



Vignobles de la
Vallée du Rhône

RENCONTRES INTER RHÔNE

**Réduction des sulfites :
Aspect microbiologique & retour d'expériences**

Mardi 26 Mars 2019 de 16h à 18h – Lycée Viticole d'Orange

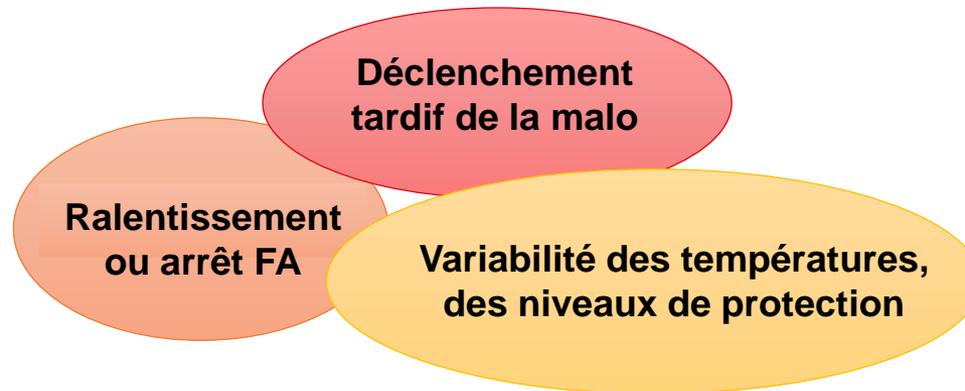
NOUVELLES CONNAISSANCES SUR BRETTANOMYCES

— Nicolas RICHARD

Pour Virginie SERPAGGI

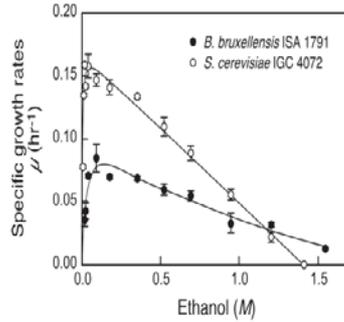
— Ce que l'on sait déjà ...

- Très peu isolée à partir de baies de raisin
- Concentration plus élevée sur des raisins contaminés par *Botrytis*
- Concentrations variables à différents moments, pour diverses raisons

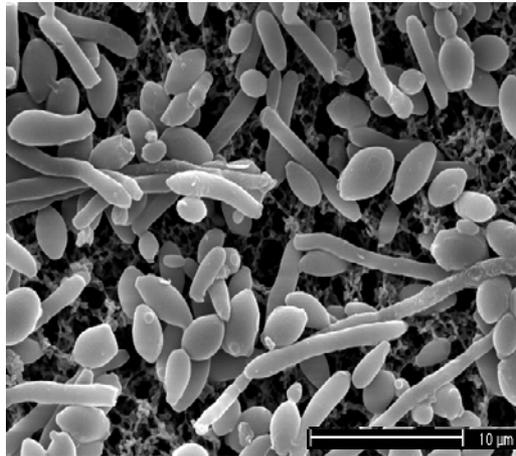


— Ce que l'on sait aussi ...

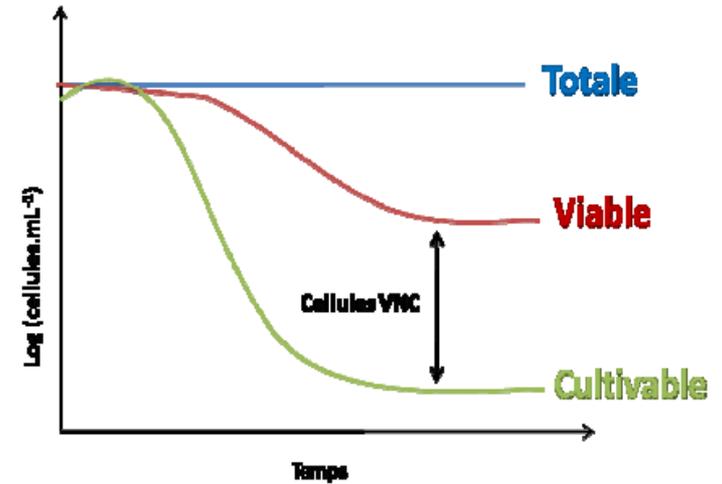
Faibles besoins nutritionnels



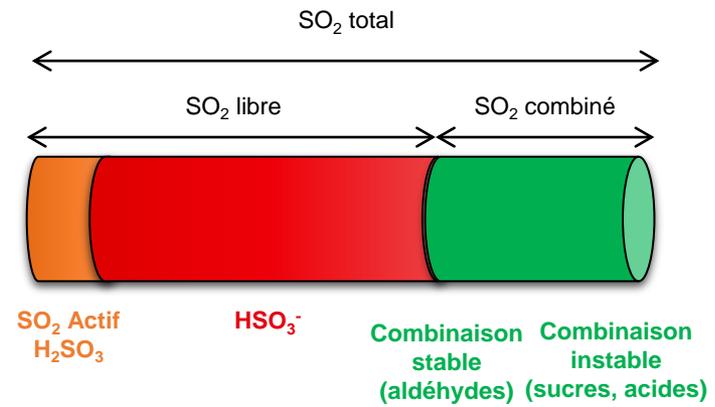
Forme très variable



Etat Viable mais Non Cultivable (VNC)



— La solution SO₂



Mais

Seul le SO₂ actif est antiseptique

Ce SO₂ actif est dépendant de :

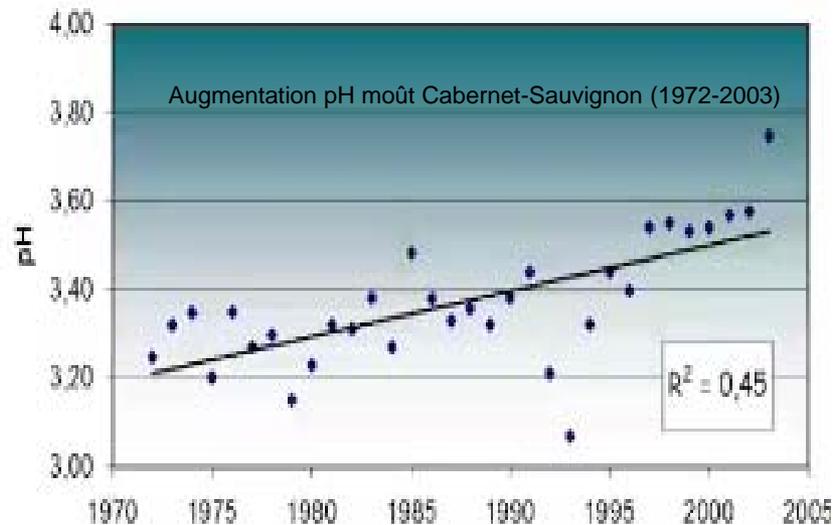
- SO₂ libre
- pH
- Température
- degré d'éthanol
- Polyphénols
-

Le contexte actuel est favorable à Brett ... et défavorable à l'activité du SO₂

Diminution des doses de SO₂ admises

Teneur en SO ₂ total (mg/l)	Rgt OCM viti/vini	Rgt (UE) VIN BIO	NOP	Bio-dynamie (DEMETER)	Vin AVN
Rouge sec (sucre < 2g/l)	150	100	100	70	0-30
Rouge sec (sucre > 5g/l)	200	170	100	70	0-30
Blanc et rosé secs (sucre < 2g/l)	200	150	100	90	0-40
Blanc et rosé secs (sucre > 5g/l)	250	220	100	130	0-40

Augmentation du pH des moûts et des vins



Résultats du Groupe National

« LUTTE CONTRE BRETTANOMYCES »



AXE 1 : BIODIVERSITÉ ET MÉTABOLISME

AXE 2 : MÉTHODES DE DÉTECTION

AXE 3 : OUTILS DE LUTTE EN CAVE



AXE 1

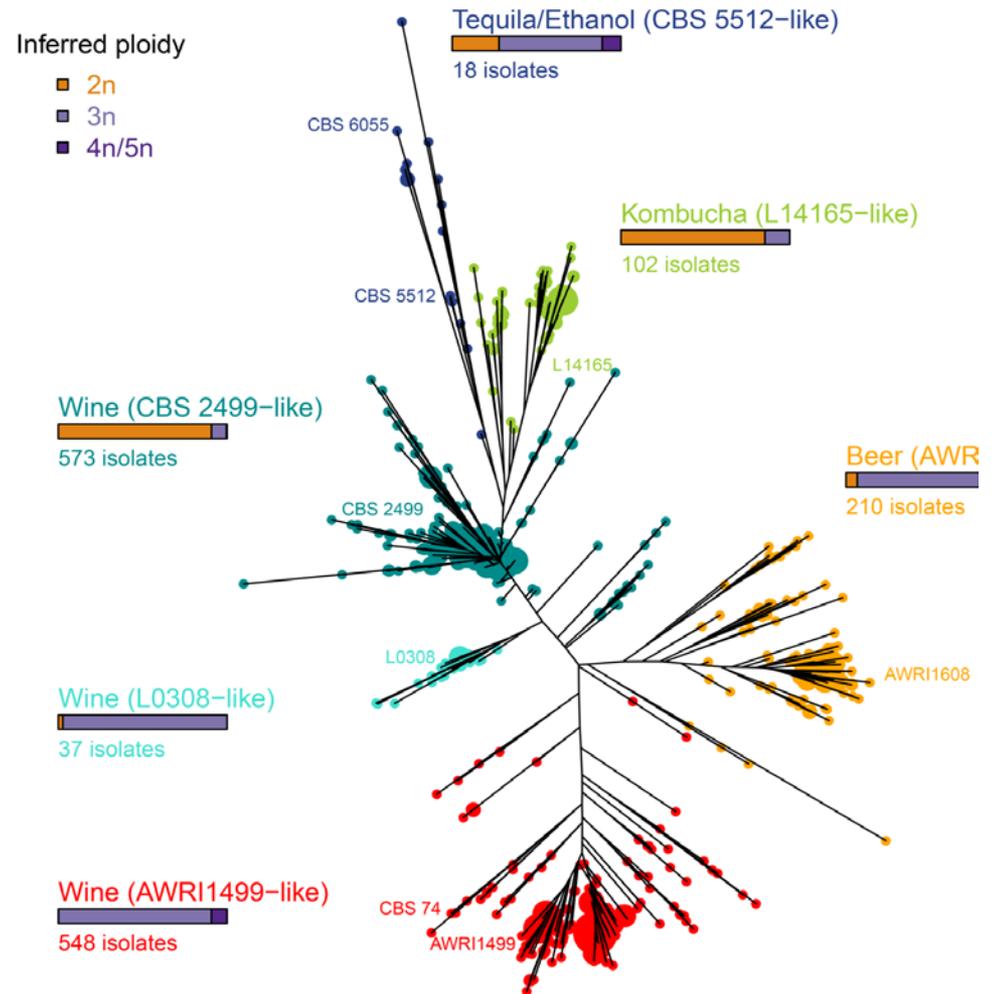
BIODIVERSITÉ ET MÉTABOLISME

1488 isolats provenant de
- 29 pays
- 9 processus de fermentation
(vin, bière, kombucha, etc.)

12 marqueurs microsatellites

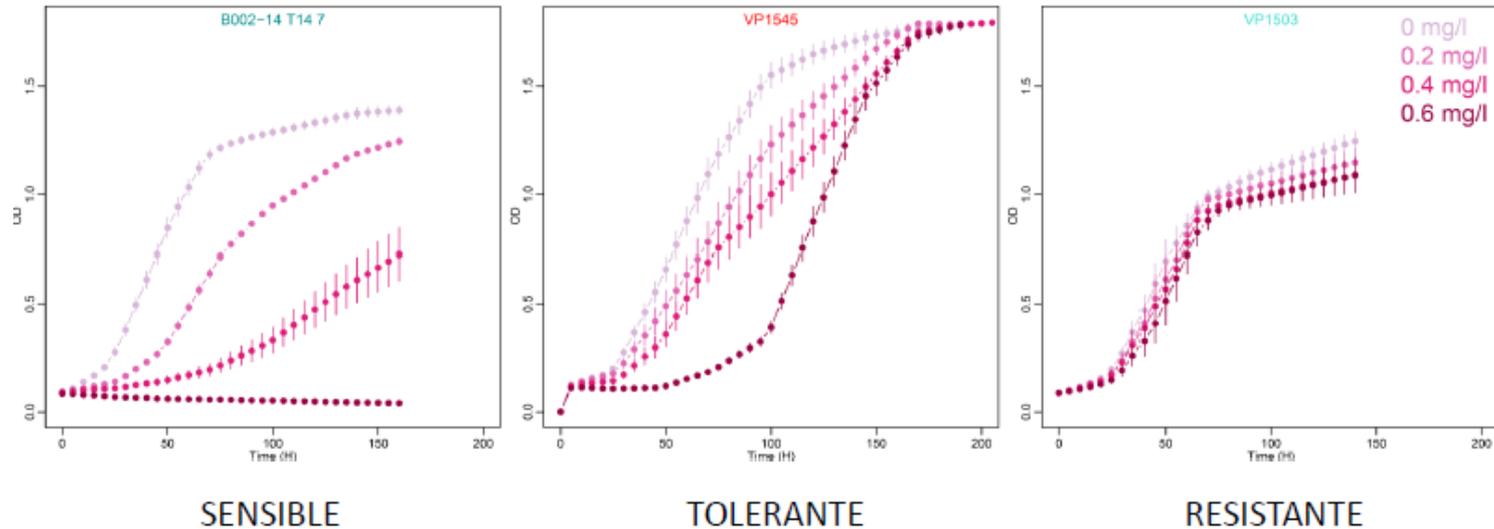
[Albertin et al., 2014 ; Avramova et al., 2018]

➔ 632 profils génétiques différents



Quel est l'effet du génotype sur la réaction vis-à-vis du SO₂ ?

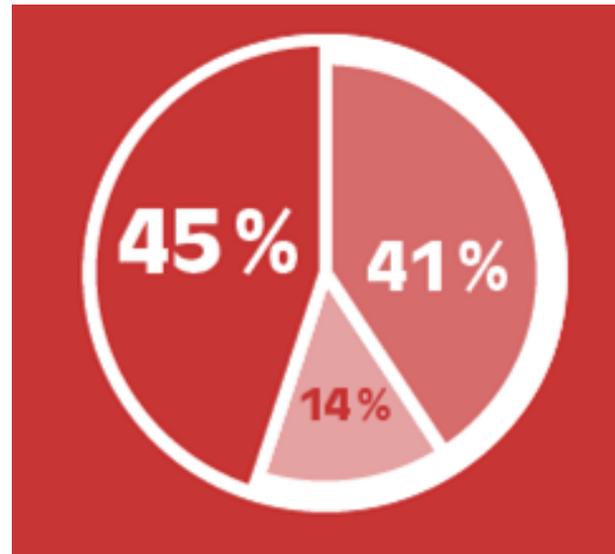
145 souches « dangereuses » cultivées à différentes doses de SO₂ actif : de 0,2 à 0,6 mg/L



3 groupes génétiques de dangerosité différentes

- Sensibles : Mortalité à partir de 0.6 mg/L
- Tolérantes : Croissance ralentie sans effet sur le niveau de population atteint
- Résistantes : croissance normale jusqu'à 0,6 mg/L de SO₂ moléculaire

sensibles



résistantes

tolérantes



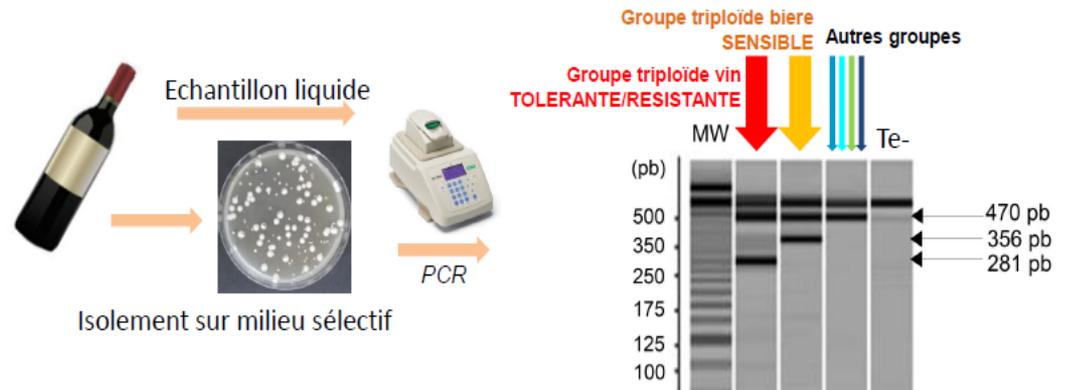
Pour plus de la moitié des souches testées, le SO_2 n'a pas l'effet espéré

En pratique : comment évaluer la dangerosité réelle ?

En connaissant le génotype :

TYPEBBRETT

Ma "Brett" est **sensible**
ou **résistante** au SO₂ ?



Ajuster le traitement et limiter le SO₂ si il est inefficace.

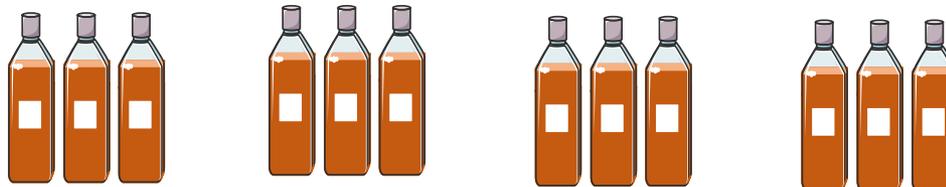
Quel est l'effet du niveau de population initiale ?

2 Souches
Sensible et tolérante

X

3 Populations initiales
 10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL

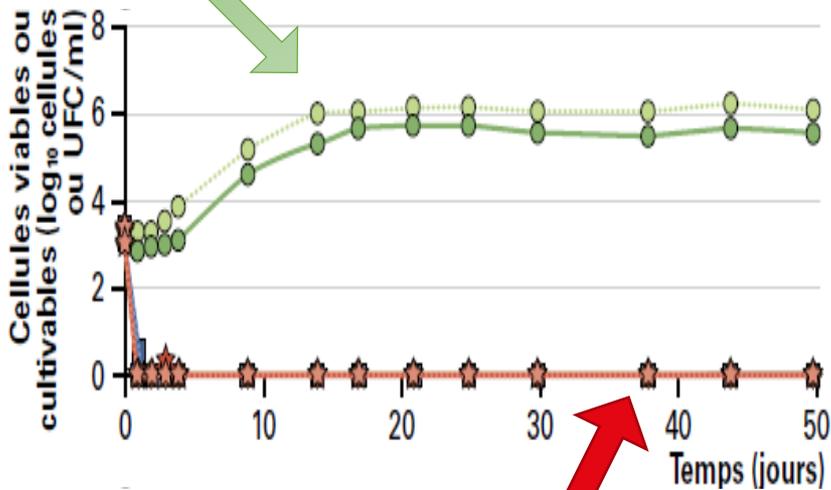
4 Doses de SO₂ actif 0 mg/L 0,5 mg/L 0,9 mg/L 1,1 mg/L



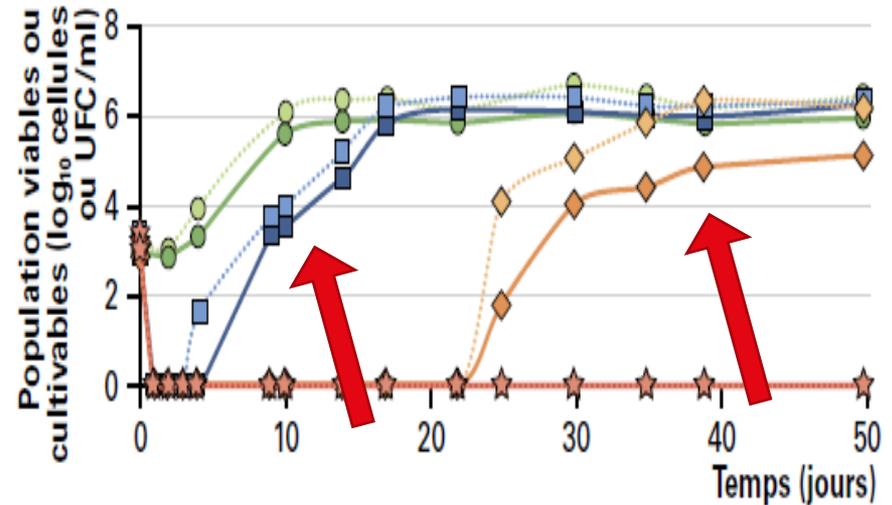
	1	2	3	4
SO ₂ total	0	25	36	43
SO ₂ libre	0	10	16	20
SO ₂ actif	0	0,5	0,9	1,1

À 10³ cellules/mL :

Souche sensible



Souche tolérante



Souche sensible :



10^3 cellules/ml
 10^4 cellules/ml

0,5, 0,9 et 1,1 mg/L de SO₂ actif



Jour 0



Jour 20



Jour 50

= sensible

0,5 et 0,9 mg/L de SO₂ actif



Jour 0



Jour 20



Jour 50



= tolérante
!!

1,1 mg/L de SO₂ actif



Jour 0



Jour 20



Jour 50



= sensible
??

- Cellules viables
- Cellules mortes
- Cellules viables mais non cultivables (VNC)

Effet de la population initiale
sur la réaction vis-à-vis du SO₂



AXE 2

MÉTHODES DE DETECTION

Etude inter-laboratoire de l'usage des Kits commerciaux de qPCR *Brettanomyces*

Confrontation de 3 kits de qPCR conçus pour *Brett*



3 régions | Bourgogne
Bordeaux
Vallée du Rhône

X



4 niveaux de contamination

X

3 labo | Microflora
Inter Rhône
IUVV

X

3 kits qPCR | Kit 1
Kit 2
Kit 3

Brett dans 5 vins naturellement contaminés

:

	Kit 1		Kit 2		Kit 3		Petri dish
	Lab 2	Lab 3	Lab 1	Lab 3	Lab 1	Lab 2	
Wine 1	2.3 ± 1.0**	3.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2***	2.4 ± 0.0**	3.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0***	3.6 ± 0.3
Wine 2	0.0 ± 0.0	-0.1 ± 0.2*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.0***	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Wine 3	0.2 ± 0.3***	1.9 ± 0.1	0.0 ± 0.0***	0.4 ± 0.5***	2.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0***	2.1 ± 0.5
Wine 4	1.4 ± 1.0*	3.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1**	1.8 ± 0.2	2.3 ± 1.0	1.5 ± 1.4	2.8 ± 0.4
Wine 5	0.0 ± 0.0	2.3 ± 0.2***	1.1 ± 0.1***	1.4 ± 0.1***	1.5 ± 0.6***	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Hétérogène
+ sous-éval

Hétérogène
+ sous-éval

Hétérogène

+ VNC ou
mortes ?

➔ Protocole qPCR normalisé : ajout d'un contrôle interne

NON, IL N'Y A PAS DE METHODE PARFAITE !

Le bon choix en fonction
du moment, de votre besoin, des signes

Boite de Pétri

qPCR

vPCR

Microscopie épifluo

Cytométrie en flux
(spécifique ou pas)

Sniff'Brett

Phénols traces

besoin ?

- Rapide
- Spécifique
- Précis

Contraintes ?

- Présence de *Saccharomyces*
- Risque (sucres, lies...)
- Traitements du vin (cellules mortes + VNC)

Type d'info ?

- Présence ou absence
- Quantification
- Etat physiologique



AXE 3

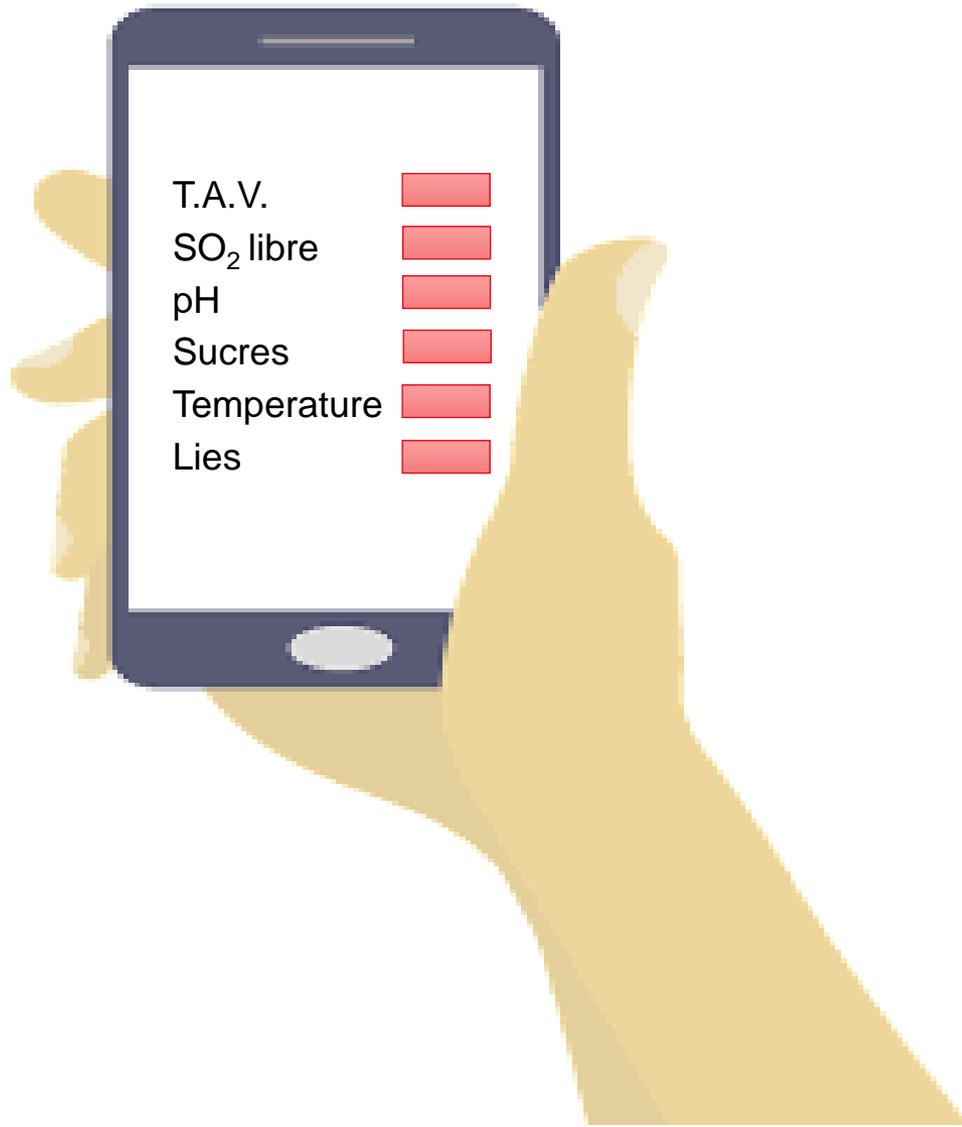
OUTIL DE LUTTE EN CAVE

PRÉDICTION DU RISQUE THEORIQUE

Effet de 6 paramètres du vin sur
Croissance Brett et production de phénol volatils

	Niveau bas	Niveau intermédiaire	Niveau haut
pH	3,5	3,75	4
Température (°C)	12	17	22
T.A.V (%)	13,5	14,5	15,5
Sucres (g/L)	1,5	3,75	6
SO ₂ actif (mg/L)	0	0,3	0,6
Lies (g/L)	0	5	10

Création d'une application mobile simple et conviviale



Outils de prédiction
existants
mais non adaptés aux
vins rhodaniens

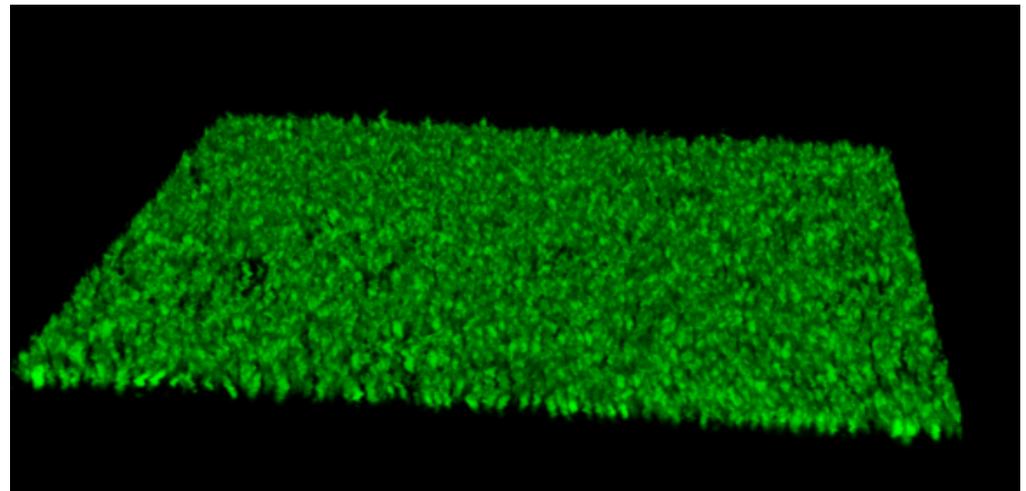
BRETT'LESS



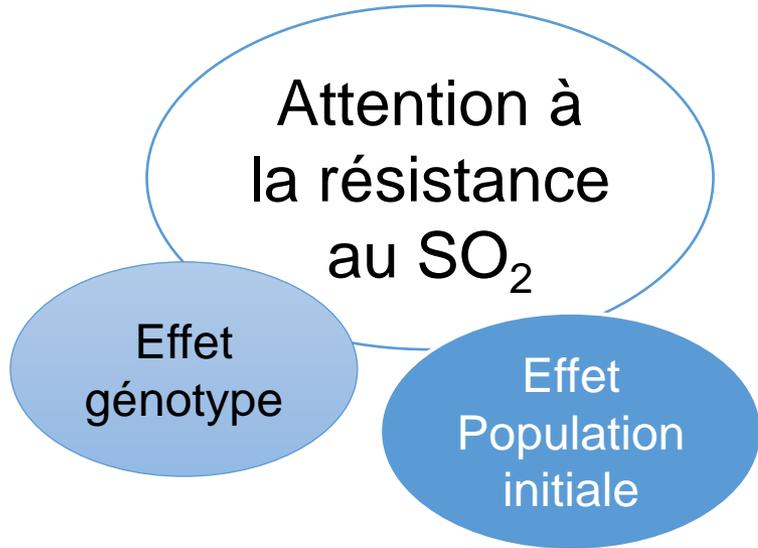
cenocentres
ceosocouples



NETTOYAGE DES SURFACES POUR ELIMINER LES BIOFILMS DE BRETT



Pour conclure



Guide de gestion du risque **BRETT** en cave



Cette plaquette est le fruit de 3 années de travail du Groupe National de Recherche « Lutte contre *Brettanomyces* » qui a regroupé onze partenaires issus d'universités, de centres techniques, d'entreprises de conseil et d'analyse et de plateformes de recherche.

Ce document résume les données essentielles à une bonne gestion du risque *Brettanomyces* en cave. Ces informations découlent des recherches menées par le groupe qui se sont organisées autour de trois axes :

- l'étude de la diversité génétique de *Brettanomyces*,
- le test à la comparaison des différentes méthodes de détection de cette levure,
- la gestion du risque en cave et l'utilisation d'outils d'aide à la décision.

Ce document reste un guide et la spécificité régionale pour la vinification et l'élevage des vins ne doit pas être oubliée. Nous sommes conscients qu'il est impossible de mettre en place une recette standard ou un protocole d'alerte universel. Mais les rappels et connaissances récentes présents dans cette plaquette sont là pour vous aider à appréhender le risque de contamination par *Brettanomyces* et pour vous guider vers une gestion et une maîtrise du risque.

nrichard@inter-rhone.com

vserpaggi@inter-rhone.com

MERCI
pour votre attention