



Maîtrise des bactéries indigènes par pied de cuve pour fiabiliser la fermentation malolactique des vins biologiques

> Édition 2022





édito

Pierrick LAVAU

Vigneron Bio à Saint Etienne de Lisse
Président de la Commission Technique de Vignerons Bio
Nouvelle-Aquitaine

Mes chers collègues,

En tant que vigneron, nous avons à cœur de comprendre les processus de transformation de notre vin pour l'accompagner jusqu'au meilleur de son potentiel. Ces dernières années, de nombreux collègues ont rencontré des difficultés à amorcer ou terminer des fermentations malolactiques en fermentation indigène. La Commission technique a donc souhaité travailler sur la question afin de proposer des solutions pour cette étape, tout en s'appuyant sur la flore naturellement présente.

Cette plaquette présente les résultats du programme Pied de cuve Malo Bio mené par Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine, l'IFV et l'ISVV avec notamment un protocole de pied de cuve bactérien pouvant apporter des réponses.

Bonne lecture !

AVEC LE SOUTIEN FINANCIER DE :





Les partenaires



Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine est un syndicat professionnel créé en 1995 par des vignerons Bio, pour des vignerons Bio. En 2021, **Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine représentait les intérêts de plus de 300 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**. Cet organisme qualifié 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, le développement du biocontrôle et les bonnes pratiques de pulvérisation,
- la microbiologie appliquée à l'œnologie,
- la maîtrise des résidus dans les vins,
- la maîtrise et la diminution des intrants œnologiques,
- l'étude des procédés et matériels innovants.

Le pôle IFV du Val de Loire mène divers travaux sur différents sujets :

- matériel végétal : conservation, création, sélection et diffusion,
- diminution des intrants : biocontrôle, bioprotection, vins sans sulfites,
- agronomie viticole : gestion des sols, changement climatique, cartographie,
- microbiologie : diversité des micro-organismes, caractérisation et sélection, conservation au sein du CRB (Centre de Ressources Biologiques).

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 l'INRAE à Villenave d'Ornon, **l'ensemble des équipes de la 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, l'Union Européenne (FEDER), l'Etat, le Conseil Général de la Gironde, Bordeaux Métropole, l'INRAE et le 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.

Dans le cadre de ce projet, l'Unité Mixte de Recherche Œnologie (UMR 1366 OENO) de l'ISVV est impliquée. **L'UMR OENO réalise des travaux de recherche finalisée au service de la filière vitivinicole, impliquant à la fois l'acquisition de connaissances fondamentales et le développement de savoir-faire et d'innovations. Elle a 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.

« 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'expérimentation.

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.
- Les sujets des projets de recherche sont décidés dans le cadre de la Commission technique.

« 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 !

Exemple : Volonté de réaliser des fermentations malolactiques indigènes spontanées, mais échec de lancement sur certains lots

=> Mise en place d'un protocole solutionnant le blocage et identification des souches de bactéries récalcitrantes à la malo.

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

Exemple : intéressé par les vins sans sulfites, hésitation à se lancer seul

=> Possibilité de tester différents protocoles de vinification et que le vin soit dégusté par des professionnels, ce qui permet d'orienter les choix d'itinéraire produit.

Être au courant des dernières innovations et résultats de recherche

Exemple : Souhait de diminuer l'emploi de sulfites, intéressé par l'utilisation de levures non-Saccharomyces en bioprotection pré fermentaire.

=> Possibilité de suivre différentes modalités en exploitation et en micro-vinification à l'IFV, participer aux dégustations et permettre de choisir si cela est adapté à ses besoins.

REJOIGNEZ NOTRE POOL DE VIGNERONS EXPÉRIMENTATEURS !

« Qu'est-ce qu'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 ! Nos experts seront sur le terrain durant toute la période des tests, à votre disposition pour répondre à vos questions, prélever les échantillons et les résultats d'analyse. Ils s'adapteront à vos contraintes mais pensez à rester joignable !

SI CELA VOUS INTÉRESSE, CONTACTEZ-NOUS !

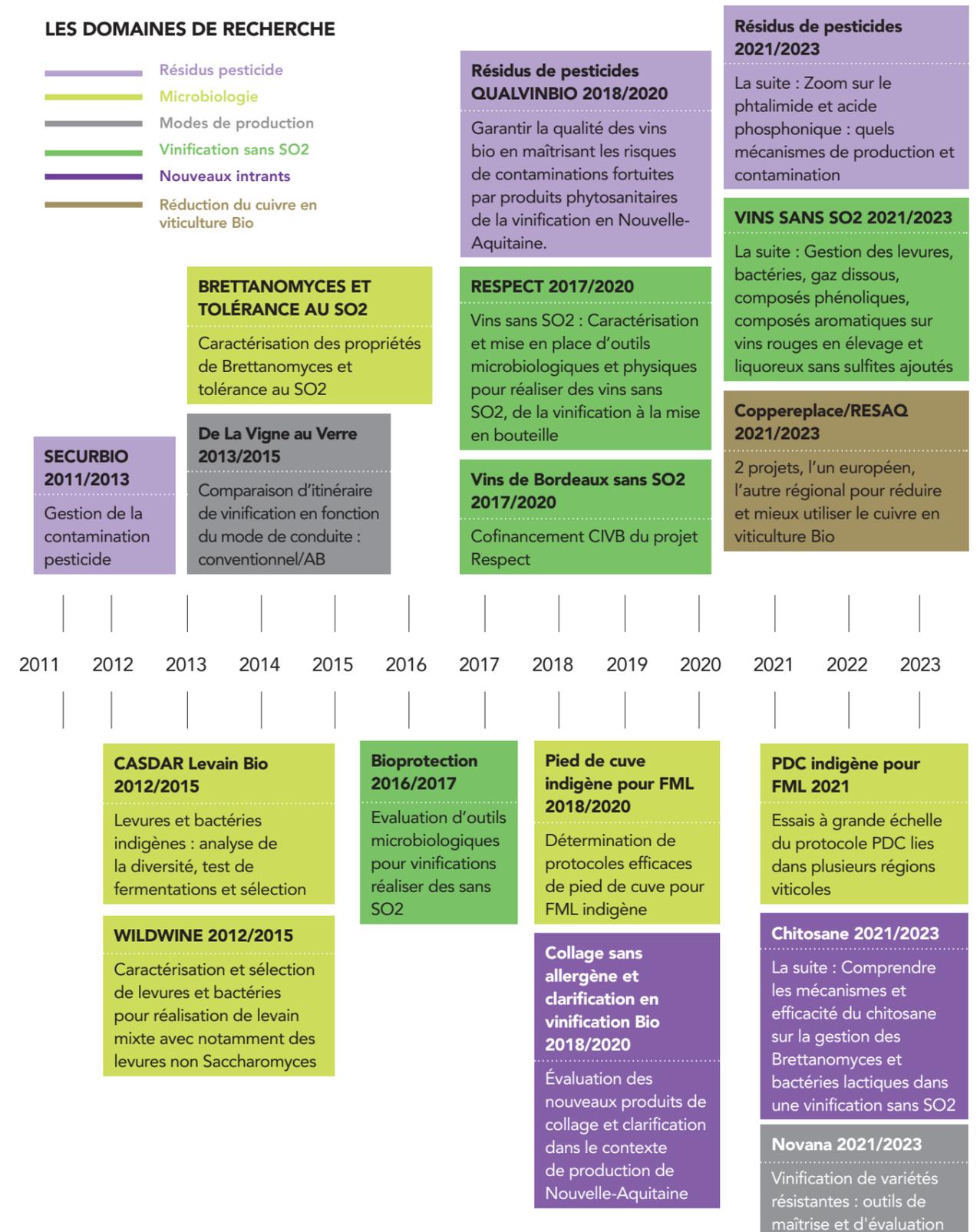
Stéphane BECQUET
conseil@vigneronsbionouvelleaquitaine.fr
06 32 68 88 80

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

- Résidu pesticide
- Microbiologie
- Modes de production
- Vinification sans SO2
- Nouveaux intrants
- Réduction du cuivre en viticulture Bio





Maîtrise des bactéries indigènes
par pied de cuve pour fiabiliser
la fermentation malolactique
des vins biologiques

Édition 2022

Sommaire

I. LA FERMENTATION MALOLACTIQUE, UNE ÉTAPE CLÉ PAS TOUJOURS FACILE À MAÎTRISER	11
II. L'INTÉRÊT DU PIED DE CUVE BACTÉRIEN	12
État des connaissances sur le sujet	12
Le projet "Pied de cuve Malo Bio"	14
III. LES RÉSULTATS DU PROJET "PIED DE CUVE MALO BIO"	14
Essais préalables en laboratoire : principaux résultats obtenus en recherche fondamentale, par l'ISVV	14
Les différents protocoles de pied de cuve testés en chai expérimental et en propriété	16
Principaux résultats obtenus en caves expérimentales, par l'IFV	18
Principaux résultats obtenus en propriétés, par Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine .	20
Synthèse des résultats obtenus	22
Le protocole de pied de cuve bactérien retenu	26
IV. LES PREMIERS RETOURS À GRANDE ÉCHELLE : TROIS CAS DE FIGURE	28
Cas 1 : Des dysfonctionnements dans la réalisation du pied de cuve	31
Cas 2 : La fermentation malolactique s'est aussi bien déroulée en indigène ou avec l'aide du pied de cuve	31
Cas 3 : Le pied de cuve a apporté une sécurisation de la fermentation malolactique par rapport à une FML indigène spontanée	32
Ce que l'on retient des essais grandeur réelle	36
CONCLUSION	33
POUR ALLER PLUS LOIN	34

I. LA FERMENTATION MALOLACTIQUE, UNE ÉTAPE CLÉ PAS TOUJOURS FACILE À MAÎTRISER

La fermentation malolactique (FML) est une étape indispensable de la vinification des vins rouges et de nombreux vins blancs. La principale transformation de la FML est la conversion de l'acide malique en acide lactique et dioxyde de carbone. L'acide malique est présent à des teneurs de quelques grammes par litre dans les moûts de raisin. Il a un goût acide prononcé qui confère de la « dureté » au vin. Sa conversion en acide lactique, plus doux, contribue fortement à l'assouplissement du vin.

La FML est réalisée par les bactéries lactiques (BL), et presque toujours par l'espèce *Enococcus oeni*, qui est la mieux adaptée aux vins, grâce à sa très bonne résistance à l'acidité et à l'éthanol. Il faut atteindre une population d'O.œni de 10E⁶ cellules/mL pour que la diminution de la teneur en acide malique soit significative.

Le développement des bactéries lactiques est influencé par 4 facteurs bien connus, liés les uns aux autres : la température, le pH, le titre alcoométrique volumique (TAV) et la teneur en sulfites. Ils pourront avoir une influence pour favoriser ou non le déclenchement et la durée de la FML. Par exemple, elle sera plus difficile dans les vins à faible pH, à TAV important et en présence de sulfites, mais peut être facilitée par ajustement de la température autour de 20°C.

Pour que les fermentations malolactiques se déroulent dans de bonnes conditions, il est également important de récolter de la vendange saine avec des paramètres technologiques et phénoliques acceptables. La date de vendange reste une étape clé de décision : vouloir pousser les maturités pas assez, ou trop loin peut avoir des conséquences importantes sur la fermentation malolactique. Or une mauvaise FML peut ruiner les efforts réalisés par le vigneron pour produire le meilleur vin possible. Il faut donc tenir compte de ce paramètre lors de la prise de décision du déclenchement des vendanges. L'hygiène au chai est également un élément essentiel pour limiter les déviations microbiologiques.

Le bon respect de ces principes de base est primordial mais parfois ne suffit pas et la fermentation malolactique est plus souvent subie que maîtrisée. Après la fermenta-

”
" Il faut atteindre une population d'O.œni de 10E⁶ cellules/mL pour que la diminution de la teneur en acide malique soit significative. "

tion alcoolique, les bactéries lactiques indigènes sont plus ou moins présentes et actives selon les types de vins, les vinifications, ou les millésimes. Dans ces conditions, le déclenchement et la durée de la FML sont imprévisibles, ce qui peut poser des difficultés de production (non- déclenchement ou déclenchement tardif) et nuire à la qualité du vin (développement de microorganismes indésirables comme *Brettanomyces bruxellensis*, montée d'acidité volatile, perte aromatique...).

Aujourd'hui, l'utilisation de bactéries lactiques commerciales est possible pour maîtriser la FML. Ces bactéries sont sélectionnées pour leurs bonnes aptitudes fermentaires, produites industriellement et introduites dans le vin au moment choisi pour lancer la FML. Néanmoins, la majorité des vignerons ne les utilisent pas ou seulement en cas de difficulté majeure. Ce choix peut être lié au coût des préparations commerciales (entre 0,90 et 3,60€/hL¹), au souhait de limiter les intrants œnologiques, ou à un vrai désir d'utiliser les bactéries indigènes, comme on l'observe souvent chez les vignerons Bio. Seuls 7% des vignerons en Bio ont utilisé des bactéries lactiques commerciales en 2020².

Il est donc indispensable de développer des alternatives à l'usage des bactéries commerciales pour maîtriser la FML.

PETIT LEXIQUE



En systématique microbiologique, un genre rassemble une ou plusieurs espèces, qui rassemblent chacune une ou plusieurs souches.

Exemple : *Oenococcus* (= genre)
oeni (=espèce).

1. <https://www.vignevin-occitanie.com/fiches-pratiques/la-maitrise-de-la-fermentation-malolactique-ou-fml/>

2. ITAB, Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine (2021) Enquête sur les pratiques œnologiques des vignerons Bio en France ; Millésime 2020

II. L'INTÉRÊT DU PIED DE CUVE BACTÉRIEN

Un pied de cuve bactérien, sert à développer la population de bactéries lactiques, dans un milieu de moût qui peut être dilué, puis de l'incorporer dans le vin afin de favoriser le déclenchement de la fermentation malolactique.

ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE SUJET

Les références bibliographiques montrent que la réalisation de pieds de cuve bactériens est une approche bien connue pour maîtriser l'étape de la fermentation malolactique.

Par exemple, lors de la vinification des vins de Champagne³, plusieurs protocoles existent comme :

- le blocage par le froid (-2°C) d'une cuve ayant réalisé rapidement sa FML et sa conservation jusqu'au millésime suivant pour servir d'inoculum⁴,
- la réalisation de pieds de cuve basée sur la multiplication et l'acclimatation de bactéries du commerce⁵.
- L'OIV propose également un protocole de pied de cuve pour réaliser la FML dans les vins très acides⁶.

Il est vrai que la microbiologie en vinification reste un sujet très complexe, il est difficile pour le vinificateur de savoir quelle(s) souche(s) de levures ou bactéries est en train de fermenter ! Sans analyse, aucune certitude que ce soit les mêmes souches qui agissent chaque année ou que les bactéries commerciales apportées soient bien celles qui « font le job ».

Le projet européen Wildwine (2012-2015), a permis de mieux connaître la nature et le comportement des bactéries lactiques présentes lors de la FML. Une analyse de la biodiversité des espèces a montré qu'il s'agissait à 95% d'*Oenococcus oeni* (alors que pour les levures, l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* n'est présente qu'à 75%).

De plus, il n'existe pas de spécificité génétique par régions viticoles : on peut retrouver les mêmes souches de bactéries lactiques en Val de Loire ou en Bordelais par exemple. En revanche, les souches de bactéries lactiques sont génétiquement adaptées à certains produits. Par exemple, les souches présentes dans le

« Des lies de FML du millésime précédent, après une année de conservation au froid, sont capables de relancer les FML du nouveau millésime. »

cidre et les souches présentes dans le vin appartiennent à deux familles génétiques bien distinctes. Les analyses génomiques montrent même des « sous-familles » : il existe deux sous-familles différentes entre les vins rouges et les vins blancs de Bourgogne. On peut réellement parler de souches spécifiques de bactéries lactiques pour ces produits⁷.

En parallèle, le projet Casdar « Levains bio » (2012-2015), a permis d'avancer sur le développement de protocoles de pied de cuve. Ce projet a commencé à évaluer des solutions pratiques permettant de réaliser des FML avec bactéries indigènes et avec le même niveau de maîtrise qu'avec des bactéries commerciales.

Une première approche a consisté à sélectionner et micro-produire des bactéries de cru. Cependant, il est apparu que les coûts de production à l'échelle d'une exploitation étaient prohibitifs et ne permettaient pas d'envisager un ensemencement de la totalité de la cuverie, comme cela peut être fait avec des bactéries du commerce. Pour remédier à ce problème, il a été envisagé que les bactéries sélectionnées soient multipliées au chai en réalisant un pied de cuve.

Une deuxième approche a consisté à utiliser des lies de FML du millésime précédent, qui, après une année de conservation au froid, sont capables de relancer les FML du nouveau millésime. L'étude de la température de conservation des lies montre que les bactéries survivent mieux à une température positive plutôt qu'en congélation, l'idéal étant autour de 4°C à 10°C (Figure 1).

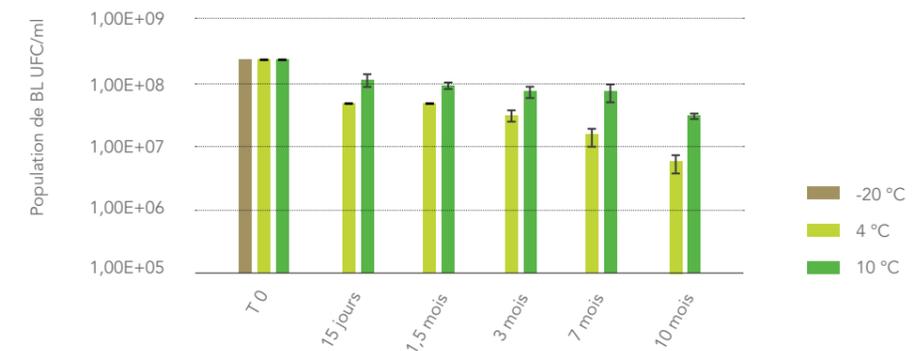


Figure 1 : Évolution de population bactérienne dans les lies conservées à différentes températures en fonction du temps⁸

De plus, des évolutions ont été constatées au cours de la conservation, certaines souches disparaissent alors que d'autres se multiplient. On observe une disparition progressive des souches majoritaires avec apparition de nouvelles souches (Figure 2).

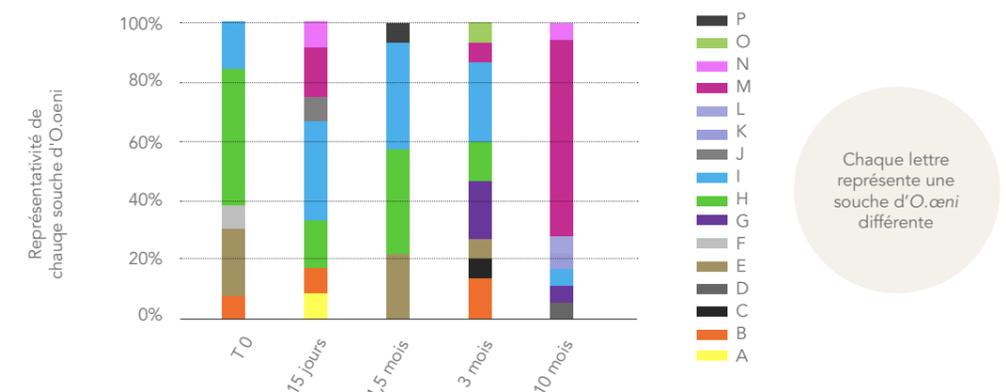


Figure 2 : Évolution des souches de bactéries lactiques en présence en fonction de la durée de conservation⁸

Les vins ensemencés à partir de ces lies conservées au froid ont réalisé des fermentations malolactiques franches et rapides en milieux contrôlés. Lors de ce projet, il a été plus difficile de conclure sur les essais terrain car la flore spontanée très active prenait rapidement le dessus. De plus, les essais se sont tenus lors de millésimes peu problématiques.

Enfin, la troisième approche envisagée, consistait à utiliser des terres de filtration ou des rétentats de microfiltration tangentielle d'un vin du millésime, ayant déjà réalisé la FML. Cette solution n'ayant pas été jugée reproductible sur le terrain par les vignerons, elle n'a pas été reconduite.

Au niveau du laboratoire, la plupart des objectifs ont été atteints : mise au point des protocoles de sélection et de conservation de souches sélectionnées à l'exploitation, protocole de conservation des lies, suivi des populations bactériennes au cours de la conservation, protocoles de contrôle microbiologique des lies et terres de filtration avant utilisation. Néanmoins, de nombreuses questions se posaient alors encore : des essais en cuveries expérimentales et en exploitations restaient à mener. Le projet « Pied de cuve Malo Bio », a donc été lancé pour finaliser et valider ces protocoles de pieds de cuve bactériens et mettre cette pratique à la portée de tous les vignerons et types de vinification.

3. Duteurtre B., (2010). Le champagne : de la tradition à la science. Ed Tec & Doc. Paris, 347p.

4. Parenthoën A., (1981). Techniques d'ensemencement de bactéries lactiques. Rev. Fr. Oenol. 124 : 5-12

5. Laurent M., Valade M., Landrieux A. and Moncomble D., (2009). Faire la fermentation malolactique sans chauffage. Le vigneron champenois. 6 : 34-53.

6. Résolution OIV-OENO 494-2012. Lactic acid bacteria. 2009. Révision 2012. International OENOlogical Codex.

7. Lorentzen MPG, Lucas PM (2019) Distribution of *Oenococcus oeni* populations in natural habitats. Appl Microbiol Biotechnol 103: 2937-2945

8. Mariette El Khoury. Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinielles. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2014.

LE PROJET "PIED DE CUVE MALO BIO"

Mené par l'Institut Français de la Vigne et du Vin, l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin et Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine, le programme « Pied de cuve Malo Bio », soutenu par la Région Nouvelle Aquitaine de 2018 à 2020, s'intéresse à la mise en place de pied de cuve bactérien dans le cas de fermentation malolactique indigène.

Dans la majorité des cas, elle se déroule très bien et ne nécessite pas d'intervention. Cependant, lors des derniers millésimes, un certain nombre d'exploitations ont connu des problèmes croissants de réalisation de la fermentation malolactique. Les millésimes secs ont apporté des conditions extrêmes pour les populations bactériennes avec des degrés alcooliques élevés et des teneurs en acide malique très faibles dus à des effets sécheresse et/ou maturités très poussées.

S'ajoutent à cela les cas suivants, pour lesquels une attention particulière est à apporter ainsi que la mise en place de moyens techniques :

- cas de démarrages tardifs ou de non déclenchement de la fermentation malolactique récurrents.
- cas de co-inoculation en indigène.
- cas de sites souhaitant sécuriser le lancement de la fermentation malolactique sans avoir recourt à des bactéries commerciales (vins sans SO₂, mise en bouteille précoce).

L'utilisation d'un pied de cuve est une possibilité intéressante dans les cas pré-cités : tout en mettant en œuvre la flore indigène, il permet de sécuriser la fermentation malolactique par rapport à une fermentation spontanée. Ce projet est conçu pour apporter des outils de maîtrise de cette fermentation indigène en proposant un protocole de pied de cuve permettant d'atteindre le même niveau de sécurité qu'avec l'utilisation de levains sélectionnés (souches commerciales). Les préconisations finales peuvent s'adresser à l'ensemble des producteurs ne souhaitant pas utiliser de bactéries commerciales en s'adaptant au plus près des conditions terrain (objectif qualitatif, coût et praticité).

Répartis entre les 3 partenaires, les essais mis en œuvre s'intéressent au développement de protocoles de pied de cuve en s'appuyant sur les souches de bactéries indigènes de l'année N-1 :

Ces protocoles ont été testés à 3 échelles différentes :

- en laboratoire (pilotage ISVV),
- puis testés en conditions maîtrisées (pilotage IFV)
- et enfin mis en place en conditions terrain, sur site (pilotage Vignerons Bio Nouvelle Aquitaine).

III. LES RÉSULTATS DU PROJET "PIED DE CUVE MALO BIO"

ESSAIS PRÉALABLES EN LABORATOIRE : PRINCIPAUX RÉSULTATS OBTENUS EN RECHERCHE FONDAMENTALE, PAR L'ISVV

La naissance de l'idée

Les précédents travaux ont montré une bonne conservation des souches d'*Enococcus oeni* dans les lies conservées à 4°C d'une année sur l'autre. L'idée d'utiliser ces souches pour réaliser un pied de cuve s'est donc rapidement imposée. Par ailleurs, les souches d'*Enococcus oeni* cultivées en laboratoire montraient parfois des difficultés à se développer dans un vin fin FA.

Ainsi, le laboratoire a testé le fait d'inoculer les lies conservées dans un moût et de réaliser la FA afin que les souches d'*Enococcus oeni* s'acclimatent progressivement à la quantité d'alcool croissante, comme cela se produit lors des FML spontanées.

Différents essais ont été menés afin de déterminer les conditions optimales de réalisation d'un tel pied de cuve en prenant en compte les contraintes techniques des vinificateurs :

- capacité de stocker le volume de lies nécessaire pendant un an,
- température de réalisation du pied de cuve compatible avec celles du chai,
- facilité de mise en œuvre.

Développement des bactéries lactiques dans le pied de cuve

Plusieurs modalités ont donc été testées :

- Utilisation de moût pur ou dilué au 1/2 dans de l'eau,
- Pied de cuve inoculé en LSA ou non,
- Ajout de 1% ou 10% de lies,
- Réalisation du pied de cuve à 20°C ou 25°C.

Toutes ces conditions ont été croisées et réalisées en duplicata dans un moût naturel et dans un jus de raisin bio pasteurisé.

Le suivi des FA a été réalisé par pesée quotidienne et les niveaux de population en *Enococcus oeni* ont été mesurés par dénombrement sur boîte de Petri à 0 ; 4 ; 8 et 14 jours. Les résultats obtenus dans le moût sont présentés ci-après, ceux obtenus dans le jus de raisin étant totalement comparables. Toutes les modalités testées ont réalisé correctement la FA avec un léger retard pour le moût 1/2 à 20°C.

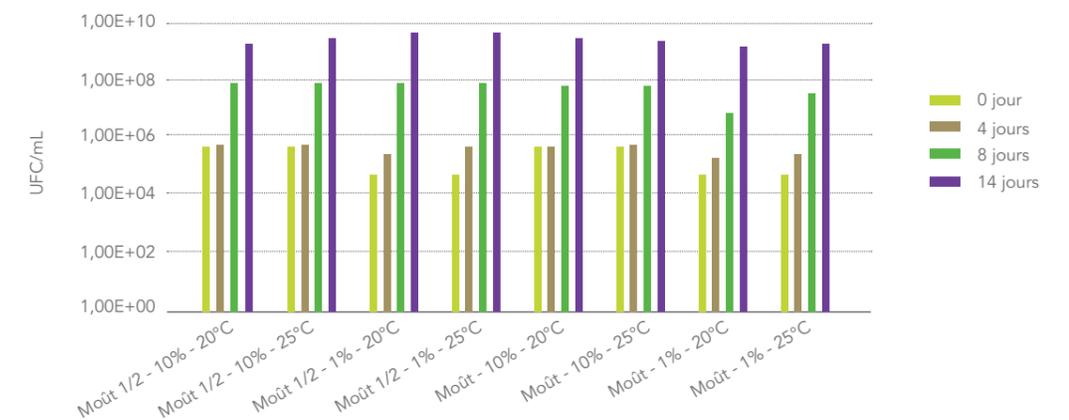


Figure 3 : Suivi des niveaux de population en *Enococcus oeni* dans les pieds de cuve testés au cours du temps

À l'issue de ces essais, les quantités de BL obtenues dans les pieds de cuve à 14 jours sont comparables quel que soit le moût utilisé (pur ou 1/2), le pourcentage de lies ajouté (1% ou 10%) et la température d'incubation (20°C ou 25°C). A 14 jours, tous les flacons ont été sentis. Aucun ne présentait de défaut olfactif marqué.

Pour plus de praticité pour les vinificateurs, les conditions retenues ont été :

- 1% de lies : ce volume de lies à conserver à 4°C est le plus faible et donc le plus réaliste.
- Température d'incubation de 20°C : plus facile à mettre en œuvre sur le terrain en évitant le chauffage du pied de cuve.

Concernant le moût, il a été décidé de conserver les 2 modalités (moût pur et moût dilué au demi) jusqu'à l'incorporation du pied de cuve pour réalisation de la FML.

Réalisation de la FML avec utilisation du pied de cuve

Deux pieds de cuve ont été réalisés :

- Moût pur + 1% de lies année N-1 à 20°C
- Moût dilué 1/2 + 1% de lies année N-1 à 20°C

Les deux pieds de cuve ont réalisé sans problème la FA. Les dénombrements de bactéries lactiques dans les pieds de cuve fin FA sont les suivants :

	Population BL fin FA (UFC/mL)
Moût pur + 1% de lies Année N-1 à 20°C	2,07E+07
Moût 1/2 + 1% de lies Année N-1 à 20°C	8,50E+08

Tableau 1 : Dénombrements de bactéries lactiques fin FA par pied de cuve

Chaque pied de cuve a été incorporé dans le vin fin FA correspondant au moût à 3 concentrations différentes : 0,1 %, 1% ou 10% vol/vol du pied de cuve. Ces essais ont été réalisés en duplicata. La FML a été suivie par dosage de l'acide malique.

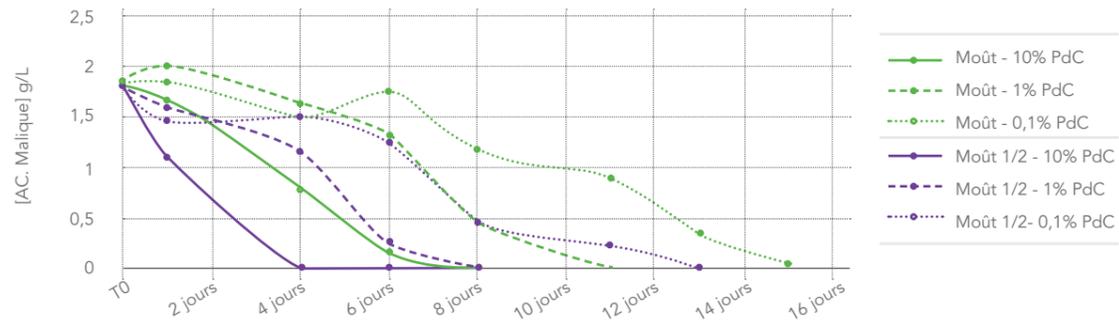


Figure 4 : Suivi de la fermentation malolactique par pied de cuve

Le pied de cuve en moût ½ a réalisé la FML plus rapidement que celui en moût pur pour les trois niveaux d'ajout testés. Dans toutes les conditions, la FML s'est déroulée sans encombre et assez logiquement, la réalisation est d'autant plus rapide que la quantité de pied de cuve incorporée est importante. À l'issue de ces essais, différentes modalités ont été testées en chai expérimental et en propriété afin de conforter les résultats encourageants obtenus en laboratoire.

LES DIFFÉRENTS PROTOCOLES DE PIED DE CUVE TESTÉS EN CHAI EXPÉRIMENTAL ET EN PROPRIÉTÉ

À partir des essais en laboratoire, plusieurs protocoles de pied de cuve ont été testés en chai expérimental et en propriété, sur deux années.

La propriété sélectionnée présentait un problème récurrent de déclenchement de fermentation malolactique sur le vin issu d'une parcelle identifiée.

Plusieurs facteurs ont été testés au sein des protocoles de pied de cuve :

- **la matière première** : le pied de cuve a été réalisé soit à base de moût à ensemercer, soit à base de jus de raisin pasteurisé,
- **le contenu** : le pied de cuve a reçu soit des lies fin FML indigène de l'année précédente (n- 1), soit une préparation de souches de bactéries lactiques sélectionnées au sein de l'exploitation. Cet apport ne varie pas et représente toujours 1% du volume du pied de cuve,
- **le dosage** : le pied de cuve a pu être apporté à hauteur de 1% du volume de vin à ensemercer, ou à 0,1 %,
- **la technique** : l'apport de pieds de cuve a été comparé à l'apport direct de lies N-1 dans le vin fin FA à ensemercer, ou l'apport de vin d'un autre lot en cours de FML.

Voici le récapitulatif de toutes les modalités testées :

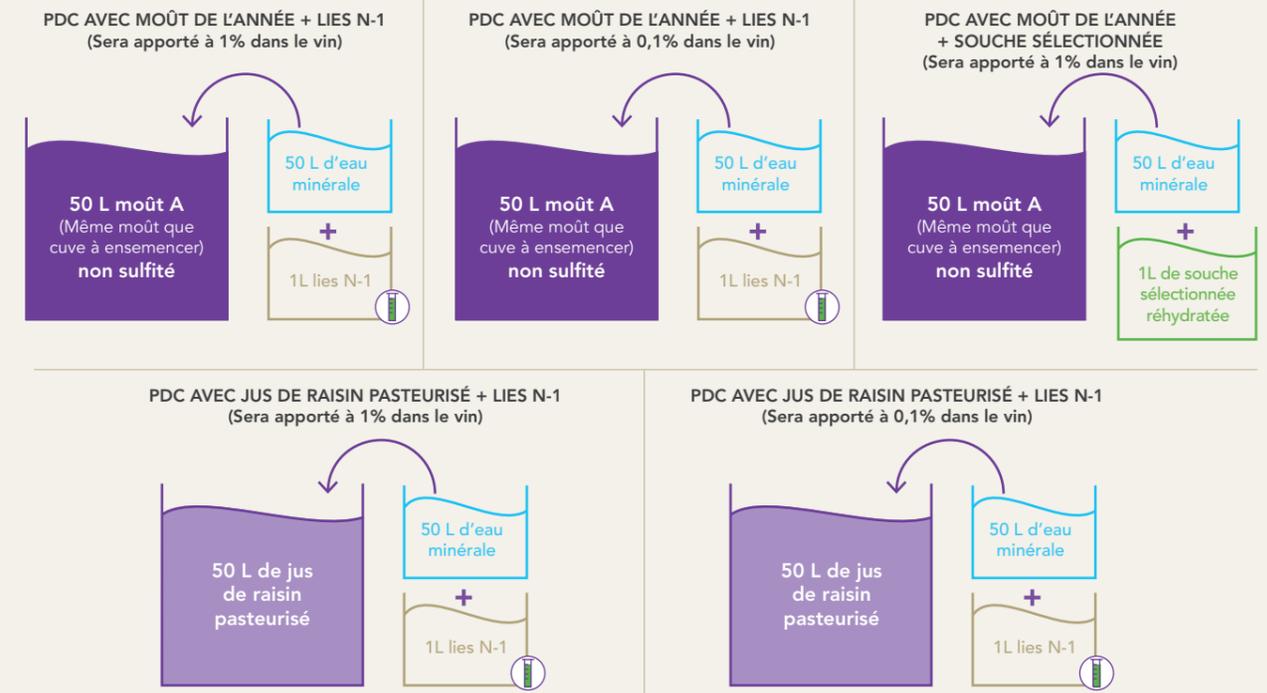
- PDC avec moût de l'année + lies N-1. Apporté à 1%,
- PDC avec moût de l'année + lies N-1. Apporté à 0,1%,
- PDC avec moût de l'année + souche sélectionnée de l'exploitation. Apporté à 1%,
- Vin d'un autre lot à mi FML. Apporté à 1%,
- Apport direct de lies N-1. Apportées à 1%,
- PDC avec jus de raisin pasteurisé + lies N-1. Apporté à 1%,
- PDC avec jus de raisin pasteurisé + lies N-1. Apporté à 0,1%.

Que ce soit en chai expérimental ou en propriété, ces modalités pied de cuve ont été comparées à deux modalités témoin :

- une modalité bactéries indigène spontanée,
- une modalité bactéries commerciales.

Chaque essai s'est réalisé en duplicat pour chaque modalité, sur Merlot ou Cabernet Sauvignon.

1 Lancement des pieds de cuve



2

À cette étape, un apport de levures est effectué pour éviter tous biais lors de la fermentation alcoolique : soit par un pied de cuve levures, soit en prenant du jus déjà en fermentation, soit en apportant des LSA (10 g/hL)

Les pieds de cuve sont placés dans une pièce à température constante, autour de 20 °C. Ils ne sont pas agités. La densité et la température sont contrôlées tous les jours pour suivre la FA. Tous les sucres doivent être consommés.

En attendant que le vin à inoculer soit prêt, les pieds de cuve sont conservés inertes à température ambiante du chai (azote ou barbotage au CO₂). Les pieds de cuve ne sont pas sulfités.

Réalisation de la FA et FML au sein du pied de cuve

3

Le vin A (à ensemercer, issu du moût A) est en fin de FA et est séparé en plusieurs contenants identiques de 100 hL

4 Lancement de la FML sur le Vin A (exemple pour 100 hL)

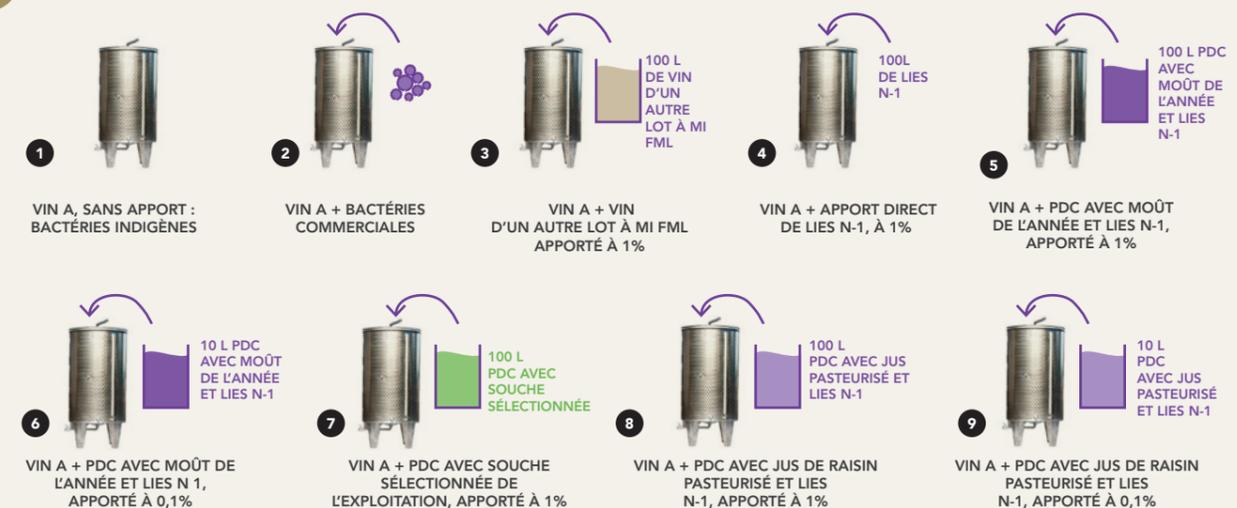


Figure 5 : Synthèse des protocoles de pied de cuve testés, pour 100 hL de vin à ensemercer

PRINCIPAUX RÉSULTATS OBTENUS EN CAVES EXPÉRIMENTALES, PAR L'IFV

Des essais ont été réalisés lors des millésimes 2019 et 2020, à partir d'un site rencontrant des difficultés de réalisation de FML indigènes sur vin de merlot et cabernet sauvignon en AOP Bordeaux rouge. L'objectif de ces essais était de valider pour chaque millésime le protocole optimisé proposé par les résultats de recherches au laboratoire (ISVV).

Pour cela, plusieurs pieds de cuve ont été préparés au cours des deux millésimes selon différents protocoles afin de mesurer leur efficacité, en faisant varier :

- Ensemencement : lies N-1 ou souche pure isolée en année N-1,
- Concentration : 0,1% ou 1%,
- Milieu pour le pied de cuve : jus de raisin ou moût.

Le bon déroulement de la FML a été obtenu par le suivi régulier de la dégradation de l'acide malique.

Des analyses physicochimiques ont été réalisées sur le vin à l'écoulage, fin FML et en fin d'élevage après mise en bouteille. Des analyses microbiologiques (dénombrements levures totales (LT), levures non saccharomyces (NS),

bactéries lactiques (BL), bactéries acétiques (BA)) ont été réalisées sur les lies de l'année N-1, sur le moût, sur les pieds de cuve avant leur utilisation, sur le vin à ensemercer fin FA et sur les vins de toutes les modalités mi FML pour détecter toute déviation ou contamination par des micro-organismes d'altération (*Brettanomyces bruxellensis* ou bactéries acétiques). Les vins ont été dégustés en fin d'élevage après mise en bouteilles.

En ce qui concerne le déroulement de la FML, les données 2019 ont montré des résultats similaires pour les modalités ensemençées par PDC 1% lies et par la souche commerciale : que ce soit au niveau des temps de latence, des cinétiques de fermentation et des durées totales.

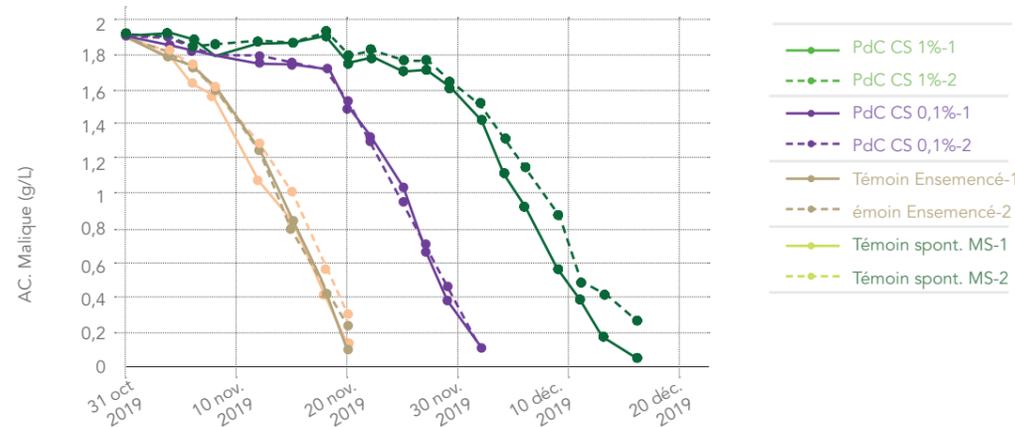


Figure 6 : Cinétique de dégradation de l'acide malique – IFV Cabernet Sauvignon 2019

En 2020, les vins présentaient des profils analytiques plus « difficiles » avec un niveau de TAV élevé et des teneurs en acide malique faibles. L'essai sur merlot n'a montré une réalisation de la FML que sur les vins ensemençés avec souche commerciale et PDC lies 1%.

Sur Cabernet Sauvignon, la FML s'est déclenchée rapidement dans le cas de la modalité souche commerciale puis en seconde position pour les modalités PDC lies ou souche pure et loin derrière la modalité FML spontanée.

Les résultats des contrôles microbiologiques des deux cépages ont montré au sein des pieds de cuves avant leur utilisation, la présence d'une souche majoritaire provenant des lies de l'année N-1 associée à d'autres souches.

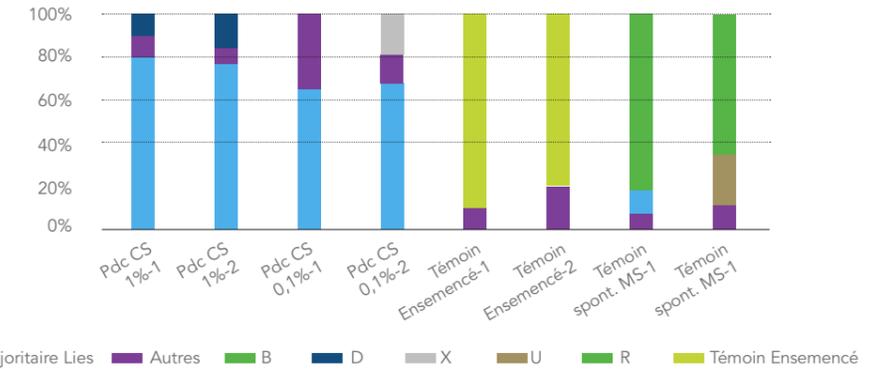


Figure 7 : Typage des souches d'Oenococcus oeni sur pieds de cuve – Cabernet Sauvignon 2019

Les résultats obtenus sur les vins ensemençés à mi FML, font apparaître :

- la bonne implantation de la souche commerciale
- une bonne implantation de la souche majoritaire des lies dans les autres modalités, associée à un consortium de souches.

Au niveau de la composition analytique des vins et de leur qualité sensorielle, les résultats ne font pas apparaître d'incidence significative du mode d'ensemencement et de l'utilisation de PDC. La qualité des vins est préservée.

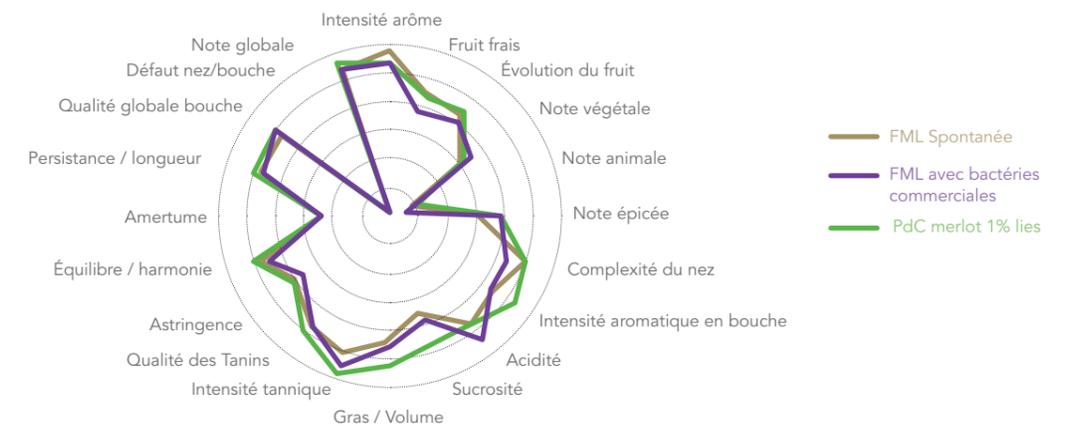


Figure 8 : Profil sensoriel des vins – Merlot 2019



L'utilisation du Pied de Cuve à 1% avec du moût semble une alternative intéressante à celle de bactéries commerciales grâce à des cinétiques de fermentation similaires et pas d'incidence sur les analyses physico-chimiques et qualité organoleptique des vins.

PRINCIPAUX RÉSULTATS OBTENUS EN PROPRIÉTÉS, PAR VIGNERONS BIO NOUVELLE-AQUITAINE

L'une des propriétés suivie par Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine présente un problème récurrent pour réaliser la FML sur un lot issu d'une parcelle bien identifiée. Une autre parcelle, a permis de fournir un lot dit « modèle » qui réalise sans difficulté, à chaque millésime sa FML.

En témoigne les quantités de populations de bactéries lactiques en présence.

Echantillons	Population de Bactéries lactiques (UFC/mL)
Moût du lot « à problème »	9.10 ¹
Lot « à problème » fin FA	4.10 ¹
Lot « modèle » fin FA	5.10 ⁵

Tableau 2 : Exemple de niveau de population sur les deux lots suivis, à différents stades en 2020

Les différents protocoles développés par l'ISVV et testés en parallèle à l'IFV ont été mis en place sur le lot à problème, en 2019 et 2020.

En termes d'évolution de population de bactéries lactiques, les protocoles testés ont apporté des résultats, équivalents voire supérieurs à ceux du lot modèle ou à l'apport de bactéries commerciales. En témoigne l'exemple de 2019 avec les performances de l'apport de vin d'un autre lot mi FML, ou l'inoculation d'un pied de cuve lies à 1%.

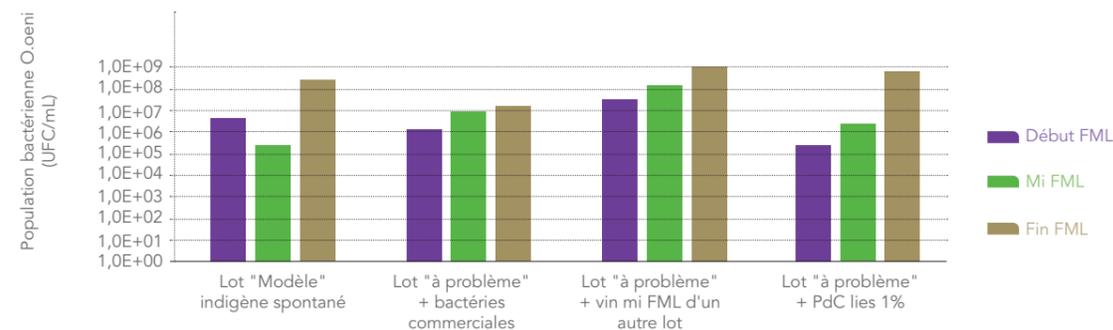


Figure 9 : Exemple d'évolution des populations de bactéries lactiques, essai 2019

En ce qui concerne la cinétique de la fermentation malolactique, les protocoles testés ont permis de réaliser la fermentation malolactique sans latence ni retard sur le lot à problème alors que la modalité indigène sur le même lot n'avait toujours pas démarré. En témoigne l'exemple ici du suivi des teneurs en acide malique de l'essai 2020 montrant une vitesse fermentaire pour les 2 modalités pied de cuve, comparables à celle de la modalité souches commerciales.

[Ac malique] en g/L	Lot « à problème » + BL commerciales		Lot « à problème » + PDC souche sélectionnée 1%		Lot « à problème » + PDC lies 1%	
	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2	Duplicat 1	Duplicat 2
Date						
20-oct	0,4	0,5	0,6	0,5	0,7	0,7
26-oct	0	0	0	0	0	0

Tableau 3 : Suivi [acide malique] - 2020

Pour identifier les bactéries lactiques présentes dans les différentes modalités, un typage des souches d'*Oenococcus oeni* a été réalisé, chaque année. L'objectif est d'observer si les souches identifiées au sein des lies, du vin fin FA ou du pied de cuve, se retrouvent ensuite dans les modalités testées.

L'exemple de 2019 montre une bonne implantation dans les deux modalités suivies. La souche majoritaire du lot « modèle » fin FA, se retrouve dans la modalité lot « à problème » + vin mi FML issu du lot « modèle ». La souche majoritaire des lies se retrouve au sein du pied de cuve lies 1%, ainsi qu'au sein de la modalité lot « à problème » + PDC lies 1%.

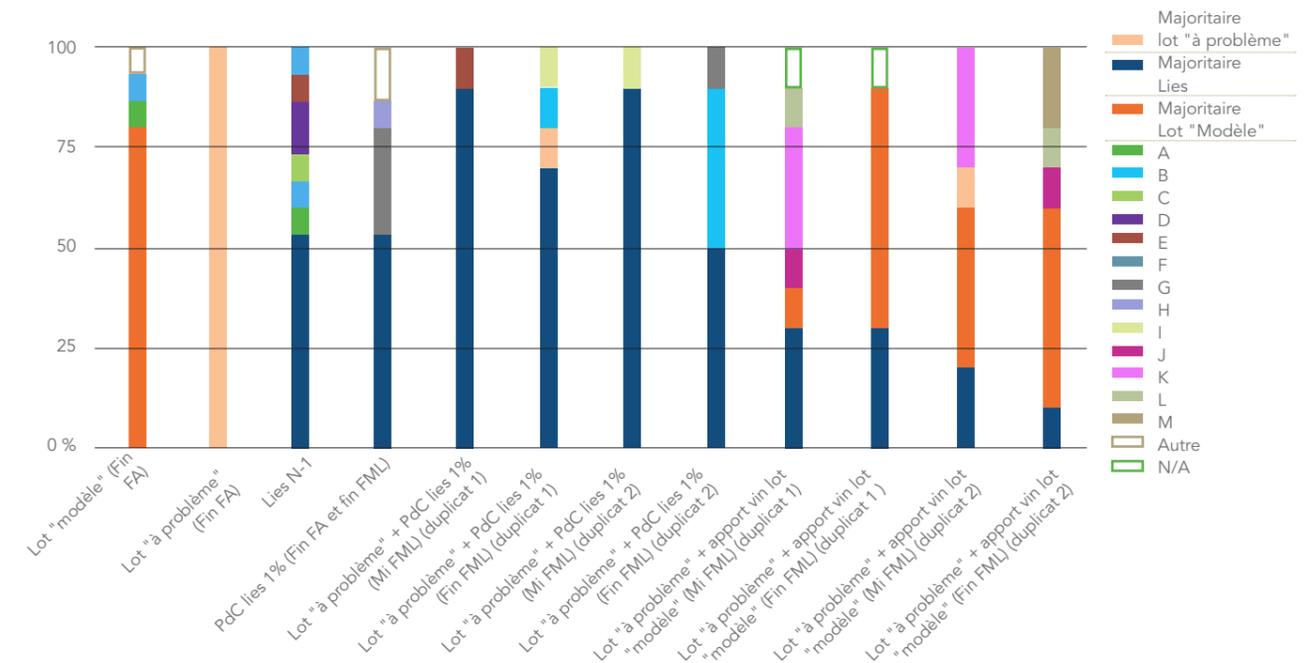


Figure 10 : Typages de souches *Oenococcus oeni* selon les modalités – 2019
Entre 10 et 15 clones ont été analysés, sauf pour échantillon Lot « à problème » fin FA, 1 clone analysé.

Sur ce millésime, la réalisation du pied de cuve avec lies de l'année N-1 a permis un bon développement de la souche des lies au sein du pied de cuve, puis au sein des modalités inoculées. Néanmoins, cela n'est pas toujours le cas. En 2020, deux modalités ont été comparées : l'apport d'un pied de cuve lies 1% et l'apport d'un pied de cuve à partir d'une souche sélectionnée. Les souches majoritaires des lies se sont bien retrouvées dans le pied de cuve lies. Mais après inoculation, le vin qui avait reçu le pied de cuve lies et le vin ayant reçu le pied de cuve souche sélectionnée ont été tous deux dominés par la souche sélectionnée. Cela n'a aucunement gêné la fermentation malolactique qui s'est très bien déroulée dans les deux cas, mais la maîtrise des populations en présence n'est pas une science exacte.

SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS

Pour chaque type de modalité testée, les résultats sont présentés au sein du tableau bilan au niveau du démarrage de la FML, sa cinétique, l'implantation des souches et l'analyse sensorielle.

Les modalités « FML indigène spontanées » ont systématiquement montré des difficultés à fermenter, voire à ne pas réaliser la FML.

Les deux années d'essai mettent en exergue trois types d'approche intéressantes :

- le pied de cuve avec lies N-1, apporté à 1%,
- le pied de cuve avec souche sélectionnée de l'exploitation, apporté à 1%,
- l'apport de vin d'un autre lot en mi FML, apporté à 1%.

Ces trois méthodes permettent de réaliser une fermentation malolactique franche et complète, au même rythme que dans le cas d'emploi de bactéries commerciales.

L'utilisation de lies a l'avantage d'être à la portée de tous vignerons, sans matériel ou intervention d'un laboratoire (si ce n'est l'analyse de Brettanomyces en amont de l'inoculation). La souche sélectionnée a l'avantage de permettre au vigneron de réagir face aux années où aucune lie issue d'une fermentation indigène n'aie fonctionné (et donc pas de possibilité d'en conserver pour l'année suivante). Enfin, l'apport de vin d'un autre lot en cours de FML reste le plus rapide et facile, quand les différents lots sont synchronisés. Cette solution implique que le lot choisi apporte un vin équilibré et net, pour éviter tout risque de déviation (notamment Brettanomyces).

Au niveau de l'implantation des souches, il semblerait que les approches « souche sélectionnée » et « apport de vin d'un autre lot à mi FML » garantissent davantage la présence majoritaire de leur souche dans le vin inoculé.

Néanmoins, la méthode « pied de cuve avec lies N-1 à 1% » a permis tout aussi bien la bonne réalisation de la fermentation, même sur des lots extrêmement récalcitrants en propriété et a l'avantage de ne nécessiter que des lies N-1.

La contrainte du pied de cuve avec souche sélectionnée est le travail microbiologique nécessaire à la sélection de la souche, sa conservation et sa préparation annuelle. De la même manière, l'apport de vin d'un autre lot implique d'avoir à sa disposition chaque année, un lot dont la FML aura déjà débuté, en indigène. Ce qui n'est pas du tout garanti, surtout si l'exploitation a des difficultés récurrentes au niveau de cette étape de la vinification.

Enfin, lorsque la matrice vin présente des caractéristiques impliquant des difficultés pour la FML (TAV important, pH faible, faible concentration en acide malique), la modalité PDC lies N-1 à 1% a permis de terminer la FML, contrairement à la modalité PDC souche sélectionnée (sur Merlot essai 2020). Un des risques de cette sélection est qu'elle se réalise en amont et la souche sélectionnée peut ne pas être adaptée au profil du millésime suivant.

”

" L'utilisation de lies a l'avantage d'être à la portée de tous vignerons, sans matériel ou intervention d'un laboratoire (si ce n'est l'analyse de Brettanomyces en amont de l'inoculation). "



SYNTHÈSE DES RÉSULTATS OBTENUS POUR CHAQUE PROTOCOLE TESTÉ

Résultat positif
 Résultat négatif

Modalité	PDC avec lies N-1 à 1%						PDC avec lies N-1 à 0,1%		PDC avec souche sélectionnée de l'exploitation à 1%			Apport de vin d'un autre lot en mi FML à 1%	Apport direct de lies à 1%	PDC avec jus de raisin pasteurisé + lies N-1 à 1%		PDC avec jus de raisin pasteurisé + lies N-1 à 0,1%	
Essais	Caves expérimentales				Propriété		Caves expérimentales		Caves expérimentales		Propriété	Propriété	Caves expérimentales		Caves expérimentales		
Millésime	2019		2020		2019	2020	2019		2020		2020	2019	2019	2019		2019	
Cépage	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Sauvignon	Merlot	Merlot		Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Sauvignon	Merlot	Merlot	Merlot	Merlot	Cabernet Sauvignon	Merlot	Cabernet Sauvignon	Merlot
Vin à ensemencer	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	TAV important 15%vol	TAV important 15%vol	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	TAV important 15%vol	TAV important 15%vol	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière	Pas de spécificité particulière
Démarrage de la FML dans le vin par rapport au vin ensemencé avec bactéries commerciales	Synchrone	Synchrone	Plus tardif	Plus tardif	Plus rapide	Synchrone	Plus tardif	Plus tardif	Plus tardif	Pas de FML	Synchrone	Plus rapide (mais plus tardif que PDC lies N-1 1%)	Pas de FML	Plus tardif	Synchrone	Plus tardif	Plus tardif
Cinétique de la FML dans le vin par rapport au vin ensemencé avec bactéries commerciales	Synchrone	Synchrone	Synchrone	Plus lente	Plus lente	Synchrone	Plus lente	Plus lente	Synchrone	Synchrone	Synchrone	Plus rapide	Pas de FML	Plus lente	Plus lente	Plus lente	Plus lente
Souches de BL en présence dans le PDC	Souche majoritaire des lies est majoritaire dans le PDC	Souche majoritaire des lies est majoritaire dans le PDC	Souche sélectionnée domine le PDC lies. Présence en minorité d'autres souches, non présentes dans les lies	Souche majoritaire des lies est absente du PDC. Présence en revanche de souche minoritaire des lies dans le PDC. Consortium de souches.	Souche majoritaire des lies est majoritaire dans le PDC	Souche majoritaire des lies est présente au sein du PDC, dans un consortium de souches	Souche majoritaire des lies est majoritaire dans le PDC	Souche majoritaire des lies est majoritaire dans le PDC	La souche sélectionnée est majoritaire dans le PDC	Souche sélectionnée majoritaire dans le PDC, tout au long de sa FML	Souche sélectionnée majoritaire dans le PDC	-	Pas de FML	Souche majoritaire des lies est majoritaire dans le PDC	Souche majoritaire des lies est présente dans le PDC, mais non majoritaire. Consortium de souches	Souche majoritaire des lies est majoritaire dans le PDC	Souche majoritaire des lies est présente dans le PDC, mais non majoritaire. Consortium de souches
Souches de BL en présence dans le vin ensemencé	Souche majoritaire des lies, majoritaire au cours de la FML	Souche majoritaire des lies est présente dans le vin, mais non majoritaire. Consortium de souches	Consortium de souches certaines aussi présentes dans le pied de cuve, d'autres issues du moût. Absence de la souche sélectionnée	La modalité ensemencée avec le PDC fait sa FML avec un consortium de souches de BL, dont certaines présentes dans le PDC et les lies	Souche majoritaire des lies, majoritaire au cours de la FML	La souche sélectionnée est majoritaire au cours de la FML, au détriment de la souche majoritaire des lies, complètement absente	Souche majoritaire des lies est présente dans le vin, mais non majoritaire. Consortium de souches	Souche majoritaire des lies, majoritaire au cours de la FML	Une souche présente à 100% tout au long de la FML, différente de la souche sélectionnée	Pas de FML	Souche sélectionnée majoritaire tout au long de la FML	Souche majoritaire du lot apporté est majoritaire, tout au long de la FML	Pas de FML	Souche majoritaire des lies, majoritaire au début de la FML puis mise en place d'un consortium de souches.	Souche majoritaire des lies est présente dans le vin, mais non majoritaire. Consortium de souches	Souche majoritaire des lies présente tout au long de la FML mais non majoritaire. Consortium de souches.	Souche majoritaire des lies, majoritaire au cours de la FML
Analyse sensorielle	Différence significative. Apprécié gustativement par rapport aux modalités BL commerciales et indigènes	Différence significative. Apprécié gustativement	Pas de différences significatives	Pas de différences significatives	Différence significative. Meilleure complexité aromatique que BL commerciales	Pas de différences significatives	Différence significative. Apprécié gustativement par rapport aux modalités BL commerciales et indigènes	Différence significative. Apprécié gustativement	Pas de différences significatives	Pas de FML	Pas de différences significatives	Différence significative. Meilleure complexité aromatique que BL commerciales	Pas de FML	Différence significative. Apprécié gustativement par rapport aux modalités BL commerciales et indigènes	Différences significatives. Moins apprécié que PDC issu du moût	Différence significative. Apprécié gustativement par rapport aux modalités BL commerciales et indigènes	Différences significatives. Le vin issu du pied de cuve jus de raisin 0.1% a été perçu avec des notes d'oxydation

LE PROTOCOLE DE PIED DE CUVE BACTÉRIEN RETENU

La méthode « pied de cuve avec lies N-1 apporté à 1% » a donc été sélectionnée pour optimiser précisément le protocole et permettre aux vignerons de fiabiliser leur fermentation malolactique, en indigène.

NB : Les volumes sont à adapter en fonction du volume que vous souhaitez ensemençer : le vin à ensemençer recevra 1% de son volume en PDC qui aura reçu 1% de son volume en lies. Le protocole ici présenté est prévu pour 100 hL de vin à ensemençer, 100 L de pied de cuve et 1L de lies.

ÉTAPE PRÉLIMINAIRE (Année N-1) : Conservation de lies

- Prélever des lies épaisses (pate au fond de la cuve), non sulfitées, à la fin d'une FML réalisée en indigène.
- Le matériel utilisé doit toujours être propre et désinfecté.
- Il faut prévoir une quantité de 1 L de lies pour ensemençer l'année suivante 100 hL de vin. Choisir des lies issues de lots ayant effectué une FML rapidement, et sans défaut (notamment phénols ou acidité volatile). Il est possible de les prélever dans un domaine voisin.
- Remplir votre contenant au maximum pour minimiser le volume d'air en contact avec les lies.
- Durant les premières semaines de conservation ne pas visser complètement le bouchon.
- Les lies sont à conserver jusqu'aux vinifications suivantes au frais (entre 4 et 10°C), sans les congeler et sans les sulfiter.

ÉTAPE 1 (Année N) : Analyse des lies

Les lies peuvent être conservées jusqu'à 1 an. Leur capacité fermentaire dépend de la population en bactéries lactiques de l'espèce *Enococcus oeni* présentes à la fin de la période de conservation. Quinze jours avant la réalisation du pied de cuve, **une analyse des lies est donc nécessaire pour vérifier :**

- la quantité de population en bactéries lactiques : 10⁶ UFC/mL (Unité Formant Colonie) est un minimum.

Durée d'analyse : 12 jours. Si vous souhaitez typer génétiquement les souches en présence, comptez 4 semaines.

- la qualité sanitaire des lies : absence de *Brettanomyces bruxellensis* et un niveau nul à très faible de bactéries acétiques.

Durée d'analyse : 3 jours par qPCR, 7 jours par méthode classique.

Chaque analyse requiert environ 10 mL d'échantillon. Il peut être conseillé de réaliser également ces vérifications avant la conservation des lies. Cela évite de les conserver « pour rien » en cas de déviation ou de population insuffisante et d'anticiper pour ses malo de l'année suivante.

ANALYSE	DESCRIPTION	DELAI	COÛT / échantillon
Niveau de population en bactéries lactiques	Dénombrement des bactéries lactiques par culture sur milieu nutritif gélosé	12 jours	Entre 20 et 30€
Diversité des souches d' <i>O.oeni</i>	Dénombrement et analyse de 15 clones d' <i>O. oeni</i> au niveau de la souche : donne la quantité et la proportion des souches en présence	4 semaines	Environ 150€
Niveau de population en <i>B. bruxellensis</i>	Dénombrement par qPCR de la population de <i>B.bruxellensis</i> en présence	3 jours	Entre 70 et 100€
Niveau de population en levures non-Saccharomyces	Dénombrement des levures non-Saccharomyces (dont <i>B.bruxellensis</i>) par culture sur milieu nutritif gélosé	7 jours	Environ 30€
Niveau de population en bactéries acétiques	Dénombrement des bactéries acétiques par culture sur milieu nutritif gélosé	12 jours	Entre 20 et 30€

Tableau 5 : Les analyses microbiologiques possibles à réaliser sur lies⁹

ÉTAPE 2 : Préparation du Pied de cuve

Un des points délicats dans l'utilisation d'un pied de cuve est de bien gérer la synchronisation entre le moment où le pied de cuve sera finalisé et le moment où votre vin sera prêt à le recevoir. Il faut donc penser à vos itinéraires de vinification et caler le lancement de votre pied de cuve en fonction : anticiper les temps de cuvaisons avant ou post FA par exemple.

Le pied de cuve réalise en général sa FA et FML simultanément et peut être prêt relativement vite. Cela s'explique par la dilution du moût et de la non-réalisation de l'étape de macération post fermentaire. Il peut être pertinent de le réaliser au milieu des vendanges et non en amont. **En tout état de cause, s'il était prêt trop tôt par rapport au vin à ensemençer, il est conseillé de le conserver plein et inerté, à température ambiante dans le chai, sans variation de température.**

D'après quelques essais en laboratoire, il est plutôt conseillé de choisir le même cépage que le vin à ensemençer pour réaliser son pied de cuve.

En termes de contenant, il est conseillé de réaliser les fermentations du pied de cuve en garde vin. Le fait de ne pas coller le chapeau au jus permet le dégagement de CO₂. Cela évite les débordements et les risques de déviations. Le mieux étant un garde vin avec soupape. Quand les sucres sont terminés, il est alors possible de coller le chapeau.

3

ÉTAPE 3 : Réalisation de la FA et de la FML au sein du pied de cuve

Afin de s'assurer une bonne réalisation de la fermentation alcoolique, un apport de levures est conseillé :

- soit par un pied de cuve levures
- soit en prenant du jus déjà en fermentation
- soit en apportant des LSA (10 g/hL)

A ce stade, la densité, la température et la teneur en acide malique sont à mesurer très régulièrement pour suivre l'évolution de la FA et de la FML. Une fois les sucres consommés et l'acide malique transformé en acide lactique, le pied de cuve est prêt.

En attendant que le vin à inoculer soit prêt, le pied de cuve doit être conservé inerté à température ambiante du chai (azote ou barbotage au CO₂). Si pas de possibilité d'inertage, il est possible de combler l'espace de tête avec de l'eau minérale. En aucun cas le pied de cuve ne doit être sulfité, cela bloquerait les populations de bactéries lactiques.

2

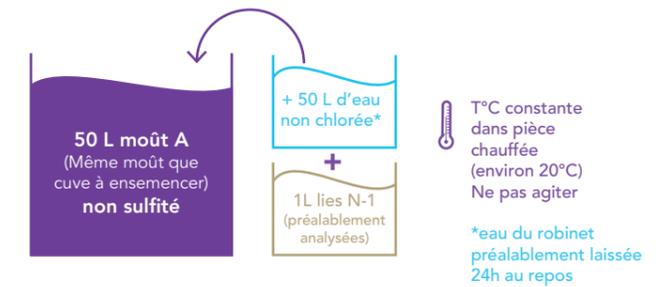


Figure 11 : Préparation du pied de cuve



4

ÉTAPE 4 : Inoculation du vin

Avant ensemençement du vin, il peut être prudent de réaliser une analyse d'acidité volatile (AV) sur le pied de cuve. A partir de 0,4 à 0,5 g/L d'AV (H₂SO₄), il vaut mieux éviter de l'utiliser.

Une fois que vous souhaitez lancer la fermentation malolactique dans le vin à ensemençer, vous pouvez apporter les 100 L de pied de cuve pour 100 hL de vin et homogénéiser. L'évolution des teneurs en acide malique et lactique sont à suivre pour mesurer l'avancée de la FML.

IV. LES PREMIERS RETOURS À GRANDE ÉCHELLE : TROIS CAS DE FIGURE

En 2021 un projet à financement ACTIA a rassemblé plusieurs organisations de recherche réparties dans 5 régions viticoles pour suivre plusieurs exploitations viticoles et tester ce protocole en grandeur nature. L'objectif étant de confronter cette méthode :

- à différents types de vins
- sur des volumes importants
- dans différentes régions vitiviniholes

pour garantir son efficacité avant d'être diffusé très largement auprès des professionnels.

Structures de recherche	Région viticole	Nombre d'exploitations suivies
IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin)	Loire	1
BNIC (Bureau National Interprofessionnel du Cognac)	Cognac	1
Unité de Recherche Œnologie, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin-Université de Bordeaux	Bordelais	Appui des autres partenaires
CHANGINS Haute Ecole de Viticulture et Œnologie	Suisse	4
INTER RHONE (Interprofession des vins AOC de la vallée du Rhône)	Rhône	4
Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine	Bordelais	5

Tableau 6 : Zones et nombre d'essais grandeur nature en 2021

Les 5 exploitations accompagnées par Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine font partie de son pool de vigneron expérimentateurs. Voici leurs profils et raisons de participation à l'essai :

	Profil d'exploitation	Motivation	Schéma expérimental	Lies utilisées
Domaine 1	Exploitation familiale, AOP Bordeaux, 4 ha	Souhait de sécuriser le démarrage de la FML indigène	2 modalités : - 5 hL recevant le PDC avec 1% de lies - 5 hL en FML spontanée indigène	Lies 2019 d'un autre domaine
Domaine 2	Grand Cru, AOP Pauillac, 80 ha	Souhait de limiter les intrants et tester les fermentations indigènes	2 modalités : - 50 hL recevant le PDC avec 1% de lies - 50 hL en FML spontanée indigène	Lies 2020, en propre
Domaine 3	Exploitation familiale, AOP Bordeaux, 2,5 ha	Difficulté récurrente de réalisation de la FML indigène. Souhait de limiter les intrants	2 modalités : - 3 hL recevant le PDC avec 1% de lies - 3 hL en FML spontanée indigène	Lies 2019 d'un autre domaine
Domaine 4	Grand Cru, AOP Pauillac, 80 ha	Souhait de limiter les intrants et tester les fermentations indigènes. Difficulté récurrente de réalisation de la FML indigène	3 modalités : - 2,5 hL recevant le PDC avec 1% de lies - 2,5 hL en FML spontanée indigène - 2,5 hL recevant des bactéries commerciales	Lies 2019 d'un autre domaine
Domaine 5*	Grand Cru, AOP Pomerol, 12 ha	Difficulté récurrente de réalisation de la FML indigène. Souhait de généraliser le protocole de pied de cuve pour la totalité du chai	2 modalités : - L'ensemble du chai a étéensemencé avec le PDC soit 380 hL - Sauf un lot dit « modèle », qui réalise chaque année sa FML en spontanée sans difficulté.	Pas de lies. Souche de BL sélectionnée au sein du domaine à partir du lot modèle

Tableau 7 : Présentation des 5 exploitations suivies par Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine en 2021

Le choix des lies s'est réalisé en fonction de l'absence de Brettanomyces et de bactéries acétiques, ainsi que de la population de bactéries lactiques en présence. Certains domaines avaient conservé des lies 2020 mais la population était trop faible (de l'ordre de 10^4 UFC/mL), excepté pour le domaine 2.

Nous avons donc décidé d'utiliser des lies en notre possession issues du projet Pied de cuve malo Bio, avec la plus importante population en bactéries lactiques. Ces lies datent donc du millésime 2019 (n+2) avec une population de l'ordre de $1,8 \cdot 10^5$ UFC/mL.

* Les essais terrain du projet « Pied de cuve malo Bio » présenté dans cette plaquette ont été réalisés au sein du domaine 5. Lors des expérimentations des années précédentes, une souche indigène avait été sélectionnée pour sa bonne aptitude à réaliser la FML, même sur le lot à problème.

Bien que l'ensemble des résultats ne soient pas encore consolidés, plusieurs cas de figure ont été observés :

CAS 1 : DES DYSFONCTIONNEMENTS DANS LA RÉALISATION DU PIED DE CUVE

Le domaine 1 a eu des difficultés à réaliser le pied de cuve. A deux reprises, il a été touché par une piqure acétique et la présence de Brettanomyces. La population de bactéries lactiques en présence ($6 \cdot 10^4$) n'a pas permis de réaliser la fermentation malolactique, l'essai a donc été avorté pour ce domaine.

Le domaine 3 a pris plus de temps que les autres domaines pour réaliser son pied de cuve (la FA et la FML ont duré plus de 2 semaines). Cela peut s'expliquer par le fait que le pied de cuve ait été réalisé à partir de moût sulfité, par erreur. Nous avons décidé de tout de même poursuivre l'essai, les résultats sont néanmoins à relativiser. Une fois le pied de cuve inoculé, le démarrage de la FML n'a pas été immédiat. Cela a également été le cas pour la modalité indigène. Les deux contenants ont été chauffés et la FML s'est déroulée en 3 mois, simultanément sur les deux lots.

Au niveau des populations, le PDC a permis d'accroître le niveau de population initialement présent dans les lies. L'ordre de grandeur est ensuite équivalent entre les deux modalités en fin FML. Comme pour le domaine 2, un consortium de bactéries lactiques semble avoir réalisé la FML, dans les deux modalités, avec peut-être une diversité de souches plus importante dans la modalité indigène.

Domaine 3	Stade	Population de Bactéries lactiques (UFC/mL)
Lies	Après 2 ans de conservation post FML	$1,80 \cdot 10^5$
PDC	fin FA et FML	$1,06 \cdot 10^7$
Modalité vin + PDC	fin FML	$2,07 \cdot 10^7$
Modalité vin indigène spontanée	fin FML	$4,20 \cdot 10^7$

Tableau 8 : Evolution des populations de bactéries lactiques - Domaine 3

Avec la réalisation du PDC à partir de moût sulfité, on ne peut conclure sur cet essai.

CAS 2 : LA FERMENTATION MALOLACTIQUE S'EST AUSSI BIEN DÉROULÉE EN INDIGÈNE OU AVEC L'AIDE DU PIED DE CUVE

Le domaine 2 a réalisé ses fermentations malolactiques sans difficulté, que ce soit avec l'aide du pied de cuve ou en indigène. Au niveau de la cinétique, les deux modalités ont suivi le même rythme, avec une légère accélération de la modalité indigène en fin de FML. Les deux modalités ont terminé leur FML en même temps.

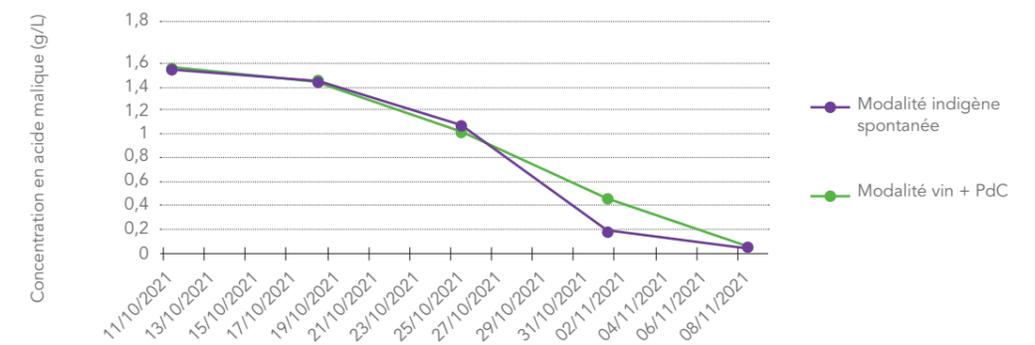


Figure 12 : Cinétique de FML - Domaine 2

Au niveau de la population en bactéries lactiques, la réalisation du pied de cuve a réellement permis de développer la population, par rapport à la population des lies initiale.

Domaine 2	Stade	Population de Bactéries lactiques (UFC/mL)
Lies	Après 1 an de conservation post FML	1,7.10 ⁶
PDC	fin FA et FML	1,34.10 ⁹
Modalité vin + PDC	fin FML	4,67.10 ⁶
Modalité vin indigène spontanée	fin FML	2,7.10 ⁸

Tableau 9 : Évolution des populations de bactéries lactiques - Domaine 2

En revanche, en fin de FML, la modalité vin + PDC présente une population plus faible que la modalité indigène. Le typage des souches semble également présager une diversité plus faible. Dans les deux cas, un consortium de souches a réalisé la FML. Pour ce domaine, les conditions initiales de FML semblaient être bonnes, avec :

- 13,4% vol de TAV,
- un pH de 3,44,
- une teneur initiale en acide malique de 1,48 g/L.

On ne peut donc réellement conclure sur un effet du PDC supplémentaire.

CAS 3 : LE PIED DE CUVE A APPORTÉ UNE SÉCURISATION DE LA FERMENTATION MALOLACTIQUE PAR RAPPORT À UNE FML INDIGÈNE SPONTANÉE

Pour le domaine 4, le démarrage de la FML a eu un temps de latence, pour les trois modalités. La modalité pied de cuve a été la première à démarré (au bout de 3 semaines), et a terminé la fermentation le plus rapidement, en quelques jours, devant la modalité bactéries commerciales.

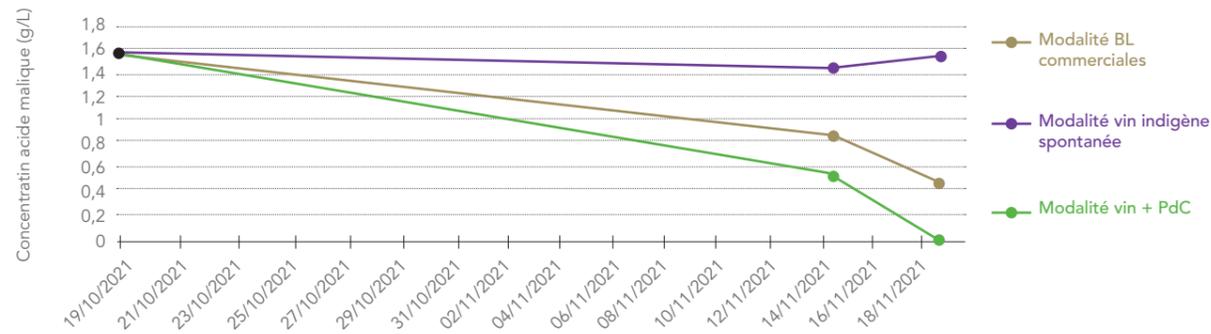


Figure 13 : Cinétique de FML - Domaine 4

Au niveau de la population de bactéries lactiques, le PDC présente une population plus faible que celle des lies. En revanche, il a fourni une population plus importante à la modalité inoculée, que ce soit par rapport à la modalité indigène ou BL commerciales, et ce, tout au long de la FML.

Les conditions initiales de FML étaient clairement difficiles sur ce lot : en témoigne la population quasi nulle initialement dans la modalité indigène.

Domaine 4	Stade	Population de Bactéries lactiques (UFC/mL)
Lies	Après 2 ans de conservation post FML	1,8.10 ⁵
PDC	fin FA et FML	5,50.10 ⁴
Modalité vin + PDC	09/11 : début FML	1,03.10 ⁶
Modalité vin indigène spontanée	09/11 : FML non démarrée	20
Modalité vin + BL commerciales	09/11 : début FML	5,33.10 ⁵
Modalité vin + PDC	15/11 : fin FML	1,90.10 ⁷
Modalité vin indigène spontanée	15/11 : FML non démarrée	1,20.10 ³
Modalité vin + BL commerciales	15/11 : mi FML	4.10 ⁶

Tableau 10 : Évolution des populations de bactéries lactiques - Domaine 4

En termes de diversité, le pied de cuve semble abriter deux souches majoritaires, issues des lies (A et C). La modalité vin + PDC semble avoir été réalisée par un consortium de souches, dont certaines sont issues du pied de cuve et des lies (souche C). La diversité semble diminuer au fur et à mesure de l'avancée de la FML. La modalité indigène semble être dominée par une souche non présente dans les lies. Enfin, la modalité vin + bactéries commerciales contient en majorité la souche de bactérie inoculée.

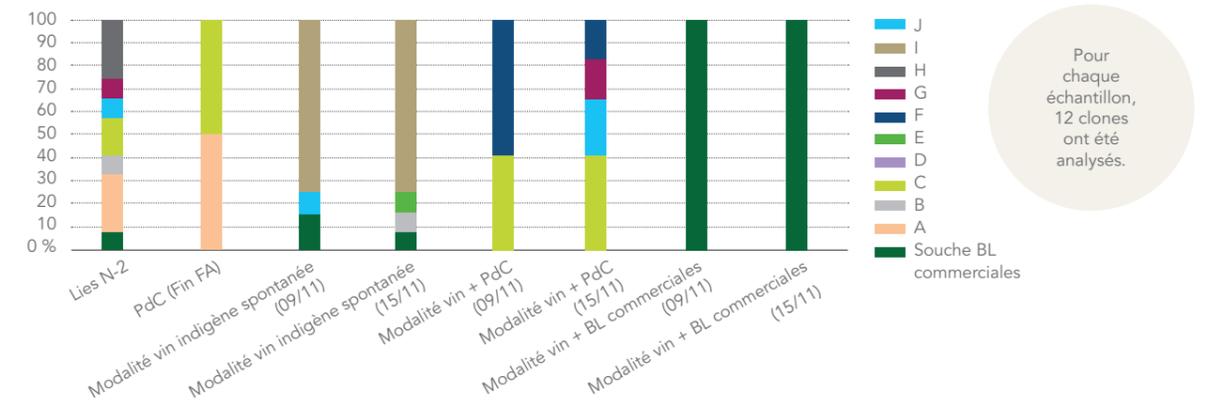


Figure 14 : Diversité des souches de BL par modalité au cours de la FML - Domaine 4

Le domaine 5 a un profil un peu particulier par rapport aux autres car a été terrain d'expérimentation pour le projet PDC malo Bio sur plusieurs millésimes. Ainsi, les essais ont été adaptés à son niveau d'avancement sur la question. L'ensemble du chai a étéensemencé avec un pied de cuve réalisé à partir d'une souche sélectionnée par l'ISV au sein de ce domaine. Un seul lot dit « modèle », issu d'une parcelle identifiée a mené sa FML en indigène spontanée. Ce même lot a permis d'isoler la souche sélectionnée car il réalise sa FML sans difficulté, chaque année.

Au niveau de la cinétique, la FML s'est déroulée en mois de 15 jours, avec un démarrage franc pour les deux modalités. Le pied de cuve a été inoculé deux jours après le démarrage de la FML sur la modalité indigène. Cela explique le petit décalage entre les deux modalités. L'apport du pied de cuve a donc permis d'obtenir sur le lot récalcitrant une cinétique aussi efficace que sur le lot « modèle » en indigène.

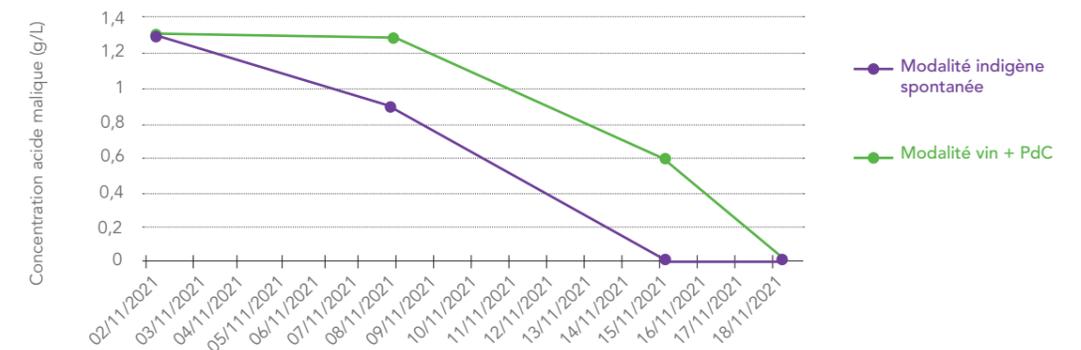


Figure 15 : Cinétique de FML - Domaine 5

Au niveau des populations de bactéries lactiques, le pied de cuve a permis un bon développement, en nombre. Son inoculation se justifie étant donné la faible population dans le vin avant apport ($3,5 \cdot 10^3$). Cela a permis ainsi d'atteindre à mi malo une population de $1,53 \cdot 10^7$, même supérieure à la population de $8 \cdot 10^6$, au même stade dans la modalité indigène du « lot modèle ».

Domaine 5	Stade	Population de Bactéries lactiques (UFC/mL)
PDC	fin FA et FML	$3,90 \cdot 10^8$
Vin avant inoculation du PDC	Fin FA	$3,50 \cdot 10^3$
Modalité vin + PDC	fin FML	$1,53 \cdot 10^7$

Tableau 11 : Évolution des populations de bactéries lactiques - Domaine 5

En termes de diversité des souches, la souche sélectionnée s'est extrêmement bien implantée dans le pied de cuve et semble être dominante. On la retrouve dans le vin fin FA, sur le lot à problème et le lot « modèle » dont elle est issue. En revanche, elle ne semble pas être responsable de la FML dans la modalité PDC ou lot modèle. Il s'agirait plutôt d'un consortium de souches, certaines présentes dans le lot modèle fin FA (souche F, G). C'est également le cas pour la FML du lot modèle avec les souches C et F.

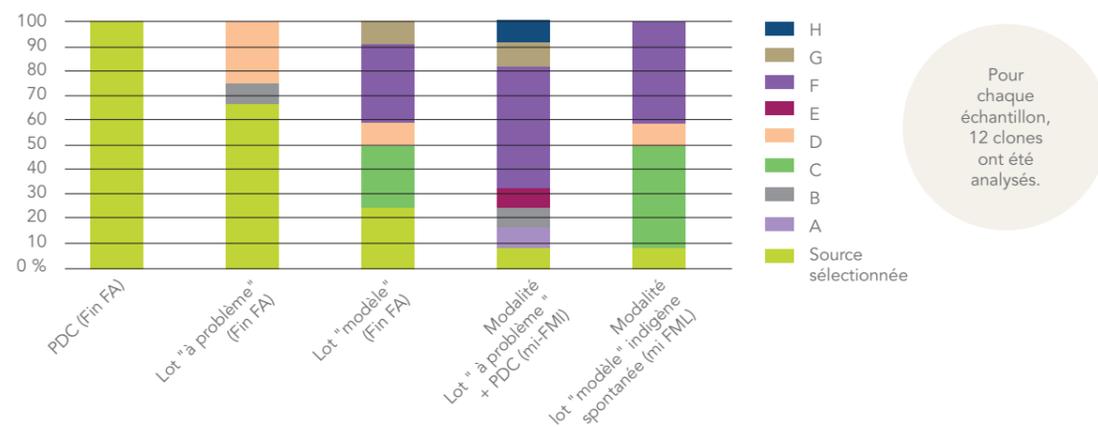


Figure 16 : Diversité des souches de BL par modalité au cours de la FML - Domaine 5

Pour les domaines 4 et 5, le pied de cuve semble ainsi avoir apporté une plus-value dans la réalisation et la maîtrise de la FML.

Une analyse sensorielle sera réalisée en 2022 afin de s'assurer que l'usage de pied de cuve n'influe pas l'équilibre aromatique du vin.

Ce que l'on retient des essais grandeur réelle

À ce stade, il est difficile de conclure sur l'apport du PDC par rapport aux modalités indigènes. Dans certains cas de figure, cela semble bénéfique, mais une multitude de facteurs peut influencer la réussite de la FML.

Ce millésime 2021 a fourni une vendange avec « de bonnes conditions » de réalisation de FML en évitant: une maturité avancée, un pH et un TAV élevés ou une faible teneur en acide malique. De plus, la plupart des exploitations se sont appuyées sur des lies n+2, ce qui n'est pas conseillé au niveau de la population de bactéries lactiques qui décroît avec le temps.

Certains dysfonctionnements dans la réalisation du pied de cuve ont également limité le nombre de résultats fiables.

Au niveau microbiologique, on ne peut conclure sur le fait que la FML soit réalisée par les souches apportées par le PDC, s'agissant dans la majorité des cas, de consortium. En outre, les méthodes d'analyse rendent difficile la vision globale des souches en présence et donc le statut de « souche majoritaire » sur 12 clones analysés.

Ce qui semble certain est que la typologie des bactéries lactiques évolue au fur et à mesure de la FML. Il est tout à fait possible que la FML soit réalisée par plusieurs souches, qui se donnent le relais au fur et à mesure de la fermentation.

> Il serait intéressant de créer une fiche diagnostic pour les viticulteurs listant les facteurs physico-chimiques avec des valeurs de référence sur vendange pouvant influencer la bonne réalisation de la FML en indigène. Le vigneron pourra alors anticiper le besoin de réaliser un pied de cuve, selon les millésimes.

Conclusion

De plus en plus de vignerons souhaitent limiter l'utilisation d'intrants en œnologie tout en comprenant et maîtrisant les différentes phases de la vinification et de l'élevage. Les fermentations indigènes sont de plus en plus pratiquées. **Pour ce faire, le pied de cuve est un bon outil pour utiliser la flore naturellement présente tout en amorçant le démarrage de ses fermentations.**

Ces années d'essai sur le cas du protocole de pied de cuve bactérien montrent qu'il y a un intérêt à s'appuyer sur ses lies N-1. Peu coûteuse en matériel, en temps et en analyse, cette technique reste très opérationnelle, sûre et logique. Néanmoins, la fermentation malolactique reste une étape faisant intervenir du vivant... et qui plus est, des micro-organismes ! **Chaque vigneron aura donc à adapter ce protocole et ses recommandations à sa matrice vin, ses conditions de chai, ses problématiques et ses possibilités techniques.**

La recherche reste en perpétuelle évolution, nous invitons donc chaque viticulteur à nous faire part de ses retours pour que ce protocole continue à s'améliorer et se perfectionner au cours des millésimes !

Pour aller plus loin

La maîtrise de la fermentation malolactique, Patrice Marchand, Institut Français de la Vigne et du Vin, <https://www.vignevin-occitanie.com/fiches-pratiques/la-maitrise-de-la-fermentation-malolactique-ou-fml/>, consulté en Mars 2022

Lucas P, Masneuf-Pomarède I, Legras JL, Bely M, Miot-Sertier C, Claisse O, El Khoury M, Campbell- Sills H, Börlin M, Maupeu J, Courbin-Vallet A, Pladeau V, Becquet S, Chovelon M, Bauduin R, Cottureau P, Coarer M, Vinsonneau E, Colosio MC (2018) Des outils pour fiabiliser les fermentations des vins et cidres biologiques en utilisant les levures et bactéries indigènes. *Innovations Agronomiques*. 68: 279- 291

Vinsonneau E, Colosio M-C, Coarer M, Cottureau P, Bely M, Masneuf I, Miot-Sertier C, Maupeu J, Vallet-Courbin A, Becquet S, Pladeau (2017) Fermentation indigène et pied de cuve. Résultats du projet Casdar « Levains Bio » *Revue des Œnologues et des Techniques Vitivinicoles et Œnologiques*. 162: 25- 27

Börlin M, Miot-Sertier C, Vinsonneau E, Becquet S, Salin F, Bely M, Lucas P, Albertin W, Legras J-L, Masneuf-Pomarède I (2020) The “pied de cuve” as an alternative way to manage indigenous fermentation: impact on the fermentative process and *Saccharomyces cerevisiae* diversity. *OENO One* 54: 2.3105

Becquet S, Lucas P (2016) Garder ses lies : efficace, mais risqué. *Réussir Vigne*. 230

Vinsonneau E (Sept Oct 2017) Sélection de levures et bactéries lactiques : des références supplémentaires acquises lors du projet WildWine en Aquitaine. *Union Girondine des vins de Bordeaux*

ITAB, Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine (2021) Enquête sur les pratiques œnologiques des vigneron Bio en France ; Millésime 2020

Duteurtre B., (2010). *Le champagne : de la tradition à la science*. Ed Tec & Doc. Paris, 347p.
Parenthoën A., (1981). Techniques d'ensemencement de bactéries lactiques. *Rev. Fr. Oenol.* 124 : 5- 12

Laurent M., Valade M., Landrieux A. and Moncomble D., (2009). Faire la fermentation malolactique sans chauffage. *Le vigneron champenois*. 6 : 34-53

Valade M. and Laurent M., (1993). La fermentation malolactique. La réactivation sur mout. *Le vigneron champenois*. 6 : 5-17

Valade M. and Laurent M., (1994). La maîtrise de la fermentation malolactique. *Revue des œnologues*. 70 : 45-47.

Résolution OIV-OENO 494-2012. Lactic acid bacteria. 2009. Révision 2012. *International Œnological Codex*

Fiche pratique « Protocole de pied de cuve FA et conservation des lies », projet LEVAINSBIO, AAP Casdar N°1220, 2015

Vidéo Journées Techniques Vigne Vin Bio 2021 – Sécuriser sa fermentation malolactique indigène en vinification Bio - <https://www.journeestechiquesvignevinbio.fr/ressources-medias/>

Comité de rédaction : BECQUET Stéphane (Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine), CAYLA Laure (IFV), HEGUIAPHAL Emy (IFV), HUBERT Anne (Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine), LUCAS Patrick, (ISW UMR Œnologie), MIOT-SERTIER Cécile (ISW UMR Œnologie), VINSONNEAU Emmanuel (IFV).

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

Création graphique : atelierv1.fr, Libourne - Nelly Soustre - Mai 2022

Crédits photos : Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine



VIGNERONS BIO
NOUVELLE AQUITAINE

Vignerons Bio Nouvelle-Aquitaine

38 Route de Goujon, 33570 Montagne

-

05 57 51 39 60

contact@vigneronsbionouvelleaquitaine.fr

www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr



Institut Français de la Vigne et du Vin Vinopôle Bordeaux Aquitaine

39 Rue Michel de Montaigne, 33290 Blanquefort

Château de la Frémoire, 44120 Vertou

-

05 56 16 14 20 | 02 40 80 39 52

www.vignevin.com | www.vinopole.com

emmanuel.vinsonneau@vignevin.com

emy.heguiaphal@vignevin.com



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

cecile.miot-sertier@u-bordeaux.fr

patrick.lucas@u-bordeaux.fr

AVEC LE SOUTIEN FINANCIER DE :

