

# Brettanomyces bruxellensis: où en sommes-nous ?

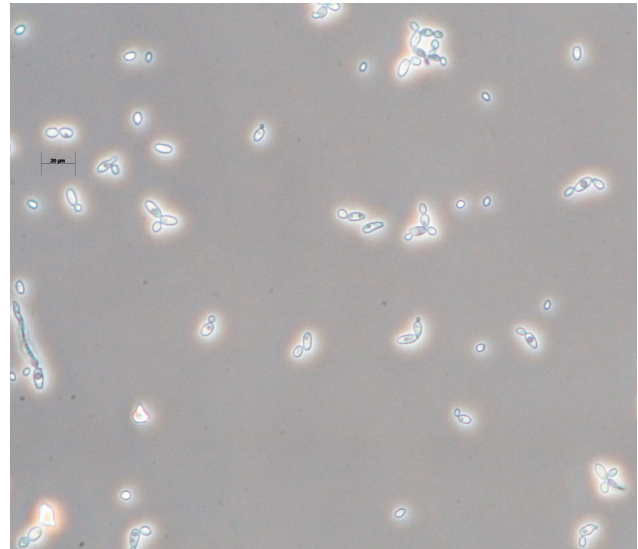
>>> Dès les années 1950, *B. bruxellensis* apparaît dans les inventaires de levures de moûts et de vins, et rapidement, on lui attribue des altérations du vin. Beaucoup plus tard, les phénols volatils produits par ces levures sont identifiés comme la cause de déviations sensorielles. Leur présence est de plus en plus prégnante, surtout pendant l'élevage en barriques. Le sulfitage est le moyen idéal d'éradication, mais s'avère quelquefois insuffisant. Particulièrement bien adaptée au vin, *B. bruxellensis* est aujourd'hui au centre des préoccupations des vinificateurs et des microbiologistes. <<<

En 1960, Peynaud et Domercq attribuent à *Brettanomyces* des altérations du vin, et en 1986, Heresztyn démontre que le défaut olfactif est dû surtout à l'accumulation de phénols volatils, produits à partir des acides cinnamiques. Les études sur *B. bruxellensis* sont lancées et ne s'arrêtent plus. Les méthodes moléculaires et l'analyse génétique d'un côté, et l'analyse chimique et sensorielle de l'autre, sont mises à profit. En même temps, œnologues et producteurs rapportent aux scientifiques les observations du terrain.

## ■ Ce que l'on sait

**Au chai d'élevage et plus tard** : la période la plus critique est l'élevage en barriques. Les altérations surviennent souvent au premier été qui suit la récolte, quand l'augmentation de la température entraîne la multiplication des *B. bruxellensis*. Une population de  $10^2$ - $10^3$  UFC/mL est le signe d'une altération prévisible si rien n'est entrepris pour arrêter la prolifération. Les soutirages, par le simple fait de la sédimentation, éliminent toute ou une partie de la population. Des travaux et observations du chai montrent que l'ajustement du  $SO_2$  à 0,6 mg/L (moléculaire) est nécessaire en cas de contamination<sup>1</sup>. Après la mise en bouteille, les levures ne meurent pas immédiatement et l'accumulation des phénols volatils peut se poursuivre. Une faible population en survie peut se multiplier dès que les conditions sont favorables.

**Connaissances scientifiques sur l'espèce** : on connaissait la diversité des souches dans l'espèce *B. bruxellensis*, et très récemment les études génétiques ont établi les causes des différences. Les méthodes basées sur l'ADN ont permis successivement de détecter spécifiquement les *B. bruxellensis* par une simple PCR (réaction de polymérisation en chaîne), de les quantifier (même si les kits de détection commerciaux ne sont pas toujours simples d'utilisation et manquent de robustesse<sup>2</sup>), de distinguer dans la plupart des cas une souche d'une autre et de séquencer des génomes entiers. L'analyse des génomes, associée à des données phénotypiques, fournit des réponses à des questions œnologiques, mais aussi des bases pour



*B. bruxellensis* © Microflora

comprendre le fonctionnement de ces levures. Le rôle de la polyploïdie dans l'évolution de l'espèce est mis en évidence.

**Physiologie** : L'adaptation de *B. bruxellensis* à sa multiplication et sa survie dans l'environnement œnologique sur les raisins, le moût en fermentation, le vin et le chai est exemplaire. Sa population (en nombre et en souches) évolue au cours du processus de vinification et d'élevage. Elle est sélectionnée au fur et à mesure de l'avancée de la fermentation alcoolique<sup>3</sup>. Elle exige peu de nutriments azotés et peu de sucres pour assurer sa croissance et sa survie. Le pH a peu d'effet, et l'éthanol est toléré jusqu'à 14 % et plus. Une petite quantité d'oxygène dissous est favorable, même en fin de fermentation alcoolique.

**Production des éthyl phénols (EP) et autres métabolites indésirables** : les acides *p*-coumarique et férulique du vin sont transformés en vinyl puis éthyl phénols. *B. bruxellensis* possède les deux enzymes nécessaires, décarboxylase et réductase. Les substrats sont les acides libres ; ils sont aussi libérés de molécules plus complexes, *p*-coumaroyl et feruloyl glucose et *p*-coumaroyl et feruloyl tartrate<sup>4</sup>. Si *B. bruxellensis* ne semble pouvoir hydrolyser que les esters de glucose, *O. oeni* hydrolyse des esters d'acide tartrique. Peynaud attribuait à *B. bruxellensis* le « goût de souris » ; en effet le 2-acétyl-tétrahydro-pyridine caractéristique est produit, semble-t-il par toutes les souches, mais moins fréquemment que les EP, de même que l'acide acétique et l'acide iso valérique<sup>5</sup>.

## ■ Ce que l'on dit

**Sur leur origine** : la levure *B. bruxellensis* est principalement présente dans le chai sur l'équipement vinaire et notamment dans le bois des barriques déjà utilisées<sup>3</sup>. L'observation est exacte, mais ces levures existent aussi sur la baie de raisin<sup>3</sup>. Elles passent là souvent

## Sur la détection du risque en élevage

Le dosage des EP est souvent effectué pour la détection du risque d'altération. Si leur concentration est élevée, ou juste au-dessus du seuil critique (200-300 µg/L et même parfois moins en fonction des matrices et des dégustateurs), cela ne signifie pas que la population de *B. bruxellensis* est importante à ce moment-là. Elle peut aussi être en déclin. Inversement, une faible concentration de EP ne signifie pas l'absence de risque. Les *B. bruxellensis* peuvent se développer plus tard. Le suivi microbiologique est un complément indispensable au suivi des phénols.

inaaperçues, car, comme pour la majorité de la flore épiphytique, les conditions optimales de culture et d'isolement sont inconnues. Des observations confirment leur plus grande présence dans la microflore plus abondante des raisins pourris. Le chai et les barriques sont contaminés par des vins contaminés, issus de raisins naturellement colonisés par *Brettanomyces*<sup>3</sup>.

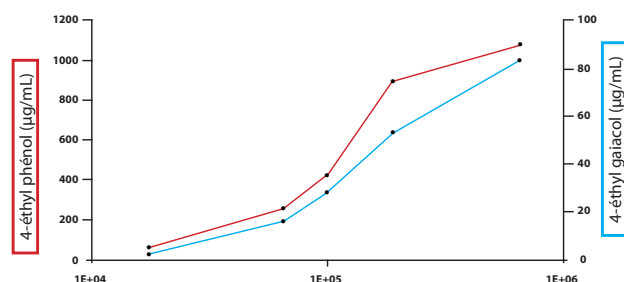
**Sur leur activité :** contrairement à ce qui est parfois dit, dans l'état actuel des connaissances, toutes les souches isolées de vin ont les activités enzymatiques cinnamate decarboxylase et vinyl réductase ; mais les activités spécifiques varient. L'accumulation des EP dépend surtout de la concentration de la population viable (Figure 1), de la disponibilité des substrats et probablement d'autres facteurs.

## Prévention

Le « Code des bonnes pratiques vitivinicoles destinées à prévenir ou à limiter la contamination par *Brettanomyces* » (OIV-OENO 462-2014) rassemble les précautions à prendre, pendant les phases pré-fermentaires, les fermentations et l'élevage. Sans surprise l'hygiène du chai et de tout l'équipement sont au cœur du dispositif. Il en est de même des soutirages, collages car *B. bruxellensis* sédimente facilement. L'élimination des populations persistantes nécessite sulfitage (en adaptant la dose à la population<sup>6</sup>) ou traitements physiques : filtration sur membrane ou traitements thermiques. Tout traitement doit être assorti d'un dénombrement avant et après application. D'autres méthodes sont préconisées suivant la tendance à la baisse du sulfitage, « bioprotection », chitosan, DMDC ; les résultats sont contradictoires ou discutables. Des pratiques physiques (champs pulsés, haute pression) tardent à faire leur preuve. Quel que soit le moyen, il faut que toute opportunité pour une contamination ultérieure au traitement soit bannie.

La prévention passe par la prévision du risque qui reste difficile en raison de la variabilité des paramètres

Figure 1. Évolution de la concentration en phénols volatils pendant l'élevage dans une barrique en fonction de la population cumulée de *B. bruxellensis* [UFC x t/mL]<sup>3</sup>.



environnementaux et de celle des souches. Le dénombrement des *B. bruxellensis* est essentiel. Il doit intervenir tout au long de l'élaboration du vin, et plus fréquemment aux périodes cruciales (ralentissements de fermentations, élevage) car seul le suivi renseigne sur la capacité de la population à se multiplier. De nouvelles méthodes permettent de détecter les souches tolérantes au SO<sub>2</sub><sup>7</sup>, ce qui apporte une information complémentaire pour choisir le bon moyen de lutte.

## Ce qu'il faut savoir et comprendre

Pourquoi cette recrudescence des cas d'altération, pourquoi certains chais sont-ils souvent atteints, d'autres jamais ? L'espèce a été domestiquée, probablement aidée par sa polyploidie, par la pression du milieu œnologique. Des souches sont plus tolérantes que d'autres à certaines contraintes, sans doute pas seulement à celle du SO<sub>2</sub> déjà démontrée. Une question se pose : l'avantage sélectif des souches tripléides va-t-il aboutir à la domination de ces souches ? D'autres facteurs environnementaux vont-ils jouer pour la contrer ? Cela est difficile à prévoir. Mais ce qui l'est beaucoup moins est l'impact de nouvelles pratiques œnologiques. Tous les éléments favorables à l'altération microbiologique en général et à *B. bruxellensis* en particulier sont réunis. En premier lieu la diminution ou l'absence du sulfitage, difficile à remplacer sans risque. Ensuite, tout ce qui enrichit le vin en nutriments carbonés, azotés et en précurseurs d'EP : la surmaturation des raisins et les pratiques pré/post-fermentaires qui extraient un maximum de matière du raisin. Des études, indiscutables, sont indispensables pour évaluer l'impact des ajouts de nutriments azotés sous toutes les formes (chimique, dérivés de levure, levures). Le sujet est difficile car *B. bruxellensis* est dans un système, et les interactions avec les autres micro-organismes ne se limitent pas à l'inhibition que l'on suppose ou espère. ■

Aline Lonvaud-Funel

Institut des sciences de la vigne et du vin - ISVV  
210 chemin de Leysotte 33882 Villenave d'Ornon

- 1 Du Toit, W.J., Pretorius, I.S. & Lonvaud Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 862–871.
- 2 Longin, C., Julliat, F., Serpaggi, V., Maupeu, J., Bourbon, G., Rousseaux, S., Guilloux-Benatier, M., & Alexandre, H. (2016). Evaluation of three *Brettanomyces*; qPCR commercial kits: results from an interlaboratory study. *OENO One*, 50(4). <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2016.50.4.1274>
- 3 Renouf, V., Lonvaud-Funel, A. & Coulon, J. (2007). The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: a review. *OENO One*, 41(3), 161–173. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2007.41.3.846>
- 4 Hixson J.L., Hayasaka Y., Curtin C.D., Sefton M.A. & Taylor D.K. (2016). Hydroxycinnamoyl Glucose and Tartrate Esters and Their Role in the Formation of Ethylphenols in Wine. *J Agric Food Chem.* ; 64 :9401–11.
- 5 Romano, A., Perello, M.C, de Revel, G., Lonvaud-Funel, A. (2008). Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J Appl Microbiol.*, 104:1577–85.
- 6 Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. & Hervé A. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine, *Food Research International*, Volume 89, Part 1, Pages 620-630, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>
- 7 Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarède I. & Albertin W. (2018). Molecular Diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' Sulfur Dioxide Sensitivity Through Genotype Specific Method. *Front Microbiol.*, 9:1260.