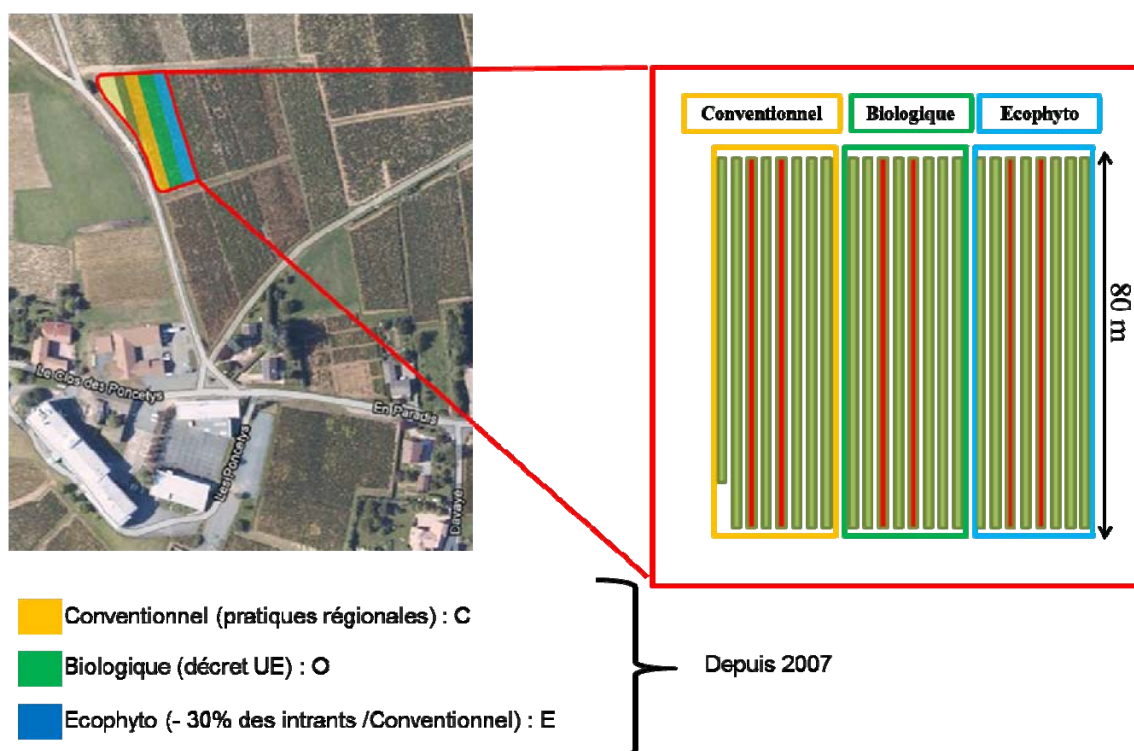
De même, une seule étude a été menée sur l'effet du pressurage et sur les pommes *(Valles et al. – 2007)*.

Il existe donc peu de données sur l'impact de ces opérations œnologiques.

PROTOCOLE

La parcelle retenue pour ce travail est une parcelle expérimentale de Chardonnay, plantée en 1986 à Davayé. Elle appartient au Lycée viticole de Davayé. L'expérimentation est gérée par le Vinipôle Sud Bourgogne. Depuis 2007, des essais sur la comparaison de 3 modes de production sont menés dans cette parcelle :

- Mode de production raisonné (conventionnel) sur 8 rangs → C sur les graphiques
- Mode de production biologique sur 8 rangs → O sur les graphiques
- Mode de production Ecophyto (diminution de 30 % des intrants par rapport au conventionnel avec un pilotage via des outils d'aide à la décision) sur 8 rangs → E sur les graphiques



Les prélèvements sont réalisés au centre de chacune des modalités pour limiter les biais (rangs en rouge sur la figure).

Pour étudier la biodiversité sur les échantillons de baies de raisins, de moûts ou de vin, 2 techniques sont utilisées :

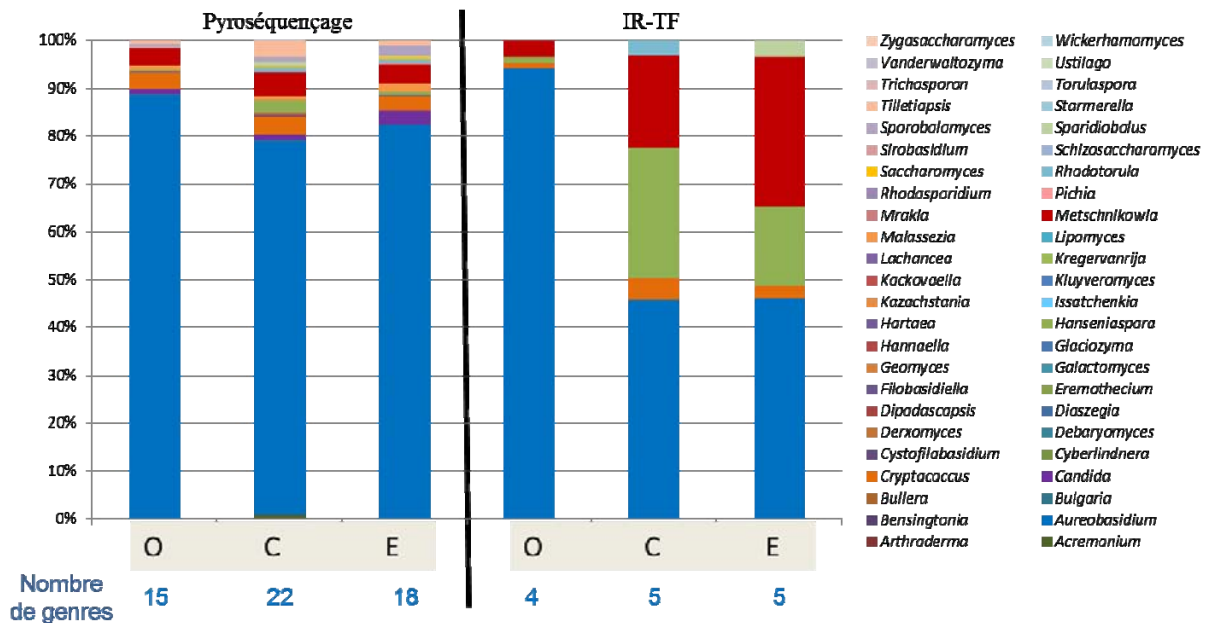
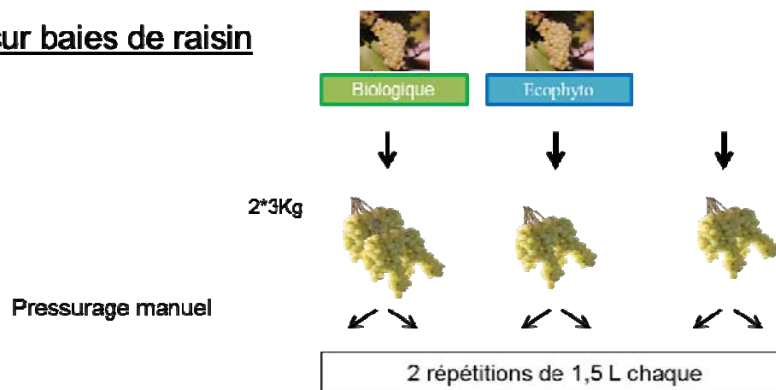
- Le pyroséquençage (collaboration INRA Dijon)
C'est une méthode globale sans étape de culture qui détecte les genres et/ou les espèces présents dans l'échantillon. Elle permet d'avoir accès aux genres et espèces non cultivables ou très minoritaires.
Les résultats obtenus donnent une idée très précise de la population globale à un instant donné. 12 et 48 échantillons ont respectivement été traités en 2012 et 2013.
- IRTF (spectroscopie infra-rouge – collaboration avec l'Université de Geisenheim en Allemagne)

C'est une méthode avec une étape de culture des micro-organismes. Elle révèle les genres et/ou espèces présents capables de se développer sur les milieux de culture utilisés. Elle permet la caractérisation jusqu'à l'individu pour certaines espèces. En 2012, 2 730 isolats ont été identifiés sur 5 500, et 2 154 isolats sur 4 500, ont été identifiés en 2013.

RESULTATS : IMPACTS DE LA PROTECTION PHYTOSANITAIRE SUR LA BIODIVERSITE LEVURIENNE DES BAIES

Millésime 2012

sur baies de raisin



Chaque couleur représente un genre de levures.

La méthode globale montre une grande diversité, alors qu'en IRTF seuls les genres majoritaires sont mis en évidence. Les genres retrouvés sont déjà décrits dans la littérature.

De nombreux genres sont présents **et il existe une grande diversité**. Elle apparaît plus faible dans le mode de conduite viticulture biologique selon la méthode de pyroséquençage et la méthode IRTF. Les genres retrouvés sont habituels.

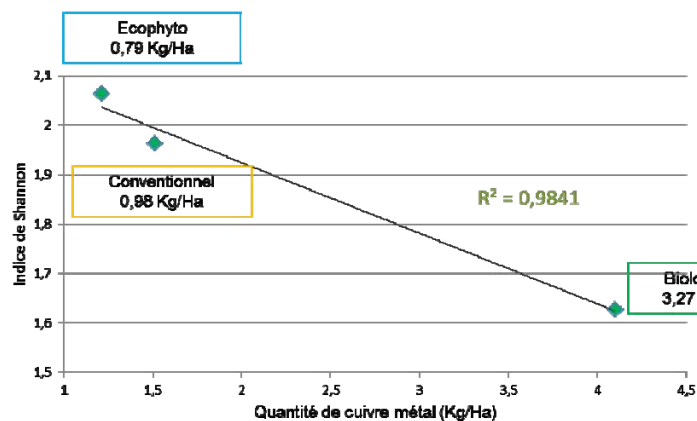
Les résultats pour le millésime 2013 ne sont pas présentés car les données sont en cours d'analyse.

En conclusion, dans le cadre de cette étude, il ressort que **la diversité levurienne est différente en fonction de la protection phytosanitaire utilisée et qu'elle est moins importante dans le cas de la viticulture biologique. Ces résultats seront à confirmer avec le millésime 2013.**

Cela pose de nouvelles questions sur les effets des molécules utilisées selon la protection (intrants chimiques, cuivre, soufre...) et sur les effets des quantités apportées qui diffèrent selon le type de protection.

En 2012, seuls **le cuivre et le soufre** ont été appliqués pour les 3 modalités.

La quantité de cuivre métal apportée sur l'année pour chaque mode de conduite est mise en parallèle avec un indice reflétant la diversité : indice de Shannon (plus il est bas, moins il y a de diversité).

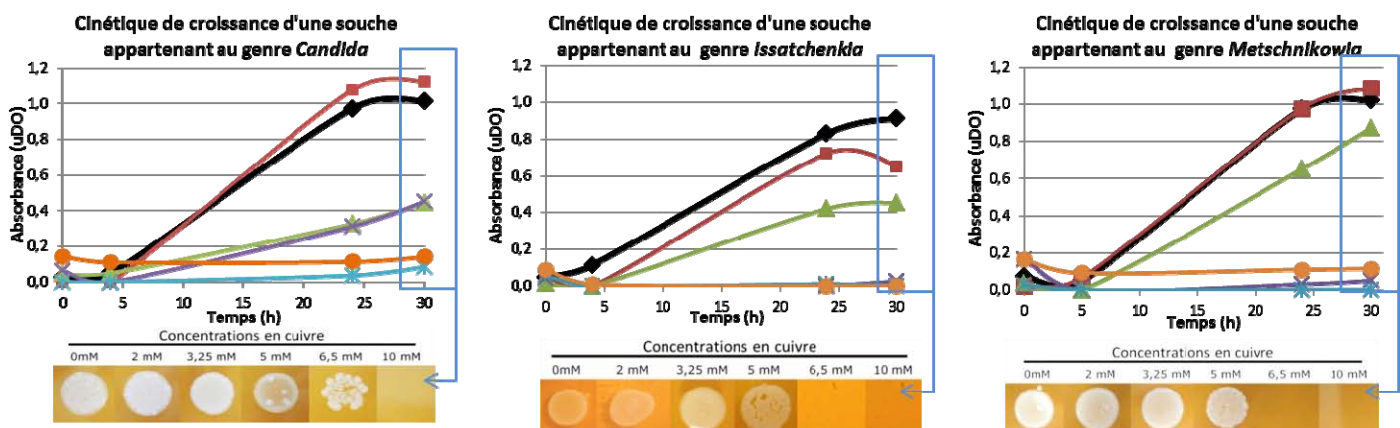


Le coefficient de corrélation obtenu est très bon. Ce qui indique **qu'il semble exister une corrélation importante entre la quantité de cuivre utilisée et la diversité levurienne observée : plus il y a de cuivre, moins il y a de diversité.**

Il s'avère donc pertinent de s'intéresser à la résistance au cuivre et au soufre des souches isolées en 2012 pour les 3 modalités. Une étude sur la résistance au soufre a été réalisée en parallèle.

Test de résistance au cuivre

La résistance au cuivre de 134 souches a été testée. La cinétique de croissance est observée pour des souches isolées sur les 3 modalités. Elles appartiennent à 3 genres : *Candida* et *Metschnikowia* décrits comme ayant un intérêt œnologique et *Issatchenkia*, faiblement présente sur baie, et qui n'a pas d'intérêt œnologique décrit.



Les **comportements diffèrent suivant les souches, la résistance est donc variable selon le genre et l'espèce**. Cela soulève la question d'une résistance souche-dépendante.
La conclusion est donc qu'il n'y a **pas de résistance spécifique en fonction des modalités**.

Test de résistance au soufre

120 souches sont étudiées. La résistance est évaluée avec un test de croissance.

Il ressort de plus de 70 % des souches résistent jusqu'à 20 g/l de Thiovit (5 mM soufre), particulièrement les genres *Metschnikowia* et *Aureobasidium*. Toutefois, certaines souches ne résistent pas à plus de 200 mg/l de Thiovit (genre *Pichia*).

La résistance est variable selon le genre ou l'espèce, il n'existe pas de lien avec la modalité.

Conclusions tests de résistance

La résistance au cuivre des souches isolées est très supérieure à celles isolées dans d'autres écosystèmes, mais elle ne dépend pas de la protection phytosanitaire.

Pour le **soufre**, les souches isolées présentent une **résistance élevée mais non-dépendante de la protection phytosanitaire**. Cependant, les genres *Candida* et *Pichia*, les plus sensibles au soufre, sont peu ou pas isolés dans la modalité biologique.

Le soufre et le cuivre peuvent être utilisés séparément ou ensemble, existe-t-il une synergie ? L'étude a été réalisée et les résultats sont en cours de traitement.

Ces tests de résistance ont été effectués in vitro. Il serait intéressant de réaliser une étude de la résistance des populations de levures présentes sur baies directement au vignoble.

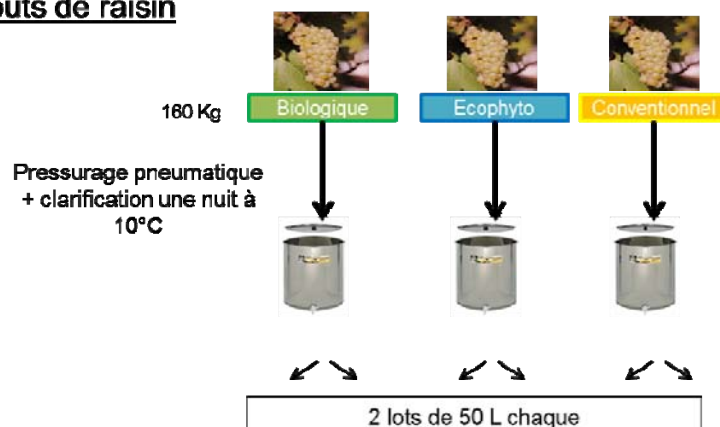
Des différences de diversité ont été observées sur baies en fonction de la protection phytosanitaire, mais se maintiennent-elles suite à différentes pratiques œnologiques (pressurage, débourbage, SO₂...) ?

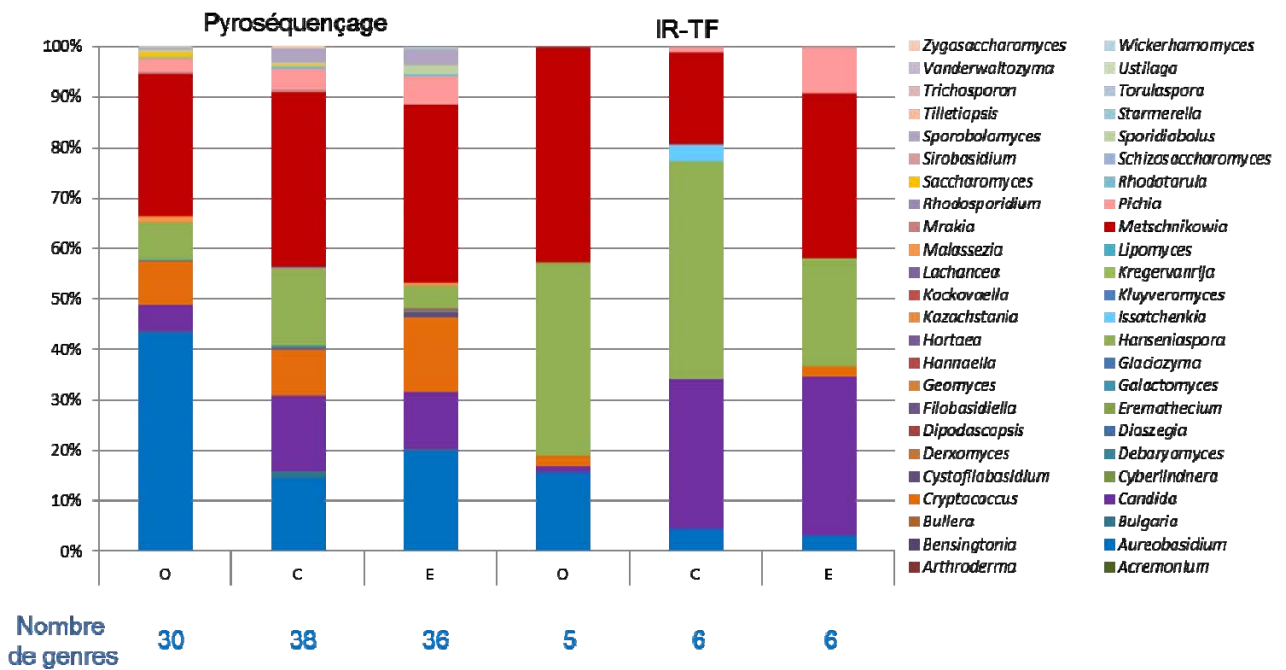
RESULTATS : EFFETS DES PRATIQUES ŒNOLOGIQUES SUR LA BIODIVERSITE LEVURIENNE EN MOÛTS

Effet du pressurage et du débourbage

Millésime 2012

sur moûts de raisin





Les vinifications sont réalisées en cuverie expérimentale au Centre Interprofessionnel Technique des Vins de Bourgogne à Beaune.

Rappel : sur baies de raisins, le nombre de genre obtenus est :

- Par pyroséquençage : 15 en bio, 22 en raisonné (conventionnel) et 18 en Ecophyto (30 % d'intrants en moins par rapport au raisonné).
- Par IRTF : 4 en bio, 5 en raisonné et 5 en Ecophyto.

Sur moûts de raisins, la différence de diversité en fonction de la protection phytosanitaire est toujours observée. L'itinéraire bio présente moins de genres.

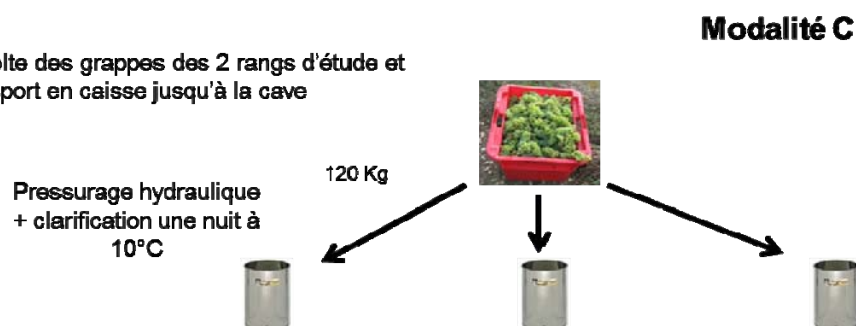
Les étapes pré-fermentaires : **pressurage et débordage** ont pour effet : **l'augmentation du nombre de genre et la modification de la représentativité de certains genres** : *Metschnikowia* et *Candida*.

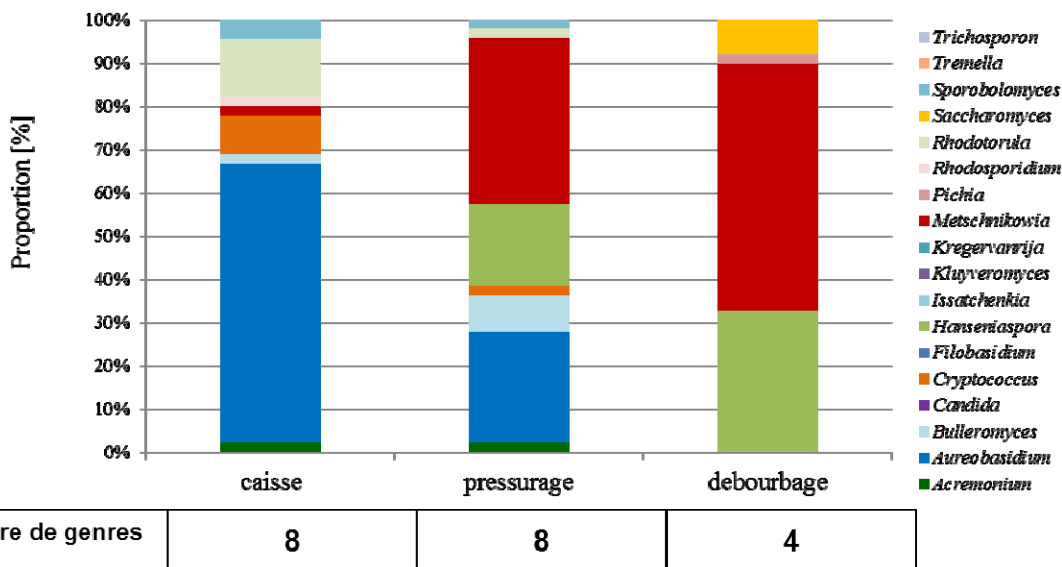
La **diversité est donc remaniée par ces étapes œnologiques** selon les résultats obtenus par pyroséquençage et en IRTF.

Millésime 2013 – Focus sur la modalité conventionnelle = raisonnée

sur moûts de raisin

Récolte des grappes des 2 rangs d'étude et transport en caisse jusqu'à la cave





Résultats en IRTF.

Les résultats présentent la diversité en casse, post-pressurage et post-débouillage.

La **diversité diminue lors de l'opération de débouillage. La répartition des genres évolue.** Le genre *Aureobasidium* très majoritaire dans les casses n'est plus détecté après débouillage. A l'inverse, le genre *Metshnikowia*, minoritaire sur les baies, est majoritaire après débouillage. La particularité sur ce millésime est la mise en évidence du genre *Saccharomyces* (8 %) après débouillage, alors qu'il n'est pas détecté sur les baies en casses. De même, *Hanseniaspora*, non détecté sur baies, représente 19 % des isolats après pressurage et 32 % après débouillage.

Effet du sulfitage

Millésime 2013

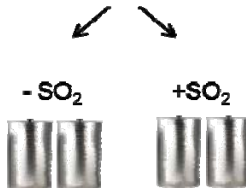
Modalité C

Récolte des grappes des 2 rangs d'étude et transport en casse jusqu'à la cave

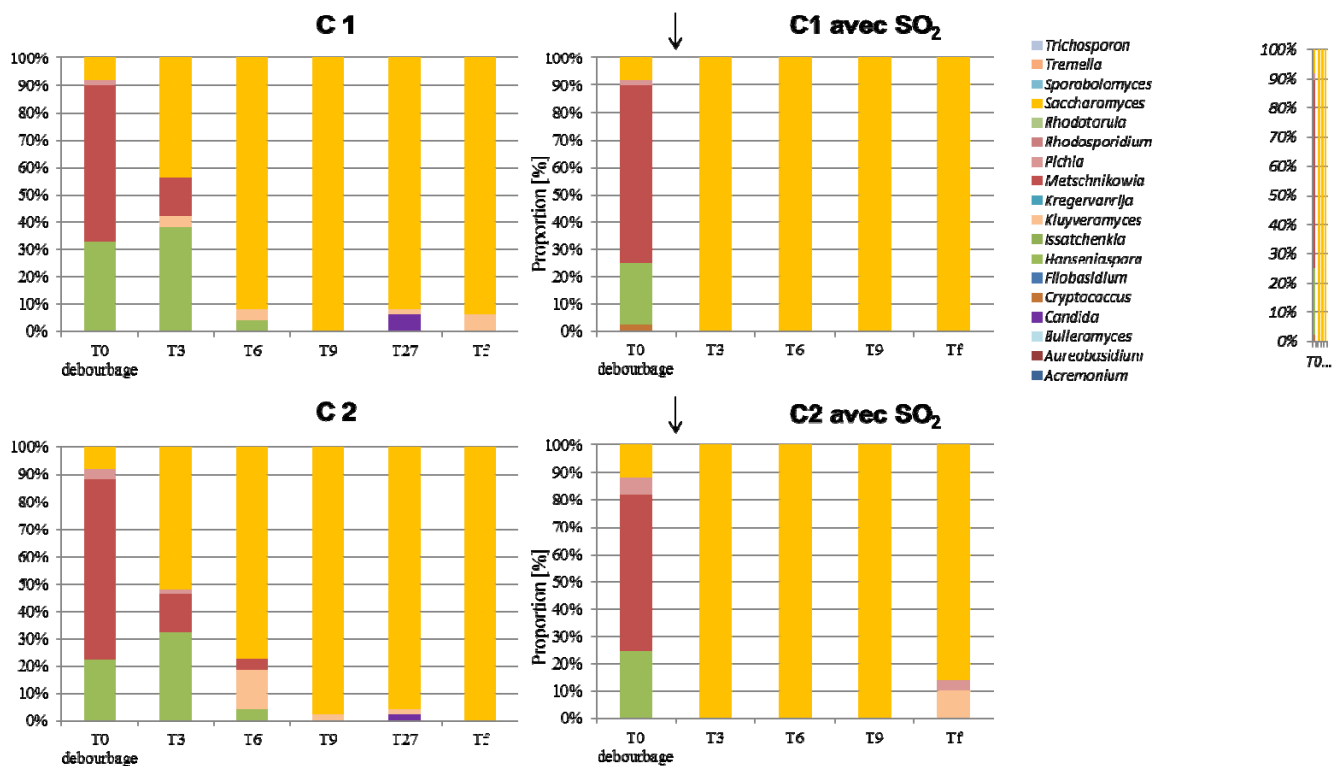


120 Kg

Pressurage hydraulique
+ clarification une nuit à
10°C



La diversité levurienne est mesurée après débouillage et après ajout de SO₂.



L'ajout de SO₂ modifie la diversité levurienne. De même, la production d'éthanol effectue une sélection des levures.

Le genre *Saccharomyces* devient prédominant dans tous les cas, mais plus rapidement avec l'ajout de SO₂.

Conclusions

Les étapes pré-fermentaires diminuent et remanient la diversité levurienne.

Des genres non détectés sur les baies sont identifiés dans les moûts.

Le SO₂ inhibe certains genres *non-Saccharomyces* comme *Pichia* et *Hanseniaspora* mais d'autres comme *Metschnikowia* peuvent perdurer.

L'implantation du genre *Saccharomyces* est facilitée en présence SO₂.

FLORE DE RAISIN / FLORE DE CAVE INTERET DES NON-Saccharomyces

Michèle Guilloux-Bénatier
Equipe VALMiS (Vin Aliment Microbiologie et Stress)
UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques)
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin « Jules Guyot »
Université de Bourgogne

Ce travail a été mené dans le cadre de la thèse de Cédric Grangeteau dans l'équipe du professeur Hervé Alexandre, sous la responsabilité de Sandrine Rousseaux et Michèle Guilloux-Bénatier, avec le soutien financier du Conseil Régional de Bourgogne et du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne.

INTRODUCTION

Un des objectifs du travail de thèse en cours est de caractériser la biodiversité levurienne :

- Des baies de raisin ;
- Dans les moûts de raisin issus de ces baies et au cours de la fermentation alcoolique ;
- Dans l'environnement de la cuverie (avant, pendant et après vinification).

Et ce, sur plusieurs millésimes, afin de mesurer l'influence de la flore résidante de cave sur les populations de levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*.

Une des questions est également de savoir si les genres de levures présents une année N le sont toujours en année N+1.

Que sait-on ?

Il existe beaucoup d'études sur *Saccharomyces cerevisiae* et beaucoup d'entre elles, réalisées récemment, ont montré que les levures présentes sur les bois, le sol, le matériel... se retrouvent dans le milieu en vinification. Sont-elles impliquées dans la fermentation alcoolique ?

Il a également été montré que la **flore résidante de cave est impliquée dans la fermentation** mais spécifiquement en ce qui concerne *Saccharomyces cerevisiae*.
(Lejeune et al. – 2006, Lopes et al. – 2007, Mercado et al. – 2007)

Aucune étude sur les non-*Saccharomyces* ne semble avoir été menée.

Quand ce travail démarre, il n'existe pas de méthode d'analyse capable de discriminer des souches appartenant à une même espèce (intra-spécifique) pour des non-*Saccharomyces*, ce qui peut expliquer l'absence de références.

Une méthode a depuis été développée.

ORIGINE DES SOUCHES DE *Saccharomyces* SUR LE MILLESIME 2012

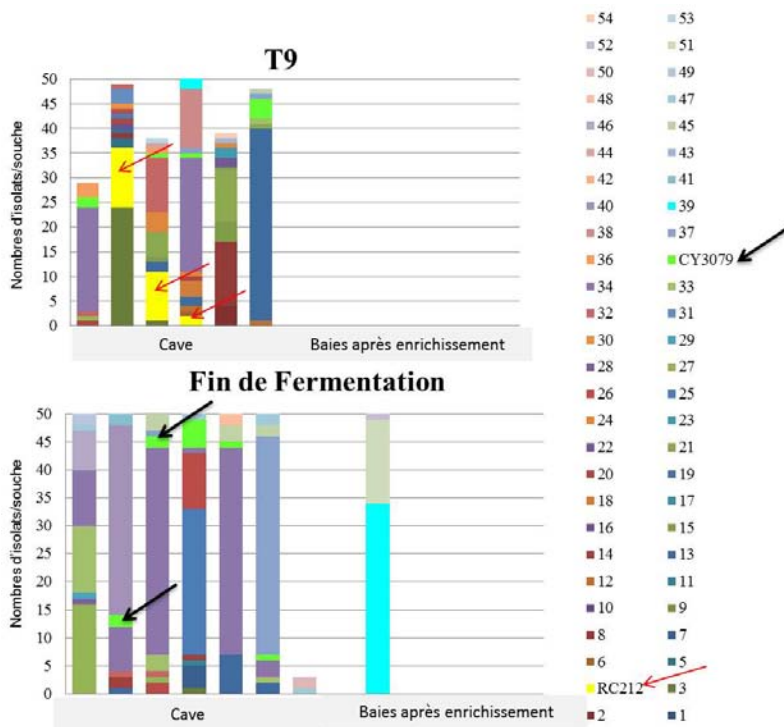
On sait **qu'il n'y a pas ou peu de levures *Saccharomyces* sur les baies de raisin.**

Les levures sont isolées à partir des baies de raisins (milieu pour *Saccharomyces*) et également après technique « d'enrichissement » : fermentation alcoolique des baies de raisins pressées manuellement en milieu stérile.

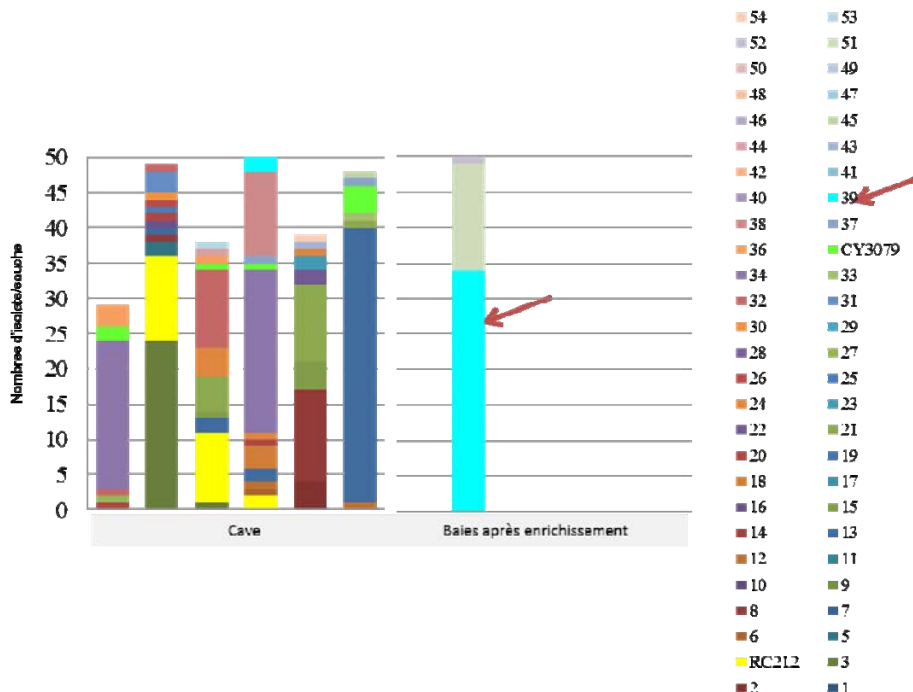
Les souches de levures sont ensuite, également isolées au cours de la fermentation alcoolique et identifiées par technique moléculaire.

Les résultats confirment **la très faible présence de *Saccharomyces* sur les baies**, puisqu'elles sont isolées en utilisant la technique d'enrichissement.

La majeure partie des souches isolées pendant la fermentation alcoolique sont des *Saccharomyces cerevisiae* et de nombreux individus différents sont présents, il s'agit d'une population polyclonale (54 souches).



Les raisins sont les premiers de ce millésime à être vinifiés dans la cuverie du Centre Interprofessionnel Technique des Vins de Bourgogne, aucun ajout de levures sélectionnées n'a donc eu lieu dans cette cave, pour cette campagne. Pourtant, les deux types de levures sèches couramment utilisés dans cette cave sont retrouvés dans les moûts au cours de la fermentation alcoolique (RC212 et CY 3079). Elles sont donc présentes dans la cave.



Pour un des lots, une des souches de *Saccharomyces cerevisiae* identifiée après la technique d'enrichissement est retrouvée en cours de fermentation alcoolique, elle provient donc de la baie. Elle est en faible proportion. **La plupart du temps, les souches qui réalisent la fermentation alcoolique sont vraisemblablement les souches présentes dans la cuverie.**

Conclusions :

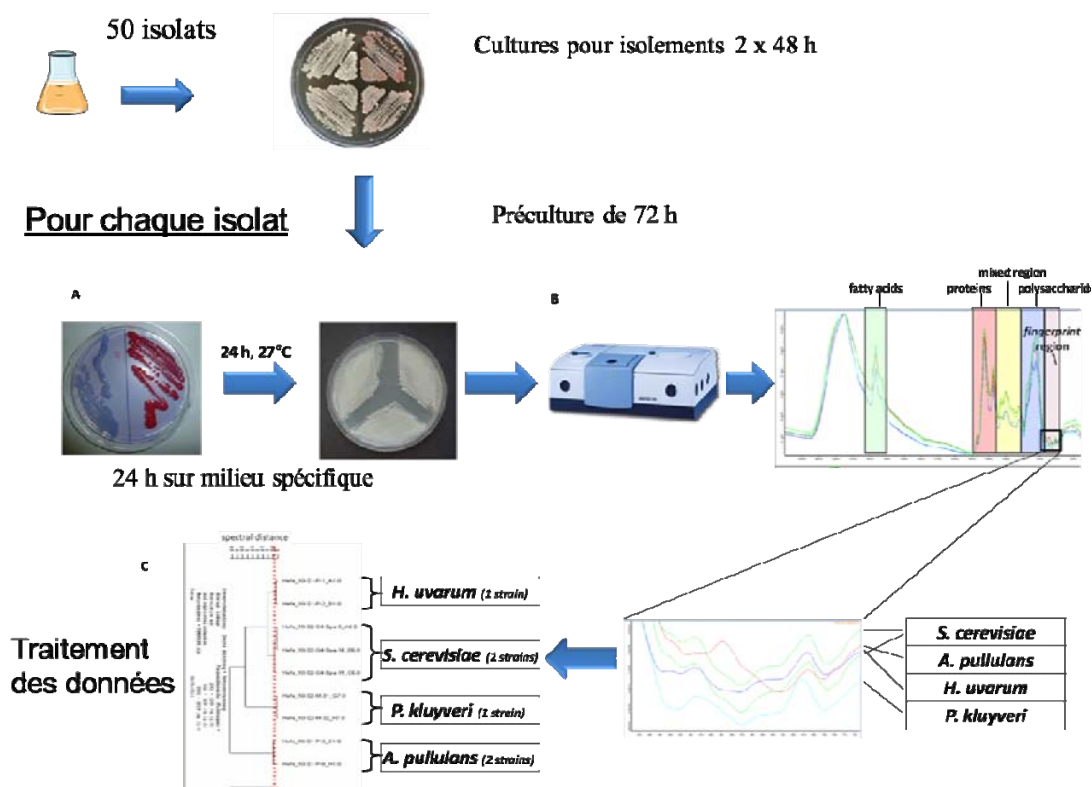
« L'origine cave » est très importante. Il est possible de retrouver **des souches qui proviennent des baies mais, si elles sont présentes, elles restent très minoritaires**. Il y a une distribution polyclonale au cours de la fermentation alcoolique, c'est-à-dire qu'il y a **beaucoup d'individus différents**.

Ces résultats étaient déjà connus et trouvés dans la littérature mais ils sont confirmés par ces travaux.

QU'EN EST-IL DES LEVURES NON-*Saccharomyces* ?

Pour étudier la biodiversité des levures non-*Saccharomyces*, l'équipe de l'Université de Bourgogne a travaillé en collaboration avec l'Université de Geisenheim en Allemagne. En effet, cette dernière a mis au point une méthode utilisant la spectroscopie infra-rouge (IRTF) permettant l'identification des genres et/ou espèces présents dans un échantillon. Pour certaines espèces, il est même possible d'aller jusqu'à la souche.

Il s'agissait de la **première étude concernant les levures œnologiques grâce à cette méthode**. Cette technique a l'avantage d'être beaucoup moins chères que les procédés classiques et de pouvoir traiter beaucoup d'échantillons.



L'identification se fait à partir de la composition de la paroi des levures. Les spectres obtenus sont caractéristiques du genre et, à l'intérieur du genre, des espèces. Pour certaines espèces, il est possible de descendre jusqu'à la souche.

L'étape la plus longue est le traitement des données en final.

ORIGINE DES SOUCHES DE *Candida* SUR LES MILLESIMES 2012 et 2013

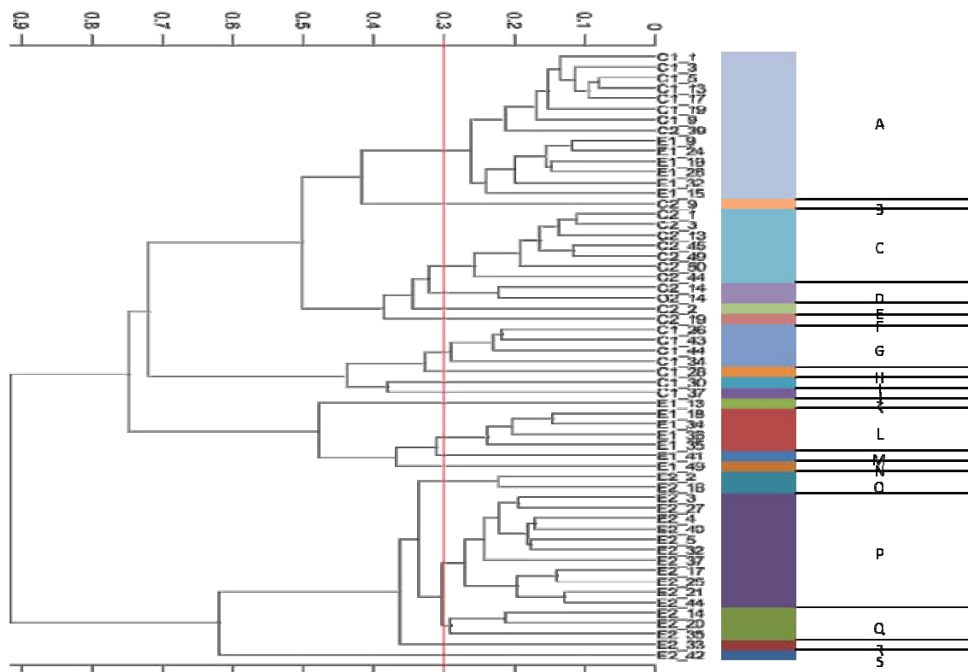
Le protocole est le même que pour les levures *Saccharomyces*, sauf pour l'identification qui est donc réalisée en IRTF.

Millésime 2012

	Baies de raisin	Après enrichissement	Cave Moût à T=0j	Cave pendant FA
Présence	non	oui	oui	oui
Nombre d'isolats de <i>Candida</i>	0	17	50	135
Nombre total d'isolats	208	725	263	1184

Sur baies de raisins, ce genre n'est pas identifié. La recherche se fait sur un lessivat des baies. Après enrichissement, des levures *Candida* sont mises en évidence, elles sont donc présentes sur les baies mais restent très minoritaires (2,3 %). C'est un genre peu représenté.

Toutefois, ces levures sont bien présentes en moût avant (T=0 → 11 %) et en cours de fermentation alcoolique (FA → 19 %), l'environnement cave est donc important.



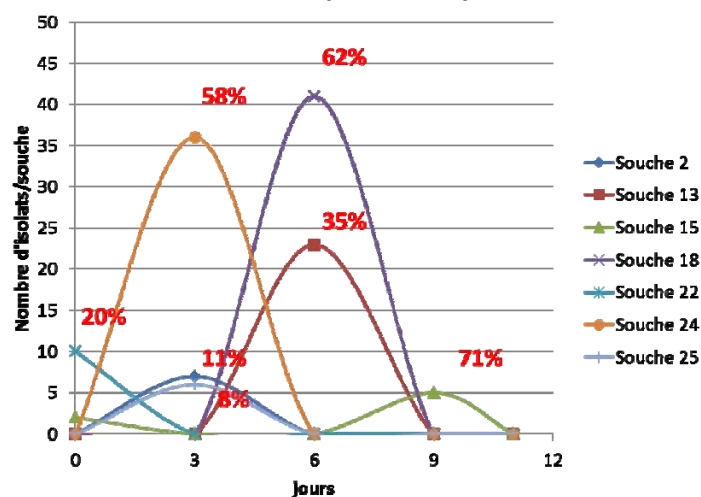
Ce que montre cet arbre, c'est qu'il n'y a, au final, **qu'une seule espèce de *Candida* : *Candida zemplinina*** mais **33 souches différentes** : distribution polyclonale.

	Origine baies après enrichissement	Cave Moût à T=0j	Cave pendant FA T=3jet T=6j	Cave pendant FA T=9j	Cave pendant FA T=11j
Présence	oui	oui	oui	oui	non
Nombre d'isolats de <i>Candida zemplinina</i>	17	50	128	7	0
Nombre de souches différentes	3	18	11	3	0

Au départ, par la technique d'enrichissement, seules 3 souches différentes sont retrouvées. Leur nombre augmente en moût juste avant fermentation alcoolique. Cette augmentation de diversité est sans doute liée à l'environnement de la cave.

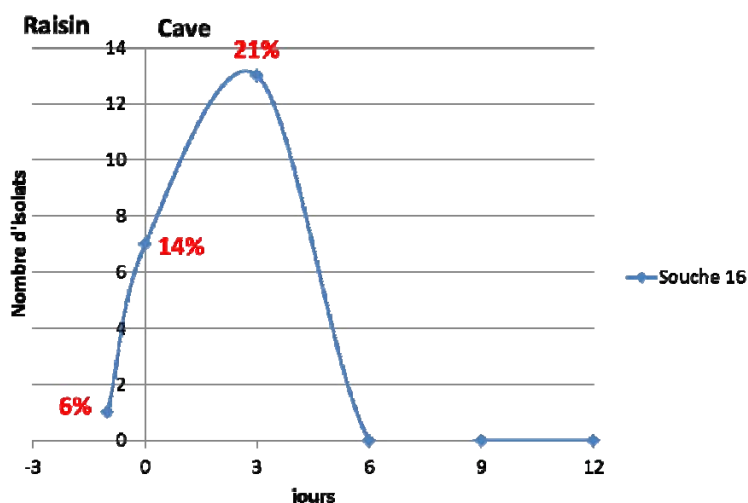
Il y a donc **une grande diversité chez *Candida zemplinina*** (33 souches pour 202 isolats) mais une diminution de la biodiversité est observée au cours de la fermentation alcoolique.

Succession des souches de cave pendant la fermentation alcoolique



Une succession de souches majoritaires (c'est-à-dire présentes dans plus de 4 isolats) est observée mais aucune ne s'implante. **Aucune souche ne prend le pas sur les autres.**

Suivi de la seule souche provenant des baies de raisins



La souche 16 est la seule provenant des baies de raisins à être présente au cours de la fermentation alcoolique. Elle est présente après 3 jours mais disparaît au bout de 6 jours. Elle est donc très minoritaire sur baies et ne s'implante que pendant les premiers jours de la fermentation alcoolique.

Millésime 2013

Aucune souche de *Candida* n'est trouvée :

- Sur baies ;
- Dans l'environnement cave avant et après vinifications ;
- Dans les moûts au cours de la fermentation alcoolique en cave.

Ce genre ne semble donc pas persister d'une année sur l'autre.

Conclusions

Une seule espèce du genre *Candida* est identifiée : *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*).

La **présence sur baies est très minoritaire**.

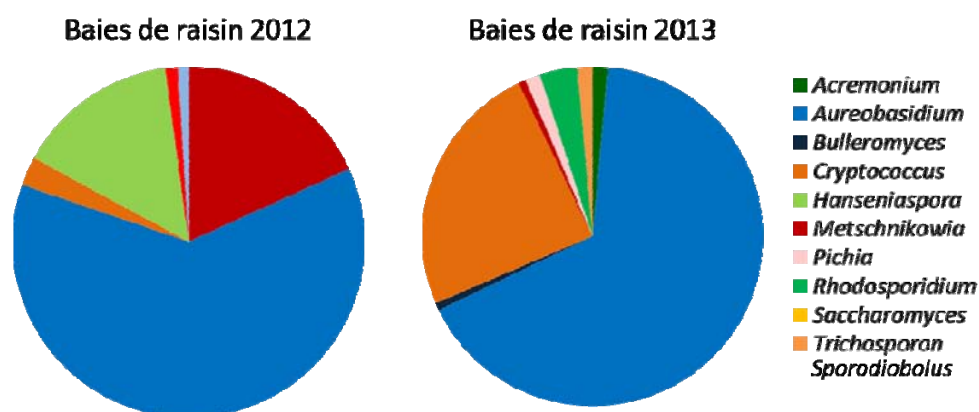
Elle **joue sans doute un rôle dans la fermentation alcoolique** car elle s'implante en moût (*travaux de M. Sadoudi – Revue des Œnologues*).

Aucune souche ne s'implante durablement au cours de la fermentation alcoolique, les souches se succèdent sans perdurer.

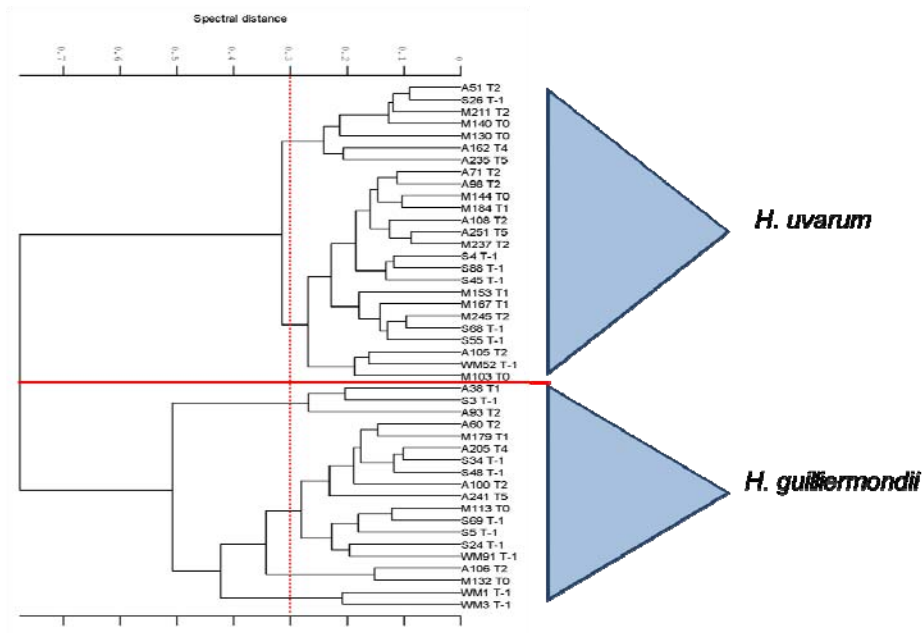
Il ne semble **pas y avoir de persistance sur 2 millésimes successifs**.

ORIGINE DES SOUCHES DE *Hanseniaspora* SUR LES MILLESIMES 2012 et 2013

Le protocole suivi est le même que pour le genre *Candida*.

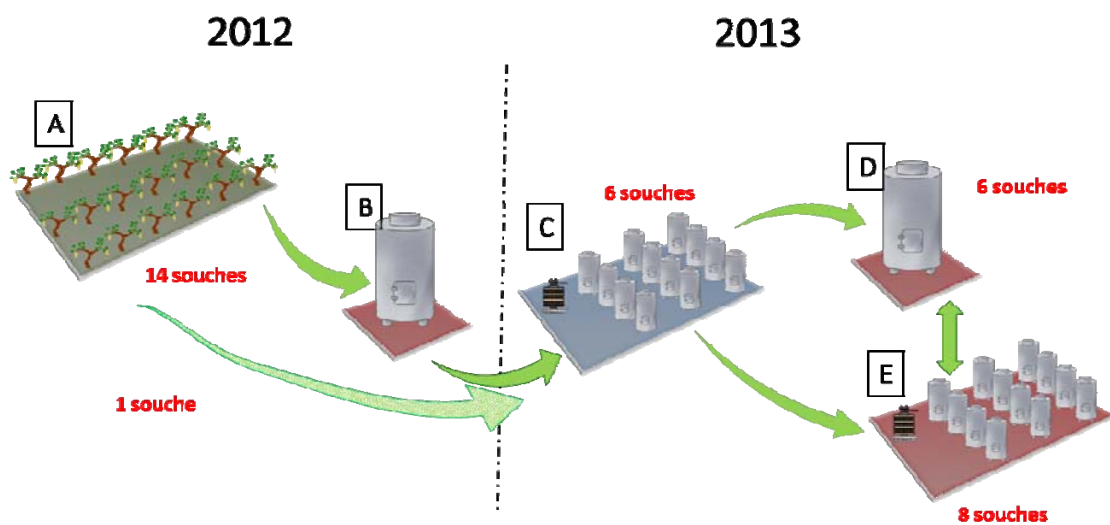


Le genre *Hanseniaspora* est identifié sur baies en 2012 mais dans peu d'isolats (15 %). Il n'est pas trouvé en 2013. Toutefois, la technique d'enrichissement n'a pas été pratiquée, il est possible qu'il y ait des levures de ce genre mais très minoritaires.



La technique IRTF développée par l'Université de Geisenheim est utilisée. **2 espèces** d'*Hanseniaspora* sont identifiées avec une **riche diversité** (185 souches différentes sur 1 165 isolats).

Persistence de souches isolées en 2012 et retrouvées dans la même cave en 2013 :



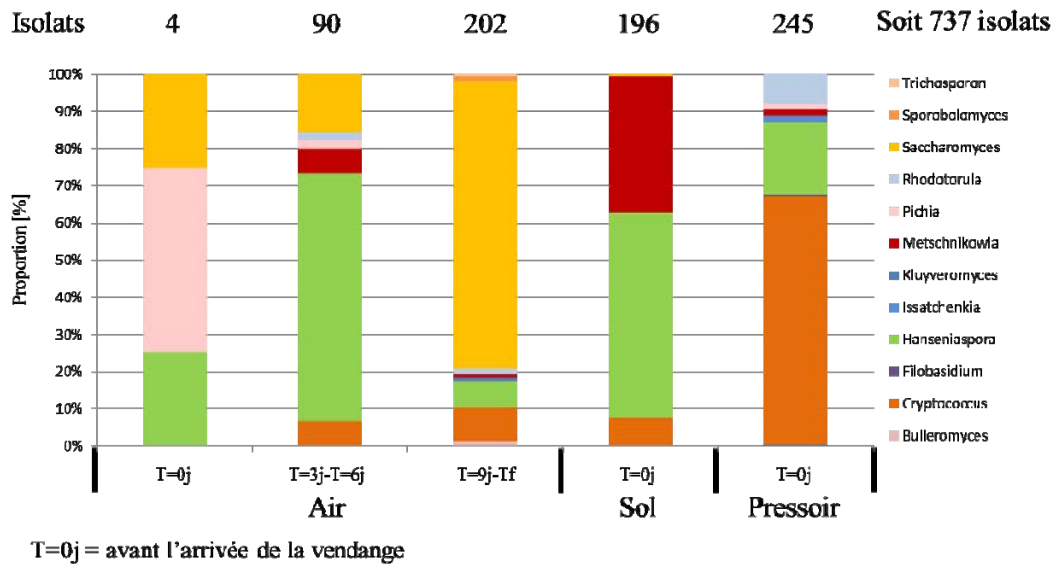
A : vignoble 2012 ; B : moûts 2012 ; C : environnement cave 2013 avant l'arrivée de la vendange ; D : moûts 2013 ; E : environnement cave 2013 pendant la FA

14 souches identifiées au vignoble en 2012 sont retrouvées dans les moûts 2012. 1 souche identifiée au vignoble en 2012 est retrouvée dans l'environnement cave en 2013, alors qu'elle n'était pas présente dans les moûts 2012.

6 souches présentes dans les moûts 2012 sont mises en évidence dans l'environnement cave en 2013, avant l'arrivée de la vendange, et dans les moûts de 2013.

Enfin, dans l'environnement cave après fermentation alcoolique 2013, 8 souches 2012 sont retrouvées.

Comment pourrait se faire le transfert de levures ?



Beaucoup de prélèvements ont été réalisés dans l'air pendant la fermentation alcoolique. *Hanseniaspora* est très présent. 35 % des isolats réalisés en cave en 2013 sont des *Hanseniaspora*.

Conclusions

La **principale origine des levures *Hanseniaspora* est la cave**, l'origine baies est très minoritaire. Il y a une **diversité importante**, beaucoup d'individus différents (distribution polyclonale).

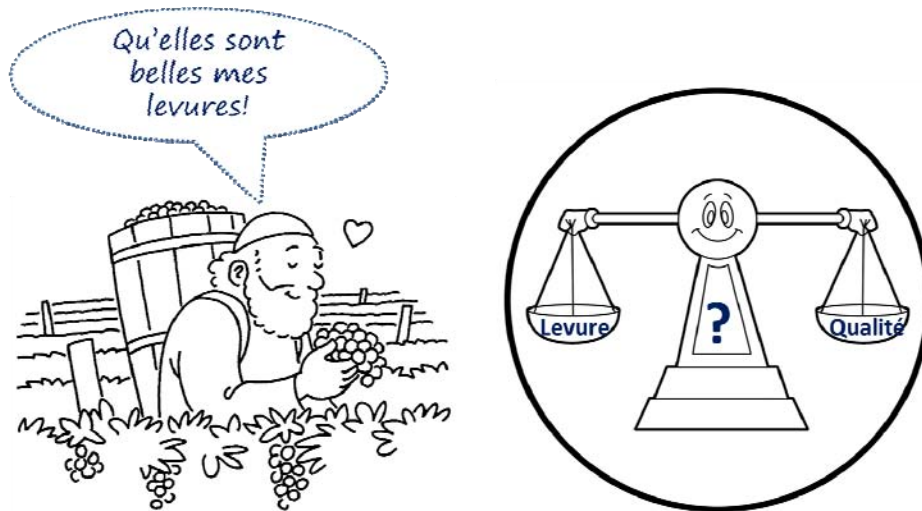
Certaines souches persistent d'une année sur l'autre dans la cave. Il serait intéressant d'étudier ce point pour savoir s'il s'agit de phénomènes d'adaptation ou de résistance.

Dans le vignoble, il se dit qu'il existe « des caves à Brett », dans le même esprit, cela ne viendrait-il pas d'individus ayant développé une résistance ?

APPROCHES TECHNIQUES ET RISQUES LIES A LA FLORE LEVURIENNE

Vincent Gerbaux
Institut Français de la Vigne et du Vin – Unité de Beaune

INTRODUCTION



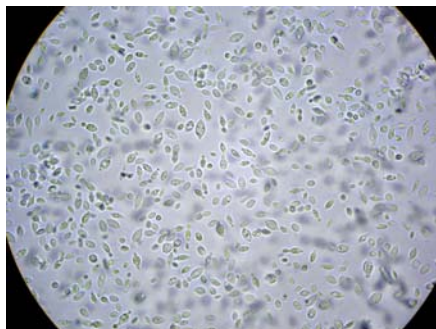
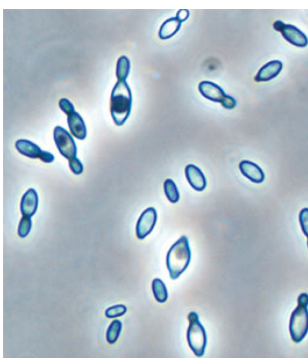
La vinification peut-être découpée en 3 grandes phases :

- La phase pré-fermentaire qui dure quelques heures. Le milieu est propice au développement des levures du fait de l'absence d'alcool et de la présence de nutriments en quantité. Les levures à croissance rapide sont favorisées, notamment *Kloeckera apiculata*.
- La phase fermentaire qui dure quelques semaines. Avec le développement de la fermentation alcoolique, *Saccharomyces cerevisiae* devient progressivement dominante.
- La phase post-fermentaire qui dure quelques mois. Le milieu est appauvri (moins de nutriments) et riche en alcool. Seules quelques espèces de levures sont capables de résister dont *Brettanomyces bruxellensis*.

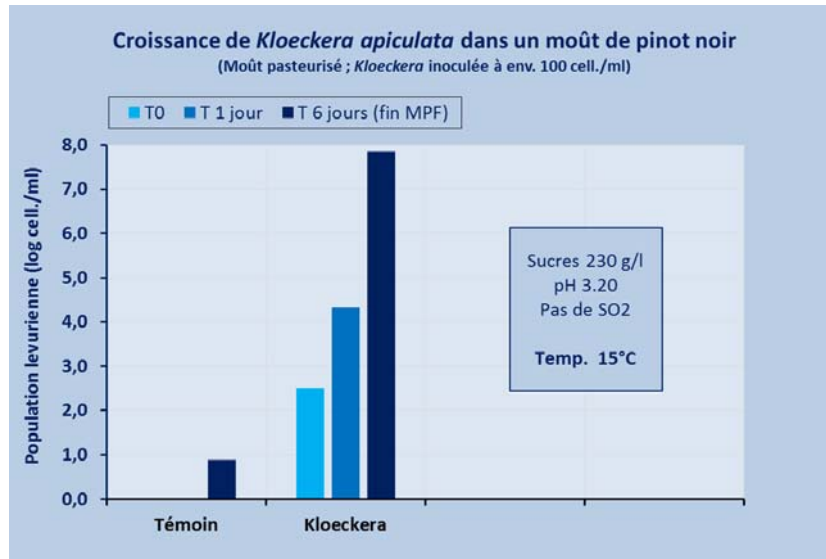
Durant la vinification, l'**hygiène** et le **sulfitage** impactent fortement la flore levurienne.

Kloeckera apiculata (*Hanseniaspora uvarum*)

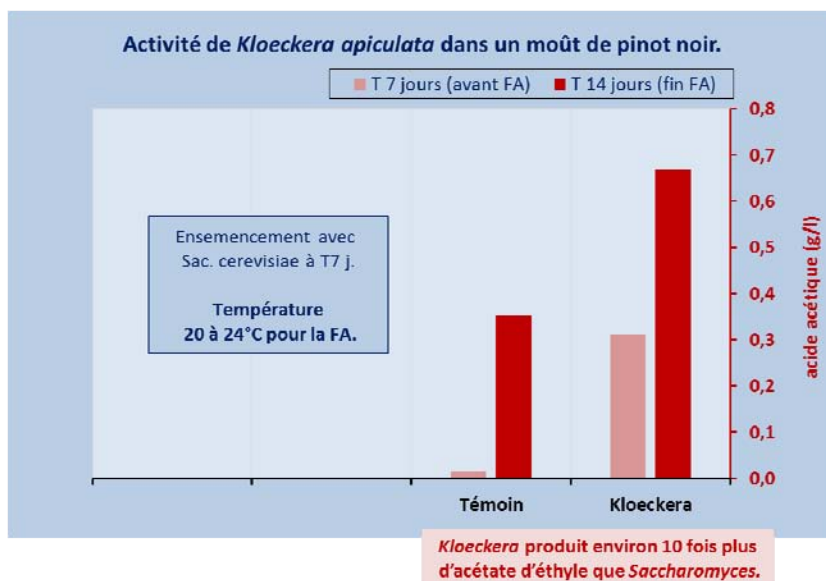
Il s'agit d'une levure productrice d'acide acétique et d'acétate d'éthyle. Elle a une forme caractéristique apiculée.



Crédits photo : Lisa Van de Water
Source : Internet



Pour une contamination de départ de 100 cellules/ml environ, *Kloeckera* atteint 100 millions de cellules/ml en 6 jours. Son développement est très rapide à 15 °C qui est une température classique de macération pré-fermentaire à froid.



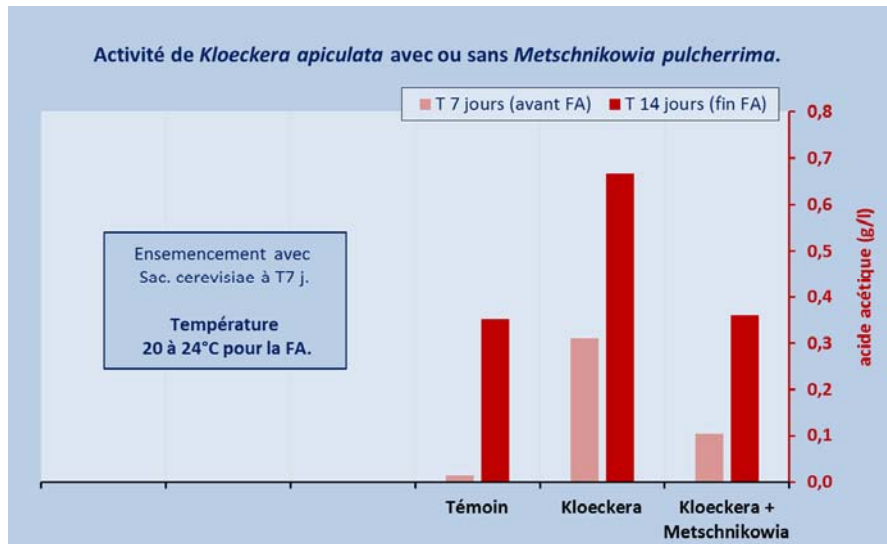
La concentration en acide acétique est mesurée avant fermentation alcoolique et en fin de fermentation alcoolique. ***Kloeckera apiculata* produit beaucoup d'acide acétique et d'acétate d'éthyle** (10 fois plus que *Saccharomyces cerevisiae*) durant la fermentation alcoolique. Cela entraîne des **déviations organoleptiques et notamment le goût piqué.**

Dès le départ, avant même l'enclenchement de la fermentation, la teneur en acide acétique est élevée et presque équivalente à la teneur mesurée à l'issue de la fermentation alcoolique sur le témoin.

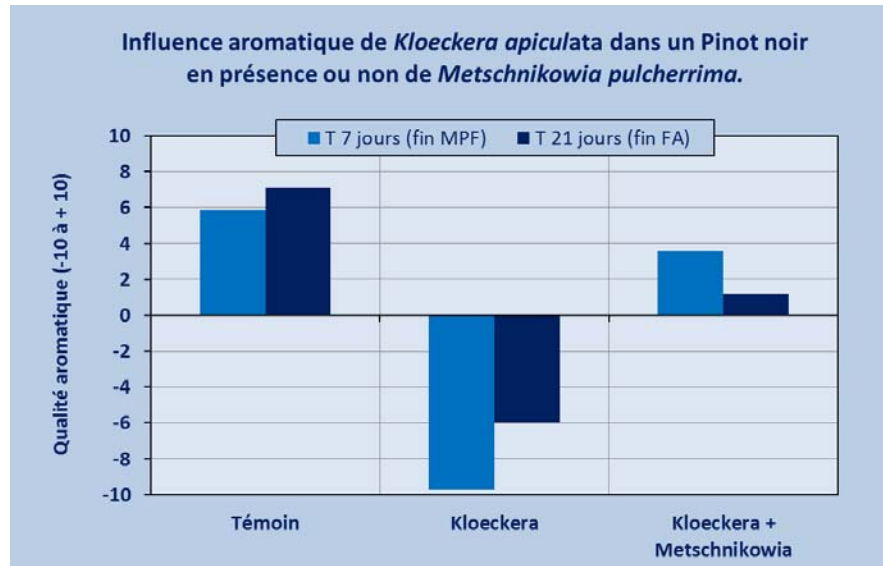
Il est possible de **bloquer l'activité de *Kloeckera apiculata*** :

La solution classique consiste à pratiquer un **levurage précoce avec *Saccharomyces cerevisiae*** pour coloniser le milieu et enclencher la fermentation alcoolique. En effet, *Kloeckera apiculata* est inhibée par une teneur en alcool de 5 à 7 % v/v.

Une autre solution, plus innovante, consiste à pratiquer un **levurage précoce avec *Metschnikowia pulcherrima***, qui est une levure **très courante sur le raisin, non fermentaire et non productrice d'acide acétique, afin de coloniser le milieu** (bio-contrôle) et développer des arômes. (L'IFV Beaune a sélectionné une souche de *Metschnikowia pulcherrima* pour la maîtrise de la phase pré-fermentaire : Gaïa MP_{98,3}).



Dans le cas d'un levurage avec *Metschnikowia* en présence de *Kloeckera*, la production d'acide acétique en fin de fermentation alcoolique est identique à celle du témoin. Cette méthode permet **d'éviter l'altération du vin due à *Kloeckera* par utilisation de bio-contrôle.**



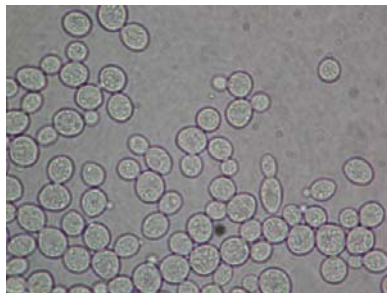
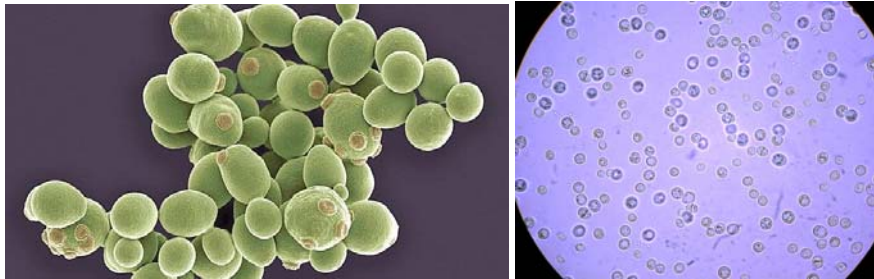
La qualité aromatique du témoin est jugée très bonne en fin de macération pré-fermentaire et en fin de fermentation alcoolique.

En présence de *Kloeckera*, la qualité aromatique du moût est très largement dépréciée et ce même avant fermentation alcoolique, du fait de la production d'arômes négatifs (note piquée).

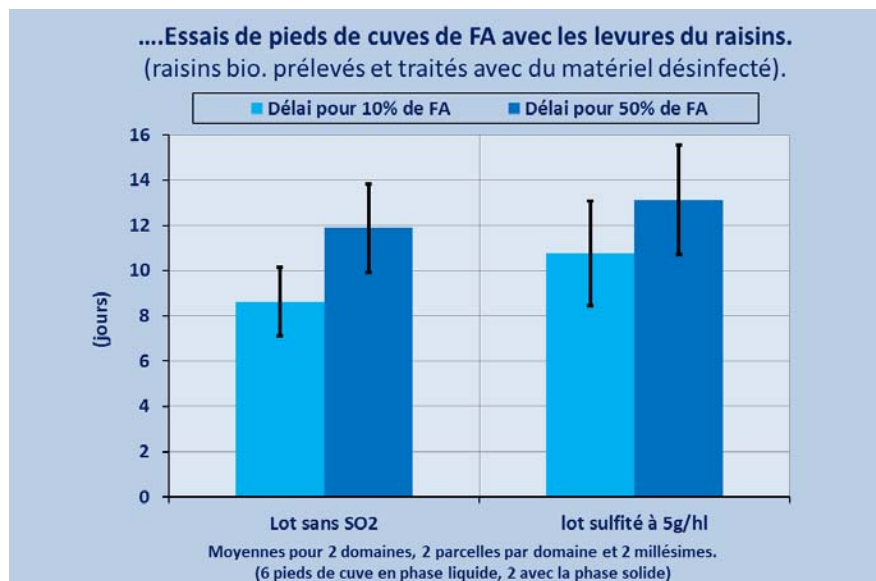
En présence de *Metschnikowia* et *Kloeckera*, la qualité aromatique est jugée correcte même si elle reste inférieure au témoin. La présence de *Metschnikowia* limite donc, pratiquement totalement, l'impact organoleptique négatif de *Kloeckera*.

Saccharomyces cerevisiae

C'est la levure de base du vin mais elle est peu présente sur les raisins.



Source : Internet



Pour éviter l'impact de la flore de cave, les cuves et le matériel ont été nettoyés avec un produit aseptisant. Ainsi, dans le milieu, seules la flore indigène des raisins est présente.

Il faut 9 à 11 jours pour que la fermentation alcoolique démarre, et 12 à 13 jours pour que le pied de cuve soit actif.

**Photos des pieds de cuve FA après 9 jours d'incubation à env. 20°C
(mini-cuves inox avec couvercles – Millésime 2013)**



Crédit photos : BIVB/IFV

Après 9 jours d'incubation à 20 °C des pieds de cuve avec ou sans SO₂, **des développements de moisissures** sont observés à la surface. Elles se développent plus vite que les *Saccharomyces* du raisin.

Ce phénomène est peu observé dans les conditions pratiques d'une cuverie de domaines car les levures *Saccharomyces cerevisiae* de la cave (et non des raisins) s'implantent et enclenchent la fermentation alcoolique.

Pour **enclencher la fermentation alcoolique**, il est possible de **laisser les levures *Saccharomyces cerevisiae* de la cave** coloniser la cuvée. Attention à l'excès d'hygiène, dans un milieu aseptisé, ce sont les moisissures qui se développeront en premier lieu.

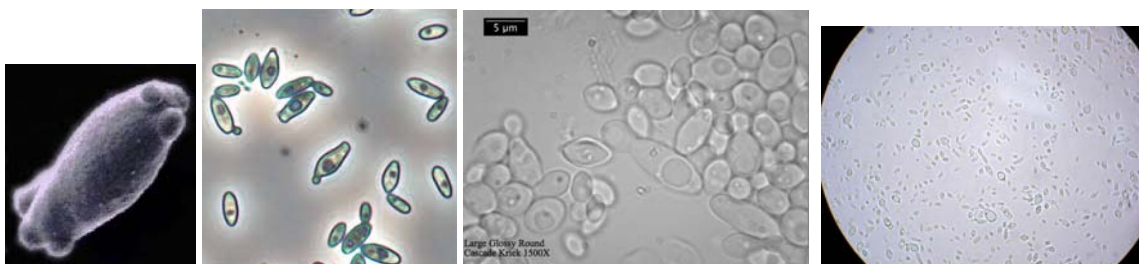
Il est également possible **d'ensemencer avec un pied de cuve**. Il faut également faire attention à l'excès d'hygiène pour ces pieds de cuve.

Une autre solution est **d'ensemencer avec une biomasse sélectionnée de *Saccharomyces cerevisiae* (LSA)**.

Quelle que soit la technique envisagée, il n'y **pas ou peu de rémanence des souches majoritaires d'une année sur l'autre**. Elles peuvent être présentes mais en quantité faible.

Brettanomyces bruxellensis (*Dekkera bruxellensis*)

La levure de l'extrême.....



Source : Internet

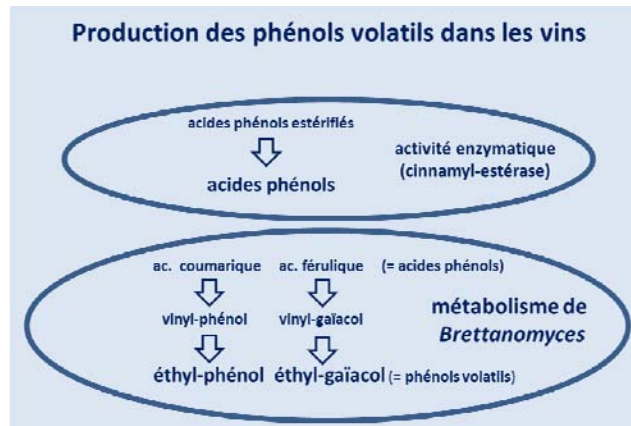
Brettanomyces est la seule levure capable de se développer dans un vin sec (avec les levures de voile).

Les vins sont très exposés jusqu'à la stabilisation de fin de fermentation malolactique. Des développements ultérieurs sont possibles même en bouteilles.....

Les vins rouges sont d'autant plus concernés qu'ils contiennent des quantités importantes de précurseurs des phénols volatils mais les vins blancs ne sont pas épargnés.

***Brettanomyces* est présente dans toutes les caves !**

Rappel :



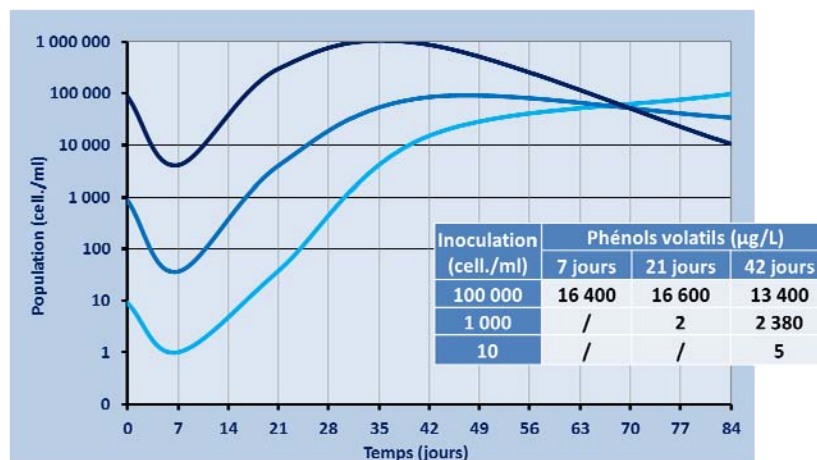
Brettanomyces transforme les acides phénols en **phénols volatils qui entraînent des déviations organoleptiques.**

L'éthyl-phénol développe des odeurs de sueur de cheval, encre de chine, gouache.... Et l'éthyl-gaïacol développe des odeurs pharmaceutiques, camphre....

Certaines enzymes œnologiques contiennent de la cinnamyl-estérase qui produit les acides phénols. Pour éviter la formation de ces précurseurs, il faut utiliser dans enzymes « FCE » (free cinnamyl-estérase).

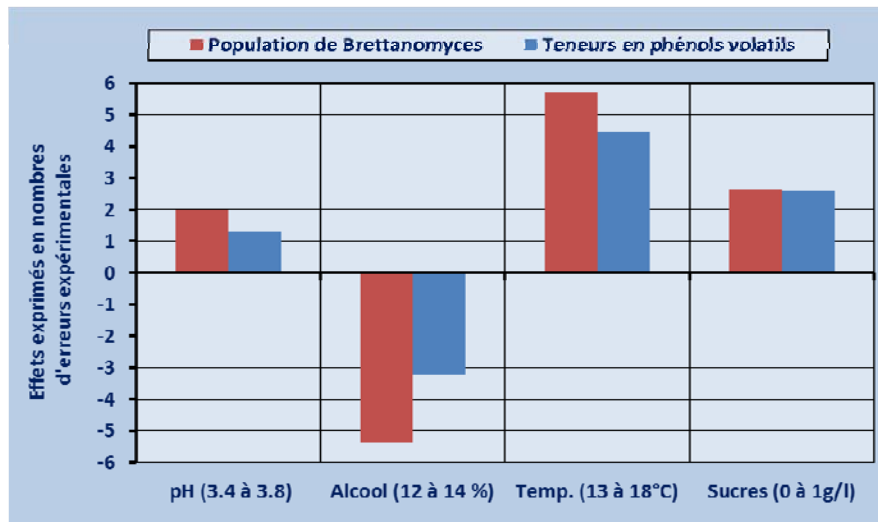
Il faut noter qu'en vinification en blanc (et non en rouge), *Saccharomyces cerevisiae* produit des vinyl-phénols à partir des acides phénols, mais pas d'éthyl-phénols.

Activité de *Brettanomyces*, inoculée à différents taux, dans un vin de Pinot noir « sec » (enrichi en acides phénols).



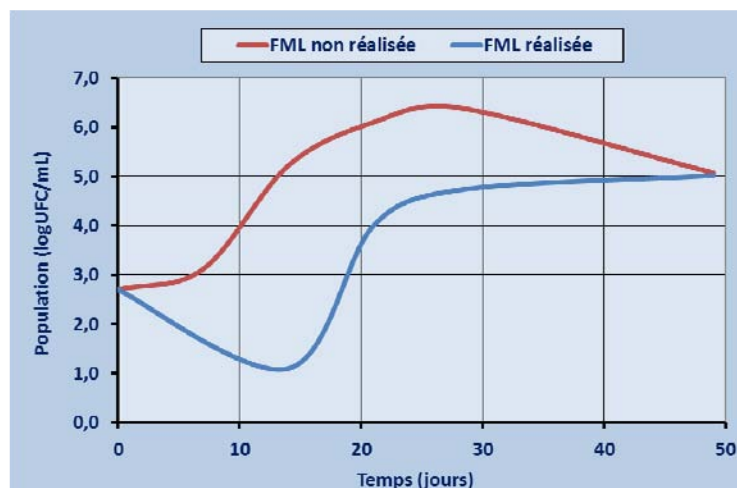
Les *Brettanomyces* mettent environ 7 jours à s'adapter avant de commencer leur croissance. **Elles vont consommer tous les acides phénols et produire des phénols volatils, même si la population de départ est faible.** Le temps nécessaire sera simplement plus long.

Influences de facteurs physico-chimiques sur la croissance et l'activité de *Brettanomyces* dans un vin rouge (plan d'expérience fractionnaire).



Pour le développement des *Brettanomyces*, les deux facteurs les plus impactants sont la température et la teneur en alcool. **Plus le vin est riche en alcool, moins *Brettanomyces* pourra se développer. De même, plus la température sera élevée, plus l'activité des *Brettanomyces* sera favorisée.** Le pH est un facteur peu déterminant pour leur développement.

Influence de la FML sur la croissance de *Brettanomyces* dans un vin de Pinot noir.



Au final, la croissance des *Brettanomyces* est équivalente dans le vin qui a effectué sa fermentation malolactique et dans celui qui ne l'a pas faite. Cependant, les fluctuations et les niveaux de populations atteints dans les 2 cas ne sont pas les mêmes.

Les *Brettanomyces* se développent beaucoup plus vite et atteignent des niveaux de population plus élevés dans le vin où la fermentation malolactique ne se fait pas.

Que se passe-t-il après la mise en bouteilles ?

A ce stade, il est **impossible d'intervenir**.

Un vin de Pinot Noir est contaminé avec environ une cellule de *Brettanomyces* pour 10 ml de vin. Le vin contaminé est ensuite réparti dans 400 tubes de 20 ml. **Chaque tube contient de 0 à 3 cellules de *Brettanomyces*.**

Au bout d'un an de conservation à 15 et à 18 °C, le nombre de tubes contenant une population de *Brettanomyces* supérieure à 100 000 cellules/ml, est compté.

Après 1 an à 15 °C, 72 % des tubes ont une population de *Brettanomyces* > à 10⁵ cellules/ml.

Après 1 an à 18 °C, 88 % des tubes ont une population de *Brettanomyces* > à 10⁵ cellules/ml.

1 cellule suffit pour avoir une contamination importante.

Il est donc important de **stabiliser suffisamment le vin avant mise en bouteilles** pour éviter le développement des *Brettanomyces* et la production de phénols volatils en bouteille. Il est conseillé de **filtrer de manière stérile, notamment en cas de faible sulfitage.**

Il se dit que la filtration stérile impacterait la qualité des vins de Pinot Noir. Un essai a été réalisé pour répondre à cette question.

Cinq expérimentations réalisées avec des vins prêts pour la mise en bouteilles
(généralement uniquement filtrés Kieselguhr)

Analyses sensorielles à 1, 4, 12 mois après la mise en bouteilles

Classement : 1 = meilleur à 4 = moins bon	Témoïn		Cartouche 1.2µm		Différence (%) Filtré / Non Filtré
	11°C	21°C	11°C	21°C	
Somme des rangs (149 tests)	366	372	375	377	2% Non significatif

Les résultats montrent que **l'évaluation sensorielle des vins ne présente pas de différence significative. La filtration stérile ne semble donc pas impacter la qualité des vins.**

Comme il est illusoire d'éradiquer les *Brettanomyces* des caves, il est important de surveiller la population dans les vins.

La cytométrie de flux est une méthode simple et rapide (15 minutes) développée par l'IFV de Beaune qui permet de dénombrer les cellules vivantes.

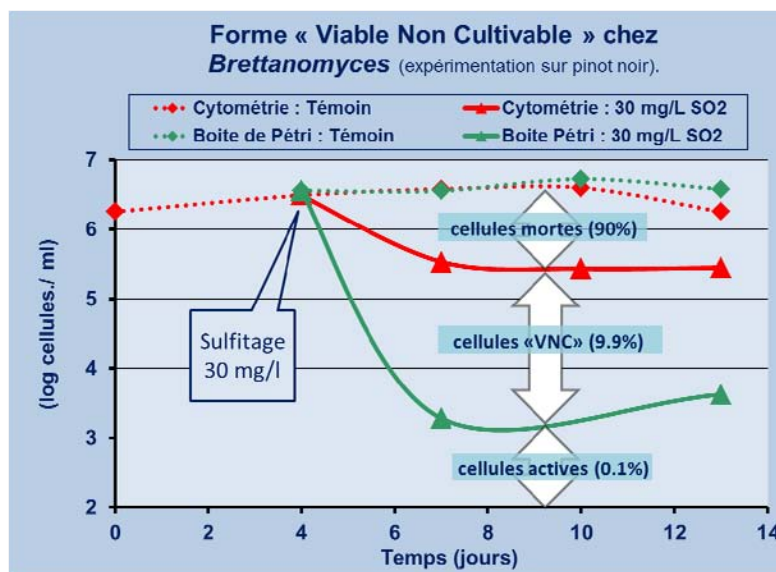
Pour dénombrer une population de *Brettanomyces* par la méthode classique sur boîte de Pétri, il faut une semaine.

Un dénombrement de *Brettanomyces* a été effectué sur 225 vins en cours d'élevage ou en bouteilles a été réalisé :

- 116 vins, soit 52 %, présentent moins de 200 cellules/ml en cytométrie. Tous les résultats sont confirmés en boîtes de Pétri.

- 90 vins, soit 40 %, présentent plus de 200 cellules/ml en cytométrie et en boîtes de Pétri avec un très bon coefficient de corrélation (0,96).
- 19 vins, soit 8 %, présentent plus de 200 cellules/ml en cytométrie et aucune en boîtes de Pétri. Ces cellules peuvent être des *Saccharomyces* en fin de fermentation alcoolique, une flore levurienne de surface ou des *Brettanomyces* dites VNC c'est-à-dire viables mais non cultivables.

Cet état particulier de *Brettanomyces* fait qu'elles ne se développent pas sur un milieu spécifique en boîtes de Pétri, elles sont donc **non cultivables mais elles sont vivantes et détectées en cytométrie de flux**. Ces cellules sont sans doute **capables de se redévelopper quand les conditions sont plus favorables**.



Un sulfitage à 30 mg/l entraîne une mortalité très importante des *Brettanomyces* : 90 %. Toutefois, une partie (10 %) subsiste dans cet état particulier, sorte d'hibernation.

Pour solutionner le problème « Brett », il faut mettre en place **des procédures d'hygiène et éviter les contaminations croisées**. Il est nécessaire également de **définir un plan de contrôle de la population et ponctuellement des phénols volatils**.

Il faut **maîtriser les fermentations alcoolique et malolactique, sulfiter avec la dose nécessaire et suffisante**, notamment en fin de fermentation malolactique et en une seule fois. Il est conseillé de **filtrer de façon stérile pour la mise en bouteilles**.

Seuil de détection des phénols volatils en Bourgogne

Ratio : 2/3 d'éthyl-phénol pour 1/3 d'tétyl-gaïacol. Il a été établi à partir de l'analyse de 379 vins de Pinot Noir et 72 vins de Chardonnay notés phénolés dans le cadre du Suivi Aval de la Qualité (pour des teneurs maximales de 600 µg/l). Ce ratio est une **particularité de la Bourgogne**, dans la littérature, il est plutôt de 9/10 et 1/10.

en µg/l	Chardonnay		Pinot noir	
	Non boisé	Boisé	Non boisé	Boisé
Seuil de détection	128	241	173	231

Les phénols volatils doivent toujours être considérés comme négatifs pour la qualité globale des vins, même à des teneurs proches du seuil de détection (situation très courante pour le Pinot Noir en Bourgogne).

CONCLUSIONS

La sélection naturelle des micro-organismes à la vigne est très différente de celle dans la cave.

Pour réaliser la fermentation alcoolique, *Saccharomyces cerevisiae* doit s'imposer sur d'autres espèces problématiques pour la qualité. Ce n'est pas toujours le cas. Le levurage réduit ce risque.

Brettanomyces est l'ennemi microbiologique n°1 !

Dans le contexte actuel de diminution du SO₂, il est important de reconsidérer les règles d'hygiène, le contrôle microbiologique et la filtration.

Quand la maîtrise de la viticulture et de l'œnologie est atteinte, la microbiologie reste la source des problèmes....

La problématique « Brett » n'est pas nouvelle :

L'ODE AU PINARD

*Salut ! Pinard de l'Intendance
Qu'as goût de trop peu ou goût de rien,
Sauf les jours où t'aurais tendance
A puer le phénol ou bien l'purin.
Y'a même des fois que tu sens l'pétrole,
T'es trouble, t'es louche et t'es vaseux,
Tu vauux pas mieux qu'ta sœur la gnole.
C'est sûr comme un et un fons deux,
Que les riz-pain-sel y vous mélangent
Avec l'eau d'une mare à canards.
Mais qu'y faire ? La soif vous démange...
Salut, Pinard, pur jus des treilles,
Dont un permissionnaire parfois
Nous rapporte une ou deux bouteilles ;
C'est tout le pays qui vit en toi.
Dès qu'on a bu les premières goustes,
Chacun r'trouve en soi son pat'lin...
Es l'on se sent chaud sous les paupières.*

Max Leclerc - 1915



PÔLE TECHNIQUE ET QUALITÉ DU BIVB
CITVB
6 rue du 16^e chasseurs - 21200 Beaune
Tél. 03 80 26 23 74 - Fax. 03 80 26 23 71
technique@bivb.com
Site extranet (réservé aux adhérents du BIVB) :
<https://extranet.bivb.com>