



## Bio-adhésion des levures du genre *Brettanomyces* et conséquences sur l'hygiène de la barrique

P.Poupault : IFV Pôle Val de Loire-Centre - Tél : 02 47 23 45 11 [pascal.poupault@vignevin.com](mailto:pascal.poupault@vignevin.com)  
N.Richard : InterRhône, Orange – Tél : 04 90 11 46 00 [nrichard@inter-rhone.com](mailto:nrichard@inter-rhone.com)

### Evaluer le risque par un prélèvement et une technique de numération adaptés, réduire la contamination par des procédures d'hygiène efficaces

La levure d'altération *Brettanomyces* trouve d'excellentes conditions de prolifération dans la pratique de l'élevage en barrique. En effet, cette levure prolifère dans les vins peu clarifiés, qui subissent peu de transferts, dont la teneur en SO<sub>2</sub> libre passe régulièrement en dessous du seuil critique et dont la température est stable et douce. Néanmoins, on peut aussi rencontrer ces conditions lors d'un élevage en cuve inox. Alors comment expliquer la prolifération accentuée de *Brettanomyces* lors d'un élevage sous bois ? Au-delà des conditions physico-chimiques qui favorisent la présence de la levure d'altération, le niveau d'hygiène s'avère primordial. Mais cette notion de « niveau d'hygiène » doit être affinée pour ne plus être assimilée à l'idée que l'hygiène apparente d'un chai est corrélée aux quantités de microorganismes qui y vivent. La « propreté » du chai doit se raisonner à l'échelle microscopique. Le bois est un milieu si poreux que les *Brettanomyces* peuvent le pénétrer jusqu'à un centimètre de profondeur, et lorsqu'elles y sont, il est impossible de les éradiquer totalement. La dissémination des microorganismes s'entretient à chaque entonnage en barrique usagée, dans un cycle sans fin à l'échelle du chai.

Il est inutile de s'alarmer inutilement car *Brettanomyces* ne génère d'altération que lorsque sa population atteint un niveau critique. En pratique, choisir les procédés de nettoyage les plus efficaces (banc d'essai Inter Rhône), les associer dans une procédure de routine maintenant la population en dessous du niveau critique, et savoir réagir rapidement quand elle dépasse ce niveau. Cela nécessite un suivi quantitatif des microorganismes du vin et du bois. La limite de ce suivi microbiologique est que les *Brettanomyces* qui survivent au nettoyage entrent souvent dans un état de résistance, les fameuses « VNC ». La PCR est un outil adéquat pour quantifier ces cellules VNC, mais les extraire du bois nécessite un protocole particulier.

Dans le cadre d'un programme de recherche (financement FranceAgriMer) sur la compréhension des phénomènes d'adhésion à l'origine des altérations des vins, le comportement de la levure du genre *Brettanomyces* a été étudié en conditions statiques (forces d'adhésion) et dynamiques (cinétiques avec pic d'adhésion) sur quelques matériaux. L'étude spécifique du comportement de ce microorganisme dans le cas de l'utilisation des barriques a conduit à la mise en place d'outil pour évaluer les risques et à la mise en place de bans d'essais pour évaluer l'efficacité de techniques d'entretien.

### Une méthode de prélèvement non destructive et une qPCR spécifique

La méthode originale consiste à prélever à l'intérieur de la barrique, sur la douelle opposée au trou de bonde, l'équivalent d'une pièce de monnaie de deux euros (épaisseur et diamètre). Ceci est effectué grâce à une mèche habituellement utilisée pour percer des logements de charnière dans les meubles. Le porte-outil permet de récupérer les copeaux afin qu'ils ne s'échappent pas au cours du perçage, et de pouvoir standardiser la profondeur

de prélèvement en y incorporant une butée. Le porte-outil est fait à façon, en aluminium, pour la légèreté et la résistance à l'alcool utilisé pour désinfecter le matériel entre deux prélèvements (photos 1 et 2). Le porte-outil est adaptable sur n'importe quelle perceuse standard, bien que nous préconisons une machine dotée de réglages de la vitesse de rotation et du couple (à régler sur max pour le couple et min pour la vitesse). La mèche est standard et s'achète en grande surface de bricolage. Ce qui fait que l'outil complet est très peu onéreux, ce qui était un des fondamentaux du cahier des charges pour le transférer facilement aux vignerons.

La mèche débite des petits copeaux de bois, ce qui favorise la pénétration de la solution hydroalcoolique dans l'étape de migration.

Photos 1, 2 et 3 : porte-outil et sa mèche, analyses microbiologiques associées.



	<b>Boite de Pétri</b> • Durée : 7 jours • Détection : cellules en pleine forme = viables cultivables
	<b>Cytométrie de flux</b> • Durée : 1 jour • Détection : viables cultivables + cellules en état de survie = VNC • DDM : spécificité vis-à-vis des autres levures ; fluorescence du bois
	<b>PCR quantitative</b> • Durée : 1 jour • Détection : viables cultivables + VNC + mortes récemment • DDM : extraction ADN génée par les composés du bois

La qPCR se fait en deux étapes : la purification qui consiste à isoler l'ADN de l'échantillon, et l'amplification qui consiste à le multiplier et le quantifier. Tout l'enjeu est de trouver un compromis entre niveau de purification suffisant pour enlever l'inhibition, et pas trop fort pour ne pas trop diminuer la quantité d'ADN car la réaction ne peut se faire qu'à partir d'une certaine quantité. Lors des premières années de banc d'essai, nous avons rapidement été confrontés à cela, avec une répétabilité d'analyse insuffisante. Plusieurs kits de purification utilisés en recherche ont alors été comparés. Puis nous sommes revenus aux kits spécifiques de *Brettanomyces* sur vin disponibles sur le marché des labo-conseils, pour leur côté pratique et facilement transférable. Et enfin nous sommes parvenus à élaborer un protocole robuste et sensible qui allie les avantages de l'un et de l'autre.

Le protocole consiste à utiliser un kit de purification classique de Qiagen (Blood and Tissue), à y ajouter une étape de purification supplémentaire sur pvpp au besoin, et d'y associer le kit d'amplification de R-Biopharm. Cette combinaison est le meilleur compromis que nous ayons trouvé entre coût et fiabilité.

## Associer les procédés de nettoyage les plus efficaces

Les deux premières années ont permis de mettre en place une méthodologie de prélèvement de bois dans les barriques puis de comparer les procédés de nettoyage les plus utilisés par les vignerons de la Vallée du Rhône. Pour la troisième année, le but était d'explorer de nouveaux procédés peu répandus sur le marché ou en cours de mise au point industrielle, c'est pourquoi nous avons (re)testé : les ultrasons haute puissance, l'ozone gazeux, le méchage sous pression, les produits chimiques sans permanganate et enfin un procédé combinant la vapeur et l'eau chaude sous pression. De nouvelles techniques de nettoyage sont testées :

- Les ultrasons à haute puissance

Ce procédé permet l'élimination des dépôts de tartre, des polyphénols ainsi que les biofilms. Pour le bon fonctionnement de ce procédé, un générateur d'ultrasons à haute fréquence (>150 kHz, 1 à 4 kW) est utilisé. La barrique doit être remplie avec de l'eau à 60°C pour plus d'efficacité. La fréquence des ultrasons dépend de l'âge de la barrique et de la concentration en micro-organismes. L'énergie libérée par cavitation (implosion des microbulles) crée une onde de choc. Les hautes fréquences permettent de générer des

pressions importantes et de très fortes augmentations de températures de façon locales, ce qui favorise l'atomisation des dépôts fixés sur le bois et l'éclatement des cellules des micro-organismes présents. (Chatonnet, 2011). La barrique est tout d'abord remplie avec de l'eau chaude à 65°C grâce à une canne. Ensuite, une sonde plonge à travers le trou de la bonde dans la barrique et le traitement à ultrasons commence. Une surpression de 0.2 bar est maintenue durant la durée du traitement. La durée du traitement dépend de l'âge de la barrique et de son niveau de contamination. Enfin, la barrique est vidée.

Les trois barriques contaminées (J, P, U) ont été traitées de la même manière : 10 minutes.

- Le méchage sous pression

C'est une désinfection au SO<sub>2</sub> à l'aide d'une bonbonne de sulfitage classique des vins en cuve. Le gaz, en se dépressurant à l'intérieur de la barrique, produit une surpression de 0.3 bars à l'intérieur de la barrique, ce qui favoriserait la pénétration du gaz dans les couches profondes du bois. Toutefois, cette légère surpression se stabilise à 0.1 bar au bout de 30 secondes, pour durer toute la durée du traitement, que l'on a fixé à 20 minutes mais qui doit se faire bien plus rapidement en théorie puisqu'il s'agit d'un traitement choc.

La barrique C a été traitée à 20g/barrique (10g/hL) et la barrique E à 10g/barrique (5g/hL = dose classique de méchage).

- L'ozone gazeux

L'ozone gazeux est un des désinfectant les plus puissant qu'il existe, il est utilisé notamment dans le domaine médical et le traitement des eaux. Son principe d'action est la création d'un pouvoir oxydant qui provoque l'élimination des micro-organismes, mais qui attaque plus globalement toutes les molécules organiques. Il s'agit donc d'un puissant poison pour l'homme, c'est pourquoi son utilisation avait été abandonné par manque de sécurité pour l'utilisateur dans les caves.

La solution industrielle mise au point ici est sécurisante pour l'utilisateur, puisque tout le gaz injecté dans la barrique est renouvelé et purifié en cours de traitement. La dose est de 100ppm, ce qui est une dose théoriquement suffisante au vu des résultats obtenus en laboratoire. Le gaz est en légère surpression de 0.2 bars durant toute la durée de traitement, qui est de 30 minutes pour la barrique B, 20 minutes pour la H et 10 minutes pour la L.

- Le trempage au produit chimique désinfectant sans permanganate

Il s'agit d'un trempage similaire au produit soude/permanganate, à ceci près que le permanganate est remplacé par une solution contenant, entre autres, de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le trempage peut être réalisé sur barrique juste vidée, donc sale, ce qui fait l'originalité de ce procédé par rapport aux autres testés cette année. La barrique est entièrement remplie d'une solution de soude pour un trempage statique de 24 heures, puis vidée, rincée à l'eau, et remplie de 30 litres d'une solution de désinfection à l'eau oxygénée., pour un mouillage dynamique (remuer la barrique de temps en temps) de 30 minutes. La barrique n'a pas besoin d'être rincée après ce deuxième trempage, elle doit être stockée telle quelle.

- La combinaison simultanée de la vapeur et de l'eau chaude sous pression

Le principe de base est la canne utilisée pour l'eau chaude sous pression. Des modifications sont apportées pour créer moins de pression sur le bois et plus d'humectation de la barrique. Les buses sont modifiées de sorte que l'eau sortant de la canne est à pression moitié moindre que classiquement, mais avec le même débit et la même pression d'eau, ce qui entraîne une micronisation de l'eau et permet de générer une sorte de vapeur qui sature l'intérieur de la barrique à la manière d'un générateur classique. La température de l'air intérieur peut atteindre 90°C une demi-heure après la fin du traitement, qui dure 10 minutes.

Pour chaque lavage on a utilisé 3 barriques différemment contaminées au vu des derniers résultats. Puis, pour chaque nettoyage, on a réalisé ce protocole (figure 1) :

- Rinçage à l'eau froide
  - Prélèvement avant nettoyage
  - Nettoyage, le même sur les trois barriques
  - Prélèvement après nettoyage
- Traitement de finition : une barrique méchée puis mise en vin, deux barriques directement mise en vin. La barrique méchée n'est remplie qu'une semaine après méchage, et rincée par trempage à l'eau de 24h, pour ne pas trop sulfiter le vin stérile introduit, ce qui apporterait un biais dans la cinétique de recontamination.

Pour déterminer quel est statistiquement le nettoyage le plus efficace sur le bois, nous avons choisi de réaliser une analyse de variance (ANOVA) (tableau 1). Nous avons laissé de côté la profondeur car le manque de micro-organismes dans celle-ci ne nous permettait pas de traiter les données statistiquement.

Tableau 1 : Test de Duncan

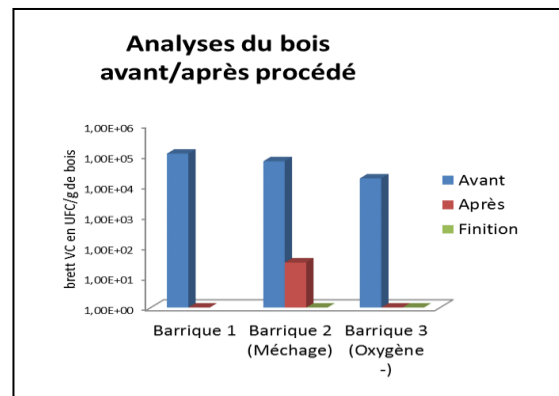
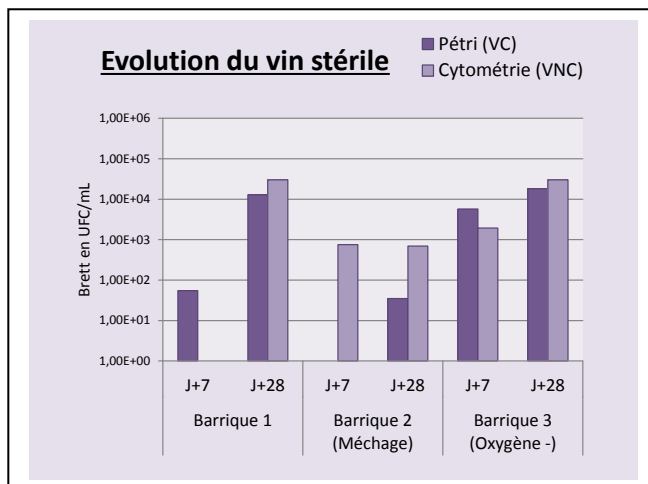
Modalité	Moyenne estimée	Groupes	
ultrasons	2,423	A	
méchage sous pression	2,232	A	B
vapeur + eau chaude sous pression	1,840	A	B
ozone gazeux	1,656		B
<b>trempage chimique</b>	<b>0,326</b>		<b>C</b>

Classement basé sur une estimation quantitative (non statistique) de l'effet sur le bois :

<i>Perte de Brett après traitement par rapport à la population initiale :</i>	<u>De la surface intérieure à -3 mm</u>	<u>De -3 mm à -6 mm de profondeur</u>
<b>Vapeur (barriclean 10min 110°C)</b>	<b>3 log</b>	<b>2 log</b>
<b>Ultrasons (dyogena 10min)</b>	<b>2 log</b>	<b>1,5 log</b>
<b>Méchage sur vin (5g/hL)</b>	<b>2 log</b>	<b>1,5 log</b>
<b>Eau chaude sous pression (canne Moog 7 min 70°C 100bars)</b>	<b>2 log</b>	<b>1 log</b>
<b>Eau ozonée</b>	<b>0,5 log</b>	<b>négligeable</b>
<b>Soude/permanganate</b>	<b>négligeable</b>	<b>négligeable</b>

On voit qu'il y a donc une différence significative entre les procédés (exemple pour l'eau chaude sous pression, graphiques 1 et 2). Ci-dessus, le test de Duncan qui classe l'efficacité des procédés. Les résultats sont à relativiser avec l'expérimentation car la perte de puissance dépend aussi de la quantité de *Brettanomyces* contenu dans le bois avant le nettoyage. Mais, on peut tout de même conclure, que les ultrasons sont le procédé le plus efficace avec une moyenne de perte sur la surface de 4 log. A l'inverse, le trempage chimique sans permanganate est le moins efficace avec une perte de 0,4 log, ce qui est confondu avec l'incertitude de mesure, donc négligeable.

**Graphiques 1** : Incidence de l'eau chaude sous pression sur la population de levures dans le bois pour trois barriques ; avant/après traitement, et après traitement de finition (barrique 1 méchage et mise en vin décalée / barrique 2 méchage et mise en vin / barrique 3 + Oxygène négatif et mise en vin) - InterRhône.



**Graphique 2** : Incidence de l'eau chaude sous pression sur la population de levures dans le vin 7 et 28 jours après traitement et entonnage, après traitement ou non de finition (barrique 1 méchage et mise en vin décalée / barrique 2 méchage et mise en vin / barrique 3 + Oxygène négatif et mise en vin) - InterRhône.

## Conclusion - perspectives

Ces quatre années d'expérimentation nous ont permis de conclure qu'il est possible de maîtriser la dissémination de *Brettanomyces* à chaque soutirage de barrique et que l'idée de stériliser une barrique est à abandonner. Néanmoins, certains procédés de nettoyage disponibles sur le marché ont montré une efficacité remarquable, suffisante à maintenir les populations de *Brettanomyces* en dessous du seuil critique, pourvu qu'ils soient employés dans les bonnes conditions.

En pratique, choisir les procédés de nettoyage les plus efficaces (résultats du banc d'essais), les associer dans une procédure de routine maintenant la population en dessous du niveau critique, et savoir réagir rapidement quand elle dépasse ce niveau. Des améliorations et adaptations de ces matériels à chaque configuration de cave sont souhaitables et possibles.

Cette démarche nécessite par contre un suivi quantitatif des microorganismes du vin et du bois. Ce suivi peut être effectué grâce à l'outil de prélèvement de bois non destructeur qui est maintenant au point. La limite de ce suivi microbiologique est que les *Brettanomyces* qui survivent au nettoyage entrent souvent dans un état de résistance, les fameuses « VNC ». La PCR est un outil adéquat pour quantifier ces cellules VNC à condition d'utiliser le protocole mis au point par Inter Rhône.

Tester les autres matériels disponibles sur le marché pourrait être envisagé, mais la priorité est désormais au transfert de la connaissance auprès des vignerons, et au transfert des outils permettant globalement une meilleure maîtrise. Pour ce transfert, les laboratoires-conseils de terrain semblent être les mieux indiqués car ce sont eux qui réalisent les analyses et qui ont la capacité d'expertise indispensable à la bonne mise en œuvre des outils de diagnostic développés.

**Copyright MatéVi. Toute reproduction totale ou partielle des contenus est strictement interdite. Pour pouvoir les diffuser, contactez-nous.**