

SYNTHÈSE : APPARITION DE BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS, MULTIPLICATION ET IMPACT SUR LES AROMES DU VIN

Torey Arvik¹, Thomas Henick-Kling²

¹ Etudiant en Doctorat, Groupe d'œnologie de l'Université de Cornell, Genève, Etat de New York

² Maître de Conférence en Oenologie, Cornell University, Station Expérimentale en Agriculture de l'Etat de New York, Genève, Etat de New York

S'il fallait caractériser l'odeur que la levure *Brettanomyces bruxellensis* peut donner à certains vins rouges, on parlerait de couverture de cheval qui aurait été laissée dans une boîte de pansements en métal. Ces arômes et goûts peuvent être détectés dans les vins contenant cette levure, individuellement ou combinés entre eux. *Dekkera/Brettanomyces* est connue pour vivre dans de nombreux environnements spécialisés, tels que la sève des arbres, les laiteries et les brasseries. Sa présence est cependant la plus marquée dans les caves vinicoles.

5 espèces de *Dekkera/Brettanomyces* sont aujourd'hui reconnues : *D. (B.) bruxellensis*, *B. custersianus*, *D. anomalus*, *B. naardenensis*, and *B. nanus*. Ces espèces ont été re-classifiées à partir d'isolats multiples après que de nombreux synonymes leur ont été donnés au cours de l'histoire de la mycologie. Des analyses de séquences génétiques qui avaient été conservées ainsi que des tests biochimiques traditionnels ont été récemment utilisés pour re-classifier ce groupe.

Quelle est la différence entre *Brettanomyces* et *Dekkera* ? Pour répondre à cette question, il faut d'abord connaître quelques bases sur le sexe des levures.

Dekkera, qui produit des spores en période difficile, est d'un point de vue mycologique, la forme sexuelle « parfaite » de *Brettanomyces*. Ainsi, le lecteur verra souvent le nom « *Dekkera/Brettanomyces* » dans la documentation qui existe au sujet des Brett, pour décrire cette dualité.

Focalisons nous seulement sur le terme *Brettanomyces*, car il n'y a que quelques personnes chanceuses qui ont été capables de détecter une forme de *Dekkera* dans un vin. A ce que l'on suppose, *Brettanomyces bruxellensis* a été isolée à partir d'un vin de 10 ans d'âge. Ce qui est surprenant cependant c'est que lorsque les levures *Brettanomyces* se trouvent dans des barriques ou dans des bouteilles, elles peuvent fermenter de petites quantités de sucre avec un apport d'oxygène minimal. Apparemment, *Brettanomyces* se développe activement dans le vin pendant une durée relativement courte. Cependant, à notre connaissance, aucune recherche n'a testé cette hypothèse directement. Les « Brett » ne peuvent pas se multiplier de façon active indéfiniment.

Il existe cependant une hypothèse selon laquelle les *Brettanomyces* (comme de nombreux autres organismes) peuvent rester à l'état viable mais non cultivable (VCN) pendant de longues périodes. Ces cellules en état VCN, qui ne peuvent pas être observées avec les méthodes de culture traditionnelles, poursuivent la métabolisation des nutriments à partir de leur environnement et sont donc toujours considérées comme vivantes. Il s'agit d'un phénomène assez commun pour les microbes spécialisés considérés comme des agents pathogènes pour les humains et qui a été récemment mis en évidence pour les bactéries du vin.

Revenons maintenant à *B. bruxellensis* isolée à partir d'un vin de 10 ans d'âge. Il est vraisemblable qu'il s'agissait soit de spores, soit de cellules VCN qui étaient en quelque sorte en période de stase (=stagnation) dans leur environnement. L'état physiologique resterait théoriquement viable pendant de nombreuses années dans les conditions de conservation favorables d'un vin rouge fin. Les cellules sous forme de colonies classiques apparaîtraient une fois cultivées dans un milieu riche. Donc, quand elles seraient stimulées par une bonne nutrition et des conditions de milieu convenables.

Mais qu'est ce que font des "Brett" dans mon vin ?

Il y a peu de temps encore, prononcer le mot « Brett » en présence de vinificateurs était presque insultant. Il semble à présent qu'ils soient plus disposés à discuter sur le sujet et moins sur la défensive. Après tout, il existe des vins rouges très bien cotés qui sont de parfaits exemples de vins de « style Brett » par leur arômes et leurs goûts spécifiques. Les vinificateurs apprennent actuellement à reconnaître ces arômes complexes et à comprendre les mécanismes de leur formation dans le vin. Grâce à cette nouvelle compréhension de l'écologie des levures Brettanomyces et de la formation de ces goûts désagréables, il faut espérer que les vinificateurs seront mieux à même de contrôler la formation de ces arômes dans leurs vins.

La plupart des caves ont déjà du faire face au contrôle des Brettanomyces. Certaines des caves avec lesquelles nous avons travaillé nous ont fait promettre de garder secret leur « problème de contamination ». Certaines nous ont indiqué avoir « travaillé avec les Brett » pour produire des vins plus complexes, mais que désormais, la présence des Brett était devenue un vrai problème dans certains de leurs rouges. Au cours d'un des projets que nous avons menés dans une cave, nous avons pu identifier deux souches de Brettanomyces bruxellensis indigènes se succédant tour à tour dans trois de leurs millésimes.

La réputation qui entourait la levure Brettanomyces dans l'industrie viti-vinicole a récemment vécu un changement. Certains écrivains du vin ont réprimandé les vinificateurs américains car ils les jugent trop « axés sur l'hygiène ». Certains d'entre eux sont même allés jusqu'à dire que les odeurs et arômes de Brett étaient plus désirables que bannissables dans les vins. Cela peut d'ailleurs être prouvé par les sommes d'argent exorbitantes qui sont dépensées pour des bouteilles présentant le « caractère classique d'un vin de Bordeaux standard ». Le débat est à présent lancé. Mais les œnologues avec lesquels nous avons travaillé ne sont eux pas enthousiasmés par la perte potentielle du fruité et des arômes variétaux.

Quel est l'historique de Brettanomyces ?

Les espèces de Brettanomyces ont un long historique anecdotique en lien avec différents aliments. Depuis 110 ans, divers rapports industriels donnent de multiples noms (et découvreurs) au même organisme. Il existe énormément de rapports décrivant la contamination de diverses boissons, et plus précisément de bières et de vins présentant un voile de levure en bouteilles ou dans des cuves de seconde fermentation ainsi que des mauvaises odeurs (pour les vins rouges essentiellement).

Un auteur a décrit l'utilisation brevetée de la levure Brettanomyces pour la seconde fermentation pour les bières de spécialité. Le nom Brettanomyces a été officiellement donné à la levure « type Torula » caractérisée en 1904 par N. Hiltje Clausen comme étant la levure responsable de la production du « vrai style de bières anglaises ».

Voici l'histoire de Clausen : Les Britanniques ont commencé à ajouter des cultures starter de levure Saccharomyces pure et cela avait complètement ruiné le goût des bières « Stock Ales » anglaises. À travers le monde, les chimistes de la brasserie se demandaient pourquoi les Britanniques ne pouvaient pas travailler ensemble et produire de bonnes stock ales, grâce au nouveau système amélioré qui prônait l'utilisation d'une seule levure.

Clausen a prouvé par diverses expériences que Brettanomyces était un agent de seconde fermentation en fût et qu'il était ainsi responsable de la production du caractère typique des bières « stock ales » anglaises. Cette bière est ironiquement qualifiée de bière « au goût de vin ». Il est intéressant de noter que les brasseurs amateurs à domicile peuvent acheter des souches de Brettanomyces bruxellensis (également connues sous le nom de B. lambicus) auprès de fournisseurs de starters de levure pour obtenir cette même note « vineuse » caractéristique que l'on retrouve dans les vraies stock ales anglaises et les lambics belges.

Il existe très peu de descripteurs positifs donnés aux composés individuels dérivés de Brettanomyces Bruxellensis dans le vin rouge. À certaines des caractéristiques « type vin » que les bières de spécialité présentent on donne la plupart du temps, quand il s'agit de vin rouge, les descripteurs « médicinal », « chaussettes sales », « basse-cour », « fumé », « métallique », « pansement adhésif » et « épice ».

Pendant, certains descripteurs tels que « clou de girofle », « fumé » et « épice » sont des arômes très désirables en arrière plan des arômes typiques de premier plan floraux et fruités intenses des Cabernet Sauvignon, Merlot ou Cabernet Franc. Dans les vins dont l'intensité gustative est moindre (avec moins de structure et d'extraction), le « style brett » peut être trop marqué et donc nuisible pour la valeur de vente du produit fini.

Il existe un autre sujet nébuleux : peu de gens sont capables de sentir chacun des aspects des défauts typiques causés par les Brett dans le vin rouge. Certains détectent l'odeur purement « médicinale » de 4-éthyl-phénol et un peu d'arôme « pomme verte » ou « chèvre mouillée » dûs aux acides valérique et iso-valérique produits à des degrés variables. D'autres détectent l'odeur « animale » ou « basse-cour ».

Peu de personnes perçoivent les arômes de « souris » ou de « croûte de pain » qui sont produits par l'oxydation des acétyl tétrahydropyridines volatiles en bouche. Il est important de noter que l'arôme de souris d'un vin est probablement moins lié aux Bretts qu'à certaines bactéries présentes dans ce vin. Que cet arôme de souris soit lié à la présence de Brett reste néanmoins une possibilité.

Ainsi, Paul Henschke de l'Australian Wine Research Institute explique : « Au cours de nos années de travail sur des vins présentant un goût de souris, nous n'avons été capable de détecter cette mauvaise odeur [de souris] que dans le cas vraiment catastrophique d'un vin rouge où l'arôme était incroyablement volatile. Le vin était complètement hors concours au niveau des phénols volatiles et autres caractères « décapants » pour le palais. »

Aucun des attributs cités plus haut ne saurait être considéré comme positif. Cependant, tel qu'indiqué auparavant, un profil de vin complexe et avec une belle structure peut être souligné par une petite odeur désagréable individuellement si le contexte s'y prête.

Cela amène certaines personnes à croire les histoires narrées par certains œnologues lorsqu'ils décrivent leurs nombreuses rencontres avec Brett, du type : « il me semblait que la souche dont je disposais produisait de belles choses dans mes vins mais peut-être que l'année dernière, ou quelque chose comme ça, j'ai eu une nouvelle souche, et alors tous mes vins se sont mis à puer ». Alors, y a-t-il des bonnes et des mauvaises souches de *B. bruxellensis* ?

Nous nous sommes rendus avec plusieurs œnologues à un séminaire sur les Brett sponsorisé par Vinquiry à Santa Rosa en Californie, en 2001, et il y est clairement apparu que l'industrie viti-vinicole a décidé d'explorer cette hypothèse selon laquelle il existe des bonnes souches de Brettanomyces et des mauvaises souches de Brettanomyces.

Des laboratoires, dont le nôtre, essaient actuellement de caractériser des souches avec plusieurs technologies à travers le monde pour voir s'il est possible qu'il existe des souches qui donnent au vin des arômes de Brett désirables (fumé, épicé) ou s'il existe seulement des mauvaises souches de Brettanomyces.

Comment est-ce que Brettanomyces opère ?

Comme tout survivant qui se respecte, Brettanomyces se nourrit avec ce qu'elle trouve. Comme on peut s'y attendre, plus l'environnement est sélectif, plus il est simple pour un organisme tolérant de remporter la compétition sur ses rivaux quand les ressources sont limitées.

De petites quantités de sucres fermentescibles (0,1 g/L) et de grandes concentrations d'éthanol (jusqu'à 14%) peuvent agir comme des sources d'énergie pour Brettanomyces bruxellensis. Une petite quantité d'oxygène est également un très bon moyen de développer des Brett dans le vin. Les Brett peuvent produire 2,0 g/L d'acide acétique avant que leur croissance n'en soit véritablement affectée. C'est la raison pour laquelle il est si difficile de prévoir ce qui arrivera dans la bouteille à un vin non filtré, car il pourra être complexe au moment de sa mise en bouteille et horrible une année après !

Un composant malodorant majeur associé à « Brett » est le 4-éthylphénol. Il existe au moins 10 autres composés odorants pouvant délivrer des arômes de plastique similaires, dont le 4-éthylgâïacol, qui est un composé odorant « fumé », « épicé » dans certains vins.

Le 4-éthylphénol est produit à partir de l'acide p-coumarique au cours d'une courte succession d'étapes. P-coumarate est dégradé en 4-vinylphénol, un composé dont le seuil olfactif est élevé. Il est commun, et ce même pour *Saccharomyces cerevisiae*, de produire du 4-vinylphénol lors de la fermentation active, mais néanmoins pas à la même échelle que Brett. La dernière étape qui consiste en la transformation de 4-vinylphénol en 4-éthylphénol est propre à Brettanomyces seulement (c'est en tous cas ce que pense la science pour le moment). On suppose que cette conversion se produit en continu pendant plusieurs mois, mais personne n'en connaît véritablement le déroulement physiologique complet (pour bilan et réactions, voir Boulton, R., B. et al., 1996).

Des observations menées dans des caves et des laboratoires ont montré que les conditions de développement, les concentrations des différents co-facteurs, le nombre de levures et la température des contenants contaminés jouent un rôle important dans la production des mauvaises odeurs.

Il existe deux hypothèses majeures qui expliquent pourquoi *B. bruxellensis* réalise la décarboxylation du 4-vinylphénol en 4-éthylphénol. L'une des théories affirme que *Brettanomyces* puise de l'énergie à partir de cette transformation sous la forme d'un petit gradient d'électron d'où la formation d'une petite quantité d'ATP utile. Cette théorie nous plaît, car *Oenococcus oeni* agit de la même façon en convertissant l'acide malique en acide lactique et peut ainsi en tirer le même avantage. Certains émettent la théorie qu'un gradient de protons peut se développer et que tout excès pourrait être « rejeté » pour obtenir de l'ATP.

La seconde théorie affirme que *Brett* détoxifie le p-coumarate par décarboxylation et réduction en 4-vinylphénol. Après tout, si *S. cerevisiae* le fait, pourquoi pas *Brettanomyces bruxellensis* ? Il n'existe cependant encore aucun écrit scientifique pour soutenir ces théories. Ainsi la question de savoir pourquoi *B. bruxellensis* réalise la décarboxylation du 4-vinylphénol en 4-éthylphénol doit encore être étudiée. Davantage d'études physiologiques de base doivent être entreprises sur la plus grande quantité de souches possible.

Où trouve-t-on Dekkera/Brettanomyces ?

Brettanomyces est omniprésente. C'est-à-dire que quelque soit l'endroit où vous la cherchez dans le monde, vous la trouverez : dans les vignobles, dans l'eau, dans le sol, dans le moût de raisin, dans les chambres froides, dans les cuves de fermentation, sur les sols en béton et dans les barriques.

Brettanomyces bruxellensis s'installe dans les caves où l'hygiène dans le chai n'est pas contrôlée, où le SO₂ n'est pas utilisé de façon adéquate, où les barriques ou contenants infectés sont négligés et où ils peuvent absorber l'oxygène de l'air. Les *Brettanomyces* sont uniques dans le sens où elles utilisent l'« effet Custer », un moyen de terminer la fermentation alcoolique en présence d'une petite quantité d'oxygène.

Nous ne devons pas oublier l'effet fongistatique de SO₂ sur les *Brett*. Maintenir une quantité de 80 ppm de SO₂ total (\leq pH 3.5) empêchera la croissance des *Brett*. La température est également importante. La croissance est beaucoup plus rapide à plus de 20°C et s'arrête dans la plupart des cas en dessous de 8°C. La filtration peut éliminer physiquement les *Brett*. Une grande partie du problème des vins affectés par *Brett* vient du fait que certains vinificateurs suivent la mode et mettent les vins en bouteille sans les filtrer.

Les *Brett* peuvent être surveillées, mais pas contrôlées. Les barriques qui ne sont pas surveillées et qui sont fréquemment ouillées sont susceptibles de développer de grandes quantités de *Brettanomyces*. Quant à ce qu'il convient de faire à ce sujet, les vinificateurs devraient tenir compte de ce qui s'est passé avec la production animale en Europe.

Aujourd'hui, dans les fermes d'élevage européennes, il est possible qu'on vous demande de plonger vos chaussures dans un bain désinfectant afin d'empêcher la propagation de virus et d'autres organismes potentiellement dangereux qui vous pourriez promener sous vos semelles. Il faudrait faire la même chose dans les caves et plus particulièrement dans les chais. Essayez donc de savoir où tel visiteur a fait traîner ses pieds et ensuite demandez lui donc de couvrir ses pieds avec des sacs.

Quand un tuyau est utilisé pour nettoyer du jus ou du vin renversé sur le sol, des microbes sont libérés et voyagent dans l'air. Ils se posent ensuite sur le mur, sur la barrique ou bien sur le tuyau d'à côté. Ils voyagent aussi lorsque le personnel de cave visite des sites hautement contaminés, sans désinfecter ses chaussures ou changer de vêtements avant de se mettre à travailler le vin.

Nous ne voulons pas dire ici que les caves devraient toutes devenir des salles stériles. Cependant, réfléchir un peu et prendre quelques précautions permettraient de réduire l'incidence de la contamination. Vous pouvez travailler un jour dans la cave et le lendemain travailler où vous voudrez, mais ne pénétrez pas dans la cave après avoir manipulé d'autres équipements, visité une autre cave ou touché d'autres raisins sans avoir préalablement fait en sorte de stopper le cycle de pénétration possible d'organismes dans les zones de vinification. Les *Brett* rentreront sur les raisins et seront tuées par des bonnes pratiques de vinification et sanitaires. Il n'est donc pas besoin d'introduire de la levure provenant de la cave de votre ami dans la vôtre.

Il semble que Brett pénètre dans la cave avec les raisins. Le fait que les Brett soient présentes en petites quantités les rendent difficiles à isoler, mais quand elles disposent de suffisamment de temps, très peu de Brett sont capables de se multiplier suffisamment et entraîner des problèmes. La voie d'introduction la plus répandue reste cependant celle par le vin ou les barriques provenant d'autres caves.

Brett semble attendre le moment favorable pour faire surface et ça c'est le sujet vraiment important. Une population réduite de Brettanomyces peut rester dans une barrique voire même n'importe où dans la cave à attendre les bonnes conditions pour se développer !

Si vous avez affaire à des contaminations de Brettanomyces dans une ou deux barriques, il faut les isoler et utiliser, dans la mesure du possible, un autre équipement. Si cela est possible, filtrer le vin qui se trouve dans les barriques contaminées, nettoyer les barriques et y ajouter du soufre. Le vin filtré peut être stocké dans un autre contenant pour un certain temps et utilisé pour de l'assemblage, après s'être assuré qu'il est stable.

Le travail mené par Mark Shefton et al. a montré que les fûts en chêne contaminés par *B. bruxellensis* ne peuvent pas être stérilisés efficacement. Ni un lavage soigné, ni un rinçage avec de l'eau sulfitée, ni un traitement à l'ozone ne peuvent stériliser un fût. Les Brett ne peuvent pas toutes être éliminées ou tuées en raison du large volume interne et de la nature poreuse du chêne.

La NASA est confrontée à un problème similaire à celui des œnologues : quand il se produit un incident au milieu d'une mission (ou d'un millésime), l'incident peut s'avérer désastreux et irréparable. Pour cette raison, les ingénieurs de la NASA se sont réunis et ont développé le programme HACCP (Analyse des dangers et des points critiques pour leur maîtrise). Il s'agit véritablement d'une philosophie de vérification et re-vérification des points clés d'un système pour s'assurer qu'il y a une solution de secours en cas de problème. Ainsi, si l'on découvre qu'un fût est contaminé, il doit être considéré comme tel tout au long de la durée de son utilisation dans la cave. Le vin à l'intérieur du fût doit être filtré, sulfité, et l'absence de Brett doit être vérifiée avant que le vin soit assemblé ou embouteillé. Prendre le risque d'assembler de mauvais arômes n'est pas une solution.

Etant donné que les vinificateurs se battent avec des mécanismes de contamination étranges, et ce même en ayant adopté une bonne hygiène dans la cave et même lorsque les sources de contamination seront localisées, il sera dans la plupart des cas souvent trop tard pour que cela soit réellement utile. L'utilisation de pipettes en plastique stériles au lieu d'un seul échantillonneur pourrait permettre de réduire grandement le risque d'inoculation de Brett.

Le matériel d'échantillonnage peut être stérilisé en le plaçant 15 minutes dans de l'eau bouillante. Il peut également être stérilisé dans une solution à 70% d'éthanol. Paul Henschke explique : « ...les micro-organismes non sporulant tel que Brettanomyces peuvent être tués en les plaçant 10 minutes dans de l'eau bouillante ou 5 minutes dans de l'éthanol »

Utiliser des vins qui ne contiennent pas de Brett (filtrés, pasteurisés ou traités avec Velcorin®) pour ouiller les barriques est également un procédé utile. Ouiller les barriques tout en évitant les éclaboussures retardera la croissance des populations de Brett indigènes car le petit extra d'oxygène qu'elles aiment tant sera ainsi restreint. La meilleure façon d'exclure l'oxygène est de fermer la barrique hermétiquement et de la laisser tranquille !

Cela nous amène à un autre point : faut-il micro-oxygéner ou non ? Le Dr. Ralph Kunkee (UC Davis) ainsi que d'autres microbiologistes qui connaissent Brettanomyces vous déconseilleraient vivement cette pratique à moins que vous ne disposiez d'un très bon programme de surveillance pour le 4-éthylphénol ou le 4-éthylgâïacol par exemple et de la possibilité de cultiver les Brett sur des milieux appropriés. Des laboratoires d'analyse proposent généralement ce service à moindre coût.

Malheureusement, tous les arômes et mauvais goûts de Brett ne peuvent pas être détectés et surveillés de la même façon que 4-éthylphénol et la méthode de mise en culture est souvent trop lente. Ainsi, de nouvelles méthodes ont besoin d'être mises au point pour que le développement des Brettanomyces puisse être empêché ou pour que ces levures soient détectées dans un état viable de façon précoce lors du stockage du vin.

Lors de notre expérience, nous n'avons pas pu corrélérer la concentration de 4-éthylphénol avec les *B. bruxellensis* viables. Nous n'avons également pas pu nous appuyer sur cette incapacité à détecter 4-éthylphénol pour vérifier l'absence de Brett lors d'une enquête menée sur des vins locaux. Cette méthode peut cependant être employée comme mesure préventive pour surveiller les altérations qu'une population de Brett active peut provoquer dans une barrique au cours du temps.

L'impact de Brettanomyces sur les arômes et les goûts du vin

Parmi les premiers effets observés dans les vins contaminés par Brett, on note une perte du caractère fruité et une augmentation de la complexité générale du vin à court terme. A long terme apparaissent un accroissement des arômes désagréables tels que pansement adhésif, créosote, plastique brûlé et une perte générale du caractère fruité et des arômes floraux.

Dans le cadre d'une étude menée au sein d'une cave californienne importante, le développement des « caractères brett » ainsi que les altérations d'autres composants du vin ont été observées sur 3 millésimes. Il en est ressorti que ce sont les composés aromatiques et gustatifs associés à l'impact du cépage, qui ont été le plus touchés par la conversion en composés désagréables et ce de façon très significative.

Les acides cinnamiques (comme le p-coumarique) peuvent contribuer aux arômes floraux et miel du vin. Etant donné que les Brett convertissent ces composés afin de rester longtemps viables en bouteille, il est évident que ces arômes délicats disparaissent lorsque les Bretts ont une activité prolongée. La chromatographie-olfactométrie au gaz a permis de mettre cela en évidence dans la cave citée plus haut. Des arômes et perceptions médicinales et métalliques ont remplacé les arômes floraux.

Il existe différents degrés et types de « caractères brett » dans les vins. Tous les défauts brett ne sont pas tous détectables par tout-un-chacun. Certaines personnes souffrent d'anosmie (incapacité de sentir) envers les notes « animal » et « basse-cour » qui sont les descripteurs généraux des vins contaminés. D'autres personnes sont plus sensibles aux arômes type « plastique » (tel que 4-éthylphénol). Ces deux groupes de composés chimiques ont des seuils olfactifs très différents et la plupart des gens n'ont pas les récepteurs pour les détecter tous.

Il est également important de rappeler que de nombreux composés retrouvés dans les vins contaminés par Brett présentent des arômes de « plastique » similaires et ont pourtant des seuils de détection très variables au sein des panels de dégustation. Le seuil olfactif de 4-éthylphénol dans l'eau est d'approximativement 50 ng/L. Celui de 4-éthylgàïacol est de 500 ng/L. Associé avec d'autres principes odorants dont les seuils olfactifs sont similaires, il y a un effet d'accumulation dans le vin pour le dégustateur. Le caractère Brett peut être un phénomène très complexe dans les vins structurés.

Le caractère de souris est un autre des caractères attribués à *Brettanomyces bruxellensis* et à quelques bactéries de type *Lactobacillus*. C'est comme arrière goût que le caractère de souris est détecté dans le vin et non pas comme odeur. Ce caractère est produit par des isomères de 2-acétyl-tétrahydropyridine et 2-acétyl-1-pyrroline qui s'oxydent dans la bouche du dégustateur et qui sont perçus en rétro nasal. Ces composés sont généralement associés avec de descripteurs comme « croûte de pain », « popcorn rassis » et « pipi de souris ».

Le seuil olfactif pour les 2-acétyl-tétrahydropyridines est d'approximativement 1.6 ng/L ! En outre, le Dr. Paul Henschke et ses collaborateurs ont démontré que toutes les espèces de *Brettanomyces* et de *Dekkera* testées peuvent produire des goûts de souris, ainsi que les acétyl-tétrahydropyridines.

Que réserve le futur aux Brett ?

Au cours des 5 prochaines années, une méthode de détection moléculaire sera mise au point et fournira des résultats d'énumération en un jour. Notre laboratoire continue à développer des méthodes dans ce but précis. Actuellement un travail est en cours sur des sondes de séquences génétiques de *Brettanomyces bruxellensis* ayant une spécificité attendue de 100% . La détection de n'importe quel organisme est problématique avec les méthodologies d'ADN. L'un des problèmes est que l'ADN est relativement stable (tout comme certains types d'ARN). Si des molécules de *Brettanomyces bruxellensis* sont détectées et aucune cellule viable n'est en train de transformer votre vin activement, alors c'est un résultat positif erroné que vous obtenez. Il signifierait que la levure Brett est présente et qu'elle est en train d'altérer le caractère fruité de votre vin, alors qu'en fait, pas du tout.

Les technologies d'ADN sont tellement sensibles que l'obtention de résultats positifs erronés est un véritable casse-tête pour les développeurs de méthodes de détection moléculaire. D'un autre côté, les méthodes traditionnelles de mise en culture peuvent conduire à des résultats négatifs erronés tout aussi simplement (ex : des Brett qui ne sont pas en période de croissance ne créent pas de colonies sur boîte mais elles métabolisent les acides cinnamiques)

Et qui va payer la facture ? Voilà un autre sujet d'importance. Lorsqu'on considère qu'une barrique de vin peut valoir 4000\$ ou plus, un test bimensuel de 50\$ pour détecter et dénombrer les Brettanomyces avant que les problèmes de mauvais goûts et odeurs n'apparaissent, semble en valoir largement la peine. Le coût de l'équipement est élevé au départ, mais la détection des Brett dans les barriques avant que le seuil sensoriel ne soit atteint grâce à des méthodes chimiques et moléculaires équilibrera la balance en seulement quelques années ! Renseignez vous prochainement sur ces services auprès des laboratoires œnologiques.

L'industrie viti-vinicole a été lente à adopter les méthodes de détection et de caractérisation moléculaires. Les producteurs de vin ne les avaient pas adoptées parce que les microbes qui survivent dans le vin ne sont pas pathogènes. L'industrie agro-alimentaire a payé la majeure partie des dépenses pour en développer les protocoles et les équipements standard. Une opportunité en or se présente à nous aujourd'hui : utiliser ces méthodes en parvenant à dépasser notre inhibition culturelle et la limitation des coûts dans le vin qui empêchent leur utilisation quotidienne.

Nous pensons enfin que quelqu'un devrait observer dans des tubes à essai les enzymes responsables de la conversion de précurseurs en odeurs déplaisantes. Que se passe-t-il réellement quand les cellules de levure Brettanomyces bruxellensis se déchirent et libèrent leur contenu dans le vin ? Est-ce que les enzymes qui étaient auparavant contenues dans la cellule continuent ensuite à altérer le vin ? Combien de temps cela dure t'il ?

Conclusion: C'est la perception qui fait tout

Plusieurs œnologues ont émis des théories quant à savoir pourquoi des réactions se produisent dans un vin contaminé par Brett. D'autres ont proposé des solutions qui prendraient longtemps à être mises en œuvre pour la gestion de Brett dans la cave. Parmi tous ces sujets de controverse on trouve l'utilisation de stérilisants commerciaux pour boissons et de la flash pasteurisation.

Le but des sujets traités dans cet article est d'accroître les connaissances générales sur Brettanomyces et de passer en revue les documents qui existent à ce jour au sujet des problèmes d'ordre général associés avec les contaminations par Brettanomyces dans les caves. Les Brettanomyces sont encore un sujet tout chaud si on le compare à d'autres problèmes de viticulture et à l'aspect économique du fonctionnement d'une cave. Alors où se trouvent les financements pour la recherche ?

Une partie de la filière a décidé de s'écarter complètement du problème et a proclamé une relation symbiotique naturelle entre le bon vin et les Brett.

Certaines personnes avec lesquelles nous nous sommes entretenues au sujet des « bons Brett » croient qu'il s'agit en fait d'une excuse pour produire des vins avec des défauts. Car si un vin a été produit dans des conditions qui promouvaient une bonne souche spécifique de Brettanomyces bruxellensis, n'importe quelle autre « mauvaise » souche pourrait s'immiscer et lui faire concurrence. Alors où peut-on vraiment avoir un sentiment de contrôle sur la production ? Peut-être dans la sélection des souches et dans une filtration sélective.

Un acheteur de vin nous a dit qu'il était déçu par les producteurs et les écrivains du vin qui promeuvent le « caractère Brett » dans le vin. Il croyait jusqu'à présent que l'époque où l'on produisait ce qu'il qualifie de « vin sale » était révolue. Nous avons encore quelques belles années de recherche devant nous avant que nous puissions affirmer que l'effet Brett peut être contrôlable. Il semble que l'industrie viti-vinicole a sélectionné Brett ainsi que d'autres organismes spécifiques en se basant sur leurs capacités à s'imposer sur de petites niches. S'il était possible d'avoir ce type de contrôle microbiologique dans un système biologique dynamique, nous estimons que les œnologues accueilleront les discussions sur le sujet les bras ouverts. D'ici là, nous pensons que la levure Brettanomyces continuera d'être au cœur des débats sur le financement pour la recherche. C'est la raison pour laquelle les caves mènent leurs propres recherches pour découvrir le comportement de Brettanomyces bruxellensis.

Nous construisons une base de données de caractéristiques et de marqueurs moléculaires afin que lorsque quelqu'un découvre un sous-type spécifique de *B. bruxellensis* produisant uniquement des attributs positifs dans le vin rouge, nous puissions avoir des informations à son sujet. La chose la plus importante que nous ayons apprise en travaillant sur les Brett, c'est qu'il faut toujours garder à l'esprit la perception du consommateur.

Il y a quelques années, une bouteille de vin rouge a été achetée en Californie uniquement pour être ramenée au laboratoire et mettre en culture *Brettanomyces bruxellensis*. La « puanteur » était forte avec cette souche là. On pouvait à peine mettre le vin à la bouche ! Nous avons vu des vins similaires en France qui avaient plus de 5 ans d'âge et qui produisaient des odeurs bien pires, mais il s'agissait là du caractère « français » le plus marqué que nous n'ayons jamais vu dans un vin californien ou de New York.

Je n'ai pu en acheter qu'une bouteille (\$25) et ne pouvais justifier une telle dépense pour le cas d'un vin avec des défauts aussi marqués pour le ramener et l'étudier pendant l'un de mes cours, mais maintenant, je le regrette. La leçon qu'il nous enseigne est importante. Les notes de dégustation des œnologues ont montré qu'il s'agissait là de la meilleure représentation qu'ils se faisaient d'un assemblage de Bordeaux. Ils ont proclamé son arrivée juste à temps pour le passage à l'an 2000. Récemment la cave productrice a vendu sa dernière bouteille pour bien plus de 25\$.

A l'inverse, des vins ont été envoyés pour analyse à notre laboratoire. Ils présentaient « quelques » arômes Brett probablement en accord avec des caractéristiques spécifiques régionales et avaient été apparemment rejetés par des acheteurs de vins à cause de leur caractère Brett. Le coût du rejet d'un vin à cause de son caractère Brett trop marqué n'est pas seulement nuisible aux marges de la cave mais à sa réputation aussi.

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier le Dr. Ralph Kunkee et le Dr. Paul A. Henschke pour leurs critiques sérieuses et perspicaces sur ce travail. Nous remercions également le Dr. Jonathan Licker pour sa recherche en profondeur sur les aspects historiques de ces problèmes. Enfin, nous remercions le Dr. Carl Shively pour ses commentaires sur ce sujet important.

Bibliographie

1. Licker, J. L., "The sensory analysis and Gas Chromatography-Olfactometry (GCO) of wines with 'Brett' flavor." Master's Thesis. Cornell University Department of Food Science and Technology. May, 1998.
2. Clausen, N. H., "On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers." *Journal of the Institute of Brewing*. 1904, 10, 308-331.
3. Herderich, M.; Costello, P.J.; Grbin, P.R.; Henschke, P.A. "Occurrence of 2-acetyl-1-pyrroline in mousy wines." *Nat. Prod. Let.* 7: 129-132; 1995.
4. Kurtzman, C. P. and J. W. Fell (Eds.), "The Yeasts: a taxonomic study" 4th Edition. 1998. Elsevier Press, Amsterdam, The Netherlands.
5. Dickinson-J-Richard. "Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeast." *Microbiology (Reading)* 142 (6). 1996. 1391-1397.
6. Boekhout, T., C. P. Kurtzman, K. O'Donnell and M. T. Smith, "Phylogeny of the Yeast Genera *Hanseniaspora* (Anamorph *Kloeckera*), *Dekkera* (Anamorph *Brettanomyces*, and *Eeniella* as Inferred from Partial 26S Ribosomal DNA Nucleotide Sequences." *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994, 44 (4) p. 781-786
7. Kunkee, R., Personal communication in review of this manuscript. 2001
8. Millet-V. Lonvaud-Funel-A., "The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage." *Letters in Applied Microbiology*. 30 (2). Feb. 2000. 136-141.
9. Egli C.M., Henick-Kling, T. "Identification of *Brettanomyces*/*Dekkera* species based on polymorphism in the RNA internal transcribed spacer region." *Am. J. Enol. & Vitic.* (accepted 5/2001)
10. Mitrakul C.M., Henick-Kling, T, Egli C.M. "Discrimination of *Brettanomyces*/*Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods." *Food Microbiol.* 16:3-14; 1999.
11. Wright, J. M., and Parle, J. N. "Brettanomyces in the New Zealand wine industry." *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1974, 17, 273-278.
12. Arvik, T. "Brett 101: Overview of *Brettanomyces*, its Occurrence, Growth and Effect on Wine Flavors." Presentation: Vinquiry's MegaBrett Symposium. Santa Rosa, CA. June 6, 2001.
13. Heresztyn, T. "Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast." *Archives of Microbiology* 1986, 146, p.96-98.
14. Heresztyn, T. "Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines." *Am. J. of Enol. & Vitic.* 1986, 37, p. 127-132.

15. Custers, M. T. J. "Onderzoekingen over het Gistseglacht Brettanomyces." Thesis, Delft University, 1940.
16. Freer-S-N., Dien-B-S., Matsuda-S., and Bothast-R-J. "Acetic acid production by Brettanomyces yeast." Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology. 100. 2000. Abstract number 503.
17. Chatonnet, P., D. Dubourdieu and J. N. Boidron "The influence of Brettanomyces/Dekkera sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines." Am. J. of Enol. & Vitic. 1995, 46, p. 463-468.
18. Cox, D. J. "Studies on the energetics and growth benefit of malolactic fermentation in lactic acid bacteria." Ph.D. Dissertation, Cornell University, 1991.
19. Cavin, J. F., V. Andioc, P. X. Etiévant, and C. Divies "Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids." Am. J. of Enol. & Vitic. 1993, 44, p. 76-80.
20. Cox, Donald J., and Henick-Kling, Thomas. "Proton-motive force and ATP generation during malolactic fermentation." Am. J. of Enol. & Vitic. 46 (3). 1995, p.319-323
21. Lawless, H. T. and Heymann, H. "Sensory Evaluation of Food;" Chapman & Hall: New York, 1998.
22. Stender, Henrik, Kurtzman, Cletus. Hyldig-Nielsen-Jens-J. Sorensen-Ditte. Broome-Adam. Oliveira-Kenneth. Perry-O'Keefe-Heather. Sage-Andrew. Young-Barbara. Coull-James. "Identification of Dekkera bruxellensis (Brettanomyces) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes." Applied and Environmental Microbiology. 67 (2). February, 2001 p. 938-941
23. Pollnitz, A.P.; Pardon, K.H.; Sefton, M.A. "4-Ethylphenol, 4-ethylguaiacol and oak lactones in Australian red wines." Aust. Grapegrower & Winemaker (438): 45-52; 2000
24. Grbin, P.R.; and Henschke, P.A. "Mousy off-flavor production in grape juice and wine by Dekkera and Brettanomyces yeasts." Aust. J. Grape Wine Res. 6: 255-262; 2000.
25. Boulton, R. B., V. Singleton, L.F. Bisson and R. Kunkee. Principles and Practices of Winemaking. 1996. Chapman & Hall Publishers New York, NY.