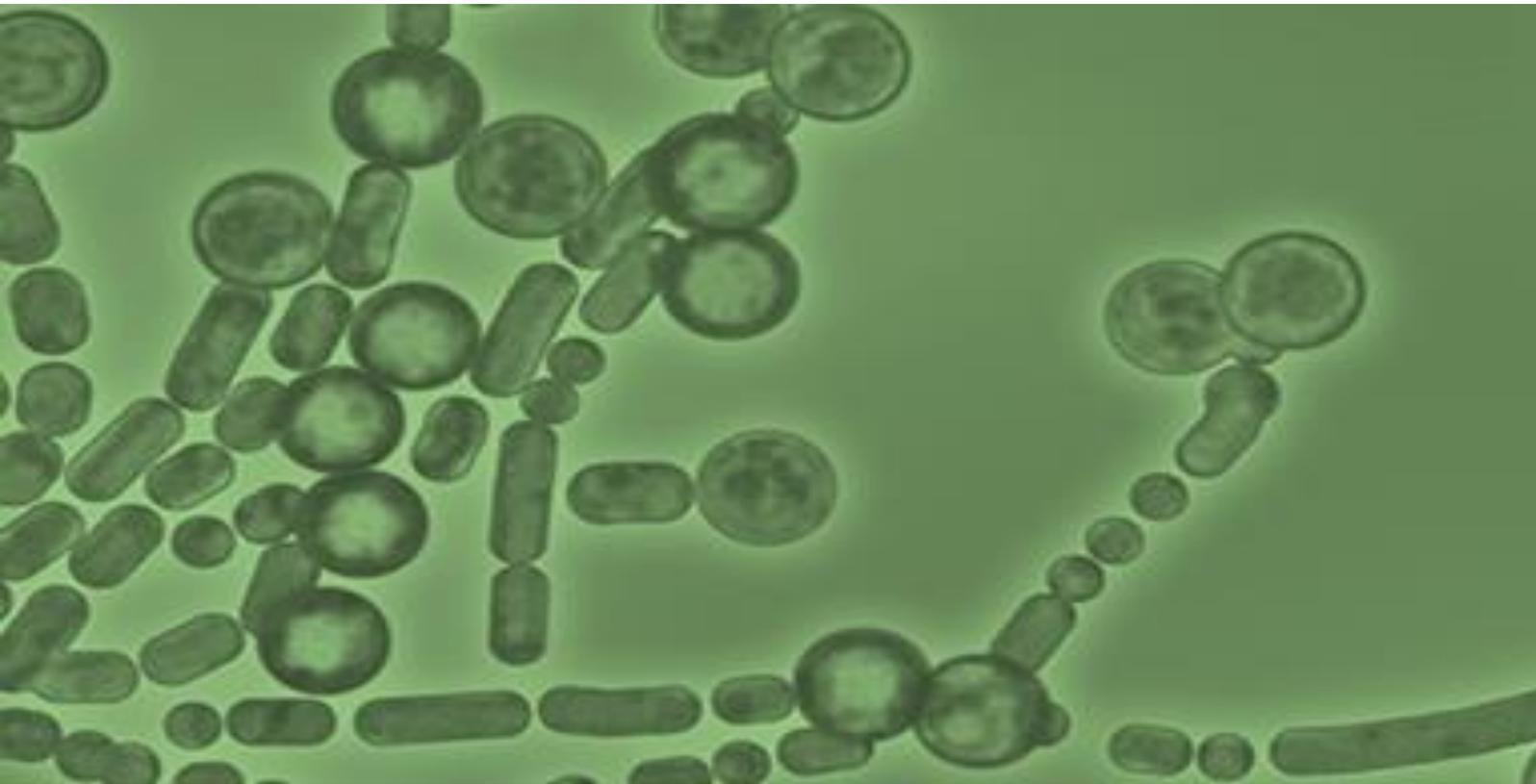


LA CYTOMETRIE APPLIQUEE A LA MICROBIOLOGIE



Pilotage de la fermentation alcoolique
Méthodes de suivi en routine

Métabolisme des levures

Le métabolisme est l'ensemble des réactions qui permettent aux organismes de se procurer les molécules et l'énergie nécessaires à leur survie, croissance et multiplication. Chez les levures il peut exister 2 types de métabolisme : la respiration ou la fermentation.

Le premier est plus efficace et conduit à une forte biomasse, quand le second génère des coproduits qui seront intéressants pour l'industrie, comme l'alcool par exemple.

Dans les deux cas, pour mener à bien un processus de production, il faut disposer d'un outil permettant à la fois de dénombrer les micro-organismes, distinguer les vivantes des mortes, mesurer la charge énergétique et l'adaptation au milieu. Enfin cette technique doit aussi permettre de distinguer les populations d'intérêt de façon spécifique.

La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique de mesure consistant à faire passer une par une devant un laser des cellules préalablement colorées ou marquées. Les paramètres mesurés sont la taille, la structure et les paramètres de fluorescence propre (auto-fluorescence) ou liée aux marqueurs.

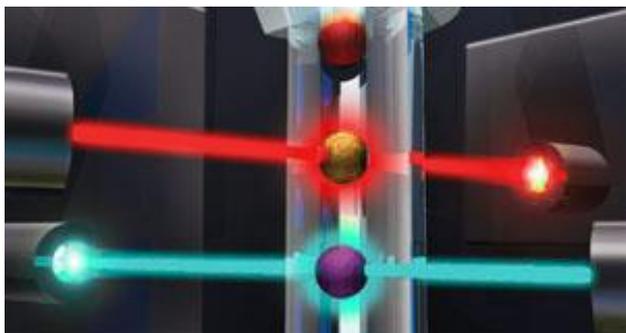


Schéma de principe du flux de cellules dans un cytomètre

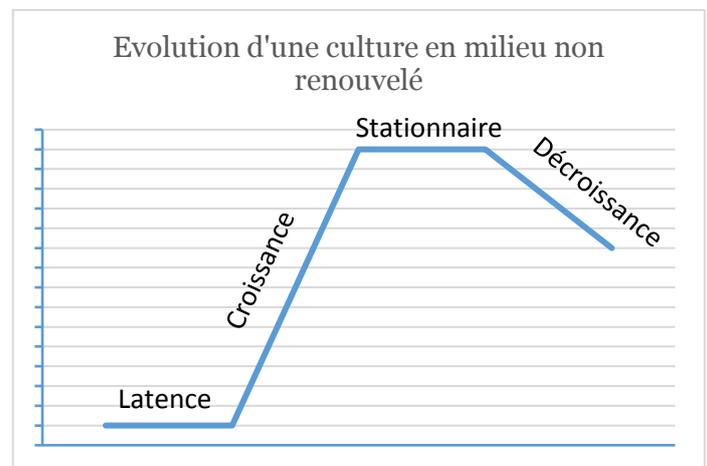
L'intérêt de cette technique réside dans la possibilité de réaliser simultanément, un comptage, une identification plus ou moins spécifique et une mesure de paramètres physiologiques qui vont donner des informations sur l'état des cellules. Le tout en quelques minutes pour des milliers de cellules.

Les bactéries de vinification

Parmi toutes les bactéries présentes sur les fruits, seules les bactéries acétiques et lactiques survivent dans le moût en fermentation, puis dans le vin. Certaines participent à la vinification quand les autres sont des contaminants qui altèrent le produit. Les cidres pour leur part, moins alcoolisés avec un pH moins acide peuvent voir se développer d'autres espèces dont les *Zymomonas* qui sont particulièrement destructrices. Ces bactéries ont la particularité d'avoir survécu à la compétition avec les levures et à la transformation du milieu. Elles peuvent également être apportées par le producteur pour déclencher la fermentation malolactique. La cytométrie est un outil efficace pour optimiser cette étape et pour contrôler les contaminations.

Adaptation au milieu

La croissance des micro-organismes passe par plusieurs phases au fur et à mesure qu'ils s'adaptent au milieu dans lequel ils se trouvent et en fonction des changements qu'ils y apportent.



On note tout d'abord une phase de latence, qui correspond à l'adaptation de la cellule à son nouvel environnement.

Suit alors une phase de démarrage et de croissance exponentielle souvent courte si le milieu n'est pas renouvelé.

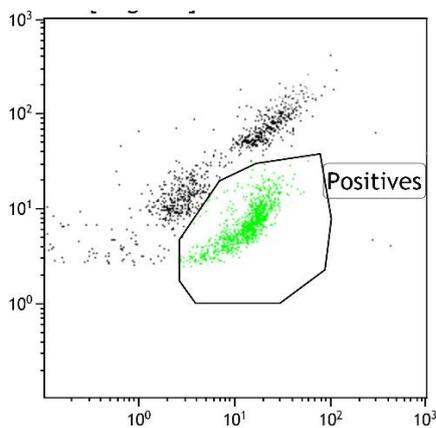
Ensuite une phase stationnaire liée à l'apparition d'une carence en éléments nutritifs de base et d'une toxicité (présence d'éthanol, facteur killer ...).

Enfin une phase de décroissance car les organismes meurent sans se renouveler. Cette phase n'est pas systématique. Certains microorganismes peuvent entrer dans une forme de résistance avec une activité métabolique minimale et une réduction de taille. *Brettanomyces* dans le vin et le cidre par exemple peut entrer en phase viable non cultivable, réduire sa taille à 1 µm (passant à travers les filtres) et rester dans cet état plusieurs années avant de relancer son activité.

Dénombrement

En analyse microbiologique on est habitué à un comptage sur boîte de pétri donné en « Colony Forming Unit » pour un volume donné. Cette unité de mesure ne prend en compte que les cellules vivantes capable de se développer sur la gélose au moment de la mise en culture.

Avec la cytométrie, on compte toutes les cellules. Les valeurs sont donc données en nombre de cellules pour un volume donné. Compte tenu de la taille variable des levures et des bactéries, nous préconisons l'utilisation d'appareil à comptage direct (volumétrique) plutôt que l'utilisation de billes de comptage qui peuvent se retrouver au sein des populations étudiées ou du bruit de fond d'une matrice complexe.



Exemple de comptage spécifique de levure dans une population mixte

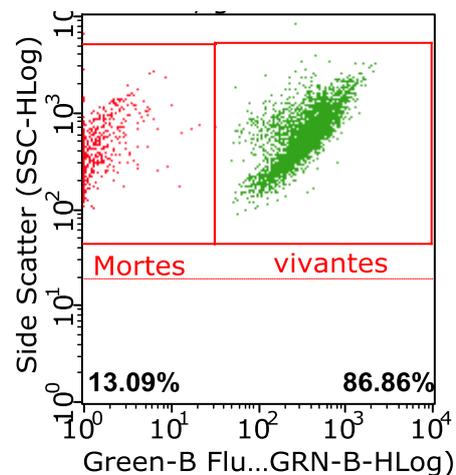
De même il est préférable d'utiliser un colorant pour mettre en évidence les cellules par rapport à ce bruit de fond.

Le comptage en cytométrie en flux est plus efficace que le comptage microscopique en raison du nombre d'évènements dénombrés qui augmente la

valeur statistique de chaque population et de la rapidité du comptage.

Viabilité

La viabilité des levures va évoluer avec le temps mais également avec le traitement qu'elles vont subir. La lyophilisation, par exemple, peut impacter plus ou moins fortement cette viabilité. Ou encore la présence d'alcool issu des fermentations est toxique pour les levures à un niveau différent en fonction des souches.



Exemple de mesure de la viabilité d'un pied de cuve de *Saccharomyces* avec le LEVIA Test

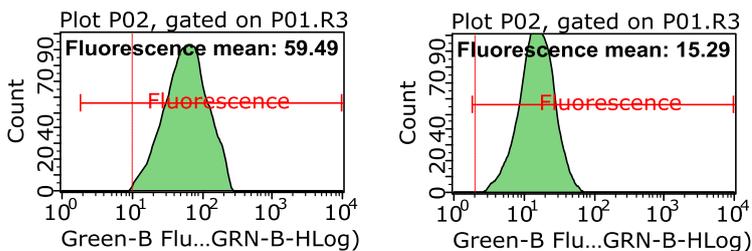
La viabilité se mesure soit avec un colorant qui marque toutes les cellules et un autre qui ne marque que les cellules mortes (Kits de la famille TVO), soit plus spécifiquement pour les levures à l'aide du kit LEVIA Test, qui met en évidence l'activité enzymatique présente dans les levures et leur capacité à maintenir un pH intracellulaire proche de la neutralité en milieu acide.

Il faut noter que dans le cas d'analyses sur les vins rouges la double coloration vivantes/mortes est moins efficace du fait de la présence des tanins qui colorent les cellules et augmentent leur autofluorescence.

Vitalité

Il existe une différence entre la viabilité et la vitalité. La première indique que la cellule est vivante la seconde indique qu'elle dispose encore de

suffisamment d'énergie pour se développer et produire activement les molécules d'intérêt. Il existe une méthode simple à mettre en œuvre en se servant du kit LEVIA Test, basée sur le principe de l'excrétion active (dépendant de l'énergie de la cellule) d'un colorant fluorescent. On mesure la moyenne de fluorescence à un temps donné et on refait la même mesure 15 minutes plus tard.



Exemple de mesure de la vitalité d'un levain mesuré par l'excrétion de fluorescence (fluorescence initiale – fluorescence finale)/ fluorescence initiale avec le LEVIA Test

Une vitalité proche de 80% indique une cellule très active alors qu'une réduction apparaît lors de la phase stationnaire et encore plus en phase de décroissance ou le rapport peut devenir négatif reflétant la faible activité résiduelle ne permettant pas à la levure de se marquer totalement lors de la phase initiale.

Une optimisation d'un levain en se servant de la mesure de viabilité peut réduire drastiquement la phase de latence.

Identification spécifique

L'identification spécifique peut être réalisée en utilisant une sonde génétique sur le principe de la FISH. C'est une technique longue et non adaptée à la routine diagnostique. De plus si on souhaite corréler les données physiologiques à l'identification spécifique il faut l'intégrité des cellules. Dès lors une technique immunologique est préférable.

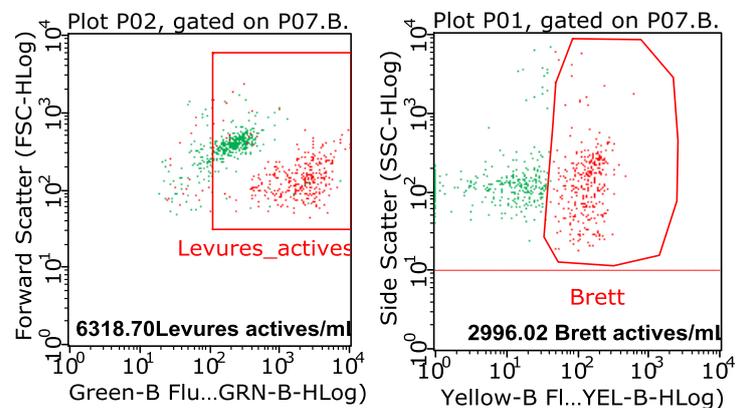
Ces techniques se basent sur l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement une population de levure parmi l'ensemble des cellules présentes.

Dans le cadre de la vinification par exemple, la détection des levures de contamination tels que les *Brettanomyces* peut permettre de prévenir

l'apparition d'une altération des propriétés organoleptiques d'un vin ou d'un cidre. L'information d'intérêt est donc le nombre de *Brettanomyces* actives qui peut être déterminé grâce au BRETTA TEST.

Un test réalisant à la fois un dénombrement de l'activité enzymatique (viabilité et/ou vitalité) et un marquage spécifique pour distinguer les levures de contamination des autres levures présentes est nécessaire. Les tests de microbiologie classique ne donnent une réponse qu'en 5 à 10 jours et on peut imaginer l'évolution du vin durant cette période en cas de contamination.

Le même test en cytométrie ne prend pas plus d'une heure. C'est donc un outil idéal pour faire un suivi de production en temps réel.



Exemple de comptage spécifique de levure *Brettanomyces* viables et actives dans une population mixte avec le BRETTA TEST

Bibliographie

Lonvaud-Funel A, Renouf V, Strehaiano P ; Microbiologie du vin ; Editions TEC & Doc, Paris, Lavoisier

Carter E A, Paul F E and Hunter P A. ; Flow Cytometry in Microbiology. D. Lloyd, London, Springer verlag.

Bouix M & Leveau JY; Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation; *Journal of the Institute of Brewing, Vol 107, 4*; (2001)

Steensels J & al ; *Brettanomyces* yeasts—from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int J Food Microbiol 206:24–38*; (2015)

Novak J & al. ; Monitoring of Brewing Yeast Propagation Under Aerobic and Anaerobic Conditions Employing Flow Cytometry ; *J. Inst. Brew. 113(3)* ; (2007)