

Bretts Sitôt dit, cyto fait

Deux nouvelles méthodes permettent de détecter et de quantifier les Bretts présentes dans un vin en une journée. Enquête dans la vallée du Rhône et à Bordeaux sur ce qui les distingue.

« **H**istoriquement, on dénombre les levures présentes dans un échantillon de vin dans une boîte de Petri. Mais cette méthode présente une limite importante : elle ne détecte pas les cellules viables non cultivables, les VNC », introduit Laurent Massini, responsable microbiologie au Laco, à Suze-la-Rousse (Drôme). Ces VNC sont des cellules vivantes à l'état de repos ; elles ne se divisent pas. Pour cette raison, elles échappent au dénombrement en boîte de Petri. « Or, dans le cas de Brettanomyces, il ne faut pas les négliger puisqu'elles peuvent s'activer par la suite », indique Laurent Massini.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) n'a pas ce défaut d'oublier une partie des levures de



contamination. Depuis une dizaine d'années, l'une de ses variantes, la qPCR s'est considérablement développée. Elle est devenue la référence en termes de quantification de *Brettanomyces*.

« **La qPCR extrait et amplifie l'ADN des Bretts.** Elle permet d'obtenir une concentration en cellules/ml. La limite ? Elle prend en compte l'ADN des cellules vivantes et aussi celui des cellules mortes », explique Laurent Massini. Ainsi, à l'inverse du dénombrement sur boîte de Petri, la qPCR surestime les populations. On risque donc d'intervenir inutilement ou trop vigoureusement sur un vin.

Pour surmonter ce défaut, « nous avons développé une nouvelle méthode pour quantifier les Bretts par vPCR que nous commercialisons depuis octobre », annonce le biologiste. La vPCR ? Viability Polymerase Chain Reaction, grâce à laquelle ce laboratoire mesure les Bretts viables et les VNC présentes dans un échantillon, mais pas les cellules mortes.

« Nous éliminons les cellules mortes pendant la préparation de l'échantillon. Après cela, l'analyse par PCR reste la même », explique Laurent Massini. Au préalable, l'opérateur ajoute une molécule qui s'installe dans toutes les cellules. « Les Bretts vivantes l'excrètent tandis que les mortes l'accumulent. On peut ainsi les éliminer avec les autres débris cellulaires. »

La concentration en Bretts viables et VNC est fournie au vigneron en 24 heures. L'analyse est réalisable à tous les stades de la vie du vin, depuis le moût jusqu'à la mise en bouteille. « Dans les moûts, c'est un peu plus délicat car beaucoup de micro-organismes sont présents, mais la détermination reste possible », nuance le chercheur.

Le prix ? 59 € HT par échantillon, avec un coût dégressif suivant le nombre d'analyses demandé. Pour comparaison, dans le même laboratoire, il faut compter 23 € HT pour une analyse classique sur boîte de Petri et 50 € HT pour une qPCR. « Nous avons de plus en



« Nous quantifions les Bretts par vPCR. Nous éliminons les cellules mortes pendant la préparation de l'échantillon »

Laurent Massini, responsable de microbiologie au laboratoire Laco (Drôme). © LACO

Un contrôle régulier

« Nous avons recours aux essais interlaboratoires pour évaluer nos résultats par vPCR », explique Laurent Massini, responsable de microbiologie au Laco de Suze-la-Rousse (Drôme). Cela fait partie de notre contrôle qualité. » Une dizaine de laboratoires de la région analysent un échantillon fourni par la société Bipea. « Nous sommes les seuls, à ma connaissance, à pratiquer la vPCR. Les autres travaillent sur des boîtes de Petri ou par qPCR », ajoute-t-il. Les résultats de ces différentes méthodes ne sont pas directement comparables, mais ils donnent une indication précieuse au Laco. En effet, pour que ces dénombrements soient justes, ils doivent se situer entre la valeur trouvée en boîte de Petri – méthode qui quantifie uniquement les cellules viables – et celle évaluée par la qPCR qui quantifie tout l'ADN, y compris celui des cellules mortes. Le dénombrement par vPCR ne peut pas donner une population de Bretts inférieure au dénombrement en boîte de Petri, ni supérieure à la qPCR.

plus de demandes pour la vPCR. Elle remplace complètement la qPCR », précise Laurent Massini.

À Libourne, le laboratoire Cēnoteam mise sur une tout autre méthode. « Nous avons complètement remplacé la PCR au profit de la cytométrie en flux », annonce Marie-Laure Badet-Murat, œnologue associée et responsable R & D de ce laboratoire. La cytométrie en flux consiste à rendre les levures fluorescentes puis à les faire passer les unes derrière les autres dans un tube extrêmement mince pour les détecter et les dénombrer au moyen d'un laser.

« Dans un premier temps, nous détectons toutes les levures présentes dans un échantillon et mesurons leur viabilité. Nous comptons les levures totales. Plus elles sont fluorescentes, plus leur viabilité est élevée », explique Marie-Laure Badet-Murat. « Si ce premier test est positif, par exemple à 100 levures viables/ml, on effectue une seconde analyse toujours par cytométrie en flux, mais, cette fois, en dénombrant spécifiquement les Bretts. Les résultats confirmeront ou non leur présence ainsi que le niveau de population », précise Cédric Longin, responsable du développement microbiologie chez Cēnoteam. Dans cette deuxième analyse, seul le protocole de préparation de

l'échantillon est différent. Ce n'est pas l'ADN de Bretts qui est quantifié, comme en PCR classique, mais l'ARN. « Nous avons l'exclusivité de cette analyse », précise Marie-Laure Badet-Murat.

Dans ce cas aussi, les analyses sont possibles à tous les stades du vin, sans restriction. « Pour des vins qui sortent de FA, on peut cibler tout de suite les Brettanomyces par la cytométrie en flux », explique Marie-Laure Badet-Murat. Concernant les vins de millésimes plus anciens, on évalue tout d'abord la viabilité de la population levurienne totale pour juger de la nécessité d'une analyse des Bretts. » Il faut compter environ 30 € l'analyse de levures totales et 40 € l'analyse des Bretts avec des résultats livrés dans la journée.

« Nous avons fait de la vPCR avant de nous tourner complètement vers la cytométrie en flux. La cytométrie est plus adaptée puisqu'on s'aperçoit que la préparation de l'échantillon en vPCR est délicate et qu'on ne peut pas éliminer pleinement l'ADN des cellules mortes. La quantification ne peut donc pas être exacte », détaille Marie-Laure Badet-Murat.

De son côté, Laurent Massini critique la cytométrie en flux. « Elle est très mise en avant depuis quelque temps. Nous l'avons testée et ne sommes pas convaincus de son efficacité.

Piloter les malos

« Nous avons la capacité de dénombrer les bactéries totales grâce à la cytométrie en flux », précise Marie-Laure Badet-Murat. Cette analyse s'avère intéressante en fin de fermentation alcoolique. À ce stade, elle permet de savoir si les bactéries lactiques présentes dans le vin sont aptes à enclencher une FML spontanée ou s'il vaut mieux réaliser un ensemencement. C'est la viabilité de ces bactéries plus que leur nombre qui importe pour le déclenchement d'une FML spontanée, un paramètre évalué par l'analyse proposée à 60 euros.

Contrairement à la vPCR, c'est une méthode non spécifique. »

À la suite de cette enquête, des constats nets apparaissent : la PCR, méthode la plus utilisée, est en amélioration grâce à l'élimination du biais introduit par la prise en compte des cellules mortes. La cytométrie en flux, quant à elle, devient spécifique. Aujourd'hui, ces deux méthodes d'analyse semblent difficiles à départager en dehors de leur coût. La cytométrie est en effet meilleur marché que la vPCR.

CLAIRE FURET-GAVALLET



PERA-PELLENC

SOLUTIONS TECHNIQUES
& CONSEIL SUR-MESURE



Réception



Pressurage



Thermovinification



Métiers du froid

Pera
GROUPE PELLENC

Créons ensemble les vins de demain !

CONCEPTION - RÉALISATION - MAINTENANCE - EXPERTISE

www.perapellenc.com