

Techniques d'identification et de quantification de l'impact des microorganismes indésirables en œnologie

Pascal CHATONNET & Sébastien PAILLARD

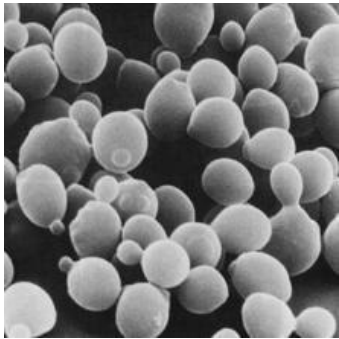
Laboratoire EXCELL France

33700 MERIGNAC

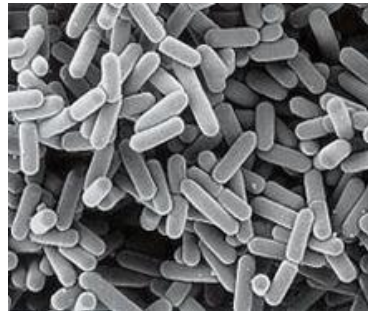
Micro-organismes ciblés ?

germes capables de provoquer une altération de la composition originelle du vin au cours de la vinification ou pendant l'élevage => Défaut(s) organoleptique(s)

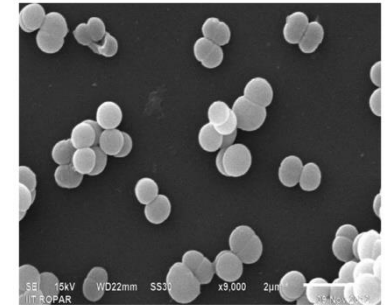
Levures



Bactéries Acétiques



Bactéries Lactiques



• **Refermentation des vins sucrés**

- *Saccharomyces*
- *Zygosaccharomyces*
- **Caractère "phénolé"**
- *Brettanomyces intermedius*
- **Déacidification**
- *Schizosaccharomyces pombes*

• **Piqure acétique**

- *Acetobacter aceti*

- *Oenococcus oeni*
- *Lactobacillus sp.*
- *Pediococcus sp.*

Homo/Hétérofermentaires

- **Dégradation de l'acide malique**
- **Piqûre lactique (sucres)**
- **Excès d'amines biogènes**
- **Piqûre Lactique Pentoses**
- **Dégradation du Glycérol**
- **Dégradation de l'acide tartrique**



Techniques de détection et de quantification des micro-organismes ciblés en Oenologie ?



- Détection/quantification des **micro-organismes** : **nécessaire voire indispensable à la préparation des vins à l'embouteillage – Inadapté au suivi en cours d'élevage**
 - Cultures sur milieux spécifiques
 - Cytométrie de flux +/- marquage spécifique (biomoléculaire, immunologique,...)
 - Technique d'analyse biomoléculaire:
 - ⇒ Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-Q-PCR)
 - ⇒ **EXCELL GEN[®]** = RT-Q-PCR Multiplex
- Détection/quantification de **métabolites caractéristiques** des micro-organismes: **bien adapté au suivi régulier des vins en cours d'élevage**
 - Dosage de l'acidité volatile => *Acetobacter sp.*
 - Dosage des phénols volatil => **Suivi Brett EXCELL[®]** : *Brettanomyces sp.*
 - Dosage simultané **de différents métabolites caractéristiques de tous les micro-organismes ciblés** => monitoring simultané et prévention rapide de toutes les altérations microbiologiques => EXCELL MONITORING Multiplex[®]
 - Technique dérivée de CHECK LIST[®] destinée à la recherche multi-contaminants des polluants odorants du vin
 - Développement de nouvelles techniques permettant de **mesurer simultanément tous les contaminants d'intérêt**



RT-Q-PCR : EXCELL GEN®

- Par rapport aux méthodes concurrentes/alternatives, la RT-Q-PCR présente des avantages et des inconvénients
 - **Avantages:**
 - Rapide
 - Sensible
 - Très spécifique
 - Détection simultanée de tous les micro-organismes cibles sur le même échantillon (si la technique est adaptée = Mutiplex)
 - **Inconvénients:**
 - Prix de revient
 - Technicité = Contraintes inhérentes à la méthode
 - Extraction de l'ADN : lyse cellulaire => lyse optimisée (chimique vs mécanique par exemple)
 - Purification de l'ADN : élimination des inhibiteurs provenant de la lyse chimique et du vin (polyphénols/PVPP)
 - Amplification /Quantification de l'ADN : sondes fluorescentes adaptées + étalons internes indispensables (levures/bactéries)

Limitations/Avantages de la Q-RT-PCR : v-PCR et PCR Multiplex

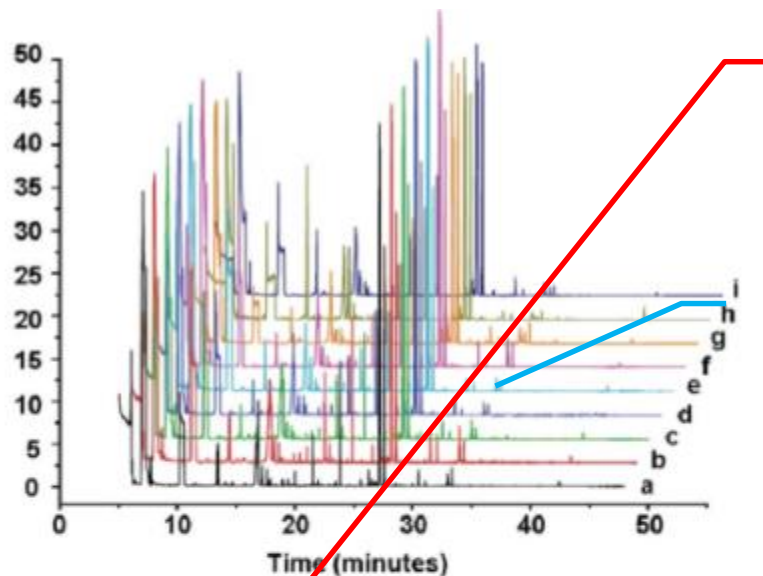


- **Détermination des germes totaux/germes viables => Amplification de l'ADN:**
 - des germes viables;
 - des germes viables non cultivables (VNC);
 - des germes à membrane +/- perméabilisée : a priori non viable (non viable à +/-long terme)
 - ADN libre dans le milieu : amplifiable durant 4 à 6 semaines dans le milieu vin (éthanol, pH acide, polyphénols)
 - Utilisation d'intercalants (Propidium Monoazide Bromide, PMA) de l'ADN des cellules mortes (v-PCR) car ne pouvant que diffuser sur cellules à membrane non intégrée (perméabilisée = cellule morte)
 - Toxicité propre de l'agent intercalant!
 - Perturbation de la spécificité vis à vis des cellules perméabilisées par l'éthanol!
 - » Sensibilité > 200 cellules/ml
 - » Sous-estimation importantes des faibles populations
- **Détermination simultanée de tous les germes cibles (PCR Multiplex):**
 - Levures
 - Bactéries acétiques
 - Actériques lactiques
 - Seuil de détection : environ 1 cellule/ml si prise d'essai > 100 ml et lyse cellulaire optimisée
 - Seuil de quantification : +/- 25-50 cellules/ml

Détection et Suivi du développement des micro-organismes indésirables dans le vin par dosage de métabolites spécifiques: EXCELL MONITORING Multiplex®

- Utilisation de la GC/MS-MS
- Analyse simultanée en un seul run sur une seule colonne grâce à une technique de dérivation adaptée des différentes molécules
- Dérivation on line sur fibre HSSPME automatique
- Etalons internes deutérés des marqueurs ciblés

- Pas d'échantillonnage stérile
- Résultats sous 12-24h
- Nécessite un suivi régulier (mensuel)

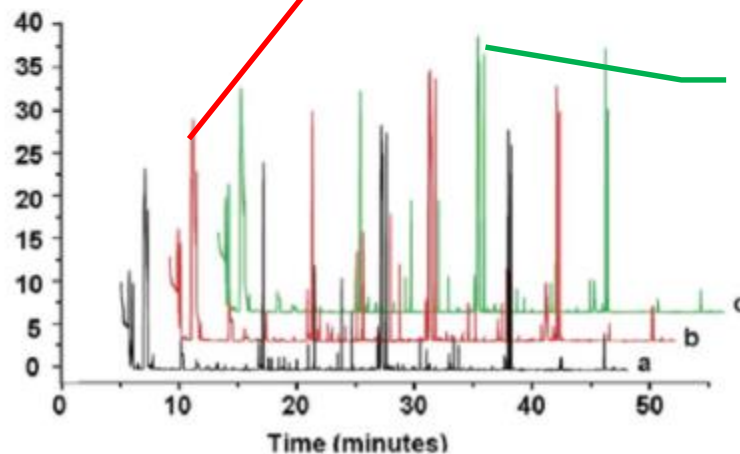


Bactéries acétiques:

- Acide acétique
- Acétate d'éthyle

Brettanomyces:

- Éthyl-4-phénol
- Éthyl-4-gaïacol

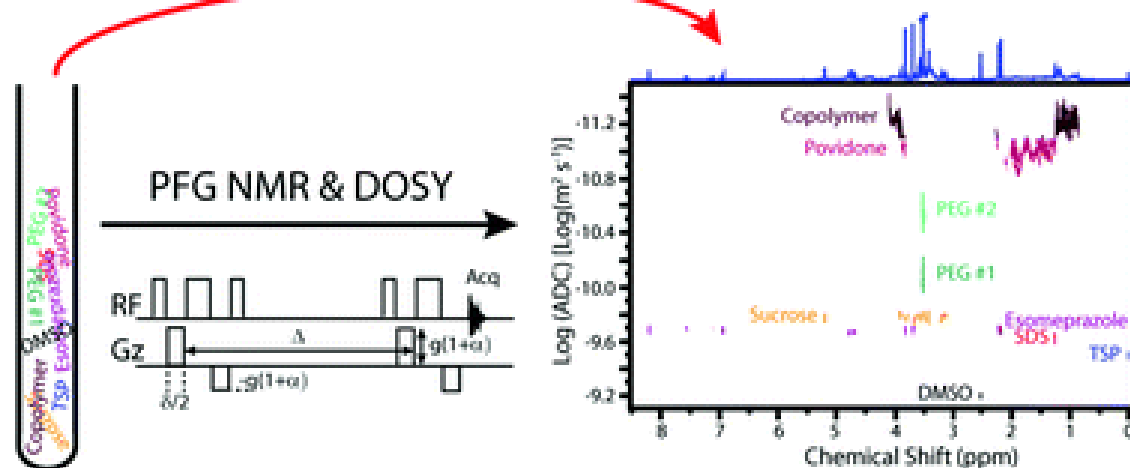


Bactéries lactiques

- Lactate d'éthyle
- Amines biogènes (tyramine, putrescine, histamine...)
- ...

Prospective: Dosage simultané des métabolites cibles (et autres) sans préparation d'échantillon par HR-DOSY-RMN (haute fréquence)

Unravelling mixture



- La RMN diffusionnelle (DOSY) est un outil puissant pour l'analyse de mélanges complexes. Son champ d'application était cependant restreint par la faible sensibilité des expériences RMN du H.
- La polarisation dynamique nucléaire (DNP) permet d'accroître la sensibilité de plusieurs ordres de grandeur, mais elle n'est pas compatible avec la RMN diffusionnelle sous sa forme usuelle.
- Les chercheurs de l'équipe de RMN de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles ont montré qu'en utilisant un codage spatial des propriétés de diffusion, il est possible d'acquérir des expériences de RMN diffusionnelle qui bénéficient de la sensibilité accrue permise par la DNP.
- L'utilisation de la RMN haute fréquence (800-900 MHz) permettrait d'atteindre des seuils de sensibilité de l'ordre du milligramme au sein d'un mélange complexe comme le vin et des temps d'analyse réduit à quelques minutes

Conclusions

- Le dosage exhaustif de métabolites caractéristiques est la technique de choix (rapide, économique, sans échantillonnage complexe) pour le suivi de l'évolution des vins en cours de vinification et d'élevage.
- La microbiologie moléculaire (moyennant un échantillonnage représentatif et stérile) est la technique certainement la plus complète et la plus adaptée lorsqu'il s'agit (i) de préparer un vin à la mise en bouteille ou/et (ii) d'arrêter une stratégie d'enrayement de contamination
- En ce cas, il vaut mieux sur-estimer un risque que le sous-estimer : les techniques alternatives à la Q-PCR souffrent de sensibilités souvent insuffisantes et d'un cruel manque d'exhaustivité ou de représentativité de sources de risque!