

UE Techniques d'analyse des moûts et des vins

# Biofilms microbiens et incidence en oenologie

2022 - 2023

Marie-T Château

[marie-therese.chateau@umontpellier.fr](mailto:marie-therese.chateau@umontpellier.fr)  
[marie-therese.chateau@crbm.cnrs.fr](mailto:marie-therese.chateau@crbm.cnrs.fr)

# Définition d'un biofilm

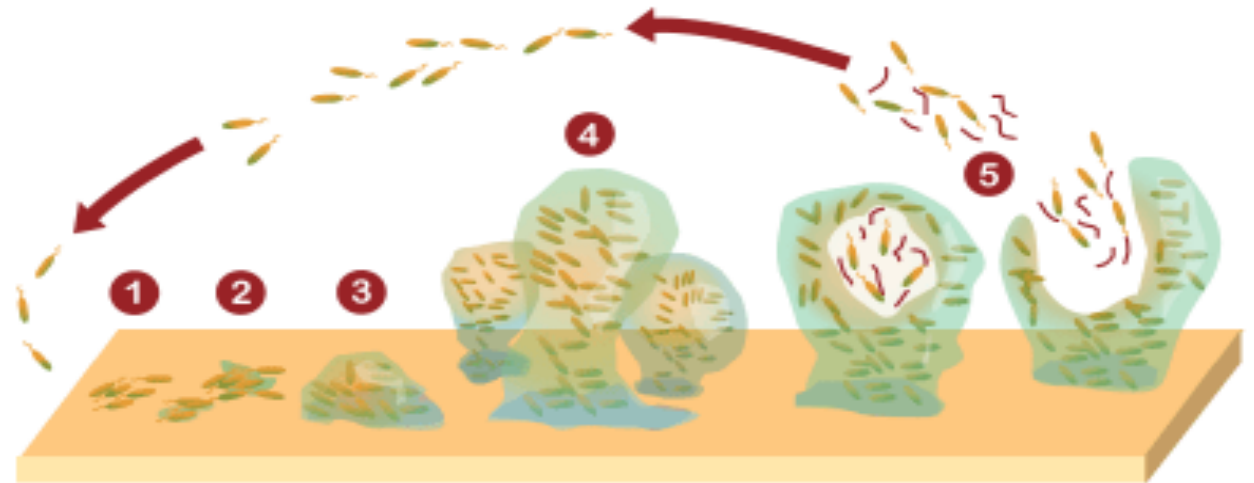
**Communauté**, mono ou **poly-microbienne**, capable de synthétiser une **matrice extracellulaire** responsable de l'**adhérence irréversible** à un support **en milieu aqueux**

L'organisation en **biofilm** assure la **survie de la communauté** qui développe une **stratégie de résistance** vis à vis de l'action des antibiotiques, antifongiques et décontaminants

## Formation d'un biofilm

La colonisation du support est un **processus bio-adhésif non spécifique**  
fonction de **≠ paramètres physico-chimiques** liés à la nature  
du matériau, du micro-organisme et de l'environnement

Le micro-organisme passe ainsi  
de l'état **libre** dit « planctonique »  
à l'état **fixé** dit « sessile »



- 1 : adhérence réversible** des micro-organismes au support
- 2:** début de colonisation de la surface par **agrégation** des micro-organismes
- 3:** sécrétion de **polymères organiques visqueux** rendant la **fixation irréversible**
- 4:** **croissance tridimensionnelle du biofilm** par multiplication *in situ* ou par recrutement
- 5:** extension possible à d'autres surfaces par **détachement de cellules**

# Architecture et équilibre dynamique d'un biofilm

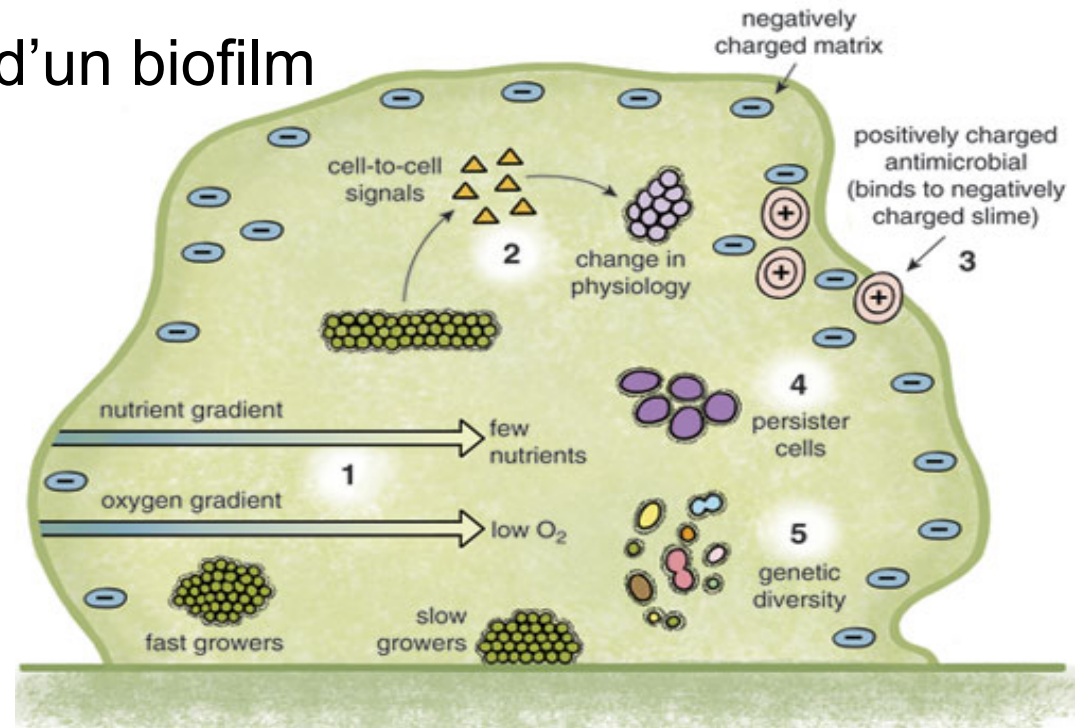
**1:** la **position des micro-organismes**, au sein du biofilm, conditionne leur vitesse de multiplication:

les cellules **centrales à croissance lente** (faible disponibilité de l'O<sub>2</sub> et des nutriments) sont moins sensibles aux antimicrobiens que les cellules **périphériques** à forte croissance. Certaines, appelées cellules **persistantes (4)**, vont entrer en **quiescence** et résister ainsi aux antimicrobiens

**2:** au sein du biofilm, les **cellules communiquent** à l'aide de signaux moléculaires appelés **auto-inducteurs** (peptides, lactones) leur permettant d'évaluer la densité de la population (**quorum sensing**) et d'adapter la réponse aux stress (oxydatif, mécanique, chimique) par **modulation de l'expression génique**

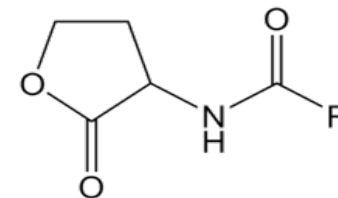
**3:** la **matrice extracellulaire** (polysaccharides, acides nucléiques), **chargée négativement**, **neutralise les antimicrobiens** de charge opposée

**5:** dans un **biofilm polymicrobien**, la diversité génétique et les différences physiologiques assurent la **survie** des espèces



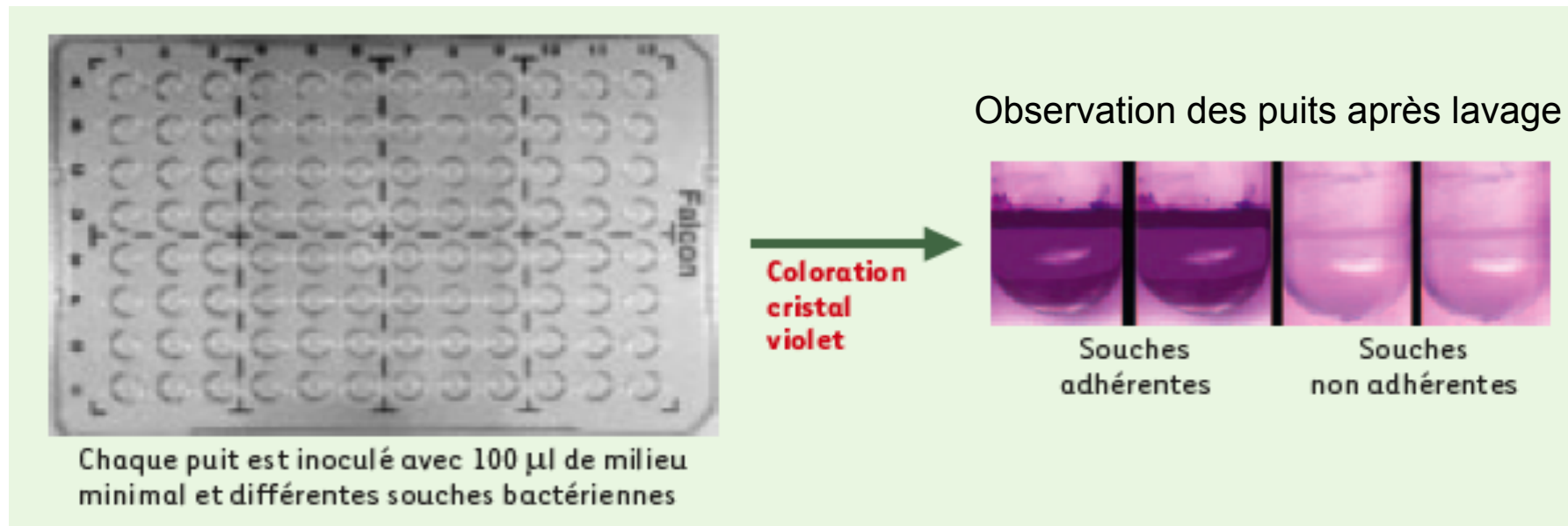
Harrison *et al.* 2005, *American Scientist*, **93**, 508

Acyl homosérine lactone



# Mise en évidence expérimentale de la formation de biofilms

- ◆ technique de coloration au violet de gentiane (ou cristal violet)



incubation: 2h à 24h à 30°C

Filloux et Vallet, 2003 M/S 19 (1) 77

L'organisation des bactéries (souches adhérentes) en biofilms se traduit par la persistance d'un dépôt coloré, après lavage des puits (avec, notamment, présence d'un anneau à l'interface liquide/air)

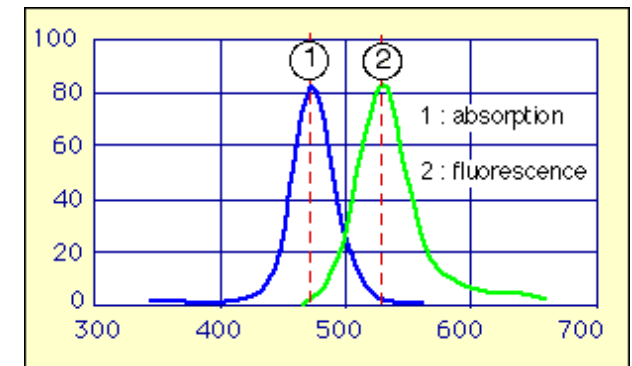
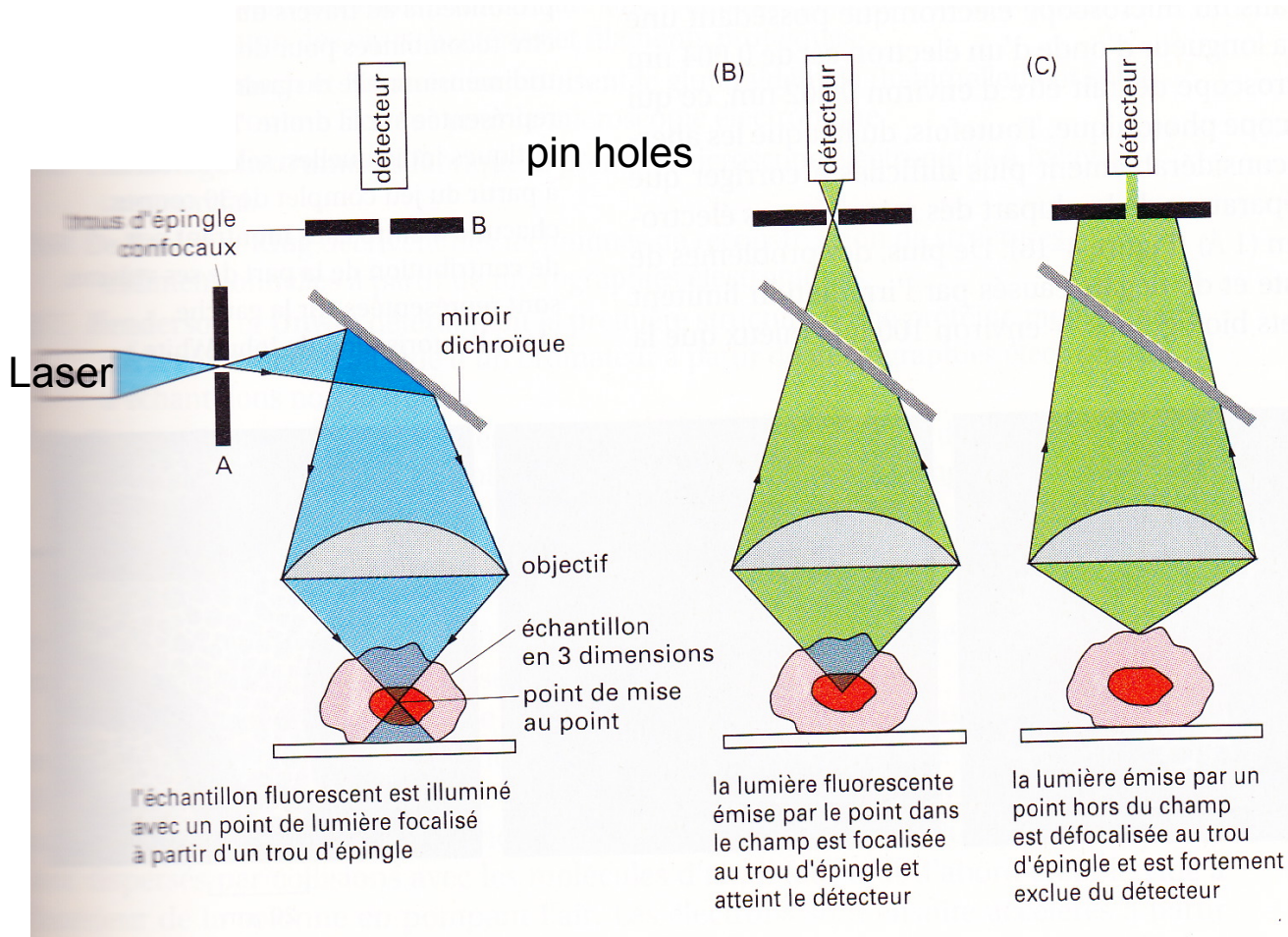
La cinétique de formation des biofilms varie en fonction de l'espèce bactérienne testée (de quelques heures à 24h )

Possibilité de quantification spectro-photométrique (DO 570 nm) du biofilm formé après solubilisation du cristal violet par ajout d'éthanol à 95 %



# ◆ Estimation de l'épaisseur et de la viabilité d'un biofilm par observation en microscopie confocale en présence de fluorochromes

- focalisation du **rayon laser** grâce aux *pin holes* (trous d'épingle confocaux) des filtres d'excitation et d'émission
- axe z
- coupes virtuelles et reconstitution image 3D

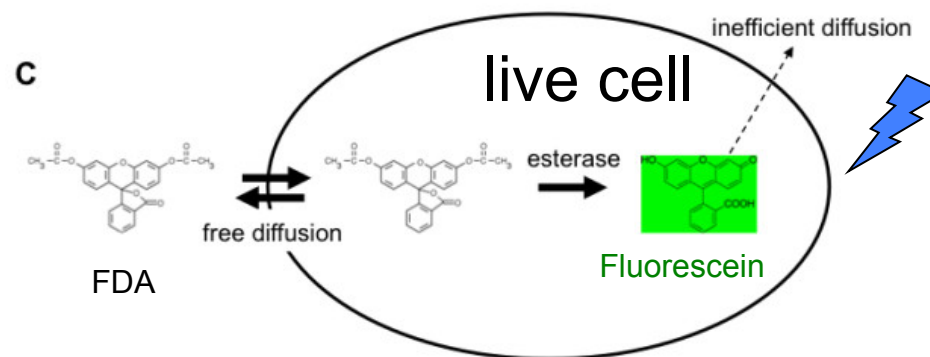
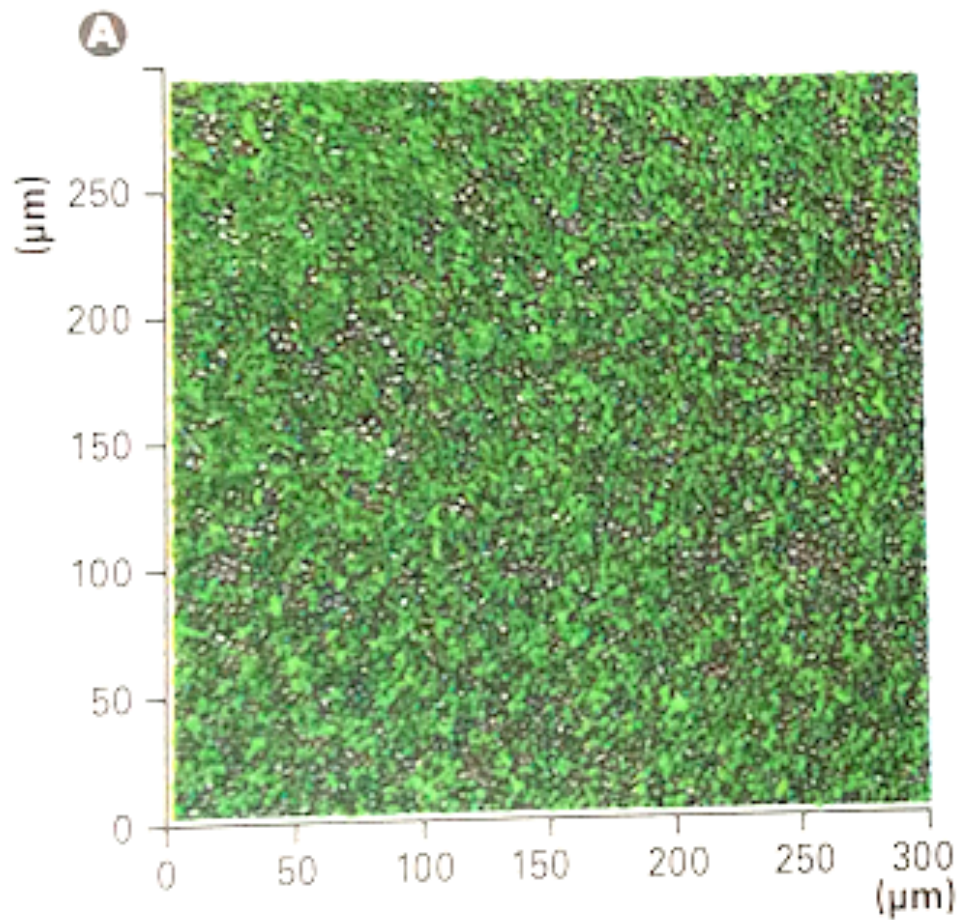


Spectres d'absorption et d'émission du di-acétate de fluorescéine (FDA)

$\lambda_{ex}$  : 488

$\lambda_{em}$  : 520

Fluorochrome utilisé comme colorant vital :  
di-acétate de fluorescéine (FDA)

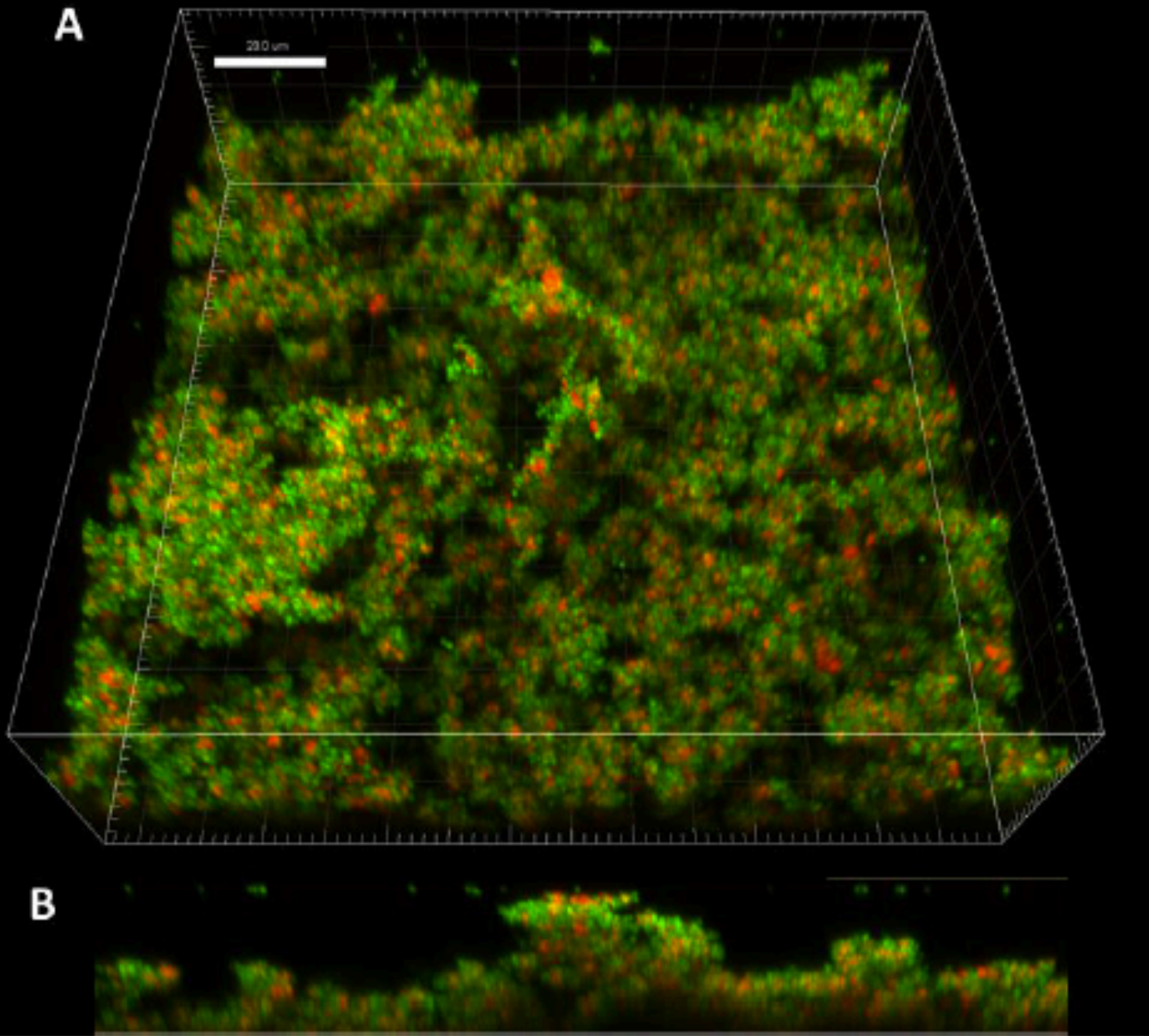


G = x100

G = x1000



Double marquage  
FDA / iodure de propidium



G = x400

◆ technique du « *ring test* »

basée sur l'utilisation de billes magnétiques

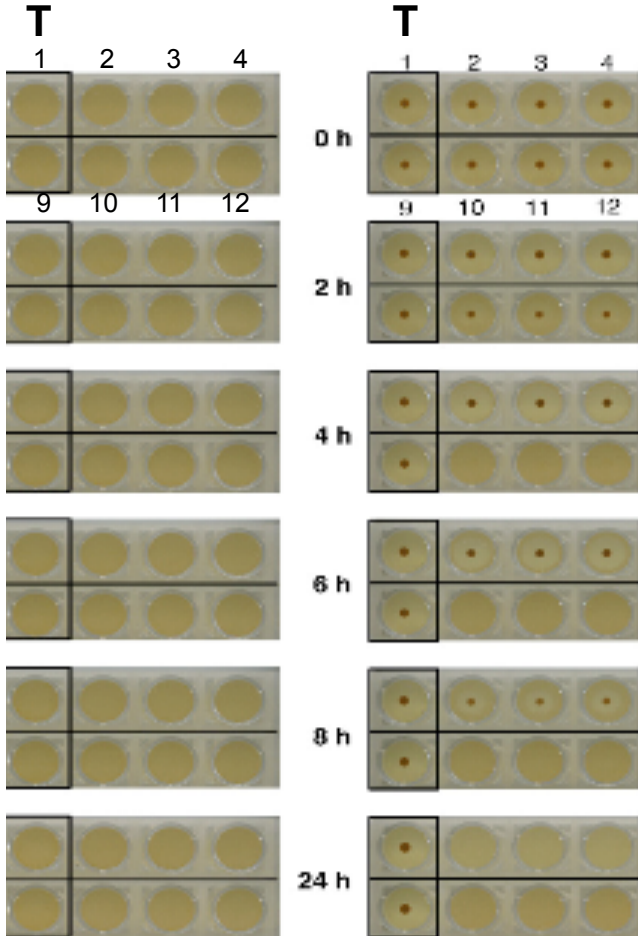
Chavant et al. 2007, *J. Microbiol.Meth.* 68, 605

champ magnétique

-

+

T: absence de bactéries  
(puits 1 et 9)



*L. monocytogenes* (puits 2 à 4)

*Staphylococcus sp.* (puits 10 à 12)

Suivi de la cinétique de formation des biofilms

À chaque temps t, les 8 puits sont placés sur un aimant (avant d'être replacés à 30°C, après homogénéisation des puits)

- en absence de biofilm :

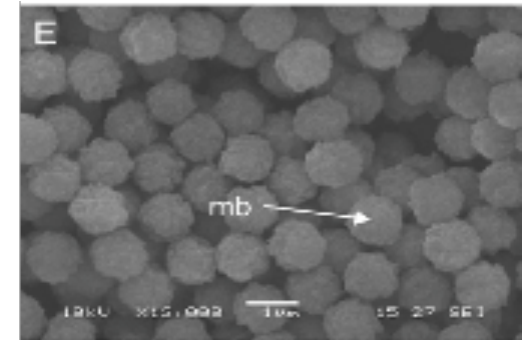
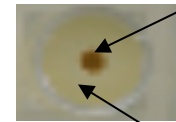
formation d'un anneau marron au centre du puits par aimantation des billes libres de se déplacer

- en présence de biofilm :

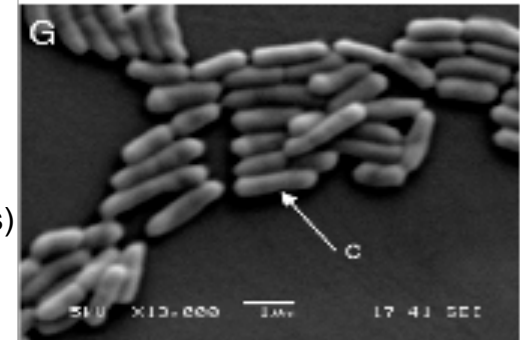
l'anneau ne peut plus se former car les billes sont immobilisées au sein de la matrice extra-cellulaire du biofilm

Biofilms bactériens constitués: la matrice extra-cellulaire engluie les billes magnétiques

*Listeria* t = 4h

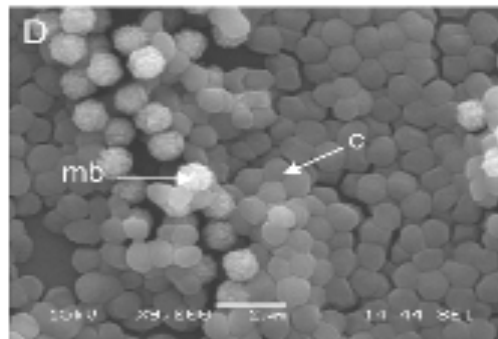


Anneau constitué de billes magnétiques aimantées sous l'action du champ magnétique

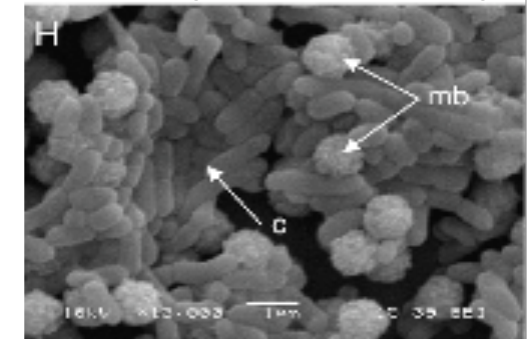


Milieu contenant des agrégats de bactéries (adhérence réversible)

Incubation à 30°C : t = 0 à t = 24h



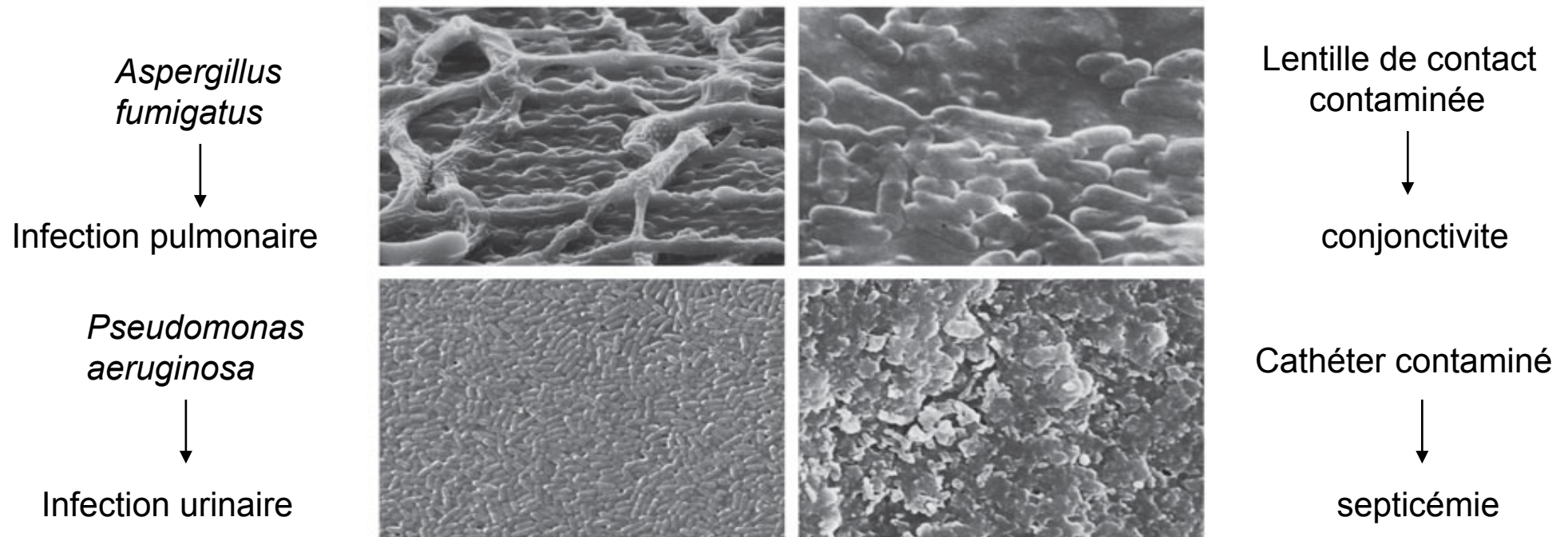
Staphylocoques t = 4h



*Listeria* t = 24h

Applications: **criblage d'antibiotiques ou de décontaminants** capables d'inhiber la formation de biofilms

# Biofilms, santé humaine et ... valorisation du marc de raisin !



Les biofilms sont impliqués dans:

- la majorité des pathologies nosocomiales
- les légionelloses
- les toxi-infections alimentaires
- la formation de la plaque dentaire et des caries

Les **extraits de marc de raisin** (Cabernet franc, Pinot noir) renferment des **polyphénols** capables d'interférer avec la bactérie cariogène *Streptococcus mutans* **sans la tuer, mais en inhibant** :

- la **production de polysaccharides extracellulaires** constitutifs de la plaque dentaire
- l'**acidification du milieu** généré par cette bactérie, qui entrave la croissance des germes banaux

Possibilité d'action sur les autres biofilms ??



# Applications industrielles des biofilms



## ○ Industrie alimentaire et cosmétique:

- fabrication du **vinaigre**: mère = biofilm monomicrobien formé par *Acetobacter europaeus*  
= bactérie acétique sélectionnée pour sa forte résistance à l'éthanol et à l'acide acétique
- fabrication **d'agents de texture et de gélifiants**:  
mise à profit de la capacité des micro-organismes à synthétiser des polysaccharides lors de la formation de biofilms

Actuellement utilisation de 2 polysaccharides d'origine bactérienne: **xanthane et gellane**

mais, constitution d'une **polymérotèque** basée sur la **sélection de bactéries lactiques fortement productrices d'exopolysaccharides**: *Leuconostoc mesenteroides* (dextrane)

## ○ Traitement des eaux usées:

**lits bactériens**: biofilms microbiens fixés sur matériel poreux = systèmes de **biofiltration**

## ○ Méthanisation: biofilms **anaérobies**



# Biofilms et vinification

## I- Micro-organismes impliqués

**Tous les micro-organismes adaptés au vin** peuvent être impliqués, seuls ou en association et plus particulièrement, ceux **responsables de défauts des vins**:

*Brettanomyces*, *Pichia*, *Candida*, les bactéries acétiques, les lactobacilles ainsi que les bactéries lactiques fortement productrices de polysaccharides exocellulaires, telles que:

*Leuconostoc mesenteroides* (dextrane) et *Pediococcus damnosus* (glucane des souches filantes)

La formation de biofilms peut être observée en conditions:

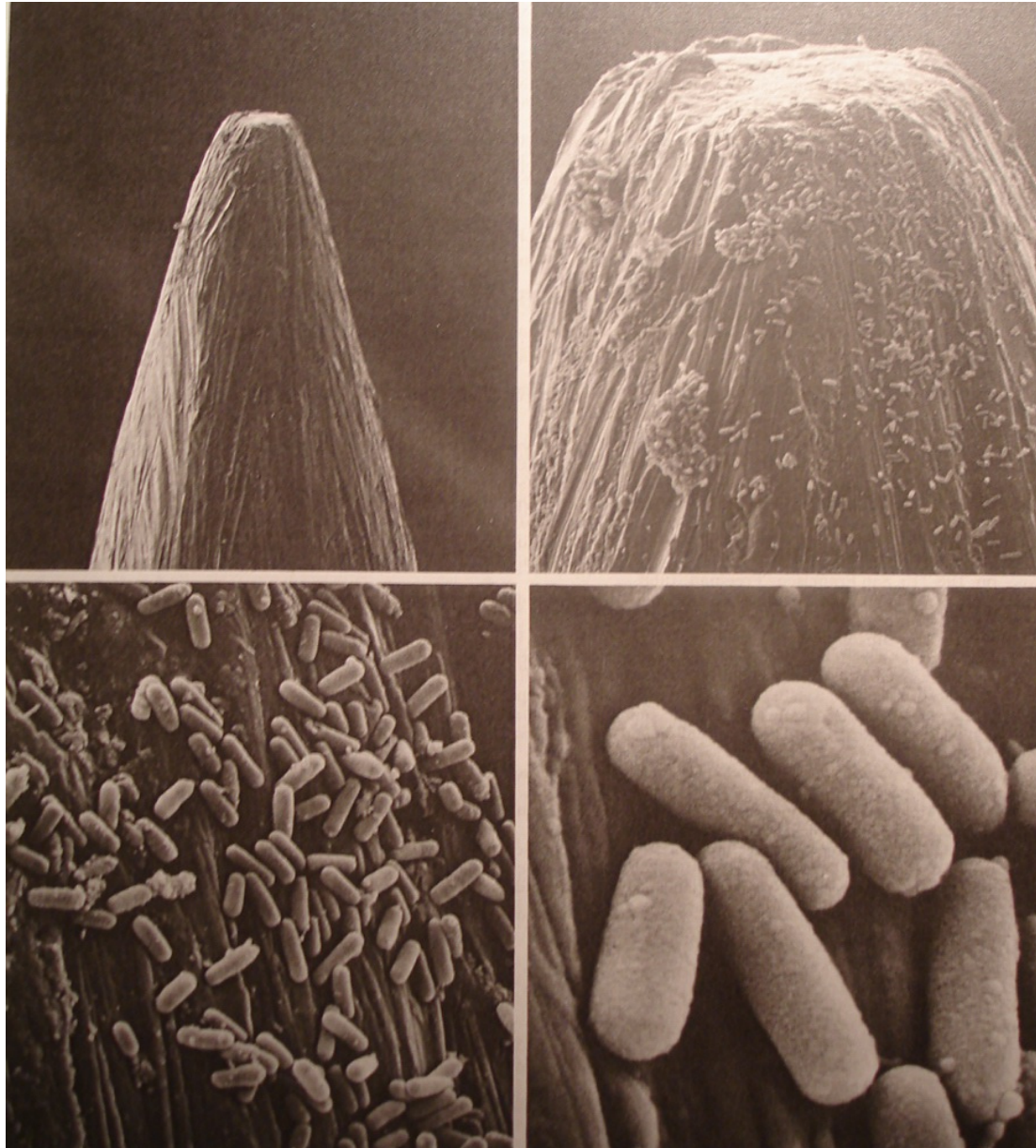
- statiques (cuves de stockage)
- dynamiques (tuyaux)

## II- Facteurs favorisant l'adhérence et la formation de biofilms

- la faible concentration en sucres du vin
- le pH élevé du vin (> 3,8)
- les précipités et le tartre
- l'expression à la **surface du micro-organisme** d'appendices (flagelles, pili) ou de mannoprotéines spécifiques (floculine codée par le gène *flo-11* chez *S. cerevisiae*)
- le support: la **nature du matériau** semble plus importante que sa rugosité:  
adhérence à l'acier inox > verre > PET (polyéthylène téréphtalate) > téflon  
mais adhérence préférentielle des bactéries lactiques au verre

Rq: un matériau qui nous paraît lisse ne l'est pas à l'échelle d'un micro-organisme

(cf: épingle en acier observée en SEM)



Bactéries observées sur la pointe d'une épingle ordinaire, à différents grossissements, en microscopie électronique à balayage

Alberts *et al.*, 1995, *Biologie moléculaire de la cellule*, 3ème ed., Flammarion Médecine-Sciences, Paris



### III- Cas de l'élevage d'un vin sous voile (vins jaunes du Jura, vins de Xérès)

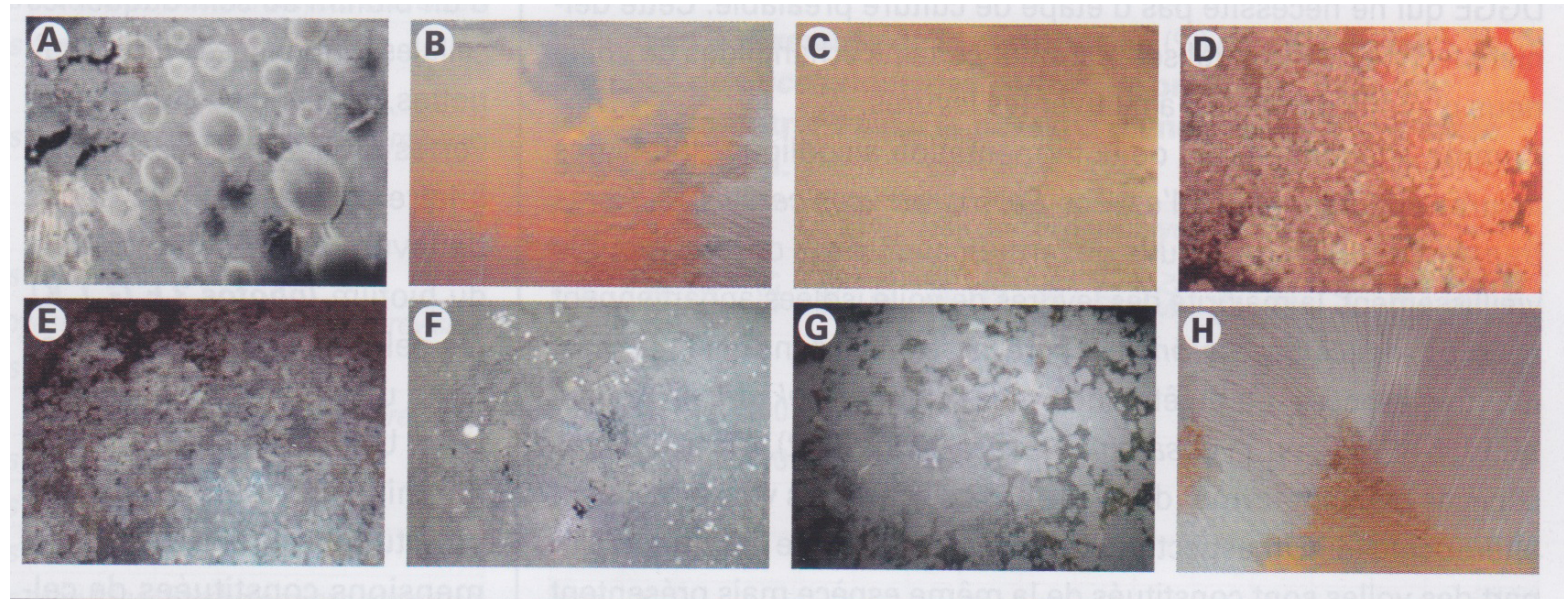
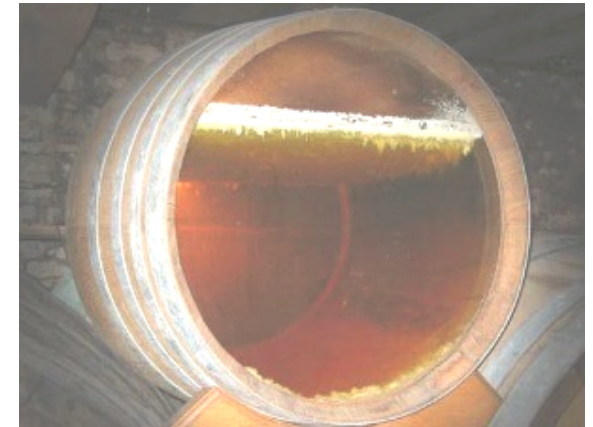
L'élevage sous voile implique

- le transfert du vin, après FA, en fûts **non ouillés**
- la formation d'un **biofilm** à l'**interface air/vin** essentiellement constitué de souches de ***Saccharomyces cerevisiae*** surexprimant le **gène *flo-11*** codant pour la floculine et développant un **métabolisme oxydatif**

Origine des souches: raisin ?, chai ?, ensemencement LSA

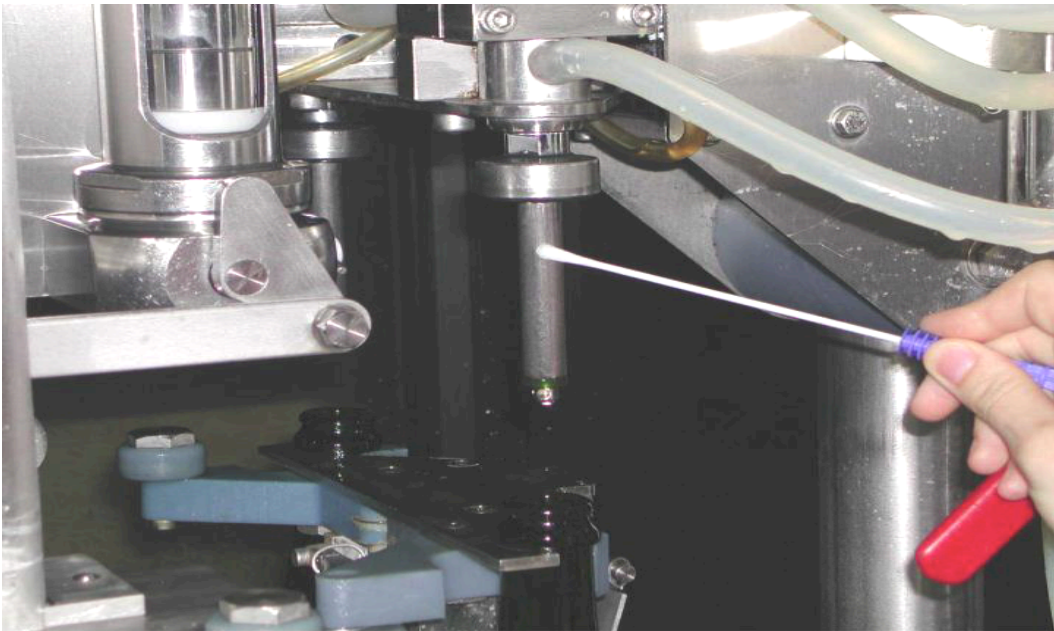
- une durée minimale d'élevage sous voile de **5 ans**

Caractéristiques des voiles: couleur, aspect, épaisseur



## IV- Techniques de détection / quantification / identification de biofilms applicables au matériel de cave

### ◆ Prélèvement par écouvillonnage



Chaînes d'embouteillage, pompes ...



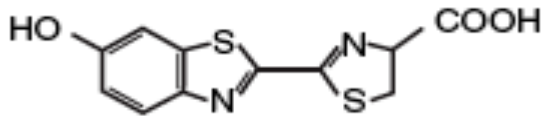
Cuves, évier ...



# ◆ Détection /quantification des cellules viables par ATPmétrie

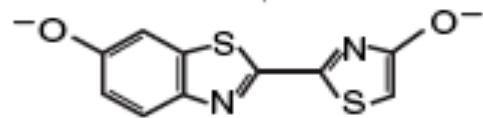
● Rappel : quantification de l'ATP par bio-luminescence

kit BacTiter-Glo Promega

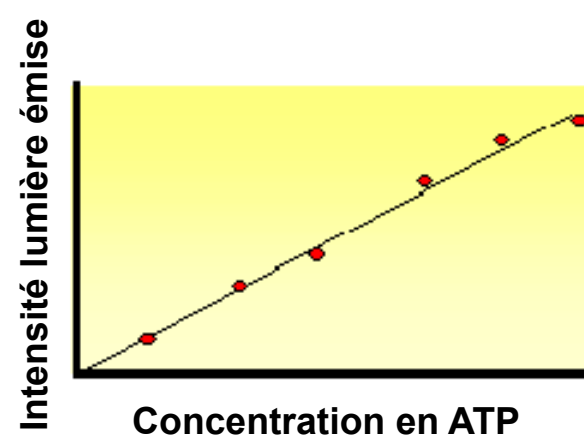
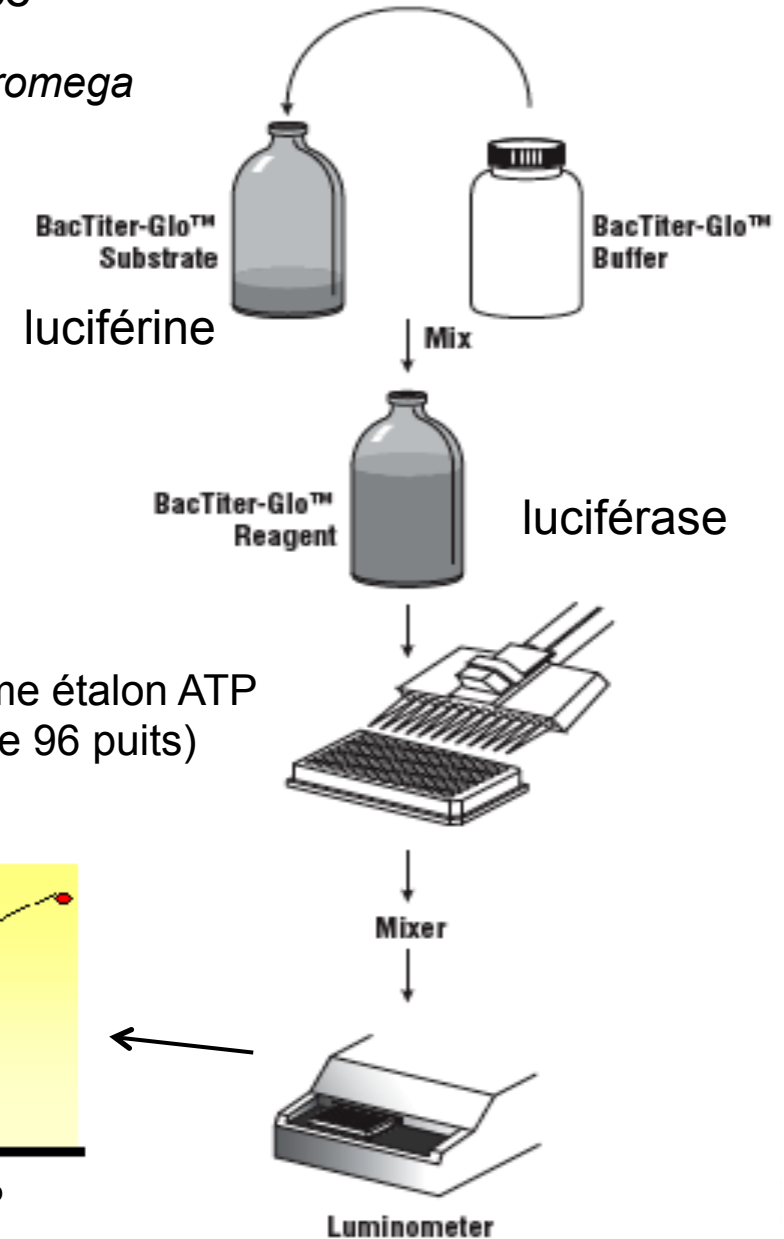


Beetle Luciferin + ATP + O<sub>2</sub>

Recombinant Firefly Luciferase  
Mg<sup>2+</sup>



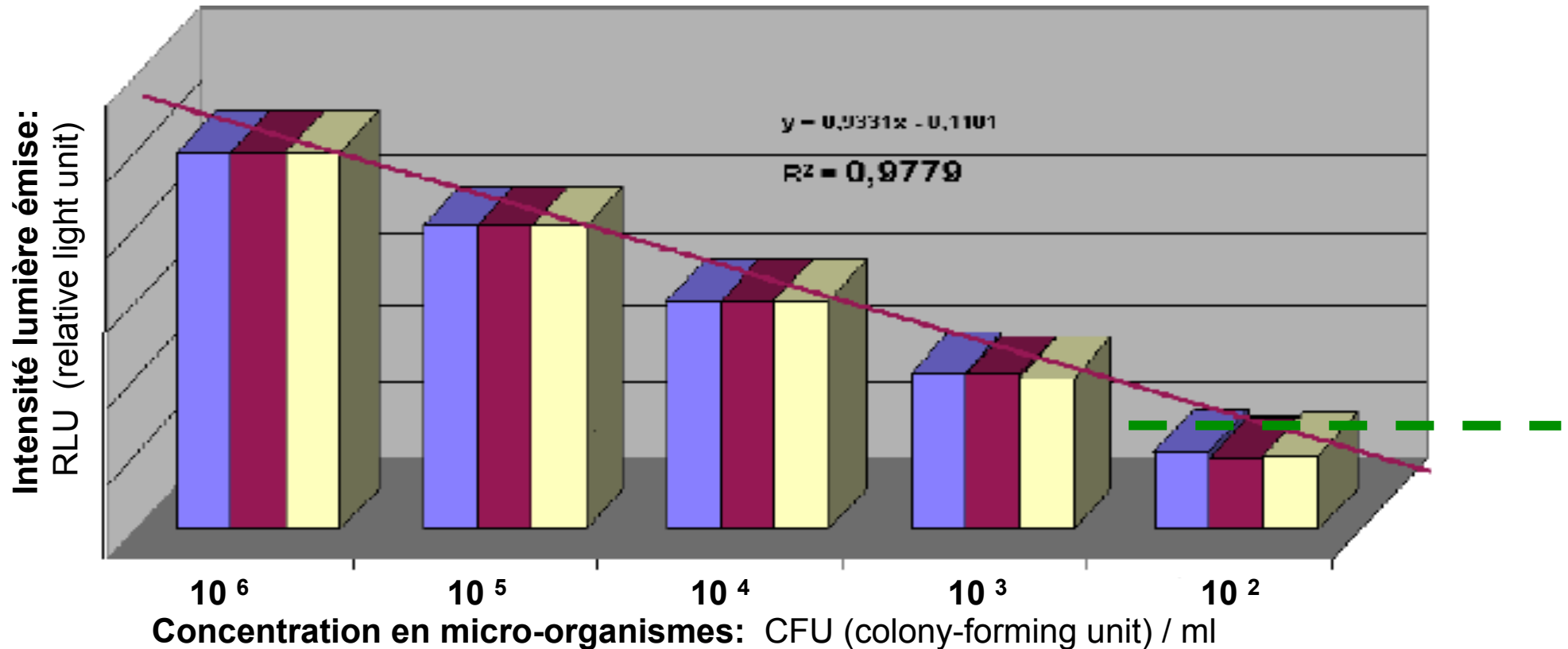
Oxyluciferin + AMP + PP<sub>1</sub> + CO<sub>2</sub> + Light



La **quantité d'ATP** est proportionnelle à l'intensité de la lumière émise

○ la quantification de **micro-organismes viables** par ATPmétrie nécessite :

- un **étalonnage**: gamme de dilution à partir d'une concentration connue d'un micro-organisme test
- la **libération préalable de l'ATP** par lyse des cellules



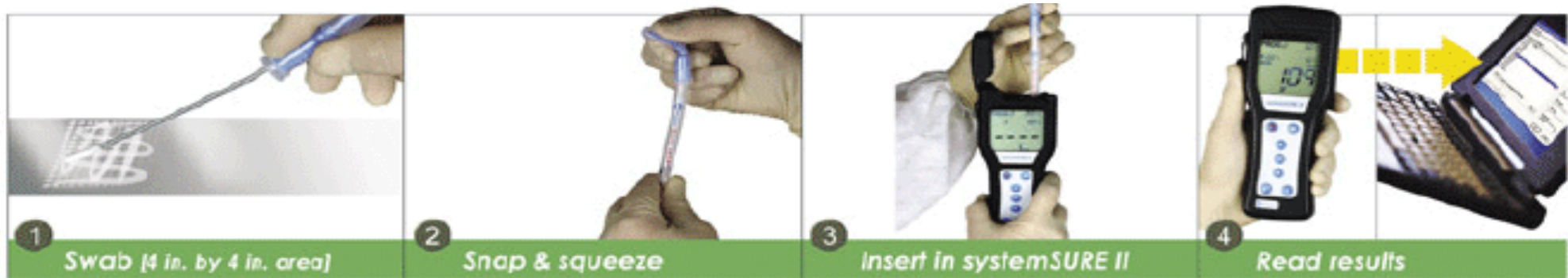
**La quantité d'ATP libéré (intensité de lumière émise)  
est proportionnelle au nombre de micro-organismes viables**

**Seuil de sensibilité: 10<sup>2</sup> CFU / ml**

**Linéarité : de 10<sup>2</sup> à >10<sup>6</sup> CFU / ml**



## ● Analyse quantitative directe



la **quantité d'ATP** (lumière émise) est proportionnelle au nombre de **micro-organismes viables** constitutifs du **biofilm**



luminomètre à main  
pré-étalonné

### Avantages:

- rapidité
- quantification globale de la contamination

### Limites:

- absence de spécificité
- quantité d'ATP variable selon la nature et l'état physiologique des micro-organismes
- seuil de sensibilité:  $10^2$  bactéries

Tube porte-écouvillon  
incluant les réactifs



○ Analyse **qualitative** après **enrichissement de l'échantillon**:

Inclut une étape de **pré-incubation de l'échantillon en bouillon** de culture durant **16 à 24h**

- Bouillon Trypticase Soja (TSB): bactéries
- Bouillon Sabouraud ou YPD (yeast peptone dextrose): levures

**Intérêt :** permet la détection de micro-organismes:

- présents en trop faible quantité pour être quantifiés par technique directe
- revivifiables: germes stressés, quiescents ou **viables non cultivables (VNC)**

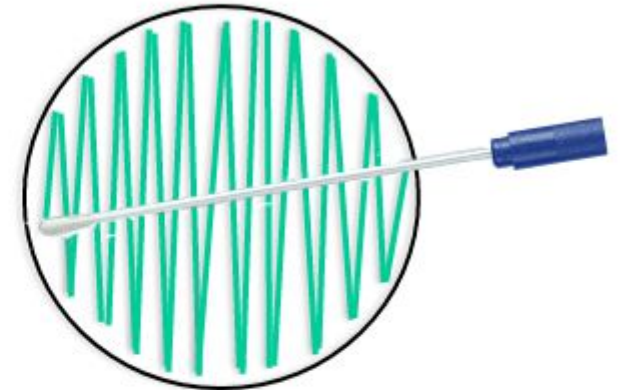
**Limites :**

- non quantitative: réponse de type **présence ou absence**
- lente
- non spécifique

## ◆ Identification des micro-organismes constitutifs d'un biofilm

### ● Identification génétique après isolement des germes sur milieu gélosé

- prélèvement d'un échantillon de biofilm
- mise en culture par technique d'isolement sur milieu gélosé
- incubation à 30/37°C: 48h à une semaine
- examen visuel des colonies obtenues
- identification de chaque type de colonie par PCR classique



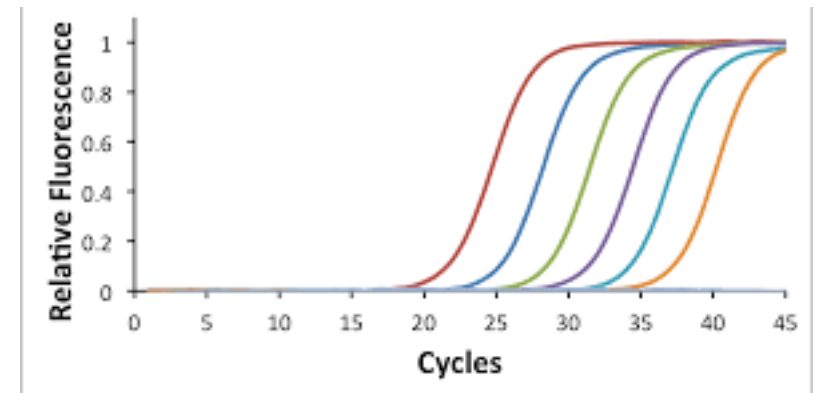
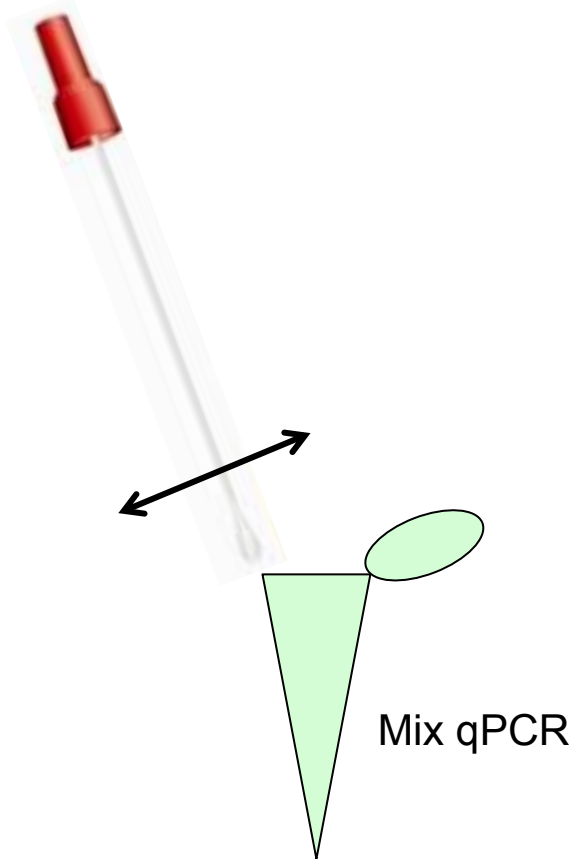
#### **Intérêt:**

- analyse qualitative
- spécificité

#### **Limites:**

- durée surtout si micro-organismes à croissance lente
- ne prend pas en compte les VNC (viables non cultivables)

## ● Quantification directe et identification génétique par PCR quantitative en temps réel



**Intérêt:**

- analyse quantitative
- spécificité
- rapidité
- sensibilité

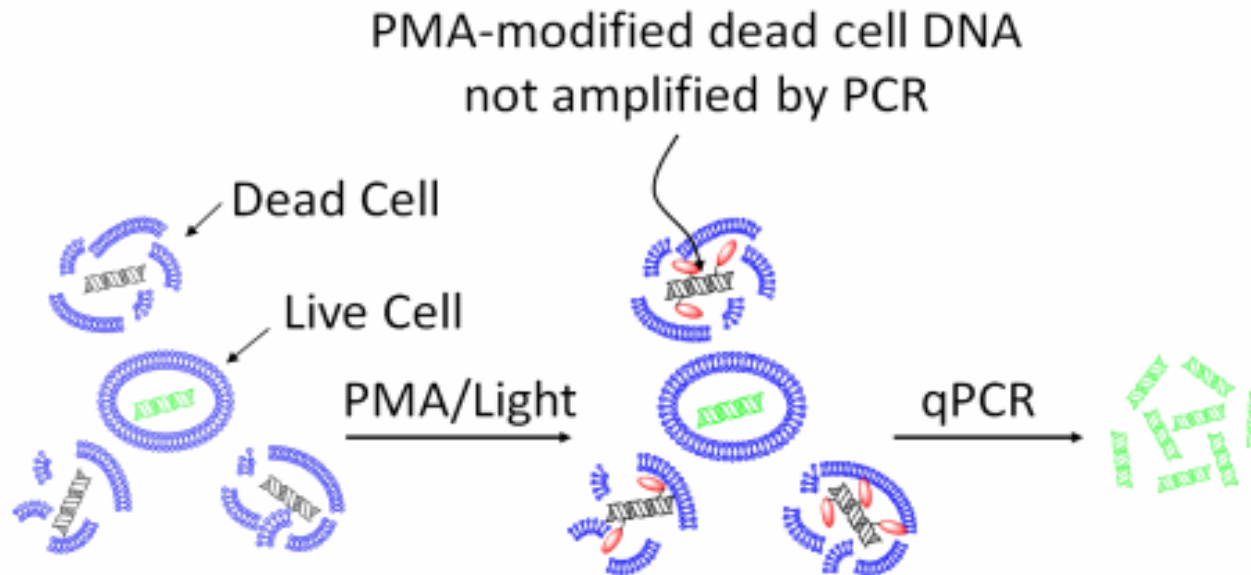
**Limite:** prend en compte les cellules vivantes et mortes  
(sauf si pré-traitement de l'échantillon par le propidium monoazide)

## Possibilité de quantification spécifique des cellules vivantes par qPCR

Le **propidium monoazide** (PMA) ne pénètre que dans les cellules mortes

Le couplage covalent entre l'ADN des cellules mortes et le PMA est induit par **photo-activation**

Seul l'ADN des cellules vivantes reste disponible pour l'amplification par PCR



V- Cas particulier :

mise en évidence de biofilms de *Brettanomyces* dans le bois des barriques

- Prélèvement de copeaux à l'aide d'un *wood seeker*





**- Mise en culture des copeaux en bouillon nutritif de type Sniff'Brett  
enrichi en acides cinnamiques, précurseurs des éthyl-phénols**



**Ensemencement :**  
1g de copeaux

**→ INTERPRETATION :**

NOMBRE DE JOURS NECESSAIRES A L'APPARITION DE L'ODEUR A 30°C (20°C entre parenthèses)	POPULATION DE BRETT DANGEREUX	QUOI FAIRE ?
>10 (>13)	absence dans 20 mL	CONTRÔLE DANS 1 MOIS
10 (12-13)	Très faible (autour de 1/mL)	CONTRÔLE DANS 2 SEMAINES
8 (10-11)	Faible (autour de 10/mL)	CONTRÔLE DANS 1 SEMAINE
6 (8-9)	Moyenne (100 à 1000 / mL)	2 CONTROLES : 1 DE SUITE / 1 DANS 5 JOURS
4 (6)	significative : danger (10 000 à 50 000)	AGIR : FILTRATION OU CENTRIFUGATION OU FLASH-PASTEURISATION PUIS SO2 puis contrôle
2 (4)	forte : gros danger (100 000 à 1 million/mL)	IDEM

**TEST MIS AU POINT ET VALIDE PAR  
L'ECOLE SUPERIEURE DE BIOTECHNOLOGIE DE PORTO ET INTELLI'OENO**

**La concentration en *Brettanomyces* est inversement proportionnelle  
au temps nécessaire à la production des arômes défectueux**

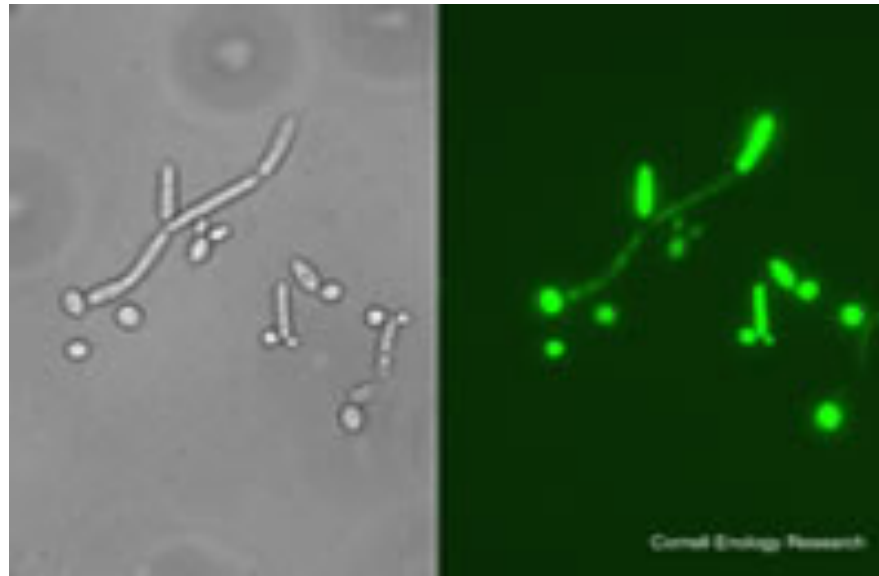
- **Confirmation** de la présence de *Brettanomyces*  
**par observation microscopique** à partir d'un sniff'Brett positif  
en présence d'un **colorant vital** :

**bleu de Méthylène**



lumière visible

**di-acétate de fluorescéine (FDA)**



lumière visible / fond noir



## - Identification génétique par PCR

### / PCR classique

A partir du **Sniff'Brett**

- directement

ou

- après obtention de colonies par étalement sur milieu gélosé sélectif et incubation à 30°C

Milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose)  
+ cycloheximide (ou actidione)  
+ chloramphénicol

Dextrose = D-glucose

### / PCR quantitative

**Directement** à partir des **copeaux broyés**

après lyse des levures / lyticase

Extraction et purification de l'ADN (cf. TP)



**Kit Brett**

## VI- Incidence des biofilms en vinification et mesures d'hygiène

absence d'incidence sanitaire mais conséquence économique possible liée au risque d'altération de la qualité du vin

Les mesures d'hygiène sont essentiellement préventives  
car il est très difficile d'éliminer un biofilm microbien  
par les opérations de nettoyage et désinfection classiques

Décontamination:

(d'après des études effectuées sur des biofilms de *Brettanomyces*)

par ordre décroissant d'efficacité: - **soude caustique**  
- ammoniums quaternaires (Biocidal)  
- détergents alcalins

Les produits à base de chlore (Sanibac) ou de cétones sont peu ou pas efficaces

## Mise au point d'un détergent enzymatique: *BioRem 10* (INRA Lille, 2010)

### Composition:

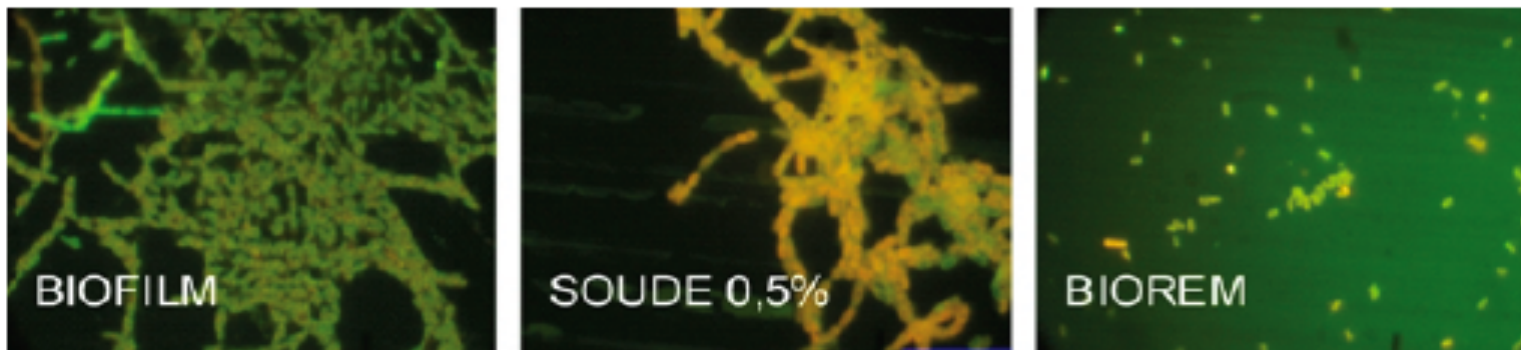
Activités enzymatiques: polysaccharidase et protéase

### Utilisation:

- T = 50°C
- pH = 10

### Avantages:

- efficacité > soude caustique
- biodégradable

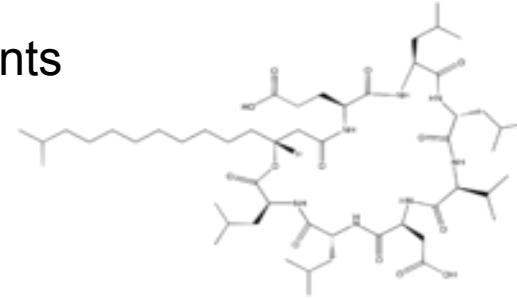


# Autres stratégies de lutte contre les biofilms

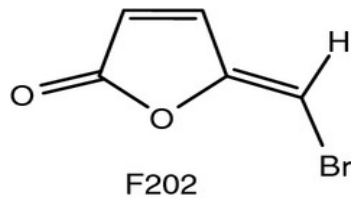
- Inhibition de l'adhérence des micro-organismes aux supports :

traitement des supports par des surfactants

surfactine



- Inhibition du quorum sensing = quorum quenching



par compétition avec des furanones halogénées

= analogues structuraux des auto-inducteurs de type lactone

- Lyse des bactéries constitutives des biofilms

- bactériocines : nisine, mésentéricine

- bactériophages

- rayonnement: UV-c