

## NOUVELLES CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES ET PRATIQUES POUR LA PREVENTION DES DEVIATIONS PHENOLEES PROVOQUEES PAR LES BRETTANOMYCES

Christophe GERLAND, Intellioeno Sarl, [christophe.gerland@intellioeno.com](mailto:christophe.gerland@intellioeno.com)

Les déviations phénolées liées aux *Brettanomyces* sont un des défauts principaux des vins rouges, notamment dans les régions viticoles traditionnelles et dans les très bons millésimes. Ils touchent également beaucoup les pays aux climats chauds comme l'Australie, le Chili,.....

Ces déviations sont plutôt en recrudescence : lors de l'International Wine Challenge à Londres, sur plus de 10 000 vins dégustés en 2006, 2007 et 2008, le pourcentage de vins phénolés était respectivement de 10,5 – 12,8 et 15,7% du total des vins à défaut . Autour de 6% du total des vins étaient rejetés pour défaut (Goode et Harrop, 2008). Sur ces 10 000 vins, en 2008, près de 100 présentaient une déviation phénolée !

La diminution de la qualité liée à la présence de phénols volatils n'est pas uniquement perçue par les professionnels, mais aussi par les consommateurs, ce qui a été largement mis en évidence par les chercheurs australiens (Curtin, 2007).

Ces deux dernières années, de nombreux chercheurs et techniciens ont travaillé sur le sujet avec des avancées intéressantes, et les œnologues ont essayé d'adapter ces découvertes sur le terrain pour améliorer la prévention de ces défauts. Cet article se propose de passer en revue ces nouvelles connaissances et nouvelles pratiques.

### 1/ RISQUES DE DEVIATIONS PHENOLEES

Un des travaux les plus innovants a été réalisé par l'équipe du Pr Strehaiano à Toulouse, et a consisté à mesurer la vitesse de production des phénols volatils, en fonction du niveau de contamination en *Brettanomyces*. En examinant les résultats (figure 1), on constate qu'avec une population de  $10^4$  cellules par mL, on a largement le temps d'agir si on est par exemple en élevage, et un simple soutirage pourra permettre d'éliminer une bonne partie des levures contaminantes. Si la FML n'est pas réalisée, on pourra inoculer en bactéries sélectionnées, alors, en fin de FML et après soutirage et sulfitage, les *Brettanomyces* auront dans la plupart des cas disparu. Avec ce niveau de population, les œnologues ont plutôt le réflexe d'engager une action corrective (filtration, centrifugation, resulfitage), ce qui n'est pas réellement nécessaire (il faudrait 50 mois pour atteindre le seuil communément admis de 500 µg/L) . On pourra se contenter de faire un suivi microbiologique régulier et agir en conséquence.

Par contre, lorsqu'on atteint  $10^7$  cellules par mL, il faut moins de 3 jours pour atteindre ce seuil, il est alors urgent d'agir. (voir comment au paragraphe 3).

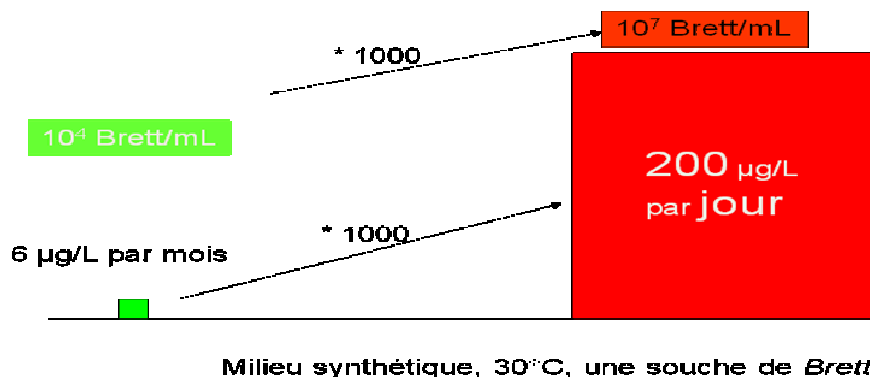


Figure N°1 : vitesse de production du 4-éthyl-phénol en fonction du niveau de contamination en *Brettanomyces*

Ces données ont été obtenues à 30°C et sur un milieu synthétique ; en cave sur vin réel , les vitesses doivent être inférieures mais c'est l'ordre de grandeur qu'il faut considérer.

Un suivi microbiologique régulier permettra de détecter préventivement la multiplication des *Brettanomyces*, et donc d'agir avant d'atteindre ce niveau de contamination élevé et à gros risque.

Il reste cependant encore des zones d'ombre, notamment sur l'origine de ces multiplications des *Brettanomyces*, plus importantes sur certains vins que sur d'autres. On observe aussi des vins pouvant être contaminés mais ne conduisant pas à l'apparition de phénols volatils, même en présence de souches productrices. Certains l'expliquent par la disponibilité des précurseurs, sans que rien n'ait été encore prouvé. On constate aussi la présence de souches ne produisant pas de phénols (en moyenne autour de 20% des souches). Ces deux observations montrent l'intérêt d'utiliser un test de détection microbiologique faisant appel au sniffing (Couto, 2003 et Gerland, 2006) et permettant donc de détecter les souches productrices spécifiquement (voir paragraphe 2).

## 2/ QUELLES TECHNIQUES DE CONTROLE MICROBIOLOGIQUE UTILISER ?

### 2.1. IMPORTANCE DU PRELEVEMENT

Quelle que soit la technique utilisée, la méthode de prélèvement est capitale. En effet, rapidement après la fermentation alcoolique ou tout mouvement du vin (pompage, soutirage, remontage), les levures dont les *Brettanomyces* précipitent au fond des cuves ou des fûts, et on retrouve la quasi-totalité des *Brettanomyces* dans et juste au-dessus des lies. Pour prélever dans les cuves, on privilégiera la vanne du bas de la cuve au lieu du robinet dégustateur, et pour les fûts, on prélèvera juste au-dessus des lies. L'IFV de Beaune a mis au point un kit de prélèvement constitué d'une seringue, d'un tuyau souple en silicone (longueur étudiée pour aller au fond du fût) et d'un tube inox pour assurer le lest et pouvoir aller au fond du fût (photos 1, 2 et 3). Ce kit est disponible auprès d'Intelli'oen. Avec cette méthode, on va chercher les *Brettanomyces* à l'endroit où ils sont concentrés et on évite de batôner, technique qui favorise leur développement (aération, dispersion dans tout le fût). On utilise un kit par fût à prélever ce qui accélère le travail de prélèvement (on n'est plus obligé d'aller passer le siphon à l'eau bouillante entre 2 prélèvements) et ensuite les kits utilisés pourront être nettoyés et stérilisés, en vue d'une nouvelle utilisation.



Photos 1, 2 et 3 : kit de prélèvement microbiologie pour les fûts

En ce qui concerne le plan de prélèvement, on prélèvera sur 10 à 20% des fûts en fonction du nombre de fûts, et on essaiera de prélever toujours dans les mêmes fûts. Pour les gros lots, on pourra assembler les prélèvements pour contrôler d'abord un lot moyen puis revenir à chaque prélèvement unitaire en cas de résultat positif. Dans ce cas, une technique rapide sera plus intéressante (cytométrie ou PCR quantitative) et il faudra veiller à conserver les échantillons prélevés dans des tubes bien pleins (sinon les *Brettanomyces* peuvent se multiplier, même à 4°C).

## 2.2. LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES BRETTANOMYCES

Même si de nouvelles techniques sont apparues ces dernières années, la technique la plus utilisée demeure pour l'instant la mise en culture sur boîte de Pétri. Cette technique n'est pas spécifique à 100%, même si la plupart des milieux proposés contiennent de la cyclo-héximide, qui inhibe la plupart des levures sauf les *Brettanomyces*. Les *Kloeckera* résistent à cet antifongique, aussi, il faudra veiller à faire une première lecture à 3 jours (non *Brettanomyces*) puis une deuxième lecture à 7-8 jours (*Brettanomyces*). Cette technique a plusieurs inconvénients : sa longueur, le temps de travail (en fonction de la contamination, on devra diluer ou filtrer), la détection globale (y compris de souches ne produisant pas de phénols) et la non détection des cellules VNC (viables non cultivables) entraînant donc des faux négatifs, notamment dans les 10 jours suivants un sulfitage.

Trois nouvelles techniques se sont fortement développées sur le terrain ces dernières années :

La **PCR quantitative** : cette technique consiste à extraire l'ADN des levures présentes dans l'échantillon, l'amplifier avec des sondes ADN spécifiques des *Brettanomyces* et un appareil de type thermocycler (photo n°4), puis quantifier grâce à des courbes d'étalonnage établies précédemment en comparant PCR et culture sur boîte. Cette technique est très sensible (1 à 5 germes/mL) et très spécifique, plusieurs fabricants proposent des matériels et une vingtaine de laboratoires œnologiques dans le monde sont équipés. La réponse peut être donnée dans la journée. Seuls 2 inconvénients : le coût (équipement entre 30 000 et 50 000 euros, réactifs autour de 30 euros/analyse) et le risque de détecter des faux positifs (ADN encore présents dans des



cellules en train de mourir ou mortes – des cas ont été signalés aux USA sur des vins traités au Velcorin où les PCR sont positives plusieurs semaines après le traitement, alors que les autres techniques indiquent une mortalité totale des *Brettanomyces*).

Photo n°4 : thermocycler utilisé en PCR classique ou quantitative

La **cytométrie en flux** : la technique consiste en une mesure de l'activité estérase des levures viables et permet de compter précisément les levures, de connaître leur taille et leur viabilité. Elle a l'avantage d'être très rapide (10 mn d'incubation, 3 mn de mesure) et de mesurer les VNC. On pourra même avec cette technique faire des tests pour déterminer la quantité de SO<sub>2</sub> à ajouter pour éliminer une faible contamination. Elle n'est par contre pas spécifique des *Brettanomyces*, donc il faut attendre la fin de la fermentation alcoolique pour faire les premiers contrôles et utiliser la méthode de prélèvement décrite ci-dessus pendant l'élevage (pour ne pas prélever de levures de voile en surface du vin). A noter qu'elle est utilisée depuis plusieurs années notamment en Champagne pour le contrôle des moûts, mais ce n'est que depuis l'important travail de l'Institut Français de la Vigne et du Vin (Gerbaux, 2007 et 2009), que cette technique est utilisée pour le suivi préventif des *Brettanomyces*.

Le coût de l'équipement (exemple photo n°5) se situe autour de 20 000 euros, celui des réactifs à 5 euros/analyse ; la société Partec a développé récemment une méthode couplant cytométrie et PCR : on réalise dans un premier temps une analyse en cytométrie, puis sur les échantillons positifs uniquement, une PCR, avec extraction/amplification classiques (thermocycler) puis révélation ensuite très simple et très précise sur le cytomètre (après accrochage de l'ADN amplifié sur des billes).

Le délai est du même ordre de grandeur que pour la Q-PCR (8 heures) mais le coût inférieur (7500 euros d'équipement supplémentaires, réactifs spécifiques autour de 10 euros/analyse). Avec le couplage de ces 2 techniques, on obtient un résultat plus complet que la Q-PCR, puisqu'on a à la fois la viabilité et la spécificité (appartenance ou non à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*).

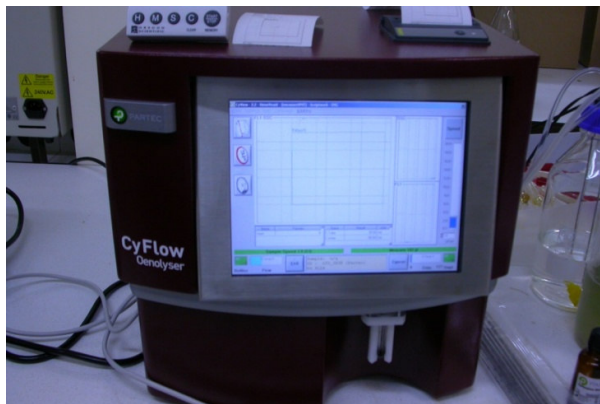


Photo n°5 : cytomètre de flux

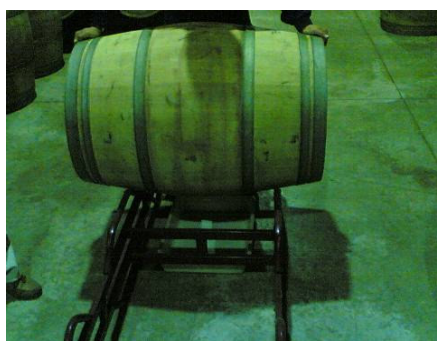
**Le milieu liquide Sniff'Brett** : ce milieu contient tous les éléments nutritifs pour le développement des levures et de la cycloheximide (pour inhiber les non *Brettanomyces*, comme dans les milieux solides), mais aussi une grande quantité d'acide p-coumarique précurseur du 4-éthyl-phénol. Les *Kloeckera* peuvent pousser dans ce milieu (seule autre espèce de levure œnologique résistant à la cycloheximide) mais ne produisent pas de phénols, le test est donc très spécifique. Le protocole consiste à ensemencer avec 20 mL de vin ou de moût, puis d'observer chaque jour pendant 10 jours (à 30°C, ou 14 jours à 20°C) l'apparition d'un trouble puis de l'odeur caractéristique phénolée (très forte si elle survient). On a alors une correspondance entre le nombre de jours nécessaire à l'apparition de l'odeur et la quantité de *Brettanomyces* présentes initialement dans le vin : 2 jours pour 10<sup>6</sup> cellules par mL, 6 jours pour 10<sup>3</sup> cellules par mL, 10 jours pour 1 cellule/mL.

Cette technique possède de nombreux avantages : coût limité, temps de travail très restreint (pas besoin de diluer ni filtrer, milieu tout prêt), détection spécifique des souches produisant des phénols, meilleure détection des VNC qu'en milieu solide (observations de Gerland et col. ainsi qu'Oleofse et col.) , rapidité en cas de forte contamination et travail possible sur moût ou en cours de FA. Elle est par contre un peu moins précise que la technique sur bête (précision de +/-50% contre +/-20%). Enfin, on peut aussi l'utiliser pour contrôler la contamination en *Brettanomyces* du bois des fûts de chêne, en grattant avec une canne inox bizautee l'intérieur des fûts puis en ensemencant le Sniff'Brett avec les copeaux récupérés (photos n°4 à 9). Cette méthode nous a permis d'optimiser largement les procédures de nettoyage-désinfection des fûts utilisés en cave, sur les fûts ayant contenus des vins phénolés.

Photos 4 à 9 : procédé de contrôle microbiologique des fûts avec Sniff'Brett

1/ raclage de l'intérieur des fûts





2/ récupération des copeaux par la bonde, dans un plateau stérile

3/ ensemencement des copeaux dans le milieu Sniff'Brett puis incubation



Le tableau n°1 reprend les performances des différentes techniques.

Tableau n°1 : performances des différentes méthodes microbiologiques de détection des Brettanomyces

Technique	Spécificité	Sensibilité	Rapidité	Coût par analyse (€) **
milieu de culture solide	+	++	7 jours	20 - 25
milieu de culture liquide (Sniff'Brett)	++	++	1 à 10 jours	15 - 20
PCR quantitative	+++	+++	8 heures	85 - 125
cytométrie simple	+	+	15 minutes	20 - 25
cytométrie couplée PCR	+++	++	8 heures	40 - 50

Légendes : +++ très bon, ++ bon, + moyen, - mauvais ; \*\* prix proposés par les laboratoires en France

### 3/ PRATIQUES OENOLOGIQUES DE PREVENTION ET D'ELIMINATION DES BRETTANOMYCES

Si on considère la problématique depuis l'encuvage des raisins jusqu'à la mise en bouteilles, on peut intervenir à de nombreux niveaux et avec différentes techniques.

Si on encuve des raisins provenant de parcelles identifiées à risque (historique, parcelles humides, parcelles attaquées par Botrytis,...), on augmentera les doses de sulfitage et on veillera à démarrer rapidement la fermentation alcoolique avec une nutrition raisonnée de la levure, pour assurer un rapide démarrage et une bonne fin de la FA. On enchaînera avec une FML rapide avec une petite clarification et un soutirage entre les 2 fermentations. Si on détecte des Brettanomyces à l'encuvage ou en cours de FA, une pratique fortement conseillée est de ne pas macérer trop longtemps et de passer après l'écoulage par une cuve tampon pendant 2-3 jours avant d'entonner les vins. On mettra les lies de côté, cette opération diminue la charge en

*Brettanomyces*. On pourra faire un contrôle microbiologique sur ces lies, et les utiliser si elles ne sont pas contaminées. Dans ces premières phases, la technique de contrôle la plus intéressante est la culture sur milieu Sniff'Brett. En cas de forte contamination ( $>10^5$  cellules par mL, et cellules en multiplication rapide), la seule technique utilisable pour les éliminer à ce stade est la flash-pasteurisation. Elle est très efficace et très utilisée en France sur ce genre de problèmes. Le passage du vin à une température de 75°C pendant quelques dizaines de secondes tuent tous les *Brettanomyces*, sans impact notable sur les arômes du vin. En prestation de service, le coût se situe autour de 5 euros/hL. Il faut faire très attention à l'hygiène en aval, notamment de la cuve de réception, car les vins sont ensuite en général facilement recontaminables (destruction aussi des toxines certainement d'où un milieu propice au redéveloppement des levures et des bactéries).

Dans les phases de FML et d'élevage, on pourra utiliser la centrifugation pour faire baisser la charge en *Brettanomyces*, elle fonctionne bien pour des contaminations pas trop importantes ( $<10^5$  cellules par mL). On pourra aussi utiliser la microfiltration tangentielle ou la filtration sur terres de diatomées, qui feront chuter la population de *Brettanomyces* (plus fortement pour la MFT). A noter que ces 2 techniques de filtration ne sont pas totalement stérilisantes, mais à ce stade elles sont souvent moins pénalisantes pour le vin que la filtration frontale, même si de nouveaux média-filtrants très intéressants (à base de cellulose) sont apparus ces dernières années, avec de très bonnes efficacités de réduction de la contamination microbiologique pour des porosités plus élevées (mécanismes d'adsorption des germes sur le média filtrant).

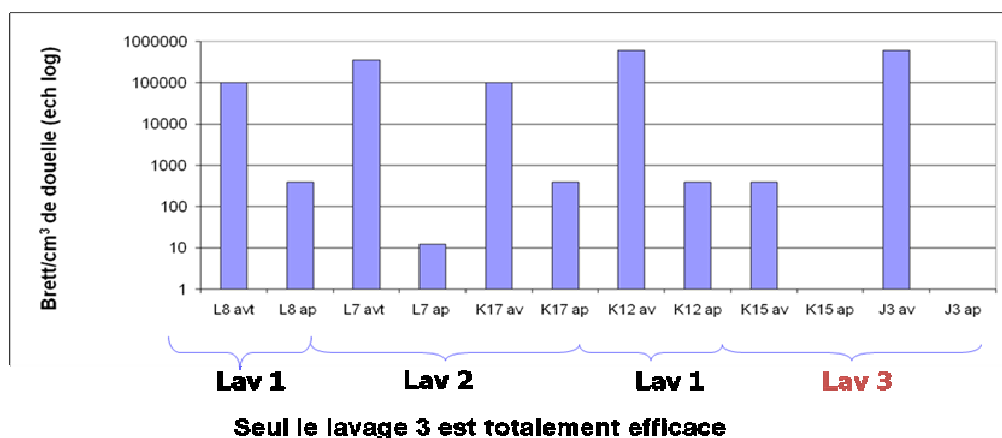
Le collage est aussi une opération qui va faire chuter (de 2 à 3 logarithmes) la population en *Brettanomyces* (ML. Murat). Lors de l'élevage, des soutirages plus fréquents favoriseront aussi la baisse de la charge levurienne.

Le SO<sub>2</sub> est aussi très utilisé pour lutter contre le développement des *Brettanomyces*. La valeur létale en SO<sub>2</sub> moléculaire est de 0,825 mg/L (Boulton), ce qui correspond à une teneur en SO<sub>2</sub> libre de 75 mg/L pour un pH de 3,75. Donc, on ne peut considérer le SO<sub>2</sub> comme un moyen de destruction des *Brettanomyces*. Pour limiter leur développement, la valeur varie entre 0,4 et 0,6 mg/L selon les auteurs. En Australie, la valeur de 0,6 mg/L est conseillée, ce qui correspond à une teneur en SO<sub>2</sub> libre de 30 mg/L à pH 3,5 (acceptable) mais de 55 mg/L pour un pH de 3,75. Ces valeurs ne sont pas compatibles avec l'élaboration de vins de qualité en Europe. Le traitement classique en Australie à 7g/hL en fin de FML non plus. Les australiens en reviennent d'ailleurs, car ils observent, tout comme les américains, de plus en plus de souches de *Brettanomyces* résistantes à ces hautes concentrations en SO<sub>2</sub>, (Curtin, 2007 et Edwards, 2006). Il faudra privilégier d'autres techniques préventives comme indiqué par ailleurs, afin de limiter le sulfitage au strict nécessaire et au meilleur moment (embouteillage).

Un gros point noir constitue l'hygiène des fûts, et malheureusement la grande difficulté à éliminer les *Brettanomyces* d'un fût ayant contenu un vin phénolé. La vapeur est certainement la technique de stérilisation la plus efficace comme l'ont montré plusieurs travaux de Malfeito-Ferreira (2004). Nous avons réalisé de nombreux essais et optimisation des traitements combinant le nettoyage à l'eau sous pression (canne Mog) et la stérilisation avec un générateur de vapeur, et bien souvent les temps de traitements sont largement augmentés par rapport à ce qui se pratique. Un exemple est illustré dans le tableau n°2 et la figure n°2. Une fois ce gros point noir éliminé, il est plus facile de gérer les contaminations. D'autres traitements peuvent être envisagés (produits chimiques, ozone) mais il faudra faire des tests pour adapter à vos conditions. A noter que l'eau ozonée est très utilisée (USA, Australie, Nouvelle-Zélande) mais il a été démontré que dans ce cas l'ozone ne pénètre pas dans le bois donc ne constitue qu'un traitement hygiénique final d'appoint. Le traitement avec de l'ozone sous forme de gaz est plus efficace mais constitue une pratique dangereuse pour le caviste qui la met en œuvre.

Tableau n°2 : différentes procédures de nettoyage-désinfection incluant l'utilisation de vapeur

	procédure 1	procédure 2	procédure 3
eau	1min	1min	1min
vapeur	2min	3min	6min
Eau haute Pression	2min	2min	5min
vapeur	6min	10min	10min
eau	2min	2min	2min

Figure 2 : contamination en *Brettanomyces* dans des fûts avant et après nettoyage-désinfection selon les procédures du tableau 2 (av = avant traitement, ap = après traitement).Brett / cm<sup>3</sup> de bois

Il existe aussi des techniques de régénération de fûts, utilisant soit les micro-ondes soit un traitement à la silice. Cette dernière technique, plus récente, avec l'abrasion d'un bon centimètre de bois, suivie d'une stérilisation à la vapeur et un sulfitage final, semble donner de très bons résultats (technique Barena).

Lorsqu'on arrive à l'étape de la mise en bouteilles, on ne parle plus de baisse de la contamination mais il faut passer à une élimination totale. A ce stade d'ailleurs, il faut s'assurer de l'absence totale de *Brettanomyces*, sous peine de développement probable en bouteilles, donc on contrôlera en filtrant un volume de 750 mL idéalement. La mise en culture reste à ce stade la technique la plus fiable. Pour éliminer les *Brettanomyces* détectés, deux techniques sont utilisées : la filtration et le traitement au DMDC (di-méthyl-di-carbonate ou Velcorin, seule marque disponible). A noter que ce traitement, admis par l'OIV, n'est autorisé en Europe que pour les vins avec plus de 5g/L de sucres (pour l'instant), donc ne concerne pas les vins rouges en général. Par contre, il est très efficace et très utilisé aux USA. Il agit très rapidement et se décompose en quelques heures en un peu de méthanol et CO<sub>2</sub>. Il a l'avantage de stériliser non seulement le vin mais aussi la tireuse et la bouteille. Il est très important de veiller à un bon nettoyage-désinfection de la tireuse et du circuit (filtres, tuyaux), car il peut se former des biofilms contaminés en *Brettanomyces* (je l'ai déjà observé).

En ce qui concerne la filtration stérile, il faudra se situer à 0,65 µm au maximum, les porosités supérieures laissant passer les cellules de *Brettanomyces* (Renouf, 2007). Certains parlent de cellules encore plus petites (notamment les VNC) donc tout le travail de prévention de la

croissance des *Brettanomyces* en amont durant la vinification et l'élevage est primordial pour garantir une sécurité finale.

Enfin, si jamais le producteur ne souhaite pas utiliser ces traitements sur son vin (fréquent dans les Grands Crus de Bourgogne, Vallée du Rhône, Bordeaux), il faut savoir que des bouteilles stockées en dessous de 13°C auront beaucoup moins de chance de voir se développer la contamination et les odeurs phénolées, que si elles sont conservées à 18°C ou plus (Gerbaux, 2008) .

### Conclusion

On peut voir à travers toutes ces nouveautés que les œnologues et vinificateurs sont dorénavant mieux armés pour la prévention des déviations liées aux *Brettanomyces*, mais il faut être très vigilant, mettre en place des procédures de prélèvement et contrôle bien pensées et adaptées à son chais, ne pas hésiter à combiner les techniques et se faire sa propre expérience. Il est possible, comme je l'ai déjà fait dans plusieurs caves (comme d'autres collègues spécialistes) de maîtriser les *Brettanomyces* sans nécessairement passer par des techniques d'élimination puissantes comme la flash-pasteurisation ou la filtration stérilisante ou des sulfitages à forte dose. Il faudra veiller à associer tout le personnel de cave à la démarche.

### BIBLIOGRAPHIE

J. Goode and S. Harrop, Wine faults and their prevalence : data from the world's largest blind tasting, in 16èmes Entretiens Scientifiques Lallemand, Horsens, 2008

C. Curtin, Sensory perceptions of "Brett" and relationship to consumer preference, in 13ème AWITC, 2007.

D. SALAMEH , C. BRANDAM, W. MEDAWAR , R. LTEIF, P. STREHAIANO -

Influence de l'étape de croissance et de la quantité de *Brettanomyces Bruxellensis* sur la production d'éthylphénols - 8<sup>ème</sup> symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2007.

A. DELAHERCHE., O. Claisse, A. LONVAUD-FUNEL , Détection et quantification de *Brettanomyces Bruxellensis* par PCR quantitative, 7<sup>ème</sup> symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2003.

A. DELAHERCHE., J.COULON, E. WALLING, A. LONVAUD-FUNEL , Détection et quantification de *Brettanomyces Bruxellensis* par PCR quantitative, 8<sup>ème</sup> symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2007.

L. Massini, F. Remize, H. Tessonniere, B. Bach, L. Barnavon, Quantification de *Brettanomyces* dans les vins – Développement et validation d'une méthode directe, sensible et fiable, par PCR quantitative, Rev. Oenol. Bourg. N°133, Octobre 2009.

V. Gerbaux, Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans un vin rouge par cytométrie de flux, Rev. Oenol. Bourg. N°127, avril 2007.

V. Gerbaux et J. Thomas, Utilisations pratiques de la cytométrie de flux pour le suivi des levures en œnologie, Rev. Fr. d'Oe. N°236, juillet-août 2009.

Couto J.A., Barbosa A., Vieira M., Cabral L. ; Graça A.R., Soares-Franco J.M., Hogg T., Detection of *Brettanomyces/Dekkera* in wines in a liquid culture medium, 7<sup>ème</sup> symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2003.

C. Gerland, Interest of a simple new test for large detection of *Brettanomyces* in winery, 3<sup>rd</sup> international Enology and Viticulture conference of S.A. Society for Enol. And Vitic., South Africa, 2006.



A. Oleofse, IS. Pretorius, M Du Toit, Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking : a synoptic review, S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol.29, N°2, 2008.

M.-L. Murat, Prévention du risque *Brettanomyces* par l'utilisation d'outils analytiques innovants et la gestion rigoureuse du process d'élaboration, Rev. CEnol. Bourg., n°121, août 2006.

V. Renouf, M-C. Perello, G. de Revel and A. Lonvaud-Funel, Survival of Wine Microorganisms in the Bottle during Storage Am. J. Enol. Vitic., Sep 2007; 58: 379 - 386.

A. BARATA, J. CALDEIRA, R. BOTELHO, D. PAGLIARA, A. COSTA, MALFEITO-FERREIRA, M. AND LOUREIRO, V. - Effect of different barrique sanitation procedures on yeasts isolated from the inner layers of wood - Annual congress of American Society of Enology and Viticulture – 2004.

R.B. Boulton, V. Singleton, L.F. Bisson and R. Kunkee – Principles and Practices of Winemaking – Chapman and Hall Publishers New York, 1996.

C. Edwards, Spoilage microbes and their detection, what's new ? , 3<sup>rd</sup> international Enology and Viticulture conference of S.A. Society for Enol. And Vitic., South Africa, 2006.

C. Curtin, J. Bellon, E. Kennedy, M. de Barros Lopes, P. Godden, P. Hensckee - Sulfite tolerance amongst genetically diverse *Brettanomyces bruxellensis* yeast strains isolated from Australian red wines, Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, 2007.