



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

Pascal CHATONNET & Sébastien PAILLARD

Le vin est un produit susceptible d'être exposé à plusieurs types de micro-organismes tout au long des processus de fermentation, d'élevage et éventuellement de vieillissement. Parmi ces microorganismes, certains sont indispensables à l'élaboration d'un produit de qualité et d'autres beaucoup moins. Les germes susceptibles d'affecter négativement la qualité du vin sont généralement qualifiés de germes de contamination. Parmi ces germes particuliers, certains sont systématiquement présents et d'autres plus exceptionnellement. Le plus souvent on ne parle d'altération, ou de contamination avérée, que quand le métabolisme de ces germes conduit à la biosynthèse de composés altérant la qualité du vin. Cette altération n'est décelable qu'au-delà d'une certaine concentration du, ou des, contaminants produits par ces microorganismes. En dessous de cette limite, ces mêmes contaminants font partie de la composition normale du vin ou peuvent même participer positivement à sa qualité dans certains cas.

La stratégie employée aujourd'hui pour le contrôle de ces déviations indésirables fait généralement appel à la détection et à la quantification précoce des populations de germes de manière aussi spécifique que possible. Différentes techniques sont disponibles à cette fin, de la culture sur des milieux plus ou moins sélectif en passant par le comptage (CFC) de cellules marquées de manière plus ou moins sélective (FISH) et l'utilisation des techniques de biologie moléculaire quantitative en temps réel (QPCR). Chaque technique possède ses avantages et inconvénients. La mesure aussi sensible que possible des populations de germes s'impose au moment de l'embouteillage final. En revanche, pour le monitoring des vins en cours d'élevage, le suivi des germes de contamination peut plus aisément se faire par le dosage de métabolites spécifiques. Cette technique présente l'avantage d'être plus rapide, moins coûteuse et surtout de ne pas nécessiter de prélèvement stérile. Le développement d'une nouvelle technique CHECK LIST EXCELL® basée sur la GC/MSMS ou l'UHPLC/MSMS permet d'ores et déjà le dosage simultané de différents métabolites pour détecter le développement anormal de l'ensemble des familles de germes de contamination des vins. Plus prospectivement, la mesure de diffusion par RMN et les expériences de type DOSY sont de puissants outils analytiques qui ont été longtemps sous exploités. Les spectromètres RMN modernes à haute fréquence (équipés d'une sonde à gradient Z) permettent désormais de réaliser de telles mesures dans des conditions optimales. Un traitement mathématique complexe des données recueillies permet l'obtention de résultats pertinents et précis utilisables pour doser rapidement, simultanément, sans aucune préparation, ni séparation, différents métabolites cibles au sein du mélange complexe qu'est le vin.

Pour la mesure des populations de germes résiduelles, la QPCR a l'énorme avantage de permettre de détecter rapidement (<24h), de quantifier ultra-spécifiquement et avec une sensibilité meilleure que toutes les autres techniques (<10 cellules/ml), l'intégralité des germes de contamination d'intérêt en œnologie. Les techniques d'extraction de l'ADN sont certainement à l'origine des écarts parfois importants notés entre les différents kits commerciaux utilisés par les laboratoires non spécialisés. EXCELL a développé une méthodologie qui permet de garantir une parfaite extraction quel que soit le type de microorganisme. Les variations d'amplification parfois notées dans les vins rouges les plus riches en polyphénols sont facilement levées par l'ajout de PVP en quantité *ad hoc*. Par contre, il est certain que la QPCR quantifie les cellules viables, viables non cultivables et certaines cellules mortes. En effet, la stabilité de l'ADN dans le vin qui dépend de la teneur en éthanol, du pH et de la présence de polyphénols, permet toujours d'amplifier l'ADN de cellules mortes ou ayant fui dans le milieu plusieurs semaines après la mort de la cellule. D'un point de vue pratique, il est plus intéressant de surestimer que sous-estimer un risque. L'utilisation de techniques à base d'intercalants ne migrant pas à travers la membrane cytoplasmique permet théoriquement de différencier les cellules mortes des vivantes. Néanmoins, compte tenu de la toxicité propre de ces produits, nous avons montré que les techniques actuelles ne permettent de toujours mesurer avec suffisamment de précision et de répétabilité les populations supérieures à 200 cellules/mL ce qui n'est pas parfaitement satisfaisant.