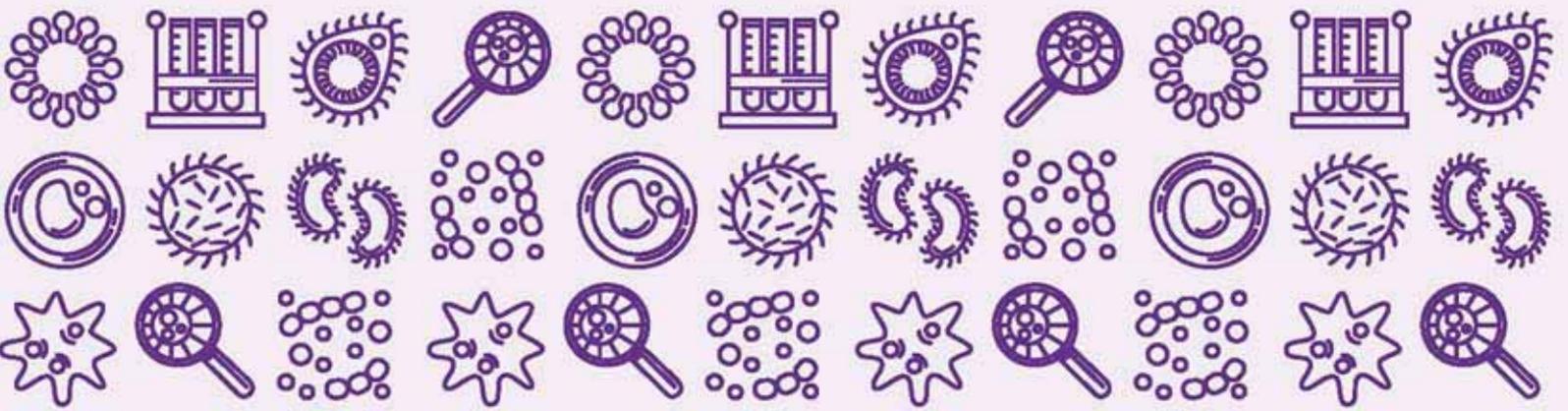




L'art & l'expertise du vin

les contaminants microbiologiques

RISQUES ET OUTILS DE MAÎTRISE



les CONTAMINANTS microbiologiques

RISQUES ET OUTILS DE MAÎTRISE

1 Qui sont les micro-organismes CONTAMINANTS ? 3

2 Quelques rappels de microbiologie 5

| | |
|--|---|
| La vie des micro-organismes et altérations des vins | 5 |
| • La contamination | 5 |
| • Les conditions de développement favorables | 5 |
| • Du temps pour se multiplier et produire des composés indésirables | 5 |
| • L' intensité de l'altération dépend du niveau de population et du temps de présence des germes d'altération | 6 |
| • Seules les <i>Brettanomyces</i> viables cultivables produisent des phénols volatils dans les vins | 7 |

| | |
|--|---|
| Des actions correctives pas toujours suffisantes ? | 7 |
|--|---|

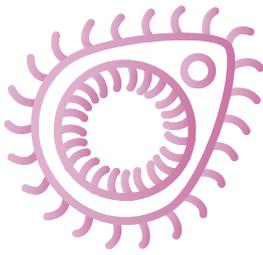
3 les altérations sont-elles réversibles et/ou curables ? 8

4 LES RÈGLES DE TRAVAIL POUR PRÉVENIR LES RISQUES 9

| | |
|--|----|
| L'hygiène reste la base | 9 |
| L'état sanitaire de la vendange | 9 |
| L'usage du SO ₂ | 9 |
| Quelles pistes alternatives au SO ₂ ? | 9 |
| • La bioprotection | 9 |
| • La co-inoculation | 10 |
| • Le lysozyme | 11 |
| • Le chitosane en préventif | 11 |
| La maîtrise des fermentations | 11 |
| La maîtrise de l'élevage | 12 |

5 LE PLAN DE CONTROLE : UN OUTIL INDISPENSABLE POUR UNE PRÉVENTION DES RISQUES ET DES INTERVENTIONS RAPIDES 13

| | |
|---|----|
| Choisir la méthode | 13 |
| Quelles cuves contrôler ? | 14 |
| Quand dois-je contrôler ? | 14 |
| Quels comportements mettre en place en fonction du résultat ? | 14 |



QUI SONT LES MICRO-ORGANISMES CONTAMINANTS ?

Par nature le moût et le vin sont des milieux de culture plus ou moins propices au développement de nombreux micro-organismes.

En effet, faut-il le rappeler ?

Ce sont bien les micro-organismes qui transforment le jus de raisin en vin. Malheureusement, selon le moment auquel ils sont actifs dans le cycle de vie du vin et le métabolisme préférentiel qu'ils activent, certains micro-organismes sont tour à tour précieux pour le vinificateur ou au contraire à l'origine d'altérations analytiques ou organoleptiques fortes.

Des catégories de micro-organismes sont systématiquement à l'origine de la dépréciation des vins et de leur perte de valeur. C'est le cas de levures, notamment *Brettanomyces*, mais aussi de bactéries lactiques ou acétiques.

TABLEAU 1 : Altérations pour lesquelles des seuils de détections des molécules SONT CONNUS.

| NON «COMMUN» | MOLÉCULES IMPLIQUÉES | SEUILS DE DÉTECTION | MICRO-ORGANISMES IMPLIQUÉS | ALTÉRATIONS PERCEPTIBLES SUR LES VINS | |
|-----------------|---|---|---|--|---|
| | | | | Gustatif/Olfactif | Analytique |
| L'AMER | Glycérol → Acroléine réagit avec composés phénoliques → Amertume | Plusieurs g/l de glycérol dégradé produisent quelques µg/l d'acroléine et provoquent l'amertume du vin | <i>Lactobacilles</i> | Amertume | |
| GOÛT DE SOURIS | Formation de 2-acétyltétrahydropyridine (ATHP), 2-éthyltétrahydropyridine (ETHP) et 2-acétylpyrroline | Seuil de perception dans l'eau : 1.6 ng/l | <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | Odeur acétamide ou urine de souris | Teneurs en ATHP, ETPH et APY |
| GÉRANIUM | Acide sorbique → sorbitol → 2-éthoxyhexa-3,5 diène | Seuil de détection : 0.1 mg/l | Toutes bactéries lactiques mais principalement <i>Oenococcus oeni</i> | Odeur de feuille de géranium | RAS |
| «BRETT» | Ac cinnamiques → 4-vinyl phénols et 4-vinyl gâiacol → 4-éthyl phénol et 4-éthyl gâiacol | Seuils de détection : 400 à 600 µg/l mais très variable selon la "matrice aromatique" des vins et la présence conjointe des 2 molécules | BRETTANOMYCES <i>Bruxellensis</i> <i>Lactobacilles</i> <i>Plantarum</i> | Encre, écurie, cheval.... | Possibilité d'augmentation d'acidité volatile |
| GOÛTS MOISI | TCP, TeCP et TBP → TCA, TeCA et TBA | Seuils de détection (variables selon matrices) TCA : 1 à 5 ng/l TeCA : 4 à 15 ng/l TBA : 1 à 8 ng/l | Divers microorganismes | Moisi, croupi, carton, papier mouillé, pharmaceutique, | RAS |
| AMINES BIOGÈNES | Acides aminés → amines biogènes Putrescine, cadavérine, histamine, ... | 15 à 80 mg/l selon publication, selon matrices seuil total est abaissé dans les "mélanges" d'amines biogènes | <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Oenococcus sp.</i> , <i>Pediococcus sp.</i> | Putride | Teneurs en amines biogènes |

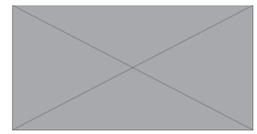


TABLEAU 2 : Altérations pour lesquelles des seuils de détections des molécules NE SONT PAS CONNUS.

| NON «COMMUN» | MOLECULES IMPLIQUEES | MICRO-ORGANISMES IMPLIQUEES | ALTÉRATIONS PERCEPTIBLES SUR LES VINS | | |
|--|---|--|--|--|--|
| | | | Visuel | Gustatif/Olfactif | Analytique |
| PIQÛRE ACÉTIQUE | Oxydation : Ethanol → acide acétique : acidité volatile | <i>Acetobacter</i> (fin FAL) et <i>Gluconobacter</i> (début FAL) | | Formation acétate d'éthyle (si faible aération): Acescence | Augmentation de l'acidité volatile |
| FML NON SOUHAITÉE | Ac malique → Ac lactique + CO ₂ | <i>Oenococcus Oeni</i> , pédiocoques, lactobacilles | dépôt CO ₂ | Légère acidité, arôme lactique | Baisse de l'acidité totale et malique Hausse de l'acidité volatile et lactique |
| PIQÛRE LACTIQUE | Sucre > Ac lactique + acide acétique + CO ₂ | <i>Oenococcus Oeni</i> , pédiocoques, lactobacilles | Trouble, surtout si conditionné | Odeur acétique et lactique | Hausse de l'acidité totale et volatile Acide D lactique → 0.3g/l |
| LA TOURNE | *Ac tartrique → ac lactique + ac citrique + CO ₂ * Ac tartrique → ac succinique + ac acétique + CO ₂ | Lactobacilles (<i>Lactobacillus plantarum</i> et <i>Lactobacillus brevis</i>) | Vin trouble Brunissement | Odeur lactique, goût plat et mou (choucroute, aigret) | Baisse de l'acidité totale, hausse de l'acidité volatile, baisse de l'acidité tartrique |
| LA FLEUR | Éthanol → Éthanal + CO ₂ acide acétique | <i>Candida sp</i> , <i>Pichia sp</i> , <i>Hanselunaspota sp</i> , <i>Hanseniaspora</i> | Voile blanchâtre en surface de la cuve | Production d'acétaldéhyde (évent) Jaunissement et saveur fade | Perte d'éthanol et d'acidité totale et augmentation de acidité volatile |
| LA GRAISSE | <i>Polysaccharide</i> de β-glucane (mucilage) qui enveloppe les cellules bactériennes et les relie entre elles | <i>Pediococcus sp</i> (surtout <i>damnosus</i>) et plus rarement <i>Oenococcus oeni</i> | Consistance huileuse, filante et visqueuse | RAS | RAS |
| REPRISE DE FERMENTATION ALCOOLIQUE DE VINS "SUCRÉS" | Glucose + Fructose → CO ₂ + Ethanol | Levures <i>Saccharomyces sp</i> ou <i>Zygosaccharomyces sp</i> | Vin trouble | Présence de CO ₂ | Perte du glucose-fructose Hausse du TAV et CO ₂ Fermentation de 1g/l de Glucose+fructose conduit à la production de 500 mg/l de CO ₂ |

Mais la complexité du monde des micro-organismes ne s'arrête pas là puisque les outils modernes d'analyse microbiologique et génétique ont permis de mettre en évidence une grande diversité intra-espèces. Ainsi toutes les bactéries *Oenococcus oeni* n'ont pas le même potentiel à produire des amines biogènes (toutes ne possèdent pas les gènes codant pour la décarboxylation des acides aminés), toutes les *Brettanomyces* à résister aux mêmes niveaux de SO₂ ... Les méthodes d'analyses permettant d'identifier précisément le potentiel de nuisance des souches présentes ne sont pas encore disponibles (encore au stade de la recherche fondamentale). Une grande partie de ces altérations étant irréversibles, la préservation des qualités organoleptiques des vins dépend donc de la capacité du vinificateur à limiter au maximum le développement et l'activité des contaminants.



QUELQUES RAPPELS DE MICROBIOLOGIE

Pour qu'une altération microbiologique se produise sur un vin, plusieurs étapes doivent être franchies.

La vie des micro-organismes et altérations des vins.

1 - La contamination initiale

L'origine des germes présents dans le jus ou le vin provient soit des matériels, avec transfert par contact, soit d'une présence initiale sur le raisin, ou encore d'un apport lors d'un assemblage avec un jus ou un vin contaminé.

2 - Les conditions de développement favorables

Des conditions de développement favorables sont nécessaires, c'est-à-dire des nutriments correspondant aux besoins de la ou des souches, une température, un pH, la présence éventuelle d'oxygène dissous, l'absence d'un niveau critique d'antiseptique (SO_2 par exemple), la faiblesse de la pression compétitive... De ces points de vue, la plupart des germes de contaminations sont coriaces : ils se contentent de très peu de nutriments, leurs besoins en oxygène sont souvent faibles voire nuls, certains résistent de manière spectaculaire au SO_2 .

| CONTAMINANTS | Ordres de grandeur du SO_2 actif limitant |
|------------------------------|--|
| BACTÉRIES LACTIQUES | 0.5 mg/l |
| BACTÉRIES ACÉTIQUES | 0.8 mg/l |
| LEVURES <i>Brettanomyces</i> | 0.6 à plus de 1mg/l (forte variabilité inter souche) |

Tableau 3 : Ordre de grandeur des niveaux de SO_2 actif limitant en fonction des contaminants.

D'après : (ALBERTIN, et al., 2017) (BLATEYRON, et al., 2008), (VINCENT, 2001).

Contrairement à certaines idées reçues, les températures basses ne suffisent pas à empêcher les altérations microbiologiques : elles ne font que les ralentir. Ainsi, des études conduites sur *Brettanomyces* ont mis en évidence que même à 12°C, la quantité de phénols volatils produits en 40 jours avec une contamination entre 10^4 et 10^5 UFC/ml et en l'absence de SO_2 actif conduisait à des teneurs en phénols largement supérieures au seuil de détection le plus couramment admis. À une température de 18°C, les teneurs en phénols volatils sont 2 à 3 fois plus importantes qu'à 12°C, alors que l'impact sur les populations est faible.

Les sucres en C6 (glucose et fructose) favorisent toujours le développement des populations, étant une source énergétique facilement utilisable. On peut considérer que les risques d'accélération de développement des contaminants s'accroissent proportionnellement à la teneur en glucose + fructose résiduelle (facilement dosable par les laboratoires). Idéalement, il faudrait viser des teneurs < 0.5 g / L. Et malgré ce, le développement des contaminants n'est pas inhibé puisque nombre d'entre eux sont capables d'utiliser d'autres sources de carbone.

L'azote assimilable résiduel sur vins finis ne semble pas être un facteur clef du développement des *Brettanomyces*. Une étude ICV de 2013 sur 77 cuves, en fin de fermentation alcoolique, avait montré des teneurs variant entre 35 et 150 mg/L (toutes couleurs confondues), sans qu'il n'y ait d'effets mesurables sur les niveaux de contaminants. Par ailleurs, ces levures sont capables d'utiliser de nombreuses sources d'azote. Enfin, l' O_2 dissous est favorable à tous les micro-organismes soit indirectement en abaissant, à terme, les niveaux de SO_2 libre (donc d'actif), soit en favorisant leur métabolisme.

3 - Du temps pour se multiplier et produire des composés indésirables

La plupart des microorganismes, y compris ceux que le vinificateur favorise pour assurer les fermentations, doivent d'abord se multiplier avant de démontrer une activité biochimique significative. Par exemple, pour les *Brettanomyces*, on considère assez souvent qu'il faut passer le cap des 1 000 UFC / mL (Unités Formant Colonies) pour que soit avéré le risque de production de phénols volatils (E4P : ethyl-4phénols et E4G : ethyl-4-gaïacol). De ce point de vue, les temps de génération (temps nécessaire au doublement de la population) de la plupart des microorganismes contaminants sont longs (Tableau 4). Ceci confère un avantage à la fois aux populations intéressantes surtout lorsque l'on ensemence (pour la FA comme pour la FML), mais aussi au vinificateur qui a généralement le temps pour réagir, pour autant qu'il contrôle régulièrement l'évolution des populations.

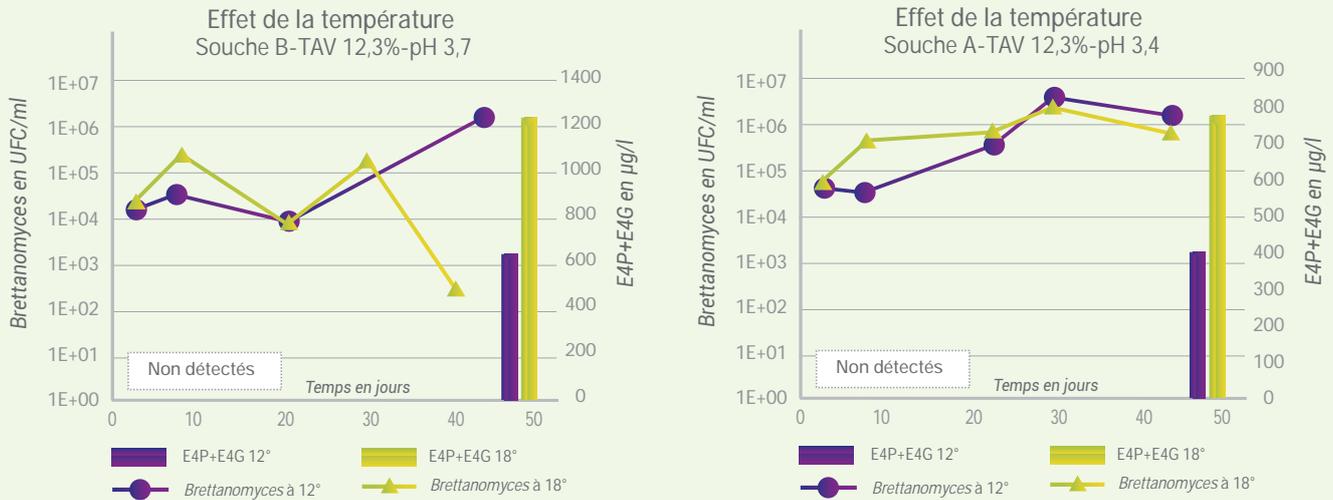
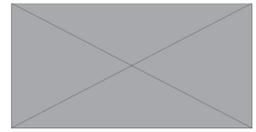


Figure 1 : Impact des conditions sur la croissance de Brettanomyces et la production de phénols volatils en fonction de la souche. D'après (PIC & GRANÈS, 2013).

Tableau 4 : ordre de grandeur des durées nécessaires pour la multiplication de contaminants en milieu hydroalcoolique (12%-pH 3.5) à 20°C
* = en présence de sucres (FA)

| | Doublément de la population en heures | Accroissement d'un log (x10) en jours | Passer de 10 UFC/ml à 1 000 UFC/ml en jours |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| BACTÉRIES LACTIQUES | 24 heures | 4 jours | 8 jours |
| LEVURES BRETTANOMYCES | 48 - 72 heures | 8-12 jours | 16 à 24 jours |
| LEVURES SACCHAROMYCES* | 4 heures | 0,5 jours | 1,5 jours |

4 - L'intensité de l'altération dépend du niveau de population et du temps de présence des germes d'altération

Il est cependant important d'être vigilant à ne pas maintenir trop longtemps une population contaminante même modérée car une contamination de 10^2 à 10^3 UFC/mL durant une longue période est aussi dangereuse qu'un pic de 10^5 à 10^6 UFC/mL (Figure 2).

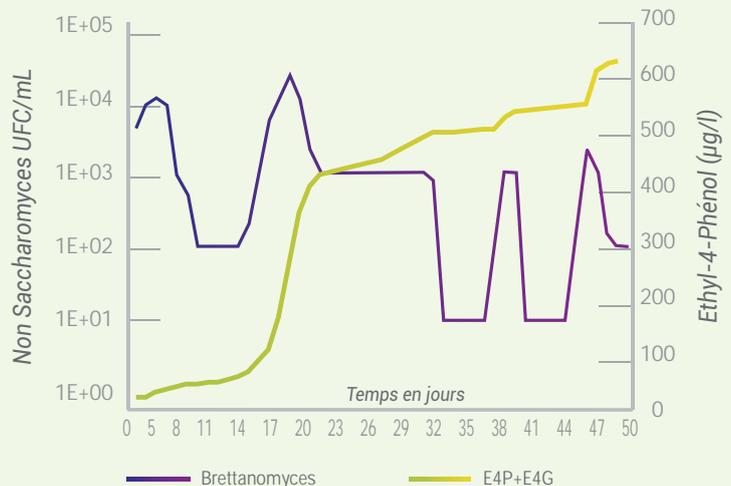


Figure 2 : D'après (RENOUF, 2006)



QUELQUES RAPPELS ...

5 - Seules les *Brettanomyces* viables cultivables produisent des phénols volatils dans les vins

Les levures *Brettanomyces* présentent la particularité de pouvoir rentrer en état dit "Viable Non Cultivable" (VNC) face à une situation environnementale défavorable. Dans cet état, les cellules sont toujours actives métaboliquement, mais dans l'incapacité de se multiplier, et ce notamment sur les milieux gélosés utilisés habituellement pour leur numération. Elles continueront par contre à être détectées par les méthodes d'analyse telles que la Q-PCR.

Des travaux récents ont permis de mettre en évidence que le sulfitage était l'une des causes de passage de l'état de germe viable à germe VNC dans les vins (SERPAGGI, 2012).

En outre, il a aussi été déterminé que dans les vins, les levures en état VNC ne produisent pas de phénols volatils et que l'augmentation de ces molécules est uniquement liée au niveau de levures viables cultivables (mesuré sur boîte) (Figure 3).

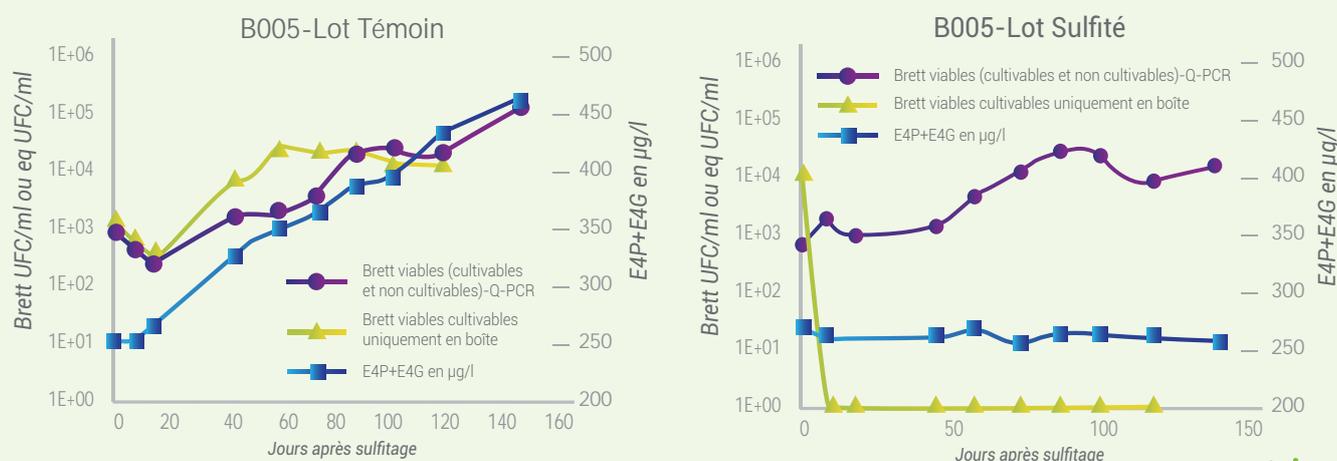


Figure 3 : Lien entre l'état de *Brettanomyces* et la production de phénols volatils, d'après PIC & MATHIEU, www.infowine.com, 2016.



Des actions correctives pas toujours suffisantes ?

De façon générale, les actions correctives vont conduire à l'élimination d'une partie des populations en présence. Plus la charge microbienne totale sera élevée au moment du traitement, plus le niveau de contaminants encore présents après traitement sera important.

Le sulfitage

Parmi les trois formes qu'il peut prendre dans le vin, la forme la plus efficace du bisulfite de potassium vis-à-vis des micro-organismes est la forme H_2SO_3 (dite SO_2 actif), dont la proportion dépend de la température, du TAV et surtout du pH. Plus les pH seront élevés, plus il sera difficile d'atteindre les niveaux de SO_2 actif permettant l'élimination des contaminants. Par ailleurs, la nature des contaminants en présence doit aussi être prise en compte dans le choix des valeurs de SO_2 actif ciblé (cf tableau 3).

La diversité de sensibilité au SO_2 ne se rencontre cependant pas uniquement entre espèces, mais aussi au sein d'une espèce donnée : ainsi (BLATEYRON et al., 2008) et plus récemment (ALBERTIN, et al., 2017) ont montré que certaines souches de *Brettanomyces bruxellensis* pouvaient se développer en présence de plus de 0.6-0.8 mg/l de SO_2 actif.

Enfin, le sulfitage peut conduire les levures *Brettanomyces* à entrer en état VNC ce qui retarde significativement le risque d'altération du vin, sans l'annuler à long terme.

La flash pasteurisation

Dans le vin, on estime que pour passer d'une population globale en contaminants de 10^7 UFC/ml à <1 UFC/ml par flash-pasteurisation, il faut un traitement de 20 secondes à une température comprise entre 72 et 75°C.

... DE MICROBIOLOGIE (SUITE)



Filtrations frontales sur plaques ou lenticulaires

Les plaques dites stérilisantes correspondent à des plaques de 0,017 Da (les plaques de 1-2 Da sont dégrossissantes et les plaques de 0,15 Da sont clarifiantes). La préparation des vins à la filtration sur plaques est indispensable pour assurer les résultats microbiologiques conformes (turbidité < 1 NTU + IC < 250 + nombre de germes viables au départ < 10² /ml).

Pour ce type de filtration : on retiendra un impact très fort des débits de travail (la charge microbiologique après filtration est inversement proportionnelle au débit) et une évolution des résultats en cours de journée (baisse des performances en général).

Filtration frontale sur membrane

Diamètres de pores : de 0,1 à plusieurs µm. Lorsque les diamètres de pores sont compris entre 1,2 et 0,65 µm on peut espérer une rétention de la totalité des levures. Pour la rétention des bactéries, les diamètres des pores doivent être inférieurs ou égaux à 0,45 µm.

Une filtration dite stérilisante nécessite une très bonne préparation des produits à traiter, ainsi qu'un pilotage expert du filtre (montée en pression, test d'intégrité,...). Une pré-clarification poussée, ainsi que des tests préalables de filtrabilité sont recommandés, (IC < 20 ou Vmax > 4000).

Filtration tangentielle

Les diamètres moyens les plus utilisés en œnologie sont 0,2 µm. Ce type de filtre permet en une seule opération unitaire la clarification et la stabilisation microbiologique du vin, et ce, quelle que soit la charge initiale du produit. Des essais conduits par l'IFV (2005) montrent que la rétention des levures est totale, mais que selon les filtres et les conditions d'utilisation il peut rester des populations en bactéries.

Le chitosane fongique

Il a été démontré que le chitosane fongique (Kiofine B®) utilisé à 4 g/hl avec un brassage conduisait à la mort de *Brettanomyces* à travers deux mécanismes (PIC-BLATEYRON, et *al*, 2012) : d'une part l'adsorption suivie de la déstructuration de la membrane cellulaire et d'autre part le blocage des transferts entre la cellule et le milieu externe (vin). Le produit agit quasi immédiatement (quelques heures au laboratoire). Dans la grande majorité des cas, 10 jours sont suffisants pour avoir l'effet biocide et la sédimentation. Le traitement est efficace pour les très hautes contaminations (> 10⁵ UFC/ml) mais avec de tels niveaux initiaux, il peut être nécessaire de réaliser deux traitements successifs pour obtenir un niveau < 1 UFC/ml.

L'effet de ce produit sur les bactéries lactiques et acétiques n'est pas suffisant pour réduire une contamination importante en ces micro-organismes et se prémunir de leurs altérations.



LES ALTÉRATIONS SONT-ELLES RÉVERSIBLES ET/OU CURABLES ?

Les altérations microbiologiques ne sont pas réversibles et peu de traitements sont autorisés pour en réduire l'impact.

A ce jour, sur vins, seules les teneurs en 4-éthylphénol et 4-éthylgâïacol du vin peuvent être réduites par un traitement associant la nanofiltration et le traitement par charbon actif désodorisant. Le pourcentage du volume de la cuve à traiter est fonction de la quantité de phénols à retirer.

Sur les moûts, moûts de raisin partiellement fermentés et moûts encore en fermentation, il est possible d'utiliser des charbons pour éliminer les contaminants éventuels. L'utilisation de plaques filtrantes contenant des zéolithes Y-faujasite pour adsorber les haloanisoles est admise sur vins clarifiés.



LES RÈGLES DE TRAVAIL POUR PRÉVENIR LES RISQUES.

L'hygiène reste la base

La propreté apparente mais aussi la désinfection régulière des matériels en contact avec la vendange, le moût puis le vin sont indispensables pour limiter les contaminations initiales comme les contaminations croisées. Ainsi on veillera à respecter les bonnes pratiques d'hygiène de la récolte au conditionnement.

L'état sanitaire de la vendange

Une vendange en mauvais état sanitaire libère du jus donc des nutriments pour les germes de contamination. Dès la récolte, particulièrement sur les vendanges atteintes de pourriture acide, la multiplication peut être rapide. Cette situation impose de traiter la vendange altérée de manière séparée et d'appliquer rigoureusement toutes les Bonnes Pratiques : hygiène, sulfitage, maîtrise des fermentations, suivi en élevage.

L'usage du SO₂

Le SO₂, de par son effet bactéricide et fongicide, est l'additif œnologique historiquement le plus utilisé pour maîtriser le développement des micro-organismes en vinification.

Tous les micro-organismes ne présentant pas la même sensibilité à cette molécule, son effet varie au cours de process de vinification. Dans les phases préfermentaires, il va favoriser les espèces *Saccharomyces* au détriment d'espèces plus sensibles au SO₂ majoritaires sur raisins et dans les jus (*Hanseniospora sp*, *Torulaspora sp*, *Pichia sp*, *Metschnikovia sp*) et réduire le niveau de contaminants bactériens (bactéries acétiques et lactiques). Son usage à ce stade permet donc de favoriser l'activité des levures globalement plus aptes à la réalisation des fermentations alcooliques et peu productrices d'acétates (*Saccharomyces sp*).

Dans les phases post-fermentaires, où l'alcool a naturellement éliminé un grand nombre des levures présentes sur jus (sensibles à l'éthanol), il permet de limiter le développement des germes d'altérations les plus souvent rencontrés à ces stades : bactéries acétiques, lactiques, *Brettanomyces*. Il évite ainsi d'atteindre des niveaux de contaminations à l'origine d'éventuels défauts analytiques et organoleptiques. Cependant, de par son agressivité, mais aussi son efficacité variable, le SO₂ ne peut être considéré comme seul outil préventif et curatif des contaminations.

Quelles pistes alternatives au SO₂ ?

En alternative au SO₂ et en prévention, on cherchera donc à développer des pratiques qui limitent le développement et l'activité des germes d'altération à chacune des étapes du process concernée.

Bioprotection

Dans les phases préfermentaires, il est possible d'introduire le plus précocement possible (dès la récolte) des micro-organismes sélectionnés en quantité suffisante dans l'objectif "d'occuper le milieu avec des micro-organismes n'altérant pas les jus" et d'éviter ainsi le développement des germes indigènes. Il n'y a pas au sens propre "d'occupation de l'espace" mais des interactions compétitives soit par la consommation de nutriments ou vitamines essentiels, soit par la production de toxines (protéine killer, éthanol par exemple), soit encore par la modification significative des conditions environnementales (élévation de température, modification du pH...). Ces pratiques, regroupées sous le terme de "bioprotection" peuvent être mises en œuvre de multiples façons : diverses espèces de micro-organismes introduites (*Metschnikovia*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Saccharomyces*, bactéries lactiques...), différentes formes (réhydratées, non réhydratées), différents moments d'introductions, différentes quantités apportées.



En vinification en rouge traditionnel, de récents travaux de l'ICV ont mis en évidence que l'implantation des germes apportés en bioprotection ne conduisait pas, systématiquement, à réduire significativement la quantité de flore indigène en présence : en fait les deux types de populations cohabitent.

En respectant certaines pratiques (choix d'une souche tolérante à la non réhydratation, utilisation d'une forte dose 25-30g/100kg), il est possible de réaliser la bioprotection dès la récolte, avec des *Saccharomyces* et de s'affranchir ensuite d'un nouveau levurage à l'encuvage : ce sont bien les *Saccharomyces* apportées à la récolte qui vont effectuer la fermentation alcoolique.

Dans le cadre de ces travaux, il n'a cependant pas été possible de confirmer l'impact de ces pratiques sur le développement des flores d'altérations type *Brettanomyces* : en effet, de telles contaminations n'ont pu être observées sur les témoins non couverts par la bioprotection.

En vinification en blanc et rosé, il est important d'intégrer le fait que les germes apportés en bioprotection ne doivent pas conduire à un risque de départ en fermentation alcoolique pendant les phases de clarification, notamment le débouillage statique à froid. De fait, tous les résultats obtenus avec des levures capables de fermenter les sucres (*Saccharomyces sp*, *Torulasporea sp*) ont montré que ces risques étaient difficiles à maîtriser.

Lorsque la bioprotection a été effectuée avec une non *Saccharomyces*, les effets sur les populations indigènes sont irréguliers même lorsque les germes apportés en bioprotection sont retrouvés en quantité significative (ce qui n'est pas toujours le cas). En outre, aucune des pratiques testées n'a permis de compenser l'effet anti-oxydant du SO_2 . Là encore, il n'a cependant pas été possible de confirmer l'impact de ces pratiques sur l'apparition d'altérations microbiologiques puisque les témoins non couverts par bioprotection sont non défectueux.

Co-inoculation

La maîtrise des flores bactériennes, notamment des différentes bactéries lactiques potentiellement source d'altération, peut être réalisée par un apport précoce de bactéries lactiques sélectionnées, dépourvues de capacité de production d'amines biogènes et/ou d'acidité volatile par exemple. On parle alors de co-inoculation (voir § La maîtrise des fermentations). L'efficacité de telles pratiques pour la réduction des contaminants *Brettanomyces* mais aussi des teneurs en phénols volatils a été démontrée par plusieurs auteurs (VINCENT GERBAUX, 2009).

Intérêt de la co-inoculation bactérienne pour réduire le niveau de contamination en *Brettanomyces*

D'après les travaux de GERBAUX - Paroles d'expert (Lallemand Oenologie, 2017).

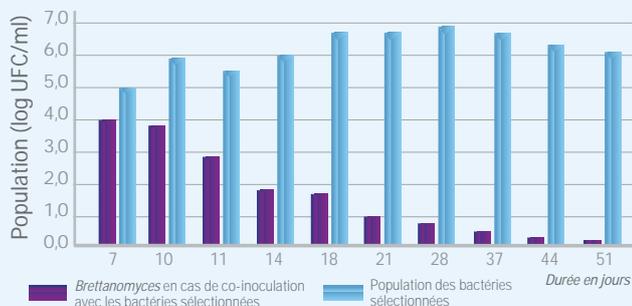


Figure 4a : Suivi des populations de *Brettanomyces* et de bactéries. Co-inoculation avec des bactéries sélectionnées.

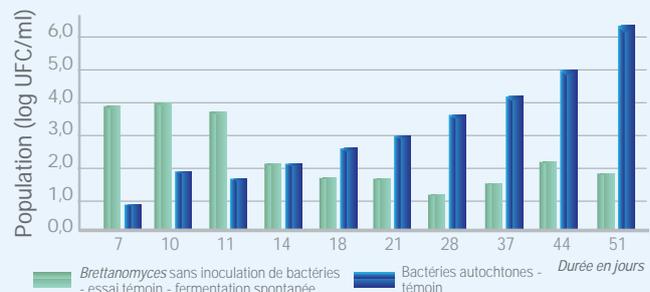


Figure 4b : Suivi des populations de *Brettanomyces* et de bactéries. Témoin sans inoculation des bactéries.

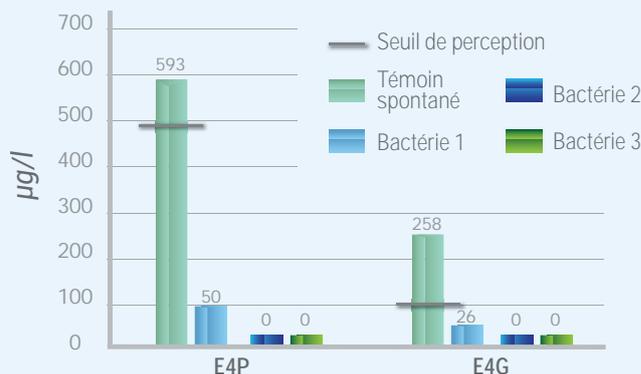


Figure 5 : Biocontrôle des *Brettanomyces* par l'inoculation de bactéries sélectionnées. Impact sur la production de phénols volatils.

D'après les travaux de GERBAUX, Paroles d'expert (Lallemand Oenologie, 2017).

LES REGLES DE TRAVAIL ...

Lysozyme

Le lysozyme est une enzyme (donc une protéine) extraite du blanc d'oeuf qui a une activité en œnologie limitée au contrôle des populations de bactéries lactiques : il ne touche ni les levures ni les bactéries acétiques. Dans les essais conduits par l'ICV à 20 g/hL, le lysozyme a confirmé son efficacité préventive à éviter la prolifération d'une population bactérienne lactique pas trop élevée au départ (< 100 000/mL). En blanc, l'utilisation de lysozyme sur moût à la dose de 50 g/hL, ou deux additions de lysozyme sur moût à 25 g/hL puis sur vin à la même dose, permet d'inhiber durablement la Fermentation Malo-Lactique. L'IFV a montré que en rouge, l'emploi de lysozyme à une dose de 25 g/hL permet une diminution de la microflore équivalente à celle d'un sulfitage 5 g/hL. L'expérience de terrain montre qu'il est préférable d'ajouter le lysozyme, en rouge, en tout début de FA.

Le chitosane en préventif

Très récemment, des solutions préventives vis-à-vis du développement de *Brettanomyces* ont été développées. Ainsi le suivi, pendant 5 à 11 mois, du développement de *Brettanomyces* dans des vins en barriques neuves traitées avec KiofineDrop® ou non, a mis en évidence une baisse de la fréquence des contaminations grâce au traitement : 30% des essais non traités ont été contaminés, contre seulement 11% pour les essais traités.

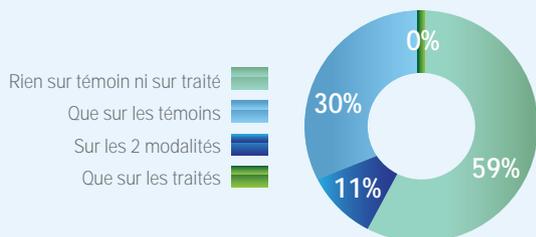


Figure 6 : Résultats des essais de KIOfine® en préventif sur les essais barriques de 2016 et 2017 - ICV.

La maîtrise des fermentations

La maîtrise des fermentations alcooliques et malolactiques ainsi que du temps de latence entre les deux assure le maintien d'une forte pression de compétition et laisse peu de temps aux germes de contamination pour se développer.

La fermentation alcoolique doit être gérée en respectant scrupuleusement les points clés : choix de la souche de levure, dose

et qualité de la réhydratation, températures, azote et oxygène raisonnés... Il ne doit bien sûr pas y avoir d'arrêt de FA sans mise en œuvre immédiate d'une procédure raisonnée de reprise.

La fin de FA est particulièrement importante : un ralentissement excessif (moins de 5 points de perte de densité par jour ou plus de 5 jours pour consommer les 15 à 20 derniers g de sucres fermentescibles), témoigne d'une population de *Saccharomyces* en mauvais état physiologique ou trop faible. C'est alors une situation très favorable pour les germes de contamination. Rappelons qu'à ce moment là, il y a très peu d'actions correctives possibles pour accélérer la fin de FA. Les apports d'oxygène sont potentiellement plus favorables aux germes de contamination qu'aux levures de FA qui ne sont plus capables d'en profiter.

La fermentation malo-lactique est trop souvent négligée, laissée aux "bons soins" des bactéries lactiques indigènes. Cette situation a deux conséquences potentielles graves :

- Les temps de latence peuvent être longs du fait du choix de la levure pour la FA, du cumul des doses de SO₂, de la température, du degré alcoolique, du pH... Pendant ce temps, les bactéries acétiques ainsi que les *Brettanomyces* peuvent se développer, le vin n'étant généralement pas protégé par du SO₂ actif.
- Les bactéries lactiques indigènes qui se multiplient ne forment pas une population pure. On peut y retrouver plusieurs souches d'*Oenococcus* dont certaines susceptibles de produire des amines biogènes, en mélange avec des Lactobacilles et des Pédicoques. Les vins qui "se ferment" aromatiquement à ce stade là ne sont souvent pas autre chose que le résultat du travail de ces populations.

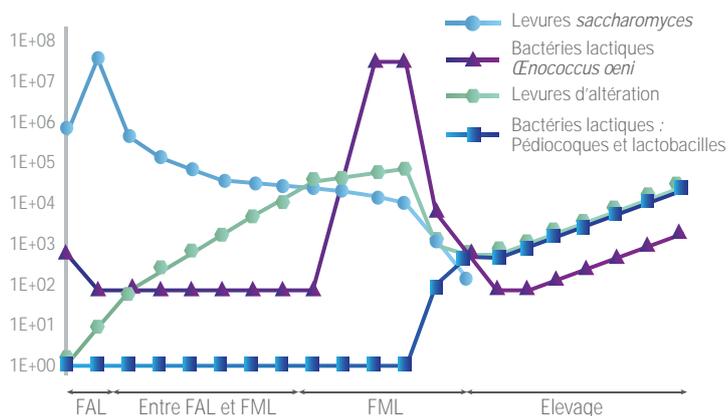
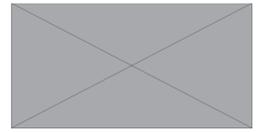


Figure 7 : Évolution schématique des flores indigènes en l'absence d'intervention humaine.



... POUR PRÉVENIR LES RISQUES (SUITE)

Il est aujourd'hui possible d'implanter une population pure sélectionnée sans activité décarboxylase pour éviter ces problèmes. L'inoculation dans les 3 à 6 jours suivant la fin de FA ou la co-inoculation levures-bactéries fonctionne sans problème dans les caves qui maîtrisent parfaitement cette étape (technique d'ensemencement, température notamment). La sélection récente de bactéries de l'espèce *Lactobacillus plantarum* (MLPrime®) offre une nouvelle solution à haute activité malolactique et ne présente aucun risque de production d'acidité volatile, même en présence de sucres résiduels. Ces micro-organismes, utilisés en co-inoculation ou rapidement après la fin de la FAL sont en mesure de réaliser une fermentation malolactique très rapide avant la croissance des bactéries indigènes, souvent responsables de l'augmentation de l'acidité volatile ou d'autres défauts du vin.

La maîtrise de l'élevage

L'ensemble des fermentations achevées, lors de l'élevage, c'est essentiellement sur le niveau de contamination initiale, la température et le niveau de SO_2 actif que l'on peut agir.

Plus le niveau de contamination initial sera bas, plus le vinificateur aura l'opportunité d'intervenir avant l'apparition d'une altération irréversible.

Afin d'abaisser cet inoculum de début d'élevage, plusieurs pratiques sont efficaces : elles consistent toutes à clarifier le vin le plus précocement possible, que ce soit grâce à des simples soutirages, des centrifugations, ou des filtrations précoces. Quelle que soit la technique choisie, il est important de garder à l'esprit que tout apport d'oxygène lors de ces opérations est favorable au développement et au métabolisme des germes d'altération.

En baissant la température on allonge un peu les temps de génération et on ralentit le métabolisme négatif de certains germes : on repousse le risque sans l'éliminer.

Le SO_2 actif dépend à cette étape-là, du SO_2 libre et du pH. Si le pH est relativement bas (< 3,6) non seulement les conditions sont moins favorables aux bactéries lactiques mais encore le SO_2 actif est plus élevé pour même un niveau de libre. Si le pH est haut (> 3,8), c'est l'hygiène qui reste la meilleure arme.

Importance des mises au propre et des filtrations

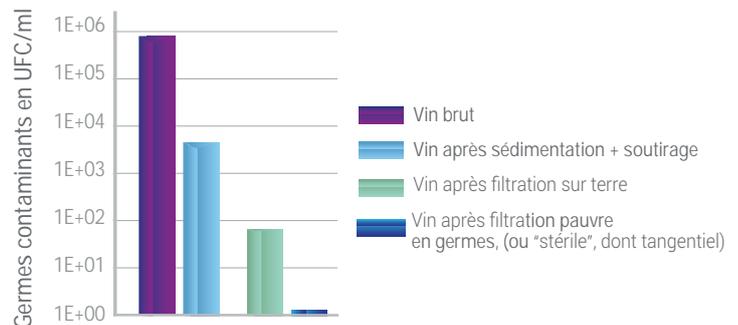


Figure 8 : Ordre de grandeur de l'évolution du nombre de contaminants en fonction du travail de mises au propre et filtration.

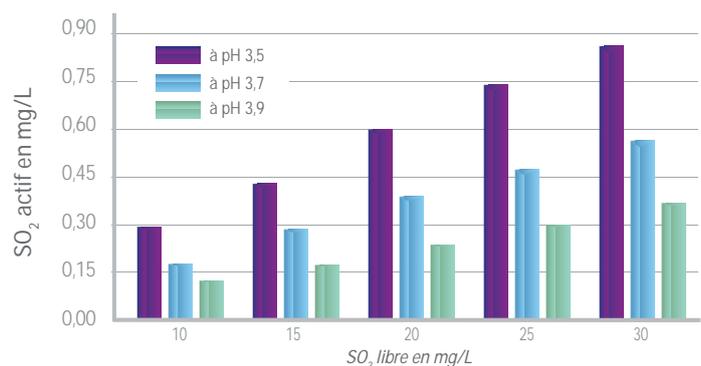
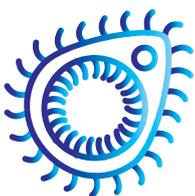


Figure 9 : Effet combiné du pH et du SO_2 libre sur la teneur en SO_2 actif à 20°C.



LE PLAN DE CONTROLE : UN OUTIL INDISPENSABLE POUR UNE PRÉVENTION DES RISQUES ET DES INTERVENTIONS RAPIDES

Le plan de contrôle doit organiser la stratégie de surveillance pour un produit (ou un ensemble de produits) sur le processus d'élaboration.

Dans le cadre de la prévention des contaminants, il aura pour objectif d'identifier les cuves sur lesquelles une intervention est nécessaire pour éviter l'apparition d'une altération. C'est avant tout un outil de prévention.

Lors de l'établissement de ce plan de surveillance, le vinificateur devra répondre aux questions suivantes :

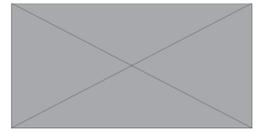
- Quelles analyses dois-je réaliser ?
- Quelles cuves dois-je contrôler ?
- Quand dois-je faire des contrôles ?
- Quelles actions mettre en place en fonction du résultat ?

Les réponses à chacune de ces questions sont propres à chaque cave et pourront évoluer en fonction des premiers résultats obtenus. Un plan de contrôle doit aussi s'adapter dans le temps.

Choisir la méthode

La première question à trancher est de savoir quelle méthode analytique retenir. Il est possible de quantifier les conséquences d'une altération microbiologique, en dosant **par exemple** les éthylphénols produits par *Brettanomyces*. On peut aussi mesurer et suivre l'évolution des populations de ces mêmes *Brettanomyces*.

| MÉTHODES/PRINCIPES | AVANTAGES | INCONVÉNIENTS |
|---|---|---|
| DOSAGE ÉTHYL PHÉNOLS | Quantification précise des phénols volatils produits par <i>Brettanomyces</i> et donc du défaut gustatif d'un vin. | Pas de mesure de population, ni d'évolution du risque donc pas d'indication sur les actions à entreprendre (les molécules peuvent être présentes alors que les populations ne le sont plus). Ne permet pas de mesurer les effets d'un traitement sur les populations. Teneurs en composés pas toujours liées à la perception du défaut. |
| Q PCR | Réponse immédiate (24 à 48 heures) sur la présence de <i>Brettanomyces</i> . | Ne distingue pas les <i>Brettanomyces</i> mortes des vivantes (qu'elles soient sous forme VNC (Viable Non Cultivable) ou sous forme viable cultivable) et seuil de détection >10 UFC/ml. |
| CYTOMÉTRIE EN FLUX | Réponse immédiate (24 à 48 heures) sur la présence de <i>Brettanomyces</i> ou autres levures selon méthode. | Au mieux, ne prend en compte que les <i>Brettanomyces</i> vivantes ET sous forme VNC. Difficultés sur les produits en cours de FA et seuil de détection >100 UFC/ml. |
| MISE EN CULTURE SUR MILIEU SPÉCIFIQUE GÉLOSÉ | Réponse spécifique <i>Brettanomyces</i> vivantes et cultivables (donc susceptibles de produire des phénols volatils) et bactéries lactiques/acétiques (selon méthode retenue) avec des seuils de détection <10 UFC/ml Certains milieux comme celui utilisé par l'ICV pour les IGA permettent aussi de suivre les bactéries lactiques et acétiques. | Délai de réponse à 7 jours incompressible. |
| MILIEU LIQUIDE POUR DÉTECTER LE NIVEAU DE POPULATION DES <i>BRETTANOMYCES</i> | Identifie une population active de <i>Brettanomyces</i> . | Délai de réponse d'au moins 5 jours (le plus souvent 7 à 10). Pas d'indication sur le niveau de la population et donc aucune information sur les dynamiques de populations. |



La mise en culture sur milieu spécifique permet donc, malgré son délai de réponse, d'anticiper les montées de populations (Brett en particulier) et par conséquent les altérations qui peuvent en découler. Elle se positionne totalement dans un dispositif de surveillance et de prévention.

Quelles cuves contrôler ?

Chaque vinificateur le sait : toutes les cuvées ne sont pas "égales" devant le risque microbiologique.

Le "risque contaminant" associé à chaque cuve ou lot intègre les caractéristiques du raisin (état sanitaire notamment), le type de vinification (carbonique, traditionnelle, sans SO₂ ...), le déroulement des fermentations, les caractéristiques analytiques (TAV, pH, ...), l'historique de la cave ou encore le type de contenant. Des outils existent permettant, a priori, d'évaluer ce risque microbiologique en fonction des critères décrits ci-dessus.

Dès lors, on contrôlera prioritairement les cuves estimées "à risque", en prenant aussi en compte leur potentiel commercial. Dans le cas de lots importants (cuves ou barriques), on pourra pratiquer par sondage.

Quand dois-je contrôler ?

Pour certaines cuvées (identifiées comme problématiques les années précédentes), les contrôles doivent commencer très tôt, dès le début de fermentation alcoolique ou sur les fins des fermentations alcooliques (FA languissante par exemple).

Globalement, un premier état des lieux précoce (post FA et FML) permettra :

- D'évaluer le niveau de risque général du nouveau millésime.
- D'identifier les cuvées à surveiller pendant l'hiver
- D'éviter de propager la contamination lors des éventuels assemblages et autres manipulations de vins.

Ensuite, la fréquence des contrôles dépendra du niveau de contaminants évalué, des conditions environnementales (températures notamment) et des caractéristiques des matrices (niveau de SO₂ actif).

En période hivernale, un suivi tous les 2 mois (novembre/janvier/mars par exemple) peut s'avérer suffisant. Avec le réchauffement des vins, un suivi toutes les 4/6 semaines s'impose alors.

De manière plus générale, il est conseillé d'évaluer les contaminants sur les cuves de base des assemblages à bonne ou forte valeur ajoutée ainsi que sur toutes les cuves qui feront l'objet d'un élevage spécifique avec du bois (barriques ou alternatifs) et / ou de l'oxygène. Les cuves de ouillage des chais barriques sont une source fréquente de contamination : les contrôler plusieurs fois par mois notamment au moment du remplissage des barriques neuves, est fortement conseillé.

Dans tous les cas, le plan de contrôle initial pourra être modifié et adapté selon les résultats analytiques obtenus en cours de campagne.

Quels comportements mettre en place en fonction du résultat ?

Avant de savoir que faire, le vinificateur doit se fixer des seuils d'alerte et/ou d'intervention. **A partir de quel résultat analytique dois-je mettre en œuvre une action ?**

A ce stade, deux éléments clés doivent être pris en compte. Tout d'abord, la disponibilité des moyens d'action peut conditionner la capacité de réaction de la cave. Selon qu'il s'agisse de vins bio ou pas, de gros volumes ou pas, les solutions possibles seront plus ou moins "radicales" et rapides à mettre en œuvre.

Ensuite, la dynamique des populations suivies doit être estimée en tenant compte des résultats précédents. Un vin peut très bien présenter une petite population de *Brettanomyces* mais qui reste totalement stable au fil des contrôles.

On peut très bien imaginer plusieurs seuils d'intervention associés à différentes méthodes en cave.



LE PLAN DE CONTROLE : UN OUTIL INDISPENSABLE ...

TABLEAU 3 : EXEMPLE DE PLAN D'ACTION EN FONCTION DES NIVEAUX DE CONTAMINATION DÉTECTÉS

| Résultat précédent Dernier résultat | <10 UFC/ML | 10 À 100 UFC/ML | 100 À 1.000 UFC/ML | >1.000 UFC/M |
|--|---|---|--|--------------|
| <10 UFC/ML | Pas de souci sanitaire Maintenir la surveillance. | Baisse de populations suite au traitement réalisé. Reprendre une surveillance normale. | Baisse drastique de populations suite au traitement réalisé. Reprendre une surveillance normale. | |
| 10 À 100 UFC/ML | Progression des populations Resserrer le prochain contrôle et l'étendre aux autres cuves du lot. Intervenir sur le niveau de SO ₂ , un soutirage, chitosane en préventif... | Populations présentes mais stables Maintenir les contrôles rapprochés. Valider l'absence de déviation organoleptique et les niveaux de SO ₂ . | Baisse sensible mais partielle des populations. Maintenir des contrôles rapprochés Contrôler l'absence de déviation organoleptique ainsi que les niveaux de SO ₂ . | |
| 100 À 1.000 UFC/ML | Forte progression des populations. Réaliser un contrôle sur toutes les cuves du lot Intervenir rapidement : chitosane, filtration, flash pasteurisation et suivi organoleptique. Contrôle IGA après traitement. | Progression nette des populations et atteinte de seuils critiques. Réaliser un contrôle sur toutes les cuves du lot. Intervenir rapidement : chitosane, filtration, flash pasteurisation et suivi organoleptique. Contrôle IGA après traitement | Populations toujours présentes à de forts niveaux Traitement réalisé inefficace ou re-contamination immédiate. Intervenir urgemment sur un traitement mieux adapté filtration tangentielle, flash pasteurisation Contrôle IGA après traitement. | |
| > 1.000 UFC/ML | | | | |

Pour les parcs de barriques conséquents, certaines adaptations sont nécessaires dans l'élaboration du plan de contrôle :

- Segmentation du parc en différents lots selon l'âge des barriques, leur historique (contamination n-1) ou encore leur localisation (chai climatisé ou pas,...).
- Echantillonnage au moins une barrique par lot et monter à 1 barrique sur 10 si risque élevé.
- Favoriser l'utilisation de chitosane en préventif.
- Sortie immédiate des barriques dès passage à plus de 100 UFC/ml pour traitement du vin et désinfection des barriques.

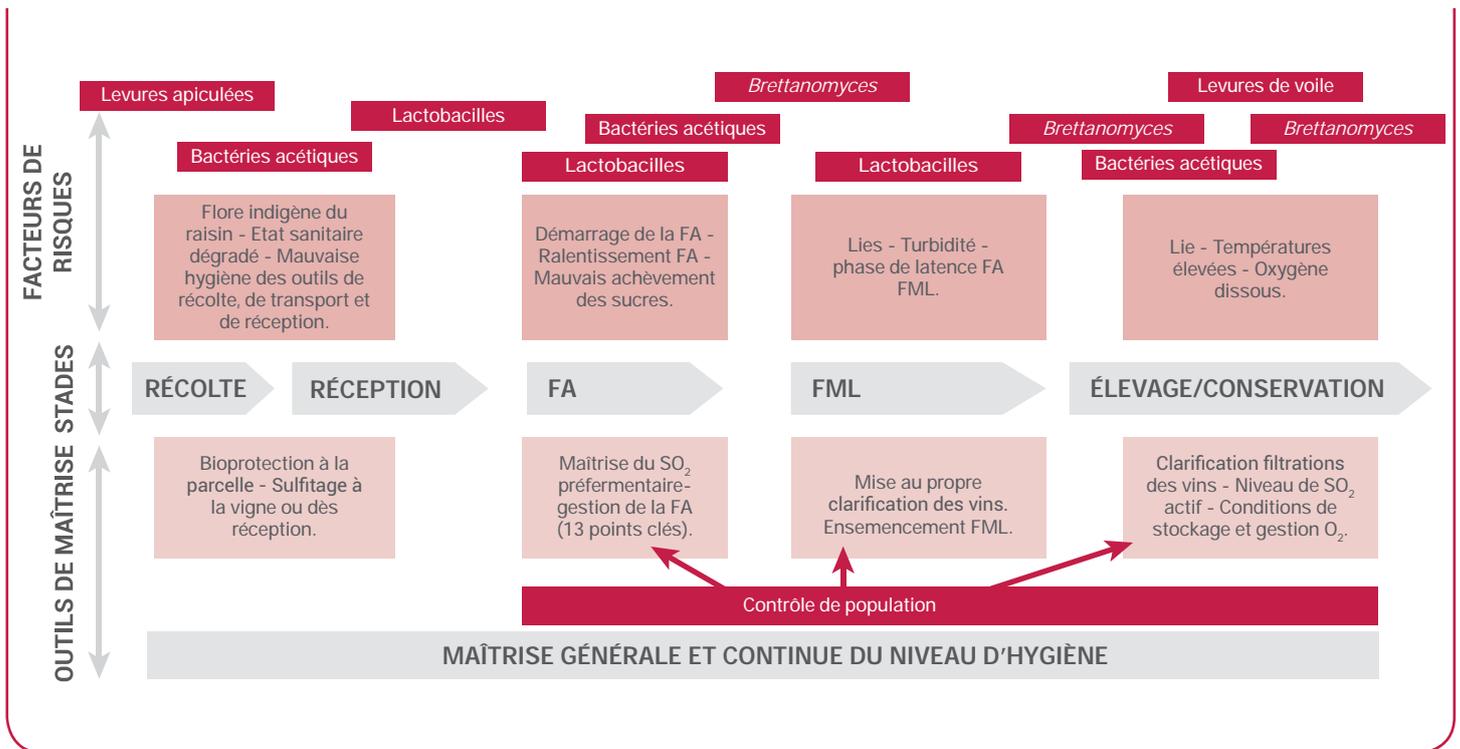
Quelques conseils pratiques pour effectuer les prélèvements :

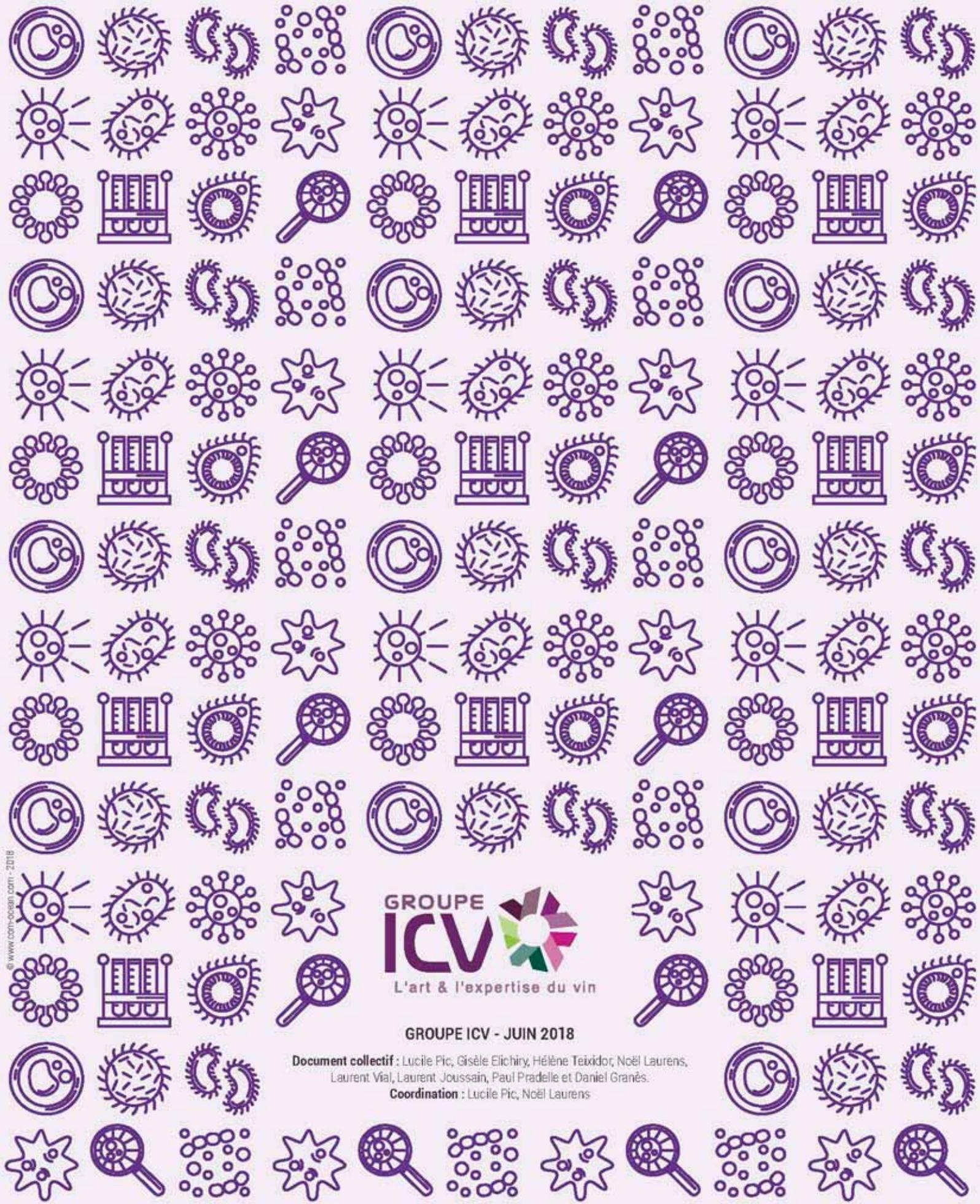
- Si possible assurer la représentativité de l'échantillon par un brassage du vin.
- Echantillonner par le haut de cuve possible en veillant à prélever au cœur de la cuve. Ne pas prélever dans les 4/5 jours suivant un sulfitage.
- Prélever éventuellement par vannes ou robinets en prenant soin de lessiver et sans manipuler la vanne ou le robinet en cours d'échantillonnage !
- Utiliser des flacons avec bouchons à vis neufs ou parfaitement propres, préalablement rincés à l'eau chaude puis fermés.
- Privilégier du matériel à usage unique. Sinon rincer/désinfecter le matériel de prélèvement entre 2 cuves ou travailler avec du matériel à usage unique : le risque de contamination croisée des échantillons et des cuves doit être maîtrisé.
- Fermer immédiatement l'échantillon en évitant de toucher le pas de vis et l'intérieur du bouchon.
- Pour les barriques privilégier du matériel de prélèvement à usage unique, sinon veiller à rincer totalement la pipette de prélèvement.





... POUR UNE PRÉVENTION DES RISQUES ET DES INTERVENTIONS RAPIDES (SUITE)





© www.com-ocean.com - 2016



GROUPE ICV - JUIN 2018

Document collectif : Lucile Pic, Gisèle Elichiry, Hélène Teixidor, Noël Laurens,
Laurent Vial, Laurent Joussain, Paul Pradelle et Daniel Gran  s.

Coordination : Lucile Pic, Noël Laurens