



Identification et Quantification Rapide des Contaminations Chimiques et Microbiologiques Majeures des Vins

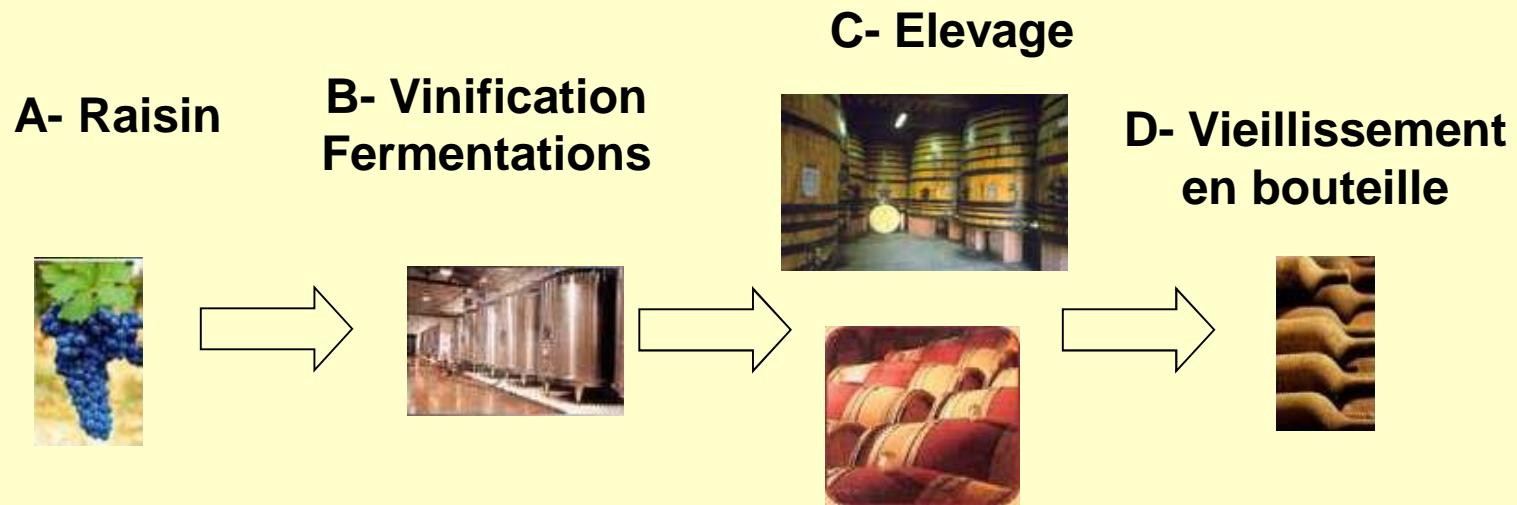
Pascal CHATONNET

Stéphane BOUTOU
Antoine Fleury

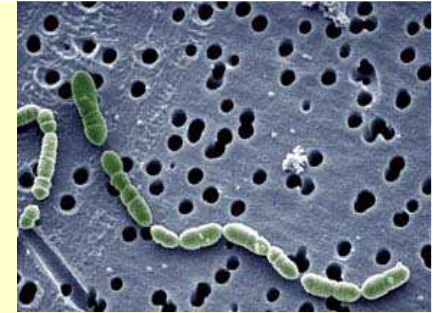
Laboratoire EXCELL
33700 MERIGNAC France

Contaminations Microbiologiques du Vin :

Elles peuvent apparaître à tous les stades de
l'élaboration



Principaux Micro-organismes Contaminants des Vins



- **Levures**

- *Brettanomyces intermedius*
 - Production de phénols volatils (éthyl-phénols)
- *Zigosaccharomyces bailli*
 - Refermentation des sucres résiduels malgré la présence d'antiseptiques

Comment les détecter et les quantifier rapidement et sélectivement ?



- **Bactéries**

- Bactéries acétiques

- *Acetobacter sp.*,
Gluconobacter sp. :
 - Production d'acide acétique, d'acétate d'éthyle et d'acides gras volatils

- Bactéries lactiques

- *Lactobacillus sp.*
 - Production d'amines biogènes
 - Dégradation lactique du glycérol
- *Pediococcus sp.*
 - Production d'amines biogènes
 - Production d'acétyl-tétrahydropyridines
 - Production d'acroléine

a) Culture des microorganismes sur milieux synthétiques



Un milieu spécifique pour chaque micro-organismes :

- Très difficile de différencier les différentes bactéries lactiques par culture ;
- Le contrôle de *Brettanomyces* nécessite un milieu de culture spécifique que quasiment aucun laboratoire n'utilise ;
- Beaucoup de faux positifs.

Délai de culture variable selon les micro-organismes et leur état physiologique (2 à 8 jours) :

- Réponse trop tardive pour être vraiment utile dans quasiment tous les cas !

Non prise en compte des germes viables mais non cultivables en raison de leur état physiologique au moment du contrôle !

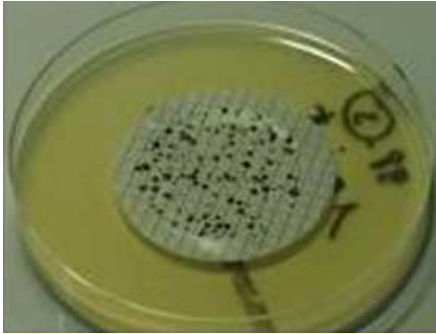
b) Evolutions de la culture simple sur milieux synthétiques

	Culture sur milieu spécifique Suivi Brett Excell	Culture / PCR / migration sur gel	Culture / Détection de micro-colonies
Principe	Culture sur milieu synthétique spécifique	Culture sur milieu semi spécifique / PCR / électrophorèse	Culture sur milieu semi spécifique + identification des colonies / anticorps fluorescent
Délai de réponse	5 à 8 jours	6 à 9 jours	2 à 4 jours
Spécificité	Dépend de la spécificité des milieux de culture	Spécifique aux microorganismes visés par le choix des amorces	Semi spécificité des milieux de culture + spécificité des anticorps
Sensibilité	Détection des germes quiescents aléatoire = sous estimation de la population potentiellement dangereuse		10 UFC/ml
Précision	La faible viabilité des cellules due aux conditions « stressantes » du vin peut conduire à des résultats dits « faux négatifs »		Défauts de fonctionnement
Application de la technique	Facile à mettre en œuvre, équipement peu onéreux	Main d'œuvre qualifiée / Equipement spécifique	Coûteux / Matériel spécifique / Précautions de manipulations sévères

Peu coûteuse
Délai de réponse trop long
Ne détecte pas les germes viables non cultivables (VNC)

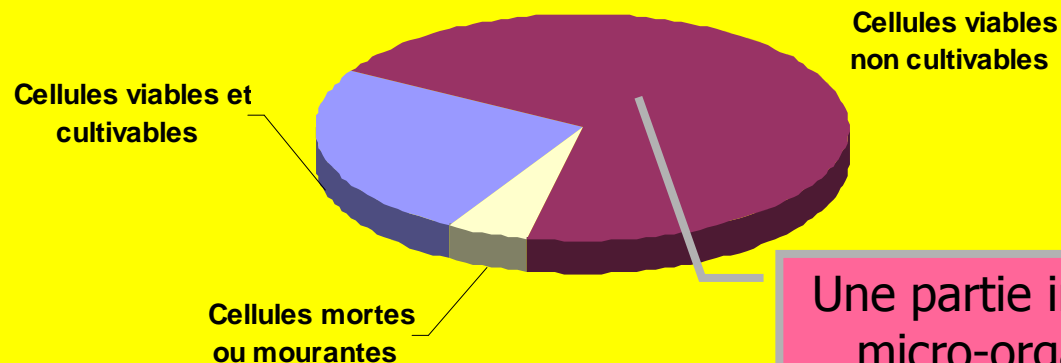
Délai de réponse trop long
Ne détecte pas les VNC

Défaut de fonctionnement
(Millipore)



Les germes viables non cultivables (VNC)

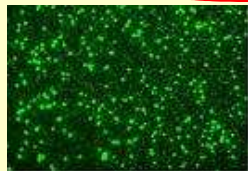
Distribution caractéristique des populations microbiennes dans un échantillon de vin



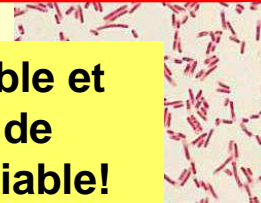
Une partie importante de ces micro-organismes pourra néanmoins se développer après un temps d'acclimatation variable et la disparition de leur stress physiologique (antiseptiques, température,....)

d) Techniques Alternatives Jugées Non Fiables

	Epifluorescence	Cytométrie de flux pour détecter <i>Brettanomyces</i>	Analyse microscopique	Sniff'Brett'
Principe	Marquage des cellules par fluorescence / Quantification du signal fluorescent	Marquage par fluorescent non spécifique des cellules vivantes	Observation microscopique	Culture sur milieu liquide semi spécifique / détection des métabolites par analyses sensorielles
Délai de réponse	24 heures	< 15 minutes	15 minutes	2 à 13 jours
Spécificité	Non spécifique	Non spécifique	Non spécifique	Détection des populations viables en cours de croissance
Sensibilité	100 000 cellules / mL	200 cellules / mL	100 000 cellules / mL	test semi quantitatif
Précision	Les morphologies ambiguës des microorganismes peuvent facilement aboutir à de mauvaises identifications			La faible viabilité des cellules due aux conditions « stressantes » du vin conduit à des résultats « faux négatifs »
Application de la technique	Main d'œuvre qualifiée / Matériel spécifique	Main d'œuvre qualifiée / Matériel spécifique / Appliquable seulement quand la fermentation alcoolique est terminée ou bloquée	Facile à mettre en œuvre / Coût faible	Facile à mettre en œuvre / coût faible



Sans intérêt car non peu sensible et pas spécifiques en absence de « marquage » immunologique fiable!

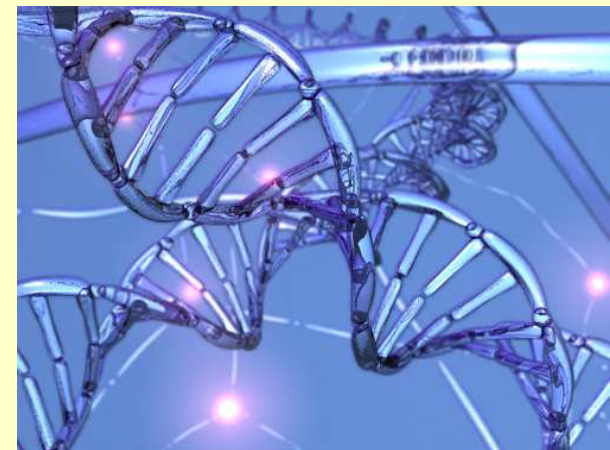


Peu d'intérêt car : non spécifique, non quantitative et délai beaucoup trop long

e) Mesure des principaux micro-organismes contaminants du Vin par analyse biomoléculaire quantitative en temps réel

Innovation 2008

- Développement de la technique EXCELL Gen®
 - EXCELL Gen Levures
 - EXCELL Gen Bactéries
 - EXCELL Gen Brettanomyces



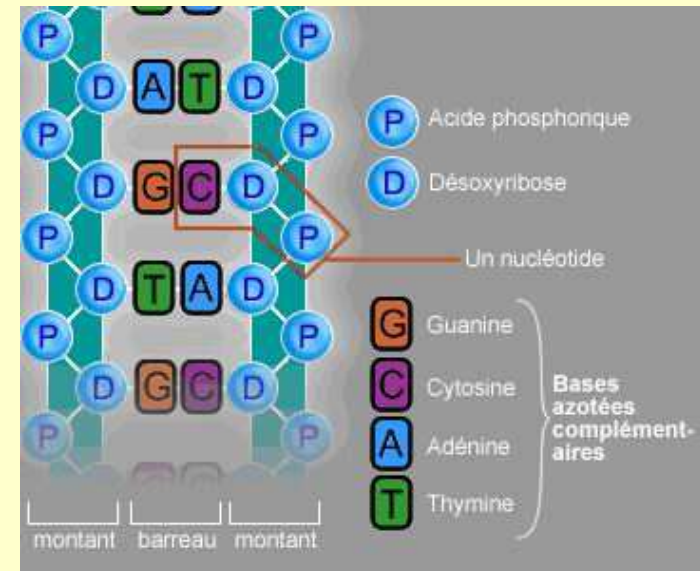
Arômes, texture et consommateurs



Rappel : l'ADN molécule du vivant

- ✓ L'ADN est une molécule que l'on retrouve dans toutes les **cellules vivantes**. L'ADN est le **support de l'hérédité** et de l'information génétique car il constitue le **génome** des êtres vivants et se transmet en totalité ou en partie lors des processus de reproduction. L'ADN détermine la synthèse des protéines.
- ✓ Sa fonction principale, est de **stocker l'information génétique, information qui détermine le développement et le fonctionnement des organismes vivant**. Cette information est contenue dans l'enchaînement non-aléatoire de nucléotides (Adénine, Thymine, Cytosine, Guanine).

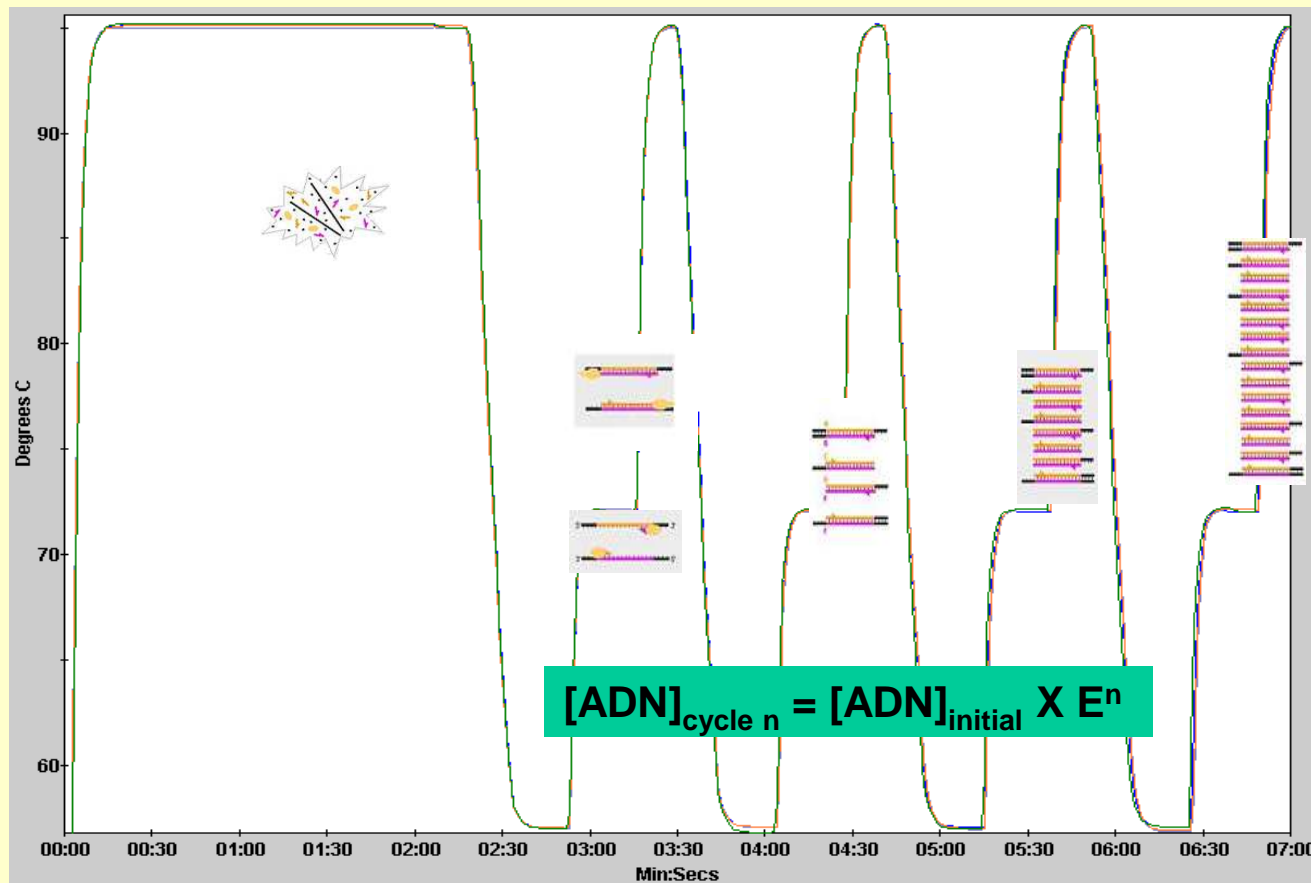
- ✓ Pour chaque type de micro-organismes, **il existe des séquences nucléotides extrêmement spécifiques** qui permettent de les différencier !



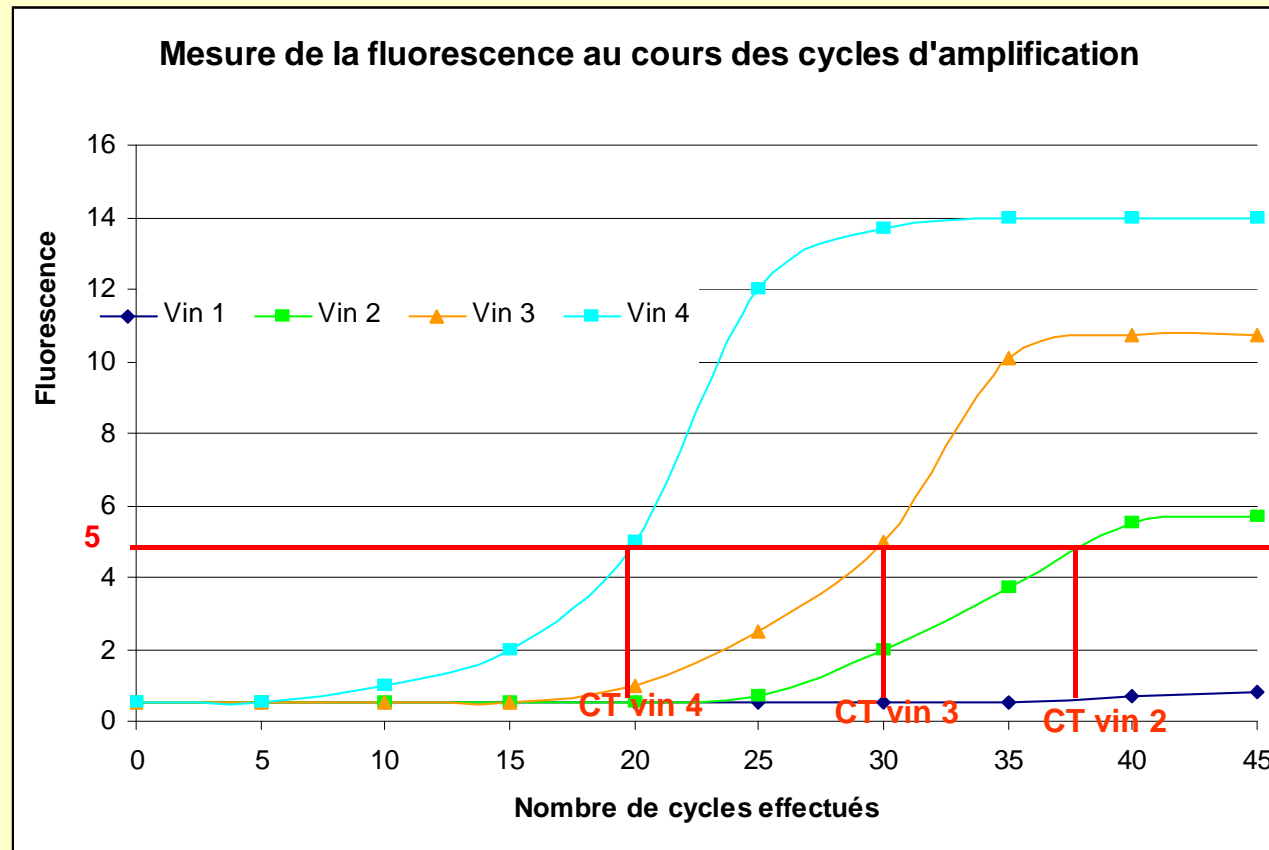
Arômes, texture et consommateurs

La PCR (Polymerase Chain Reaction)

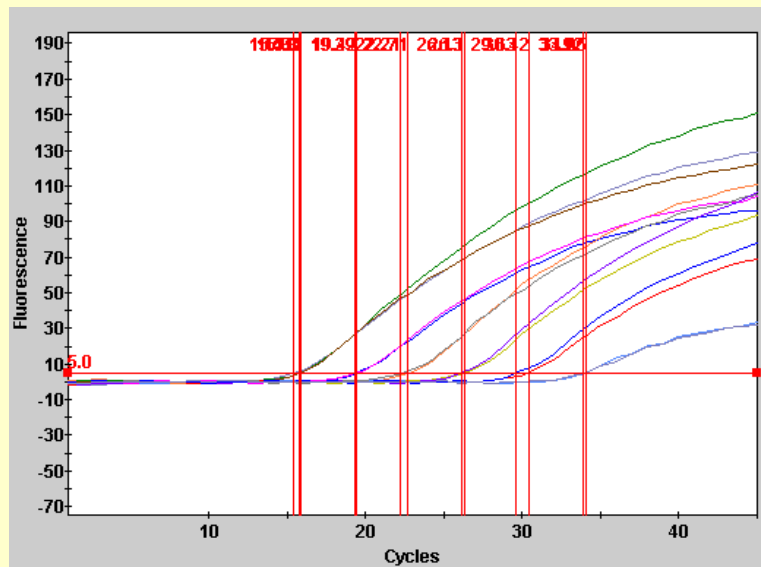
- ✓ La PCR est une méthode permettant de localiser dans l'ensemble des molécules d'ADN d'un individu, les morceaux (séquences, gènes) propres à l'individu et de les copier une multitude de fois en un temps très court.



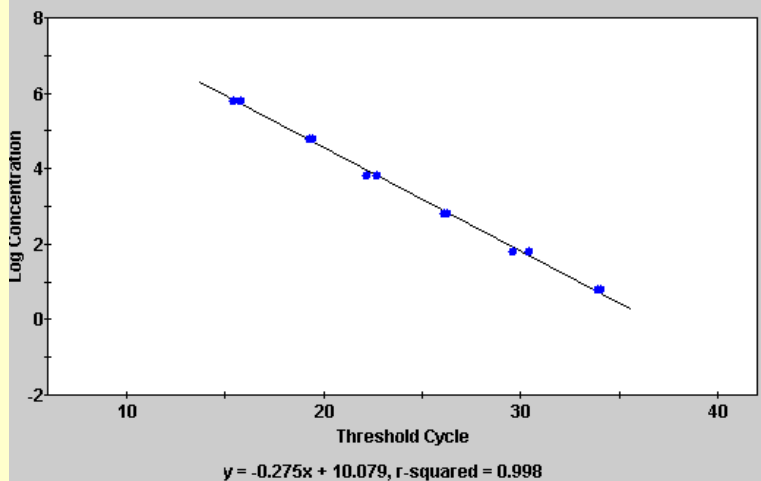
La PCR quantitative en temps réel est une révolution dans l'utilisation de la PCR, elle consiste à mesurer la quantité d'ADN amplifiée au cours du temps grâce à un **marqueur fluorescent spécifique** pour faire des mesures quantitatives en temps réel.



CT (Cycle Treshold) = nombre de cycles d'amplification nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence statistiquement significatif par rapport au bruit de fond



Site ID	Sample ID
A1	0709201-1
A1	0709201
A2	0709201-2
A2	0709202
A3	0709201-3
A3	0709203
A4	0709201-4
A4	0709204
A5	0709201-5
A5	0709205
A6	0709202-1
A6	0709206
A7	0709202-2
A7	0709207
A8	0709202-3
A8	0709208
A9	0709202-4
A10	0709202-5

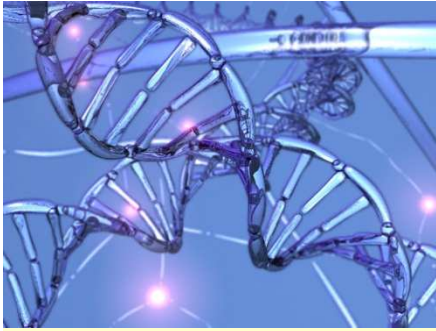


Site ID	Sample ID
A1	0709201-1
A1	0709201
A2	0709201-2
A2	0709202
A3	0709201-3
A3	0709203
A4	0709201-4
A4	0709204
A5	0709201-5
A5	0709205
A6	0709202-1
A6	0709206
A7	0709202-2
A7	0709207
A8	0709202-3
A8	0709208
A9	0709202-4
A10	0709202-5

La spécificité et la multiplicité des amorces et des sondes fluorescentes utilisées permet la détection simultanée de différents types de micro-organismes !

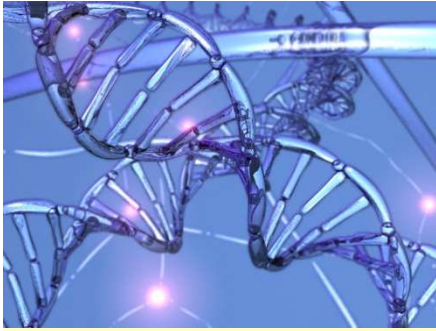
Grâce à une **courbe de calibration** effectuée pour chaque type de micro-organisme ciblé, il est possible quantifier précisément la quantité de cellules présentes dans l'échantillon

$$[\text{Population}] = [\text{Population}]_{\text{CT}} \times (1/E^{\text{CT}})$$



Les différentes étapes de la méthode analytique **EXCELL Gen**®


- **Isolement / Extraction / Purification des ADN**
 - ✓ Isolement et lyse des cellules de microorganismes
 - ✓ Extraction / purification des molécules d'ADN
- **Amplification et détections spécifiques des molécules d'ADN**
 - ✓ Amplification par amorces spécifiques (PCR)
 - ✓ Détection par sondes spécifiques marquées
- **Interprétation des résultats**
 - ✓ Courbes de calibrations
 - ✓ Détermination des populations de l'échantillon



Caractéristiques de la méthode EXCELL Gen ®

- La méthode d'isolement des molécules d'ADN microbiens développée est unique, son efficacité est inégalée par les autres méthodes
- **Très faible niveau de bruit**, permettant l'obtention d'un rapport signal sur bruit très important et ainsi une très grande sensibilité (limites de détection très basses ex : *Brettanomyces* <10 cellules /100 mL)
- Les systèmes de marquage des molécules d'ADN ciblées sont les plus sophistiqués du marché et les plus discriminants ; ils utilisent des amorces et des sondes spécifiques qui rendent possible la **détection simultanée de l'ensemble des microorganismes ciblés**
- Par l'utilisation d'un contrôle interne, **le risque de donner un résultat dit "faux négatif" est quasi nul**
- **Elle est rapide # 8 heures.**

Caractéristiques comparées des méthodes quantitatives « temps réel »

	 Excell Gen	Autres laboratoires	Suivi des produits de synthèse des microorganismes Diagnostic Brett Excell
Principe	PCR quantitative en temps réel		Analyse par chromatographie phase gazeuse
Délai de réponse	8 heures	48 heures	2 heures
Spécificité	Amorces + Sondes spécifiques	Amorces uniquement spécifiques	Haute : détection des éthylphénols (produits de synthèse des Brettanomyces)
Sensibilité	10 cellules viables /100 mL	1000 cellules /100 mL	Limite de détection basse (éthyl-4-phénol = 27 µg/L; seuil de perception : 450 µg/L)
Précision	Contrôle interne ↓ Pas de "faux négatif"	Pas de contrôle interne ↓ Risque de "faux négatif"	Incertitude = 31 µg/L
Application de la technique	Main d'œuvre qualifiée / Matériel spécifique		Peu onéreux/ Matériel spécifique

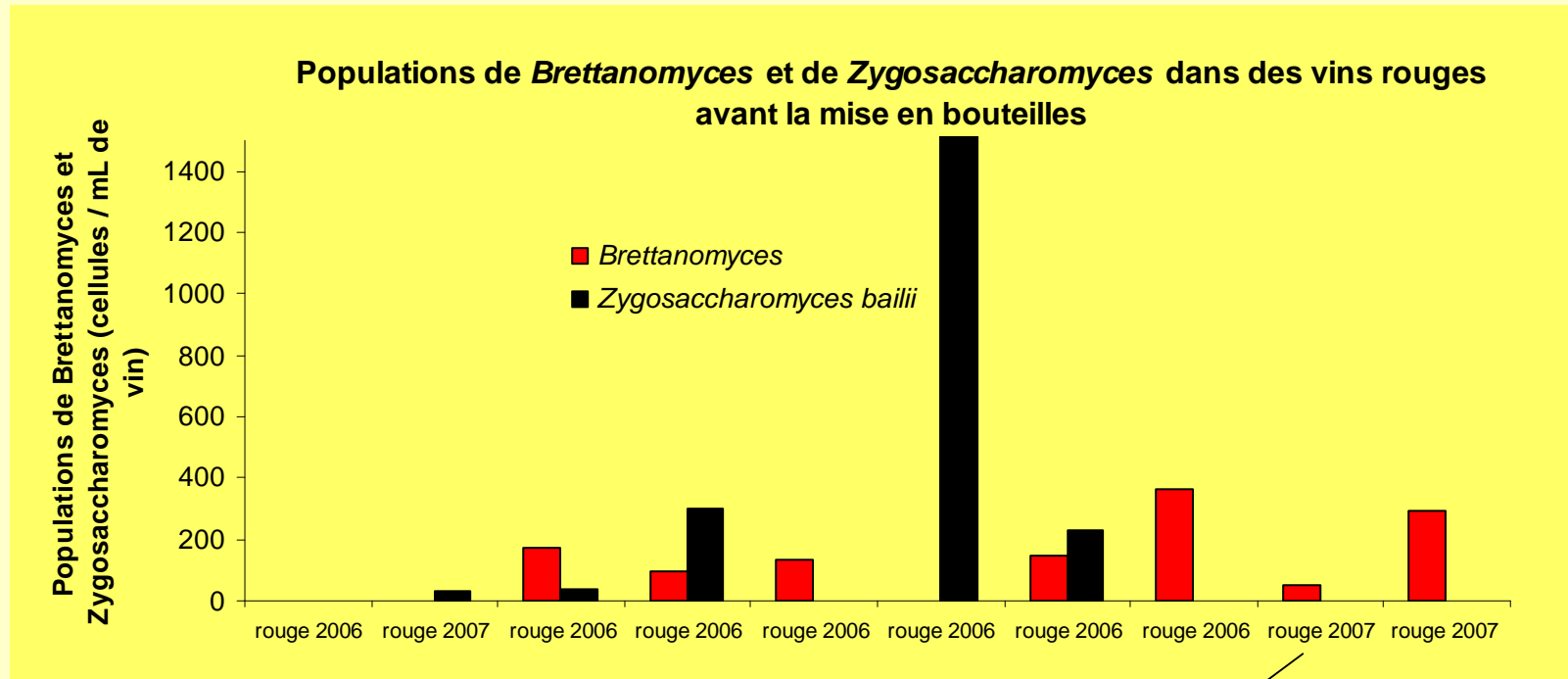
Rapide / Sensible / Hautement spécifique
Détection de 5 types de germes

Moins rapide / moins sensible / moins spécifique
Détection d'un seul germe

Rapide / Sensible / Spécifique
Très peu onéreux : idéale pour le suivi régulier des vins à risque

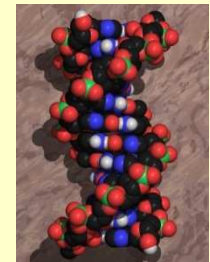
Arômes, texture et consommateurs

Applications de EXCELL Gen Levures et Brettanomyces®



> Résultats dans la journée :

- Adaptation de la préparation à la mise en bouteille,
- Sélection du media de filtration avant mise,
- Contrôle de stérilité après filtration au cours de la mise en bouteille



Arômes, texture et consommateurs

Application de EXCELL Gen Bactéries ®

- Bactéries lactiques en cours d'élevage et amines biogènes

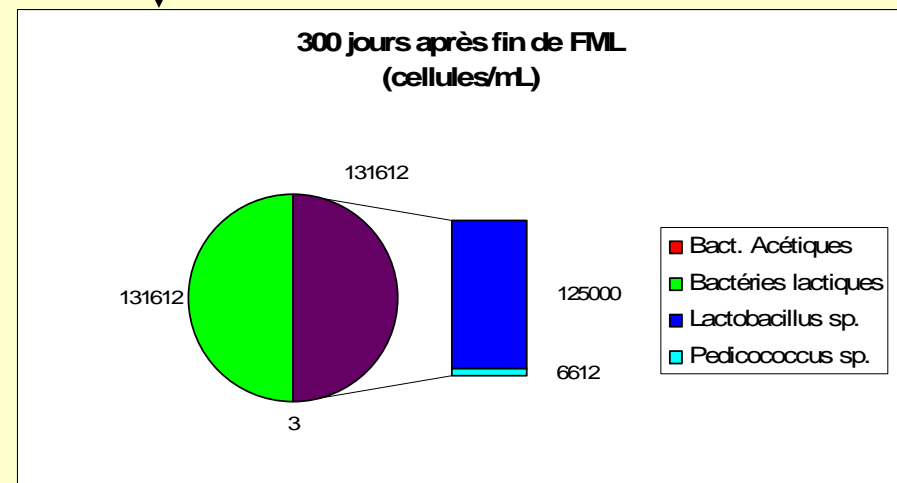
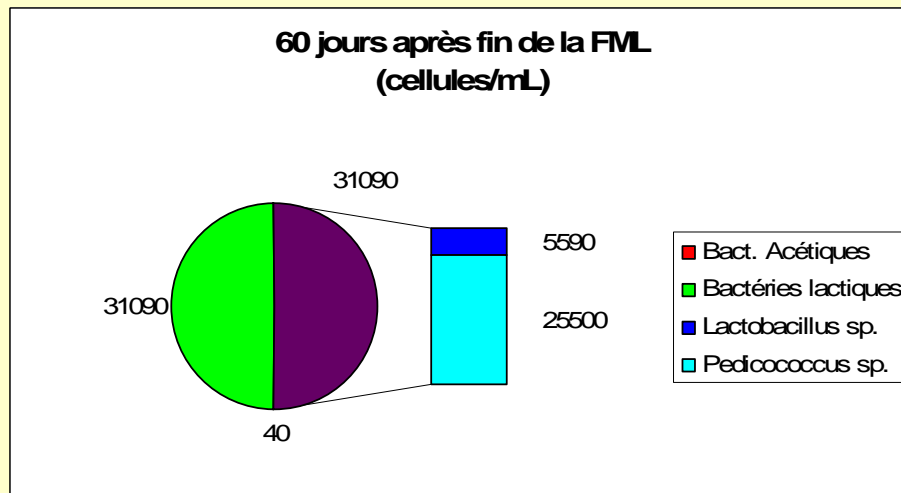
mg/l	Histamine				Putrescine				Tyramine			
Temps (jours)	0	30	60	300	0	30	60	300	0	30	60	300
Témoin	0,2	11,1	11,2	35,7	0,0	0,8	20,0	84,6	0,0	0,2	5,7	9,5
Ensemencé	0,2	3,4	8,7	35,9	0,0	0,9	1,3	82,0	0,0	0,4	2,1	8,6

30 j après
fin FML

Recontamination
évidente du vin
malgré
ensemencement par
des bactéries
lactiques produisant
de l'Histamine
(*Pediococcus*)

Recontamination
évidente du vin
malgré
ensemencement par
des bactéries
lactiques produisant
de l'Histamine et de
la Putrescine
(*Lactobacillus*)

mg/l	Histamine				Putrescine				Tyramine			
Temps (jours)	0	30	60	300	0	30	60	300	0	30	60	300
Témoin	0,2	11,1	11,2	35,7	0,0	0,8	20,0	84,6	0,0	0,2	5,7	9,5
Ensemencé	0,2	3,4	8,7	35,9	0,0	0,9	1,3	82,0	0,0	0,4	2,1	8,6



En utilisant EXCELL Gen®, il aurait été possible d'anticiper sur le changement de composition du vin en amines biogènes en décelant très tôt les modifications fines de la population de bactéries lactiques du vin

Conclusions & Perspectives

- Parfait outil de diagnostic microbiologique rapide et précis dans le vin dans les phases critiques de la vinification et avant/pendant la mise en bouteille (conditionnement en général).
- Automatisation du process et augmentation du volume d'analyse pour réduire les coûts ;
- Extension de **EXCELL Gen Levures** aux *Saccharomyces* pour accéder à la quasi intégralité de la flore levurienne ;
- Extension de **EXCELL Gen Bactéries** au dénombrement spécifique des bactéries lactiques Histidine Décarboxylase (+) en temps réel .
- **EXCELL Gen Brettanomyces** permet de détecter toutes espèces de cette levure de contamination extrêmement répandue.



Merci de votre attention

Parc INNOLIN
10, rue du golf
33700 MERIGNAC
France

Tél. : +33 05 57 92 02 10
Fax : +33 05 57 92 02 15
E-mail : contact@labexcell.com

Laboratoire accrédité



www.labexcell.com

Laboratoire agréé



Enoforum 2008
Innovation et Performance

Arômes, texture et consommateurs