IVES Technical Reviews vigne & vin
https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2020.4544

Biofilms de *Brettanomyces bruxellensis* : un mode de vie pour résister aux stress environnementaux ?

Article prenant sa source de l'article de recherche "New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life" (International Journal of Food Microbiology 2020)[1].

>>> La capacité à former des biofilms est une stratégie de résistance potentielle, bien qu'elle n'ait pas été beaucoup explorée, jusqu'à présent, pour la levure d'altération du vin, *Brettanomyces bruxellensis*. La capacité de deux souches à adhérer et à former des biofilms sur des coupons d'acier inoxydable dans le vin a été étudiée. En utilisant la microscopie électronique, des structures cellulaires particulières, telles que des cellules filamenteuses ou une structure semblable à celle de chlamydospores, ont été identifiées et pourraient être impliquées dans la résistance de *B. bruxellensis*. De plus, des cellules libres, relarguées des biofilms formés, ont été observées : ces cellules relarguées pourraient être à l'origine de la contamination récurrente du vin. <<<

Le biofilm peut être défini comme une communauté de microorganismes irréversiblement attachés à une surface, liés entre eux et intégrés dans une matrice autoproduite. Cette stratégie de croissance, très répandue chez les microorganismes, contribue à leur persistance dans divers environnements grâce à une résistance accrue aux stress et à la colonisation des surfaces[2]. La capacité de la levure d'altération du vin, *Brettanomyces bruxellensis*, à former des biofilms est mal décrite dans la littérature. Si l'adhésion sur les surfaces des équipements de vinification et la capacité à former des biofilms étaient démontrées pour *B. bruxellensis*, il serait alors nécessaire de développer des stratégies appropriées pour une élimination efficace. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était, premièrement, de mettre en évidence le mode de vie biofilm chez *B. bruxellensis* ; deuxièmement, de visualiser les différentes structures cellulaires à l'aide d'observations microscopiques ; et troisièmement, d'étudier l'impact du vin sur des biofilms établis produits par deux souches de *B. bruxellensis*.

■ Formation et structure des biofilms dans le vin

Les cellules de deux souches sélectionnées (appelées "11" et "14" et précédemment isolées à partir de matériel de vinification) ont été adaptées aux conditions du vin rouge (concentration d'alcool et pH) comme décrit par Longin *et al.*, 2016[3]. De plus, avant la formation du biofilm, des pré-cultures ont permis de s'assurer que les cellules étaient dans le même état physiologique correspondant à la fin de la phase exponentielle, ce qui a permis de comparer, avec précision, la formation de biofilms dans le vin entre les 2 souches étudiées. La formation de biofilm de *B. bruxellensis* dans le vin a été réalisée sur des coupons en acier inoxydable selon un protocole adapté d'études antérieures[4].

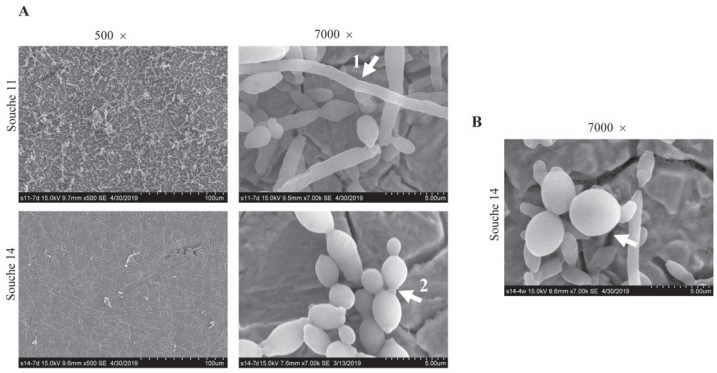

Figure 1. A) Observations au MEB de microcolonies de 7 jours pour les souches 11 et 14 développées dans le vin rouge sur des coupons en acier inoxydable. Les grossissements ont été effectués à 500 x (développement des microcolonies sur la surface en acier inoxydable) et à 7000 x (cellules filamenteuses et EPS indiquées par les flèches blanches n°1 et n°2 respectivement). B) Observations au MEB de microcolonies de la souche 14 développées pendant 14 jours dans du vin rouge sur des coupons en acier inoxydable. Des grossissements ont été effectués à 7000 x (structure de type chlamydospores indiquée par une flèche blanche).

Les coupons d'acier inoxydable de 25 mm × 25 mm ont été immergés dans 15 ml de vin rouge inoculé avec une suspension cellulaire à 5,0 × 105 UFC/ml. Après une incubation de 7 et 14 jours à 28 °C, la structure du biofilm a été observée par microscopie électronique à balayage (MEB).
L'adhésion et la formation de biofilm dans le vin pour les deux souches ont été étudiées sur coupons après 2 h, 24 h et 7 et 14 jours d'incubation. Pour chaque temps d'incubation, les cellules ont été détachées des coupons par sonication et les populations de cellules cultivables du biofilm ont été déterminées par dénombrement sur un milieu YPD. Les cultures de levures ont été initialement inoculées à environ 106 UFC/ml (tableau 1). La souche 14 avait un faible taux d'adhésion de 0,69 % après 2 h dans le vin, comparé à la souche 11 (5,69 %). Cette différence de population s'est maintenue pendant les 7 premiers jours, mais pas après 14 jours d'incubation, même si aucune croissance supplémentaire du biofilm n'a été observée pour les deux souches dans le vin (tableau 1). Ainsi *B. bruxellensis* est capable d'adhérer et de former un biofilm dans des environnements difficiles comme le vin, mais la croissance du biofilm est faible après 14 jours d'incubation.

Tableau 1. Croissance des microcolonies sur coupons en acier inoxydable dans le vin pour les souches 11 et 14 à 2 et 24 heures et 7 et 14 jours. Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes, affectées d'un écart-type (valeurs en gris). Le signe* indique une différence significative (ANOVA, valeur $p \leq 0,05$) entre les 2 souches pour un point dans le temps.

Souche	Population initiale dans le vin UFC/mL	Population sur les coupons (UFC/cm²)			
	0 heure	2 heures*	24 heures*	7 jours*	14 jours
11	$5.44 \times 10^5 \pm 2.59 \times 10^5$	$3.22 \times 10^4 \pm 8.75 \times 10^3$	$5.26 \times 10^4 \pm 8.55 \times 10^3$	$1.06 \times 10^5 \pm 5.53 \times 10^4$	$1.79 \times 10^4 \pm 5.37 \times 10^3$
14	$1.33 \times 10^6 \pm 4.67 \times 10^5$	$9.53 \times 10^3 \pm 7.04 \times 10^3$	$1.50 \times 10^4 \pm 9.05 \times 10^3$	$4.78 \times 10^3 \pm 6.11 \times 10^3$	$5.29 \times 10^3 \pm 7.15 \times 10^3$

Le LabEx COTE soutient la création et le lancement de la revue IVES Technical Reviews dans le cadre de son appel à projets Transfert et valorisation.

En parallèle, l'observation des souches 11 et 14 après 7 jours d'incubation sur des coupons en acier inoxydable a révélé la présence de microcolonies contenant des cellules incorporées dans des substances polymères extracellulaires (SPE) (figure 1A). En outre, il est important de noter que de nombreuses cellules filamenteuses ont été observées au sein des microcolonies, dont on suppose qu'elles jouent un rôle structurel au sein du biofilm (figure 1A). Les observations microscopiques ont également révélé la présence de structures plus grandes qu'une cellule de levure habituelle, avec des parois épaisses et dérivées de cellules filamenteuses (figure 1B). De telles caractéristiques sont propres aux structures de type chlamydospore, déjà décrite pour *C. albicans*[5].

■ Impact du vin sur le biofilm de *B. bruxellensis*

Tout d'abord, nous avons produit des biofilms sur des coupons en acier inoxydable dans un milieu YPD (comme décrit précédemment), et après 7 jours d'incubation, les coupons avec des cellules adhérées en biofilm ont été transférées dans le vin pour étudier l'impact du vin sur des biofilms de *B. bruxellensis* âgés de 7 jours. Deux types de cellules ont été dénombrés : (i) celles qui sont restées dans le biofilm sur les coupons, et (ii) celles qui ont été libérées dans le vin (Figure 2). Pour les deux souches, la quantité de cellules dans les biofilms a diminué de manière significative après 24 heures, mais est restée stable par la suite jusqu'à 14 jours (figures 2A et 2B). Comme décrit précédemment, la souche 14 a été plus négativement affectée par le vin que la souche 11. Un phénomène important de libération des cellules du biofilm a été observé dès 2 h après l'incubation dans le vin (à environ 106 UFC/ml) pour les deux souches (figures 2A et 2B). Par la suite, pour la souche 14, une diminution du nombre de cellules libérées a été observée pendant 24 heures avant de rester stable jusqu'à 7 jours. Cette diminution a été suivie d'une augmentation du nombre de cellules entre le 7e et le 14e jour. Le même comportement a été observé pour la souche 11, mais dans une moindre mesure.

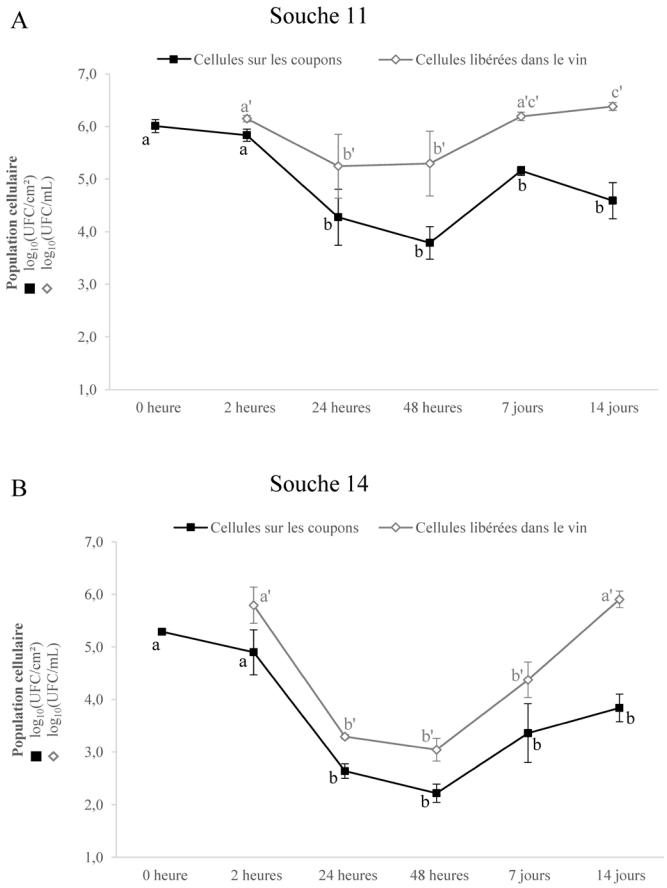

Figure 2. Comportement des microcolonies dans le vin pour la souche 11 (A) et la souche 14 (B). La population cellulaire sur les coupons est exprimée en log10 (UFC/cm²) et la population cellulaire libérée dans le vin en log10 (UFC/mL). Les barres d'erreur représentent l'écart type entre trois répétitions indépendantes. Une lettre différente indique une différence significative (ANOVA, p-value ≤ 0,05).

■ Conclusion

Dans cette étude, la capacité de la levure d'altération *B. bruxellensis* à former un biofilm sur acier inoxydable a été démontrée dans le vin. Comme décrit pour d'autres microorganismes[6], le mode de vie biofilm peut permettre à *B. bruxellensis* de persister dans le vin et les environnements liés au vin et, de plus, être une voie importante de contamination du vin. Ce type de développement doit être pris en compte lors du nettoyage des cuves ou des systèmes de conduite, car une fois qu'un biofilm s'est formé, le processus de nettoyage pourrait être moins efficace, car le mode de vie biofilm permet une meilleure résistance aux conditions de stress. De plus, les observations au MEB ont révélé des structures "de type chlamydospores" qui n'avaient jamais été signalées pour *B. bruxellensis*. Les chlamydospores ont été décrites comme des formes de résistance chez certains champignons[7], mais chez les levures, leur rôle n'a jamais été clairement identifié. De futurs travaux devraient se concentrer sur la détermination de la nature et du rôle de ces structures "de type chlamydospores" chez *B. bruxellensis*, ainsi que sur le rôle de ces structures dans la persistance de la levure d'altération en cuverie. ■

Sandrine Rousseaux, Manon Lebleux, Hany Abdo, Louise Basmacyian, Chloé Roullier-Gall, Hervé Alexandre, Stéphanie Weidmann
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliments, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université Bourgogne Franche-Comté, IUVV, Dijon, France

1 Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall., Alexandre, H. Guilloux-Benatier, M., Weidmann, & S. Rousseaux, S. (2020). "New Advances on the *Brettanomyces bruxellensis* Biofilm Mode of Life." *International Journal of Food Microbiology*, vol. 318, p. 108464., doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464.
2 Davey, M.E., & O'toole, GA. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 64, p. 847-867.
3 Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res Int*, vol. 89, p. 620-630.
4 Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., & Weidmann, S. (2016). Effect of biofilm formation by Oenococcus oeni on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. *Front Microbiol*, vol. 7, p. 613.
5 Martin, S.W., Douglas, L.M., & Konopka, J.B. (2005). Cell cycle dynamics and quorum sensing in Candida albicans chlamydospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot Cell*, vol. 4, p. 1191-202.
6 Davey, M.E., & O'toole, GA. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 64, p. 847-867.
7 Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JF, Ayala-Burgos AJ, Sandoval-Castro CA, Valero-Coss RO, Mendoza-de-Gives P. 2009. Digestibility of Duddingtonia flagrans chlamydospores in ruminants: in vitro and in vivo studies. *BMC Vet Res* 5:46.