

DÉNOMBREMENT RAPIDE DE *BRETTANOMYCES* DANS UN VIN PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX

V. GERBAUX

IFV, UNITÉ DE BEAUNE (21200)

Brettanomyces est une levure commune dans les caves. Différents travaux montrent que plus de 50% des vins rouges sont contaminés à un moment donné de leur élaboration. Le pourcentage de vins phénolés est heureusement nettement plus faible. L'apparition de ce défaut nécessite, outre les précurseurs disponibles, une population de *Brettanomyces* suffisante pendant un temps suffisant. Un suivi de *Brettanomyces* permet de mettre en évidence une croissance anormale et de prendre les mesures nécessaires, avant l'apparition du défaut sensoriel. Il faut cependant pouvoir disposer d'une méthode simple et rapide.

La cytométrie de flux n'est une technique nouvelle. Les progrès en électronique et en optique permettent aujourd'hui de proposer un appareillage performant pour un prix contenu. L'IFV, en partenariat avec le fabricant Partec, a mis au point une méthode de dénombrement des levures vivantes, appliquée au suivi de *Brettanomyces* dans les vins en cours d'élevage et en bouteilles. La base de la méthode s'appuie sur le fait démontré qu'une croissance levurienne dans un vin sec, est assimilée à *Brettanomyces*. La population est alors graduellement décroissante des lies vers la surface.

Pour disposer d'une population en état physiologique représentatif, ainsi que pour s'affranchir des contaminations extérieures et des levures de surface, un prélèvement spécifique est requis pour l'analyse. Ceci est d'ailleurs valable pour toute méthode de détermination microbiologique. Le vin prélevé doit avoir achevé la fermentation alcoolique depuis une dizaine de jour au minimum. La population de *Saccharomyces cerevisiae* est alors réduite, en mauvais état physiologique et ne perturbe pas le dénombrement.

L'analyse proprement dite consiste à mélanger l'échantillon avec un tampon et un fluorochrome, à attendre 10 minutes et à injecter dans le cytomètre de flux. L'obtention du résultat demande moins de 15mn. Il est possible de réaliser 15 analyses en une heure.

A partir d'un échantillon brut, la plage de dénombrement est de 100 à 1 million de cellules par ml, ce qui est suffisant pour le suivi d'un vin en cours d'élevage. Pour les vins en fin d'élevage ou en bouteilles, le seuil de dénombrement peut être amélioré par centrifugation de l'échantillon. L'écart-type de répétabilité est de 5.3%.

La méthode a été validée sur des vins en cours d'élevage ou en bouteilles. La référence était la culture sur boîte de Pétri en utilisant un milieu spécifique pour *Brettanomyces*. Sur les 225 vins analysés, 116 présentent moins de 200 cellules/ml en cytométrie de flux. Le comptage en boîte de Pétri donne en moyenne 13 cell./ml (maxi.: 182). 109 vins présentent plus de 200 cellules/ml en cytométrie de flux. Pour 90 d'entre eux, les valeurs sont fortement corrélées avec celles obtenues en Boîte de Pétri (coefficient de 0.96). Pour les 19 échantillons restant (8% de l'ensemble), la cytométrie de flux indique une population non mise en évidence en boîte de Pétri. L'explication peut être la présence d'une population résiduelle active de *Sc Cerevisiae*, d'une contamination de l'échantillon par une flore levurienne de surface ou de matériel ou par la présence de *Brettanomyces* sous forme viable non cultivable (VNC).

La cytométrie de flux permet donc de suivre le développement de *Brettanomyces* dans les chais et de donner un degré d'urgence pour une opération de stabilisation.