

GESTION DES BRETTANOMYCES EN VINIFICATION BIOLOGIQUE

Brettanomyces est une levure présente naturellement au sein de la flore microbienne du raisin dont certaines souches peuvent persister au chai d'une année sur l'autre et constituer un réel problème pour les vignerons lorsqu'elle dépasse une certaine concentration dans les mouts et les vins. Elle peut être responsable de l'apparition de gout phénolé (sueur de cheval, écurie), de baisse du fruité mais aussi de goûts de souris et d'acidité volatile. Cette fiche technique a pour but de rassembler les connaissances actuelles sur cette levure d'altération et sa gestion possible en vinification biologique.

1. Morphologie

Plus petite que *Saccharomyces cerevisiae*, elle est facilement observable au microscope mais son polymorphisme (capacité à prendre des formes et tailles différentes selon les conditions du milieu dans lequel elle évolue) la rend parfois difficile à identifier. Néanmoins, son bourgeonnement multipolaire et non-axial (photo 1) est très distinctif et permet de la distinguer d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* (photo 2) car elles ne sont jamais aussi rondes, ni même en forme de « citrons » comme les levures apiculées oxydatives (*Kloeckera apiculata*) (les deux levures au centre de la photo 3). Elle peut prendre parfois des formes atypiques sous forme de filaments (photo 4).



PHOTO 1

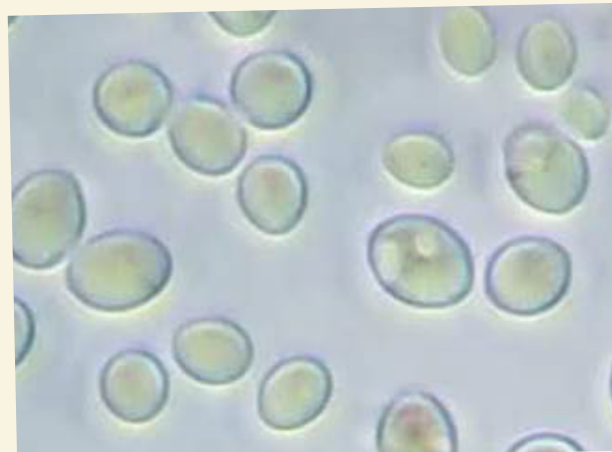


PHOTO 2

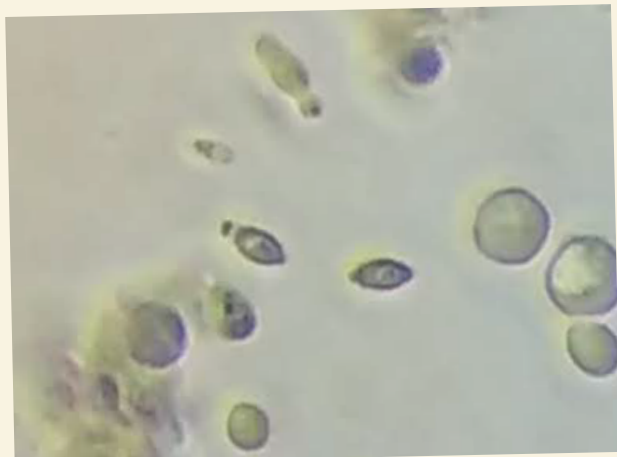
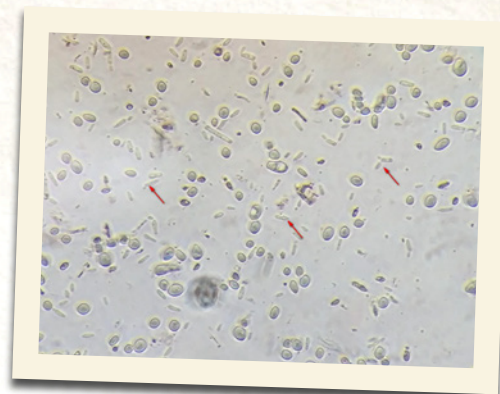


PHOTO 3



PHOTO 4

Les Brettanomyces ont la capacité lorsqu'elles se retrouvent en condition de stress, après un sulfitage par exemple, de passer en état viable non cultivable (VNC). Leurs tailles diminuent en moyenne de 22 % (V. Serpaggi et al., 2011) et elles ne sont plus capables de se développer. La grande majorité des souches s'arrêtent alors de produire des phénols volatils. Dans cet état-là, elles ne sont plus détectables par les techniques de mise en culture sur milieu (Boite de Pétri, Sniff'Brett) mais garde la capacité à repasser ensuite en état viable cultivable lorsque les conditions du milieu redeviennent plus adaptées (augmentation de la température, baisse du SO₂ actif) et retrouve alors leur capacités à produire des phénols volatils.



Photos: Jérémy CÉRON CAB

Brettanomyces en état VNC (flèches rouges)

2. Métabolisme

Nutriments	Besoin nutritif très faible (sucre < 1 g/L, azote organique, vitamine)
Oxygène	Se multiplie jusqu'à 4 fois plus vite en présence d'oxygène mais s'accommode également de son absence
pH	Pas d'influence du pH sur leur développement mais profite des pH élevés, car le SO ₂ libre y est moins actif. Le pH a donc un rôle crucial.
SO₂	0,5 mg/L en SO ₂ actif est nécessaire pour avoir une bonne protection. Certaines souches peuvent être très résistantes au SO ₂ (> 0.8 mg/L SO ₂ actif).
Alcool	Tolérance à l'éthanol élevée (jusqu'à 16 % vol)
Température	Certaines souches se multiplient jusqu'à quasiment 4 fois plus vite à 25°C qu'à 15°C. Pas de développement en dessous de 10°C. Le temps de génération de Brettanomyces reste cependant bien inférieur à celui de <i>S. cerevisiae</i> (quelques jours en élevage contre 5 à 7 heures pour <i>S. cerevisiae</i> en pleine FA).

3. Principaux produits d'altération et descriptions olfactives

■ Phénols volatils

La production de phénols volatils devient significative pour une population de Brettanomyces supérieure à 10³ levures/mL (Chatonnet et al., 1995).

Molécules	Description olfactive	Seuil de perception moyen dans le vin	Ratio 4-EP / 4-EG
4-éthylphénol (4-EP)	Animales, écurie, cheval, sueur	400-600 µg/L	8 à 10/1 dans le sud de la France
4-éthylgâïacol (4-EG)	Fumé, épicé	70-100 µg/L	3 à 5/1 dans le nord de la France

Remarque : La matrice du vin influence très largement le seuil de perception de ces molécules. Certains vins très structurés peuvent supporter des concentrations élevées supérieures à 800 µg/L sans perte de qualité, alors que dans des vins plus légers sur le fruit, le seuil de perception peut être seulement de 200 µg/L.

■ Goûts de souris

Les Brettanomyces peuvent être à l'origine des goûts de souris. Les molécules responsables ne s'expriment qu'en fin de bouche et rappellent l'urine de souris, la peau de saucisson, la cacahouète, le riz basmati ou encore le pop-corn.

■ Acide acétique

Le développement de Brettanomyces s'accompagne souvent d'une augmentation significative de l'acidité volatile (AV) en présence d'oxygène et de sucres résiduels.

■ Acide gras à moyennes chaînes

L'acide octanoïque (C8) et l'acide décanoïque (C10) amènent respectivement des odeurs de « rance » et des notes « pharmaceutique » ou de « savon ». Ces composés sont de vrais exhausteurs des notes phénolées conférées par les phénols volatils produits par Brettanomyces. De plus, ce sont des inhibiteurs de fermentation vis-à-vis de *S. cerevisiae* et des bactéries lactiques, permettant à Brettanomyces de s'implanter encore plus facilement dans le milieu.

4. Notion de souche

Il n'existe pas une Brettanomyces mais une multitude de souches et chaque souche possède des propriétés spécifiques (résistance au milieu, production des métabolites d'altération...).

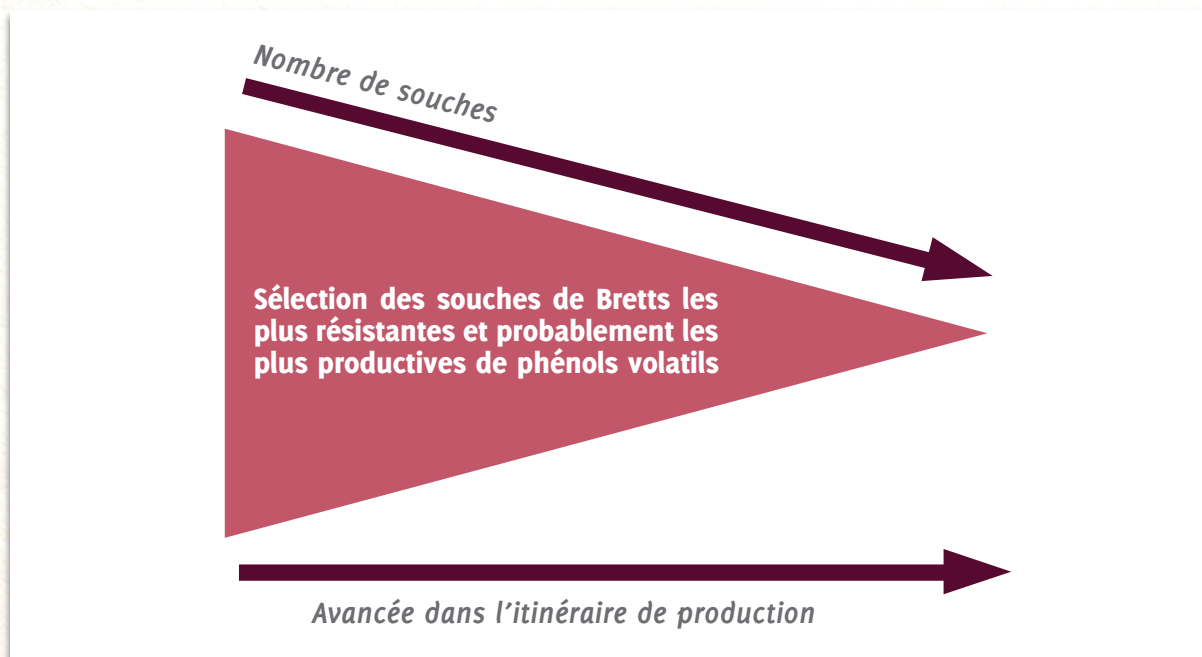


Illustration de sélection naturelle des souches les plus résistantes de Brettanomyces dans le vin au fur et à mesure de l'avancée dans l'itinéraire de production (Brettanomyces et phénols volatils, V.Renouf, 2015)

Remarque : Les Brettanomyces viennent à l'origine des raisins et du vignoble. Elles peuvent néanmoins persister au chai à la surface du matériel au contact avec le raisin et le vin d'une année sur l'autre et participer à leur contamination. Les souches survivantes au chai étant les plus résistantes et potentiellement les plus productives en phénols volatils.

5. Facteurs favorables et gestion des Brettanomyces

a Au vignoble et gestion de la vendange

Facteurs Favorables	Gestion des risques
Maturité : Plus le niveau de maturité progresse, plus la présence de Brettanomyces est élevée. La surmaturité présente un risque augmenté mais le facteur le plus favorable reste l'état sanitaire. Etat sanitaire : Humidité importante, les raisins abimés avec de la pourriture (Botrytis) sont plus souvent porteur de Brettanomyces (jusqu'à 1000 fois plus).	Eviter la surmaturation des baies Tri de la vendange, élimination des baies touchées par Botrytis cinerea qui présentent une population de Brettanomyces significativement plus élevée ainsi que des composés combinant le SO₂, fragilisant encore d'avantage la vendange. Le sulfitage de la vendange doit se faire suivant l'état sanitaire de la vendange mais un ajout de sulfite excessif (> 6 g/hL) n'aura pas d'effet significatif sur les Brettanomyces. Cela pourra même avoir des conséquences négatives en inhibant trop fortement les autres microorganismes du moût (surtout en cas de fermentation indigène) et en augmentant fortement la production d'éthanal par les levures, celui-ci combinant très fortement le SO₂. L'ajout de Levure non-Saccharomyces à la vendange permet d'occuper le milieu rapidement.

b Vinification

Facteurs Favorables	Gestion des risques
Macération pré-fermentaire à froid (MPF) : le risque est augmenté si la température stagne entre 10°C et 15°C.	Si la température ne peut pas être maintenue en dessous de 10°C, mieux vaut renoncer à toute tentative de MPF.
Macération carbonique : les dynamiques microbiennes y sont beaucoup plus hétérogènes en termes de population et de cinétique.	A réserver à une vendange complètement saine. S'assurer que la cuve est saturée en CO₂ tout le long de la macération carbonique, la constitution d'un pied de cuve ou l'ajout de LSA est conseillée.
Non foulage des baies et extraction douce : Hétérogénéité de la masse microbiennes, des substrats (sucres, azote...) et du SO₂.	A réserver à des petits volumes qualitatifs avec un suivi analytique attentif.
Fermentation languissante : Les Brettanomyces ne sont pas affectées par les inhibiteurs de fermentations que sont les acides gras à moyennes chaînes (C8 et C10), elles profitent de la place laissée par les Saccharomyces pour se développer voire achever la fermentation avec une hausse importante d'acidité volatile avant de produire une grande quantité de phénols volatils.	Recourir au Pied-de-Cuve (levures indigènes) (cf. fiche technique CAB sur la réalisation d'un pied-de-cuve) ou aux LSA pour limiter la compétition entre les micro-organismes et achever rapidement et complètement les sucres (< 0,5 g/L glucose + fructose) Nutrition azotée adaptée. Détoxification du milieu des acides gras à moyennes chaînes à l'aide d'écorces de levures dès les premiers signes de ralentissement. Contrôler les populations de levures (microscope) dès les premiers signes de ralentissement de la FA. Si la fermentation ralentit dangereusement et qu'une présence de Brettanomyces est avérée, on peut sulfiter à 2 g/hL et/ou passer au froid (<10°C) durant 2 à 3 jours, soutirer puis re-inoculer avec une souche sélectionnée (ex. Sacch. Bayanus) pour relancer la fermentation.
Temps de latence entre FA et FML Si trop important, risque de contamination : - Endogène par multiplication rapide des Brettanomyces présentes depuis la vendange - Exogène lors des opérations de cave utilisant du matériel contaminé	Maintenir des conditions favorables au développement des bactéries lactiques (O. Oeni) : • Température comprise entre 18 et 25 °C • Ajout d'écorces de levures • Inoculation avec des lies de Malo ou bactéries sélectionnées Si population O. Oeni < Brettanomyces, le but est alors d'appauvrir le milieu en Brettanomyces pour favoriser les bactéries lactiques en procédant à l'une de ses trois opérations en fonction du ratio de concentration R [O. Oeni] / [Brettanomyces] 1 > R > 0,1 : Soutirage 0,1 > R > 0,01 : Collage suivi d'un soutirage R < 0,01 : Filtration lâche à 3µm (filtre presse)
Sulfitage Post-FML : Brettanomyces étant la principale levure à pouvoir persister et se développer pendant l'élevage.	Première occasion d'agir significativement sur la population de Brettanomyces, le sulfitage doit être adapté aux paramètres physico-chimiques (TAV, pH, température...) du vin, l'objectif étant d'avoir une concentration minimale de 0,5 mg/L de SO₂ actif dans le cadre d'une protection moyenne vis-à-vis de Brettanomyces.

c Élevage

Facteurs favorables	Gestion des risques
Les vins de presse : ils sont systématiquement plus riches en Brettanomyces que les vins de goutte. Ils sont aussi plus riches en nutriments, parfois même en sucres résiduels et leur pH est souvent plus élevé.	Fractionnement des différentes pressées afin d'opter pour des traitements adaptés à chaque population : Soutirage, collage voir procédés physiques en fonctions des populations observées
L'élevage sur lies : Les Brettanomyces se logeant préférentiellement dans les lies durant la première partie de l'élevage. Des études récentes montrent cependant que l'élevage sur lies de FML ralentirait la croissance des Brettanomyces pendant l'élevage.	Réserver l'élevage sur lies aux situations les plus saines ou limiter cette pratique dans le temps. Clarifier rapidement le vin après FML soient par des soutirages, des collages ou par des procédés physique en fonction des populations observées.
Vins d'ouillage contaminés :	Choisir un vin d'ouillage stable sur le plan microbien , pauvre en sucres résiduels avec pH plutôt bas (favorisant un SO ₂ actif élevé). Contrôler fréquemment sa population en Brettanomyces. Le conserver dans de bonne condition d'élevage (contenant adapté, inertage...) et à une température inférieure à 16°C.
L'élevage en barrique : De par leur porosité (perméabilité à l'oxygène, évaporation), leurs réserves en nutriments et leur régulation en température plus difficile, les barriques sont plus propices aux développements microbiens que des contenants inertes comme l'inox. Aussi, entre deux barriques non contaminées avant entonnage, la barrique neuve aura plus de chance de voir se développer une population de Brettanomyces (porosité et réserves en nutriments plus élevés).	Ouillage régulier. Les Brettanomyces pouvant se loger jusqu'à 8 mm de profondeur, il est nécessaire d'avoir une hygiène stricte lors des opérations de nettoyage des fûts usagé : • Action en surface et en profondeur du bois : Vapeur/Ultrasons sont les plus efficaces. • Toujours rincer à l'eau froide après un traitement. • Egouttage d'au moins 40 min avant méchage • Mécher les fûts avant ré-entonnage Le méchage sur lies est aussi un procédé ayant fait ses preuves quand il est suivi par l'application d'un des procédés suivants : vapeur ou ultrasons.
Soutirages trop fréquents en fin d'élevage :	Les soutirages en début d'élevage permettent souvent de diminuer les populations de Brettanomyces, la richesse en CO ₂ y limitant la dissolution d'oxygène et les populations de Brettanomyces étant essentiellement présentes dans les lies. Ensuite lorsque le vin est « propre », les Brettanomyces sont présentes de manière plutôt homogène dans la barrique et un soutirage aura pour effet de ramener de l'oxygène et d'accélérer leur développement.
Température d'élevage trop élevée :	Température d'élevage inférieur à 16°C , être vigilant lors du réchauffement des chais au printemps. Les caves froide et isolée toute l'année ont assez peu de problèmes de Brettanomyces en général.
Cliquage/Micro-oxygénation : Stimule la croissance des Brettanomyces	Inoffensif si la population dans les lies ou dans le reste de la cuve est inférieure à 10 ² levures/mL Au-delà, le risque de favoriser un développement est augmenté.
Vins non filtrés avant mise en bouteille	S'assurer que le vin ne présente pas de risque de développement en faisant un dénombrement précis(culture sur milieu gélosé, cytomètre, PCR).

Tous les leviers ci-dessus sont des outils pour prévenir la contamination et un développement trop important de Brettanomyces. Ils sont efficaces lorsque la population de Brettanomyces ne dépasse pas 10³ cellules/mL. Passé ce seuil-là, il faut souvent avoir à utiliser des pratiques curatives de façon à éviter une forte production de phénols volatils par les Brettanomyces.

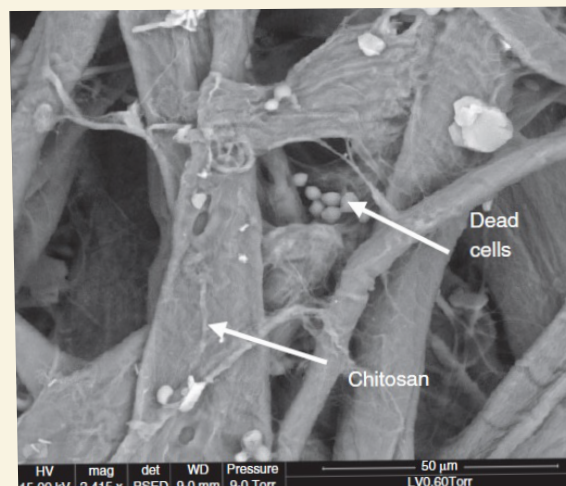
6. Luttés curatives

a Chitosane

Autorisé en bio depuis novembre 2018, c'est un polymère linéaire issu de la chitine, constituant essentiel des cellules de champignons ou de levures. Le chitosane utilisé en œnologie est d'origine fongique car facilement purifiable. Il possède une double action antimicrobienne et de collage. Il tue les cellules et favorise ensuite leur élimination par sédimentation.

Mode d'utilisation :

- FA et FML finies car action antimicrobienne sur les *Saccharomyces* et les bactéries lactiques.
- Le plus efficace en début d'élevage après le sulfitage post-FML, lorsque les *Brettanomyces* subissent des stress environnementaux (SO_2 , température, collage...).
- Dose moyenne de traitement entre 4 et 5 g/hL.



Taillander et al., 2015

Deux itinéraires possibles en fonction de la population de Brettanomyces :

1. Si $10^2 < \text{Brettanomyces} < 10^4$ cellules/mL : Il n'est pas nécessaire d'associer le traitement au chitosane à un soutirage. Le vin peut être conservé sur lies de chitosane plusieurs semaines voire plusieurs mois sans risque de recontamination s'il n'est pas assemblé avec d'autre.
2. Si $\text{Brettanomyces} > 10^4$ cellules/mL : Il est recommandé de soutirer le vin une dizaine de jours après l'opération pour éviter que les cellules lysées ne libèrent des nutriments pour les rares cellules résiduelles encore viables.

Remarque : L'utilisation du chitosane peut très bien être combinée à une opération de collage classique (ovalbumine ou gélatine) qui était déjà prévu dans l'itinéraire technique.

b Traitements physique

Ils conviennent lorsque le niveau de contamination devient trop élevé ($>10^5$ levures/mL) pour être abaissée par les opérations vu précédemment (soutirage, traitement au chitosane). Les opérations physiques possibles sont :

Traitements avant FML :

- Filtration sur terre avec une perméabilité entre 1,5 et 3 Darcy
- Filtration sur plaques avec un seuil de rétention de 3 μm
- Centrifugation autour de 7500 tours/min.

Traitement après FML :

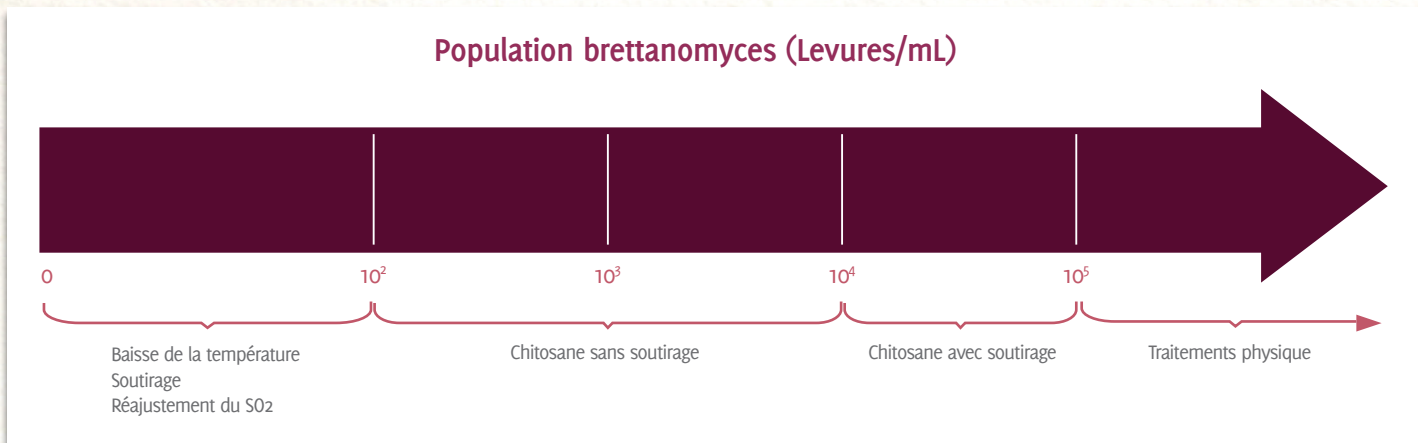
- Centrifugation autour de 7500 tours/min, cette opération est beaucoup plus efficace lorsqu'elle est couplée avec un traitement au chitosane préalable (10 jours avant).
- Filtration tangentiel : rien de sert de filtrer en dessous de 1 μm pour les *Brettanomyces*, cela affecterait trop le profil gustatif du vin sans être autant plus efficace vis-à-vis de la réduction de la population.

En début d'itinéraire, il n'est pas nécessaire de rechercher une filtration trop serrée au risque de créer un vide microbiologique conséquent qui sera propice aux recontamination. Donc plus le traitement physique assainira le vin plus il devra être pratiqué à un moment proche de la mise en bouteille pour limiter ce risque de recontamination.

Un mot sur la flash pasteurisation :

Actuellement interdite, elle sera possible à partir du 1^{er} janvier 2021 avec la mise en œuvre de la réglementation générale bio qui autorisera une température maximale de 75°C contre 70°C aujourd'hui (température jusqu'alors insuffisante pour cette pratique).

Pour résumer :

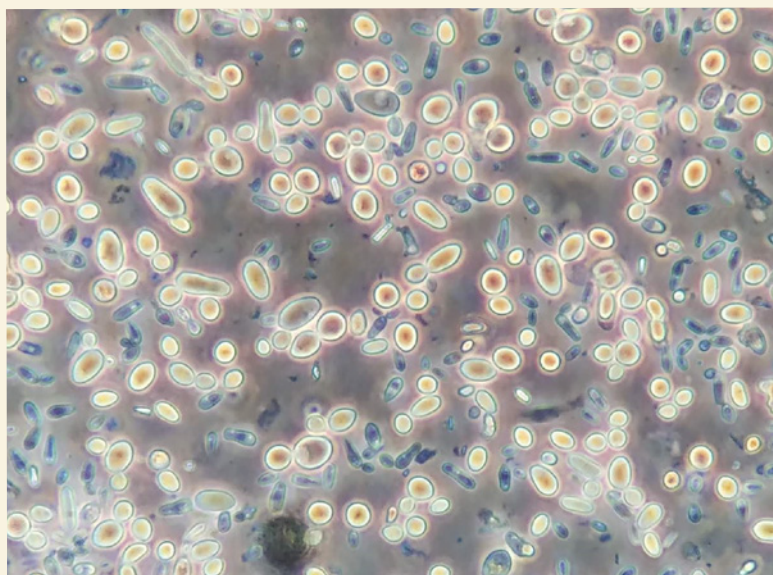


Brettanomyces et phénols volatils, V.Renouf, 2015

7. Diminution des teneurs en phénols volatils.

Une étude (Antonina Barbosa et al., 2012) démontre que l'ajout de lies fines de vins blancs (entre 1 et 3% du volume à traiter) a permis d'induire une réduction d'environ 35% des composés phénoliques et a contribué à une plus grande « fraîcheur » et complexité des vins traités. Les lies sont d'autant plus efficaces qu'elles ont subi de l'autolyse.

8. Moyen d'identification usuel : avantages et inconvénients



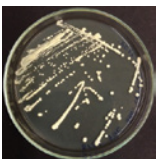
Vin contaminé par Brettanomyces (levures bleutées)

Les Brettanomyces font partie intégrante de la flore levurienne présente sur le raisin et dans le vin. Ce qui fait que dès lors qu'on cherche des Brettanomyces dans un vin, on en trouve toujours. Leur présence est quasiment systématique.

L'objectif d'une analyse est d'évaluer les risques d'altération en fonction de la population de Brettanomyces et surtout son évolution dans le temps.

Un vin sera peut-être plus contaminé en phénols volatils par de faibles populations de Brettanomyces si celles-ci persistent dans le temps que lorsqu'une population croît rapidement à un niveau de population plus élevée mais qu'elle diminue tout aussi brusquement.

Pour être pertinente, les analyses doivent être correctement positionnées. Le tableau ci-dessous présente les types d'analyse existant pour le vigneron et leur moment d'utilisation privilégié :

Pratique	Principe	Avantages	Inconvénients
Microscope optique 	Examen visuel d'un échantillon de vin placé entre une lame et une lamelle à un grossissement donné (généralement x400 ou x600 pour les levures)	Facile à mettre en œuvre Très rapide : pas de délai de réponse Dénombrement possible des levures si population > 10 ³ levures/mL Peu chère Très bien en FA et en début d'élevage	Seuil de détection assez haut : entre 10 ² et 10 ³ cell/mL, donc pas assez précis à l'approche des mises en bouteilles Peu de renseignement sur la viabilité des levures sauf si couplé à la coloration au bleu de méthylène ou à l'épifluorescence.
Dénombrement sur boîte de Pétri 	Mise en culture des levures présentes dans le vin sur milieu gélosé	Simple Seuil de détection très bas Très bien en fin d'itinéraire et avant mise en bouteille	Délai de réponse important de 5 à 7 jours N'est pas fiable lorsque réalisée dans les 7 à 10 jours après une opération de cave (sulfitage, soutirage, assemblage)*
Milieux liquides à sniffer 	Milieux contenant des éléments nutritifs pour un développement des Brettanomyces Après l'ajout du vin dans le milieu, il est observé et senti tous les jours L'intensité du risque est inversement proportionnelle à la vitesse de l'apparition de l'odeur phénolé	Simple d'emploi Peu chère Permet une estimation de la population Bien pendant l'élevage	A réserver au suivi en élevage car délai de réponse important (sauf si contamination très forte, délai = 2 jours) N'est pas fiable lorsque réalisée dans les 7 à 10 jours après une opération de cave (sulfitage, soutirage, assemblage)*
Cytométrie de flux	Détection et dénombrement automatique des levures et des bactéries	Rapide Seuil de détection assez bas (10 levures/mL) Prend en compte la viabilité des levures Bien en élevage pour suivre une évolution après un traitement contre Brettanomyces	Ne permet pas de distinguer les levures entre elles donc à réserver aux stades œnologiques où Brettanomyces est la principale levure résiduelle dans le vin (en élevage donc). Moins précise quand population > 10 ⁶ levures/mL
Analyse de biologie moléculaire : La PCR quantitative	Identification et dénombrement grâce à l'extraction et l'analyse de l'ADN des micro-organismes	Rapidité (24 heures en moyenne) Ultra spécifique Dénombrement très précis	Très chère : 60-120 euros par analyse Moins fiable lorsque réalisée dans les 7 à 10 jours après une opération de cave (sulfitage, soutirage, assemblage)*

* Certaines méthodes d'analyse deviennent moins fiables lorsqu'elles sont effectuées à la suite d'une opération de cave qui modifie la viabilité et/ou la cultivabilité des Brettanomyces

La CAB et Bio Centre proposent à ses vignerons adhérents (adhérents GAB aussi) des accompagnements techniques tout au long de l'année. Pour plus d'information, **vous pouvez contacter Jérémie Cébron.**



Contact CAB

Jérémie CEBRON (œnologue)
07 68 98 54 95
cab.oenologie@biopaysdelaloire.fr



www.biopaysdelaloire.fr

www.bio-centre.org

Action financée par

