ÉVALUATION RAPIDE DE LA CONTAMINATION DES MOÛTS PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

RAPID DETECTION OF MICROBIAL CONTAMINATION IN GRAPE JUICE BY FLOW CYTOMETRY

Marielle BOUIX*, Agnès GRABOWSKI*, Monique CHARPENTIER** et [1], J.Y. LEVEAU* et B. DUTEURTRE**

*Département de Microbiologie Industrielle, Ecole Nationale Supérieure des Industries Alimentaires, 1 avenue des Olympiades, 91744 Massy cedex (France)
**Moët et Chandon, 6 rue Croix de Bussy, 51200 Epernay (France)

Résumé : Ce travail présente les conditions d'utilisation de la cytométrie en flux pour le dénombrement rapide des micro-organismes dans les moûts. Dans un premier temps, cette technique a été mise au point sur du jus de raisin pressé et clarifié au laboratoire. Nous avons pu montrer que la cytométrie permettait de dénombrer simultanément des levures et des bactéries en 15 minutes avec un seuil de détection à 5.10^3 cellules/ml pour les levures et à 5.10^4 cellules/ml pour les bactéries. Cette technique permet également la détection partielle des spores de *Botrytis* présentes dans un jus de raisin atteint de pourriture. Cette méthode a été ensuite utilisée au cours des vendanges sur plus de 1 000 échantillons de moûts arrivant en citerne au centre de vinification. Les résultats ont permis de déterminer, en 10 minutes, donc avant le déchargement de la citerne, le niveau de contamination en levures des moûts ; la corrélation avec les dénombrements en boîte de Petri est de 99 p. cent en prenant comme niveau de contamination 5.10^4 levures/ml. Cette technique a permis au cours des vendanges de sélectionner et d'orienter les moûts en cuverie en fonction de leur niveau de contamination, et de prévenir rapidement les fournisseurs des moûts les plus contaminés.

Abstract : This study presents an application of flow cytometry to evaluate rapidly the viable micro-organisms in grape juice. In this method, viable cells are firstly specifically labelled with a fluorescent reagent. The sample is then injected into the flow cytometer where the labelled micro-organisms are individually illuminated by a laser beam. The emission of fluorescence is measured. The system counts the number of fluorescent events and prints out a histogram of the fluorescence intensity which is characteristic of the micro-organism being analysed. In laboratory conditions, preliminary trials have been undertaken with an artificially inoculated grape juice with pure yeast and bacteria cultures. This method succeeded in counting simultaneously yeasts and bacteria within 15 minutes, with a high degree of sensitivity, 5.10^3 yeasts per ml and 5.10^4 bacteria per ml. This technique can also be applied to the detection of mould contamination and the test has been done with *Botrytis* spores. The method makes direct cell counts possible and is capable of analysing 30 samples per hour. It can be automatised and easily used in industrial laboratory. During the last harvest, more than a thousand of must samples were controled using this technique. The results let to determine the yeast contamination level of a grape juice tank even before unloading. The results obtained by flow cytometry were compared to the plate count reference method. The correlation between cytometry and count by plate culture was 99 p. cent for the threshold of 5.10^4 yeasts/ml which seemed to point out a high contamination. By using this flow cytometry method during the harvest period, the results were supplied in real time. This allowed a rapid selection of the musts, depending upon the scale of their contamination and improved the quality of the wine by corrective actions.

Mots clés : moût, levure, bactérie, spore de *Botrytis*, cytométrie en flux, comptage

Key words : must, yeast, bacteria, spore of *Botrytis*, flow cytometry, cell count

INTRODUCTION

Dans toute industrie de transformation dont l'approvisionnement est extérieur à l'entreprise, la matière première représente un élément clef pour l'obtention de produit de qualité. Dans le domaine de l'œnologie, quatre paramètres essentiels interviennent dans la définition de la qualité des jus avant la vinification. Ce sont la maturité et l'état phytosanitaire des raisins, la qualité œnologique et la qualité hygiénique des moûts. Le raisin est en effet un fruit sensible à un grand nombre de maladies apportant divers types de défauts organoleptiques. Actuellement, de nombreux produits de traitements phytosanitaires existent, mais la pourriture grise engendrée par *Botrytis cinerea* persiste et pose au vinificateur des problèmes tant technologiques qu'or-

1 : correspondance : E-mail : mcharpen@moet.tm.fr

J. Int. Sci. Vigne Vin, 1999, **33**, n°1, 25-32
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

ganoleptiques. À son mycélium sont souvent associés des développements bactériens (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas*...) engendrant d'autres goûts anormaux (acétate d'éthyle, précurseurs phéniqués...). Or, lorsque les moûts arrivent chez le négociant après débourbage, la présence de spores pourrait être le témoin d'un développement de *Botrytis* sur les raisins. D'autre part, la qualité œnologique des moûts va dépendre du travail réalisé dans les centres de pressurage prestataires de services et de la qualité d'acheminement des moûts vers le centre de vinification. Il est en effet impératif qu'avant mise en fermentation par des levures sélectionnées, les jus soient correctement débourbés et ne présentent pas un niveau de contamination levurienne proche de celle d'un départ en fermentation. La maîtrise de la qualité des vins doit donc passer par la connaissance de la qualité microbiologique des moûts avant ensemencement. Il s'avère donc indispensable de disposer de méthodes d'analyses rapides pour la détection des contaminants microbiens. La technique recherchée devra permettre le dénombrement des spores comme témoin d'une présence de *Botrytis* sur les raisins, des levures comme indicateur de départ en fermentation spontanée et des bactéries associées à *Botrytis*. Elle sera applicable aux jus après pressurage et plus particulièrement aux moûts arrivant par citernes dans le cas des pressoirs éloignés du lieu de vinification. La connaissance de ces paramètres permettra d'orienter les moûts en cuverie en fonction de leurs niveaux de contaminations. Un moût fortement contaminé ne sera pas mélangé avec des moûts peu contaminés et pourra être traité en fonction de son niveau de contamination, garantissant ainsi une meilleure maîtrise des fermentations. De même, un moût *botrytisé* pourra être traité spécifiquement.

La méthode traditionnellement utilisée pour le comptage des micro-organismes est le dénombrement en boîte de Petri, qui nécessite 48 heures d'incubation pour obtenir un résultat, délai incompatible avec l'objectif défini. Nous avons donc choisi d'utiliser la cytométrie en flux qui permet de compter les cellules individuellement et de les classer suivant leur intensité de fluorescence et leur taille, avec une cadence d'analyse de l'ordre de 100 à 200 micro-organismes par seconde, soit environ 2 minutes pour un comptage. Des travaux récents montrent que cette technique se développe en particulier pour le dénombrement des levures (BAUMGART et KOETTER, 1992 ; BRUETSCHY *et al.*, 1994 ; DE GROOTE *et al.*, 1995 ; JOOSTEN *et al.*, 1996 ; ROY et MULARD, 1996 ; MULARD, 1997). Dans ce travail, notre objectif a été d'évaluer à la réception des citernes, en 15 minutes maximum, les niveaux de contamination des moûts en levures, en bactéries et en spores. Après avoir mis au point la méthode au laboratoire sur du jus de raisin artificiellement contaminé avec des cultures pures et des mélanges de micro-organismes, nous avons validé les résultats au cours des vendanges.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - LES SOUCHES MICROBIENNES ET LES MILIEUX DE CULTURE

La souche de levure utilisée au laboratoire est *Hansenula anomala* isolée de raisin, dont les cellules sont un peu plus petites que celles de *Saccharomyces cerevisiae* et plus représentatives de la taille des cellules des levures observées dans les moûts juste après pressurage. Les cultures de levures sont réalisées pendant 24 heures en bouillon de Sabouraud.

Les spores de *Botrytis* (souche 617 INRA Versailles) sont récoltées en surface d'une gélose au malt.

Les bactéries utilisées sont *Leuconostoc mesenteroides* CIP 102422 et *Lactobacillus* CIVC 3 cultivées pendant 16 h en milieu MRS.

Le jus de raisin est obtenu au laboratoire par pressurage mécanique des baies, puis clarifié par centrifugation à 3 000 g pendant 10 minutes. 1 ml des cultures de levures ou de bactéries est ajouté à 9 ml de ce jus, puis des dilutions au 1/10 de ces suspensions sont réalisées avec du jus de raisin clarifié de façon à reconstituer des suspensions de jus de raisin contenant des concentrations variables mais connues (dilutions au 1/10) de levures et de bactéries, et toujours la même concentration de particules provenant du jus lui-même.

La validation des résultats est effectuée sur des moûts provenant de toute la Champagne.

Les numérations de contrôle sont effectuées en boîte de Petri.

II - PROTOCOLE DE MARQUAGE DES MICRO-ORGANISMES

Nous avons modifié le protocole de LAPLACE-BUILHE *et al.* (1993) pour l'adapter au dénombrement des micro-organismes dans les conditions œnologiques.

Le protocole de marquage au laboratoire pour la mise au point de la méthode est le suivant :

- Prélèvement de quelques ml de suspension de jus de raisin.

- Dilutions au 1/10 (suivant les essais).

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

- Filtration sur membrane de porosité 15 µ.

- Prélèvement de 200 µl + 1,8 ml de tampon de marquage (le tampon de marquage est différent pour les bactéries et pour les champignons).

- Addition de 20 µl de substrat de marquage.

- Incubation 5 à 10 min à 40°C.

- Arrêt de la réaction dans la glace, 5 min.

- Addition de CSB (100 µl).

- Addition de CSR (une spatule) (seulement dans le protocole utilisé pour le comptage des bactéries).

- Mélange, filtration sur membrane de porosité 15 µ (seulement dans le protocole utilisé pour le comptage des bactéries).

- Lecture au cytomètre.

Les produits utilisés tels que tampon, substrat, CSB et CSR sont commercialisés par Chemunex, Maisons-Alfort. Le substrat est du diacétate de carboxyfluorescéine. Le CSB réduit la fluorescence particulaire et l'autofluorescence des cellules. Le CSR éteint la fluorescence de fond dans le cas de marquage de bactéries. Les formulations chimiques sont la propriété de Chemunex.

Au cours de la mise au point de la méthode, nous avons fait varier le temps d'incubation de 5 à 10 minutes, et nous avons fait des essais de marquage simultané des levures et des bactéries, en appliquant le protocole « levures » (tampon et substrat levures) sur des bactéries, et inversement.

En conditions de validation sur les moûts pendant les vendanges, les quantités de réactifs sont optimisées pour réduire la durée de l'analyse (le volume total dans le tube d'analyse est ramené à 762 µl) et pour pouvoir ainsi passer le maximum d'échantillons.

Le protocole de marquage des levures pendant la validation de la méthode est le suivant :

- Prélèvement de quelques ml de moût.

- Dilutions au 1/10.

- Filtration sur membrane de porosité 15 µ.

- Prélèvement de 76 µl + 640 µl de tampon de marquage (tampon de marquage et substrat levure).

- Addition de 10 µl de substrat de marquage (tampon de marquage et substrat levure).

- Incubation 6 min à 40°C.

- Arrêt de la réaction dans la glace, 1 à 5 min.

- Addition de CSB (36 µl).

- Lecture au cytomètre.

III - L'ANALYSE AU CYTOMÈTRE

Le cytomètre est un Chemflow 3 (Chemunex, Maisons-Alfort) équipé d'une source laser à ions Argon ajusté à 15 mW. Les analyses sont effectuées en fluorescence (excitation à 488 nm et émission à 515 nm).

Chaque cellule est comptabilisée et son signal est positionné sur un histogramme en fonction de son intensité de fluorescence. La sensibilité du photomultiplicateur est réglée par le paramètre « gain ». Les signaux correspondant aux bactéries sont centrés sur l'écran à un gain d'environ 400 et ceux des levures à un gain d'environ 300. Pour la détection simultanée de plusieurs populations, l'utilisation des curseurs permet d'avoir des comptages individualisés de chaque population.

La calibration du cytomètre est effectuée avec des billes fluorescentes standards (latex). La quantité de suspension analysée est de 210 µl.

Des observations sont effectuées parallèlement au microscope en épifluorescence (Leitz Dialux 20), pendant la phase de mise au point.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I - DÉNOMBREMENT DES LEVURES PRÉSENTES DANS DU JUS DE RAISIN

Le marquage est réalisé suivant le protocole « levure » décrit ci-dessus.

Le tableau I et la figure 1 présentent les résultats obtenus en cytométrie sur des dilutions successives au 1/10. Le dénombrement sur boîte de la suspension initiale (dilution 0) donne 5. 10^7 UFC/ml.

Ces résultats appellent trois commentaires :

- pour les dilutions 10^{-1} à 10^{-4} (concentrations de 5.10^3 à 5.10^6 UFC /ml), la méthode est fiable puisque les valeurs obtenues pour les dilutions successives sont bien corrélées entre elles par un facteur 10.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

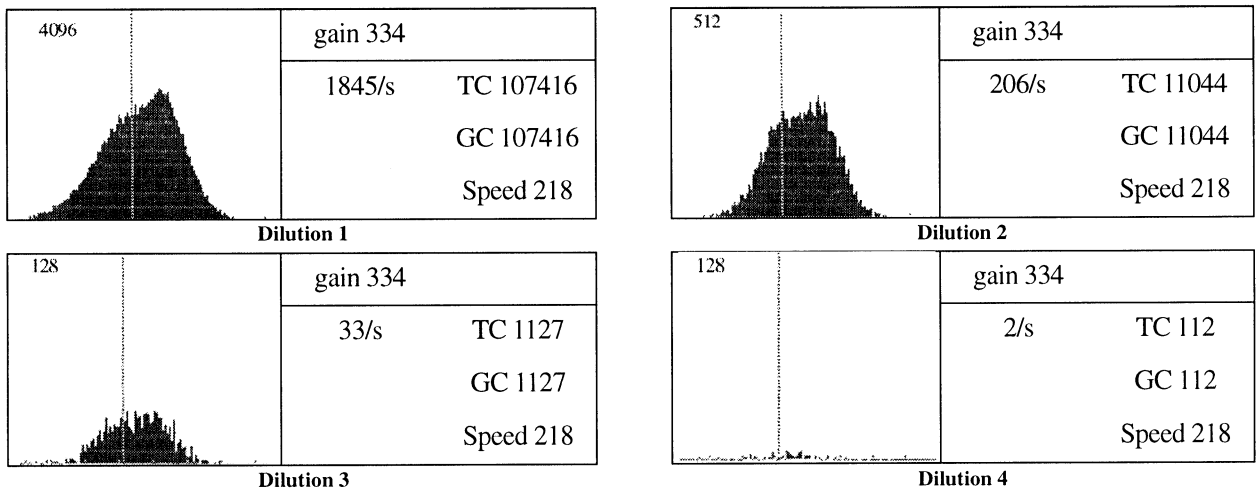


Fig. 1 - Histogrammes de dénombrement des levures en cytométrie en flux

Fig. 1 - Detection of yeast using flow cytometry

TABLEAU I
Recherche de la dilution optimum pour le dénombrement des levures par cytométrie en flux dans un moût contenant 5.10^7 UFC/ml

Table I - Determination of the optimum dilution to count yeast by flow cytometry in a must contaminated by 5.10^7 UFC/ml

Dilution	Comptage Chemflow	Résultats après calcul* (cellules/ml)
1	266.700	$1,27.10^7$
10^{-1}	107.310	$5,11.10^7$
10^{-2}	11.046	$5,26.10^7$
10^{-3}	1.127	$5,37.10^7$
10^{-4}	112	$5,34.10^7$
10^{-5}	45	$2,19.10^8$

*Le calcul tient compte du volume analysé, du mode de préparation de l'échantillon et des dilutions effectuées.

TABLEAU II
Recherche de la dilution optimum pour le dénombrement des bactéries par cytométrie en flux dans un moût contenant 8.10^8 UFC/ml

Table II - Determination of the optimum dilution to count bacteria by flow cytometry in a must contaminated with 8.10^8 UFC/ml

Dilution	Comptage Chemflow	Résultats après calcul* (cellules/ml))
10^{-2}	110.040	$5,24.10^8$
10^{-3}	17.283	$8,23.10^8$
10^{-4}	2001	$9,53.10^8$
10^{-5}	672	$3,2.10^9$
10^{-6}	756	$3,6.10^{10}$

*Le calcul tient compte du volume analysé, du mode de préparation de l'échantillon et des dilutions effectuées.

- pour la dilution 1 (concentration supérieure à 5.10^6/ml), le résultat est sous-évalué, le nombre de particules détectées par seconde par le cytomètre étant trop important pour un comptage fiable.

- enfin pour la dilution 10^{-5}, le résultat est surévalué : le cytomètre compte vraisemblablement des particules du jus de raisin, présentes indépendamment de la concentration en levure. Du jus de raisin seul, clarifié par centrifugation 10 min à 3 000 g donne un résultat de $2,15.10^3$ particules équivalent levures/ml. Après centrifugation à 10 000 g pendant 5 min, le comptage n'est plus que de 5.10^2/ml.

Dans ce protocole, le temps de marquage peut être réduit à 6 minutes sans modifier significativement le nombre de cellules marquées.

II - DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES PRÉSENTES DANS LE JUS DE RAISIN

Le marquage est effectué selon le protocole standard « bactéries ». La lecture au cytomètre est effectuée au gain 430. La suspension de *Leuconostoc* utilisée est à 8.10^8 UFC/ml.

Les résultats figurent dans le tableau II.

Les résultats sont semblables à ceux obtenus avec les levures, mais avec un seuil de détection plus élevé. En effet, après 10 minutes de centrifugation à 3 000 g, le bruit de fond donné par le jus de raisin équivaut à 3.10^4 bactéries/ml et après une centrifugation à 10 000 g pendant 5 minutes, ce bruit de fond équivaut à 4.10^3 bactéries/ml. Nous considérerons donc que le seuil de détection pour les bactéries dans le jus de rai-

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

sin est de 5.10^4 cellules/ml, la valeur minimale trouvée quelle que soit la dilution étant de 3.10^4/ml.

L'objectif étant de dénombrer les levures et les bactéries dans un temps le plus court possible, nous avons étudié les conditions de l'analyse de façon à pouvoir obtenir le marquage des deux micro-organismes simultanément et à faire les dénombrements avec un seul passage au cytomètre.

III - MARQUAGE SIMULTANÉ DES LEVURES ET DES BACTÉRIES

Des levures sont révélées avec les conditions de marquage des levures (témoin) et avec les conditions de marquage des bactéries, et des bactéries sont détectées avec les conditions de marquage des bactéries (témoin) et avec les conditions de marquage des levures. Les résultats du tableau III montrent que les levures sont détectées après un marquage dans les conditions des bactéries avec une différence de 15 à 18 p. cent par rapport au marquage témoin ($4,4.10^3$ au lieu de $5,3.10^3$).

Par contre, les bactéries sont très mal marquées dans les conditions utilisées pour les levures (80 à 95 p. cent de différence par rapport au témoin).

L'objectif étant de faire une évaluation rapide des niveaux de contamination, nous avons retenu la méthode de marquage simultanée en conditions bactéries, même si le résultat sur les levures est sous-évalué d'environ 15 p. cent.

IV - DÉTECTION SIMULTANÉE DES LEVURES ET DES BACTÉRIES

En utilisant la fonction (gate count) du cytomètre qui permet de compter la population située soit à droite soit à gauche d'un curseur, tout en indiquant la population totale (fonction total count), il est possible de compter séparément, en un seul passage sur le cytomètre, les levures et les bactéries, si les populations sont bien individualisées.

Les histogrammes de la figure 2 montrent un exemple de mélange de levures et de bactéries : les levures sont plus fluorescentes et sont visualisées à droite alors que les bactéries, moins fluorescentes, sont représentées à gauche.

Il est à noter que les événements situés à gauche de la fenêtre de lecture ne sont pas comptabilisés (faible fluorescence considérée comme du bruit de fond), alors que les événements situés à droite de la fenêtre sont comptés (forte fluorescence) ; c'est le cas des levures dans nos conditions de fonctionnement. Comme l'objectif est d'avoir en priorité le nombre de levures, nous utiliserons, dans la suite du travail, le curseur « lower » pour avoir directement le nombre de levures affiché à l'écran dans la rubrique GC.

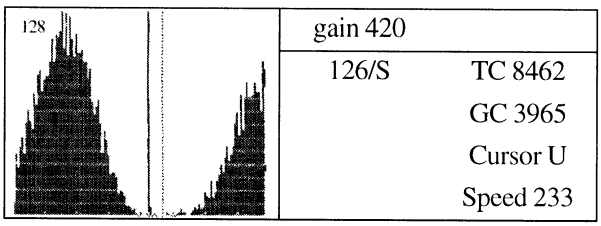
En vue de confirmer la méthode de marquage et de détection simultanés des 2 micro-organismes, nous avons ensuite effectué des comptages sur différents jus ensemencés avec une dilution de levures et une dilution de bactéries, marquées selon le protocole standard « bactéries » et détectées dans les conditions des bactéries (gain 420), avec le curseur « lower » (tableau IV). Les suspensions initiales de levures et de bactéries sont respectivement aux concentrations de $2,70.10^7$ UFC/ml et $2,35.10^8$ UFC/ml.

Les résultats obtenus sont d'autant plus justes qu'on se situe à une concentration supérieure à 10^3 levures/ml et à une concentration supérieure à 10^4 bactéries/ml. Pour 10^3 levures/ml, les résultats sont un peu plus dis-

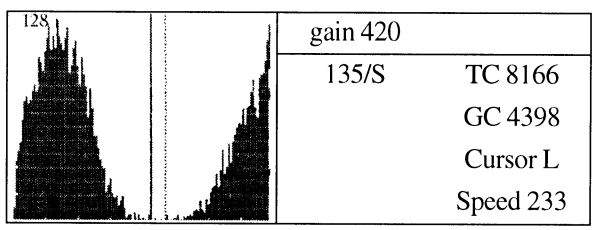
TABLEAU III
Comparaison des résultats de comptage en fonction des conditions de marquage

Table III - Comparison between two labelling modes

Levures x 10^3		Bactéries x 10^4	
Conditions levure	Conditions bactérie	Conditions bactérie	Conditions levure
5,34	4,36	3,68	0,885 (Le)
5,07	4,34	12	0,55 (Lb)



2a : curseur « upper »
GC = bactéries = $1,8.10^4$
TC-GC = levures = $2,14.10^4$



2b : curseur « lower »
TC-GC= bactéries = $1,79.10^4$
GC = levures = $2,09.10^4$

Fig. 2 - Histogrammes de mélanges levures - bactéries

Fig. 2 - Simultaneous count of yeast and bacteria by flow cytometry

J. Int. Sci. Vigne Vin, 1999, **33**, n°1, 25-32
©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

persés qu'avec les concentrations supérieures. Pour 10^4 bactéries/ml, le résultat est correct s'il y a peu de levures, mais mauvais si la concentration en levures est supérieure à 10^5. On retrouve ce seuil de 5.10^4 bactéries/ml pour une mesure fiable.

Dans ces fourchettes de concentrations, il est donc tout à fait possible de réaliser les deux dénombrements en un seul marquage et un seul passage au cytomètre, soit une lecture en 1 min 30. Le temps total d'analyse est donc de l'ordre de 15 minutes (dilution-filtration 1 min, marquage 10 min, séjour dans la glace 2 min, lecture 1 min 30).

Le marquage est l'étape la plus longue.

TABLEAU IV
Détection simultanée des levures et des bactéries dans des mélanges à différentes concentrations
Table IV - Simultaneously detection of yeast and bacteria in different mixtures

Population théorique	Population totale comptée (TC)	Comptage levures (GC)	Comptage bactéries (TC-GC)
Levures : $2,7.10^3$	$2,42.10^4$	$2,52.10^3$	
Bactéries : $2,35.10^4$			$2,17.10^4$
Levures : $2,7.10^3$	$1,61.10^5$	$3,7.10^3$	
Bactéries : $2,35.10^5$			$1,58.10^5$
Levures : $2,7.10^3$	$1,74.10^6$	$1,9.10^3$	
Bactéries : $2,35.10^6$			$1,74.10^6$
Levures : $2,7.10^4$	$2,57.10^6$	$2,9.10^4$	
Bactéries : $2,35.10^6$			$2,54.10^6$
Levures : $2,7.10^4$	$3,56.10^5$	$2,86.10^4$	
Bactéries : $2,35.10^5$			$3,28.10^5$
Levures : $2,7.10^4$	$5,42.10^4$	$2,77.10^4$	
Bactéries : $2,35.10^4$			$2,65.10^4$
Levures : $2,7.10^5$	$4,6.10^5$	$2,34.10^5$	
Bactéries : $2,35.10^5$			$2,28.10^5$
Levures : $2,7.10^6$	$2,68.10^6$	$2,3.10^6$	
Bactéries : $2,35.10^5$			$3,67.10^5$
Levures : $2,7.10^6$	$2,5.10^6$	$2,37.10^6$	
Bactéries : $2,35.10^4$			$1,28.10^5$

TABLEAU V
Influence de la durée de l'incubation sur le marquage des micro-organismes
Table V - Influence of incubation time for a good simultaneous labelling of yeast and bacteria

Durée d'incubation (minutes)	Levures x 10^5 (cellules/ml)	Bactéries x 10^5 (cellules/ml)
5	4,62	2,15
7	4,84	2.9
10	5,52	3,5

V - ESSAI DE RÉDUCTION DE LA DURÉE DE MARQUAGE

Sur des cultures pures et sur un mélange de levures et de bactéries, nous avons effectué des incubations de 5 min, 7 min et 10 min (témoin) après addition du substrat de marquage des bactéries.

Les résultats du tableau V montrent que le nombre de cellules marquées augmente avec le temps d'incubation. En réduisant le temps, il y a donc sous-évaluation du nombre des micro-organismes. Ce phénomène est bien visible sur les histogrammes où l'on observe un décalage de la population vers la droite (fluorescence plus forte) avec l'augmentation du temps d'incubation. Pour détecter l'ensemble de la population, tout en réduisant le temps, il faudrait augmenter la sensibilité de l'appareil, ce qui est possible si l'on fait une détection des levures seules. Mais dans le cas de la détection des bactéries, les conditions de sensibilité sont déjà limites et une augmentation de sensibilité risque d'augmenter le bruit de fond de façon trop importante. Par ailleurs, les deux populations en mélange ne sont plus séparées.

Le temps de marquage peut être réduit à 6 minutes, si l'on recherche seulement des levures (protocole de marquage avec tampon et substrat levure) ; mais si l'on recherche la détection simultanée des levures et des bactéries, la durée du marquage ne peut pas être réduite à moins de 10 minutes.

VI - DÉNOMBREMENT DES SPORES DE *BOTRYTIS*

Le marquage des spores est effectué dans les conditions de marquage des levures (tampon et substrat). Les spores peu actives physiologiquement après récolte directe sur boîte de Petri se marquent mal ; pour améliorer le marquage, il est nécessaire d'obtenir des formes métaboliquement actives. Des conditions optimales de germination ont été déterminées (PELLOUX-PRAYER *et al.*, 1997), mais notre objectif étant de détecter les spores présentes dans les moûts, nous avons préféré observer l'évolution des spores dans ce milieu. Les spores ont donc été remises en suspension dans du jus de raisin et laissées à température ambiante pendant une nuit. Ce délai simule les conditions naturelles d'une vinification en blanc avec débourbage.

Par ailleurs, nous avons pressé des grappes de raisins entièrement recouverts de *Botrytis* pour récolter directement des spores dans leur état physiologique au moment des vendanges.

Les résultats montrent que les spores sont facilement détectées au cytomètre à un gain de 200 après un

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

marquage dans les conditions de marquage des levures (figure 3a). Une observation microscopique montre que les spores sont toutes fluorescentes avec des intensités variables et il y a une bonne corrélation avec un comptage sur cellule de Malassez. Par contre, il y a plus de disparité avec les spores issues d'une culture sur boîte de Petri et mises en suspension une nuit.

VII - DÉTECTION SIMULTANÉE DES SPORES DE *BOTRYTIS*, DES LEVURES ET DES BACTÉRIES

- Les conditions de marquage des spores de *Botrytis* et des levures sont identiques : il est donc facile de faire le marquage simultanément. L'histogramme de la figure 3b montre le dénombrement simultané de levures (pic de gauche, TC - GC) et de spores (pic de droite, GC). Pour observer les deux populations, il faut augmenter le gain jusqu'à avoir la totalité du pic de levures à l'écran ; le pic des spores est incomplet visuellement, mais est comptabilisé en entier par l'appareil.

- Le marquage des spores avec le substrat des bactéries est moins performant : il faut faire une lecture à un gain de 300 au lieu de 200 avec le substrat des levures (figure 3c). Cela a pour conséquence que les populations de bactéries et de spores ne sont pas séparées dans un mélange (figure 3d).

Les essais au laboratoire montrent qu'il est possible de réaliser le comptage des micro-organismes dans le jus de raisin par cytométrie en flux, avec une bonne fiabilité dans la fourchette de concentration 5.10^3 - 5.10^6/ml pour les levures en 10 minutes, 5.10^4 - 5.10^6/ml pour les bactéries en 15 minutes, et un seuil de 10^3/ml pour les spores de *Botrytis*.

Le comptage simultané des levures et des spores de *Botrytis* est possible en 15 min (10 min de marquage).

Le comptage simultané des levures et des bactéries est également possible en 15 min, le résultat sur les levures pouvant être minoré d'environ 15 p. cent.

VIII - VALIDATION DES RÉSULTATS AU COURS DES VENDANGES

Pour la première année d'utilisation de la cytométrie au cours des vendanges, nous avons choisi de dénombrer seulement les levures, suivant le protocole levures (tampon et substrat levure, ce qui permet de raccourcir la durée du marquage à 6 minutes).

1) Corrélation entre les résultats de la cytométrie et les dénombrements des levures en boîte de Petri

1 000 échantillons de moûts ont été analysés. Les lectures des boîtes de Petri ont été effectuées après 24 heures d'incubation, pour des raisons pratiques.

La figure 4 permet de comparer l'ensemble des résultats. On observe que pour les niveaux de contaminations supérieurs à 5.10^4/ml, les corrélations entre les résultats obtenus par cytométrie en 10 minutes et par culture en 24 heures sont bonnes. Pour les niveaux de contamination inférieurs à 5.10^4/ml, les résultats ne sont pas superposables. On peut expliquer ces différences par les principes respectifs des techniques de comptage utilisées. En effet, le marquage en cytométrie est un marquage de viabilité, c'est-à-dire que toutes les levures présentes et vivantes sont détectées quel que soit leur état physiologique et indépendamment de leur cinétique de croissance. Par culture sur boîte, les levures peu actives, présentant une phase de latence de plusieurs heures, ne sont pas visibles ou comptables après

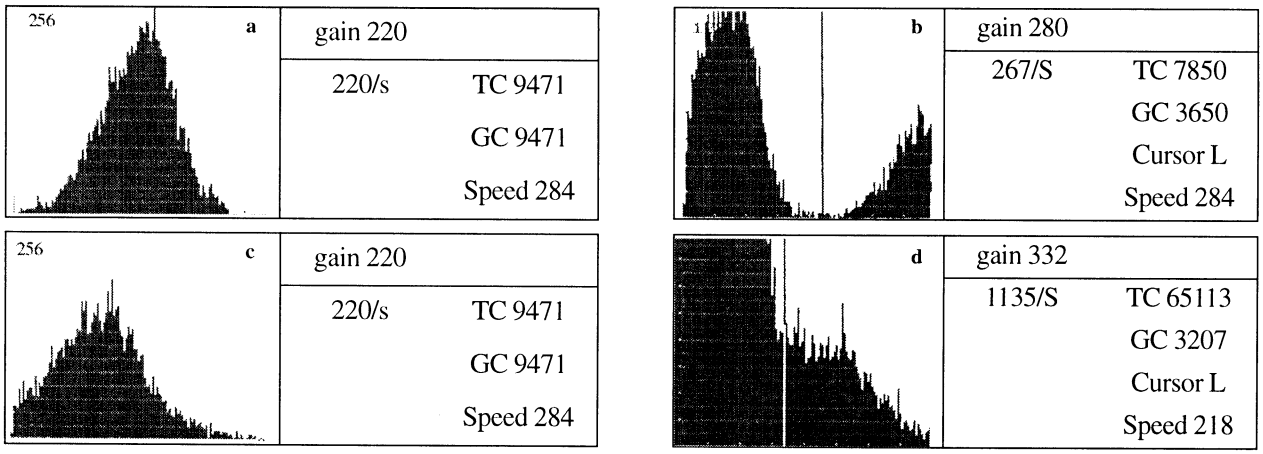


Fig. 3 - Histogrammes obtenus avec les spores de *Botrytis* ayant séjourné une nuit dans le jus de raisin
3a : Spores. Marquage substrat levures - **3b** : Mélange spores levures. Marquage substrat levure
3c : Spores. Marquage substrat bactéries - **3d** : Mélange spores bactéries. Marquage substrat bactéries

Fig. 3 - Detection of spores of *Botrytis* in grape juice
3a : Spores labelled with yeast substrate - **3b** : Spores and yeast labelled with yeast substrate
3c : Spores labelled with bacteria substrate - **3d** : Spores and bacteria labelled with bacteria substrate

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)

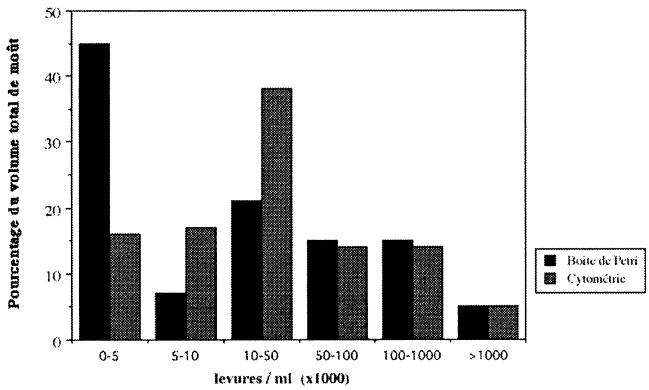


Fig. 4 - Pourcentage du volume total de moût par niveaux de contamination levurienne évalués par culture et cytométrie en flux

Fig. 4 - Comparison of plate count and cytometry for yeast enumeration on the musts received during the last harvest

24 heures ; il est vraisemblable que si les comptages sur boîtes avaient été effectués après 48 heures d'incubation au lieu de 24 heures, les résultats auraient été mieux corrélés. Ceci explique le volume important de moût trouvé contaminé à un niveau inférieur à 5.10^3 levures/ml par culture alors que la cytométrie permet de détecter, pour les mêmes moûts, des niveaux de contaminations supérieurs : ces moûts sont contaminés par des levures physiologiquement peu actives. Ceci est confirmé par la forme des histogrammes : pour des concentrations comprises entre 10^4/ml et 10^5/ml, ils sont très étalés sur l'échelle de fluorescence, ce qui indique une hétérogénéité des levures en taille ou/et en état physiologique, alors qu'ils présentent un pic étroit, traduisant une population homogène en cours de fermentation pour un moût contenant plus de 2.10^6 levures/ml.

2) Détection des spores de *Botrytis* dans les moûts

Quelques essais de détection de spores de *Botrytis* ont été effectués, mais la vendange 1997 présentant un bon état sanitaire, la technique de comptage n'a pas pu être validée sur les moûts.

CONCLUSION

La technique de cytométrie en flux appliquée au comptage des levures dans les moûts permet de connaître en 10 minutes leur niveau de contamination, et en particulier de savoir si un moût est en dessous ou au-dessus du seuil de 5.10^4 levures/ml. Ce délai extrêmement court permet d'orienter les jus en cuverie en fonction de leurs niveaux de contamination, et d'adapter ensuite les traitements et les ensemencements. Ceci présente un réel intérêt puisque la qualité initiale des moûts caractérisée par des critères biochimiques et microbiologiques a pu être corrélée aux résultats des dégustations. Après dégustation, les vins sont notés A ou B (la qualité A étant jugée meilleure que la qualité B). Il a été observé un plus grand nombre de notes B quand une cuve est constituée de moûts dont la concentration initiale en levures est supérieure à 5.10^5/ml. Ces résultats sont à affiner, mais ils montrent que la qualité microbiologique du moût a une influence sur la qualité organoleptique des vins.

De plus, ces résultats ont permis d'identifier la provenance des moûts les plus contaminés et d'intervenir rapidement auprès des fournisseurs ou auprès des transporteurs. La plupart du temps, les moûts présentant une contamination élevée proviennent des régions les plus éloignées de la cave, et la fermentation a vraisemblablement commencé durant le transport. Des conseils sont alors donnés pour maintenir une bonne hygiène en cuverie et permettre la mise à disposition de citernes pour un transport rapide.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BAUMGART J. et KOETTER C., 1992. Delicatessen salads. Rapid detection of yeasts by flow cytometry. *Fleischwirtschaft*, **72**, n°8, 1109-1110.

BRUETSCHY A., LAURENT M. et JACQUET R., 1994. Use of flow cytometry in oenology to analyse yeasts. *Lett. Apll. Microbiol.*, **18**, 343-345.

DE GROOTE J., VROEGOP L. et BRAILSFORD M., 1995. A proactive tool for the control of yeast spoilage in fermented milk products. *Microbiology Europe*, **3**, 24-27.

JOOSTEN H.M.L.J., DIJCK W.G.F.M. Van, SPIKKER J.W.M. et TRAA H.M., 1996. Detection of yeasts in quarg by flow cytometry. *Milchwissenschaft*, **51**, n°4, 202-204.

LAPLACE-BUIHLE C., HAHNE K., HUNGER W., TIRILLY Y. et DROCOURT J.-L., 1993. Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biol. Cell.*, **78**, 123-128.

MULARD Y., 1997. Microbiologie rapide : détection des contaminants dans les concentrés et jus de fruits. *Bios Boissons Conditionnement*, **266**, 35-37.

PELLOUX-PRAYER A.L., PRIEM B. et JOSELEAU J.P. 1997. Mise au point d'une technique fluorimétrique permettant l'étude cinétique de la germination de *Botrytis cinerea. Nouvelles approches analytiques en Biotechnologie, Actes du colloque*, Grenoble.

ROY D. et MULARD Y., 1996. Rapid microbiology using a laser flow cytometer : total bacteria and yeast count within 45 minutes in ready prepared salads and other food products. *Food Tech Europe*, mars-avril, 36-40.

Reçu le 21 août 1998 ; révisé le 1er décembre 1998 ; accepté pour publication le 3 février 1999.

©Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France)