



> Edition 2023

CHITOSANE

Etat des lieux et pistes de recherche

AVEC LE SOUTIEN FINANCIER DE



La Nouvelle-Aquitaine et l'Europe
agissent ensemble pour votre territoire





Pierrick LAVAU

Vigneron Bio
à Saint-Etienne-de-Lisse (33330)

*Président de la Commission Technique
de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine*

ÉDITO

« Mes chers collègues,

Qu'il s'agisse de répondre aux attentes du marché ou d'une volonté technique de réduire les intrants dans leurs vins, de plus en plus de producteurs montrent un intérêt pour l'élaboration de vins sans ajout de SO_2 . Le défi de mener à bien ce type de vinification demande une vigilance particulière en ce qui concerne la préservation contre les altérations microbiologiques et les risques liés à l'oxydation.

Parmi les alternatives potentielles au SO_2 , le chitosane est pressenti comme un outil de lutte contre les déviations microbiologiques dont la principale levure d'altération est *Brettanomyces bruxellensis*. Le chitosane présente l'avantage d'être utilisé pour de nombreuses applications : collage, stabilisation, prévention des casses (...). Cependant, ses mécanismes d'action en usage anti-microbien ne sont pas encore totalement maîtrisés. Dans l'optique d'améliorer l'utilisation de cet outil œnologique, la Commission Technique de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine travaille en étroite collaboration avec ses partenaires experts de l'IFV, de l'ISV, et de la Chambre d'Agriculture de la Gironde. Les savoirs acquis et ceux encore à l'étude concernant le chitosane sont détaillés dans cette plaquette. L'accès à ces connaissances permet d'aborder l'utilisation du chitosane avec davantage de recul lors de la vinification de vos vins biologiques. Bonne lecture ! »

table des matières

I.	Qu'est-ce que le chitosane ?	8
II.	Le chitosane en œnologie	9
	a. Règlementation	9
	b. Clarification, agent de collage	10
	c. Réduction des teneurs en métaux et prévention des casses	11
	d. Réduction des contaminants de type ochratoxine A (OTA)	12
	e. Réduction des populations de micro-organismes indésirables	12
III.	Recherche et expérimentations : l'activité antimicrobienne du chitosane	13
	a. Contexte	13
	b. Le projet Chitowine	13
	c. Le projet Vins Sans	15
	1. Essais en conditions contrôlées : IFV pôle Nouvelle-Aquitaine	15
	2. Essais terrain : Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine	21
IV.	Conclusion	26

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- FA : Fermentation alcoolique
- FML : Fermentation malolactique
- ND : Non détecté
- « rep » : répétition
- UFC : Unité Formant Colonie, permettant d'estimer le nombre de microorganismes viables dans un échantillon, c'est-à-dire capables de se multiplier sur un milieu gélosé sélectif.
- MEB : mise en bouteille

LES PARTENAIRES



VIGNERONS BIO
NOUVELLE-AQUITAINE

Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine est un syndicat professionnel créé en 1995 par des vignerons Bio, pour des vignerons Bio. En 2023, **Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine représentait les intérêts de plus de 200 structures viticoles Bio (vignerons indépendants et coopérateurs).**

La volonté du Syndicat est de **développer une viticulture biologique certifiée, plurielle et viable économiquement.**

Pour ce faire, les missions de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine s'articulent autour de 4 grands pôles :

- la **défense syndicale**, pour porter la voix des vignerons Bio auprès des instances locales, nationales et européennes.
- l'**expertise œnologique et économique**, pour apporter conseils, outils et accompagnement sur des problématiques rencontrées par les producteurs.
- la **promotion des vins Bio** auprès des professionnels et particuliers.
- la **recherche et l'expérimentation** pour permettre aux vignerons Bio d'être au cœur des innovations viticoles et œnologiques de demain.

Tous les vignerons certifiés Bio ou en conversion de Nouvelle-Aquitaine peuvent adhérer, contactez-nous !



L'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV) est l'institut technique de la filière vitivinicole. Organisme qualifié, l'IFV dispose d'un savoir-faire et de compétences techniques et scientifiques sur l'ensemble du procédé, de la vigne au vin.

Ses équipes pluridisciplinaires conduisent des expérimentations de recherche appliquée, maillon essentiel pour assurer le transfert entre la recherche académique et le développement sur le terrain.

Le pôle IFV de Nouvelle-Aquitaine, dans le cadre du Vinopôle Bordeaux Aquitaine, est en particulier référent sur :

- la réduction des intrants phytosanitaires, les pratiques alternatives dont le développement du biocontrôle, les OAD et les bonnes pratiques de pulvérisation
- les pratiques œnologiques, procédés et matériels innovants, la microbiologie appliquée à l'œnologie notamment dans l'objectif de diminuer les intrants, sécuriser les productions et adapter le profil des vins aux attentes des consommateurs et de la société

En tant qu'Institut technique national de la filière viti-vinicole, l'IFV assure une dissémination des références au-delà de la Nouvelle-Aquitaine.



L'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) est un pôle pluridisciplinaire et international de recherche et d'enseignement supérieur dédié à la vigne et au vin.

L'ISVV regroupe, sur le site de l'INRAE à Villenave d'Ornon, **des équipes de recherche, de la formation et du transfert de technologie et accueille plus de 600 étudiants.** Il a ouvert ses portes en janvier 2009, grâce au soutien du Conseil Régional d'Aquitaine, de l'Union Européenne (FEDER), de l'Etat, du Conseil Général de la Gironde, de Bordeaux Métropole, de l'INRAE et du Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux. Aujourd'hui l'ISVV a le statut d'un institut dérogatoire de l'Université de Bordeaux. Il maintient des liens forts avec les acteurs de la profession, notamment avec le CIVB, et développe des actions de transfert en collaboration avec le cluster Inno'Vin.

L'Unité Mixte de Recherche Œnologie (UMR 1366 OENO, Université de Bordeaux, INRAE, Bordeaux-INP, Bordeaux Sciences Agro) de l'ISVV est impliquée dans ce projet. **L'UMR OENO réalise des travaux de recherche finalisée au service de la filière vitivinicole, qui contribuent à la fois à l'acquisition de connaissances fondamentales et au développement de savoir-faire et d'innovations. Elle s'est donnée pour mission de contribuer à la préservation et à la valorisation de la qualité du vin.** L'unité rassemble plus de 100 chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs, techniciens, doctorants et post-doctorants, spécialistes de toutes les disciplines de l'œnologie.



Microflora est une des quatre cellules de transfert de l'ISVV, adossée à l'Unité Mixte de Recherche Œnologie (UMR 1366 OENO). Son rôle est de valoriser les dernières avancées techniques et scientifiques des résultats de Recherche au service des professionnels de la filière. Microflora maîtrise une gamme complète d'expertises en analyses innovantes en microbiologie appliquées à l'œnologie afin d'accompagner les professionnels dans leurs innovations et développement.

REJOIGNEZ NOTRE POOL DE VIGNERONS EXPERIMENTATEURS !

Comment fonctionne le pôle Recherche et expérimentations de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine ?

Depuis 2011, le Syndicat participe à des programmes de recherche sur le vin Bio en proposant aux vignerons adhérents d'être acteurs d'expérimentations. Les collaborations établies avec nos partenaires, permettent de répondre à la problématique selon 3 échelles :

- Recherche fondamentale par l'ISVV.
- Recherche appliquée en parcelles et chais expérimentaux par l'IFV, Vinopôle Bordeaux Aquitaine.
- Recherche appliquée en conditions terrain par Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine et les Chambres d'Agriculture du territoire.

A noter que certains projets d'envergure nationale ou internationale font intervenir des partenaires d'autres régions viticoles de France ou du Monde.

Tous les sujets sont choisis et décidés en Commission Technique de Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine directement par les vignerons.

Qu'est-ce que cela peut apporter à mon exploitation d'intégrer le pool ?

Travailler sur des problématiques techniques que vous rencontrez et ce, gratuitement !

Par exemple, vous souhaitez réaliser des fermentations malolactiques indigènes spontanées, mais certains lots ne démarrent jamais seuls. Avec le pool, vous pourrez mettre en place un protocole résolvant le blocage avec identification des souches de bactéries récalcitrantes à la fermentation malolactique.

Placer votre exploitation dans une dynamique de constante amélioration de qualité de vos vins Bio.

Par exemple, vous êtes intéressé par les vins sans sulfites ajoutés, mais vous hésitez à vous lancer seul. Grâce au pool, vous aurez la possibilité de tester différents protocoles de vinification et élevage et de faire déguster le vin à des professionnels pour orienter votre choix d'itinéraire produit.

Être au courant des dernières innovations et résultats de recherche.

Par exemple, vous aimeriez en savoir plus sur certains intrants comme le chitosane, et le tester chez vous. Le pool vous permettra de suivre différentes modalités en exploitation et en micro-vinification à l'IFV, de participer aux dégustations et de choisir des solutions adaptées à vos enjeux.

Qu'est-ce que l'on attend de moi ? Cela va me prendre du temps ?

Toute expérimentation, la plus simple soit-elle, demande surtout de **la rigueur, du début à la fin du test** (ne pas s'arrêter en route, ou changer le protocole) : sinon, pas de résultats exploitables !

Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine sera à vos côtés avant, pendant et après l'expérimentation.

La totalité du processus sera décrit et discuté au préalable : nous **limitons au maximum les imprévus** (bien qu'en recherche, le 0 imprévu n'existe pas !). **C'est donc bien vous, qui serez amenés à réaliser les essais dans votre chai**, en suivant ce **protocole défini ensemble**. La **totalité du matériel vous sera fourni** en amont des vendanges, vous permettant d'être prêt. Pour gagner du temps, **communiquer est la clé de la réussite !** Nos experts seront sur le terrain durant toute la période des tests, à **vos disposition pour répondre à vos questions, prélever les échantillons et partager, commenter, discuter les résultats d'analyse**. Ils s'adapteront à vos contraintes mais **pensez à rester joignable !**

Et si je souhaite réaliser des essais en propre ?

Souvent, les questions de chacun peuvent servir au collectif ! **Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine propose donc aux domaines adhérents un accompagnement dans la mise en place d'essais en propre avec :**

- Expertise sur la question de recherche,
- Conseil sur la rédaction du protocole et mise en place de l'essai,
- Mise en relation avec chercheurs, experts du sujet et autres domaines réalisant des essais sur ce thème.



VIGNERONS BIO
NOUVELLE AQUITAINE

Si cela vous intéresse, contactez-nous :

Stéphane BECQUET
dirtech@vigneronsbionouvelleaquitaine.fr
06 32 68 88 80

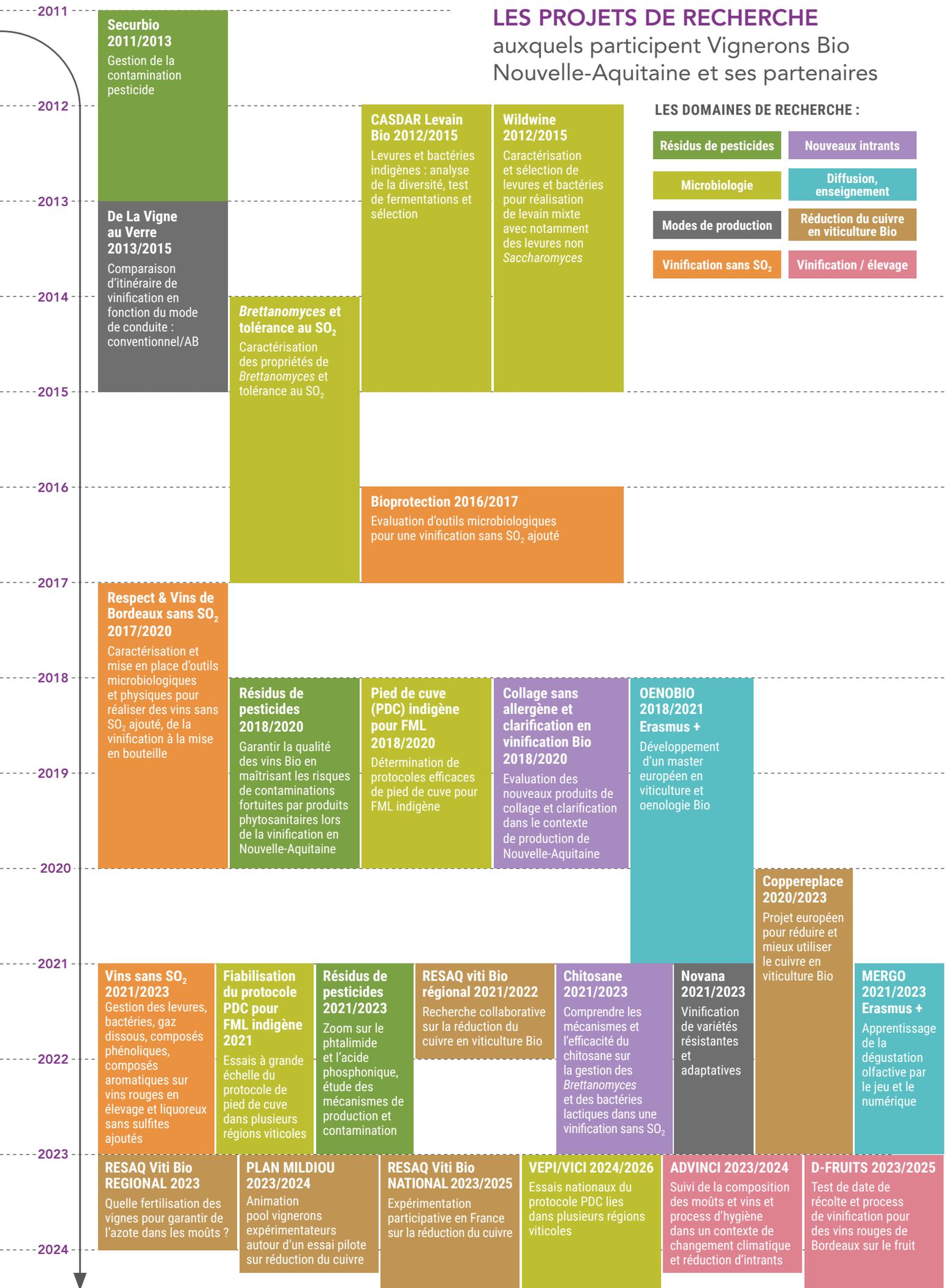
Anne HUBERT
economie@vigneronsbionouvelleaquitaine.fr
07 88 09 00 53

LES PROJETS DE RECHERCHE

auxquels participent Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine et ses partenaires

LES DOMAINES DE RECHERCHE :

Résidus de pesticides	Nouveaux intrants
Microbiologie	Diffusion, enseignement
Modes de production	Réduction du cuivre en viticulture Bio
Vinification sans SO ₂	Vinification / élevage



Respect & Vins de Bordeaux sans SO₂ 2017/2020
Caractérisation et mise en place d'outils microbiologiques et physiques pour réaliser des vins sans SO₂ ajouté, de la vinification à la mise en bouteille

Résidus de pesticides 2018/2020
Garantir la qualité des vins Bio en maîtrisant les risques de contaminations fortuites par produits phytosanitaires lors de la vinification en Nouvelle-Aquitaine

Pied de cuve (PDC) indigène pour FML 2018/2020
Détermination de protocoles efficaces de pied de cuve pour FML indigène

Collage sans allergène et clarification en vinification Bio 2018/2020
Evaluation des nouveaux produits de collage et clarification dans le contexte de production de Nouvelle-Aquitaine

OENOBIO 2018/2021 Erasmus +
Développement d'un master européen en viticulture et oenologie Bio

Coppereplace 2020/2023
Projet européen pour réduire et mieux utiliser le cuivre en viticulture Bio

Vins sans SO₂ 2021/2023
Gestion des levures, bactéries, gaz dissous, composés phénoliques, composés aromatiques sur vins rouges en élevage et liquoreux sans sulfites ajoutés

Fiabilisation du protocole PDC pour FML indigène 2021
Essais à grande échelle du protocole de pied de cuve dans plusieurs régions viticoles

Résidus de pesticides 2021/2023
Zoom sur le phtalimide et l'acide phosphonique, étude des mécanismes de production et contamination

RESAQ viti Bio régional 2021/2022
Recherche collaborative sur la réduction du cuivre en viticulture Bio

Chitosane 2021/2023
Comprendre les mécanismes et l'efficacité du chitosane sur la gestion des *Brettanomyces* et des bactéries lactiques dans une vinification sans SO₂

Novana 2021/2023
Vinification de variétés résistantes et adaptatives

MERGO 2021/2023 Erasmus +
Apprentissage de la dégustation olfactive par le jeu et le numérique

RESAQ Viti Bio REGIONAL 2023
Quelle fertilisation des vignes pour garantir de l'azote dans les moûts ?

PLAN MILDIOU 2023/2024
Animation pool vignerons expérimentateurs autour d'un essai pilote sur réduction du cuivre

RESAQ Viti Bio NATIONAL 2023/2025
Expérimentation participative en France sur la réduction du cuivre

VEPI/VICI 2024/2026
Essais nationaux du protocole PDC lies dans plusieurs régions viticoles

ADVINCI 2023/2024
Suivi de la composition des moûts et vins et process d'hygiène dans un contexte de changement climatique et réduction d'intrants

D-FRUIITS 2023/2025
Test de date de récolte et process de vinification pour des vins rouges de Bordeaux sur le fruit

1.

QU'EST-CE QUE LE CHITOSANE ?

Le chitosane est un polymère naturel. Il est obtenu à partir de la chitine, qui est extraite des champignons ou des crustacés puis désacétylée et purifiée. La chitine et le chitosane sont connus depuis le 19^{ème} siècle. Le chitosane peut aujourd'hui être extrait à partir de sources fongiques (non animales, non allergènes), sans utiliser de réactifs polluants ni de solvants organiques.

Le chitosane et ses dérivés sont utilisés dans de nombreux domaines

Utilisation dans le domaine agricole

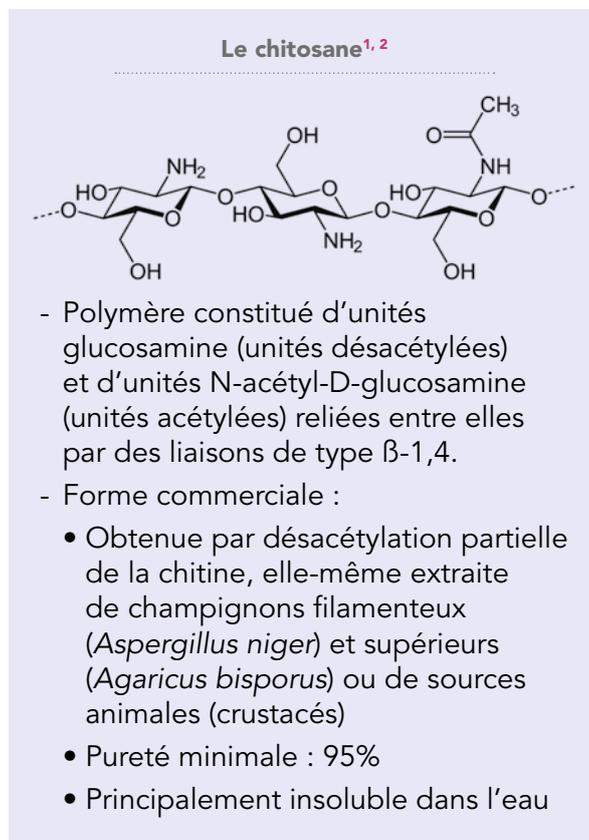
Le chitosane est autorisé depuis 2014 pour une utilisation en protection des cultures, en tant que **substance de base** (Règlement UE 563 / 2014). Dans ce cas, il est extrait à partir de crustacés. Il a pour objectif de renforcer les mécanismes de défense de la plante contre les champignons et bactéries pathogènes.

Deux formes de chitosane sont listées dans les substances de base³ (Règlement UE 563/2014), autorisées en agriculture conventionnelle et en Agriculture Biologique : la forme **chitosane**, et la forme **chlorhydrate de chitosane**. Cette dernière a une meilleure solubilité dans l'eau, facilitant son utilisation en pulvérisation.

Utilisation dans le domaine de l'alimentation

Le chitosane est également utilisé comme **complément alimentaire**. Dans ce cas, seule la chitine d'origine fongique (*Aspergillus niger*, *Agaricus bisporus*) peut être utilisée, afin d'éviter les risques allergènes liés à l'usage des crustacés⁴.

Quel que soit le domaine d'utilisation, la formulation du chitosane doit respecter le



règlement européen UE 178/2002 : les exigences en termes de pureté minimale du produit suivent les règles de la pharmacopée européenne.

Sa pureté doit toujours être supérieure ou égale à 95%. Le chitosane n'a pas d'effet néfaste rapporté, ni sur la santé humaine et animale, ni sur l'environnement. Comme son utilisation ne pose pas de problématique particulière, elle a pu être étendue à de nombreux domaines comme l'agroalimentaire et les chaînes de transformations, **et ainsi à l'œnologie**.⁵

Aspergillus niger © IFV



¹ EUROPEAN COMMISSION DIRECTORATE GENERAL FOR HEALTH AND FOOD SAFETY, 25 January 2021. Review report for the basic substance chitosan hydrochloride, s.l.: s.n.

² Bornet A., Teissedre P.-L., 2005. INTÉRÊT DE L'UTILISATION DE CHITINE, CHITOSANE ET DE LEURS DÉRIVÉS EN OENOLOGIE. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 39, n°4, pp. 199-207.

³ ITAB, s.d. ITAB - Fiches substances de base. (<http://substances.itab.asso.fr/fiches-substances-de-base>)

⁴ VIDAL, 2023. Chitosane - complément alimentaire.

⁵ OIV, 2009. RÉOLUTION OIV/OENO 368/2009 - Monographie sur le chitosane, s.l.: s.n.

II.

LE CHITOSANE EN ŒNOLOGIE

a. Règlementation

Le chitosane est introduit dans la réglementation Vin générale en 2011 par l'annexe 53/2011 au règlement UE 606/2009. La réglementation a depuis été mise à jour par le règlement 934/2019.



Autorisé en
Agriculture
Biologique
depuis 2018
(Règlement UE
1584/2018)

Le chitosane est défini comme un **auxiliaire technologique**. Il est éliminé du vin avant mise en bouteille, et n'est donc pas soumis à mention sur l'étiquette⁶ au 8 décembre 2023. Après ajout, le chitosane, insoluble dans le vin, précipite et sédimente au fond de la cuve, entraînant les composés indésirables. Il est autorisé pour différentes utilisations, à

des doses d'usage et doses maximales autorisées qui varient selon les objectifs. La dose utilisée doit toujours être déterminée par des essais préalables. Le chitosane serait éliminé du vin avant mise en bouteille à plus de 95% grâce à des procédés physiques comme le soutirage, en veillant à une séparation correcte des lies.

Son emploi est préconisé pour les utilisations suivantes en œnologie, par ordre d'apparition dans la réglementation :

Doses et règlementation⁷

ACTION	DOSES D'USAGE	DOSE MAXIMALE AUTORISÉE
Clarification, agent de collage anti-oxydant	20 à 50 g/hL	100 g/hL
Réduction des teneurs en métaux de transition (fer et cuivre) et en métaux lourds (plomb et cadmium)	10 à 50 g/hL	100 g/hL
Réduction des contaminants type ochratoxine A	200 g/hL	500 g/hL
Réduction des populations de micro-organismes indésirables	4 g/hL	10 g/hL

CHITOSANE EN BIO : attention au choix de la spécialité commerciale

 **Ne pas confondre : chitosane et chitine glucane**

Le **chitine glucane** est également un produit œnologique dérivé de la chitine. Il est principalement utilisé pour faciliter le débouillage et la clarification des mouûts et pour prévenir les casses ferriques sur vins et en éliminer les composés indésirables (plomb, cadmium, mycotoxines...)⁸. Il **n'est pas autorisé en Bio** et fait courir le risque d'un **déclassement**.



Chitine glucane
Non autorisé
en Agriculture
Biologique

 **Chitosane en mélange : vérifier la composition**

Certaines spécialités commerciales de chitosane sont formulées avec de la cellulose microcristalline. C'est le cas notamment de nombreuses spécialités en tablette, souvent utilisées sur les vins en barriques. Pour rappel la **cellulose microcristalline est interdite en vinification biologique** et entraîne un **déclassement** des lots en cas d'utilisation.

⁶ Règlement (UE) 2021/2117 du Parlement européen et du Conseil du 2 décembre 2021 (JO L 435 du 6.12.2021, p. 262-314)

⁷ IFV, 2023. Grille d'évaluation des pratiques œnologiques (<https://www.vignevin.com/pratiques-oenologie/liste.php>)

⁸ OIV, 2009. Codex œnologique international - Chitine glucane. s.l.:s.n.

Chitosane et autres certifications

Bien que le chitosane soit un auxiliaire d'origine naturelle autorisé en Agriculture Biologique (certification européenne), il reste interdit dans de nombreuses certifications.

PAYS / RÉFÉRENCE	USAGE
Réglementations nationales	
USA : NOP Catégories « Made with... » et « organic »	Non autorisé
Suisse : Bourgeon	Non autorisé
Cahiers des charges privés	
Nature et Progrès	Non listés donc interdits
Demeter France Biodyvin	Non listés donc interdits
Vin méthode nature	Non autorisé

b. Clarification, agent de collage⁸

€ 10 à 35€ HT de l'hL
(20 à 50 g/hL)
Prix de vente - chitosane
de 465 à 650 € HT/kg⁹

Le chitosane, au pH du moût et du vin, est une molécule chargée négativement. Il fixe les molécules chargées positivement, en particulier les protéines du vin. Il constituerait donc une **alternative végétale d'origine naturelle aux colles** comme la gélatine, la caséine ou la PVPP (polyvinylpolypyrrolidone, interdite en Bio). Ces colles sont de moins en moins utilisées, même en œnologie conventionnelle, du fait de la pression consommateur contre les intrants d'origine animale ou synthétique.

Le chitosane peut être utilisé comme outil pour la clarification des vins blancs et rosés (décantation ou flottation) ou pour la clarification des vins rouges en thermovinification (...).

Selon la littérature, le chitosane **permettrait aussi de prévenir l'oxydation**. En effet, en milieu oxydant, les polyphénols (en particulier l'acide catarique et les catéchines) s'oxydent en ortho diphénols puis en quinones. Au fur et à mesure de leur oxydation ils forment des polymères d'oxydation, de teinte jaune orangé. Le chitosane pourrait prévenir cette polymérisation en chaîne des composés phénoliques, responsable de l'oxydation de

la couleur et des composés aromatiques. Le chitosane présenterait donc un intérêt pour une utilisation sur des vins blancs et rosés. Plusieurs modes d'action seraient impliqués :

- Sa fixation aux radicaux libres, catalyseurs d'oxydation
- Sa fixation aux quinones, produites par l'oxydation des polyphénols, et catalyseurs d'oxydation
- Sa fixation aux métaux de transition, cuivre et fer. Sous formes libres, ce sont des catalyseurs d'oxydation pour de nombreuses enzymes comme la laccase de *Botrytis cinerea* ou les polyphénoloxydases du raisin.

Il diminuerait donc à la fois les teneurs en substrats et en catalyseurs de l'oxydation (action préventive) et les teneurs en produits d'oxydation (action curative). Il pourrait alors être un complément anti-oxydant intéressant pour optimiser et/ou réduire les quantités de SO₂ utilisées, dans les contextes suivants :

- La production des vins biologiques, en particulier d'élevages longs, pour lesquels les doses maximales autorisées de SO₂ sont réduites
- Les millésimes où la maturité phénolique est atteinte à des pH élevés, réduisant la part de SO₂ actif dans les vins et augmentant le potentiel oxydatif des vins.

⁸ Bornet A., Teissedre P.-L., 2005. INTÉRÊT DE L'UTILISATION DE CHITINE, CHITOSANE ET DE LEURS DÉRIVÉS EN OENOLOGIE. J. Int. Sci. Vigne Vin, 39, n°4, pp. 199-207.

⁹ IFV, Chambre d'Agriculture des Pyrénées Orientales, Le coût des fournitures en Viticulture et Œnologie 2022 - évolutions techniques et réglementaires - <https://www.coutdesfournitures.fr/>

c. Réduction des teneurs en métaux et prévention des casses¹⁰

€ 5 à 35€ de l'hL
(10 à 50 g/hL)

Le chitosane fixe et réduit les concentrations :

- En métaux de transition, ce qui permet de lutter contre les casses ferriques et cuivriques.
- En métaux lourds (plomb, cadmium) et en aluminium, qui, lorsqu'ils sont présents dans le vin, constituent un problème d'un point de vue sanitaire.

CUIVRE, FERMENTATIONS ET CHITOSANE

Dans le cadre de pratiques phytosanitaires usuelles, la présence de résidus de cuivre n'ont pas de répercussions sur les fermentations alcooliques ou malolactiques, d'après la littérature. Cependant, des résidus de cuivre pourraient être retrouvés à la suite de traitements trop tardifs. L'IFV Occitanie a récemment mis en évidence que ces résidus étaient surtout retrouvés suite à des applications intervenues en fin de saison, en cas de conditions climatiques spécifiques, telles que la sécheresse et l'absence de pluie entre le dernier traitement et la récolte. Ces conditions peuvent entraîner des concentrations élevées de cuivre sur la vendange, supérieures à 10 mg/L.

L'analyse des taux de cuivre révèle qu'après le débouillage et la fermentation alcoolique, la concentration initiale en cuivre diminue d'environ 80 à 90%, avec des taux résiduels très bas dans le vin final (inférieurs à 0,3 mg/L). En général, ces taux «chutent» principalement dès le débouillage et ont un impact minime, voire nul, sur le déroulement des fermentations.

Cependant, si les taux de cuivre se maintiennent au-delà de 10 mg/L après débouillage des moûts, les vinifications menées en levures indigènes peuvent

présenter une période de latence prolongée avant fermentation, ce qui augmente le risque d'apparition de micro-organismes indésirables. A ces niveaux de concentration, la présence de cuivre peut aussi entraîner, dans les moûts blancs et rosés, une diminution de production d'esters, d'acétates et surtout de thiols. Pour réguler la concentration de cuivre dans ces moûts, la macération pelliculaire s'avère efficace, entraînant une augmentation des niveaux d'arômes dans la plupart des essais.¹¹

Le chitosane est le seul agent chélatant autorisé en vinification biologique. La chélation est la complexation d'un ion ou d'un atome métallique par un ligand, conduisant à un chélate et permettant l'élimination de métaux comme le cuivre. Le chitosane permet donc de gérer les problématiques de cuivre trop élevé dans les moûts et anticiper ses impacts.

De plus, des travaux de l'IFV Sud-Ouest montrent en 2017 un impact positif d'un traitement à base de chitosane, à 20 g/hL au pressurage sur le potentiel « thiols » de vins blancs de Gascogne. Ce traitement pourrait être utilisé dans les cas les plus problématiques, en complément de la macération pelliculaire. Des travaux sont encore nécessaires pour maîtriser les mécanismes exacts impliqués et éventuellement revoir la dose d'emploi à la baisse pour optimiser les coûts.¹²

¹⁰ Borne A., Teissedre P.L., Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *Eur Food Res Technol* **226**, 681–689 (2008)..

¹¹ Vinopôle, 2022. Mémo cuivre en viticulture, s.l.: s.n.

¹² Geoffroy O., Robillard B., Ducasse M-A., et al., 2017, Utilisation précoce d'une préparation à base de chitosane et de levures inactivées pour améliorer la concentration en thiols variétaux des vins blancs biologiques de Gascogne. *Revue des œnologues* **165**, pp. 38-41.

d. Réduction des contaminants de type ochratoxine A (OTA)¹⁰

€ 90€ à 130€ de l'hL
(200 g/hL)

Aspergillus carbonarius peut être à l'origine de moisissures sur le raisin avant la récolte.

Celles-ci, si elles entrent en contact avec la pulpe ou le jus (perforations, baies abîmées), peuvent produire une mycotoxine, l'ochratoxine A (OTA).

Les vers de grappe feraient partie des vecteurs de champignons producteurs d'OTA. Les risques de contamination à l'OTA augmentent également avec le stade de maturité des baies, les conditions humides aux vendanges, le mauvais état phytosanitaire (...). Cette mycotoxine, présente sur de nombreux végétaux, est considérée comme ayant des effets cancérogènes, néphrotoxiques, immunodépresseurs et neurotoxiques. Elle présente donc un risque évident pour la santé et est surveillée de près dans l'agroalimentaire. Depuis le 26 janvier 2005, la Commission Européenne a fixé la teneur maximale en ochratoxine A dans les vins commercialisés à **2 µg/L**. Il est donc important de vérifier régulièrement les niveaux présents dans les vins. Cette teneur maximale est même plus sévère pour certaines destinations à l'export (Canada 1 µg/L), et son analyse est obligatoire pour respecter le cahier des charges de certains metteurs en marché.

Les vendanges précoces, la surveillance de l'état sanitaire, le tri de la vendange et la limitation de la durée de macération sont des moyens de prévention efficaces contre la contamination à l'OTA. En cas de contamination du moût, la fermentation ne permet pas de réduire sa concentration. Différents traitements œnologiques tels que l'utilisation de charbon actif, de gels de silice et de différents produits de collage

ont montré une efficacité sur la réduction de l'OTA. Ils peuvent cependant présenter des risques de répercussions sur les qualités organoleptiques des vins. Certains d'entre eux sont aussi soumis à étiquetage allergène. Le chitosane constitue une alternative naturelle et non allergène pour la décontamination des vins présentant des teneurs élevées en ochratoxine A.

e. Réduction des populations de micro-organismes indésirables

Depuis la fin des années 1970, le chitosane est également connu

€ 2€ à 7€ de l'hL
(4 à 10 g/hL)

pour avoir une activité antimicrobienne¹³. A ce titre il permettrait de lutter contre les micro-organismes indésirables, notamment *Brettanomyces bruxellensis*¹⁴. Cependant, son utilisation aboutit souvent à des résultats contradictoires. En 2018, lors de son autorisation par la réglementation Bio, il semblait avoir une efficacité durable dans de nombreux cas mais il pouvait aussi être sans effet dans d'autres situations. Comme l'utilisation antimicrobienne est la plus répandue dans les chais, il était important de l'étudier pour apporter des éléments de décision aux vignerons, pour compléter les connaissances et affiner les préconisations.

Brettanomyces bruxellensis © IFV



¹³ Allan C.R, Hadwiger L.A. 1979, The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition, *Experimental Mycology*, **3**, 285-287»

¹⁴ Miot-Sertier, C., Paulin, M., Dutilh, L., et al. (2022). Assessment of chitosan antimicrobial effect on wine microbes. *International journal of food microbiology*, **381**, 109907.



RECHERCHE ET EXPÉRIMENTATIONS : L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DU CHITOSANE

a. Contexte

L'altération des vins due au développement de *Brettanomyces bruxellensis* est devenue une **préoccupation œnologique majeure**, dans un contexte de stabilisation microbiologique toujours plus complexe (maturité phénolique élevée, pH élevés, abaissement des teneurs en sulfites). Les impasses techniques liées à cette problématique sont courantes dans les vins conventionnels et sont d'autant plus fortes en vinification biologique, contrainte par :

- des teneurs maximales autorisées en SO₂ plus faibles
- l'interdiction d'utiliser d'autres stabilisants chimiques (sorbate, DMDC) pour compléter l'efficacité du SO₂.

Le chitosane apporte aux vificateurs une nouvelle solution technique, d'origine naturelle, qui pourrait être intégrée dans les stratégies globales de prévention et de lutte contre les altérations microbiologiques, en particulier contre ***Brettanomyces bruxellensis***, principale levure d'altération à l'origine de la production de phénols volatils.

Le chitosane pourrait aussi être utilisé pour le **contrôle des populations de bactéries lactiques**, notamment pour empêcher les départs de fermentation malolactique sur vins blancs sans SO₂ ajouté. A l'heure actuelle, cette piste n'a été que très peu explorée tant sur le terrain qu'au laboratoire, et avec des résultats contradictoires. Le chitosane pourrait donc constituer une alternative intéressante au SO₂. Dans le cadre de son utilisation pour la réduction des niveaux de populations microbiologiques indésirables, la dose de chitosane maximale autorisée est **de 10 g/hL**. En pratique, l'ajout se fait le plus souvent après la fermentation malolactique et/ou en cours d'élevage.

Deux projets de recherche récents ont été menés autour de l'utilisation du chitosane comme agent antimicrobien : Chitowine (ANR17-CE21-006) et Vins Sans.

b. Le projet Chitowine

Le projet collaboratif Chitowine financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR17-CE21-006) et porté par l'UMR OENO de l'ISVV visait (i) à mieux définir le spectre antiseptique du chitosane fongique dans le vin, (ii) à identifier, au moins en partie, les formes actives du chitosane ainsi qu'à (iii) définir des recommandations d'utilisation améliorées afin de maximiser l'efficacité antiseptique dans différentes situations œnologiques. **Ce projet a été mené par un consortium de chercheurs de l'UMR Œnologie de l'ISVV de Bordeaux, de l'UMR Sciences pour l'Œnologie de Montpellier, de l'Institut Pascal (Université Clermont Auvergne) accompagnés par la cellule de transfert Microflora, et la société Biolaffort.**





Spectre du chitosane dans le vin

L'activité de préparations commerciales de chitosane fongique répondant aux préconisations du Codex Œnologique a été évaluée sur 206 souches de levures et bactéries appartenant à 27 espèces distinctes, dans du vin. Les populations de la plupart des espèces sont affectées au moins temporairement par l'ajout de chitosane. Néanmoins, une grande variabilité intraspécifique prévaut et des souches sensibles, intermédiaires et tolérantes peuvent être observées. Les espèces les plus sensibles sont l'espèce d'intérêt *Oenococcus oeni* (90% de souches sensibles et intermédiaires), l'agent d'altération *Brettanomyces bruxellensis* (80% de souches sensibles et intermédiaires) et certaines levures non-*Saccharomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* et les bactéries acétiques sont, quant à elles, très peu affectées par le chitosane, quel que soit le stade d'élaboration du vin auquel est pratiqué le traitement.

Au sein même de l'espèce *B. bruxellensis*, 41% des souches étudiées sont très sensibles et aucune levure cultivable n'est détectée dans le vin ou les lies après seulement 3 jours de traitement à 4 g/hL. D'autres souches (13%) sont tolérantes : après une légère baisse de la cultivabilité observée au 3^e jour, elles se développent à nouveau et peuvent produire des composés indésirables. De nombreuses souches présentent un comportement intermédiaire.

Tous les essais montrent clairement que **l'étape de soutirage post traitement est indispensable** pour une stabilisation durable du vin, car des microorganismes cultivables peuvent être retrouvés dans les sédiments, alors que le vin clair en est exempt.

Les **paramètres modulant l'efficacité du traitement** ont été recherchés via différents plans d'expériences sur des souches et vins modèles. Le temps nécessaire pour un traitement efficace est variable selon la situation mais **un traitement d'une semaine semble être un bon compromis entre efficacité et réactivité**. Encore une fois, il est indispensable de soutirer pour éliminer les sédiments.

Le comportement des microorganismes et notamment *B. bruxellensis* est peu modulé par le pH (3,1-3,7), le taux d'alcool du vin (12-14%vol) ou la dose de chitosane utilisée (4-10 g/hL). La température du vin au moment du traitement a peu d'effet, aux gammes de température habituelles de garde des vins (16-20°C). Des niveaux de population entre 10² et 10⁴ UFC/ml ne semblent pas avoir d'influence sur l'issue du traitement.

En revanche, pour une souche donnée, l'effet antiseptique du chitosane est modulé par les propriétés intrinsèques du vin. Celui-ci module en effet l'état physiologique des microorganismes (présence de substrats fermentescibles, phase de croissance, présence de facteurs abiotiques...) mais aussi la disponibilité du chitosane car différents éléments présents dans le vin peuvent se lier au chitosane à la place des microorganismes. Enfin, des essais de traitement ont été menés dans différents vins naturellement ou artificiellement contaminés avec des microorganismes, afin d'analyser la **rémanence du traitement et l'intérêt de traitements complémentaires**.

On ne détecte pas de traces de chitosane après traitement mais certains vins semblent durablement protégés, du moins contre les souches de *B. bruxellensis* ou *O. oeni* sensibles au chitosane.

Une partie des travaux s'est ensuite concentrée sur la **résolution des problèmes de vinification à l'aide de chitosane**, via des essais sur moûts et vins naturellement et/ou volontairement contaminés en laboratoire. Des essais ont également été mis en œuvre en propriété viticole, en parallèle des essais laboratoire. Il apparaît que :

- Le traitement au chitosane ne permet pas de limiter la **pression microbienne des moûts** (traitement très précoce) et notamment la domination du milieu par *Hanseniaspora uvarum*.
- Le développement de *Saccharomyces cerevisiae* ne peut être stoppé pendant la fermentation alcoolique, en particulier dans les vins avec des sucres résiduels « **pas de mutage possible au chitosane** ».
- Après la fermentation alcoolique, le chitosane peut efficacement limiter le développement des **levures non-Saccharomyces** (surtout *B. bruxellensis*) et des **bactéries lactiques**. Mais, il est préférable de traiter après la fermentation malolactique (FML) si celle-ci est désirée, *O. oeni* pouvant être gravement affectée par le traitement du vin au chitosane, même plusieurs mois après le traitement.
- Sur des vins traités au chitosane, les FML spontanées ou déclenchées par inoculation peuvent être **retardées ou complètement stoppées** mais ce blocage de la FML n'est pas systématique. L'utilisation du chitosane pour bloquer des FML non souhaitées, par exemple dans certains vins blancs, reste donc encore à fiabiliser car elle semble, au vu des essais menés pendant le projet, aléatoire.
- Les **bactéries acétiques**, non souhaitées dans la majeure partie des vins, sont peu affectées par le traitement au chitosane, quel que soit le stade d'élaboration considéré.

D'autres travaux ont été menés mais sont encore en cours de validation en vue de leur publication (mécanisme d'action et effet sur les propriétés organoleptiques du vin, dosage des traces de traitement).

c. Le projet Vins Sans

Le projet Vins Sans, soutenu par la Région Nouvelle-Aquitaine, est un projet de recherche sur la **réduction des intrants œnologiques** à destination des filières biologiques et conventionnelles. En dépit du fait que la filière vin Bio bénéficie d'un engouement croissant de la part du consommateur, elle doit anticiper et s'adapter aux demandes de réduction d'intrants. Cette question de naturalité et transparence de composition est donc bien un sujet global au niveau de la filière vin, impliquant aussi bien les vigneron en agriculture biologique que les vigneron en agriculture conventionnelle.

Afin de répondre à ces enjeux, les cinq partenaires (Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine, l'Institut Français de la Vigne et du vin, l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, la cellule Microflora et la Chambre d'agriculture de la Gironde) ont construit un projet expérimental dans le but d'accompagner les vigneron et techniciens avec des éléments de compréhension et des outils pratiques. Plusieurs thématiques sont proposées, parmi lesquelles figure la meilleure connaissance et utilisation du chitosane œnologique. Les objectifs autour de ce sujet comprennent :

- L'évaluation de **l'impact du traitement** au chitosane sur la diversité microbiologique et la sélection de souches résistantes au chai
- L'amélioration des **protocoles d'utilisation** du chitosane dans la lutte contre *Brettanomyces bruxellensis* et dans la gestion de la FML

Le projet s'articule en différentes parties avec des essais en milieu contrôlé (réalisés par l'IFV au Vinopôle Bordeaux Nouvelle-Aquitaine), et des essais terrain gérés par Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine, la cellule de transfert Microflora assurant les analyses microbiologiques des vins de l'échantillothèque et des différents essais.

1. Essais en conditions contrôlées : IFV pôle Nouvelle-Aquitaine

La mise en œuvre de micro-vinifications au sein du Centre expérimental de Vinopôle Bordeaux-Aquitaine permet une évaluation de l'impact du chitosane dans des conditions maîtrisées.

Deux objectifs ont été abordés ; la gestion des levures de type *Brettanomyces* et la gestion des bactéries lactiques par le traitement au chitosane.

Gestion des levures de type *Brettanomyces*

Modalités de suivi et d'analyse des différents essais

Après 10 à 15 jours de contact, un soutirage est réalisé. Les lies et les vins sont analysés. Les vins sont ensuite élevés entre 6 et 9 mois, avec suivi microbiologique.

Analyses physico-chimiques

- TAV, AT, pH, AV, IPT, ICM et DO 420 (sur vin blanc) à T0 et à la fin de l'élevage
- Suivi de la teneur en SO₂ libre pour les vins sulfités ainsi que de l'acidité volatile

Analyses microbiologiques

Suivi des levures totales, bactéries lactiques et acétiques à différents stades :

- T0 avant mise en œuvre des modalités
- Après soutirage (à 10 jours)
- En cours d'élevage

Analyse sensorielle

Afin de déterminer si le traitement au chitosane (dose 10 g/hL) a eu un impact sur le profil sensoriel du vin

Figure 1 - Protocole expérimental gestion des *Brettanomyces* (1)

Les essais sont mis en œuvre sur des vins rouges naturellement contaminés en *Brettanomyces* dès la fermentation alcoolique ou bien lors de la fermentation malolactique. Le protocole appliqué sur deux matrices différentes permet de comparer un témoin sans aucun apport à une modalité traitée au chitosane à la **dose de 10 g/hL**. Un soutirage a été réalisé 10 jours après la mise en œuvre des essais pour l'ensemble

des modalités. Les résultats expérimentaux mettent en évidence une efficacité variable du traitement au chitosane sur les levures non-*Saccharomyces* que sont les levures de type *Brettanomyces* dans les conditions de ces essais (matrice, millésime). Les Figures 3 et 4 présentées en page 17 illustrent ainsi l'impact du chitosane sur les populations de type non-*Saccharomyces* dont font partie majoritairement les *Brettanomyces* sur vin fini.

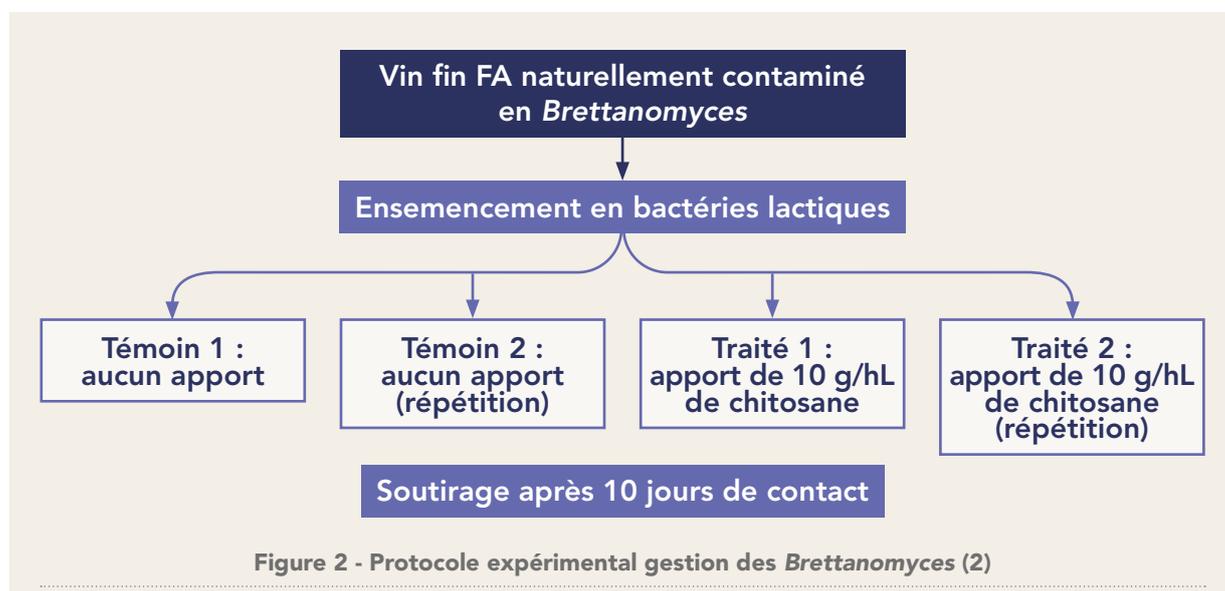


Figure 2 - Protocole expérimental gestion des *Brettanomyces* (2)

Sur la matrice 1, le soutirage permet de réduire les niveaux de population des levures non-*Saccharomyces* et ce d'autant plus avec un traitement au préalable au chitosane. Cependant, le traitement ne permet pas d'éliminer la totalité de la population en *Brettanomyces bruxellensis*. Avant filtration et conditionnement, les populations restent plus faibles dans les modalités traitées au chitosane.

Sur la matrice 2, on observe une absence de levures non-*Saccharomyces* après soutirage pour les modalités traitées au chitosane. Cependant, les populations sont très faibles en cours d'élevage quelle que soit la modalité, de l'ordre de 10 UFC/mL (Témoin/Traité). Sur les modalités traitées au chitosane, l'apparition de ces populations résiduelles pourraient être issues de nouvelles contaminations, ou de nouveaux développements originaires de cellules viables non cultivables qui n'avaient pas été détectées après traitement.

En parallèle de ces résultats, nous observons une action rémanente du chitosane sur les populations de bactéries lactiques. En effet, malgré un ensemencement, la fermentation malolactique ne s'est pas déclenchée sur les modalités traitées au chitosane et ce, quelle que soit la matrice considérée. L'apport en bactéries lactiques ayant été réalisé avant traitement au chitosane, l'effet d'un ensemencement après traitement et soutirage est à étudier.

D'autres essais sur vins contaminés naturellement en levures de type *Brettanomyces* et notamment fin FML ayant montré des résultats parfois aléatoires, des expérimentations complémentaires sont mises en œuvre afin d'évaluer de comprendre l'impact du traitement au chitosane sur les populations de levures type *Brettanomyces*.

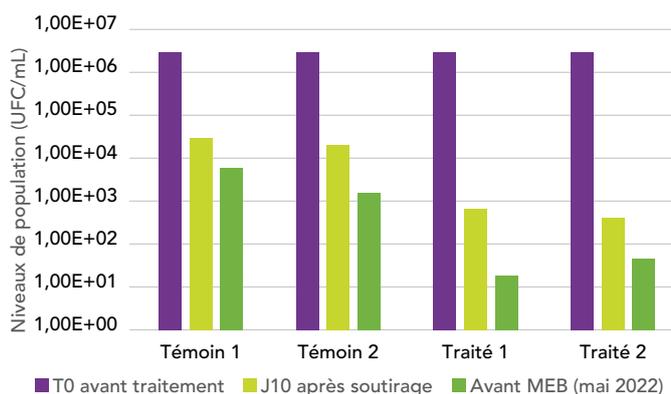


Figure 3
Impact sur levures non-*Saccharomyces* – matrice 1

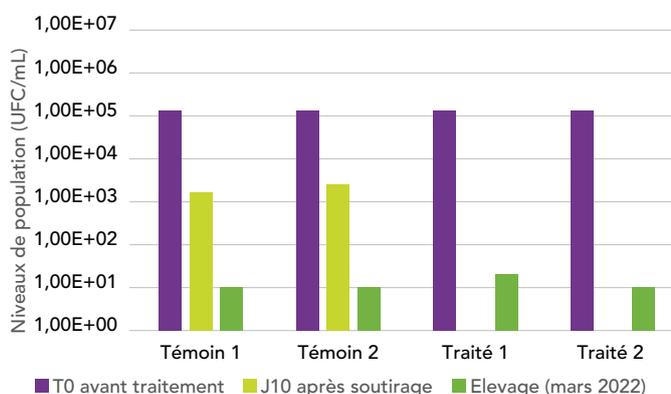


Figure 4
Impact sur levures non-*Saccharomyces* – matrice 2

Gestion des bactéries lactiques

Essais sur vin rouge

L'objectif est d'évaluer l'impact d'un traitement sur les populations de bactéries lactiques de manière à pouvoir diminuer voire supprimer le sulfitage après fermentation malolactique dans le cas de l'élaboration de vin rouge. Le protocole mis en œuvre (Figure 5) permet de comparer des apports de chitosane à différentes doses à un témoin sulfité et à un témoin sans SO₂.

La Figure 6 montre une absence de bactéries lactiques pour les modalités sulfitées et pour celles traitées au chitosane alors qu'elles persistent dans les modalités non sulfitées et sans apport. Cet essai montre donc un impact du traitement au chitosane sur les populations de bactéries lactiques, relativement durable.

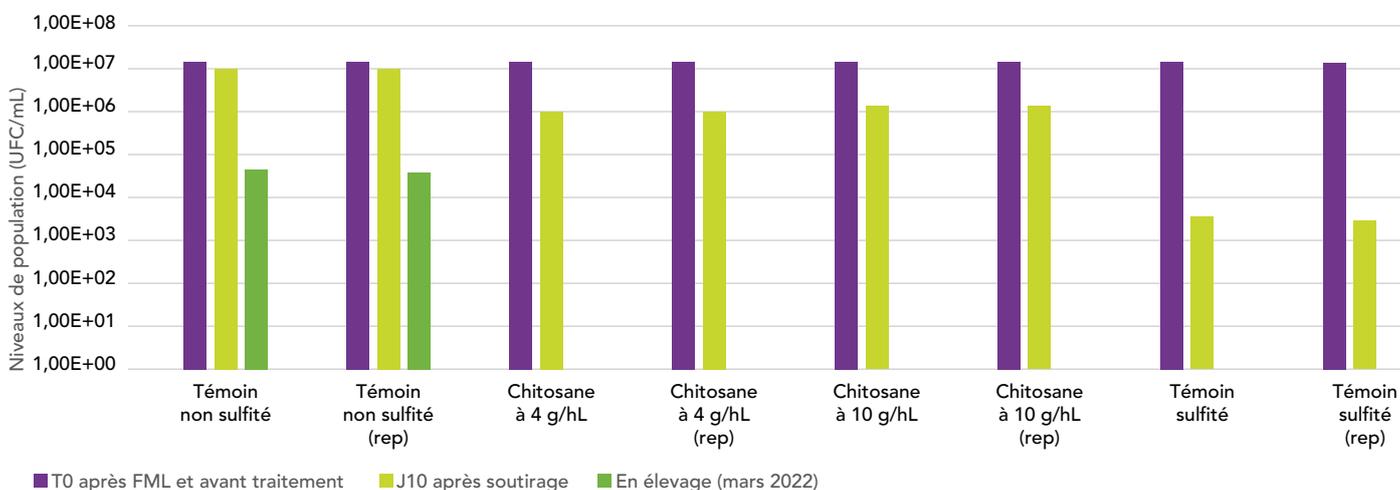
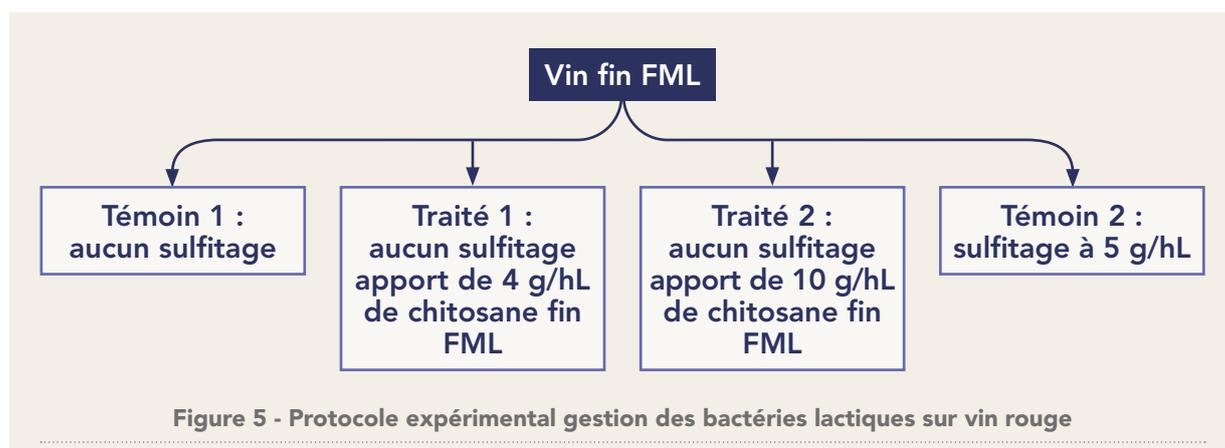
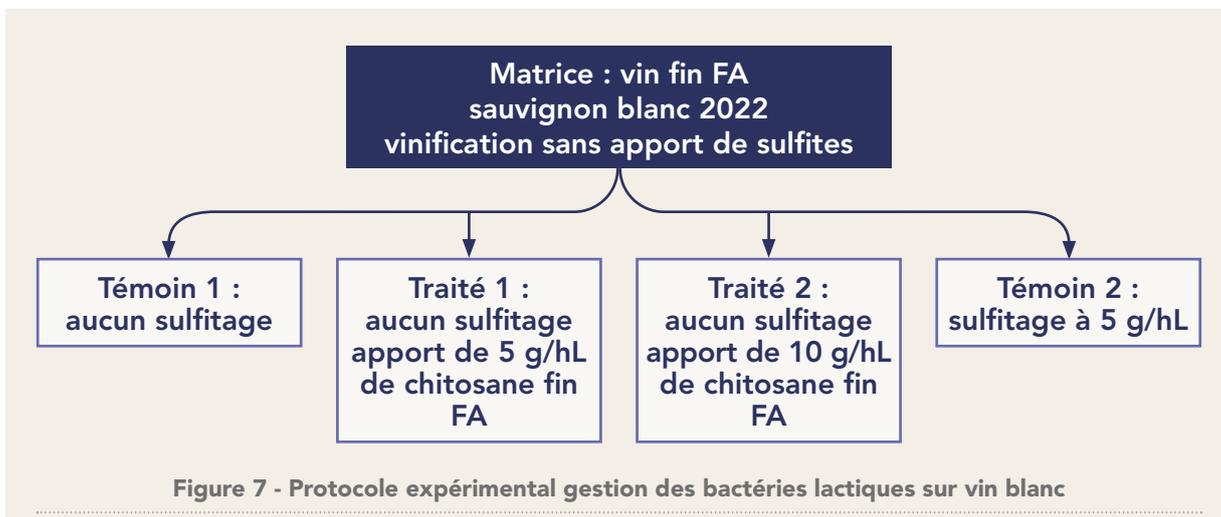


Figure 6 - Impact du traitement sur les bactéries lactiques - merlot 2021

Essais sur vin blanc

L'impact du chitosane sur la gestion des bactéries lactiques a été étudié sur un vin blanc de sauvignon vinifié sans aucun apport de sulfites. L'utilisation du chitosane sur vin blanc peut en effet présenter un intérêt certain dans le cas de vinification sans sulfites afin d'éviter le déclenchement de la fermentation malolactique qui, si elle est très majoritairement recherchée sur vin rouge, l'est très rarement sur vin blanc en AOP Bordeaux.

Tout comme les expérimentations mises en œuvre sur vin rouge, deux apports de chitosane (dans ce cas 5 et 10 g/hL) sont comparés à un témoin sans apport de sulfites et à un témoin sulfité (Figure 7). L'objectif est donc ici de définir l'action du chitosane sur les bactéries lactiques et donc sur le blocage de la fermentation malolactique en substitution aux sulfites.



Une analyse microbiologique avant mise en œuvre de l'essai (Tableau 1) permet d'identifier les micro-organismes isolés dans le vin après fermentation alcoolique attestant la présence de *Saccharomyces cerevisiae* et de dénombrer et identifier également les populations en bactéries lactiques avec dans ce cas une dominance de l'espèce *O. oeni*. En parallèle, les analyses œnologiques ont montré l'homogénéité des lots et une absence de déclenchement de fermentation malolactique.

Tableau 1 - analyse microbiologique sur vin fin FA - avant traitement

	Levures totales	Bactéries acétiques	Bactéries lactiques
Dénombrement	4.1 10 ³ UFC/mL	<10 UFC/mL	8.7 10 ² UFC/mL
Identification	10/10 clones <i>S. cerevisiae</i>	-	10/10 clones <i>O. oeni</i>

L'évolution des populations microbiologiques après traitement et soutirage est illustrée sur la Figure 8. Si, a contrario des modalités sulfitées, les modalités traitées au chitosane n'ont pas éliminé en totalité les populations en bactéries lactiques, elles ont permis de les réduire, bloquant à ce stade le déclenchement de la fermentation malolactique. Les populations de bactéries lactiques ont au contraire augmenté sur le témoin non traité non sulfité, passant de 8,7.10² UFC/mL à plus de 3,0.10³ UFC/mL entre les deux prélèvements. La poursuite de cette augmentation pourrait expliquer que le témoin non traité non sulfité ait terminé sa FML dès décembre 2022 (Figure 9)

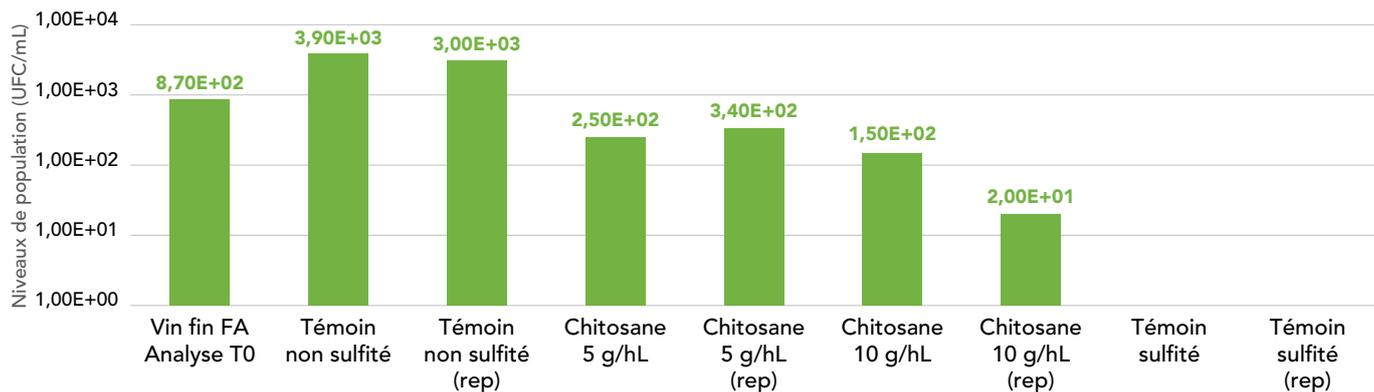


Figure 8 - Impact du traitement sur les bactéries lactiques - blanc 2022

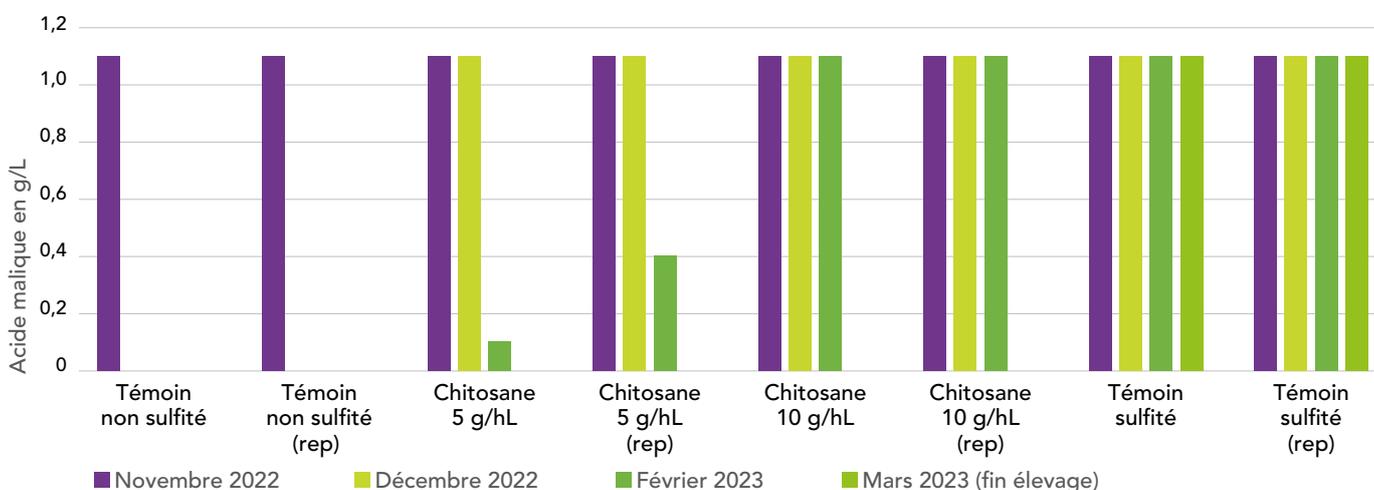


Figure 9 - Suivi des niveaux d'acide malique - blanc 2022



Le suivi de l'évolution de l'acide malique permet d'identifier les éventuels départs en fermentation malolactique. La fermentation malolactique semble d'autant plus retardée que la dose d'apport en chitosane est élevée (10 g/hL), pour cet essai. Si effectivement la fermentation malolactique se réalise sur l'ensemble des modalités non sulfitées, cela ne se produit qu'en fin d'élevage dans le cas d'un apport en chitosane.

Pour la gestion des bactéries lactiques, dans le cas notamment de vinification sans sulfites, le chitosane semble avoir une action sur la réduction des niveaux de population en bactéries lactiques.

L'usage de chitosane est un outil intéressant qui peut permettre, avec un processus d'élaboration adapté en parallèle :

- D'éviter ou de retarder un déclenchement de la FML sur les vins blancs (sauvignon blanc) en procédant par exemple à une filtration et à une mise en bouteille précoces.
- De maîtriser les populations de bactéries lactiques et de *Brettanomyces* après fermentation malolactique autorisant une réduction significative du sulfitage en cours d'élevage sur vin rouge.

En parallèle, les résultats expérimentaux montrent que l'emploi du chitosane n'a pas d'impact négatif sur le profil sensoriel des vins, et les différences observées entre les différentes modalités ne sont pas significatives (Figure 10 - Résultat d'analyse sensorielle sur vin rouge, aucune déviation sensorielle observée).

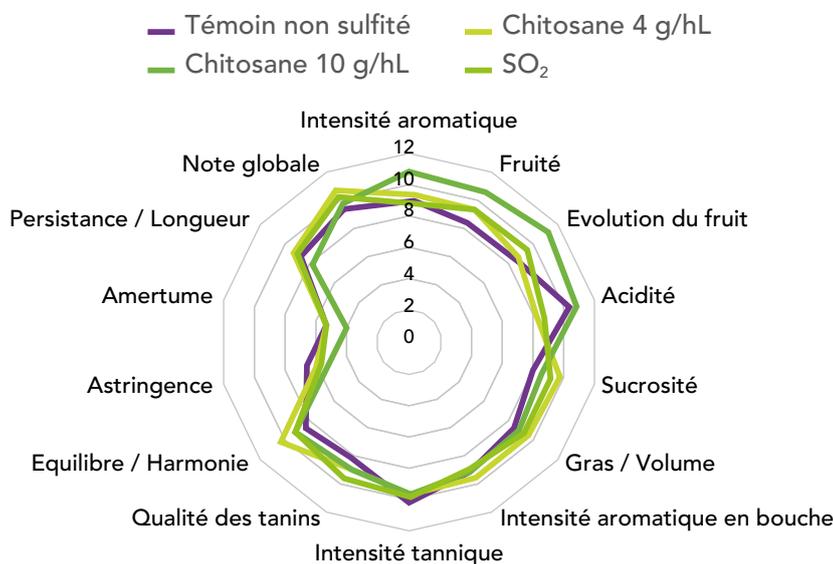


Figure 10 - Résultat d'analyse sensorielle sur vin rouge

2. Essais terrain : Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine

De nombreux vignerons utilisent déjà le chitosane pour gérer leurs problématiques *Brettanomyces*, ou pour bloquer des fermentations malolactiques sur vins blancs sans sulfites ajoutés. Cependant, quel que soit l'objectif visé, l'utilisation de chitosane sur le terrain n'est pas toujours concluante. Le travail en conditions terrain a consisté à fournir des échantillons et des références issus de la pratique à la recherche dans l'objectif de répondre aux problématiques d'utilisation des producteurs.

Pour construire cette échantillothèque,

différents sites Bio produisant du vin sans SO_2 ou ayant des problématiques de contamination par *Brettanomyces* ont été suivis tout au long de l'élaboration de leurs vins. Des échantillons ont été prélevés à différents moments clés, en fonction des analyses à réaliser selon la problématique à étudier.

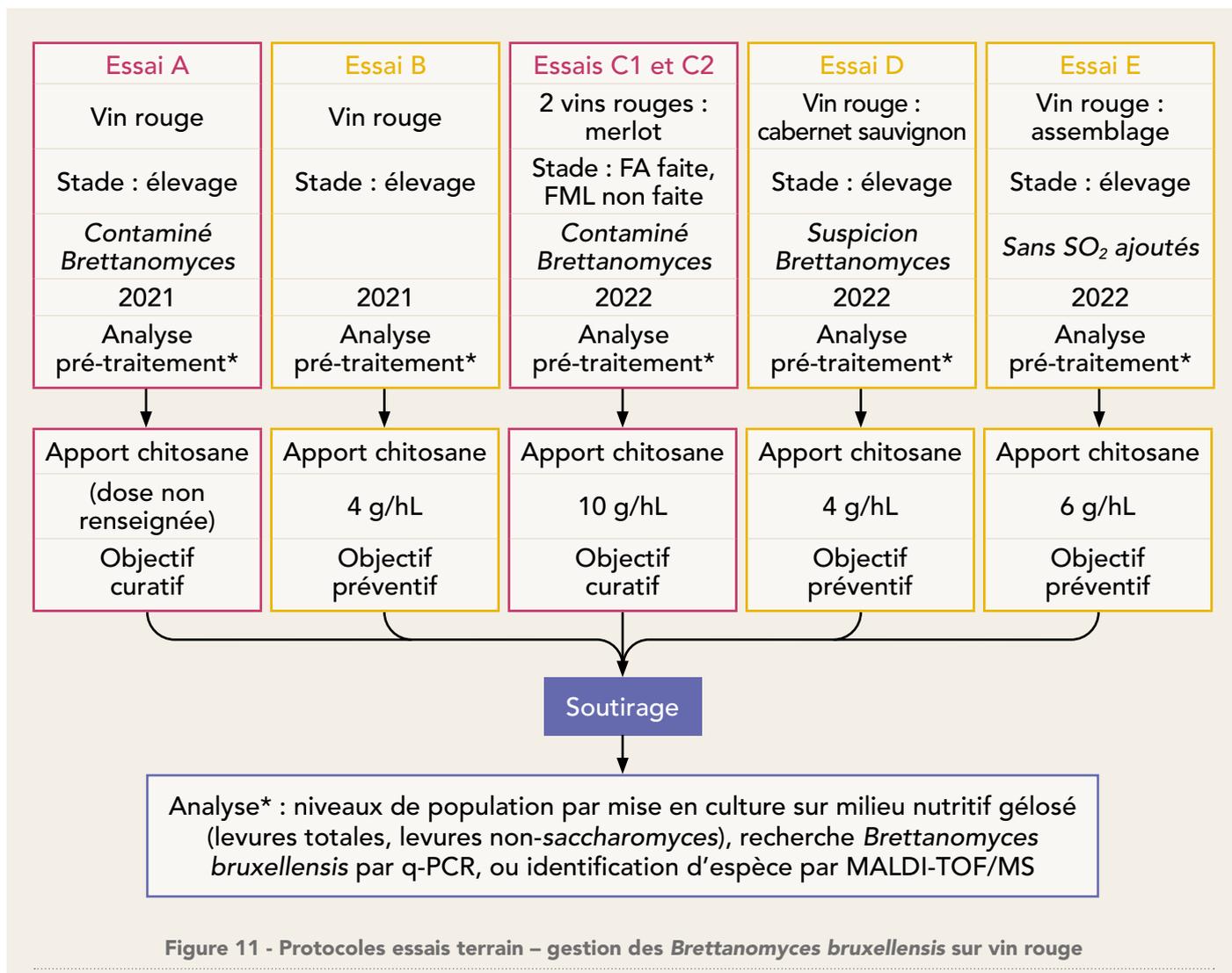
Des protocoles simplifiés coconstruits avec l'ensemble des partenaires ont été appliqués chez des vignerons volontaires. Le principe était de reproduire en conditions réelles les essais réalisés en milieux contrôlés par l'IFV, sur des volumes plus importants, pour en valider les conclusions. Ces essais suivent un protocole prédéfini entre les partenaires et le vigneron participant.



© G. Dufau

Gestion des levures de type *Brettanomyces*

Les protocoles appliqués sur le terrain en 2021 et 2022 (Figure 11) ont permis de suivre l'impact d'apports de chitosane sur des vins à problématique avérée ou suspectée de contamination par *Brettanomyces bruxellensis*. L'objectif était donc **curatif** (essais A, C1, C2) ou **préventif** (Essais B, D, E).



La Figure 12 illustre l'impact des traitements effectués sur les niveaux de populations des *Brettanomyces bruxellensis*.

- Les essais à **visée préventive**, réalisés sur des vins à historique *Brettanomyces* ou sur des suspicions (non confirmées) de contamination, n'ont pas pu réellement être évalués, car les niveaux de populations étaient indétectables (ND) avant et après traitement.
- Dans les essais à **visée curative**, réalisés sur des vins rouges contaminés, le traitement au chitosane a permis une réduction des niveaux de *Brettanomyces* autour de 2 LOG UFC/mL par rapport aux niveaux avant traitement. Après traitement, les populations restent à des niveaux qui font risquer des déviations organoleptiques. L'impact curatif n'est pas suffisant dans ces essais terrain.

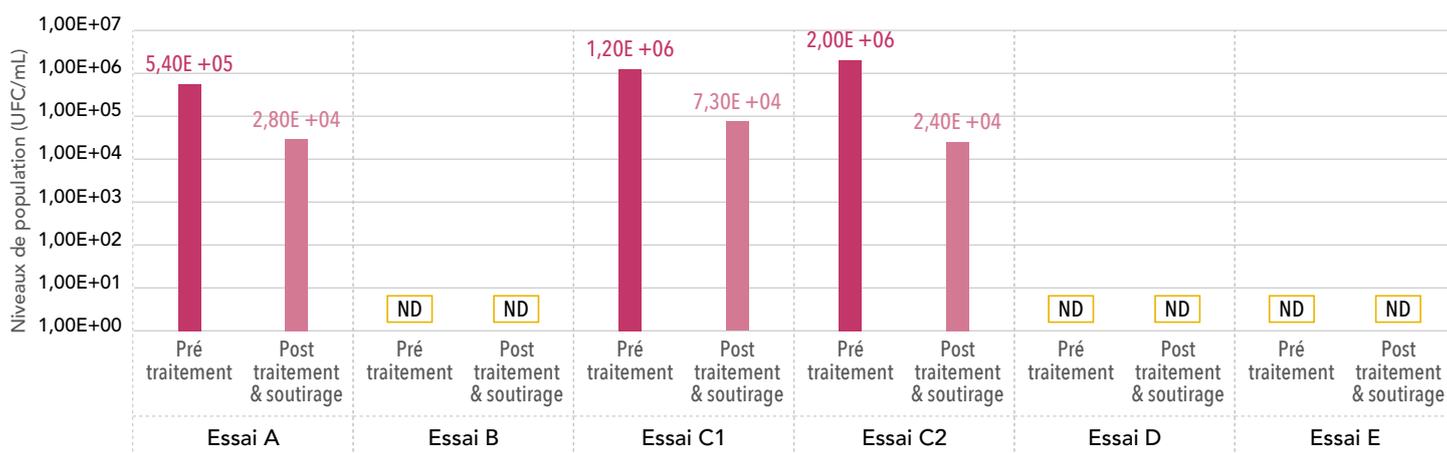


Figure 12 - Impact du traitement sur *Brettanomyces bruxellensis* - vins rouges



Gestion des bactéries lactiques

Dans les essais A à E précédemment exposés, l'impact du traitement sur les bactéries lactiques a également été évalué. Les niveaux de bactéries lactiques ont été évalués par dénombrement par mise en culture sur milieu nutritif gélosé, avec identification au niveau de l'espèce par MALDI-TOF/MS (espèce *O. oeni* majoritaire identifiée).

Les résultats présentés sur la Figure 13 montrent un effet aléatoire du traitement au chitosane sur les niveaux de bactéries lactiques :

- Sur les vins rouges en élevage, ayant terminé la FML

- Le chitosane réduit les niveaux de population de 1 à 2 LOG UFC/mL dans les essais A, D et E, mais les populations résiduelles en élevage restent trop élevées (autour ou supérieures à 10^3 UFC/mL) pour assurer une parfaite stabilité microbiologique du vin en élevage en l'absence d'application d'autres mesures (sulfitage, filtration, maintien au froid...).
- Sur l'essai B, la population en bactéries lactiques augmente de 10 à $5,9 \cdot 10^3$ UFC/mL, même après traitement. Une manipulation du vin pourrait être associée à un développement de ces bactéries lactiques.

- **Sur les vins rouges post FA et pré FML (C1 et C2)**, le chitosane réduit les niveaux de population de bactéries lactiques à des niveaux insuffisants (inférieurs à 10^6 UFC/mL) pour assurer le déclenchement de la fermentation malolactique. Il est susceptible de retarder voire compromettre l'enclenchement spontané de la fermentation malolactique.

En comparaison des résultats en conditions contrôlées présentées en page 18, ces observations montrent des effets plus aléatoires du traitement au chitosane sur vin rouge en conditions terrain sur la maîtrise des populations de bactéries lactiques.

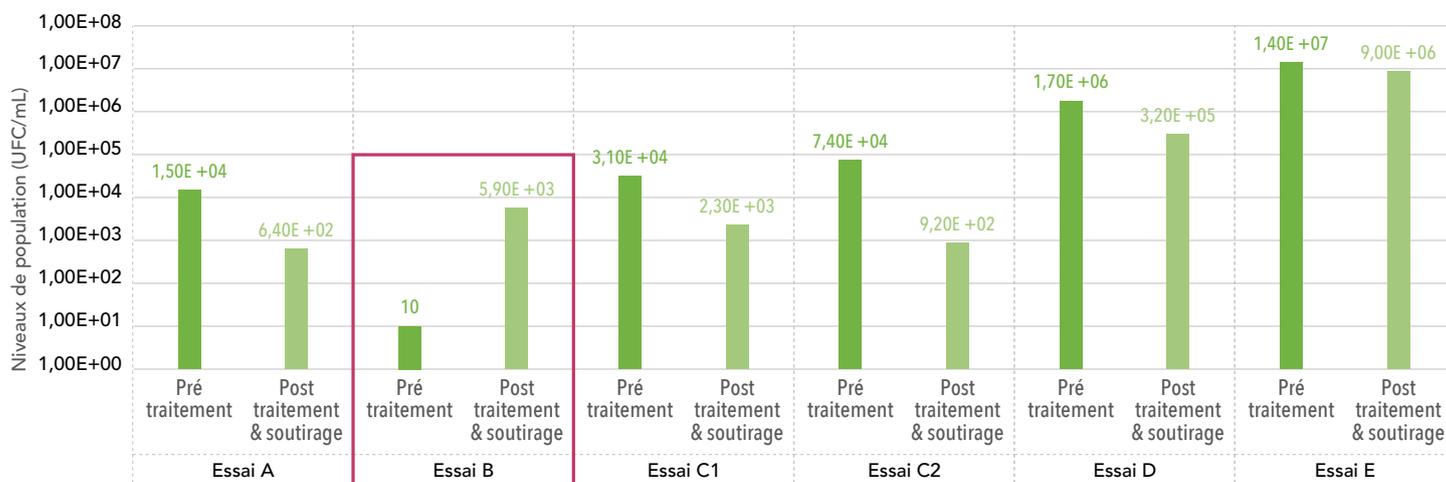
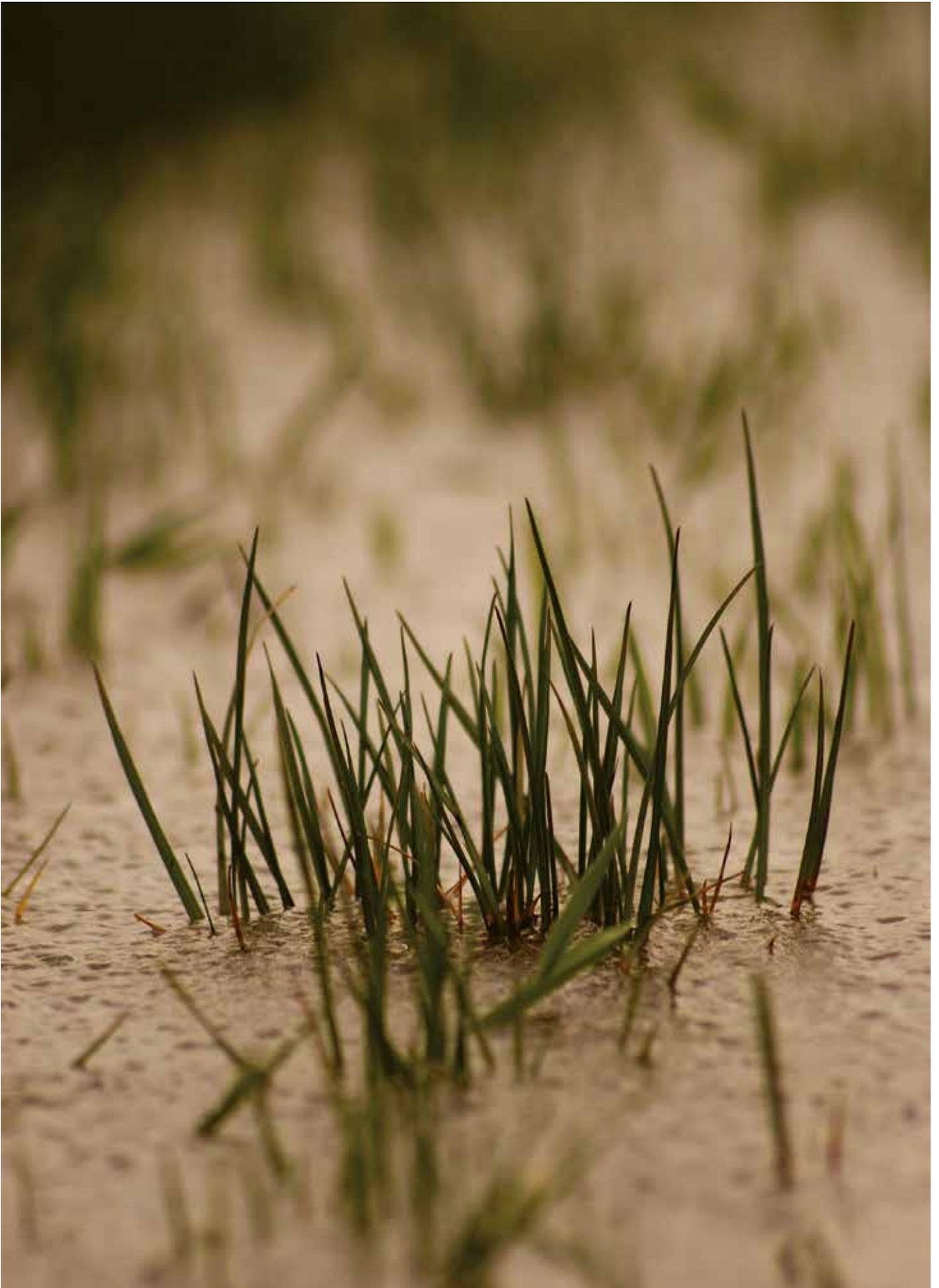


Figure 13 - Impact du traitement sur les bactéries lactiques - vins rouges



IV.

CONCLUSION

Les résultats des essais montrent des effets relativement **variables** du chitosane sur les populations de *Brettanomyces bruxellensis*. Si en conditions contrôlées, des populations jusqu'à 10^3 - 10^4 UFC/mL semblent pouvoir être corrigées, les résultats terrain montrent des réductions de population plus limitées, autour de 10^1 - 10^2 UFC/mL. Ces résultats sont probablement liés à la nature des souches de *Brettanomyces bruxellensis* présentes et à leur sensibilité au chitosane dans le vin considéré. Ils peuvent aussi être liés à une mise en œuvre plus complexe sur des volumes plus importants. Pour rappel, la matrice vin impacte elle aussi l'efficacité du traitement. **Dans ces conditions, le chitosane semble être un outil utilisable principalement aux premiers stades d'une contamination par une souche sensible ou intermédiaire de *Brettanomyces bruxellensis*.** Les niveaux de contaminations élevés en *Brettanomyces bruxellensis* sont, sur le terrain, en général solutionnés par filtration tangentielle, dont l'efficacité n'est plus à démontrer. De plus, selon la dose utilisée, le chitosane représente un coût plus élevé que la filtration tangentielle, son utilisation est donc à adapter aux niveaux de valorisation des vins et au contexte technique. En effet, la filtration devient très contraignante pour les producteurs, de plus en plus nombreux, travaillant en micro-cuvées et en petits contenants. Ces situations se prêtent alors davantage à l'emploi de chitosane. **Il semble donc nécessaire de poursuivre les essais pour améliorer son utilisation contre les *Brettanomyces*.** En effet, des résultats encourageants en laboratoire et conditions contrôlées sont également observées dans certaines situations sur le terrain, qu'il conviendrait de savoir identifier avant traitement.

Enfin, le chitosane semble montrer un intérêt dans la gestion des **bactéries lactiques**, en les réduisant suffisamment pour retarder sur plusieurs mois de la fermentation malolactique, effet particulièrement recherché sur les vins blancs sans sulfites ajoutés. **Ces vins pourraient alors être stabilisés jusqu'à la mise en bouteille à l'aide de chitosane**, en sécurisant l'itinéraire par des conditionnements précoces.

Pour améliorer l'efficacité des traitements dans les cas où les résultats semblent moins intéressants, une piste serait de tester un fractionnement des doses d'apport lors de l'élevage des vins, dans l'optique d'augmenter la durabilité de l'effet du traitement au chitosane. Ceci pourrait être évalué lors d'essais à venir. Aux doses testées, jusqu'à 10 g/hL, **l'analyse sensorielle des divers échantillons ne semble pas montrer d'impact organoleptique négatif du chitosane.**

Malgré des résultats encourageants en milieu contrôlé, la maîtrise pratique de la microbiologie avec le chitosane reste difficile et aléatoire. La poursuite des essais est donc prévue pour en affiner les contours dans les conditions terrain.

Comité de rédaction :

Marguerite Dols-Lafargue (ISVV),
Cécile Houdayer (Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine),
Charlotte Liadouze-Anneraud (IFV),
Julie Maupeu (Microflora)

Comité de relecture :

Stéphane Becquet (Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine),
Laure Cayla (IFV),
Anne Hubert (Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine)

Avec les conseils de :

Philippe Cottereau (IFV Occitanie)

Nous adressons tous nos remerciements aux domaines, vignerons, chercheurs et autres professionnels de la filière ayant participé à ce travail en mettant à disposition leur matériel, leur vin, leurs données, leurs compétences et leur temps !



VIGNERONS BIO
NOUVELLE AQUITAINE

Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine

38 Route de Goujon, 33570 Montagne
05 57 51 39 60 | www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr
contact@vigneronsbionouvelleaquitaine.fr



Institut Français de la Vigne et du Vin | Vinopôle Bordeaux Aquitaine

39 Rue Michel de Montaigne, 33290 Blanquefort
05 56 16 14 20 | www.vignevin.com | www.vinopole.com
charlotte.anneraud@vignevin.com



ISVV
INSTITUT DES SCIENCES
DE LA VIGNE ET DU VIN
BORDEAUX AQUITAINE

université
de **BORDEAUX**



UMR OENOLOGIE

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin

210 Chemin de Leysotte, 33140 Villenave-d'Ornon
05 57 57 58 58 | www.isvv.u-bordeaux.fr
julie.maupeu@u-bordeaux.fr | marguerite.dols@enscbp.fr

AVEC LE SOUTIEN FINANCIER DE



La Nouvelle-Aquitaine et l'Europe
agissent ensemble pour votre territoire