

Guide de gestion du risque **BRETT** en cave



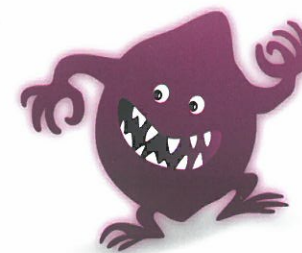
Cette plaquette est le fruit de 3 années de travail du Groupe National de Recherche « **Lutte contre *Brettanomyces*** » qui a regroupé onze partenaires issus d'universités, de centres techniques, d'entreprises de conseil et d'analyse et de plateformes de recherche.

Ce document résume les données essentielles à une bonne gestion du risque ***Brettanomyces*** en cave. Ces informations découlent des recherches menées par le groupe qui se sont organisées autour de trois axes :

- l'étude de la diversité génétique de ***Brettanomyces***,
- le test & la comparaison des différentes méthodes de détection de cette levure,
- la gestion du risque en cave et l'utilisation d'outils d'aide à la décision.

Ce document reste un guide et la spécificité régionale pour la vinification et l'élevage des vins ne doit pas être oubliée. Nous sommes conscients qu'il est impossible de mettre en place une recette standard ou un utilitaire d'alerte universel. Mais les rappels et connaissances récentes présents dans cette plaquette sont là pour vous aider à appréhender le risque de contamination par ***Brettanomyces*** et pour vous guider vers une gestion et une maîtrise du risque.

ZOOM 1



Biodiversité

Il existe une très grande diversité génétique chez ***Brettanomyces bruxellensis***. Les ***Brettanomyces*** du vin se répartissent dans 3 grands groupes génétiques et 3 comportements vis-à-vis du SO₂ :

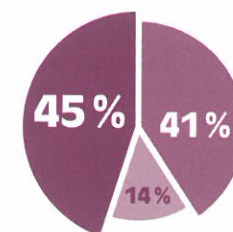
- **SENSIBLES** : quel que soit le niveau de SO₂ actif/moléculaire ajouté, la croissance ou le niveau de population maximale sont impactés.
- **TOLÉRANTS** : l'ajout de SO₂ ralentit la croissance mais n'impacte pas le niveau de population maximale atteinte.
- **RÉSISTANTS** : l'ajout de SO₂ n'impacte ni la croissance ni le temps nécessaire aux levures pour atteindre le niveau maximal de population.

Les souches **tolérantes aux sulfites** sont présentes dans le monde entier. Dans les vins sulfités, ces souches sont favorisées.

Toutes les souches étudiées sont capables de croître en utilisant les substrats carbonés résiduels du vin et toutes sont capables de produire des éthyl-phénols, quel que soit leur groupe génétique.

RÉPARTITION DES SOUCHES

pour 100: ● Sensibles
● Tolérantes
● Résistantes



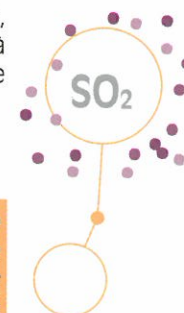
ZOOM 2

Brett & le SO₂

Dans le vin, ces 3 comportements peuvent être rencontrés et sont corrélés au groupe génétique auquel les souches appartiennent.

Un outil de diagnostic a été développé **TYPEBrett** (N° brevet 1559975) permettant, avec une seule PCR appliquée sur des colonies, de vérifier l'appartenance à l'espèce ***Brettanomyces bruxellensis*** et au groupe génétique et ainsi de prédire la tolérance aux sulfites (contact : Microflora).

À NOTER : En cas de contamination, la dose de SO₂ actif doit être adaptée au niveau de population. En effet l'efficacité du traitement sera corrélée à la concentration initiale en ***Brettanomyces*** dans le vin. Il est donc essentiel de connaître, avant de traiter, le niveau de population grâce à une analyse microbiologique.



ZOOM 3

Hygiène du matériel

La présence de **Brett** dans une cuvée est principalement due à une contamination par le matériel et par contamination croisée.

- La diversité des matériaux (bois, béton, inox,...) et la faible nettoyabilité des matériels (barrique, tuyauterie,...) contribuent à la contamination des vins. Les levures du genre ***Brettanomyces*** présentent des propriétés bio-adhésives importantes (forces d'attraction, tension de surface), en particulier sur l'acier inoxydable. En conditions dynamiques maîtrisées (circuit-test), l'adhésion est rapide quand on simule un transfert. Une hygiène irréprochable et optimisée permettra de maîtriser les populations résistantes et survivantes, en particulier à l'approche du conditionnement final. Un point critique est l'utilisation d'un même matériel, non nettoyé, d'un lot à l'autre (par exemple une simple pipette de prélèvement). Il faut donc bien identifier et mettre « en quarantaine » un lot contrôlé présentant une population active de ***Brettanomyces***.

ATTENTION aux contaminations croisées d'un lot à l'autre à cause du matériel. I

Guide de gestion du risque *BRETT* en cave

Je suis *Brett*, et j'adorerais contaminer ton vin !
A ton avis d'où je viens ?

A quel moment vas-tu commencer à me chercher ?

Si ta fermentation alcoolique ralentit ou s'arrête, je suis aux anges !
Je n'ai plus qu'à prendre la place.

Comment vas-tu me gérer au moment de la FML ?



Tu n'as peut-être pas encore senti les signes de ma présence, mais je suis peut-être déjà bien installée...

Moi, j'adore me développer quand le pH est élevé, en présence de sucres résiduels, quand la température augmente, quand la turbidité du vin reste élevée, et en présence d'oxygène (y compris en élevage en fûts).

N'oublie pas que je peux prendre différentes formes...

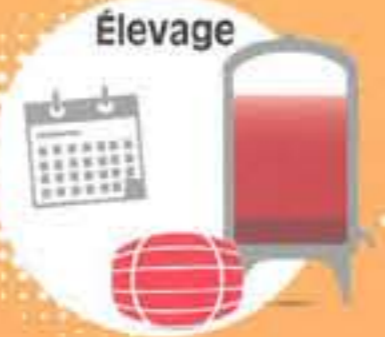


Quelle méthode penses-tu utiliser pour m'éliminer ?

Et si je restais un peu dans le vin pour lui tenir compagnie ?



La contamination la plus fréquente vient souvent du chai où les cellules qui ont survécu sont très bien adaptées au milieu vinaire.



Quel que soit le traitement réalisé, seul un pourcentage de la contamination de départ est éliminé.



Une élimination totale des *Brett* à ce stade est vivement conseillée afin d'assurer une bonne conservation du vin en bouteille.



La présence de *Brettanomyces* dans l'environnement vinicole est inévitable. L'objectif doit donc être d'éviter toute prolifération dans le chai tout en gérant la population naturelle arrivant avec la vendange.



La bonne gestion des fermentations est essentielle. Ne pas laisser une fermentation trainer dans le temps.



Le fait de limiter le délai de réalisation de la FML réduit le temps laissé à *Brettanomyces* pour se développer. L'utilisation de biomasses bactériennes est conseillée, avec une souche sans activité cinnamyl-estérase.



Il est impératif de faire un contrôle microbiologique : au moins avant la stabilisation de fin FML et avant sulfitage pour savoir dans quelles conditions va commencer l'élevage.



Les suivis réalisés sur sites ont confirmé l'idée que les conditions favorables à la croissance des *Brett* sont le facteur majeur de risque, bien plus que la contamination initiale.



Ainsi, plus on attend pour traiter, plus la contamination augmente et plus il est difficile de tomber en dessous du seuil de risque d'altération.



Les changements de température durant les transports ou le stockage peuvent entraîner un redéveloppement important de *Brett*, même à partir de quelques cellules.



On peut commencer les analyses spécifiques *Brett* dès la fin de la fermentation alcoolique, voire sur les cuves en arrêt de fermentation alcoolique.



Les travaux récents montrent aussi que les bactéries lactiques exercent une inhibition vis-à-vis de *Brettanomyces* plus ou moins forte selon la souche considérée. La co-inoculation est aussi un excellent moyen de supprimer la phase de risque avant et pendant la FML, mais elle ne convient pas forcément à tous les vins.



IMPORTANT : un personnel de cave formé aux risques microbiologiques est plus attentif et plus réactif.



Seules les *Brett* viables cultivables produisent des phénols volatils et représentent donc à court terme un risque d'altération du vin. Les *Brett* viables non cultivables font courir un risque à long terme pour le vin, si le niveau de SO₂ actif n'est pas maintenu.



Collage / Soutirage / Clarification sont donc des étapes importantes pouvant diminuer la population microbienne en complément des méthodes de filtration, flash pasteurisation, sulfitage, chitosane. Ainsi il est important de planifier ces étapes tout au long du process pour une diminution efficace du risque.

GROUPE NATIONAL DE RECHERCHE - LUTTE CONTRE BRETTANOMYCES

Une surveillance des populations aux moments clés est le seul moyen de connaître vraiment le risque d'altération. Il faut ensuite raisonner les opérations œnologiques prévues (filtrations, collages, soutirages...) afin de les positionner aux moments où l'on souhaite diminuer les populations. La gestion du sulfitage et de la température de conservation du vin sont des moyens de limiter le développement de *Brettanomyces*.

Enfin, au moment de la mise en bouteille, il faut s'assurer que la population est la plus faible possible pour mieux éliminer les dernières cellules lors de la dernière filtration.

Méthode classique sur milieu gélosé

Le dénombrement en boîte de Petri peut apporter la bonne information pour le suivi en cours de l'élevage. Cette méthode non spécifique est moins coûteuse et techniquement facile à réaliser. En choisissant de faire l'analyse sur un milieu gélosé sélectif de **Brettanomyces**, il est alors possible de quantifier spécifiquement les **Brett** viables et cultivables.

ZOOM 4

Méthode de cytométrie en flux

- La méthode de cytométrie en flux classique renseigne sur la quantité de levures totales présentes dans le vin.
- La méthode de **FISH** couplée à la cytométrie en flux permet en revanche une détection et une numération spécifique des cellules de **Brettanomyces bruxellensis** viables.

ZOOM 5

Méthode de qPCR spécifique de Brettanomyces

La méthode de PCR quantitative permet une détection et une quantification spécifique de **Brettanomyces bruxellensis**, directement dans le vin. Dans de bonnes conditions analytiques, cette technique permet de mettre en évidence la présence de **Brett** même lorsque la contamination est faible. Des kits commerciaux pour la mise en œuvre facilitée de cette méthode sont disponibles pour les laboratoires.

- L'étude interlaboratoire menée dans le cadre du groupe national sur l'utilisation de **ces kits qPCR** a cependant fait apparaître plusieurs points critiques pour cette technique d'un point de vue de la reproductibilité entre laboratoires. Il semble essentiel que:
 - Le manipulateur soit formé **aux techniques de biologie moléculaire**.
 - La quantification tienne compte de **l'état physiologique de Brettanomyces**.
 - La quantification soit réalisée en présence d'**un contrôle positif d'extraction**.
 - La quantification soit réalisée en présence d'**un contrôle positif d'amplification** validant que l'absence de signal est due à l'absence de **Brett** et non à des inhibiteurs de la réaction.
 - La quantification et l'interprétation des résultats tiennent **impérativement compte du contexte œnologique** (traitements antérieurs potentiels).



Méthode Infrarouge

La **spectroscopie infrarouge** doit permettre de développer un diagnostic permettant la détection quantitative de **Brett** ainsi que des éthyl-phénols produits par la levure. Des travaux complémentaires seront nécessaires pour permettre la mise au point d'un modèle prédictif propre à la région viticole concernée.

- L'avantage de cette méthode est **sa portabilité**, l'absence de prétraitement des échantillons de vins et sa grande rapidité (quelques minutes) de mise en œuvre et de résultats.

ZOOM 7

Comment faire un bon prélèvement?

Il est important de réaliser un prélèvement spécifique, en conditions aseptiques proche du fond du contenant (lieu où sédimentent les **Brett**), en évitant la contamination de matériel.

- **FÛTS DE CHÊNE** Il est recommandé d'utiliser une seringue équipée d'un capillaire ou tout autre système de prélèvement jetable permettant de prélever en profondeur en évitant les germes de surface.

ATTENTION :

- **AUX FÛTS DE CHÊNE à forte consume (ex: fûts de chêne neufs). Ils sont à contrôler en priorité.**
- **À LA PROPRIÉTÉ des pipettes de prélèvement.**
- **PENSER À CONTRÔLER la cuve d'ouillage.**

- **CUVES** Il est conseillé de privilégier le fond de cuve et d'utiliser des flacons propres, rincés plusieurs fois avec le vin à analyser. Le nettoyage de la vanne est important pour ne pas contaminer l'échantillon et il vaut mieux éviter le robinet dégustateur.

Dans tous les cas, le délai court entre le prélèvement et l'acheminement au laboratoire est essentiel. L'analyse microbiologique doit **IMPÉRATIVEMENT** être effectuée dans la journée une fois l'échantillon déposé au laboratoire. Il est également important de réaliser ses analyses de suivi toujours dans le même laboratoire afin d'assurer une continuité dans la méthode utilisée.

ZOOM 8



Le groupe remercie **France AgriMer** pour son soutien financier, ainsi que tous les domaines, vigneron et professionnels de la filière qui ont participé de près ou de loin à ce travail.



Contact | Service Technique d'Inter Rhône
technique@inter-rhone.com
2260, route du Grès • 84100 ORANGE
Tél. 33 (0)4 90 11 46 00