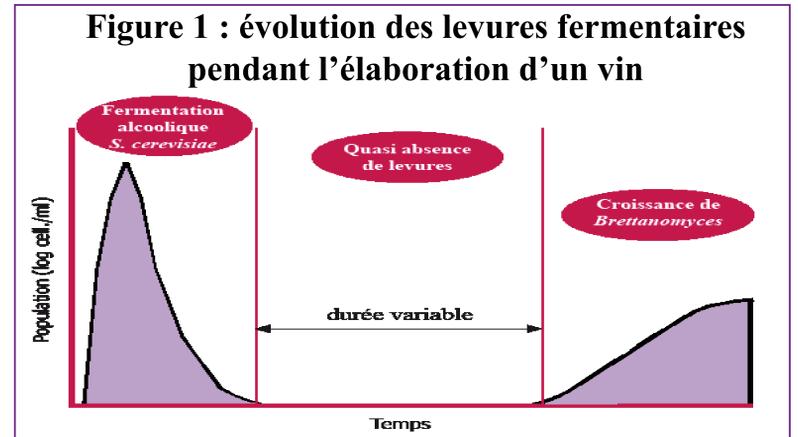


DÉNOMBREMENT RAPIDE DE BRETTANOMYCES DANS LES VINS ROUGES PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX

Brettanomyces est une levure très fréquente dans les caves. Différentes études montrent que les vins rouges peuvent être plus ou moins contaminés par *Brettanomyces*. Jusqu'à 50 % des cuvées le sont avant la stabilisation de la fin de fermentation malolactique (Figure 1).

Le développement d'un caractère phénolé nécessite une population de *Brettanomyces* suffisante pendant une période suffisamment longue. Pour éviter le caractère phénolé, il est nécessaire d'interdire l'activité de *Brettanomyces*.

Le suivi microbiologique permet de mettre en évidence le moment et l'importance d'un développement de *Brettanomyces* au cours de l'élaboration d'un vin.



MÉTHODE MISE AU POINT PAR NOTRE INSTITUT EN PARTENARIAT AVEC LA SOCIÉTÉ PARTEC

◆ Matériel et méthode

- **Echantillon de vin rouge sans traitement préalable** : soit un vin en cours d'élevage dont la fermentation alcoolique est achevée (prélèvement aseptique au-dessus des lies (turbidité < 500 NTU)), soit un vin en bouteille.
- **Réactifs** : tampon spécifique pour atteindre un pH entre 6,5 et 7,0 et fluochrome marquant les levures vivantes (temps de marquage retenu : 10 mn à 22°C).
- **Cytomètre de flux** équipé de deux capteurs : la taille des cellules et la fluorescence (Figure 2).

- **Paramétrage spécifique** pour le dénombrement de *Brettanomyces*.

La lecture des résultats (Figure 3) prend en compte le nombre d'éléments fluorescents (ordonnée) et l'intensité de la fluorescence (abscisse). Le croisement fluorescence et taille des cellules permet de confirmer le résultat et/ou de l'affiner lors d'une mauvaise séparation du pic de fluorescence.

◆ Limites du dénombrement de *Brettanomyces*

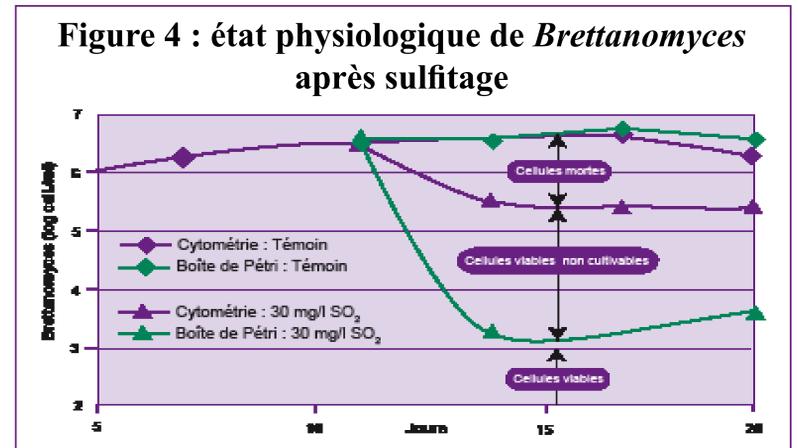
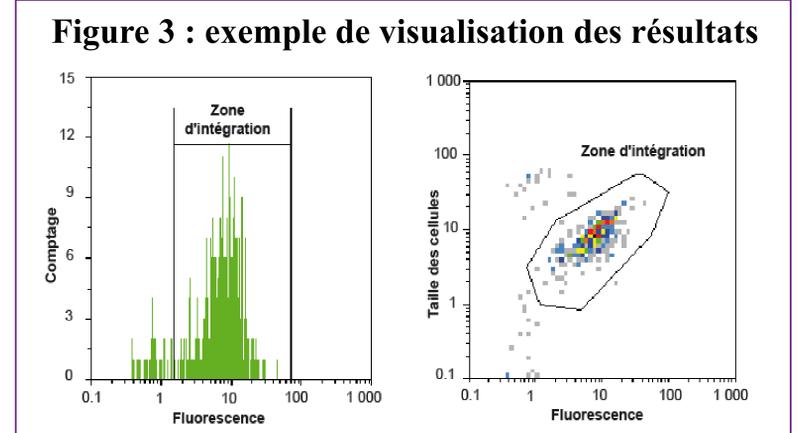
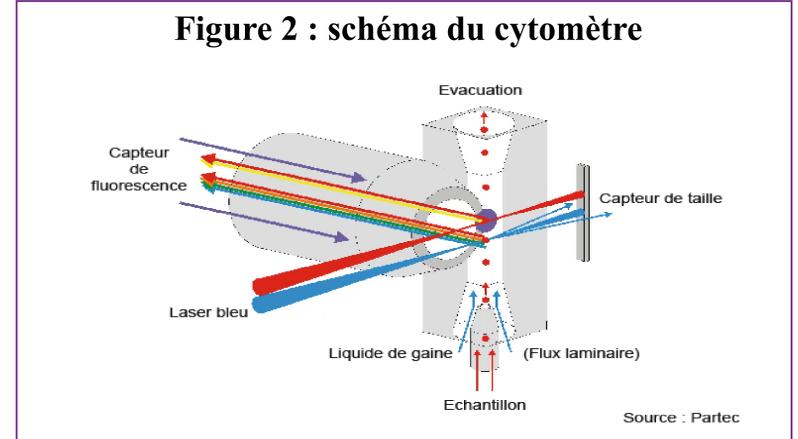
La plage de dénombrements pour l'analyse d'un vin non dilué se situe entre 100 et 1 000 000 cellules/ml. Pour les vins de faible turbidité (en fin d'élevage ou en bouteille), la limite basse peut être diminuée par centrifugation. Ainsi, le seuil de détection est abaissé à environ 10 cellules/ml. La limite haute peut être augmentée par dilution de l'échantillon.

L'écart-type de répétabilité, établi à partir de trois vins, analysés huit fois chacun, est de 5.3 %

◆ Validation avec la méthode de référence en boîte de Pétri

Sur 225 vins en cours d'élevage ou en bouteilles :

- 116 présentent moins de 200 cellules/ml. Le comptage en boîte de Pétri donne en moyenne 13 cellules/ml avec un maximum de 182 cellules/ml.
- 109 présentent plus de 200 levures vivantes/ml. Pour 90 d'entre eux, les valeurs sont fortement corrélées à celles obtenues en boîtes de Pétri (coefficient de corrélation de 0.96). Pour 19 échantillons, la cytométrie de flux révèle une population levurienne non détectée en boîte de Pétri. Ces incohérences peuvent s'expliquer soit par la présence de *S. cerevisiae* (prise en compte en cytométrie de flux) dans un échantillon dont la fermentation alcoolique n'est pas achevée, soit par la présence de *Brettanomyces* sous forme viable non cultivable (Figure 4).



CONCLUSION

La cytométrie de flux est un nouvel outil pour « mieux vivre » avec *Brettanomyces* dans les caves, car elle donne la possibilité d'établir une prévention en temps réel et de connaître le degré d'urgence d'une opération de stabilisation.

Par rapport à l'analyse en boîte de Pétri, la cytométrie de flux peut dans quelques cas surestimer le risque *Brettanomyces* (8 % des cas analysés en prenant en compte les formes viables non cultivables), mais non de le sous-estimer.

Avec des prélèvements au-dessus des lies potentiellement riches en cellules, les seuils d'intervention suivants peuvent être avancés :

- moins de 200 cellules/ml : cuvée non ou faiblement contaminée
- entre 200 et 2000 cellules/ml : cuvée contaminée, à surveiller et à stabiliser dès que possible
- plus de 2000 cellules/ml : cuvée fortement contaminée, à isoler et à stabiliser.