

LABORATOIRES Dubernet

œ n o l o g i e

CONSEIL EN VINIFICATION - ELEVAGE ET TRAVAIL DU VIN - ANALYSE
ANALYSE FINE - MICROBIOLOGIE DU VIN - AUDIT - EXPERTISE

CYTO 3D Laboratoires DUBERNET

- NOVEMBRE 2021 -

QU'EST-CE QUE C'EST ?

La cyto-3D est un ensemble de nouvelles applications révolutionnaires pour l'analyse microbiologique des moûts et des vins, utilisant la cytométrie en flux et le marquage cellulaire sélectif activé par fluorescence. Elle nous offre la possibilité de réaliser des analyses microbiologiques très précises, et surtout très rapides, permettant enfin d'envisager l'analyse microbiologique en routine, à la manière des autres paramètres physico-chimiques du vin.

LA CYTOMÉTRIE EN FLUX, CE N'EST PAS NOUVEAU, ON CONNAÎT... LES LABORATOIRES DUBERNET ONT-ILS FAIT DU NEUF AVEC DU VIEUX ?

En effet, cela fait plus de 15 ans que la cytométrie en flux a été proposée pour l'analyse des vins, sans pour autant que cette technique se soit démocratisée, en raison de limites de performance des méthodes et matériels employés.

Les travaux de recherche et développement des Laboratoires Dubernet ont porté sur plusieurs innovations essentielles qui donnent enfin à la cytométrie en flux le moyen de répondre à nos attentes œnologiques de terrain. Ces innovations sont de deux grands ordres. Premièrement, l'investissement dans un outil de cytométrie en flux de très haute performance, doté de capacité de haut débit de flux, et de lasers multiples. De tels instruments, à la pointe des développements technologiques, sont utilisés en analyse médicale, ou encore en recherche (par exemple pour la recherche des anticorps du SRAS-COV 2 !). Ils n'avaient jusqu'à présent pas été utilisés sur le vin. Nous avons été pionniers sur ce point. Le second axe de l'innovation est le marquage cellulaire triple par fluorescence, inédit à cette échelle, et qui permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes, et les cellules actives de celles qui sont en dormance.

Ainsi, la Cyto-3D n'a pratiquement plus rien à voir avec les anciennes applications de cytométrie en flux qui ont été parfois utilisées sur le vin. Les critiques qui leurs étaient adressés ne peuvent plus avoir cours sur la Cyto-3D.

LA MÉTHODE CYTO-3D EST-ELLE PUBLIÉE ? EST-ELLE VALIDÉE ?

Depuis Octobre 2021, **les analyses Cyto-3D sont réalisées sous accréditation Cofrac** selon la norme NF EN ISO 17025 (portée disponible sur www.cofrac.fr, n° d'accréditation 1-0207).

Nous sommes actuellement en train de rédiger une publication scientifique détaillée de la méthode, dont le texte va être soumis à des revues internationales.

AVEZ-VOUS FAIT DES COMPARAISONS AVEC LES BOÎTES DE PÉTRI ?

La cytométrie en flux est beaucoup plus sensible que les boîtes de pétri, et permet de mesurer à la fois les populations actives (susceptibles de se développer sur boîtes de pétri), des populations vivantes mais latentes (qui ne se développent pas sur boîtes de pétri = VNC), ce que ne font pas les boîtes de pétri. Pour autant, la question de la comparaison aux boîtes de pétri est une question légitime, mais qui n'a... pas de sens. La cytométrie en flux permet de compter de façon directe et absolue, une par une, chaque cellule de micro-organisme présente dans l'échantillon. La boîte de pétri donne un résultat sur le nombre de colonies formées au bout d'une certaine durée de culture. Le résultat s'exprime en Unités Formant Colonie (UFC). Or une colonie n'est pas nécessairement formée au départ par une unique cellule de micro-organisme. Dans la pratique ces cellules sont souvent agglomérées entre elles, et c'est cet agglomérat, allant de quelques unités jusqu'à quelques centaines de cellules, qui est à l'origine d'une colonie. Le caractère agglomérant est très variable selon les souches, ce qui aboutit à des grandes disparités de résultats en UFC, pour un même niveau de concentration microbiologique présent dans différents vins et qui sera mesuré en cytométrie.

BEAUCOUP DE RÉSULTATS SEMBLENT POSITIFS, COMMENT INTERPRÉTER LES RÉSULTATS ?

Ce que nous rappelle la cytométrie en flux, c'est qu'un vin n'est jamais stérile et est toujours porteur d'une biodiversité de levures et bactéries.

Parmi ces levures, les Brettanomyces sont très souvent présentes, et constituent même la majorité des populations levuriennes des vins finis, qu'ils soient rouges, rosés ou blancs. Il faut bien comprendre que ceci ne signifie pas nécessairement que ces vins sont malades et vont forcément devenir phénolés à court terme.

Il faut donc accepter une présence foncière de populations, comme une situation normale. L'idée, fortement ancrée dans nos esprits, que les Brettanomyces sont des levures de contamination nous apparaît de plus en plus inexacte. Elles font partie de la biodiversité naturelle présente dans de très nombreux vins. Par conséquent, l'enjeu de la surveillance Brettanomyces sur les vins en élevage est de vérifier que les populations de vivantes actives restent basses et stables. Si elles passent au-dessus d'un certain niveau à partir duquel le risque de production de phénols volatils augmente, et/ou si la population évolue rapidement, des interventions sont alors nécessaires. Nous estimons ce niveau à $1.0E+03$ cellules vivantes actives / mL. Une surveillance des Brettanomyces VNC est également à faire, celles-ci pouvant former un réservoir de population susceptible de s'activer. Les interventions sont alors de plusieurs types, et doivent être adaptées à chaque situation : soutirage, sulfitage, collage, pasteurisation, filtration tangentielle, ou chitosan.

L'autre enseignement est que l'idée de filtration "stérilisante" n'est pas vraie. Même à 0,45 µm des bactéries seront toujours là, à l'état latent, mais vivantes. L'idée et l'objectif du "0" germes dans les vins relèvent donc pratiquement d'une utopie, aboutissant à une mauvaise appréciation de la problématique microbiologique et pouvant conduire à de mauvaises décisions techniques. Les filtrations, tout comme la flash pasteurisation, ne fonctionnent pas avec des seuils de coupure absolus, mais produisent des réductions des populations de quelques facteurs de 10. Le résultat d'une filtration dépend donc du filtre employé, de sa bonne gestion, mais aussi de la taille des populations initiales. La cyto-3D peut ainsi nous informer, à chaque stade des itinéraires techniques, de la taille des populations initiales, et ainsi nous éclairer sur les choix les mieux adaptés.

Pour les vins après mise en bouteilles, différents critères sont possibles. Les critères les plus exigeants que nous préconisons, conduisent au "0" germes sur boîtes de pétri (qui n'est pas une stérilité réelle comme nous l'avons vu plus haut avec les VNC), et qui sont attendus dans certains cahiers des charges :

- 1/ Somme des levures vivantes vitales (Brettanomyces + Saccharomyces) < 1.0E+01
- 2/ Somme des levures vivantes (vitales + VNC) (Brettanomyces + Saccharomyces) < 2.0E+02
- 3/ Bactéries vivantes vitales < 1.0E+03
- 4/ Bactéries vivantes vitales + VNC < 1.0E+04

LA FORMULATION DES RÉSULTATS EN NOTATION SCIENTIFIQUE EST DIFFICILE À LIRE...

C'est une question d'habitudes avant tout. Et, c'est la convention en microbiologie pour l'expression des résultats, il est donc difficile de faire autrement.

Il est sans doute plus aisé de lire 3,2E+06 ou encore 3,2E+07, plutôt que 3200000 et 32000000 ?

NB: La notation scientifique employée suit le formalisme utilisé dans les tableurs informatiques. En toute rigueur 3,2E+06 devrait être écrit $3,2 \cdot 10^6$. Ce choix a été pris afin de permettre l'exportation de ces formats vers d'autres systèmes informatiques (logiciel de gestion de cave, etc...).

COMMENT SERA COMMERCIALISÉE LA CYTO-3D ?

Notre stratégie est d'arriver à faire en sorte que l'analyse microbiologique atteigne le même niveau de routine que les analyses chimiques. Après tout, un vin est autant le résultat de la biochimie que de la biologie. La pauvreté du suivi microbiologique des vins en œnologie est un profond paradoxe qui n'a que trop duré ...

Deux principaux menus existent :

- Cyto-3D Brett : Brettanomyces vivantes vitales/VNC/mortes.
- Cyto-3D Vins : Saccharomyces/Brettanomyces/Bactéries vivantes vitales/VNC/mortes.

Pour les clients bénéficiant d'un forfait de suivi œnologique, la période exceptionnelle de gratuité de l'analyse cyto-3D Brett associée au contrôle de cave se terminera au 1er août. Nous allons proposer à ces clients en suivi œnologique des offres forfaitaires particulièrement attractives annexées aux forfaits déjà existant pour basculer en routine la cyto-3D Brett sur

les contrôles de cave mensuels (sur les vins rouges).

Les cyto-3D vin seront ajoutés, en option, aux menus "Etude de mise" et "Contrôle de mise" moyennant un petit supplément. Ainsi, toutes les mises en bouteilles feront l'objet de mesures microbiologiques permettant de mesurer très précisément les résultats des itinéraires techniques utilisés.

Ces analyses sont au catalogue et peuvent aussi être proposées à l'acte à tout moment.

LA QUALITÉ DE L'ÉCHANTILLONNAGE A-T-ELLE UNE IMPORTANCE SUR LE RÉSULTAT ?

La qualité de l'échantillon constitue déjà une question importante pour les analyses physico-chimiques. Elle devient essentielle lorsque l'échantillon est aussi destiné à une analyse microbiologique.

Les populations microbiennes dans les cuves ne sont pas distribuées de façon homogène, avec un gradient gravitaire qui se forme inévitablement. Dans ce contexte, la recommandation générale est de réaliser le prélèvement au cœur du vin, à mi-hauteur. Autant que possible avec un plongeur en passant par le haut.

Il apparaît très clairement que les robinets dégustateurs sont souvent des nids à *Brettanomyces* et bactéries. Ce ne sont pas les meilleurs moyens pour réaliser des échantillons pour l'analyse d'une façon générale. S'ils constituent le seul moyen de prélèvement, un important dégorgement (au moins 1 L) doit être fait au préalable.