



SMARTLINK

## Une offre exclusive du laboratoire EXCELL.

**TYP\Brett** : détection et quantification des souches *Brettanomyces bruxellensis* résistantes aux sulfites, pour une stratégie raisonnée de prévention de l'altération des vins.

Malgré de nettes avancées en matière d'œnologie préventive, *Brettanomyces bruxellensis* demeure toujours la première cause de contamination microbienne des vins. Certaines problématiques arrivent de façon très pernicieuse, notamment en fin d'itinéraire alors que les teneurs en SO<sub>2</sub> libre semblent parfaitement adaptées pour limiter la croissance des *Brettanomyces bruxellensis*.

Les équipes de recherche de l'ISVV de Bordeaux d'**Isabelle Masneuf et de Warren Albertin ont récemment démontré que la résistance aux sulfites des souches de *Brettanomyces bruxellensis* est fonction de leur patrimoine génétique.** Lors de ces travaux, plusieurs centaines de souches ont été caractérisées. Des isolats ont été discriminés par analyses génétiques des microsattelites (zones répétées du génome), ce qui a permis de distinguer des groupes de souches diploïdes et triploïdes (trois lots de chromosomes au lieu de deux).

Plusieurs représentants de chaque groupe ont été analysés afin de déterminer leur résistance ou leur sensibilité aux sulfites. 40% des souches testées se sont avérées résistantes aux sulfites aux concentrations usuelles de 0,4 mg/L de SO<sub>2</sub> moléculaire. Cela explique pourquoi certaines déviations arrivent malgré des teneurs en SO<sub>2</sub> libre tout à fait cohérentes avec les recommandations habituelles. **Toutes les souches résistantes aux sulfites ont la particularité de présenter une triploïdie spécifique ce qui a permis le développement d'un test moléculaire afin de les détecter et de les dénombrer, le test TYP\Brett.**

Le laboratoire EXCELL dispose de tous les outils analytiques possibles pour l'analyse de *Brettanomyces bruxellensis*. Notre objectif n'est pas de promouvoir une technique plutôt qu'une autre mais d'aider nos partenaires à disposer de l'outil qui leur sera le plus utile en fonction des situations. Dans cet optique, dès les premières communications d'Isabelle Masneuf et de Warren Albertin nous nous sommes fortement intéressés à leurs travaux. Ces derniers mois le recours au test TYP\Brett nous a permis de caractériser la résistance aux sulfites des souches de *Brettanomyces bruxellensis* isolées sur raisins et dans les vins analysés au laboratoire mais aussi lors d'audits d'hygiène en caves. **Cela a d'ores et déjà livré de nombreuses indications très intéressantes :**

- L'immense majorité des souches de *Brettanomyces bruxellensis* présentes au vignoble sont sensibles aux sulfites.
- Les souches résistantes aux sulfites sont très souvent les plus féroces en termes de production des phénols volatils.
- La part de souches résistantes dans les moûts puis dans les vins varie en fonction des paramètres physicochimiques mais aussi des pratiques œno-techniques mises en œuvre (le sulfitage évidemment mais pas que...). Cette répartition varie aussi en fonction des sites de productions.
- Les souches isolées de l'atmosphère, à la surface des contenants ou du petit matériel sont dans l'immense majorité des souches triploïdes résistantes au SO<sub>2</sub>.

Ces données livrent de précieuses informations dans la compréhension des voies de colonisations. Certaines souches de *Brettanomyces* sont bel et bien présentes au vignoble sur les raisins mais elles diffèrent des souches présentes à la cave qui ont su développer des mécanismes de résistance à cet environnement hostile, notamment la résistance au SO<sub>2</sub>. Récemment, des microbiologistes travaillant sur les levures des boissons (vins, bières...), ont dessiné un arbre phylogénétique particulièrement intéressant. En haut de cet arbre se situe *Saccharomyces cerevisiae* qu'ils considèrent comme la levure la plus « primitive », c'est-à-dire celle qui a le moins évolué. En bas de cet arbre se trouve *Brettanomyces*, preuve que cette espèce est capable de développer de remarquables outils lui permettant de disposer d'avantages adaptatifs en fonction des conditions, notamment la résistance aux sulfites dans les vins.

Lors des vinifications 2018 nous avons suivi la répartition des souches sensibles et résistantes dans différents domaines. Les résultats du tableau ci-dessous montrent qu'effectivement plus les conditions sont contraignantes (FA languissantes par exemple), plus les souches résistantes prennent le dessus rapidement. À ce jour, nous sommes persuadés que limiter la prise de pouvoir des souches résistantes est un enjeu majeur pour la lutte raisonnée et préventive contre les altérations des vins par les phénols volatils.

	Souches de <i>Brettanomyces</i> diploïdes sensibles au SO <sub>2</sub>	Souches de <i>Brettanomyces</i> triploïdes résistantes au SO <sub>2</sub>
Analyses réalisées sur raisins 2018.	100%	Ø
En fin de FA dans des vins sans problèmes fermentaires.	85%	15%
En fin de FA dans des vins avec problèmes fermentaires.	25%	75%
Dans les vins 2018 qui présentaient déjà plus de 30 µg/L de phénols volatils en décembre 2018.	5%	95%
Souches isolées lors d'audit en caves après les vinifications.	5%	95%

Certains partenaires pilotent déjà leur suivi microbiologique en s'appuyant sur cette distinction entre les souches sensibles et les souches résistantes. Cela permet d'éviter de recourir inutilement (si les principales souches présentes sont résistantes) ou de façon contreproductive (permettre aux souches résistantes de mettre à profit leur avantage adaptatif pour devenir majoritaires) aux

sulfites. Il est probable que procéder à des sulfitages à forte dose favorise les phénomènes d'adaptation et de résistance. En effet, un groupe d'individus dit « super-résistants » a déjà été isolé de propriétés dont l'usage des sulfites s'effectue à des concentrations supérieures à celles recommandées habituellement.

### Plusieurs applications du TYP\Brett sont envisageables

- Dans le cadre d'un suivi régulier des teneurs en phénols volatils\*, lors d'une hausse des concentrations, TYP\Brett permet de déterminer si l'usage du SO<sub>2</sub> est adapté pour limiter la contamination ou bien s'il est plus efficace de recourir à d'autres actions (chitosane, filtration, traitements thermiques...).
- Lors des deux premiers ajouts notables de SO<sub>2</sub> dans l'itinéraire de vinification, à l'encuvage et à la fin de la FML, TYP\Brett permet un ajustement précis de la dose de SO<sub>2</sub>.
- Dans le cadre des audits d'hygiène des installations vinicoles, TYP\Brett permet de valider les processus d'entretien des fûts (méchage...) ou du petit matériel (rinçage avec de l'eau sulfitée).
- En fin d'itinéraire, TYP\Brett permet d'éviter le surdosage des sulfites, le risque étant d'en utiliser inutilement et d'induire une modification des équilibres REDOX (fermeture des vins à la mise en bouteille).

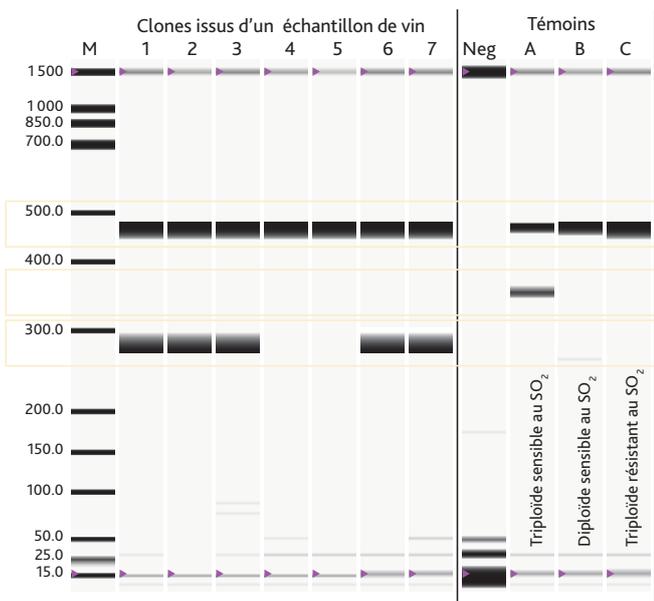
### La démarche analytique est la suivante

1. Un dénombrement de la population totale de *Brettanomyces* dans l'échantillon.

2. Un test TYP\Brett réalisé sur un nombre de clones représentatif de la population dénombrée.

Le résultat fourni par l'expertise TYP\Brett correspond à la population totale de *Brettanomyces* avec le % de souches résistantes au SO<sub>2</sub>.

La figure ci-dessous illustre cette démarche au travers d'un cas concret.



Le TYP\Brett, c'est le dénombrement de la population totale de *Brettanomyces bruxellensis*, le pourcentage de souches résistantes, la mesure du SO<sub>2</sub> libre et total et le calcul du SO<sub>2</sub> actif.

#### Interprétation

Le dénombrement de la population totale de *Brettanomyces* indique une population totale de 5.10<sup>1</sup> UFC/mL.

7 colonies sont analysées au TYP\Brett, 5 d'entre elles sont des souches triploïdes résistantes au SO<sub>2</sub> et 2 sont des souches diploïdes sensibles au SO<sub>2</sub>.

#### Conclusion

Le vin analysé présente une population notable de *Brettanomyces bruxellensis* dont 70% de souches résistantes au SO<sub>2</sub>. Afin de réduire la population et de limiter les risques contaminations, il est préférable d'opter pour un autre traitement que le réajustement en SO<sub>2</sub> libre.

#### Légende

- M : Marqueur de poids moléculaire
- 1 à 7 : Profils génétiques de colonies isolées d'un vin
- Neg : Témoin négatif
- A : Souche de référence triploïde sensible au SO<sub>2</sub>
- B : Souche de référence diploïde sensible au SO<sub>2</sub>
- C : Souche de référence triploïde résistante\* au SO<sub>2</sub>

\*capacité à se développer même si le SO<sub>2</sub> actif dans le vin est ≥ 0,4 mg/L.



En plus de quantifier la population totale de *Brettanomyces bruxellensis*, TYP\Brett est aujourd'hui le seul test d'analyse microbiologique qui combine la précision du typage génétique avec des informations pratiques sur l'action à mener pour contrôler le développement des cellules et donc l'altération des vins.

\* Même si ces dosages sont devenus de plus en plus « routiniers », il est essentiel de bien veiller à la précision et à la sensibilité des dosages réalisés. Le laboratoire SARCO est accrédité COFRAC sur le dosage du 4-éthylphénol et du 4-éthylgâicol.

### Pour plus d'informations

KtXZci`G: CDJ ;  
9 7XiZj ġ< YcYgVããWtdidġ: MB: AA`  
kġcdj [5 àWZnXZã#Xdb