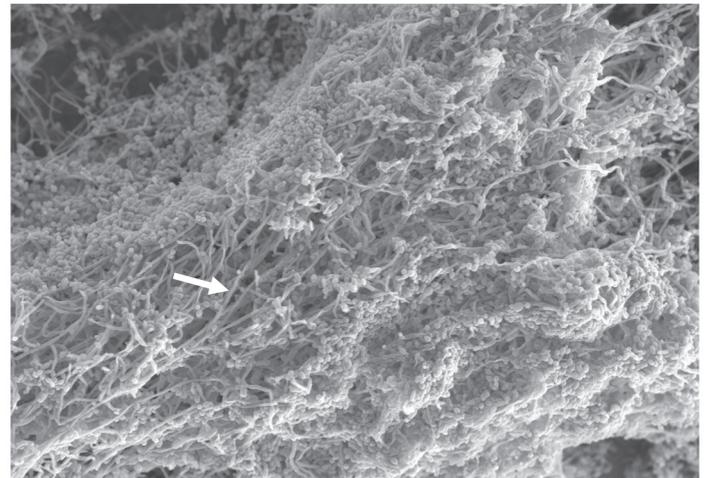


# Quelle méthode de nettoyage doit être appliquée pour éliminer les biofilms de *Brettanomyces bruxellensis*?

>>> La capacité de cinq souches de *Brettanomyces bruxellensis* à former un biofilm sur acier inoxydable a été confirmée, et l'élimination de ces biofilms a été testée en utilisant une solution d'acide lactique et une méthode de référence (une solution de soude caustique moussante et de peroxyde à 5 %). Des réponses différentes ont été observées en fonction de la souche : la solution d'acide lactique a induit une légère réduction de la population cellulaire, tandis que la méthode de référence a entraîné l'élimination des cellules adhérentes pour trois souches, mais a généré des états VNC pour deux autres. Les effets d'une procédure de nettoyage sur le biofilm formé dépendent de la souche. <<<



**Figure 1.** Observations au MEB (x 500) d'un biofilm de *Brettanomyces bruxellensis* d'un mois développé sur un coupon en acier inoxydable en milieu YPD. La surface est recouverte de microcolonies contenant des cellules de levures et des cellules filamenteuses (indiquées par une flèche blanche).

Le nettoyage des cuveries est au cœur des lignes directrices pour le contrôle des contaminations microbiennes et, en particulier, la contamination par *Brettanomyces bruxellensis*. En effet, cette levure d'altération est capable de survivre dans des conditions de stress ; par exemple, en présence de sulfites<sup>1, 2, 3</sup>. La capacité à former un biofilm est une stratégie de résistance potentielle développée par certaines levures<sup>4</sup>, bien que peu d'attention ait été accordée au cas de *B. bruxellensis* jusqu'à présent. Les biofilms sont définis comme une communauté d'un ou plusieurs types de microorganismes, qui adhèrent à des surfaces biotiques et abiotiques pouvant se développer dans les trois dimensions, et qui sont intégrés dans une matrice autoproduite appelée EPS (*Extra Polymeric Substances*)<sup>5</sup>. Une étude récente menée à l'IUVV (Dijon, France) a décrit le biofilm de *B. bruxellensis* comme une structure mince constituée de différentes morphologies cellulaires, y compris des cellules de levures et des cellules pseudo-filamenteuses incorporées dans une matrice extracellulaire (figure 1)<sup>6</sup>. De plus, la persistance des cellules du biofilm sur les surfaces au cours du temps a été démontrée.

Actuellement, le procédé le plus couramment utilisé pour le nettoyage des cuves consiste à appliquer un mélange de solutions chimiques diluées contenant des détergents alcalins et des solutions acides<sup>7</sup>. Des solutions alternatives efficaces mais plus écologiques, pour lutter contre toutes les formes de survie de *B. bruxellensis*, sont néanmoins recherchées pour réduire l'utilisation de produits chimiques dans l'industrie viticole. Dans ce contexte, nous avons cherché à étudier l'impact de deux méthodes de nettoyage différentes (une solution de soude caustique moussante et de peroxyde à 5 % et une solution d'acide lactique à 5 %) sur des souches de levure *Brettanomyces* développées en biofilm.

## ■ Étude de l'élimination des biofilms de *Brettanomyces bruxellensis*

Cinq souches de *B. bruxellensis* d'origines différentes ont été utilisées (tableau 1) et pour chaque souche, des

biofilms de quatorze jours ont été formés sur des coupons d'acier inoxydable dans un milieu synthétique (milieu *Yeast Extract-Peptone-Dextrose* (YPD)), couramment utilisé pour la culture des levures dans les laboratoires de recherche, afin d'évaluer deux méthodes de nettoyage différentes.

Avant la formation du biofilm, des pré-cultures garantissaient que les cellules étaient dans le même état physiologique, ce qui permettait de comparer avec précision la capacité des différentes souches à former des biofilms. En effet, la cinétique de croissance dépend de la souche, la souche BR17 étant plus lente que les autres souches (tableau 1). En revanche, la souche GS04 est celle qui a connu la croissance la plus rapide. Cependant, la capacité à adhérer et à former un biofilm sur des coupons en acier inoxydable a été confirmée pour toutes les souches étudiées après 14 jours d'incubation avec une population de départ sur le coupon d'environ 106 cellules/cm<sup>2</sup> (figure 2).

**Tableau 1.** Origines et paramètres de croissance des souches de *B. bruxellensis* étudiées.

Souches	Origines	Phase de latence (h)	Temps de génération (h)	Taux de croissance $\mu$ (h <sup>-1</sup> )
S11	Vin de Bourgogne (IUVV, Dijon)	40 ±8.021	11.36 ±4.867	0.097 ±0.042
S14	Vin de Bourgogne (IUVV, Dijon)	27 ±1.732	18.47 ±4.265	0.056 ±0.013
BR17	Vin de la Vallée du Rhône (IR, Orange)	100 ±0.000	29.76 ±4.066	0.034 ±0.005
GS04	Vin de la Vallée du Rhône (IR, Orange)	27 ±0.000	12.15 ±0.156	0.08 ±0.001
GS12	Vin de la Vallée du Rhône (IR, Orange)	29 ±0.000	22.67 ±1.365	0.044 ±0.003

Phase de latence: la période où le nombre de cellules reste relativement constant avant une croissance rapide

Temps de génération: Intervalle de temps permettant le doublement de la population

Taux de croissance: vitesse de multiplication des microorganismes; c'est le nombre de divisions effectuées par unité de temps.

## Effet de la méthode de référence

La méthode cuverie, ou méthode de référence utilisée par la cuverie d'Inter Rhône, consiste à appliquer une solution de soude caustique moussante et de peroxyde à 5 %. Les biofilms ont donc été exposés à cette solution pendant 15 min, et les populations sur les coupons ont été déterminées sur milieu gélosé (population cultivable) et par cytométrie en flux (population viable) à la fin du processus de nettoyage. Aucune cellule restante sur les coupons n'a été détectée après le traitement pour les trois souches S11, GS04 et GS12, ce qui démontre l'efficacité de cette méthode (figure 2A). Toutefois, pour les souches BR17 et S14, certaines cellules viables ont été détectées par cytométrie de flux, révélant ainsi des cellules dans un état viable mais non cultivable (VNC)<sup>3</sup>.

## Effet de l'acide lactique

Pour étudier une procédure alternative de nettoyage du matériel de vinification, une approche écologique a été testée. Les biofilms ont été traités avec une solution d'acide lactique à 5 % pendant 15 minutes, et les populations sur les coupons d'acier inoxydable ont été déterminées comme décrit précédemment. Les résultats montrent une réduction significative de la population de cellules cultivables sur les coupons après le traitement à l'acide lactique pour toutes les souches, à l'exception de la souche GS12 (figure 2B). Toutefois, ce traitement n'a pas éliminé toutes les cellules.

Ces essais démontrent un comportement différent selon la souche et le traitement. La souche GS12 semble être un peu plus tolérante que les autres souches à l'utilisation de l'acide lactique. En revanche, les souches BR17 et S14 semblent être plus tolérantes à la méthode de référence

avec l'induction de l'état VNC, alors que les populations des trois autres souches ont été totalement éliminées. Cet état VNC pourrait expliquer la résistance de ces deux souches à des produits chimiques différents et pourrait être la cause de recontamination d'une année sur l'autre, car les cellules peuvent ressusciter de l'état VNC lorsque les conditions de stress disparaissent.

## Conclusion

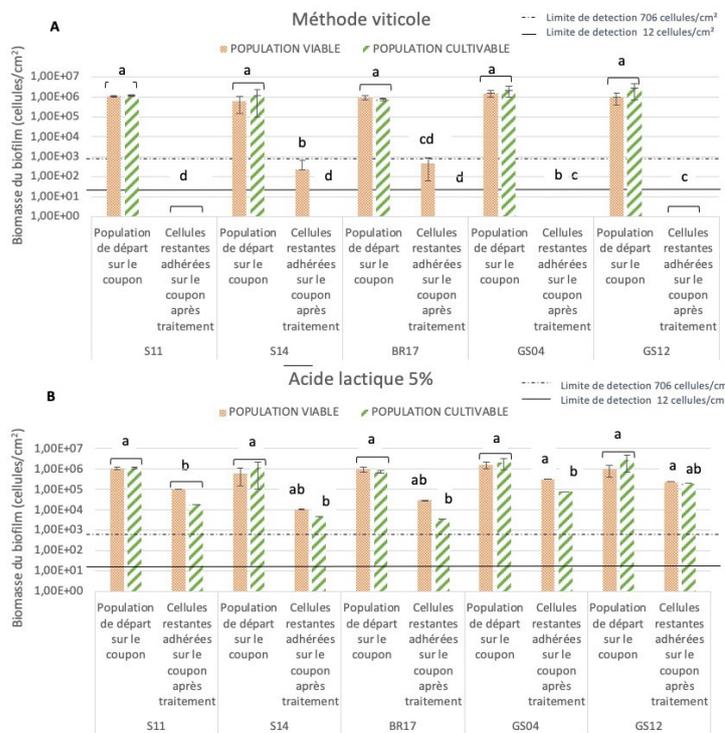
Toutes les souches testées, quelle que soit leur origine, ont pu former des biofilms sur l'acier inoxydable (environ 10<sup>6</sup> cellules/cm<sup>2</sup>) après 14 jours d'incubation dans un milieu YPD. Actuellement, la solution d'acide lactique n'est pas un traitement assez sévère pour éradiquer *B. bruxellensis*, mais c'est une approche prometteuse, qui pourrait être améliorée en augmentant le temps de contact ou la concentration de la solution. La méthode de référence a démontré son efficacité, mais deux souches présentaient des cellules en état VNC après le traitement. Ces résultats montrent que, comme pour le SO<sub>2</sub><sup>2, 3, 4</sup>, le processus de nettoyage représente un stress pour la levure avec une réponse dépendante de la souche. Le développement de méthodes de détection peu coûteuses et fiables, reproductibles au niveau de la souche, pourrait permettre de prévoir et de contrôler la contamination par *B. bruxellensis*. ■

Manon Deluchat<sup>1</sup>, Claire Lhomme<sup>1</sup>, Claudine Degueurce<sup>1</sup>, Virginie Serpaggi<sup>1</sup>, Romain Lacroix<sup>2</sup>, Manon Lebleux<sup>3</sup>, Stéphanie Weidmann<sup>3</sup>, Sandrine Rousseaux<sup>3</sup>

<sup>1</sup> InterRhône, Service technique, 2260 route de grès, 84100 Orange, France

<sup>2</sup> Syndicat des vigneron des Côtes du Rhône, Service technique, 2260 Route de grès, 84100 Orange, France

<sup>3</sup> UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VALMiS (Vin, Aliments, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université Bourgogne Franche-Comté, IUVV, Dijon, France



**Figure 2.** Concentration en cellules viables ou cultivables (cellules/cm<sup>2</sup>) pour les cinq souches de *B. bruxellensis* après l'application de la méthode de nettoyage de référence (A) et le procédé de nettoyage à l'acide lactique à 5 % (B). Le terme "cellules adhérentes" correspond aux cellules liées à la surface du coupon après le traitement. Les différentes lettres représentent une différence significative (valeurs  $p \leq 0,05$ ) entre la population de cellules adhérentes aux coupons. Limite de détection de la technique : 706 cellules/cm<sup>2</sup> (cytomètre : viable ; ligne pointillée), 12 cellules/cm<sup>2</sup> (plaque : cultivable ; ligne complète).

**1** Avramova, M., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., (2018). Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis* sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. *Frontiers in Microbiology*, vol. 9:1260.

**2** Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., and Alexandre, H. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res. Int.* 89(Pt 1), 620–630.

**3** Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., (2012). Characterization of the 'Viable but Nonculturable' (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology*, vol. 30, no. 2, 2012, pp. 438–447.

**4** Tek, E.L., Sundstrom, J.F., Gardner, J.M., Oliver, S.G., Jiranek, V., 2018. Evaluation of the ability of commercial wine yeasts to form biofilms (mats) and adhere to plastic: implications for the microbiota of the winery environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94.

**5** Flemming, H.-C., Wingender, J., (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.

**6** Lebleux, Manon, Abdo, H., Coelho, C., Basmacıyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., 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.

**7** Institut Français du Vin, (2016). Guide de bonnes pratiques d'hygiène filière vins. R36.5, p.66-73.