



Pour suivre le risque *Brettanomyces* au cours des étapes de vinification, il est important d'avoir une vision globale et fiable de l'évolution de la population. Pour cela, il est essentiel de bien choisir son analyse en fonction du moment de l'élaboration du vin.

Brettanomyces : bien choisir son analyse pour évaluer le risque

◆ Virginie SERPAGGI (Chargée de recherche Inter Rhône)

La microbiologie est un domaine en constante évolution. Comme tous les aliments, le vin bénéficie de l'enrichissement des techniques d'analyses. Depuis les premières observations de Pasteur en 1866, son suivi microbiologique a fait l'objet de nombreux travaux de recherche, permettant de proposer au vigneron des méthodes de plus en plus pointues et précises pour la détection et la numération des micro-organismes d'intérêt comme *Saccharomyces cerevisiae* ou d'altération comme *Brettanomyces*.

La microscopie optique offre la possibilité de visualiser, sans aucune préparation, les micro-organismes présents dans le vin.

Les différences morphologiques (taille et forme) permettent de différencier facilement les levures des bactéries. En revanche, cette simple observation n'offre pas la possibilité de différencier les micro-organismes vivants des cellules mortes.

La microscopie a ensuite évolué en ajoutant une étape de marquage préalable à l'observation. Le bleu de méthylène peut être utilisé en microscopie en lumière blanche pour différencier les cellules vivantes des cellules mortes.

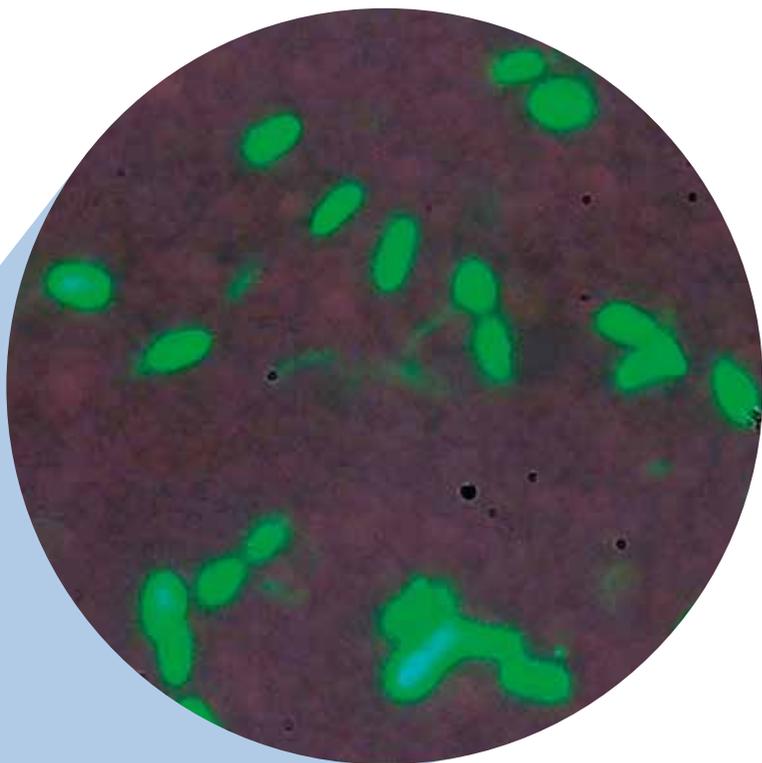
De la même façon, un marqueur fluorescent spécifique des micro-organismes vivants peut être utilisé avec une lampe UV : c'est la microscopie à épifluorescence (photo 1). Cette méthode est rapide et



efficace pour visualiser et dénombrer les cellules viables. Mais, malgré la forme typique de certaines espèces, comme la forme ronde des *Saccharomyces* ou ogivales des *Brettanomyces*, les critères morphologiques ne sont pas suffisamment discriminants pour assurer l'identification.

La méthode dite de "la boîte de Petri" permet quant à elle de révéler la présence des micro-organismes capables de se

◆ La microscopie optique offre la possibilité de visualiser les micro-organismes présents dans le vin à un moment donné. © Inter Rhône



développer sur des milieux gélosés nutritifs (photo 2). Ces milieux peuvent être spécifiques et ne laisser se développer qu'un seul type de micro-organisme pour le mettre en évidence sans être gêné par le développement des autres.

Grace à cette méthode, les cellules capables de se multiplier sur le milieu choisi deviennent détectables et quantifiables. En revanche, les cellules Viables mais Non Cultivables (VNC) ne peuvent pas être détectées par cette méthode. De plus, le temps d'obtention du résultat varie de 2 à 10 jours en fonction du micro-organisme recherché.

Une identification basée sur l'ADN

Les progrès de la biologie moléculaire ont par la suite permis de s'affranchir des inconvénients des méthodes dépendantes des cultures en basant l'identification des espèces microbiennes sur des similitudes de séquences d'ADN.

L'avantage de ces méthodes de biologie moléculaire est que l'on peut choisir le micro-organisme à rechercher grâce à des séquences d'ADN spécifiques. La PCR en point final offre la possibilité de savoir s'il y a présence ou absence d'un micro-organisme dans un échantillon de vin donné. Mais la quantification n'est possible qu'en utilisant la méthode de PCR quantitative. Pour cette technique, la quantité d'ADN détectée est corrélée à la quantité de cellules initialement présentes dans l'échantillon de vin. Mais >>>

Levures et bactéries en microscopie à épifluorescence.

© Inter Rhône

“La microscopie à épifluorescence est rapide et efficace pour visualiser et dénombrer les cellules viables.”



Knowledge grows



Notre art.
Vos chefs-d'œuvre.

Optimisez et pérennisez vos cultures avec nos solutions de nutrition sur-mesure.

Comme Paul, exploitant agricole dans la Drôme, ajoutez à votre palette nos conseils et programmes de fertilisation sur-mesure assurant meilleurs rendements, qualité supérieure et développement idéal de vos cultures. Pour parfaire le tableau, tous les produits Yara sont élaborés en France ou en Europe dans le souci du respect environnemental.

Plus d'informations sur www.yara.fr

Knowledge grows - Le savoir se cultive



ces méthodes étant basées sur la détection de l'ADN, les cellules mortes peuvent être quantifiées et donner lieu à un résultat faussement positif.

La biologie moléculaire et ses évolutions offrent aussi la possibilité d'identifier précisément des micro-organismes inconnus détectés dans un échantillon. Après une étape d'isolement sur milieu gélosé, une extraction d'ADN suivie d'une électrophorèse permettent de visualiser et de comparer les profils obtenus et ainsi d'identifier le micro-organisme.

La technique de cytométrie en flux basée sur des marquages fluorescents peut également être utilisée pour l'analyse microbiologique des vins. Des kits de marquage pour différencier levures vivantes et mortes sont disponibles pour tous les stades de la vinification. En revanche, sur vin rouge, la quantification des bactéries reste problématique avec cette technique. Des systèmes de marquages spécifiques de *Brettanomyces* existent (anticorps, hybridation *in situ*) et permettent une quantification de la levure d'altération tout au long de la vie du vin.

Aucune méthode n'est parfaite

D'une façon générale, on le voit, aucune méthode n'est parfaite. Certaines manquent de spécificité, d'autres passent à côté des cellules Viables Non Cultivables ou ne sont pas fiables pour des faibles concentrations en cellules. Or pour suivre le risque *Brettanomyces* au cours des étapes de vinification, il est important d'avoir une vision globale et fiable de l'évolution de la population. Il est donc essentiel de bien choisir son analyse en fonction du moment de l'élaboration du vin.

Avant de choisir son analyse, il est important de se souvenir de ces quelques points :

- Rechercher *Brettanomyces* dans un moût avant fermentation est très complexe : aucune méthode décrite précédemment, même la plus spécifique, n'est capable de déterminer une quantité fiable de *Brettanomyces* en moût. Un moût est un "bouillon de culture" dans lequel des milliards de micro-organismes différents sont présents. *Brettanomyces* n'étant pas majoritaires, cela revient à chercher une aiguille dans une botte de foin.

- Au cours de la fermentation alcoolique (FA), les méthodes spécifiques comme la qPCR ou la boîte de Petri peuvent permettre une détection de *Brettanomyces*. Mais mieux vaut attendre la fin de la FA où la proportion en *Saccharomyces* va diminuer et ainsi faciliter la détection de *Brettanomyces*.

- Durant la phase de latence entre la FA et la fermentation malolactique (FML), il faut privilégier les méthodes spécifiques car la quantité de *Saccharomyces* vivantes est



AIDE À LA DÉCISION POUR INTERPRÉTER ET INTERVENIR DE FAÇON RAISONNÉE

↳ Colonies de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu gélosé. © Inter Rhône

| Méthode choisie | Ce que je sais grâce à l'analyse | Ce que j'ignore toujours après l'analyse | Le risque que je prends vis-à-vis d'une contamination par <i>Brettanomyces</i> |
|-------------------------------|---|---|--|
| Microscopie à épifluorescence | Nombre de levures et bactéries vivantes | Identité de ces levures et bactéries | Confusion entre <i>Saccharomyces</i> et <i>Brettanomyces</i> : <i>Brettanomyces</i> peut se présenter sous différentes formes parfois proches de <i>Saccharomyces</i> |
| Boîte de Petri | Type de micro-organisme (levure <i>Saccharomyces</i> ou non- <i>Saccharomyces</i> ; bactéries lactiques ou acétiques) | Présence de levures Viables non cultivables (VNC) | En cas de <i>Brettanomyces</i> en état VNC, celles-ci peuvent redevenir cultivables et productrices de phénols volatils dès que les conditions du vin le permettent (diminution du SO ₂ actif, augmentation de la température...) |
| PCR | Présence ou absence du micro-organisme recherché | Viabilité des micro-organismes détectés | <ul style="list-style-type: none"> • En cas de faux-positif : sur-évaluer le risque et avoir une action corrective inutile (sulfitage, filtration...) • En cas de faible concentration en <i>Brettanomyces</i> (moins de 500 cellules/mL), la quantification n'est pas toujours fiable |
| qPCR | Quantité de micro-organismes recherchés | Quantité de bactéries vivantes | |
| Cytométrie en flux | Quantité de levures et/ou de <i>Brettanomyces</i> vivantes et mortes | | En cas de faible concentration en <i>Brettanomyces</i> (moins de 500 cellules/mL) la quantification n'est pas fiable |

encore importante et peut fausser le résultat d'une méthode basée sur les levures totales.

- Juste après un traitement de stabilisation microbienne (filtration, sulfitage...), la quantité de cellules mortes et VNC est non négligeable. Les analyses qui ne sont pas basées sur la viabilité des cellules peuvent fournir des résultats faussement positifs.

La grande diversité des méthodes d'analyses microbiologiques est une force pour

une bonne gestion de la contamination en *Brettanomyces*. Encore faut-il faire le bon choix d'analyse, et **réfléchir au résultat de façon globale**, en prenant en compte l'étape du processus de vinification, l'historique du vin vis-à-vis des traitements, et le biais de l'analyse (cf. tableau) pour interpréter et intervenir de façon raisonnée. ■