

En résumé

Ces travaux de l'IFV montrent que toutes les cuvées suivies contiennent des phénols volatils en fin d'élevage, ce qui implique une présence de levures *Brettanomyces*. La cytométrie de flux permet de mettre en évidence une présence de levures vivantes plus ou moins importante selon les cuvées. Elle n'est pas une technique spécifique pour la détection des *Brettanomyces*. Toutefois, une fois la fermentation alcoolique terminée, les levures présentes sont, de manière quasi-exclusive, des *Brettanomyces*. Aussi, l'utilisation du cytomètre de flux permet une quantification rapide des populations levuriennes et s'avère un précieux outil de suivi de cette flore microbienne d'altération. En effet, les croissances levuriennes peuvent

survenir à tout moment. La connaissance de ce développement permet au vinificateur d'intervenir en conséquence et de maintenir la teneur en phénols volatils en dessous du seuil de perception (variable selon la composition du vin). Des développements sont en cours afin d'améliorer la spécificité et les performances de la détection par cytométrie de flux.

NB : une prestation complète de suivi des populations de *Brettanomyces* par cette méthode, est proposée par le Centre Œnologique de Bourgogne. Le BIVB assure une prise en charge ponctuelle à hauteur de 50 % du coût de la prestation. *Pour en savoir plus, contactez votre laboratoire.*

Pour en savoir plus :

- *Les Brettanomyces, ce qu'il faut savoir* par Béatrice Vincent (IFV) et Eve Gueydon (BIVB) - plaquette technique BIVB
- *Utilisations pratiques de la cytométrie de flux pour les suivis des levures œnologiques* par Vincent Gerbaux et Jérôme Thomas (IFV) - 2009 - Revue Française d'Œnologie, n° 236, p 8-13
- *Dénombrement rapide de Brettanomyces dans un vin rouge par cytométrie de flux* par Vincent Gerbaux (IFV) - 2007 - Revue des Œnologues, n° 123, p 21-23

PÔLE TECHNIQUE ET QUALITÉ DU BIVB
CITVB
6 rue du 16^e chasseurs - 21200 Beaune
Tél. 03 80 26 23 74 - Fax. 03 80 26 23 71
technique@bivb.com

La cytométrie de flux

Ce qu'il faut savoir

Vincent Gerbaux
Jérôme Thomas
(IFV, Unité de Beaune)

Les phénols volatils

Les phénols volatils sont des composés responsables des notes de cuir, d'encre, de gouache, de sueur de cheval ou même d'écurie. Leur seuil de perception dans les vins rouges est de l'ordre de 500 µg/l. Leur production est le fait d'une levure du genre *Brettanomyces*.

Cette levure possède des aptitudes particulières à se développer dans un vin considéré comme sec, qu'il soit en attente de fermentation malolactique, en cours d'élevage ou même en bouteilles. *Brettanomyces* est, de ce fait, une levure commune dans les chais.

Suivi des populations de *Brettanomyces*

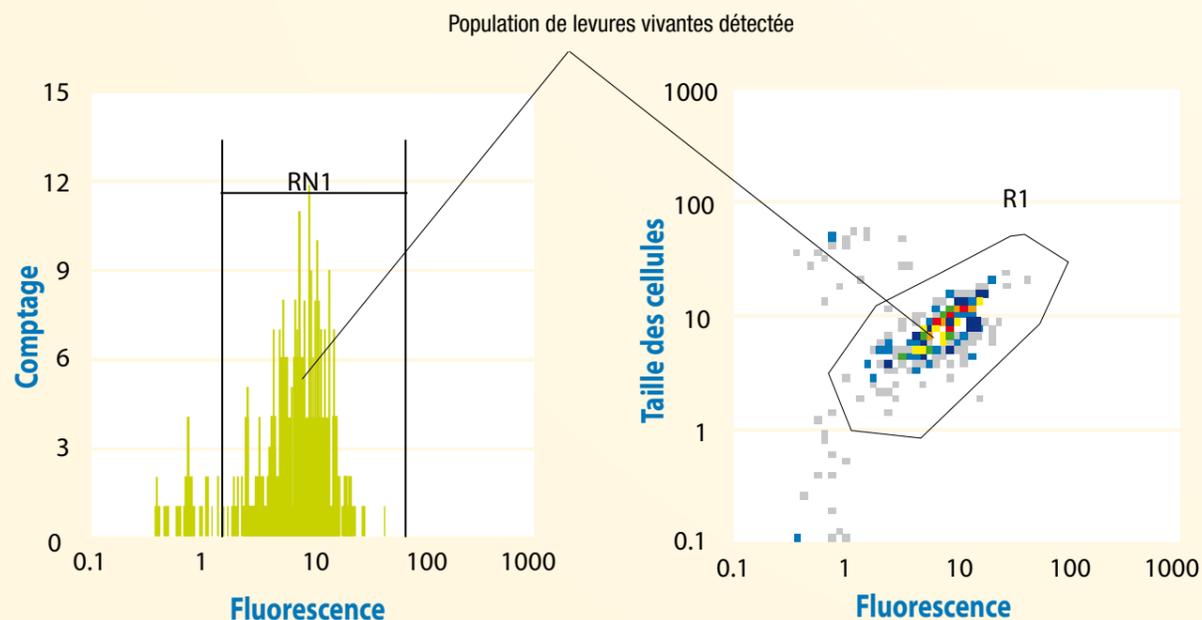
Le suivi de la population de *Brettanomyces* renseigne sur la nécessité d'une opération de stabilisation. Différentes techniques sont aujourd'hui disponibles. La cytométrie de flux présente l'avantage de la rapidité pour un coût limité. La méthode mise au point par l'Institut Français de la Vigne et du Vin - Unité de Beaune (IFV), n'est cependant pas spécifique et détermine les levures vivantes. Marquées par un fluorochrome, celles-ci sont entraînées dans un flux laminaire et détectées par un rayon laser. Les résultats indiquant une population nulle ou très limitée (moins de 100 cellules par ml) ne posent aucun problème d'interprétation. Les résultats indiquant une population élevée nécessitent une interprétation œnologique et éventuellement une analyse complémentaire sur boîtes de Pétri.

Comme pour toute méthode microbiologique, le prélèvement est un point clé. Une cellule de *Brettanomyces*, de par son poids, a tendance à sédimenter au niveau des lies. Le prélèvement doit donc être effectué au fond du contenant au-dessus de la zone des lies (soit environ 10 cm du fond du fût). Celui-ci doit être réalisé avec du matériel stérile et ne doit pas être pollué par des germes de surface ou de contamination de matériel. Un système de prélèvement spécifique, composé d'une seringue et d'un capillaire, a été développé conjointement entre l'IFV et le Centre Œnologique de Bourgogne.



Cytomètre de flux dédié à l'œnologie

Comptage de levures vivantes par cytométrie de flux, résultats en moins de 15 min.



Résultats de suivis par cytométrie de flux

L'IFV a suivi, pour les millésimes 2007 et 2008, différentes cuvées de Pinot Noir de domaines. Des déterminations analytiques ont été espacées de un à trois mois selon les cas. Les différentes situations présentées montrent qu'il n'y a pas de règle concernant le moment et l'importance du développement de *Brettanomyces*.

Des études conduites, aussi bien en Bourgogne que dans le Bordelais, montrent qu'un développement levurien dans un vin sec peut pratiquement être attribué exclusivement à *Brettanomyces* (cf. situations 1, 2, 3 et 4). L'utilisation du cytomètre permet donc un suivi des populations de *Brettanomyces* pendant l'élevage. Si le sulfitage

de fin de FML permet une forte réduction de la population de cette levure d'altération, celui-ci n'assure pas pour autant une stabilisation durable. Si la population de *Brettanomyces* peut fluctuer au cours du temps, les phénols volatils, directement imputables à la présence et au métabolisme de ces micro-organismes, s'accumulent. Il est alors important de ne pas dépasser un seuil de l'ordre de 500 µg/l, pour préserver les qualités intrinsèques du vin. L'importance d'un suivi régulier de *Brettanomyces* au cours de l'élevage prend alors tout son sens.

Exemples de situations rencontrées durant le suivi des cuvées de Pinot Noir pour les millésimes 2007 et 2008 :

Situation 1	100 à 1 000	1 000 à 10 000	Stabilisation fin de FML	< 100	< 100	Phénols volatils 410 µg/l
	Automne 15 à 20°C	Hiver 15 à 20°C		Printemps 15 à 20°C	Été 15 à 20°C	
Croissance levurienne constatée en début d'élevage Production de phénols volatils proche du seuil de perception						
Situation 2	< 100	1 000 à 10 000	Stabilisation fin de FML	< 100	100 à 1 000	Phénols volatils 170 µg/l
	Automne 15 à 20°C	Hiver 10 à 15°C		Printemps 10 à 15°C	Été 15 à 20°C	
Croissance levurienne constatée en hiver puis en été Production limitée de phénols volatils						
Situation 3	< 100	< 100	Stabilisation fin de FML	1 000 à 10 000	< 100	Phénols volatils 340 µg/l
	Automne 10 à 15°C	Hiver < 10°C		Printemps 10 à 15°C	Été 15 à 20°C	
Croissance levurienne constatée au printemps Production de phénols volatils en dessous du seuil de perception						
Situation 4	< 100	< 100	Stabilisation fin de FML	< 100	100 à 1 000	Phénols volatils 140 µg/l
	Automne 15 à 20°C	Hiver < 10°C		Printemps 10 à 15°C	Été 15 à 20°C	
Croissance levurienne constatée en été Production limitée de phénols volatils						
Situation 5	> 10 000	> 10 000	Stabilisation fin de FML	< 100	< 100	Phénols volatils 170 µg/l
	Automne 15 à 20°C	Hiver 15 à 20°C		Printemps 15 à 20°C	Été 15 à 20°C	
Présence levurienne importante en début d'élevage liée à la présence de sucres résiduels. Production limitée de phénols volatils						

La situation 5 est particulière et illustre la limite d'utilisation du cytomètre de flux due à sa non spécificité de détection. En début d'élevage, le vin contient encore des sucres résiduels correspondant à une fin de fermentation alcoolique languissante. Les levures

détectées sont des levures totales sans que l'on puisse distinguer les *Sacharomyces cerevisiae* des *Brettanomyces*, leur détection spécifique est alors impossible.