

Effet préventif et curatif de préparations à base de chitosane sur le développement de *Brettanomyces bruxellensis*

Observations macroscopiques et microscopiques

Bastien Nazaris¹, Étienne Gontier², Lucie Geay², Chantal Mansour³, Virginie Moine³, Joana Coulon³

¹ Laffort – Bordeaux – France. ² Bordeaux Imaging Center – Pôle imagerie électronique Université de Bordeaux – France. ³ BioLaffort – Bordeaux – France.



Extrait de la Revue des Œnologues n° 158
www.oeno.tm.fr

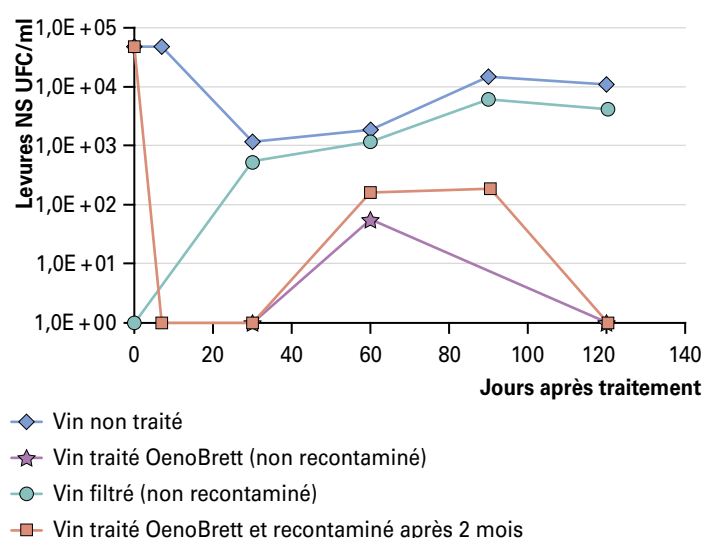
L'altération des vins par la levure *Brettanomyces* est bien connue des vinificateurs. Les phénols volatils qu'elle produit (4-éthyl-phénol ; 4-éthyl-gaïacol) confèrent au vin des odeurs de cuir et de sueur de cheval. Autrefois caractérisées comme « goût de terroir », ces flaveurs qui nivellent les notions d'origine et de cépage, sont aujourd'hui le centre de nombreuses attentions.

Le chitosane est un des rares moyens curatifs permettant de lutter contre *Brettanomyces* et les altérations qu'elle entraîne (Blateyron *et al.*, 2012). Son application dans les vins est autorisée depuis 2011 par l'Union européenne (EC 53/2011) à la dose maximale de 10 g/hL et le codex œnologique international (OIV, 2015), définit ses propriétés. Ce produit, dérivé de la désacétylation de la chitine, ne peut en œnologie avoir qu'une origine fongique. Même si son efficacité n'est plus à démontrer en tant qu'agent de lutte contre *Brettanomyces*, les dernières acquisitions permettent aujourd'hui de préconiser son utilisation comme moyen préventif contre leur développement. Lors de ces travaux, la rémanence de ce produit et son efficacité contre des recontaminations éventuelles ont été étudiées et ces phénomènes illustrés grâce à des photos obtenues par microscopie électronique.

Méthodologie

L'étude de la rémanence d'un produit à base de chitosane associé à des β -glucanases et pectinases (*OenoBrett*[®], Laffort) est mise en place afin de déterminer la sensibilité des vins, à une éventuelle recontamination par *Brettanomyces* après un traitement. Un vin naturellement contaminé à $4,8 \cdot 10^4$ cell/mL ($332 \mu\text{g/L}$ d'éthyl-4-phénol + éthyl-4-gaïacol) est traité avec 10 g/hL de ce produit ou filtré sur membrane de taille de pores 0,45 micron. Le vin est soutiré 8 jours après traitement ou laissé au contact du produit pour une période de 3 mois. Une partie des échantillons est recontaminée à partir d'une culture de *Brettanomyces* (10 à 50 cell/mL), 1 semaine, 1 mois ou 2 mois après traitement. Tous les essais sont réalisés en duplicata et dans des contenants de 60 mL. Les populations sont suivies sur milieu gélosé sélectif Mil-Brett (Sarco). Les dosages d'éthyl-4-phénol et d'éthyl-4-gaïacol sont réalisés par le laboratoire Sarco en SBSE-GS-MS, après 4 mois. En parallèle, des observations en microscopie électronique ont été réalisées en collaboration avec le BIC (Bordeaux Imaging Center, Université de Bordeaux) afin d'étudier l'impact du chitosane sur les levures *Brettanomyces bruxellensis*. La structure cellulaire est observée par microscopie électronique à transmission (H7650,

■ **Figure 1 :** Évolution des populations de levures non-*Saccharomyces* (*Brettanomyces*) pour le cas d'un vin laissé sur *OenoBrett*[®] (Laffort) durant 4 mois et recontaminé artificiellement après 2 mois. Les résultats représentent la moyenne de deux expérimentations indépendantes.



■ **Tableau 1 :** Concentration en éthyl-4-phénol et éthyl-4-gaïacol après 4 mois de conservation des vins, pour des vins traités à l'*OenoBrett*[®] et non soutirés pendant 4 mois. Les résultats représentent la moyenne de deux expérimentations indépendantes.

	Somme des éthyl-4-phénol et éthyl-4-gaïacol ($\mu\text{g/L}$)
Vin non traité (témoin)	2252
Vin filtré (0,45 μm)	1631
Vin traité avec 10 g/hL de <i>OenoBrett</i> [®] , non recontaminé	280
Vin traité avec 10 g/hL de <i>OenoBrett</i> [®] et recontaminé après 2 mois	300

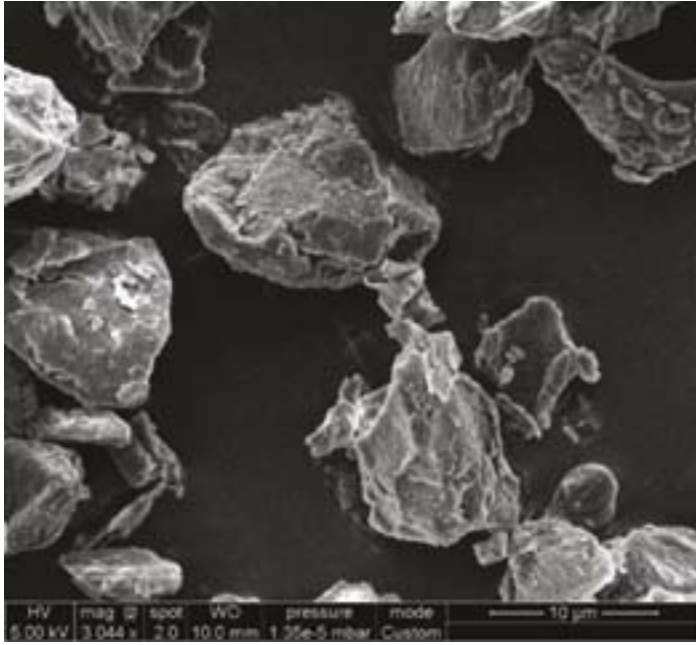
Hitachi, Tokyo, Japon) à 80 kV avant traitement ainsi qu'un jour, 4 jours et 8 jours après traitement dans un milieu modèle et dans du vin.

Résultats

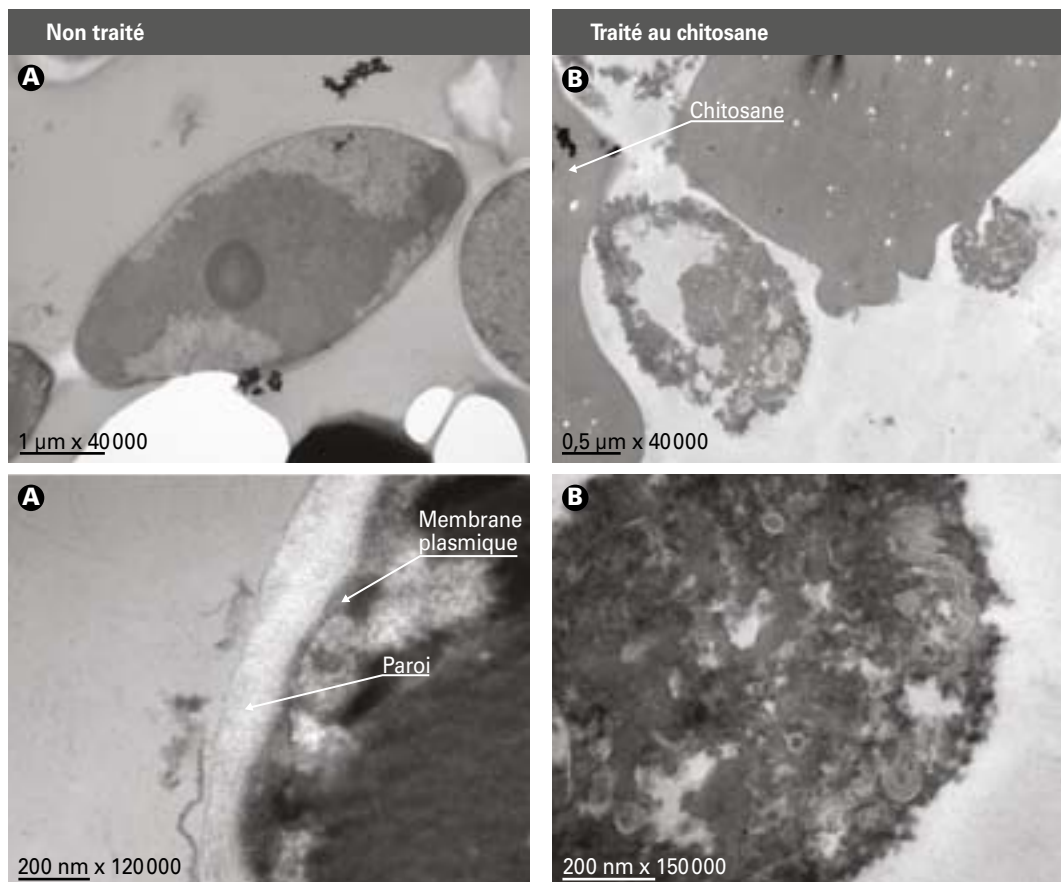
Évolution des populations de *B. bruxellensis* dans un vin traité avec un produit à base de chitosane Impact d'une recontamination

La **figure 1** illustre l'évolution des populations de *B. bruxellensis* au cours des 4 mois de conservation après traitement ou non. Le témoin non traité maintient une population au-delà de 10^3 UFC/mL

■ **Figure 2:** Chitosane observé par microscopie électronique à balayage.



■ **Figure 3:** Cellules de *B. bruxellensis* **A** cultivées en milieu YPD non traitées ou bien **B** traitées à 10 g/hL d'OenoBrett® et observées après 8 jours.



et la concentration en phénols volatils est multipliée par 7 en 4 mois. Les traitements qu'ils soient physiques (filtration) ou à base de chitosane, permettent l'élimination de *B. bruxellensis* de façon rapide et pratiquement totale si bien qu'après 1 semaine, plus aucune cellule n'est détectable (inférieur à 10 UFC/mL). Néanmoins, la modalité filtrée s'est spontanément recontaminée, indiquant que malgré la filtration, des cellules résiduelles ont pu se développer et entraîner la formation de phénols volatils, dont la concentration est multipliée par 5 durant les 4 mois de conservation (**tableau 1**). Le vin traité montre une augmentation transitoire des populations, correspondant à des cellules présentes dans les lies, mais qui en aucun cas n'entraînent la synthèse de phénols volatils. Dans l'essai traité et recontaminé après deux mois, les populations s'implantent transitoirement, mais ne sont

pas capables, dans ces conditions d'expérimentation, de former des phénols volatils. Des résultats similaires sont généralement obtenus pour des recontaminations réalisées après 1 semaine et 1 mois de traitement.

Dans quelques rares cas, une augmentation de population assortie d'une augmentation en phénols volatils peut être observée, mais jamais au niveau du témoin non traité ou de la modalité filtrée, indiquant que la rémanence observée du produit permet de limiter la synthèse de phénols volatils mais parfois, pas de l'empêcher totalement (données non montrées).

La rémanence du chitosane pourrait s'expliquer par la différence de taille des particules qui le composent (**figure 2**). Cette molécule insoluble sédimente rapidement dans le vin, cependant les particules de taille réduites pourraient rester plus longtemps en suspension, le protégeant ainsi d'un éventuel redéveloppement ou d'une recontamination par *B. bruxellensis*.

Observations microscopiques de l'effet d'un produit à base de chitosane sur des populations de *B. bruxellensis* en milieu modèle et dans du vin

Les photos présentées **figure 3** indiquent qu'avant traitement, en milieu modèle, les cellules possèdent une bonne intégrité cellulaire, une paroi et membrane plasmique visibles, ainsi que des organites en bon état. Huit jours après traitement, de gros amas, correspondant vraisemblablement au chitosane, sont visibles, associés à des structures sans paroi ni membrane et se présentant comme des agglomérats de structures subcellulaires.

Ainsi, dans ces conditions, le chitosane a entraîné la

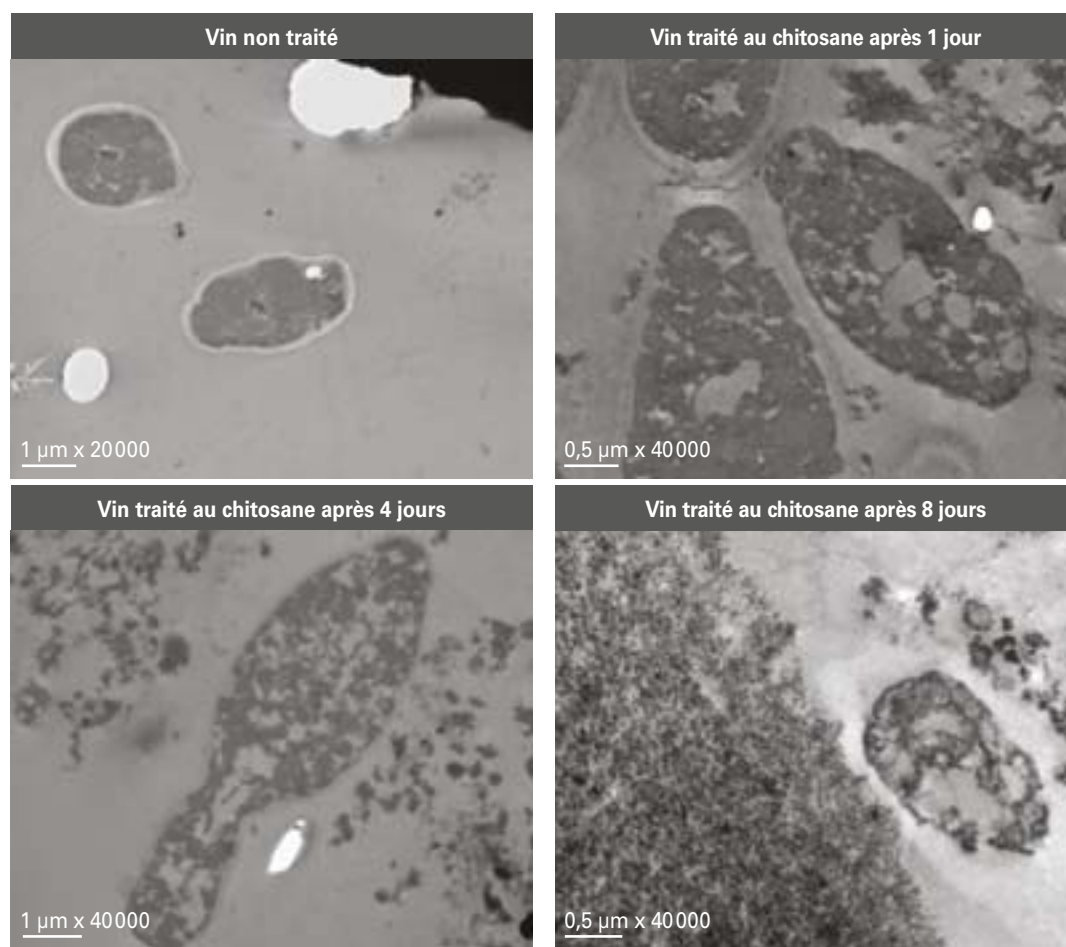
déstructuration totale des cellules et sur l'ensemble des lames observées, aucune structure cellulaire intacte n'a pu être visualisée. Dans le vin, avant traitement, les cellules présentent aussi une structure cellulaire viable (**figure 4**) et dès le premier jour de traitement, bien que les parois soient encore visibles, le milieu intracellulaire est fortement perturbé et les structures subcellulaires totalement désorganisées. Cet effet est renforcé après 4 et 8 jours de traitement.

Conclusion

Le développement de *Brettanomyces* dans les vins reste toujours un sujet sensible en œnologie et les vinificateurs mettent en œuvre tout ce qui est possible pour limiter leur développement, afin d'éviter la production de phénols volatils, notamment, par le biais de sulfites adaptés (qui restent cependant souvent insuffisants). Il existe aujourd'hui un moyen de lutte efficace contre ces micro-organismes.

Les observations microscopiques réalisées permettent d'illustrer l'effet curatif du chitosane associé à des β -glucanases et pectinases vis-à-vis de *B. bruxellensis*. Bien que parfois, pour de fortes populations initiales, des cellules résiduelles viables puissent rester dans les lies, celles-ci ne sont pas capables de produire des phénols volatils et les vins peuvent être laissés sur chitosane pendant au moins 3 mois, sans obligation de soutirage après 8 jours, comme traditionnellement préconisé. Mais au-delà

■ **Figure 4:** Cellules de *B. bruxellensis* dans du vin naturellement contaminé, traité ou non à OenoBrett® (10 g/hL) et observé après 1, 4 et 8 jours de traitement.



de cet aspect curatif, il est aujourd'hui démontré que des préparations à base de chitosane possèdent également un rôle préventif vis-à-vis de *B. bruxellensis* en empêchant le développement de populations contaminantes dans des vins préalablement traités.

Le traitement préventif de vins en fin de fermentation malolactique présente un double intérêt, puisque non seulement il permet de limiter le risque de développement de cette levure d'altération, mais il diminue aussi de façon générale la flore postfermentaire (il est en effet

connu que le chitosane agit non seulement envers *B. bruxellensis*, mais touche également les microorganismes fermentaires). Dans ce cas, le traitement peut également aider à potentialiser l'effet du SO_2 (qui sera rajouté pendant l'élevage et ultérieurement au traitement à base de chitosane), en abaissant les populations microbiennes et leur synthèse de composés combinant le SO_2 . La rationalisation de l'effet du sulfite participera donc également, à lutter contre le développement de *B. bruxellensis*. ■

■ Bibliographie

L. Blateyron-Pic, A. Bornet, C. Brandam, J.-B. Jentzer, D. Granes, J.-M. Heras, C. Joannis-Cassan, O. Pillet, N. Sieczkowski, P. Taillandier, 2012.

« Le chitosane d'origine fongique : un nouvel outil de choix pour lutter contre *Brettanomyces* dans les vins »

Revue des Œnologues, n° 143 (avril 2012) : p. 27-28.