

I. Une problématique de taille

Pourquoi Brettanomyces/Dekkera constitue-t-elle encore une préoccupation majeure des vinificateurs en 2015 ?

La levure du genre *Brettanomyces*, connue depuis bien longtemps pour être à l'origine de la formation des phénols volatils admis comme défaut organoleptique de nos vins au-delà d'une teneur de 400µg/L, constitue une **préoccupation majeure de tout vinificateur**. L'objectif est de parvenir à maîtriser les populations de cette levure tout au long du processus de production afin d'obtenir un vin en fin d'élevage exempt de caractère phénolé et ne nécessitant pas de traitement traumatisant avant mise en bouteille.

De nombreuses études menées sur le sujet ont certes permis de progresser dans la connaissance de l'écologie de cette levure^[1,2], dans les techniques de détection, d'identification et de dénombrement^[3-9] ainsi que dans les moyens de lutte^[10,11]. Toutefois, la problématique reste d'actualité et **encore trop souvent, le vinificateur ne comprend pas pourquoi son vin est phénolé alors qu'il a scrupuleusement appliqué les recommandations d'usage** (lutte préventive au vignoble, choix de l'itinéraire technique, hygiène au chai, sulfitage) et bien souvent réalisé un contrôle des populations de ces levures dont le résultat est rassurant car négatif.

La question que se pose souvent le vinificateur est la suivante : doit-on suivre les populations de *Brettanomyces*, doser les phénols volatils dans le temps, pratiquer l'un ou l'autre des contrôles selon les stades de production ou réaliser systématiquement et régulièrement les deux types de recherches ? **Le schéma décisionnel est parfois difficile à mettre en œuvre** et ce que l'on croit avoir maîtrisé au cours d'un millésime peut se révéler inopérant le millésime suivant.

Une méthode de dénombrement inadaptée ?

D'un point de vue technique, nous ne reviendrons pas ici sur les connaissances concernant les moyens de lutte qu'ils soient préventifs ou curatifs mais sur les moyens de diagnostic et de contrôle de développement de cette levure dans les vins.

Historiquement, la première technique de dénombrement mise en œuvre a été la mise en culture sur milieux plus ou moins sélectifs. Vers les années 2005, est apparue une méthode de numération des levures du genre *Brettanomyces* par PCR (Polymérase chain reaction) quantitative en temps réel (RT-qPCR). Cette technique est réputée pour sa rapidité, sa spécificité et sa capacité à quantifier les cellules viables non cultivables (VNC).

Cette dernière notion largement répandue mérite à notre sens quelques compléments pour être exhaustive : **dans un état physiologique de stress, *Brettanomyces* peut entrer dans un état qualifié de « viable non cultivable ».**

Cet état VNC désigne des cellules incapables de se développer sur un milieu de culture spécialement enrichi pour levures mais gardant une viabilité telle, qu'en cas de disparition de stress, ces levures redeviendront actives dans la cuve ou dans la bouteille, à moyen ou à long terme : elles seront alors capables de synthétiser des phénols volatils. Dans la communauté scientifique des microbiologistes, l'interprétation de cet état a largement été controversé, certains arguant qu'il s'agit en fait de cellules mortes, d'autres spécifiant que le caractère « non cultivable » serait synonyme de « non viable »... Des travaux dont la lecture reste certes très enrichissante^[14,15,16] mais laissant néanmoins de nombreuses questions posées !

Cette notion de VNC a été la justification majeure de la généralisation de l'utilisation de la RT-qPCR pour la détection et le dénombrement des *Brettanomyces* dans les vins. Il n'en reste pas moins, comme nous le disons plus haut, que certains viticulteurs obtiennent des résultats de dénombrement par RT-qPCR négatif sur des vins en suivi au cours de l'élevage, ces mêmes vins se révélant pourtant phénolés au terme du processus d'élaboration.

Ce constat étant posé, nous avons décidé de tester les techniques de RT-qPCR.

L'Expérimentation Sovivins :

Pratiquement, une analyse RT-qPCR consiste à extraire puis purifier l'ADN contenu dans les cellules avant d'amplifier une fraction spécifiquement ciblée du génome de la levure. Au cours de l'amplification, l'hybridation entre une molécule fluorescente et la séquence cible du gène caractéristique du micro-organisme d'intérêt permet le dénombrement des cellules par rapport à une courbe étalon préalablement établie et fournie par chaque fournisseur. Le signal mesuré est un cycle seuil dénommé CT (Cycle Threshold) : plus le nombre de cellules est élevé, plus il y a d'ADN détecté et plus le CT mesuré est faible.

Très concrètement nous avons testé 3 systèmes (couple appareillage/kits réactionnels) pour le dénombrement des *Brettanomyces/Dekkera* dans les vins par RT-qPCR en ciblant les points suivants :

- La **spécificité** des sondes utilisées,
- La **répétabilité** des tests,
- L'**influence du volume d'échantillon traité** quant à sa **représentativité**,
- La **fiabilité** de la numération des levures du genre *Brettanomyces* par RT-qPCR,
- La **détection des cellules « mortes »** (non viables et non cultivables).

II. L'expérimentation Sovivins

Description du matériel utilisé

Trois appareillages différents sont testés : Système A, B et C utilisant deux types de sondes pour la quantification du signal (sonde Taqman et sonde Scorpion).

	Système A	Système B	Système C
Système de détection	Sonde Taqman	Sonde Taqman	Sonde Scorpion
Détection	A chaque élongation		A chaque hybridation
Spécificité	Amorces Sondes		Amorces Sondes Température de fusion des amplicons
Appareillage	Simplex (possibilité de cibler un seul gène)	Multiplex (possibilité de cibler plusieurs gènes ; test en cours de développement)	Multiplex (possibilité de cibler plusieurs gènes ; tests validés)
Protocole extraction	Selon données fournisseur		
Protocole amplification	Selon données fournisseur		

Autres méthodes mises en œuvre

Au cours de cette étude nous avons eu recours à différentes techniques de travail pour le dénombrement des micro-organismes et l'observation de la viabilité des cellules :

- le dénombrement sur cellule de malassez : cellule de numération permettant de dénombrer une population de micro-organismes sous observation microscopique,
- le dénombrement par mise en culture, réalisé sur un milieu préparé sur site, contenant un témoin olfactif renseignant sans équivoque sur la présence de levures du genre *Brettanomyces*,
- l'utilisation de l'épifluorescence permettant de différencier et de dénombrer les cellules vivantes et les cellules mortes.

Spécificité des sondes utilisées

Afin de vérifier la spécificité des sondes utilisées, des vins supplémentés en levures non *Brettanomyces* sont analysés par RT-qPCR et mis en culture.

	RT-qPCR			Mise en culture	
	Système A	Système B	Système C	Présence/absence	Témoin olfactif
<i>Hansenula</i>	Non détecté	Non détecté	Non détecté	présence	négatif
<i>Kloeckera</i>	Non détecté	Non détecté	Non détecté	présence	négatif

Quel que soit le système de travail, **la spécificité des sondes PCR envers l'espèce *Brettanomyces* est vérifiée** puisque les levures non *Brettanomyces* ne sont pas détectées.

En outre, **la mise en culture permet de vérifier la spécificité du milieu utilisé sur site pour la détection des levures *Brettanomyces*** ; en effet les levures du genre *Hansenula* et *Kloeckera* se développent sur le milieu, l'absence d'odeur caractéristique du témoin olfactif utilisé venant confirmer que ces cellules ne sont pas des levures du genre *Brettanomyces*.

Test de répétabilité

Un même échantillon est soumis à l'analyse RT-qPCR 10 fois ; ces tests sont réalisés par un même opérateur, le même jour sur un même appareillage.

S'agissant de 3 échantillons différents, il convient de ne pas comparer les valeurs de CT et des dénombrements d'un système à l'autre.

	Système A	Système B	Système C
Nombre de répétitions	10	10	10
CT min	21.30	31.73	30.24
CT max	36.51	32.78	31.29
CT moyen	24.03	32.16	30.71
Ecart type sur CT	4.85	0.27	0.35
*CV% sur CT	20.2%	0.8%	1.12%
Dénombrement min (cell/ml)	4	233	595
Dénombrement max (cell/ml)	241152	488	1104
Dénombrement moyen (cell/ml)	122901	366	853
Ecart type sur dénombrement	90041.68	65.25	167.53
*CV% sur dénombrement	73.20%	17.80%	19.63%
Conclusion	Non répétable	Répétabilité acceptable	

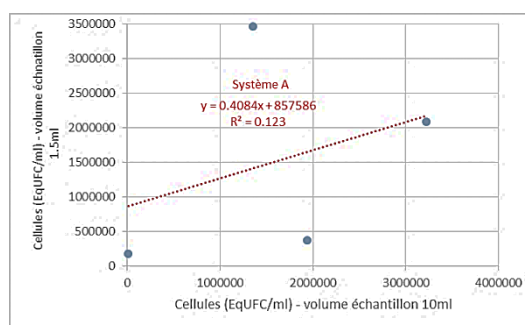
*CV% = coefficient de variation

A ce stade il apparaît que seuls les systèmes B et C permettent une répétabilité acceptable des analyses.

Influence du volume d'échantillon traité :

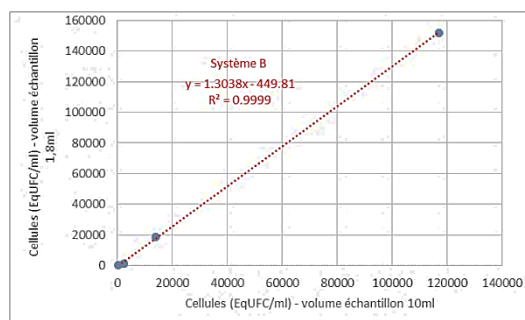
Quatre échantillons sont analysés selon les protocoles de chacun des fournisseurs en traitant deux volumes de vin: 1,5ml (ou 1,8 ml) et 10 ml.

Concernant le Système A, on observe une absence de corrélation entre les concentrations dénombrées après extraction de 1,5ml ou 10ml d'échantillon ; ceci vient confirmer la non répétabilité des tests.



Pour les systèmes B et C, on note une bonne corrélation entre les dénombrements effectués sur 1,5ml (ou 1,8ml) et 10ml.

(voir exemple résultats Système B ci-contre)

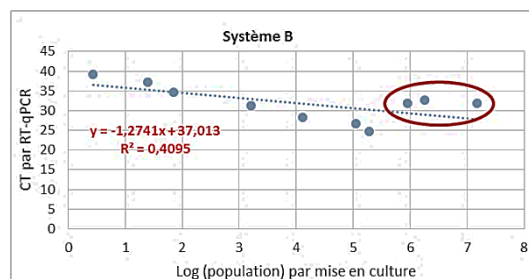


A ce stade, le Système A est écarté des tests.

Fiabilité de la numération des levures du genre *Brettanomyces* par RT-qPCR

A partir d'un vin supplémenté en *Brettanomyces/Dekkera* et 9 dilutions décimales successives, nous avons réalisé l'analyse RT-qPCR des 10 échantillons afin d'établir une courbe de calibration en matrice vin de 1 à 10⁷ cellules/ml. Parallèlement, ces échantillons ont été mis en culture.

Cette expérimentation nous a permis de mettre en évidence sur **le Système B, 3 valeurs incohérentes de CT à partir d'une population de 106 cellules/ml laissant supposer « un phénomène de saturation » de la réponse PCR** ; cette hypothèse fut confirmée par une deuxième expérimentation fixant le seuil de saturation à 2.10⁵ cellules/ml.



Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce point : un mauvais réglage du lecteur PCR et/ou un excès d'ADN par rapport à la quantité de réactifs prévus dans les kits commercialisés avec le système B.

Regardant de plus près les commentaires associés à ces 3 valeurs aberrantes de CT par la programmation du **système B, on note une incohérence supplémentaire** puisque l'interprétation associée aux trois échantillons très fortement contaminés est

Well	Sample Id	Cq Target	Cq Internal Control	Result	UFC/mL	Interpretation
D01	Cali 1	31.83	31.18	Positive	3.70E+02	Critical population to be monitored.
E01	Cali 2	32.73	31.3	Positive	1.97E+02	Critical population to be monitored.
F01	Cali 3	31.77	31.03	Positive	3.85E+02	Critical population to be monitored.
G01	Cali 4	24.68	27.99	Positive	5.56E+04	Very high population, volatile phenol production risk.
H01	Cali 5	26.66	28.49	Positive	1.38E+04	Very high population, volatile phenol production risk.
A02	Cali 6	28.24	30.6	Positive	4.57E+03	Very high population, volatile phenol production risk.
B02	Cali 7	31.25	30.61	Positive	5.56E+02	Critical population to be monitored.
C02	Cali 8	34.63	30.49	Positive	5.19E+01	Low population, controlled risk.
D02	Cali 9	37.28	30.63	Positive	8.07E+00	Low population, controlled risk.
E02	Cali 10	39.2	31.08	Positive	2.10E+00	Low population, controlled risk.

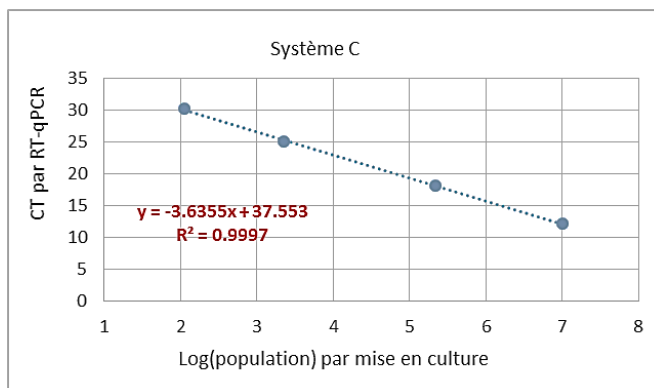
« critical population to be monitored » alors que nous sommes dans une phase de risque très élevé de production de phénols volatils.

Dans la pratique, un tel résultat analytique n'alerte pas assez le viticulteur sur le risque réel de production des phénols volatils ; ceci peut tout à fait expliquer les cas de vins phénolés en fin d'élevage alors que les résultats de dénombrement *Brettanomyces* par RT-qPCR étaient interprétés comme à des niveaux critiques seulement !

S'agissant de la fiabilité de la numération par RT-qPCR par rapport au dénombrement sur milieu de culture SOVIVINS, on dénombre par RT-qPCR avec le système B des populations 2 à 8 fois plus faibles que celles dénombrées sur milieu de culture Sovivins ; **cet écart inférieur à 10 reste dans les normes acceptables pour l'interprétation des résultats.**

Echantillons	Population sur milieu de culture Sovivins (UFC/ml) D	Population par RT-qPCR calibration Système B (équivalent UFC/ml) F	D/F
Cali 4	188500	55600	3.4
Cali 5	113000	13800	8.2
Cali 6	13050	4570	2.8
Cali 7	1610	556	2.9
Cali 8	69.5	51.9	1.3
Cali 9	25.15	8.07	3.1
Cali 10	2.75	2.1	1.3

L'analyse d'un vin supplémenté de 10^7 cellules /ml de *Brettanomyces/Dekkera* avec le **système C nous donne une valeur de CT de 12.17, valeur tout à fait cohérente**, correspondant à une population de 1.10^7 eq UFC/ml. Aucun phénomène de saturation n'est observé dans ce cas.



S'agissant de la fiabilité de la numération par RT-qPCR par rapport au dénombrement sur milieu de culture SOVIVINS, **la corrélation est acceptable**.

Echantillons	Population sur milieu de culture Sovivins (UFC/ml) D	Population par RT-qPCR calibration Système C (équivalent UFC/ml) F	D/F
Ech 1	11000000	13000000	0.8
Ech 2	230000	258776	0.8
Ech 3	360	2224	0.2
Ech 4	4	113	0.3

En l'état le système C apparaît comme le système de travail le plus performant pour le dénombrement des levures du genre *Brettanomyces* par RT-qPCR.

Détection des cellules mortes (non viables et non cultivables)

Afin de tester la réponse RT-qPCR à la détection d'ADN de cellules mortes, nous avons analysé un échantillon de vin supplémenté en levures *Brettanomyces* après avoir fait subir un traitement létal aux levures ajoutées ; nous avons validé par épifluorescence que l'ensemble des cellules étaient mortes et par ensemencement sur milieu de culture que ces levures étaient non cultivables.

	Dénombrement sur cellule de Malassez (cellules/ml)	Dénombrement après mise en culture (UFC/ml)	Epifluorescence	Dénombrement par RT-qPCR (eq UFC/ml)		
				Système A	Système B	Système C
Echantillon cellules mortes	0	0	100% de cellules mortes	107746	310	111410

Quel que soit le système utilisé, le résultat du dénombrement par RT-qPCR est positif. Il est ainsi démontré que la **RT-qPCR détecte l'ADN des cellules mortes** et surestime donc les populations réelles. Lors du déclin des cellules, il se passe plusieurs semaines avant l'autolyse complète de celles-ci et la destruction totale de leur ADN amplifiable.

L'utilisation d'un système de photo-activation neutralisant l'ADN des cellules mortes, traitement préalable appliqué à notre échantillon avant analyse par RT-qPCR, nous a permis d'obtenir un résultats cohérent : cellules non détectées.

Seule cette technique de travail permettra de détecter spécifiquement les cellules viables et de rester insensible aux cellules mortes.

III. Conclusion :

L'étude de cas menée sur le dénombrement des levures du genre *Brettanomyces/Dekkera* par RT-qPCR nous a permis d'évaluer la fiabilité de 3 systèmes actuellement commercialisés pour réaliser ce type d'analyse.

Il est clairement établi pour nous que seul le système C mérite sa place dans un laboratoire d'analyse de précision. En effet le système A ne permet pas d'obtenir une répétabilité acceptable des tests et le système B montre une saturation de signal avec une forte sous-estimation du risque en cas de population élevée.

L'utilisation de la RT-qPCR avec le système C sera d'autant plus fiable qu'elle sera couplée à l'utilisation d'un système de photo-activation neutralisant l'ADN des cellules mortes permettant ainsi la détection par PCR de l'ADN des seules cellules vivantes.

En effet, la RT-qPCR seule tend à surestimer les populations, car entre la mort d'une cellule et son autolyse totale avec disparition d'ADN détectable il peut s'écouler plusieurs semaines.

S'agissant de la pertinence du choix de la technique de dénombrement des levures du genre *Brettanomyces/Dekkera*, il est important de rappeler que le dosage des phénols volatils reste un point majeur dans la prise de décision technique. Si nous devons faire un parallèle, rappelons ici que l'on dose régulièrement l'acidité volatile sans pour autant réaliser un dénombrement des bactéries acétiques.

D'un point de vue économique, l'analyse par RT-qPCR reste la plupart du temps plus onéreuse qu'un dénombrement sur milieu de culture couplé à un dosage des phénols volatils. Il semble donc évident que pour le suivi de l'élevage des vins cette dernière démarche semble la plus adaptée.

L'analyse par RT-qPCR des cellules viables reste l'outil de prédilection dans le cas où le délai de rendu des résultats doit être court. **Elle sera donc pertinente à divers stades clés de la production :**

- **en fin de fermentation alcoolique, elle permettra un screening rapide des différents lots en vue d'isoler les cuves précocement contaminées,**
- **en fin de fermentation malolactique, elle permettra la sélection des lots sains prêts pour la mise en barriques,**
- **avant mise en bouteilles parfois réalisée dans l'urgence, ceci laissant un délai très court pour la préparation des vins, elle permettra une prise de décision rapide quant aux traitements à appliquer,**
- **lors d'un contrôle qualité en ligne des traitements appliqués pour la préparation des vins avant la mise en bouteilles, elle sera également très utile.**

Sylvie BIAU

Références bibliographiques :

- 1- **VAN DER WALT**, 1970 The genus *Dekkera*. In *The Yeast*. Van der Walt in J. Lodda (ed), 2nd ed. North-Holland publi. Co. Amsterdam, pp154-165
- 2- **BARBIN P.**, 2006, Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. Thèse, INP Toulouse, France
- 3- **COUTO J.A , A. BARBOSA and T. HOGG**, 2005, A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines, *Letters in Applied Microbiology* 2005, 41, 505–510
- 4- **RODER CHRISTOPH, HELMUT KONIG & JURGEN FROHLICH**, 2007, Species-specific identification of *Dekkera /Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA, *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research*. Vol 7, Issue6, pp1013-1026
- 5- **BAUMAN JG, WIEGANT J, BORST P, VAN DUJIN P.**, 1980, A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res*. 1980 Aug ; 128(2) : 485-90.
- 6- **STENDER H. ,KURTZMAN C., HYLDIG-NIELSEN JJ., SORENSEN D., BROOMER A., OLIVEIRA K., O'KEEFE HP., SAGE A., YOUNG B., COULL J.**; 2001, Identification of *Dekkera bruxellensis (Brettanomyces)* from Wine by Fluorescence In Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, February 2001, p. 938–941
- 7- **GERBAUX V.**, 2007, Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans un vin rouge par cytométrie de flux. *Rev OEnol* 2007; 123:21–23.
- 8- **ALEXANDRE H**, 2010, Specific Identification and Quantification of the Spoilage Microorganism *Brettanomyces* in Wine by Flow Cytometry: A Useful Tool for Winemakers, 11 February 2010 in Wiley InterScience
- 9- **RENOUF V., LONVAUD-FUNEL A.**, 2007, Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol Research*, Vol 162, Issue2, p154-167.
- 10- **HENICK-KLING T., EGLI C., LICKER J., MITRAKUL C., ACREE T.E.**, 2000, *Brettanomyces* in wine. Proceeding of the 5th International Symposium on Cool Climate, Melbourne Australie
- 11- **GÓMEZ-RIVAS L, ESCUDERO-ABARCA BI, AGUILAR-USCANGA MG, HAYWARD-JONES PM, MENDOZA P, RAMÍREZ M.** , 2004, Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations., *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004 Jan;31(1):16-22
- 12- **Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F.**, 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 237-243.
- 13- **RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV-** Numération des Levures de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* par qPCR - OIV-MA-AS4-03 : R2011 13
- 14- **MILLET V., LONVAUD-FUNEL A.**, 2000 The viable but non-cultivable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Appl Microbiol*, Vol 30, n°2 - pp136-141
- 15- **BARCINA I., ARANA I.**, 2009, The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 8:245-255.
- 16- **Virginie SERPAGGI.**, 2011, Etude et caractérisation de l'état « Viable mais Non Cultivable » chez *Brettanomyces*, une levure d'altération des vins. Nouvel outil de détection et de quantification spécifique de *Brettanomyces* en vin. Thèse de doctorat. Université de Bourgogne