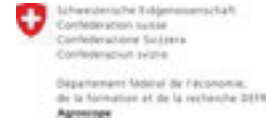


FEDERICO SIZZANO, MARIE BLACKFORD, AGROSCOPE, 1260 NYON

SCOTT SIMONIN, BENOIT BACH, SERGE HAUTIER, CHANGINS, HAUTE ÉCOLE DE VITICULTURE ET ŒNOLOGIE, NYON

FABRICE LORENZINI, CHRISTOPH CARLEN, GILLES BOURDIN, AGROSCOPE, 1260 NYON



DÉTECTION ET IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES : OUTILS APPLIQUÉS À L'ŒNOLOGIE

INTRODUCTION

Le suivi microbiologique pendant le processus de vinification fournit des informations importantes sur l'état de la fermentation ou sur la qualité du vin fini. Par exemple, l'observation d'une mortalité levurienne élevée permet de confirmer une fermentation bloquée ou l'identification de micro-organismes tels que *Brettanomyces* renseigne sur la potentielle altération du vin fini. Aux côtés des outils de la microbiologie classique, deux nouvelles méthodes d'investigation ont émergé : la biologie moléculaire et la cytométrie en flux. Alors que la biologie moléculaire s'intéresse principalement à la caractérisation des acides nucléiques présents dans les micro-organismes, la cytométrie en flux fournit des informations structurelles et fonctionnelles pour chaque cellule bactérienne ou levurienne analysée. Dans cet article nous présentons ces outils d'investigation microbiologique et discutons de leurs complémentarités dans la recherche et dans la pratique en œnologie.

OUTILS DE LA MICROBIOLOGIE CLASSIQUE

En œnologie, la technique d'investigation directe des micro-organismes consiste à prélever un échantillon de moût, d'une fermentation ou d'un vin fini afin de l'observer au microscope à l'aide d'une chambre de comptage (Fig.1A). Les micro-organismes d'intérêt sont identifiés et dénombrés. Grâce à l'utilisation de colorants, il est possible de fournir une évaluation des cellules endommagées. L'identification et le comptage des micro-organismes sur la boîte de Pétri, au contraire, est une méthode indirecte puisqu'elle permet la croissance de micro-organismes à partir de l'échantillon de départ. Dans ce cas, différentes dilutions d'un échantillon sontensemencées sur des boîtes de Pétri et incubées pendant 1 à 7 jours. Les micro-organismes d'intérêt sont reconnus et comptés non plus individuellement mais en tant qu'unités formant des colonies (UFC) (Fig.1B). L'analyse sur boîtes de Pétri est largement utilisée en vinification car elle permet de reconnaître le type de

micro-organisme par l'observation des colonies ou par l'utilisation de milieux sélectifs (par exemple milieu DBDM pour *Brettanomyces/Dekkera*). De manière générale, ces outils analytiques sont simples à mettre en œuvre et peu coûteux. En revanche, la numération et la détermination, tant au microscope que sur les boîtes, peuvent montrer une certaine variabilité analytique. En outre, la culture sur boîte peut prendre plusieurs jours, impactant de manière non négligeable le suivi de la fermentation. De plus, la numération sur boîte ne tient pas en compte des micro-organismes vivants qui ne sont pas cultivables (*Viable not Cultivable*, VNC). Cela peut se traduire par un faux négatif (résultat : absence de *Brettanomyces* alors qu'ils sont présents en état VNC).

LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

La biologie moléculaire traite de l'étude et de la caractérisation des acides nucléiques, tel que l'ADN. L'ADN est un polymère de 4 nucléotides (adénosine, thymidine, guanosine et cytosine) disposées en séquence avec différentes combinaisons sur toute la longueur de la molécule. La séquence nucléotidique de l'ADN est très variable entre les organismes vivants et est utilisée en œnologie pour déterminer précisément les micro-organismes présents avec une résolution très fine. Avec les méthodes moléculaires, il est possible de détecter différentes souches de *S. cerevisiae*. L'une des méthodes de la biologie moléculaire largement utilisées en œnologie est la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La méthode permet d'analyser l'ADN présent en faible quantité au sein des échantillons (exemple un échantillon de moût non ensemencé). De plus, cette technique permet la détermination de séquences spécifiques d'ADN, caractéristiques des différentes espèces bactériennes ou levuriennes présentes dans l'échantillon. Un système PCR pour l'œnologie (Genedisc, Pall), est disponible dans le commerce et est utilisé dans les laboratoires à la HES-SO de Changins. Après lyse cellulaire et extraction d'ADN, grâce à une réaction



Fig.1 Les trois catégories d'outils de la microbiologie. **A.** Comptage direct des micro-organismes. Une aliquote de l'échantillon est chargée dans la chambre de comptage (flèche blanche) et les microorganismes sont dénombrés par observation au microscope. **B.** Colonies de levures en croissance sur milieu gélatineux dans boîte de Petri. **C.** Le système PCR Genedisc de Pall, utilisé par l'école HES-SO de Changins. Les échantillons d'ADN sont chargés dans les micro-puits du disque (flèche noir). Une fois insérée dans le système (flèche blanche), la réaction PCR aura lieu dans les puits et le résultat s'affiche à l'écran. **D.** L'analyseur de cytométrie en flux MACSQuant de Miltenyi Biotech, utilisé par Agroscope. Un petit volume (20–100 microlitres) de l'échantillon contenant les micro-organismes est automatiquement prélevé d'une aiguille (flèche blanche) et analysé. **E.** Graphique « Dot plot » illustrant les résultats d'une analyse de cytométrie en flux. Chaque cellule est représentée par un point (carré bleu). Des groupes de cellules qui possèdent les mêmes caractéristiques de fluorescence émise par des réactifs particuliers sont regroupés en groupes. Le graphique montre les populations de cellules vivantes (entourées en rouge) et mortes (entourées en vert) et leur pourcentage par rapport au nombre total de cellules.

PCR, il est possible d'identifier *S. cerevisiae*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* tant vivantes que VNC en 3 heures (Fig. 1C). Bien que les outils de la biologie moléculaire soient spécifiques et extrêmement sensibles, ils ne fournissent généralement pas d'informations fonctionnelles (viabilité, activité métabolique, etc.) sur la population de micro-organismes examinés. Il est donc nécessaire de disposer d'autres méthodes qui analysent les cellules dans cette perspective.

LA CYTOMETRIE EN FLUX

La cytométrie en flux (FCM) est une méthode largement utilisée dans le domaine de recherche biomédical. Cette technique permet de caractériser un nombre élevé de cellules et de fournir des informations spécifiques à chaque cellule analysée. En bref, dans un cytomètre (Fig. 1D), les cellules sont guidées les unes après les autres dans un système fluide jusqu'à un point d'interrogation. A cet endroit, elles sont excitées par un faisceau de lumière laser et la fluorescence émise est collectée par un système électronique. Les cellules sont finalement

visualisées à l'aide d'un ordinateur sous forme de points sur des graphiques appelés « dot plots », qui affichent sur les axes X et Y une échelle croissante des valeurs de fluorescence (Fig. 1E). La fluorescence est émise directement à partir de réactifs qui indiquent l'état physiologique des cellules. A ce propos, des sondes fluorescentes pour le métabolisme, la viabilité ou pour l'identification phénotypique sont disponibles. En œnologie, la FCM a été appliquée avec succès pour déterminer l'état physiologique (cellules vivantes/mortes) et la concentration des micro-organismes lors des périodes de vinification. En outre, cette méthode a permis de mettre en évidence des cellules VNC, qui ne sont pas prises en compte par les techniques conventionnelles. En général, la FCM fournit des informations sur la microbiologie de la fermentation en un temps très court (quelques minutes) et peut être considérée comme un outil presque « en ligne ». Au niveau commercial, il existe des appareils et des réactifs optimisés pour l'analyse microbiologique des moûts, des fermentations ou des vins finis (par exemple le système Sysmex). Ils peuvent être mis

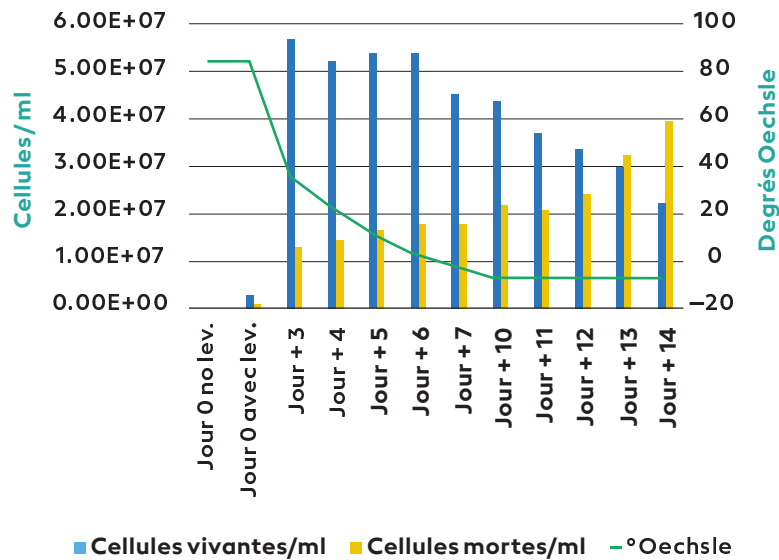


Fig. 2. Suivi par cytométrie en flux d'une fermentation alcoolique d'un moût de Chasselas inoculé avec *Saccharomyces cerevisiae* à l'aide d'un bioréacteur de 30L. En bleu la concentration (cellules/ml) de levures vivantes en orange la concentration de cellules mortes. La courbe décrit la tendance des valeurs densitométriques mesurées en degrés Oechsle.

en œuvre de manière relativement simple dans les laboratoires de microbiologie œnologique. La FCM est utilisée et en cours de développement à l'Agroscope de Changins et prendra de plus en plus d'im-

portance tant pour le suivi analytique de la vinification en cave que pour l'expérimentation au niveau du laboratoire où elle servira à étudier en détails les mécanismes cellulaires sous-jacents aux fermentations (Fig. 2).

ANNONCE

Depuis près de 50 ans auprès de vous en Suisse, dans les cantons de Genève, Tessin, Valais, Vaud.

JEAN-CLAUDE FAY
PÉPINIÈRES VITICOLES

Des réponses à vos demandes, de très haut niveau qualitatif :

- un **contrôle total** des vignes mères,
- la **traçabilité et le contrôle sanitaire** rigoureux du matériel,
- les contrôles effectués par un **organisme indépendant**,
- possibilité de **greffer** vos sélections.

PEPINIERES VITICOLES

Après plus de **60 ans d'exercice de notre métier**, nous portons une grande attention à la qualité de nos plants.

+33 (0)6.70.73.98.10.
www.pepinieres-viticoles-fay.fr

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les outils d'analyse décrits dans l'article présentent à la fois des avantages et des inconvénients. Les analyses microbiologiques classiques offrent des capacités d'identification phénotypique et une facilité de mise en œuvre. Cependant, ils peuvent présenter une variabilité analytique et des temps d'exécution longs. Les méthodes de biologie moléculaire, bien qu'extrêmement spécifiques et sensibles, ne sont généralement pas capables de fournir des informations fonctionnelles au niveau cellulaire. Enfin, la cytométrie en flux, une méthode puissante et polyvalente pour définir la fonctionnalité au niveau de la cellule unique, n'est pas en mesure, du moins pour l'instant, de fournir un niveau élevé d'identification taxonomique des micro-organismes. Idéalement, toutes ces possibilités analytiques devraient être utilisées conjointement, car l'une peut résoudre les limites de l'autre. C'est dans cet esprit que nous développons un centre de compétence pour la recherche en microbiologie œnologique sur le site de Changins, (collaboration entre Agroscope et la HES-SO Changins). La possibilité de développer et idéalement de transférer différents supports de suivi microbiologique pourrait être avantageuse pour les principaux acteurs du domaine œnologique que sont les encaveurs et les laboratoires cantonaux et privés.