

FLASH INFO SPÉCIAL ENTREPRISES



Dès le milieu des années 80 l'ICV s'est emparé du sujet des microorganismes d'altération. Les premières études ont porté sur les méthodes d'identification. La mise en culture sur milieu semi-spécifique est devenue un outil pratique très utile. D'abord réservée aux experts, elle s'est démocratisée vers la fin des années 90 pour être proposée dans tous les laboratoires du Groupe ICV, sous le nom d'IGA : Indice de Germes d'Altération. Utilisable sur vin fini, elle comptabilise les microorganismes capables de se multiplier sur un milieu non-*Saccharomyces*. Les IGA ont permis de démontrer l'importance des pratiques de vinification, d'hygiène, d'élevage... dans le développement et la dissémination des levures et bactéries d'altération. Le Groupe ICV est fier d'avoir été et de rester un pionnier dans ce domaine, en proposant aujourd'hui, en partenariat avec IAGE, une analyse spécifique de *Brettanomyces bruxellensis* en PCR digitale.

qu'elle évalue l'ADN présent dans les cellules intègres. Les *B. bruxellensis* mortes ne sont pas prises en compte

DIGI[®] *brett* : aide à l'interprétation

La PCR digitale ou dPCR est une technique dérivée de la PCR qui utilise des **sondes spécifiques** du ou des microorganismes recherchés et fractionne le milieu réactionnel en plus de 20 000 sous échantillons qui sont ensuite analysés (positif ou négatif) individuellement. La technique permet de travailler sur toutes les matrices, depuis le moût jusqu'au vin en élevage, avec une sensibilité élevée et une capacité à quantifier excellente.

DIGI[®] *brett* mesure l'ADN des cellules **intègres** spécifiquement de *Brettanomyces bruxellensis* et donne des résultats en Unités Génétiques par mL (UG ou copies d'ADN). Les levures de cette espèce peuvent présenter des **niveaux de ploïdie variables**, c'est-à-dire que le nombre de copies d'un même gène dans une cellule peut varier de 1 jusqu'à 4. Pour simplifier l'interprétation, on peut diviser la valeur de la mesure par 3 pour avoir une idée correcte du nombre de cellules intègres de cette espèce dans l'échantillon soumis à l'analyse.

Les **résultats** sont exprimés en puissances de 10, sous la forme, par exemple, 1.2^{E4} ce qui signifie 1.2×10^4 UG / mL ou encore 12 000 UG / mL (ce qui, en reprenant la transposition proposée donnerait environ 4000 cellules intègres / mL).

La dPCR mesure donc les viables et les viables non cultivables, puis-

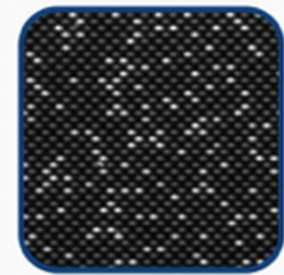


Photo 1 : Plaque de mesure à plus de 20000 puits utilisée en dPCR

Il est toujours périlleux de **comparer entre elles des méthodes qui ne mesurent pas la même chose**. Par exemple l'IGA sur vin fini va comptabiliser des Unités Formant Colonies (UFC) de bactéries d'une part et de levures non-*Saccharomyces* d'autre part, capables de se multiplier sur le milieu de culture où on étale 0,1 mL de l'échantillon homogénéisé. DiGi-Brett compte des copies d'ADN de cellule intègre (UG), spécifique de *Brettanomyces bruxellensis*, sur une prise d'échantillon de 1,5 mL de l'échantillon transmis.

Pour faciliter l'interprétation, nous vous proposons un tableau (page 2) qui résume les cas de figure et les recommandations de base que nous mettons en avant, avec un **seuil de détection à 5 UG / mL !**

La **mesure instantanée** est intéressante en particulier lorsqu'on soupçonne une présence ou encore quand on veut vérifier l'efficacité d'un traitement. Mais plus généralement, c'est aussi **la dynamique des populations** qui compte, comme le temps de pré-

Aide à l'interprétation dPCR : DIGI[®] brett

Résultat DIGI [®] brett en UG / mL – sur vins		ND	5	50	250	2500	25000
Qualification de la contamination		Non décelable	Présence	Faible	Moyenne	Forte	Très forte
Recommandations	Actions	Poursuite du plan de contrôle (toutes les 6 semaines)		Augmenter la fréquence de contrôle (4s)	Augmenter la fréquence de contrôle (2s)	Intervenir rapidement et vérifier l'efficacité	Intervenir immédiatement et vérifier l'efficacité
	Compléments (1)	Contrôle avant assemblage ou programme d'élevage Intervenir en fonction du dosage des E4P et E4G présents (et précurseurs) – suivi cinétique				Doser les E4P+E4G pour décider des actions complémentaires à programmer	
	Compléments (2)	<ul style="list-style-type: none"> . Mise en quarantaine jusqu'à résultat = ND . Désinfection complète à chaque mouvement . Recherche des causes possibles et mise en place d'actions de contrôle / correctives 					

Détecté mais non quantifiable

Tableau 1 : Outil général d'aide à l'interprétation de la mesure DIGI[®] brett
Usage et reproduction interdits sans accord écrit de l'ICV

sence : une faible population qui est dans un vin pendant des mois peut entraîner autant de dégâts qu'une plus forte qui se développerait en quelques semaines.

Lorsqu'on suit cette dynamique des populations, il faut regarder la croissance en se ramenant à un pas de temps de **10 jours** : c'est en moyenne, le temps de doublement d'une population de *Brettanomyces bruxellensis* dans des conditions très favorables (sucres disponibles, pas de SO₂ actif...), même s'il existe des variations entre souches. Autrement dit, si par exemple vous pratiquez un suivi mensuel, il vous faut être particulièrement inquiet si les variations égalent ou dépassent un facteur 8 : ceci signifierait que votre population double tous les 10 jours et qu'il faudrait intervenir très rapidement.

En cas de populations faibles ou moyennes, le **suivi des 4-éthyl-phénol et 4-éthyl-guaïacol** est intéressant, en particulier si vous ne pouvez ou ne souhaitez pas intervenir rapidement : la mesure précise de l'évolution chimique permet d'apprécier comment le risque se transforme (ou pas) en problème, **avant même que la dégustation ne puisse le déceler**.

Nyséos et le Groupe ICV utilisent une méthode dite de **dilution isotopique** pour réaliser ces analyses. Cette technique offre une fiabilité et une précision élevées pour le dosage de composés réactifs ou en faible concentration. En comparaison à une analyse conventionnelle elle permet de **s'affranchir de l'effet matrice**. Elle garantit des résultats plus robustes : sur les phénols volatils et leurs précurseurs

Certains traitements comme par exemple le DMDC, ne conduisent pas à une mort cellulaire totale immédiatement. Des cellules de *B. bruxellensis* peuvent rester intègres pendant plusieurs jours : elles ne pousseront pas sur milieu IGA mais elles seront comptabilisées en dPCR ou en PCR classique. Dans ces situations, la dPCR doit être décalée du traitement pour mesurer son efficacité.



Photo 2 : Cuvée destinée aussi bien aux vinifications qu'à la conservation des vins — Photo ICV

Aide à l'interprétation dPCR : DIGI[®] brett

cette méthode est **2 à 7 fois plus précise**.

Il faut noter que, à l'inverse de certains cris d'alarme qui prétendent que les *B. bruxellensis* seraient dans toutes les cuves, il n'en est rien. Certes il est très peu probable qu'une cave n'ait aucune cuve "touchée" mais de là à prétendre que leur présence serait systématique, il y a un pas que les preuves scientifiques viennent conseiller de ne pas franchir.

Nous avons scanné en DIGI[®] brett tous les vins rouges du millésime 2022 qui restaient en cave, y compris une trentaine de barriques, sur un site de production en Région Occitanie. Au total 130 échantillons. Les valeurs ont été reprises avec les classes du tableau de la page 2. Constat immédiat (voir figure 1), **les 3/4 des cuves sont indemnes** de *Brettanomyces bruxellensis*, en tout cas inférieures au seuil de détection (5 UG / mL). Elles ne sont donc pas partout !

Environ **1 an après** la fin des FML, dans une cave propre, aux cuves revêtues ou en inox, avec des procédures de nettoyage – désinfection correctement appliquées mais aussi des relogements fréquents, des pH élevés et donc des SO₂ actifs souvent modestes, les cuves fortement contaminées ou "à danger immédiat" sont plutôt peu nombreuses.

La photographie de l'ensemble du chai a permis à la cave de parfaitement **mesurer l'état des lieux** et de s'interroger à la fois sur ses pratiques mais aussi sur ses plans de contrôle (est – ce suffisamment fréquent ? sur un nombre adapté de cuves ?).

Ce screening permet aussi de **segmenter** en se focalisant sur les cuves les plus "urgentes", en les isolant et en mettant en place les pratiques nécessaires de nettoyage – désinfection à chaque mouvement qu'elles pourraient nécessiter.

En complément de ces mesures par DiGiBrett[®], les **analyses courantes** ont été faites. Nous avons recherché une corrélation entre l'ensemble des paramètres analytiques et les niveaux de présence. Le coefficient r² est de 0,06 ! Si on se focalise sur les cuves où la présence est quantifiée, cette corrélation est à peine améliorée. Considérant que dans ce cas précis, tous les vins sont G+F < 1 g / L, FML

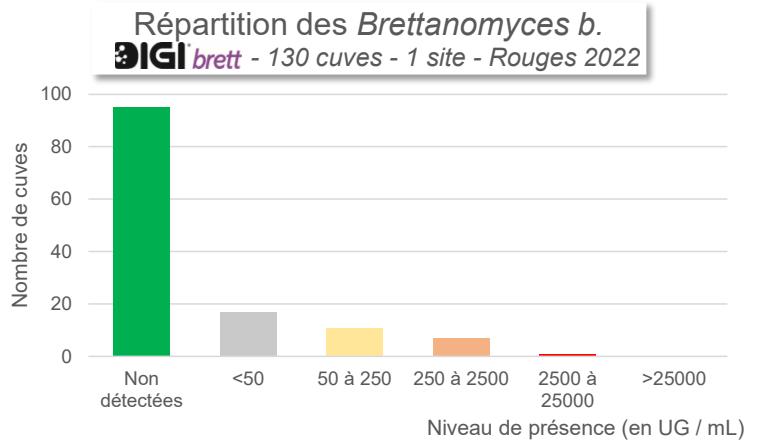


Figure 1 : répartition en classes des mesures DiGiBrett sur un site de stockage, réalisées en Novembre 2023



Photo 3 : Barriques d'élevage avec système facilitant la remise en suspension des lies — Photo ICV

terminées et tous sulfités, il n'y a pas de facteur "standard" analytique qui pourrait expliquer ni la présence, ni le niveau de celle – ci quand elle est avérée. Indépendamment de ces analyses, l'ICV peut vous accompagner sur la **mise en place d'un plan de contrôle** qui combine le suivi microbiologique et le dosage des E4P / E4G avec le niveau de risque intrinsèque à vos cuvées et la valeur que vous leur attribuez.

IAGE ONE HEALTH EXPLORER™
Pour DigiBrett, 50 à 200 mL de prélèvement suffisent.
INJYSÉOS AU CŒUR DE LA VINIFICATION
Pour les phénols (et leurs précurseurs), 250 mL.
Dans tous les cas, l'échantillonnage est une étape sensible et cruciale : cuve homogène, pas de contamination par les moyens de prélèvement (robinet par exemple).

Auteurs : Daniel GRANÈS, Gabriel DOURNES
Groupe ICV