



Évaluation de l'impact d'un traitement au chitosane sur les microorganismes en œnologie

Cécile Miot-Sertier¹, Margot Paulin¹, Lucie Dutilh², Marine Lucas², Patricia Ballestra¹, Warren Albertin¹, Isabelle Masneuf-Pomaredé¹, Joana Coulon³, Virginie Moine³, Amélie Vallet-Courbin², Julie Maupeu², Marguerite Dols-Lafargue¹

¹ Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISW, F-33140 Villenave d'Ornon, France

² Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISW, F33882 Villenave d'Ornon, France.

³ BioLaffort, 11 rue Aristide Berges, 33700 FLOIRAC, France.

Dans un contexte de réduction de SO₂ dans les vins, l'emploi empirique du chitosane pour éliminer l'agent d'altération *Brettanomyces bruxellensis* devient une alternative fréquente. Le traitement au chitosane affecte un certain nombre d'espèces microbiennes, au moins transitoirement, mais il existe une grande variabilité de réponse au sein des souches de chaque espèce. De plus, l'efficacité du chitosane serait également modulée par les paramètres physico-chimiques du vin. Toutefois, lorsque le traitement au chitosane est efficace son effet semble durable.

Le chitosane en œnologie

Le projet Chitowine, financé par l'Agence Nationale de la Recherche de 2018 à fin 2022, visait à mieux comprendre le mécanisme d'action du chitosane en œnologie, via l'évaluation fine de son efficacité pour différents usages œnologiques. Ces travaux s'appuient notamment sur les connaissances scientifiques acquises concernant les grands groupes microbiens retrouvés en œnologie.

Le chitosane est employé depuis 2009 (OIV/Oeno, 338A/2008 et réglementation européenne EC/53/2011) y compris en Agriculture Biologique (Regulation EU 1584/2018) pour traiter les vins contaminés par la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*. En effet, ce polysaccharide dérivé de chitine est chargé positivement au pH du vin, ce qui lui permet d'interagir avec les particules chargées négativement dans le vin et notamment les microorganismes présents. Néanmoins, les travaux menés divergent sur son efficacité vis-à-vis de cette espèce ainsi que pour d'autres microorganismes œnologiques. De plus, préconisé jusqu'à récemment en élevage, de nombreuses applications précoces sont désormais proposées par les fournisseurs, sans réelle démonstration scientifique, notamment pour une utilisation en phase pré-fermentaire.

Quel est l'impact d'un traitement au chitosane sur les microorganismes œnologiques ?

Une étude de large envergure, menée sur 206 souches de 27 espèces de levures et bactéries de l'écosystème œnologique a été conduite dans du vin, en conditions standardisées¹. Pour certaines espèces, comme *Saccharomyces cerevisiae*, *B. bruxellensis* et *Oenococcus oeni*, les souches ont été sélectionnées selon leur représentativité au sein des groupes génétiques^{2 3 4}. Ces souches ont été adaptées, puis mises en croissance dans un vin fermenté au laboratoire. Pour chacune, un traitement au chitosane à 4 ou 10 g/hL, suivi d'un soutirage à 3 ou 10 jours d'essais a été réalisé. Un témoin, simplement soutiré

dans les mêmes conditions, a permis d'attester la survie des souches microbiennes dans les conditions de l'essai en l'absence de traitement.

Il existe 3 grands comportements de réponse de *Brettanomyces bruxellensis* à l'ajout de chitosane

Cette étude a mis en évidence l'existence de trois types de réponses de *B. bruxellensis* vis-à-vis d'un traitement au chitosane (Figure 1) :

- ▶ Les souches dites **SENSIBLES**, qui dès le 3^{ème} jour de contact sont à des niveaux de populations viables et cultivables très faibles (ou en dessous du seuil de détection de la méthode) aussi bien dans les lies que dans la fraction de vin soutirée.
- ▶ Les souches considérées comme **INTERMÉDIAIRES**, pour lesquelles peu de cellules viables et cultivables sont détectées dans la fraction de vin soutiré, alors que des populations non négligeables de microorganismes sont présentes dans les lies.
- ▶ Les souches qualifiées de **TOLERANTES**, transitoirement affectées par le traitement, mais qui présentent des populations viables et cultivables importantes dans la fraction de vin soutiré et dans les lies à dix jours.

B. bruxellensis est donc globalement affectée par le chitosane². Pour preuve, en condition de laboratoire en vins standardisés, 41 % des souches de *B. bruxellensis* présentent un comportement « sensible » et 38 % sont plutôt associées à une réponse dite « intermédiaire ».

Finalement, divers essais ont démontré que, après soutirage, le traitement au chitosane élimine près de 80 % des souches parmi une cinquantaine testées en vin rouge. Cependant, certaines souches restent insensibles au traitement et demeurent viables et susceptibles de croître et produire des phénols volatils dans un vin pourtant traité. Pour un même vin et une souche donnée, la dose utilisée, 4 ou 10 g/hL (comme préconisée par l'OIV), module peu le comportement de la souche, seulement l'envergure du résultat.

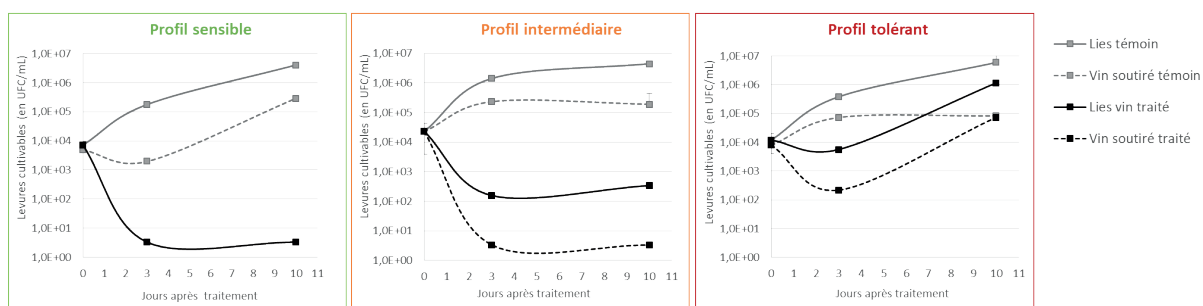


FIGURE 1. Courbes de tendances définissant les différents comportements des souches microbiennes de *B. bruxellensis* observées suite à un traitement au chitosane à 10 g/hL dans un même vin rouge. Les traits pleins correspondent aux lies du vin traité (en noir) ou témoin (en gris). Les traits pointillés correspondent à la fraction de vin soutiré traitée (en noir) ou témoin (en gris).



Existe-t-il un lien entre le groupe génétique des levures *B. bruxellensis* et leur réponse vis-à-vis du chitosane ?

Le lien entre la sensibilité au SO₂ et l'appartenance à un groupe génétique de *B. bruxellensis* a été démontré en 2018⁵. Les travaux du projet CHITOWINE se sont donc attachés à rechercher l'existence d'un lien potentiel entre le groupe génétique et le comportement vis-à-vis du chitosane sur une cinquantaine de souches⁶. Ainsi la nature du comportement de souches de *B. bruxellensis* face à un traitement au chitosane a été établie pour des isolats de chacun des 6 grands groupes génétiques.

Aux doses de chitosane préconisées en œnologie (4 à 10 g/hL), l'étude ne permet pas d'établir un lien clair et robuste entre groupe génétique et comportement de la souche (Figure 2). Cependant, une grande proportion de souches résistantes au SO₂ (groupe AWRI 1499) sont sensibles au chitosane.

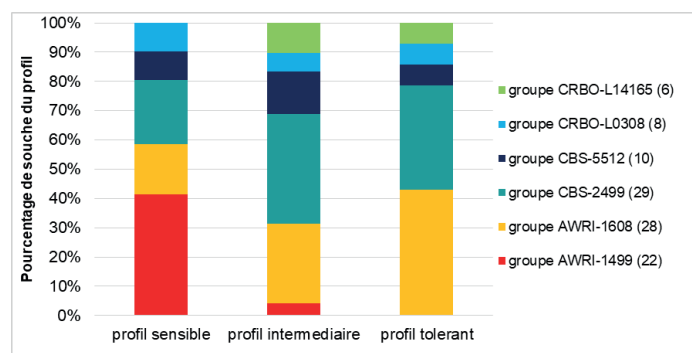


FIGURE 2. Répartition des souches de *B. bruxellensis* selon le groupe génétique (nombre d'essais entre parenthèse) en fonction de leur comportement vis-à-vis d'un traitement au chitosane à 10 g/hL dans un même vin rouge.

Qu'en est-il des autres microorganismes rencontrés en œnologie ?

L'étude a été élargie à 27 espèces de levures et bactéries œnologiques. Les trois grands comportements vis-à-vis du chitosane sont retrouvés, en proportions variables selon l'espèce ou le groupe d'espèces considéré (Figure 3).

La plupart des microorganismes étudiés sont affectés, au moins transitoirement, par un traitement au chitosane à 10 g/hL dans un vin rouge. Par exemple, parmi les levures *S. cerevisiae* testées, plus de la moitié sont efficacement éliminées par le chitosane. Les effets sont variables sur les espèces de levures dites non-*Saccharomyces* rencontrées en phase pré-fermentaire. Au laboratoire, la majeure partie des souches de l'espèce *Hanseniaspora uvarum* n'est pas affectée par un traitement précoce au chitosane. Pour des levures d'intérêt comme *T. delbrueckii* ou *M. pulcherrima*, les résultats sont très hétérogènes et dépendent clairement de la souche considérée. Les bactéries acétiques sont très peu affectées par un traitement dans

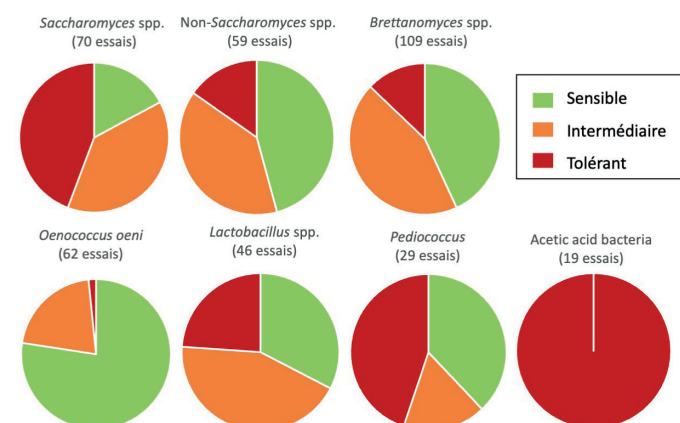


FIGURE 3. Répartition du profil sensible, intermédiaire ou tolérant des souches microbiennes testées au sein d'une espèce ou d'un groupe de microorganismes après traitement au chitosane à 10 g/hL dans un même vin rouge.

un vin rouge, aussi bien en vinification qu'en élevage : aucune des souches testées n'a vu sa viabilité modifiée par le chitosane. Enfin, l'efficacité sur les bactéries lactiques est variable, avec une mosaïque de réponses, sauf chez l'espèce *O. oeni* fortement affectée par le chitosane dans plus de 90 % des essais.

Est-ce que l'efficacité du chitosane est modulée par le stade de la vinification ?

La nature du vin module la disponibilité du chitosane et la capacité des microorganismes à surmonter ses effets.

L'application précoce du chitosane à l'encuvage ne permet pas de remplacer le sulfitage pour maîtriser la prédominance de levures non souhaitées comme l'espèce *H. uvarum*, confirmant les essais en laboratoire (Figure 3). Cette application précoce ne semble toutefois pas perturber le déroulement d'une fermentation alcoolique lorsque le moût est inoculé avec une souche sélectionnée de *S. cerevisiae*. En revanche, une application précoce bien qu'efficace rend aléatoire le déroulement de la fermentation malolactique. Ceci est en partie expliqué par la sensibilité des souches d'*O. oeni* au chitosane. L'élimination de *B. bruxellensis* est néanmoins possible, sous réserve d'un soutirage efficace, de façon durable. Enfin, le traitement n'est pas efficient pour la maîtrise des bactéries acétiques.

Conclusion

Les microorganismes œnologiques réagissent selon trois comportements vis-à-vis d'un traitement au chitosane dans un vin et peuvent être catégorisés comme étant sensibles, intermédiaires ou tolérants. Un soutirage efficace après le traitement permet l'élimination de la levure d'altération *B. bruxellensis*, pour 80 % des souches testées dans cette étude, et de façon durable. De manière rassurante, la majeure partie des souches appartenant au groupe génétique AWRI 1499 (connu pour sa tolérance aux sulfites⁵) testées dans cette étude, est sensible au chitosane. Par ailleurs, un traitement précoce ne semble pas influencer le bon déroulement de la fermentation alcoolique, mais n'a qu'un intérêt limité, voire nul pour la maîtrise des levures non-*Saccharomyces* ou des bactéries acétiques. De plus, appliqué trop tôt, le chitosane rend aléatoire le bon déroulement de la fermentation malolactique et n'est donc pas recommandé. ■

Les auteurs souhaitent remercier l'Agence nationale de la Recherche pour le financement du projet CHITOWINE : ANR-17-CE21-0006.

Sources : Article prenant sa source des articles de recherche "*Brettanomyces bruxellensis* displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine." (*Front. Microbio*, 2021) et "Assessment of chitosan antimicrobial effect on wine microbes" (*Int. Journal of Food Microbiol.*, 2022).

- Miot-Sertier C., Paulin M., Dutilh L., Ballestra P., Albertin W., Masneuf-Pomarede I., Coulon J., Moine V., Vallet-Courbin A., Maupeu J. and Dols-Lafargue M. (2022). Assessment of chitosan antimicrobial effect on wine microbes. *Int. Journal of Food Microbiol.* (381). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109907>
- Da Silva T, Albertin W, Dillmann C, Bely M, la Guerche S, Giraud C, Huet S., Sicard D., Masneuf-Pomarede I., De Vienne D. and Marullo P. (2015). Hybridization within *Saccharomyces* genus results in homeostasis and phenotypic novelty in winemaking conditions. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123834>
- Avramova M., Cibrario A., Peltier E., Coton M., Coton E., Schacherer J., Spano G., Capozzi V., Bmaitta G., Salin F., Dols-Lafargue M., Grbin P., Curtin C., Albertin W. and Masneuf-Pomarede I. (2018a). *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Sci. Rep.* (8) 4136. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
- Campbell-Sills H., El Khoury M., Favier M., Romano A., Biasioli F., Spano G., Sherman D.J., Bouchez O., Coton E., Coton M., Okada S., Tanaka N., Dols-Lafargue M. and Lucas P.M. (2015). Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals specific domestication of strains to cider and wines. *Genome Biol Evol* 7, 1506–1518. <https://doi.org/10.1093/gbe/ew084>
- Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarede I. and Albertin W. (2018b). Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*'s sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. *Front. Microbiol.* (9)1260. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>
- Paulin M., Miot-Sertier C., Dutilh L., Brasselet C., Delattre C., Pierre G., Dubessay P., Michaud P., Doco T., Ballestra P., Albertin W., Masneuf-Pomarede I., Moine V., Coulon J., Vallet-Courbin A., Maupeu J. and Dols-Lafargue M. (2020). *Brettanomyces bruxellensis* displays variable susceptibility to chitosan treatment in wine. *Front Microbiol.* (11)571067. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571067>