

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**  
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin  
Unité de recherche EA 4149  
Laboratoire de Recherche en Vigne et Vin

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences de l'alimentation  
Spécialité : Microbiologie

Par  
Virginie SERPAGGI

le 08 Juillet 2011

Etude et caractérisation de l'état « Viable mais Non Cultivable »  
chez *Brettanomyces*, une levure d'altération des vins.  
Nouvel outil de détection et de quantification spécifique de *Brettanomyces* en vin.

Directeur de thèse  
Hervé Alexandre

Co-encadrant  
Fabienne Remize

Jury :

Sam DUKAN, Chargé de recherche  
Francis KARST, Professeur  
Jean-Michel CAPPELIER, HDR  
Jean-Marie PERRIER-CORNET, Professeur  
Laurent BARNAVON, Responsable scientifique  
Vincent GERBAUX, HDR  
Hervé ALEXANDRE, Professeur  
Fabienne REMIZE, HDR

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Invité  
Invité  
Directeur de thèse  
Co-encadrante de thèse

*« Toute certitude est par essence contradictoire  
avec la philosophie de la recherche. »*

*Pierre Joliot*

## **Remerciements**

Je tiens dans un premier temps à remercier l'ensemble des membres du jury pour leur contribution.

Messieurs Sam Dukan et Francis Karst pour avoir accepté la charge de rapporteurs et pour leurs remarques pleines d'importance sur les résultats obtenus lors de ce travail.

Messieurs Jean-Michel Cappelier et Jean-Marie Perrier-Cornet pour avoir apporté leur attention à ces travaux et m'avoir fait partager leurs idées et commentaires.

Messieurs Laurent Barnavon et Vincent Gerbaux pour leur intérêt porté à mes recherches et pour leur aide scientifique et technique lors de nos rencontres au cours de ce projet.

Monsieur Hervé Alexandre, directeur de cette thèse. Je le remercie infiniment de m'avoir proposé ce projet et d'avoir su me guider tout au long de ce travail. Je lui exprime toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Madame Fabienne Remize, co-encadrante, qui malgré son absence physique a su être disponible et pleine de bons conseils pendant ces trois années.

Il me faut également remercier les deux interprofessions du vin, Inter-Rhône et le BIVB, ainsi que la région Bourgogne pour leur soutien financier indispensable à la mise en place de cette thèse.

Je remercie toutes les personnes ayant contribué d'une manière ou d'une autre à ces travaux.

Madame Anabelle Sequeira-Le Grand du plateau technique de cytométrie pour son aide précieuse, sa disponibilité et son soutien aussi bien scientifique qu'amical.

Madame Ghislaine Recorbet pour sa collaboration indispensable aux expériences de protéomique et à la compréhension des résultats obtenus. Ses connaissances et sa gentillesse ont été pour moi un véritable soutien et je l'en remercie énormément.

Madame Aline Bonnotte pour son aide technique concernant les observations MEB et pour sa bonne humeur et sa gentillesse.

J'adresse mes remerciements et ma sympathie à toutes les personnes que j'ai croisées au sein de l'institut Jules Guyot, et qui ont su faire de ce lieu ma deuxième maison, ma deuxième famille.

Merci à tous les doctorants, post-doc et stagiaires avec qui j'ai partagé les joies de la recherche et qui sont tous pour moi des amis. Un merci spécial à Maud, ma stagiaire préférée, que j'ai été ravie d'encadrer et à qui je souhaite un long parcours en recherche.

Un merci particulier à Magali, Mélanie, Céline et Mickaël pour leur amitié essentielle et pour ces pauses déjeuners irremplaçables qui me manquent déjà !

Un merci spécial à Aurélie, Charlie et Maryse pour leur soutien et leur amitié indispensable en cette fin de thèse mouvementée !

Je remercie également les membres de ma famille pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et pour leur amour irremplaçable.

Et merci à mon tant aimé associé du quotidien, qui aura su nous supporter, ma thèse et moi, jour après jour et page après page.

Ces années de thèse ont été pour moi une expérience professionnelle et personnelle extraordinaire. Rien ne pourra effacer ces souvenirs précieux. Et je vous remercie tous d'en faire partie.

## **Liste des abréviations**

**2-DE** : Electrophorèse bidimensionnelle

**4EG** : 4-éthylgaïacol

**4EP** : 4-éthylphénol

**4VG** : 4-éthylgaïacol

**4VP** : 4-éthylphénol

**ACN** : Acétonitrile

**CFU** : Colony forming unit

**FCM** : Flow cytometry

**FDA** : Flourescein diacetate

**FISH** : Fluorescence in situ hybridization

**FSC** : Forward scatter

**GST** : Glutathione S-transférase

**M** : Concentration molaire (mol.L<sup>-1</sup>)

**MALDI-TOF** : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time-of-flight mass spectrometry

**MS** : Mass spectroscopy

**PBS** : Phosphate buffered saline

**PMF** : Peptide mass fingerprints

**PNA** : Peptide nucleic acid

**RAPD-PCR** : Random amplified polymorphism DNA - Polymerase chain reaction

**SEM** : Scanning electron microscopy

**SSC** : Side scatter

**VBNC** : viable but non culturable

**VNC** : Viable non cultivable

**YPD** : Yeast peptone dextrose

## **Sommaire**

Remerciements .....	3
Liste des abréviations .....	4
Sommaire .....	5
Table des illustrations.....	7
Introduction générale.....	9
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>11</b>
1. LA LEVURE BRETTANOMYCES.....	12
1.1. Taxonomie et morphologie .....	12
1.2. Physiologie et métabolisme .....	13
2. LA PROBLEMATIQUE <i>BRETTANOMYCES</i> EN VIN.....	16
2.1. Les déviations organoleptiques entraînées par <i>Brettanomyces</i> .....	16
2.2. Les différents moyens de lutte pour l'élimination de <i>Brettanomyces</i> .....	19
2.3. Les étapes critiques de contamination lors de la vinification .....	21
2.4. Les méthodes de détection et d'identification de <i>Brettanomyces</i> .....	24
3. L'ETAT VIABLE NON CULTIVABLE (VNC) .....	29
3.1. Définition .....	29
3.2. Induction de l'état VNC.....	30
3.3. Modifications physiologiques et morphologiques .....	32
3.4. Modifications transcriptionnelles.....	33
3.5. Virulence.....	34
3.6. Ressuscitation .....	34
3.7. Détection .....	35
3.8. Remise en cause de l'état VNC.....	36
3.9. Description de l'état VNC chez les eucaryotes.....	37
<b>RESULTATS .....</b>	<b>39</b>
CHAPITRE 1 .....	40
MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DETECTION SPECIFIQUE DE <i>BRETTANOMYCES</i> PAR HYBRIDATION <i>IN SITU</i> ET CYTOMETRIE EN FLUX .....	40
Article 1:.....	42
L'hybridation <i>in situ</i> couplée à la cytométrie en flux : une méthode de détection rapide et fiable de <i>Brettanomyces/Dekkera</i> dans les vins. ....	42
CHAPITRE 2 .....	58
ETUDE ET CARACTERISATION DE L'ETAT VIABLE NON CULTIVABLE CHEZ <i>BRETTANOMYCES</i> .....	58
Article 2:.....	59
Characterization of the “Viable but non cuturable” (VBNC) state in the yeast <i>Brettanomyces</i> .....	59

Conclusion et perspectives ..... 87  
Références bibliographiques ..... 91

## **Table des illustrations**

### Synthèse bibliographique

<i>Tableau 1 : Bactéries décrites comme entrant en état VNC (Oliver, 2005) .....</i>	30
<i>Tableau 2 : Conditions d'entrée et de sortie de l'état VNC chez différentes bactéries .....</i>	31
<i>Figure 1 : Brettanomyces bruxellensis en microscopie électronique à balayage .....</i>	13
<i>Figure 2 : Molécules responsables du goût de souris .....</i>	17
<i>Figure 3 : Mécanismes de biosynthèse des éthyl-phénols .....</i>	18
<i>Figure 4 : Etats du dioxyde de soufre dans le vin .....</i>	19
<i>Figure 5 : Schéma représentatif d'un cytomètre en flux .....</i>	28
<i>Figure 6 : Profil d'évolution des populations selon les méthodes de dénombrement .....</i>	30

### Article 1

<i>Tableau 1 : Effet de différents protocoles de perméabilisation effectués avant l'hybridation avec différentes sondes sur le pourcentage de cellules de B. bruxellensis fluorescentes .....</i>	52
<i>Figure 1: Images de microscopie de B. bruxellensis (a,d), S. cerevisiae (b,e), Z. bailii (c,f) après une hybridation in situ avec des sondes spécifiques de l'ARN ribosomique 26S de Brettanomyces et couplées au fluorochrome Alexa Fluor® 488 .....</i>	49
<i>Figure 2 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de B. bruxellensis (A), S. cerevisiae (B) et Z. bailii (C) cultivées en vin synthétique et hybridées avec la sonde 26S-D.bru.5.1 .....</i>	50
<i>Figure 3 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de B. bruxellensis cultivées en vin rouge et hybridées avec la sonde 26S-D.bru.5.1 .....</i>	51
<i>Figure 4 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de S. cerevisiae cultivées en vin rouge, traitées avec Triton X-100 à 40°C avant d'être hybridées avec la sonde 26S-D.bru.5.1 .....</i>	53
<i>Figure 5 : Corrélation entre le log théorique par dilution des cellules de B. bruxellensis cultivées en vin, en fonction du log des cellules de B. bruxellensis hybridées par la sonde 26S-D.bru.5.1 (A) et les sondes 26S-D.bru.1.1 et 26S-D.bru.1.2 (B) et détectées par FCM .....</i>	54

### Article 2

<i>TABLE 1. Proteins present at lower abundance in the VBNC state isolated from a 2-DE gel of total proteins from Brettanomyces.</i>
<i>TABLE 2. Proteins induced in the VBNC state isolated from a 2-DE gel of total proteins from Brettanomyces.</i>

*FIG. 1. Changes in total (●), viable (▪), and culturable (▲) Brettanomyces cells in various conditions.*

*(A) Growth control condition in synthetic wine. (B) Growth in synthetic wine and with the addition of 0.8mg.l<sup>-1</sup> sulfite on day 0. (C) Growth in synthetic wine with the*

addition of  $0.8\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  sulfite on day 0 and sulfite elimination on day 4. The values shown are the means of three independent experiments  $\pm$  standard deviation.

⊗  $0.8\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  molecular  $\text{SO}_2$  addition to  $10^7$  cells. $\text{ml}^{-1}$  in stationary phase.

⊖ molecular  $\text{SO}_2$  removal by pH increase to 4.0.

FIG. 2. Measurement, by granulometry, of *Brettanomyces* cells in the control state, the VBNC state (3 days after sulfite addition), and after exit from the VBNC state (5 days after sulfite elimination). The values presented are the means of three independent experiments  $\pm$  standard deviation.

Group a is significantly different from group b at  $p$ -value  $< 0.05$ .

FIG. 3. Control (A) and VBNC (B) *Brettanomyces* cells observed by SEM.

FIG. 4. 4-ethylguaicol (A) and 4-ethylphenol (B) concentrations ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) for control cells (•), VBNC cells (▪) and cells after VBNC resuscitation (▲).

Group a is significantly different from group b at  $p < 0.001$  for days 3, 7 and 11.

(\*) the values for day 0 differ significantly from those for the following days.

FIG. 5. Intracellular protein profile of *Brettanomyces* cells maintained in the control condition for five days.

Green spots correspond to identified proteins whose quantity is lower in VBNC state.

Red spots correspond to identified proteins whose quantity is higher in VBNC state.

Blue spots correspond to non-identified proteins.

FIG. 6. Intracellular protein profile of *Brettanomyces* cells maintained in sulfite stress for three days.

Green spots correspond to identified proteins whose quantity is lower in VBNC state.

Red spots correspond to identified proteins whose quantity is higher in VBNC state.

Blue spots correspond to non-identified proteins.

## **Introduction générale**

La levure *Brettanomyces* est une levure de contamination, majoritairement rencontrée dans les vins rouges, qui en produisant des phénols volatils à partir de composés naturellement présents dans le raisin, donne au vin des arômes désagréables caractérisés par les termes « sueur de cheval » ou encore « d'écurie » (Chatonnet, *et al.*, 1992). Ces arômes conduisent à des vins dont les qualités organoleptiques sont altérées, entraînant un rejet du consommateur. La simple présence de *Brettanomyces* est associée fortement au risque d'observer une production non maîtrisée de phénols volatils. Ainsi, la détection et l'élimination de cette levure sont essentielles. La problématique de « faux-négatifs » de détection de *Brettanomyces* par les méthodes de microbiologie classique a été posée de plus en plus fréquemment depuis une dizaine d'années. Des erreurs de détection ont été démontrées pour la première fois par Millet *et al.*, en 2000, par l'association de méthodes de détection différentes, par culture des microorganismes et par marquage de viabilité biochimique (Millet & Lonvaud-Funel, 2000). La possibilité d'un état dit de « Viable mais Non Cultivable » (VNC) chez *Brettanomyces* a alors été suggérée. Cet état VNC est en effet connu chez les bactéries depuis 1982 (Xu, *et al.*, 1982), et la possibilité d'entrer dans cet état métabolique particulier après un changement brutal de l'environnement a été démontrée chez de nombreuses espèces bactériennes. L'hypothèse de l'existence d'un état VNC chez les levures a également été suggérée en 2005 par une étude de Divol *et al.*, puis en 2010 par les travaux d'Agnolucci *et al.* (Divol & Lonvaud-Funel, 2005, Agnolucci, *et al.*, 2010). Pourtant, cet état n'a encore jamais été précisément caractérisé chez les levures. Un manque de connaissances sur les conséquences morphologiques, physiologiques et métaboliques qui lui sont associées faisait l'objet de notre constat initial. Il avait été montré que le sulfitage jouait un rôle dans l'entrée des cellules de *Brettanomyces* en VNC, mais les conditions de sorties de cet état, qui est une phase essentielle dans la démonstration de l'existence de cet état métabolique, n'ont jamais été publiées. Au démarrage de ces travaux, les questions posées par la profession étaient multiples :

- Comment un vin apparaissant non contaminé en *Brettanomyces* à l'analyse microbiologique sur milieu gélosé peut-il développer des odeurs désagréables typiques de cette levure de contamination ?
- Comment éviter ce type d'erreur de détection ?
- Certaines pratiques de vinification peuvent-elles favoriser ou au contraire éviter l'état métabolique décrit comme VNC ?
- L'état VNC détecté doit-il conduire à modifier des pratiques de vinification ?

Cette étude répondait à un double objectif. D'une part, la mise au point d'une technique de détection spécifique de *Brettanomyces* était recherchée afin de faciliter les analyses microbiologiques des vins. D'autre part, nous proposons d'étudier précisément l'état VNC de *Brettanomyces*, en déterminant les conditions d'entrée et de sortie de cet état en conditions modèles, ainsi qu'en comparant divers paramètres physiologiques et métaboliques de la levure avant, pendant et après un état VNC.

Une première partie introductive rendra compte des connaissances actuelles sur la levure *Brettanomyces*, sur les techniques de détection existantes et sur l'état VNC chez les procaryotes et chez les eucaryotes.

La seconde partie traitera de la mise au point d'une technique de détection spécifique de *Brettanomyces* directement en vin par Hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux. Cette étude sera présentée sous la forme d'un article.

La troisième partie du manuscrit concernera l'étude et la caractérisation de l'état VNC chez *Brettanomyces*. Un article présentera les résultats obtenus pour cette étude.

Une synthèse critique des résultats et les perspectives proposées pour compléter ce travail clôtureront ce manuscrit.

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. LA LEVURE BRETTANOMYCES

### 1.1. Taxonomie et morphologie

<b>FAMILLE</b>	: <i>Cryptococcaceae</i>
<b>GENRE</b>	: <i>Brettanomyces</i>
<b>ESPECE</b>	: <i>Brettanomyces bruxellensis</i> = forme asexuée (non sporulante) ou imparfaite ou anamorphe <i>Dekkera bruxellensis</i> = forme sexuée (sporulante) ou téléomorphe
<b>DESCRIPTION</b>	: Levure de petite taille, de forme hétérogène Peu exigeante en nutriments, résistante à l'alcool et aux faibles pH

Les levures du genre *Brettanomyces* sont connues depuis 1904 comme impliquées dans la deuxième fermentation des bières (Peynaud & Domercq, 1956), et ont été depuis mises en évidence dans la majorité des boissons fermentées comme la bière, le vin ou le cidre (Chatonnet, *et al.*, 1995); (Hereztyn, 1986); (Larue, *et al.*, 1991).

Le genre *Brettanomyces* est considéré comme la forme imparfaite du genre *Dekkera* appartenant aux ascomycètes. Cinq espèces appartenant au genre *Brettanomyces* sont actuellement reconnues : *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*. Mais dans les vins, les espèces *bruxellensis* et *anomalus* sont les plus rencontrées (Mitrakul, *et al.*, 1999) ; (Rodrigues, *et al.*, 2001) ; (Martorell, *et al.*, 2006). Ces espèces se déclinent en un grand nombre de souches génétiquement différentes.

Le terme générique *Brettanomyces* sera utilisé pour la suite de la rédaction.

La morphologie de ces levures peut changer en fonction des conditions du milieu de culture (Aguilar Uscanga, *et al.*, 2000). Elles peuvent être sphéroïdes, ogivales, cylindriques, ou allongées.

Bien que plus petites que *Saccharomyces*, elles sont facilement visibles au microscope optique. Ces cellules se multiplient par bourgeonnement multipolaire (Van Der Walt, 1970); (Shung-Chang J., *et al.*, 1985) qui laisse des cicatrices de bourgeonnement conduisant à des formes cellulaires typiques. On rencontre parfois même une forme rappelant une petite cuillère (*Figure 1 : Brettanomyces bruxellensis en microscopie électronique à balayage*) (Aguilar Uscanga, *et al.*, 2000); (Medawar, *et al.*, 2003). On peut les trouver sous forme de petites cellules isolées de (2,0-7,0) x (3,5-22,0) µm, en paire ou formant de petites chaînes adoptant parfois même une forme de pseudo-mycélium non septé (Smith & Grinsven, 1984);

(Shung-Chang J., *et al.*, 1985). Ce polymorphisme contribue à rendre difficile leur dépistage et leur identification par simple observation au microscope.

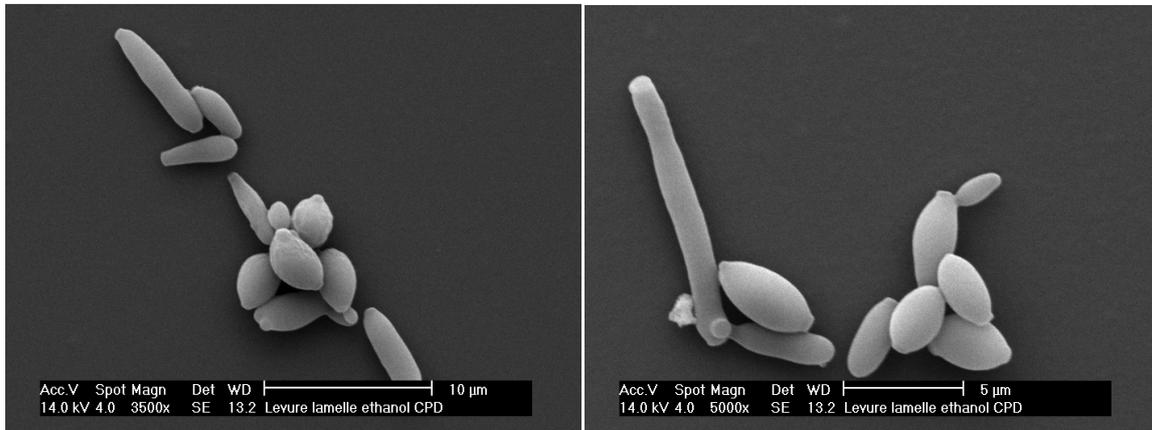


Figure 1 : *Brettanomyces bruxellensis* en microscopie électronique à balayage

Le génome de *Brettanomyces* se compose d'un ADN chromosomique et d'un ADN mitochondrial. Ce génome a une taille de 20 à 30 Mb et environ 3000 gènes putatifs ont été séquencés à ce jour (Woolfit, *et al.*, 2007). Ces données représentent environ 40% du génome de la souche choisie pour son génome de petite taille (19,4 Mb).

Génétiquement, les levures les plus proches de *Brettanomyces* sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* (Woolfit, *et al.*, 2007); (Hellborg & Piskur, 2009).

## 1.2. Physiologie et métabolisme

Dans nos conditions d'étude, la souche utilisée est *Brettanomyces bruxellensis* LO2E2, isolée de vins de Bourgogne par l'ITV de Beaune. Cette souche a une température optimale de croissance en milieu nutritif YPD de 28°C et a un temps de génération d'environ 12h en fonction du milieu de culture utilisé.

### 1.2.1. Sources de carbone

Conterno *et al.*, a montré la capacité de multiples souches de *Brettanomyces* de différentes origines à utiliser le glucose, le galactose et le fructose comme sources carbonées (Conterno, *et al.*, 2006). Cette étude a également montré que certaines souches pouvaient se développer avec comme unique source de carbone l'éthanol, à condition toutefois de le convertir en acide acétique au préalable. Cette capacité de *Brettanomyces* avait également été mise en évidence en 1999 et 2004 par les études de Gilis et Silva *et al.* respectivement (Gilis, 1999) (Silva, *et al.*, 2004).

En plus de cette capacité à utiliser la plupart des hexoses et l'éthanol comme sources carbonées, *Brettanomyces* peut se développer avec seulement 1 g/L de sucre dans le milieu (Silva, *et al.*, 2004).

A l'inverse, même lorsque l'oxygène est disponible en quantité, en présence de fortes teneurs en glucose, *Brettanomyces*, tout comme *Saccharomyces*, adopte un métabolisme fermentaire plutôt que respiratoire. Cet effet est plus souvent décrit comme l'effet Crabtree et ces espèces sont dites Crabtree-positives.

Bien que les levures *Brettanomyces* fermentent les sucres relativement lentement comparé à d'autres levures (Peynaud & Domercq, 1956); (Sponholz, 1997), elles sont capables de fermenter le jus de raisin et former différentes quantités d'éthanol, de 3,5 à 11 %(v/v) d'éthanol, en fonction de la souche utilisée (Tonchev & Bambalov, 1968).

#### 1.2.2. Sources d'azote

Comme pour les autres organismes, l'azote est essentiel pour la multiplication de *Brettanomyces*, mais il peut être apporté à la cellule sous forme inorganique ou organique. L'azote sous sa forme inorganique d'ions ammonium et en très faible quantité peut suffire à la croissance de la levure.

L'extrait de levure apparaît comme l'élément majeur favorisant la croissance, car il apporte de nombreux acides aminés et d'autres formes d'azote organique. Bien que son absence n'empêche pas la croissance de la levure, la concentration maximale de biomasse synthétisée est proportionnelle à l'apport en extrait de levure dans le milieu de culture (Aguilar Uscanga, *et al.*, 2000). Cet ingrédient apporte également les ions magnésium et phosphate qui n'apparaissent toutefois pas comme essentiels pour le développement de *Brettanomyces*. Une faible quantité d'azote apportée par l'extrait de levure est suffisante à la croissance de la levure.

*Brettanomyces* a besoin de très peu d'azote aminé pour son développement (Guilloux-Benatier, *et al.*, 2001), d'autant plus que ces composés sont abondamment présents dans le raisin, donc ne limitent pas la croissance cellulaire.

Les vitamines sont importantes au développement de *Brettanomyces*, comme la biotine et la thiamine qui pourraient lui être indispensables (Conterno, *et al.*, 2006).

Les multiples études réalisées sur les besoins nutritionnels de *Brettanomyces* montrent donc que cette levure peut se développer dans des conditions pauvres en nutriments.

### 1.2.3. Effet de l'oxygène

Comme chez *S.cerevisiae*, l'oxygène stimule la croissance de *Brettanomyces* durant la fermentation alcoolique. La levure peut alors se multiplier quatre fois plus vite qu'en anaérobiose (Gilis, 1999). En effet, en absence d'oxygène, le glucose n'est consommé qu'après une phase de latence longue, avec une vitesse lente (Aguilar Uscanga, 1998); (Ciani, *et al.*, 2003). Dans ces conditions, la production d'acide acétique est très faible (Blondin, *et al.*, 1982). Des travaux plus récents sur l'effet de l'oxygène montrent que la production d'acide acétique par *Brettanomyces* est favorisée par l'augmentation de l'apport d'oxygène (Aguilar Uscanga, *et al.*, 2003).

La diminution de la vitesse de fermentation en absence d'oxygène est aujourd'hui comprise comme en lien direct avec la capacité limitée de ces levures à ré-oxyder leurs cofacteurs (Rodríguez Vaquero, *et al.*, 2007), notamment via la production de glycérol. La fermentation peut être stimulée par l'ajout d'autres composés capables de consommer des protons, comme par exemple de l'acétoïne. Cet effet de l'anaérobiose, nommé effet Custer, correspond à un stress réducteur.

En présence d'oxygène, sur un milieu riche en glucose, il a été observé trois phases de croissances différentes : une première phase durant laquelle *Brettanomyces* consomme le glucose et se multiplie. Elle produit alors de l'éthanol et de l'acide acétique. Lorsque le glucose est totalement consommé, la deuxième phase consiste en une conversion de l'éthanol en acide acétique sans croissance de la levure. Puis la dernière phase est la consommation de l'acide acétique accompagnée d'une reprise de croissance, qui correspond à une phase fermentaire (Wijsman, *et al.*, 1984).

### 1.2.4. Effet de l'éthanol

La tolérance à l'éthanol a été largement étudiée chez plusieurs souches de *Brettanomyces*. Plus de 30 souches différentes et d'origines diverses ont été testées par Conterno *et al.* en 2006 pour une teneur de 10% (v/v) d'éthanol dans un milieu synthétique : toutes les souches ont résisté à cette concentration d'éthanol (Conterno, *et al.*, 2006).

Une autre étude a mis en évidence la résistance d'une trentaine de souches à des teneurs supérieures à 13,5% (v/v) en milieu synthétique et en vin (Barata, *et al.*, 2008).

Même s'il a été montré que le taux de croissance et le rendement en biomasse peuvent être fortement diminués par la présence d'éthanol (Medawar, *et al.*, 2003), la levure *Brettanomyces* présente une tolérance à l'éthanol élevée.

### 1.2.5. Effet du pH

En 1999, Gillis montra que la croissance de *Brettanomyces* était possible en jus de raisin pour des pH compris entre 2,6 et 4,5 (Gillis, 1999). En 2004, Silva *et al.* déterminent un taux de croissance spécifique inchangé entre pH 3,5 et pH 4,5 (Silva, *et al.*, 2004). Enfin, en 2006, l'étude de Conterno *et al.* montre que trente trois souches d'origines diverses peuvent se développer à pH 2,0 (Conterno, *et al.*, 2006).

Ces études convergentes démontrent donc que les pH couramment rencontrés en œnologie sont sans effet sur la multiplication de *Brettanomyces*.

## 2. LA PROBLEMATIQUE *BRETTANOMYCES* EN VIN

Le vin se compose d'un écosystème complexe dans lequel de multiples interactions ont lieu entre les microorganismes. En règle générale, au début de la vinification, les conditions permettent à de nombreuses levures de se développer. Rapidement, du fait de sa croissance rapide et sa résistance à l'éthanol, la levure *Saccharomyces cerevisiae* devient dominante et assure la fermentation alcoolique. A la fin de cette étape, la bactérie lactique *Oenococcus oeni* peut devenir majoritaire et commencer la fermentation malolactique. Cette seconde fermentation va contribuer à la stabilité du vin en épuisant les sources de carbone résiduelles avant l'embouteillage.

Or malgré le développement successif de ces deux microorganismes fermentaires, des microorganismes tels que *Brettanomyces* peuvent parfois s'implanter et entraîner une déviation qualitative du produit (Renouf, *et al.*, 2007). Dans ce contexte, le sulfitage des vins est un procédé largement utilisé pour limiter l'implantation de microorganismes d'altération.

### 2.1. Les déviations organoleptiques entraînées par *Brettanomyces*

#### 2.1.1. Les composés responsables du goût de souris

Le « goût de souris » est une sensation décrite en fin de dégustation et due à des composés peu volatils. Ces composés sont la 2-acétyl-tétrahydropyridine et la 2-acétyl-1-pyrroline, dérivés de l'acide acétique, qui s'oxydent en bouche et qui sont perçus par la voie rétro-nasale (Figure 2 : Molécules responsables du goût de souris) (Arvik & Henick-Kling, 2005). Même si les bactéries lactiques sont les principales responsables de cette production, *Brettanomyces* a la capacité d'en produire dans certaines conditions (Hereztyn, 1986).



- La seconde enzyme (vinyl-phénol réductase) assure la transformation des vinyl-phénols en éthyl-4-phénol (4EP) et éthyl-4-gaïacol (4EG), les phénols volatils (Suarez, *et al.*, 2007); (Tchobanov, *et al.*, 2008).

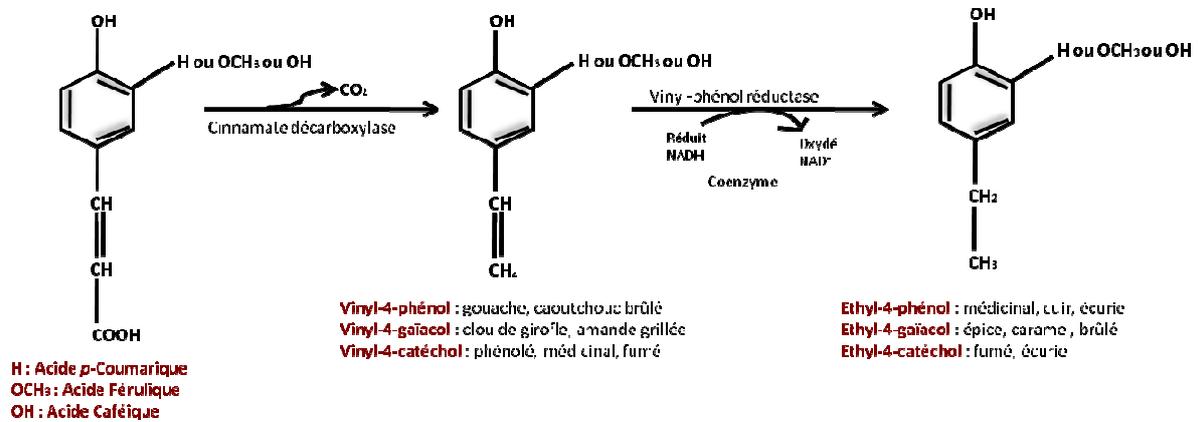


Figure 3 : Mécanismes de biosynthèse des éthyl-phénols

Bien que d'autres levures soient capables de transformer l'acide *para*-coumarique en 4VP, *Brettanomyces* est la seule capable de réduire les VP en 4EP et 4EG (Chatonnet, *et al.*, 1995). D'autres microorganismes comme *Lactobacillus brevis* et *Pediococcus pentosaceus* sont capables de décarboxyler l'acide *para*-coumarique en 4VP (Chatonnet, *et al.*, 1995). *Brettanomyces* peut produire plusieurs milligrammes d'éthyl-phénols par litre de vin, et cette concentration est directement proportionnelle à l'importance de la population de *Brettanomyces* (Chatonnet, *et al.*, 1995). Mais une étude plus récente montre une faible corrélation entre la quantité de 4EP et le nombre de colonies détectées sur boîtes de Pétri, d'où l'hypothèse d'une libération de ces composés par les levures après leur mort et leur lyse (Fugelsang & Zoecklein, 2003). De plus, il a été montré qu'une concentration supérieure à 2mM en acides hydroxycinnamiques pouvait limiter la croissance de *Brettanomyces* (Harris, *et al.*, 2008), et ce d'autant plus que le nombre d'acides hydroxycinnamiques différents est important.

Le seuil de perception des éthyl-phénols est de 425µg/l pour un rapport 4EP/4EG de 10/1 dans un vin rouge. Au-delà de ce seuil, ces substances peuvent être clairement perçues par le consommateur et la qualité aromatique et gustative du vin est affectée. Le caractère phénolé est très marqué à partir de 600µg/l (Chatonnet, *et al.*, 1992); (Romano, *et al.*, 2009). Il reste difficile de déterminer une concentration critique de contamination pour ces composés. En effet, en fonction de l'individu, de la matrice vinaire ou de la souche de *Brettanomyces*, les seuils de concentration détectés en phénols volatils sont très différentes (Suarez, *et al.*, 2007); (Rayne & Eggers, 2008); (Conterno, *et al.*, 2006, Harris, *et al.*, 2009).

C'est pourquoi il est important de limiter la multiplication de *Brettanomyces* avant la production non maîtrisable des différents composés présentés précédemment. Et afin de limiter la production de ces divers composés indésirables, il faut être capable de détecter *Brettanomyces* dans le vin rapidement et spécifiquement.

## 2.2. Les différents moyens de lutte pour l'élimination de *Brettanomyces*

### 2.2.1. Le sulfitage

L'ajout de sulfite aux vins est la méthode la plus souvent utilisée pour limiter le développement des flores de contamination. Le sulfitage est effectué par l'ajout de métabisulfite de potassium ( $K_2S_2O_5$ ) en poudre, ou de solutions de bisulfite d'ammonium ( $NH_4HSO_3$ ) ou de potassium ( $KHSO_3$ ).

Le dioxyde de soufre,  $SO_2$ , ajouté est présent dans le vin sous différentes formes (Figure 4 : *Etats du dioxyde de soufre dans le vin*) :

- le  $SO_2$  combiné qui peut être stable (quand lié à l'éthanal) ou bien labile car possiblement dissociable quand il est lié à d'autres composés du vin.
- le  $SO_2$  libre ( $HSO_3^-$ ) qui contient une part de  $SO_2$  actif ( $H_2SO_3$ ) qui est la seule molécule à présenter des propriétés antiseptiques.

La proportion entre  $SO_2$  libre et  $SO_2$  actif est dépendante du pH, de la température et de la teneur en éthanol du vin.

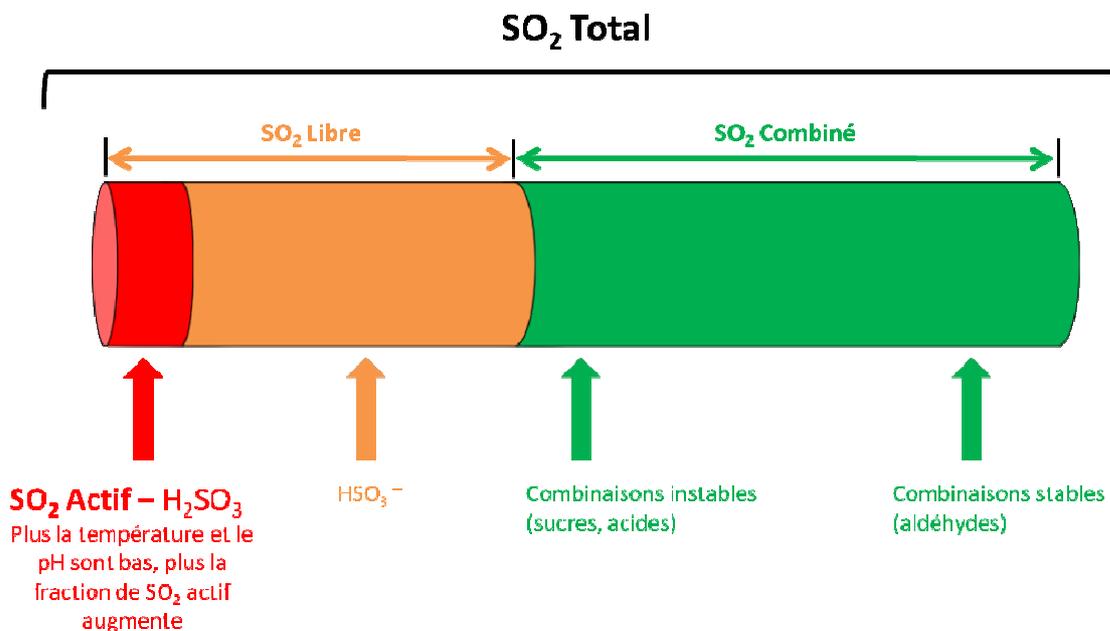


Figure 4 : *Etats du dioxyde de soufre dans le vin*

A dose adéquate, cet agent chimique a un effet létal sur les cellules des microorganismes et permet ainsi un traitement antimicrobien. Cette molécule agit selon différentes voies sur la physiologie cellulaire. Tout d'abord, le SO<sub>2</sub> entre dans la cellule via la membrane et au passage provoque l'inhibition des enzymes membranaires (Garbay et Lonvaud-Funel, 1994) et une altération des fonctions membranaires par une peroxydation lipidique (Anacleto et Van Uden, 1982), mettant en péril l'intégrité membranaire de la cellule. Une fois entré dans la cellule, le SO<sub>2</sub> intracellulaire se combine avec les composés carbonylés essentiels au maintien des fonctions cellulaires : sulfitolyse des ponts disulfures des protéines (Cole 1967), diminution de la synthèse d'ATP (Schimz et Holzer, 1979), altération des acides aminés (Yang 1970).

Pour une élimination efficace de *Brettanomyces*, le sulfitage est une méthode légale simple et très couramment utilisée. Cependant, la détermination de la teneur minimale en SO<sub>2</sub> actif efficace pour éliminer complètement les contaminations en *Brettanomyces* reste complexe. En effet plusieurs études ont été réalisées et proposent des concentrations différentes.

- du Toit *et al.* : 0,25 à 0,35mg/L de SO<sub>2</sub> actif permettent une baisse de la culturabilité et de la viabilité d'une souche de *Brettanomyces*. En revanche, une concentration de 0,8mg/l en SO<sub>2</sub> actif montre une mortalité importante de la levure (du Toit, *et al.*, 2005).

- Conterno *et al.* : 30 mg/L de SO<sub>2</sub> libre (soit 0,8 mg/L de SO<sub>2</sub> actif) ont été testés sur 35 souches de *Brettanomyces*. Près de la moitié des souches ont résisté à cette teneur en SO<sub>2</sub> actif (Conterno, *et al.*, 2006).

- Barata *et al.* : 17 souches de *Brettanomyces* ont été soumises à une concentration de 100 mg/L de métabisulfite de potassium, ce qui correspond à environ 0,70 mg/L de SO<sub>2</sub> actif. Sept souches sont totalement inhibées, dix souches sont partiellement inhibées, et trois souches sont résistantes (Barata, *et al.*, 2008).

Les concentrations de SO<sub>2</sub> actif de 0,7 à 0,8 mg/L apparaissent donc comme critiques, à la limite de causer la mortalité nette des cellules de *Brettanomyces*. Les variations de résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'il s'agit d'essais réalisés dans des conditions différentes. De plus, ces conditions tests sont assez éloignées des conditions réelles rencontrées en cave. Dans les études présentées, les cellules sont adaptées au vin,ensemencées dans un faible volume avec une population élevée, et le sulfitage est réalisé en phase stationnaire de croissance.

### 2.2.2. Les traitements physiques et chimiques

Ces méthodes sont souvent utilisées lorsque la contamination en *Brettanomyces* a déjà été détectée. Il ne s'agit donc plus de méthodes de prévention, mais bien d'élimination afin de limiter l'aggravation de la contamination en limitant la population de microorganismes.

### La flash pasteurisation

En augmentant fortement la température du vin (70 à 75°C) pendant quelques dizaines de secondes, on réduit fortement la population de micro-organismes (Les cahier Itinéraire d'ITV France, Mai 2003).

### La filtration sur membrane

L'utilisation de filtres dont les pores sont inférieurs à 1µm est nécessaire pour une bonne élimination de *Brettanomyces*. Du Toit et al. montre que cette méthode n'est pas totalement efficace pour cette levure de contamination, puisque certaines cellules sont capables de passer au travers des filtres (du Toit, *et al.*, 2005).

## **2.3. Les étapes critiques de contamination lors de la vinification**

De part sa capacité à se développer dans des milieux difficiles et à résister aux conditions environnementales du milieu vin, la levure *Brettanomyces* est une ennemie dont il faut se méfier tout au long de la vinification, des vendanges à la mise en bouteille. Il est donc important de connaître les étapes et points critiques de contamination pour mieux se protéger durant toute l'élaboration des vins.

### *2.3.1. Les vendanges*

Pendant longtemps, la contamination des baies de raisin par *Brettanomyces* n'a pas été mise en évidence, malgré de fortes présomptions de présence, car cette levure est minoritaire, sur des baies où se côtoient des microorganismes très divers ((Prakitchaiwattana, *et al.*, 2004); (Renouf, *et al.*, 2007). La présence de *Brettanomyces* sur baie de raisin n'est reliée ni au vignoble, ni au cépage, ni au millésime (Renouf, *et al.*, 2006). Sa présence semble plutôt dépendante de stress environnementaux (température, soleil, pluie, traitements phytosanitaires) comme pour tous les autres microorganismes. La composition chimique du raisin joue également un rôle important (sucre, acide malique, acide tartrique, pH et azote), même si aucune corrélation entre ces paramètres et la présence de *Brettanomyces* n'a pu être mise en évidence lors d'une étude menée sur plusieurs vignobles et à différents moment de la maturité du raisin (Renouf, *et al.*, 2006).

Pourtant en 1999, Chatonnet *et al.* avait montré un lien entre contamination en *Brettanomyces* et parcelles de vignes proches de rejets vinicoles (Chatonnet, *et al.*, 1999). Mais ce qui est sûr, c'est que les raisins présentant de la pourriture, et notamment celle associée à *Botrytis*, sont souvent contaminés par *Brettanomyces* (Barbin, 2006).

### 2.3.2. Fermentation alcoolique (FA)

Les levures *Brettanomyces* sont rarement détectées au cours de la fermentation alcoolique. C'est une étape dans la vinification qui présente globalement peu de risque. En revanche, c'est à la fin de cette étape que les risques augmentent. En effet, si la fin de la FA s'éternise, *Brettanomyces* peut s'implanter et se développer (Renouf, *et al.*, 2006). La présence de sucres résiduels en fin de FA peut en outre favoriser la croissance de la levure d'altération (Chatonnet, *et al.*, 1995).

### 2.3.3. Période entre la fin de FA et le début de fermentation malolactique (FML)

Après la FA, la levure *S. cerevisiae* meurt et laisse place à *O. oeni* pour la réalisation de la FML. Mais il arrive que la transition entre ces deux microorganismes soit trop longue, laissant alors la possibilité à *Brettanomyces* de s'installer dans le milieu grâce à ses capacités de résistance aux conditions difficiles comme la forte teneur en éthanol ou encore la pauvreté en nutriments (Renouf, *et al.*, 2008); (Aguilar Uscanga, *et al.*, 2000). L'étude de Murat et Gindreau montre une relation forte entre la durée de la période de latence avant FML et la contamination des vins en *Brettanomyces*. Il est donc conseillé d'accélérer le déclenchement de la FML pour éviter une contamination en *Brettanomyces* (Murat M.L. & Gindreau, 2006).

### 2.3.4. Elevage du vin

Il est important de noter que même un vin ayant subi une FA et une FML normales peut subir un développement de *Brettanomyces*. En effet, il a été montré qu'un vin parfaitement stérile (filtré), sans aucun résidus de sucres, permet quand même à *Brettanomyces* de se développer (Chatonnet, *et al.*, 1992).

#### *Elevage en fut de chêne*

Cette méthode d'élevage présente bon nombre de risques concernant le développement de *Brettanomyces*.

Le premier point est l'échange d'oxygène entre l'extérieur et le vin (Vivas & Glories, 1993), notamment pour l'utilisation de barriques neuves. Cet apport d'oxygène entraîne une diminution de l'efficacité du sulfitage et une stimulation de la croissance de *Brettanomyces*. De plus, le bois neuf libère davantage d'oses, facilement assimilable par la levure (del Alamo, *et al.*, 2000).

L'utilisation de barriques usagées diminue le risque d'échange d'oxygène puisque les pores sont souvent obstrués par l'élevage des vins précédents (Lonvaud-Funel & Renouf, 2005). Cependant, ces barriques peuvent être déjà contaminées par *Brettanomyces* car difficiles à

nettoyer entre deux élevages (Chatonnet & Dubourdiou, 1999), d'autant plus que la levure peut se nicher à une profondeur de 8 mm dans le bois (Suarez, *et al.*, 2007).

#### *Apport d'oxygène ponctuel*

En plus d'avoir lieu directement au niveau du bois de la barrique, l'échange d'oxygène se produit également au niveau de la bonde. Différentes positions de la bonde ont été testées, mais aucune ne permet une limitation suffisante de l'échange (Chatonnet, *et al.*, 1992).

Le soutirage est également une étape critique, car elle apporte beaucoup d'oxygène dans le vin, ce qui stimule la croissance de la levure. Le risque de contamination par transfert est également accru lors du soutirage (Gilis, 1999); (Renouf, *et al.*, 2007).

La microoxygénation et l'utilisation d'un cliqueur (appareil permettant un apport ponctuel d'oxygène dans la cuve) peuvent présenter des points critiques quant à la croissance de *Brettanomyces*. En effet, une étude menée en cuves (Gilis, 1999) a montré que l'oxygénation ponctuelle mais massive pouvait accélérer la croissance de *Brettanomyces* contrairement à une microoxygénation continue.

#### *Température*

La diffusion de l'oxygène à travers le bois de la barrique augmente lorsque les températures s'élèvent, notamment lors de la période chaude de l'année. Cette augmentation de diffusion peut diminuer l'effet du sulfitage dans la barrique, et donc favoriser le développement de *Brettanomyces*.

De plus, les températures supérieures à 20°C favorisent la croissance des levures *Brettanomyces* (Chatonnet, *et al.*, 1993, Arvik & Henick-Kling, 2005).

#### *2.3.5. Préparation à la mise en bouteille*

Les points sensibles de la chaîne d'embouteillage sont principalement le bec de la tireuse, la cloche, la cuve et les tuyaux (Ruyskensvelde J.P., *et al.*, 2006).

La population microbienne totale avant embouteillage est généralement de  $10^3$  à  $10^4$  UFC/ml. Les principales espèces retrouvées sont : *Acetobacter aceti*, *S. cerevisiae*, *O. oeni*, *Pediococcus parvulus* et *B. bruxellensis* (Renouf, *et al.*, 2007).

Bien que les conditions au sein de la bouteille soient hostiles au développement des microorganismes (microaérobie, pH bas, teneur élevée en éthanol, très faibles concentrations en éléments nutritifs), on retrouve des bactéries et des levures vivantes même après des dizaines d'années (Renouf, *et al.*, 2007). Et parmi ces microorganismes, on

y retrouve fréquemment *Brettanomyces*, grâce à sa capacité à résister aux milieux difficiles comme le vin.

#### **2.4. Les méthodes de détection et d'identification de *Brettanomyces***

Pour maîtriser le risque d'altération des vins dû à *Brettanomyces*, un premier objectif est de se munir d'outils permettant une évaluation de la contamination afin d'agir le plus rapidement possible et d'éviter la détérioration du vin. Pourtant, l'ensemble des méthodes décrites au début de cette thèse dans la bibliographie ne sont pas forcément adaptées aux réalités techniques de la production de vins.

##### *2.4.1. Méthodes d'identification*

En ce qui concerne les méthodes d'identification, le but est de différencier les *Brettanomyces* des autres levures pour effectuer des études de diversité. Ces méthodes ont des inconvénients, elles nécessitent pour la plupart l'isolement de souches pures, par des étapes successives de culture, qui nécessitent souvent plus de 10 jours. De plus, ces méthodes ne sont pas quantitatives.

##### Profils d'acides gras

Parmi ces méthodes, on compte tout d'abord l'identification par le profil d'acides gras. *Brettanomyces* peut être identifiée grâce à une base de données de profil d'acides gras cellulaires de différentes levures déterminés par Chromatographie en Phase Gazeuse (Rozès, *et al.*, 1992). Néanmoins, le matériel nécessaire à cette méthode n'est pas adapté à une vulgarisation de la méthode, et les résultats sont dépendants des conditions de culture puisque la composition en acides gras membranaires varie en fonction des conditions environnementales.

##### Galleries d'identification

Il existe ensuite des galleries d'identification qui se présentent sous forme de kits se composant de micro-puits dans lesquels divers substrats sont présents. Le microorganisme à identifier est incubé dans ces différents puits et les résultats (croissance ou non, en fonction du substrat) sont comparés à une base de données qui permet l'identification de l'espèce. Mais cette technique a quelques inconvénients, le microorganisme devant être isolé avant l'incubation, les résultats ne sont disponibles qu'après 8 à 10 jours au moins. De plus cette méthode n'offre qu'une spécificité approximative.

### Méthodes moléculaires

Depuis une vingtaine d'années, les méthodes moléculaires se mettent au service de la détection des microorganismes dans des milieux complexes. Ainsi la PCR (Polymerase Chain Reaction) permet une détection extrêmement précise et assez rapide d'un microorganisme et même d'une souche en particulier, ceci même dans un milieu complexe et à population faible et diverse. Cette méthode est basée sur la détection d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

De nombreuses techniques moléculaires utilisant la PCR ont été développées pour la détection de *Brettanomyces* dans le but de réduire le temps nécessaire à son identification.

Stender (Stender, *et al.*, 2001) a développé des peptides d'acides nucléiques qui sont complémentaires à une séquence cible unique sur l'ARNr 26S de *Brettanomyces*, ceci couplé à une méthode d'hybridation fluorescente *in situ*.

Mitrakul (Mitrakul, *et al.*, 1999) a montré que la RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) peut permettre l'identification de *Brettanomyces* au niveau de l'espèce et de la souche.

Puis on trouve également la technique de LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) mise en place par Notomi (Notomi, *et al.*, 2000) et appliquée sur *Brettanomyces* en 2007 (Hayashi, *et al.*, 2007), en utilisant les régions ITS de l'ADNr de *Brettanomyces*.

En 2006, Miot-Sertier et Lonvaud-Funel mettent en place la méthode de REA-PFGE (restriction enzyme analysis and pulse field gel electrophoresis) pour discriminer 9 souches de *B. bruxellensis* (Miot-Sertier & Lonvaud-Funel, 2007). En 2007, une étude a été menée sur 244 souches de *Dekkera bruxellensis* isolées à partir de vins rouges fabriqués dans 31 caves Australiennes différentes (Curtin, *et al.*, 2007). La méthode utilisée a été l'AFLP (amplified fragment length polymorphism) et a permis de montrer que trois génotypes étaient majoritaires dans les vins Australiens. Une autre étude de la biodiversité de *Brettanomyces* a montré un haut niveau de polymorphisme sur des souches isolées d'une petite région géographique d'Italie (Agnolucci, *et al.*, 2009), grâce à l'utilisation des méthodes de RAPD et d'analyse par restriction des ADN mitochondriaux.

Toutes ces évolutions ont permis d'améliorer la PCR classique, de gagner en spécificité, en efficacité et en précision et les méthodes précédentes offrent un niveau de discrimination élevé. En revanche, elles sont uniquement qualitatives, et ne sont pas spécifiquement développées pour une utilisation directement sur vin. Enfin, encore peu (ou pas) de laboratoires d'analyses sont formés à ces techniques et ne peuvent assurer ces analyses en routine qui sont souvent pour la plupart trop lourdes à mettre en place pour une identification rapide de *Brettanomyces*.

#### 2.4.2. Méthodes de détection et de numération

Des méthodes ont été spécifiquement développées pour permettre de détecter et éventuellement de quantifier *Brettanomyces* dans le vin. Pour pouvoir faire une numération, la rapidité, la sensibilité des limites de détection basses et la fiabilité de la méthode sont recherchées.

##### Suivi des phénols volatils

Le suivi de la formation des phénols volatils peut dénoncer la présence de *Brettanomyces* (Dominguez, *et al.*, 2002). Or, cette méthode ne permet pas de déterminer si cette apparition est proportionnelle à la quantité de levure présente (Medawar, *et al.*, 2003) et la notion de seuil critique est difficile à mettre en place puisque la présence de phénols volatils n'est pas toujours synonyme d'altération aromatique du vin.

##### Milieus sélectifs

Pour détecter spécifiquement une espèce, il est possible d'utiliser différents milieux de culture (solides ou liquides) qui déterminent une caractéristique physiologique de l'espèce recherchée. Pour *Brettanomyces*, les critères les plus souvent retenus sont : l'acidification en aérobiose, la synthèse d'éthyl-phénol, l'assimilation de différentes sources de carbone comme l'éthanol, et surtout la résistance à l'actidione (cycloheximide).

Ces cultures présentent l'avantage d'être quantitatives. Mais ce type de détection sélectif manque de spécificité. De plus, le temps nécessaire pour obtenir les résultats est souvent trop long pour permettre une réaction efficace en cas de contamination puisqu'il faut compter un délai supérieur à 7 jours.

##### Méthodes moléculaires

Les critères des méthodes moléculaires en font des méthodes à la fois rapides, sensibles et fiables.

Les méthodes moléculaires comme le marquage spécifique de l'ADN et la PCR quantitative offrent une grande spécificité mais présentent des désavantages. La technique de PNA FISH (Fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes) est très spécifique puisqu'elle permet le marquage de l'ADNr 26S de *Brettanomyces* par fluorescence. Il s'agit d'utiliser des polymères de bases nucléiques reliées par des liaisons peptidiques comme sonde puisqu'ils sont marqués en leur extrémité N-terminale par une carboxyfluorescéine. Ces peptides fluorescents entrent facilement dans les cellules car ils ne sont pas chargés contrairement aux acides nucléiques. Etant complémentaires de la région variable D1-D2 de l'ADN ribosomal 26S de *Brettanomyces*, les PNA-FISH s'y fixent et rendent ainsi les cellules fluorescentes et donc facilement détectables par microscopie à épifluorescence. Bien que très efficace et sensible, cette méthode est onéreuse et longue à mettre en place (Stender, *et al.*, 2001).

La PCR quantitative, est une méthode plus simple à appliquer, spécifique et rapide, mais qui nécessite une formation du personnel technique (Phister & Mills, 2003) ; (Delaherche, *et al.*, 2004) ; (Tessonnière, *et al.*, 2009). Basée uniquement sur l'ADN, cette méthode détecte les *Brettanomyces* qu'elles soient vivantes ou non. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un agent fluorescent qui se fixe à l'ADN. Au cours des premiers cycles, l'augmentation de la fluorescence suit une cinétique exponentielle. Le cycle qui correspond à un dépassement du seuil de détection de la fluorescence est utilisé, à l'aide d'une relation de proportionnalité, pour calculer la quantité de matrice initiale.

La difficulté au développement d'une méthode de PCR Quantitative ou d'hybridation de sondes PNA-FISH robuste et fiable est due à la nécessité d'un rendement d'extraction d'ADN à partir du vin qui soit constant. De plus, l'ADN doit être de pureté suffisante pour que le rendement de la réaction PCR ne soit pas affecté.

#### Cytométrie de flux

La méthode de marquage et de numération par cytométrie de flux est une méthode simple et rapide, mais elle n'est pas spécifique de *Brettanomyces*.

La cytométrie de flux (*Figure 5 : Schéma représentatif d'un cytomètre en flux*) est une méthode qui permet de différencier et de dénombrer des cellules en mesurant simultanément plusieurs caractéristiques de la cellule lorsque celle-ci passe devant le laser :

- La diffusion de la lumière incidente
- L'émission de la fluorescence

En général, deux capteurs sont utilisés pour le comptage des cellules :

- FSC (forward scatter) qui caractérise la taille des particules
- FL1 qui caractérise l'intensité de la fluorescence émise à une longueur d'onde donnée.

Un cytomètre se compose de trois systèmes différents:

- Un système fluide : flux laminaire permettant aux cellules en suspension de passer une à une devant le laser ;
- Un système optique : rayon laser et différents filtres permettant de sélectionner les longueurs d'ondes appropriées ;
- Un système électronique : un tube photomultiplicateur capte la lumière émise, le digitaliseur la transforme en signal électrique puis en signal numérique et finalement l'ordinateur gère et enregistre les données.

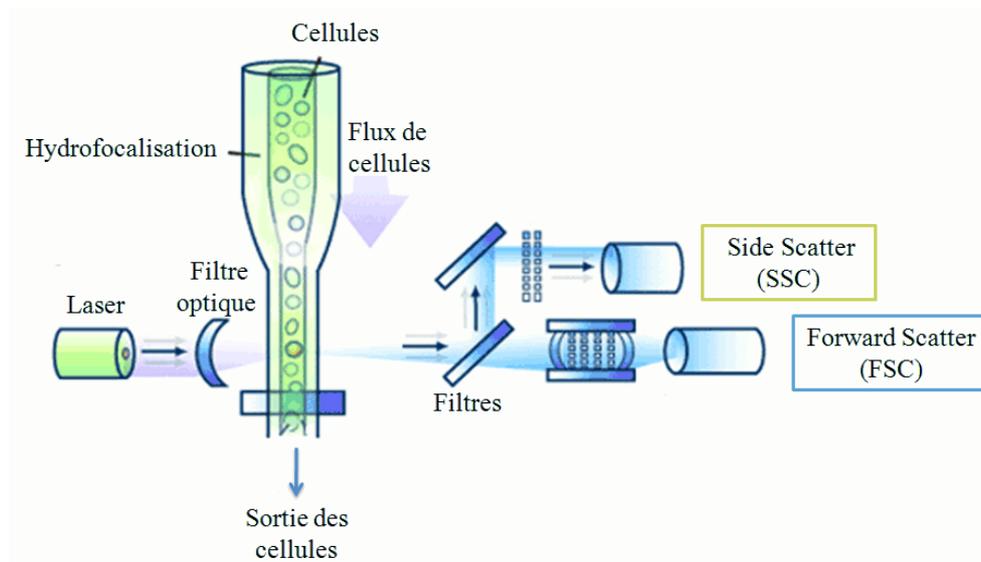


Figure 5 : Schéma représentatif d'un cytomètre en flux

La représentation fondamentale des données de cytométrie est sous forme de diagramme de dispersion qui permet de représenter l'aspect de la population des cellules. Cette technique permet une analyse multiparamétrique des cellules, et peut être utilisée avec divers marqueurs (ADN, viabilité, potentiel de membrane, sondes spécifiques...).

La méthode de numération par cytométrie en flux nécessite que le bruit de fond lié à la présence de particules interférentes dans l'échantillon soit minimisé. Pour les produits liquides, la filtration permet d'éliminer ces particules.

La cytométrie en flux est utilisée dans le contrôle qualité des produits fermentés (Gunasekera, *et al.*, 2000), de la bière (Kobayashi, *et al.*, 2007), du moût (Bouix, *et al.*, 1999) et du cidre (Herrero, *et al.*, 2006). Des essais pour contrôler les fermentations des vins ont également été menés (Malacrinò, *et al.*, 2001), (Chaney, *et al.*, 2006), (Farthing, *et al.*, 2007), (Rodriguez & Thornton, 2008).

### 3. L'ÉTAT VIABLE NON CULTIVABLE (VNC)

#### 3.1. Définition

L'état dit « Viable mais Non Cultivable » (VNC) a été proposé pour la première fois en 1982, par le laboratoire de Rita Colwell de l'université du Maryland. Cette équipe montra que des cellules de *Escherichia coli* et de *Vibrio cholerae* étaient toujours vivantes bien qu'incapables de se multiplier sur un milieu gélosé (Xu, *et al.*, 1982).

Il a été décrit que pour être considérée comme viables, des cellules de levure devaient conserver une intégrité membranaire, une activité enzymatique, et la capacité à avoir une activité métabolique (Lloyd et Hayes, 1995 ; Guillou *et al.*, 2003 ; Boyd *et al.*, 2003). Et en général, les cellules viables sont capables de former des colonies sur milieux gélosés. Et lorsqu'elles perdent cette capacité, elles sont alors usuellement considérées comme mortes. Cet état métabolique particulier dit VNC décrit des cellules toujours actives métaboliquement, mais dans l'incapacité de se multiplier, notamment sur les milieux gélosés qui permettent leur quantification habituellement. Cet état métabolique a été proposé comme une stratégie des cellules pour résister aux conditions environnementales difficiles (Oliver, 1993), notamment pour les bactéries ne formant pas de spores, qui n'ont pas de système de survie assuré par les endospores. Il est important de noter que pour dire d'une cellule qu'elle est en état VNC, il faut que celle-ci soit capable de redevenir cultivable si les conditions environnementales s'améliorent : il s'agit de la « ressuscitation » ou réanimation.

Depuis la première étude (Xu, *et al.*, 1982), le nombre d'espèces de bactéries déterminées comme capables d'entrer dans cet état particulier n'a cessé d'augmenter (Colwell, 2000); (Oliver, 2000) On retrouve dans cette longue liste aussi bien des bactéries à Gram-positif qu'à Gram-négatif (Tableau 1: *Bactéries décrites comme entrant en état VNC (Oliver, 2005)*), et notamment des pathogènes comme *Campylobacter*, *Listeria*, *Helicobacter*, *Pseudomonas Mycobacterium*, *Legionella* et *Salmonella* (Oliver, 2005).

Techniquement, une population entrant en état VNC à cause d'un stress environnemental se conceptualise de la façon suivante : 1- une population cultivable qui chute, jusqu'à devenir indétectable par les méthodes de culture traditionnelle (milieu gélosé, même non sélectif), 2- une population viable qui se stabilise, révélant donc une faible mortalité, 3- une population totale qui reste stable au cours du temps, indiquant bien que les cellules ne meurent pas puisque la lyse cellulaire entraînerait une diminution du nombre de cellules intègres (Figure 6 : *Profil d'évolution des populations selon les méthodes de dénombrement*. Une observation microscopique de cellules en VNC montre bien que les cellules conservent leur intégrité.

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteria</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>V. campbelli</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. fisheri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1 et 2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	
<i>K. planticola</i>	<i>S. typhimurium</i>	

Tableau 1: Bactéries décrites comme entrant en état VNC (Oliver, 2005)

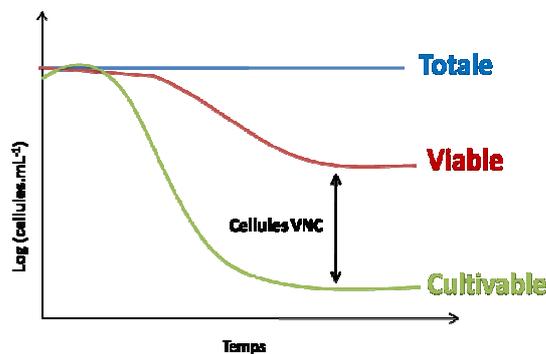


Figure 6 : Profil d'évolution des populations selon les méthodes de dénombrement

### 3.2. Induction de l'état VNC

Différents stress environnementaux peuvent provoquer l'entrée des bactéries en état VNC : la carence nutritionnelle (Cook & Bolster, 2007), les températures extrêmes (Besnard, *et al.*, 2002); (Maalej, *et al.*, 2004); (Wong & Wang, 2004), des modifications de la pression osmotique (Asakura, *et al.*, Chiu, *et al.*, 2008), des modifications de la concentration en oxygène (Kana, *et al.*, 2008), la plupart des conservateurs alimentaires (Cunningham, *et al.*, 2009); (Quiros, *et al.*, 2009), et l'exposition à la lumière (Gourmelon, *et al.*, 1994) (Tableau 2 : Conditions d'entrée et de sortie de l'état VNC chez différentes **bactéries**). Dans des conditions peu favorables, les cellules peuvent entrer en état VNC et survivre avec une

activité métabolique limitée sans se multiplier. De nombreuses modifications ont donc vraisemblablement lieu au sein des cellules pour leur permettre de survivre dans cet état.

Organisme	Conditions d'entrée en état VNC	Conditions de resuscitation	Référence
<i>Aeromonas salmonicida</i>	carence en nutriments, eau de mer à 15°C	milieu riche	Husevag, 1995
<i>Campylobacter jejuni</i>	carence en nutriments, eau stérile, 4°C	injection dans souris	Jones <i>et al.</i> , 1991
<i>Campylobacter jejuni</i>	carence en nutriments après la phase stationnaire, 4 à 6 semaines	oui	Bovill et Mackey, 1997
<i>Citrobacter freundii</i>	carence en nutriments, eau de mer stérile, 30°C	milieu nutritif	Dhiaf <i>et al.</i> , 2008
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	carence en nutriments, tampon phosphate	oui	Lappin-Scott <i>et al.</i> , 1988
<i>Legionella pneumophila</i>	carence en nutriments, eau stérile, 30°C	injection en embryons de poulet	Hussong <i>et al.</i> , 1987
<i>Micrococcus luteus</i>	stockage en phase stationnaire, température ambiante	addition de surnageant de culture active	Kaprelyants <i>et al.</i> , 1994
<i>Micrococcus luteus</i>	carence en nutriments	addition de la protéine Rpf (Resuscitation promoting factor)	Mukamolova <i>et al.</i> , 2006
<i>Pasteurella piscicida</i>	carence en nutriments, eau de mer à 6°C et 20°C	oui	Magarinos <i>et al.</i> , 1994
<i>Salmonella enteritidis</i>	carence en nutriments, eau de rivière stérile, 25°C	addition de nutriments	Roszak <i>et al.</i> , 1984
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	carence en nutriments, milieu minimum, 25°C	milieu sans source de carbone	Evdokimova <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	carence en nutriments en phase stationnaire	conditions d'anaérobiose	Binnerup <i>et al.</i> , 1995
<i>Vibrio cholerae</i>	carence en nutriments, eau stérile	injection dans lapin	Colwell <i>et al.</i> , 1985
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	carence en nutriments, eau de mer stérile, 4°C	augmentation de température et ajout de nutriments	Zhong <i>et al.</i> , 2008
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	carence en nutriments, eau de mer artificielle, 4°C	augmentation de température	Falcioni <i>et al.</i> , 2008
<i>Vibrio vulnificus</i>	carence en nutriments, milieu défini, 5°C	eau de mer artificielle avec augmentation de température	Biosca <i>et al.</i> , 1996

Tableau 2 : Conditions d'entrée et de sortie de l'état VNC chez différentes bactéries

### **3.3. Modifications physiologiques et morphologiques**

Les cellules en VNC diffèrent des cellules cultivables par de nombreuses caractéristiques cellulaires : taille, structure de la membrane, synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines et d'ATP. En effet, pour mieux comprendre les changements engendrés au sein d'une cellule par l'entrée en état VNC, de nombreuses études sur les bactéries ont été menées.

En ce qui concerne le dispositif énergétique de la cellule, il a été montré un maintien de la synthèse d'ATP chez *Campylobacter jejuni* (Beumer, *et al.*, 1992), et plus récemment chez *Listeria monocytogenes* après une entrée en état VNC (Lindbäck, *et al.*, 2010).

D'un point de vue morphologique, les cellules en état VNC sont pour la plupart de taille inférieure à des cellules cultivables. Chez *V. cincinnatiensis* par exemple, les cellules en état normal sont souvent sous forme de spirale d'environ 1,8  $\mu\text{m}$  de long, alors que les cellules en état VNC évoluent graduellement vers une forme coccoïde, avec un rayon moyen de 0,2  $\mu\text{m}$  (Zhong, *et al.*, 2009). Chez *V. vulnificus*, les cellules cultivables font 2  $\mu\text{m}$  de long, et seulement 0,6  $\mu\text{m}$  de diamètre en état VNC (Oliver, 2010).

En ce qui concerne la structure de la surface cellulaire, des modifications de composition ont été observées, notamment chez *V. vulnificus* au niveau de la composition en acides gras (Day & Oliver, 2004), ce qui suggère une capacité à modifier la fluidité membranaire lors d'un passage en état VNC. Des modifications protéiques de la composition de la surface cellulaire ont aussi été observées chez *Helicobacter pylori* (Citterio, *et al.*, 2004) et une modification du peptidoglycane de *E.coli* lors de l'état VNC (Signoretto, *et al.*, 2002) a également été mise en évidence.

En ce qui concerne les protéines cellulaires, il a été montré que la synthèse protéique ne s'arrêtait pas au cours de l'état VNC, et même que la production de certaines protéines absentes en état normal de croissance pouvait apparaître. C'est le cas dans l'étude de (Muela, *et al.*, 2008) qui montre par analyse bidimensionnelle du sous-protéome membranaire de *E. coli* que plus de 100 spots apparaissent en VNC. Malgré tout, aucune protéine n'a pu être mise en évidence comme spécifiquement liée à l'entrée en état VNC. Une étude du protéome total de *Enterococcus faecalis* en état VNC a elle aussi montré un profil protéique différent de celui obtenu pour des cellules en phase de croissance ou en phase stationnaire (Heim, *et al.*, 2002). L'état VNC apparaît donc bien constituer une phase distincte de l'état physiologique au cours du cycle de vie de la cellule de *E. faecalis*, et il est activé pour répondre à divers stress environnementaux. De la même façon, une étude du profil protéique de *V. parahaemolyticus* a révélé un nombre important de protéines surproduites dans des cellules en état VNC depuis plusieurs semaines (Lai, *et al.*, 2009).

Enfin, les teneurs d'ADN et d'ARN présents dans les cellules en VNC semblent être modifiés aussi. Dans certaines études, il a été montré que le niveau de synthèse de l'ADN et de l'ARN

était diminué en état VNC (Nilsson, *et al.*, 1991). Pourtant, les cellules de *Micrococcus luteus* maintiennent une concentration normale d'ADN, même si celle teneur en ARN est effectivement diminuée de moitié (Mukamolova, *et al.*, 1995).

Ces différents travaux et résultats laissent à penser que l'activité de la cellule n'est pas seulement ralentie lors d'un état VNC comme pourrait le laisser penser les teneurs plus faibles en ARN, mais bien modifiée. En effet il semblerait que la majorité des cellules entrées en état VNC conservent une concentration d'ATP élevée, une concentration d'ADN et d'ARN important, et surtout que de nouvelles protéines, absentes en état normal de croissance, soient synthétisées au cours de l'état VNC. Il est donc intéressant de s'intéresser à l'étude des gènes exprimés au cours d'un état VNC.

### **3.4. Modifications transcriptionnelles**

Beaucoup de questions concernant la biologie des cellules ont été élucidées grâce à l'étude des gènes. Dans le cas des cellules VNC, la RT-PCR a déjà pu montrer que des gènes continuaient bien à être exprimés (del Mar Lleó, *et al.*, 2000, Lleó, *et al.*, 2001). En plus de donner des indications sur les facteurs de régulation des cellules VNC, ces études ont apporté des preuves définitives que les cellules VNC conservaient un métabolisme actif et n'étaient pas des cellules mortes ou en train de mourir. Par exemple, Barrett en 1998 et Fisher-Le Saux *et al.* en 2002 montrèrent une production d'ARN messagers pour divers gènes chez des cellules de *V. vulnificus* en état VNC depuis 4 à 5 mois (Barrett, 1998) ; (Fischer-Le Saux, *et al.*, 2002). De même, Pai *et al.* montrèrent l'expression de l'antigène 85B chez *Mycobacterium tuberculosis*, et Gunasekera *et al.* rapportent l'expression de *gfp* chez des cellules VNC de *E. coli* et de *Pseudomonas putida* après un traitement thermique et une entrée en état VNC (Pai, *et al.*, 2000) (Gunasekera, *et al.*, 2002).

Bien que ces études démontrent la capacité des cellules VNC à transcrire des gènes, pour le moment aucun gène impliqué spécifiquement dans l'état VNC n'a pu être mis en évidence. Pourtant, une étude complexe et complète a été menée en 2005 par Vora *et al.* sur trois espèces différentes de *Vibrio* en état VNC par combinaison de la RT-PCR et d'une PCR multiplexe avec hybridation microarray pour l'analyse (Vora, *et al.*, 2005). Aucun gène commun permettant d'expliquer l'entrée en VNC n'a pu être déterminé, mais la détection de nombreux ARN messagers dans chacune des trois souches en VNC permet de savoir que les cellules VNC restent détectables.

L'étude permettant éventuellement de relier un gène à l'état VNC a été publiée en 2007 par (Abe, *et al.*, 2007). Ces chercheurs ont créé des mutants non VNC de *V. vulnificus* par mutagenèse, et les ont sélectionnés sur leur capacité à rester cultivables après un stress oxydatif ou xénobiotique. Ils ont ensuite comparé le génome de ces mutants non VNC avec

celui de la souche sauvage. La Glutathione S-tranf rase (GST) a alors été identifiée comme un gène putatif lié à l' tat VNC de la bactérie. En effet, dans les mutants non VNC (qui conservent donc leur capacité à se multiplier), la GST est surexprimée après un stress provoquant l'entrée en VNC de la souche sauvage. La GST étant liée au système de détoxification oxydative, les auteurs posent l'hypothèse que le stress oxydatif est directement lié à l'entrée de la cellule en  tat VNC. Cette hypothèse est appuyée récemment par Oliver (2010), qui montre un rôle important du gène *katG* (régulateur de la production de catalase) dans l' tat VNC chez *V. vulnificus* : le gène est inhibé lors de l'entrée en VNC de la bactérie, mais est de nouveau exprimé lorsque les conditions de sortie de VNC sont mises en place et que les cellules redeviennent cultivables.

### **3.5. Virulence**

La plupart des microorganismes pour lesquels l' tat VNC a été étudié sont des bactéries pathogènes. Dans les études transcriptionnelles présentées dans le chapitre pr c dent, certains des gènes exprimés correspondent à des toxines, il semble donc que les souches restent virulentes même en  tat VNC. Des facteurs de virulence sont conservés chez *Helicobacter pylori* (Adams, *et al.*, 2003), avec *murG* codant une glycosyltransférase. Cette enzyme est impliquée dans la formation du peptidoglycane chez des cellules VNC de *Enterococcus faecalis* (Signoretto, *et al.*, 2002). Ces résultats laissent à penser que la paroi qui a un rôle essentiel dans le maintien de la virulence des bactéries, est également impliquée de près dans l'entrée des cellules en VNC. Un autre gène impliqué dans la virulence des bactéries est *RpoS*. Ce gène est impliqué dans le maintien de la virulence de *E. coli* en  tat VNC (Boaretti, *et al.*, 2003).

Au-delà d'une simple transcription des gènes, il a été montré par évaluation de la cytotoxicité ou par injection chez l'hôte que la virulence était conservée en  tat VNC (Oliver & Bockian, 1995, Rahman, *et al.*, 1996, Sun, *et al.*, 2008). Le maintien de cette virulence par des cellules en  tat VNC est ainsi souvent mis en cause dans certaines pathologies de l'homme pouvant être dues à *V. cholerae*, *C. jejuni* (Lazaro, *et al.*, 1999, Tholozan, *et al.*, 1999, Bogosian, *et al.*, 2000), *Salmonella enterica* (Asakura, *et al.*, 2002), *Shigella dysenteriae* (Rahman, *et al.*, 1996), ou encore *Enterococcus* (Heim, *et al.*, 2002).

### **3.6. R suscitation**

Pour qu'une population soit considérée comme VNC, il faut qu'elle puisse ressortir de cet état et regagner sa capacité à se multiplier : on parle alors de « réanimation » ou « r suscitation » (Oliver, 1993).

L'hypothèse de l'état VNC est basée sur le fait que les cellules sont capables de retrouver leur capacité à se multiplier, et donc retrouver un métabolisme normal lorsque les conditions environnementales s'améliorent. Cette ressuscitation a fait l'objet de forts débats (Barer, 1997, Bogosian, *et al.*, 1998, Bogosian & Bourneuf, 2001, Nyström, 2001), puisque certains suggèrent que la reprise de cultivabilité est due à la présence et à la reprise de croissance de quelques cellules au métabolisme normal résiduelles dans une population majoritairement VNC. Mais la récupération de la division cellulaire chez une population de cellules en VNC a été décrite de façon non ambiguë pour de nombreuses bactéries (Dhiyf, *et al.*, 2008, Zhong, *et al.*, 2009). Une étude de Whitesides et Oliver de 1997 a montré que même en présence de moins de 0,0001 cellules viables et cultivables dans un échantillon, les cellules VNC retrouvaient leur capacité de croissance (Whitesides & Oliver, 1997).

La ressuscitation des cellules a été montrée *in vitro*, *in vivo* et *in situ* (Oliver, 2005). Pour certaines espèces, l'élimination du stress environnemental peut suffire à entraîner la sortie des cellules, alors que pour d'autres bactéries, il est nécessaire d'ajouter des nutriments au milieu pour engendrer la sortie de VNC. Par exemple, la bactérie *V. vulnificus* qui entre en VNC avec des températures faibles, peut en sortir simplement par augmentation de la température de culture (Oliver & Bockian, 1995). Pour d'autres bactéries pathogènes l'injection de cellules VNC dans un hôte provoque une ressuscitation des cellules. C'est le cas pour *Legionella pneumophila* chez l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* (García, *et al.*, 2007).

Pour expliquer cette capacité des cellules à reprendre une croissance normale, une enzyme capable d'hydrolyser le peptidoglycane a été mise en évidence chez *M. tuberculosis* (Mukamolova, *et al.*, 2002) puis chez *M. luteus* (Mukamolova, *et al.*, 2006, Telkov, *et al.*, 2006). Il s'agit d'un « resuscitation-promoting factor » ou Rpf qui est une protéine extracellulaire capable d'hydrolyser le peptidoglycane et de provoquer la division cellulaire. De même, une protéine Rpf-like a été identifiée chez *Salmonella Typhimurium* (Panutdaporn, *et al.*, 2006) et semble responsable du « réveil » des cellules entrées en VNC.

### **3.7. Détection**

Les modifications cellulaires liées à l'état VNC entraînent des difficultés à détecter ces cellules. C'est pourquoi différentes méthodes ont été proposées pour déterminer leur viabilité sans passer par la culture sur gélose (Kell, *et al.*, 1998). La détermination de la viabilité implique une recherche directe de diverses fonctions cellulaires : la respiration, le potentiel de membrane ou encore une activité enzymatique (del Mar Lleo, *et al.*, 2000, Divol & Lonvaud-Funel, 2005, Rudi, *et al.*, 2005). Pour ce faire, des méthodes de détection directe de la viabilité existent : comptage direct après marquage avec acridine orange qui se fixe

aux acides nucléiques (Heidelberg, *et al.*, 1997), utilisation de substrats d'estérases comme la fluorescéine diacétate, la PCR ciblant l'ADNc (del Mar Lleo, *et al.*, 2000, Vora, *et al.*, 2005). Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients, et il est possible qu'une seule méthode ne soit pas suffisante pour détecter correctement des cellules en VNC (Rice, *et al.*, 2000). Certaines de ces méthodes comme la EMA Rti-PCR mise au point pour la détection de *V.vulnificus* en VNC, pourraient donner des résultats faussés par de faux-positifs, en raison de la difficulté à déterminer précisément les capacités métaboliques des cellules VNC. Cette problématique de détection des cellules en VNC a surtout été étudiée chez les bactéries pathogènes pour l'homme, en raison des risques de santé potentiellement causés par cet état.

### **3.8. Remise en cause de l'état VNC**

Il est essentiel de rappeler que l'hypothèse de l'existence d'un état VNC chez les microorganismes n'est pas acceptée par toute la communauté scientifique. En 2010 une revue récapitule les faits connus pouvant aller dans le sens et à l'encontre de cette hypothèse (Jacob, 2010). Le point fort de ce débat est la capacité des cellules à ressusciter. Tant que la ressuscitation cellulaire ne peut pas vraiment être prouvée, l'état VNC doit être remis en cause. Barer en 1997 dit que de vraies cellules en VNC ne pourront jamais être ressuscitées (Barer, 1997). D'autres pensent que le regain de cultivabilité est en fait dû à la présence d'une faible quantité de cellules cultivables présentes dans l'échantillon (Bogosian, *et al.*, 1998). Une troisième hypothèse est que le regain de croissance peut aussi être dû à des cellules blessées qui retrouvent leur capacité à se multiplier (Bogosian, *et al.*, 2000) : après le retrait du facteur de stress, les cellules peuvent se réparer et reprendre une croissance. Donc selon ces hypothèses, l'état VNC ne serait pas un état génétiquement programmé dans la cellule.

L'article de Barcina et Arana de 2009 propose deux principales hypothèses pour expliquer l'état VNC (Barcina & Arana, 2009). La première hypothèse est que l'état VNC est une étape dans le cycle cellulaire pour les bactéries non différenciées. En effet, les études ont montré une synthèse protéique et une transcription des gènes, donc les cellules VNC sont constituées de cellules vivantes. Le fait que les cellules VNC soient capables de redevenir cultivables pourrait signifier que l'état VNC est en fait une phase du cycle cellulaire des microorganismes non différenciés. Mais il n'est pas toujours facile de faire sortir les cellules de l'état VNC et d'impliquer une ressuscitation. En effet, la population totale est souvent hétérogène, constituée de cellules viables et cultivables, VNC ou bien non viables et non cultivables. C'est pourquoi il est difficile d'assurer que la ressuscitation est le fait d'un regain

de cultivabilité des cellules VNC et non une croissance de cellules cultivables mélangées à la population VNC (Kell, *et al.*, 1998, Bogosian, *et al.*, 2000).

La seconde hypothèse est que l'état VNC est un phénotype participant au maintien des espèces, une stratégie de survie des populations. Cette hypothèse consiste à dire que les populations bactériennes sont formées de deux types de cellules : les « altruistes » et les « survivantes ». Quand les conditions environnementales deviennent difficiles, les « altruistes » libèrent dans le milieu des constituants cellulaires et des molécules organiques, perdant alors leur cultivabilité, et donnant l'apparence d'une sous population VNC. Le matériel organique ainsi libéré peut être utilisé par les autres cellules pour réparer les lésions cellulaires engendrées par le stress. Dans ces conditions, une sous population de cellules cultivables peut se maintenir et ainsi assurer la survie de l'espèce malgré les conditions environnementales difficiles.

Il faudra sans doute encore beaucoup d'études sur les microorganismes pour confirmer une de ces hypothèses, mais le nombre de cellules procaryotes étudiées et connues comme entrant en état VNC étant si important, la possibilité de trouver une réponse reste élevée. En revanche, c'est encore loin d'être le cas pour les cellules eucaryotes.

### **3.9. Description de l'état VNC chez les eucaryotes**

Comme il a été montré dans les parties précédentes, un certain nombre de connaissances concernant l'état VNC chez les bactéries a pu être recueilli. En revanche, en ce qui concerne les cellules eucaryotes, les connaissances approfondies sur l'état VNC sont quasiment inexistantes.

L'une des premières études à poser l'hypothèse d'un état VNC chez des cellules eucaryotes est celle de Millet et Lonvaud en 2000 portant sur la levure *Brettanomyces* (Millet & Lonvaud-Funel, 2000). Dans cette étude qui compare les résultats de numération de cellules présentes dans le vin par comptage sur boîtes et par marquage direct à la méthode d'épifluorescence directe (DEFT), les résultats montrèrent une incohérence entre ces deux méthodes. Le nombre de cellules détectées sur milieu gélosé était toujours inférieur à celui obtenu par DEFT. L'hypothèse de la présence de cellules en VNC dans le vin a donc été posée.

Un état comparable à celui des cellules bactériennes VNC avait déjà été supposé chez *Saccharomyces cerevisiae* (del Mar Lleo, *et al.*, 2000). De même, suite à un choc électrolytique, Guillou *et al.* (2003) observent une perte de cultivabilité mais pas de viabilité chez *S.cerevisiae*. Et Bleve *et al.* en 2003 avaient également détecté la présence de levures *S.cerevisiae* dans les aliments pasteurisés dans un état semblable à celui de VNC. Mais ces suppositions sont basées sur des études de courte durée, et sans jamais voir une

ressuscitation des cellules. Il se pourrait donc que ce phénomène ne soit du qu'à des cellules en train de mourir.

Mais des études plus récentes ont montré que le sulfitage du vin entraînait sans doute un état VNC chez la levure de contamination *Brettanomyces* (du Toit, *et al.*, 2005, Agnolucci, *et al.*, 2010). Ces études ont été menées sur des périodes plus longues, laissant moins la possibilité de confusion entre cellules VNC et cellules en cours de mort cellulaire. L'étude d'Agnolucci *et al.* de 2010 évoque même la ressuscitation des cellules de *Brettanomyces* après élimination de l'agent stressant (sulfite), mais sans apporter de résultats ni de preuves concluantes.

On peut quand même vérifier si les connaissances acquises sur les cellules bactériennes trouvent écho chez les cellules eucaryotes potentiellement VNC. Il semblerait que comme chez les cellules procaryotes, une diminution de la taille de la levure *Brettanomyces* a été soupçonnée dès l'étude de Millet et Lonvaud de 2000. En effet, certaines cellules étaient capables de passer au travers de filtres de diamètre de pores de 0,45µm (la taille normale de *Brettanomyces* étant en moyenne de 3µm).

Les stress provoqués par l'ajout de sulfite ou par l'oxydation du milieu sont à la base de l'entrée en état VNC décrit chez *Brettanomyces* (du Toit, *et al.*, 2005, Agnolucci, *et al.*, 2010). Or comme on l'a vu précédemment, le stress oxydatif semble être un acteur privilégié pour expliquer l'entrée des cellules en état VNC. Par ailleurs, plusieurs études chez *S.cerevisiae* ont montré des modifications protéiques et transcriptionnelles après un stress sulfite ou oxydatif (Kim, *et al.*, 2007, Park & Hwang, 2008), bien que les cellules étudiées dans ces travaux n'aient pas été décrites comme cellules en VNC. Ces premières études montrent une surproduction de protéines antioxydantes (Kim, *et al.*, 2007). L'étude de Park et Hwang (2008) indique après un stress sulfite de 120 minutes une induction de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates, indiquant selon eux une résistance au sulfite. Les gènes réprimés sont pour la plupart impliqués dans la transcription, la biosynthèse et la croissance cellulaire, ce qui reflèterait un arrêt de la croissance permettant à la cellule d'économiser de l'énergie.

En conséquence, on peut supposer que les modifications entraînées par le stress oxydatif pourraient être soit la conséquence soit l'origine d'une entrée en VNC chez les cellules levuriennes.

Ainsi, l'état VNC plusieurs fois décrit chez les levures n'a jamais été démontré ni caractérisé précisément.

## **RESULTATS**

**CHAPITRE 1**

**MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DETECTION  
SPECIFIQUE DE *BRETTANOMYCES* PAR HYBRIDATION *IN*  
*SITU* ET CYTOMETRIE EN FLUX**

## **Contexte et objectifs:**

Au cours de ces dernières années, les contaminations en *Brettanomyces* dans les chais n'ont cessé d'augmenter, causant de plus en plus de problèmes d'altération et de déviations organoleptiques des vins concernés. La majorité des techniques de mise en évidence de *Brettanomyces* utilisant les cultures sur milieu gélosé et la capacité de la levure à entrer en état VNC rendent sa détection de plus en plus incertaine, et l'altération du produit de plus en plus risquée.

L'objectif était donc de mettre en place et de développer une technique de détection de *Brettanomyces* qui ne se base pas sur la cultivabilité de la cellule, et qui soit moins coûteuse et complexe que les techniques de PCR quantitatives.

Nous avons donc mis en place la technique d'hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques de *Brettanomyces bruxellensis* déterminées par Röder *et al.* en 2008. L'amélioration que nous avons apportée est une détection de ces sondes fluorescentes et une quantification absolue des cellules marquées par cytométrie en flux, une méthode bien plus rapide et plus fiable que la détection et la numération par microscopie à épifluorescence associée à la méthode dans sa version initiale.

Ces deux méthodes couplées ainsi développées permettent une détection de *Brettanomyces* directement en vin, avec un seuil de détection, une spécificité et une efficacité acceptables.

**Article 1:**

L'hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux : une méthode de détection rapide et fiable de *Brettanomyces/Dekkera* dans les vins.

**Une version modifiée et en anglais a été publiée dans « Cytometry – Part A », numéro 77, Juin 2010.**

Virginie Serpaggi, Fabienne Remize<sup>1</sup>, Anabelle Sequeira-Le Grand<sup>2</sup>, Hervé Alexandre

<sup>1</sup> Adresse actuelle : CTCPA, ZA aéroport, site Agroparc, BP 21203, F-84009 Avignon cedex, France

<sup>2</sup> Plate-forme Technique de Cytométrie, IFR100 Santé STIC, Fac. Médecine, Université de Bourgogne, 7, Bd Jeanne D'Arc, 21000-Dijon

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, rue Claude Ladrey, BP 27877-21078 Dijon Cedex, France.

**Mots clefs :** FISH, *Brettanomyces*, cytométrie en flux, vin.

**Résumé**

La qualité des vins est parfois altérée par la présence de la levure de contamination *Brettanomyces*. Cette levure a la capacité de produire des phénols volatils comme le 4-éthylphénol qui est associé à des arômes désagréables de sueur de cheval ou d'écurie. L'élimination de ce microorganisme d'altération est une difficulté rencontrée par de nombreux vignerons. Pourtant, différentes méthodes de détection et d'identification de *Brettanomyces* existent déjà mais sont souvent trop longues ou trop coûteuses (comme par exemple la qPCR). Dans cet article, nous proposons une nouvelle méthode de quantification spécifique de *Brettanomyces bruxellensis* utilisant la technique d'hybridation *in situ* (FISH) avec des sondes ciblant l'ARN ribosomal 26S de *Brettanomyces* et couplée à une détection par cytométrie en flux (FCM). Le couplage de ces deux techniques permet une détection et une quantification de *Brettanomyces bruxellensis* directement dans les vins avant une trop forte contamination grâce à des limites de détection faibles. Comparée aux autres méthodes existantes, l'hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux (FISH-FCM) est plus rapide et moins coûteuse, puisqu'elle ne nécessite ni extraction d'ADN ni culture sur boîte de Petri pour un isolement du microorganisme.

Nos résultats ont montré que l'utilisation de ces deux techniques couplées constitue un réel progrès pour le suivi des contaminations des vins rouges par *Brettanomyces*, grâce à la rapidité d'analyse, la facilité d'utilisation, les avantages économiques et la sensibilité de détection.

## Introduction

La levure *Brettanomyces* est le microorganisme principalement responsable des contaminations en vins rouges et sa présence peut entraîner des pertes économiques importantes. En effet, cette levure produit, à partir de précurseurs présents dans le raisin, des phénols volatils tels que le 4-éthylphénol et le 4-éthylgâïacol. Ces phénols volatils confèrent au vin des caractéristiques aromatiques désagréables décrits comme plastique brûlé, écurie, sueur de cheval, cuir et laine mouillée. De plus cette levure est une forte productrice d'acide acétique (Silva *et al.*, 2004) et est capable de produire également du 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine et du 2-acetyl-3,4,5,6-tetrahydropyridine qui confèrent un arôme de «goût de souris» aux vins contaminés. Les produits du métabolisme de *Brettanomyces* altèrent les qualités organoleptiques des vins contaminés.

C'est pourquoi le contrôle des contaminations par cette levure est essentiel. Récemment, la cytométrie en flux a été proposée pour une quantification de *Brettanomyces* directement en vin (Gerbaux, 2007). Dans cette technique, les cellules sont marquées en fluorescence avec la fluorescéine diacétate, fluorochrome permettant de marquer tous les microorganismes vivants présents dans le vin (Schnürer et Rosswall, 1982). Cette technique n'est donc pas spécifique de *Brettanomyces*. A l'inverse, des méthodes spécifiques existent mais présentent beaucoup d'inconvénients puisque la plupart d'entre elles nécessitent une culture sur boîte de Petri pour isoler la levure, ce qui peut prendre plus d'une semaine. La détection de la levure est donc trop longue, pour une réaction efficace face à la contamination. Des méthodes basées sur l'identification phénotypique de *Brettanomyces* (culture sur milieu spécifique, profil d'acides gras,...) existent mais le temps nécessaire au test est trop important et les résultats peuvent être ambigus ou incorrects (Dominguez *et al.*, 2002 ; Rozès *et al.*, 1992). De plus, la plupart de ces méthodes permettent d'identifier *Brettanomyces*, mais ne permettent pas de quantifier la population de levures.

Afin de diminuer ces contraintes, des méthodes plus rapides basées sur l'amplification spécifique de l'ADN de *Brettanomyces* ont été développées. La RAPD-PCR a été utilisée pour identifier *Brettanomyces* au niveau de la souche. Une amplification spécifique de la région ITS (Internal Transcribed Spacer) par PCR permet une identification de *Brettanomyces* (Egli and Henick-Kling, 2001). Plus récemment, la méthode de LAMP (Loop Mediated isothermal Amplification) a été mise au point pour l'identification de *Brettanomyces* (Hayashi *et al.*, 2007). Toutes ces méthodes ne permettent pourtant pas une quantification efficace de *Brettanomyces*, car elles sont qualitatives et pas toujours développées pour une identification directement en vin.

La technique de PCR quantitative (qPCR) a été développée pour une détection et une quantification de *Brettanomyces*. Cette technique offre en effet des avantages intéressants face aux autres méthodes moléculaires en terme de rapidité et de capacité à quantifier

spécifiquement un microorganisme (Phister and Mills, 2003; Delaherche *et al.*, 2004, Tessonière *et al.*, 2008). Mais cette technique bien que rapide et efficace nécessite une technicité importante et reste assez coûteuse.

Parmi les nombreuses méthodes moléculaires pour analyser les microorganismes, l'hybridation fluorescente *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization (FISH)) est largement utilisée et reconnue. En effet, il est possible de cibler des régions spécifiques de l'ADN ou de l'ARN et de coupler cette reconnaissance spécifique à une technologie de détection et de numération grâce à une émission de fluorescence.

Les analyses par FISH avec des cibles de l'ARN ribosomal sont particulièrement développées pour l'identification et la quantification des microorganismes. Des études précédentes comme celle de Stender *et al.*, (2001) proposent une hybridation spécifique sur l'ARN grâce à des sondes PNA (Peptide Nucleic Acid) pour identifier *Brettanomyces* à partir de colonies sur gélose. Malgré la forte sensibilité et spécificité des PNA, ces sondes ne sont pas pratiques pour une utilisation en industrie du vin car elles sont trop coûteuses contrairement aux sondes oligonucléotidiques. Plus récemment, des sondes spécifiques inter-espèces pour FISH ciblant l'ARNr 26S ont été dessinées et utilisées pour la détection de *B. bruxellensis* directement en vin (Röder *et al.*, 2007). La technique de FISH couplée à une détection par microscopie est la technique la plus communément appliquée pour les analyses sur des microorganismes spécifiques (Bottari *et al.*, 2006). Cependant, la numération visuelle en microscopie est difficile, longue et fatigante. L'efficacité de cette technique de quantification est relativement faible (Wagner *et al.*, 2003) à cause du biais associé à la variabilité entre techniciens. Récemment, la combinaison de la méthode de FISH avec la détection par cytométrie en flux (FISH-FCM) est apparue comme l'une des meilleures techniques pour identifier et quantifier des microorganismes spécifiquement (Collado *et al.*, 2006).

L'objectif de ce travail est donc d'identifier et de quantifier directement en vin la levure de contamination *B. bruxellensis* en utilisant la méthode de FISH-FCM.

## **Matériels et Méthodes**

### Matériel biologique

Les souches de *B. bruxellensis* LO2E2, LO2B4, LO2A2, LO3D1, LO2A1, ITV69 ont toutes été isolées par l'Institut Technique de la Vigne et du Vin (Beaune, France). La souche œnologique *Saccharomyces cerevisiae* BM45 est distribuée par Lallemand SA, *Zygosaccharomyces bailii* (MUCL 27812) et *Hansenula anomala* (MUCL 27729) sont issues de la collection de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (Belgique), et *Kloeckera apiculata* et *Schizosaccharomyces pombe* sont des souches issues de la collection de l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin (Dijon, France).

### Milieux de culture

Toutes les souches sont cultivées sur YPD gélosé (10 g/L extrait de levure, 10 g/L bactopeptone, 20 g/L glucose, 20g/L agar) et placées en culture à 28°C. Pour les expérimentations conduites soit en vin synthétique, soit en vin rouge, le protocole suivant est appliqué : les cellules issues d'une culture de 72 heures en YPD sont ensemencées dans 10 mL d'un milieu d'adaptation composé à 50% de YPD et à 50% de vin synthétique (12% éthanol, 3g/L D-L acide malique, 0.01% acide acétique, 0.1g/L sulfate de potassium, 0.025g/L sulfate de magnésium, 1g/L extrait de levure, 1.5g/L glucose, 1.5g/L fructose, pH 3.5) ou de vin rouge (Pinot Noir de Bourgogne) à une concentration finale de  $10^6$  cellules/mL. Après 5 jours à 28°C, le vin synthétique filtré ou le vin rouge filtré sont ensemencés à  $10^5$  cellules/mL.

### Perméabilisation

Les traitements de perméabilisation ont été menés dans le but (i) d'augmenter le pourcentage de levures fluorescentes ; (ii) d'obtenir un signal de fluorescence plus puissant après hybridation. Un aliquot de 1 mL à environ  $10^7$  cellules/mL en milieu YPD, en vin synthétique ou en vin rouge, est centrifugé (9000 x g, 10 min, 25°C) et rincée deux fois avec 1 mL de PBS (130mM NaCl, 5mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7.4). Trois traitements différents ont été testés sur les cellules : (i) les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de PBS contenant 0,5g/L (p/v) de Triton X-100 et incubées dix minutes à 40°C ; (ii) les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de PBS contenant 0,5g/L (p/v) de Triton X-100 et soniquées trois minutes (Brandson Ultrasonic Cleaner 200 - 40KHz); (iii) les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 50 mM, pH 8.0) contenant soit 4,8 U/mL, soit 48 U/mL de protéase (Sigma Aldrich, St-Louis, MO, USA) et incubées 20 minutes à 37°C. A chaque fois, un second lavage est réalisé dans 1 mL de tampon PBS.

### Analyse par FISH

Les sondes 26S-D.bru.1.1 (TACCGGAACGACCGCAGT), 26S-D.bru.1.2 (TGTCACAGGCCTCTACATTG) et 26S-D.bru.5.1 (CTTACTCAAATCCCTCCGGT) précédemment dessinées par Röder *et al.* (2007) ont été utilisées. Les oligonucléotides utilisés sont couplés à l'extrémité 5' avec le fluorochrome Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Eugene, USA).

Les culots de cellules perméabilisées sont lavés une fois dans 1 mL de PBS contenant 0,5g/L (p/v) de Triton X-100 à 40°C, centrifugés (9 000 g, 10 min, 25°C), lavés de nouveau dans 1 mL de tampon PBS. Après une nouvelle centrifugation (9000 g, 10 min, 25°C), les cellules sont fixées en reprenant le culot dans 1mL de paraformaldéhyde 4% (4g de

paraformaldéhyde dans 100 mL de PBS) pendant 24 heures à 4°C. Si nécessaire, les cellules peuvent être conservées à -20°C en PBS-éthanol (1 :1) avant l'analyse. Le culot des cellules fixées est ensuite incubé avec 0,5µL de solution mère des deux sondes 26S-D.brux.1.1 et 26S-D.brux.1.2 ou de la sonde 26S-D.brux.5.1 seule à 100 µM dans 1 mL de tampon d'hybridation (20 mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.9 M NaCl, 0.01 % sodium dodecyl sulfate) à 62°C ou à 55°C pendant 16 heures.

Les hybridations non spécifiques des sondes sont éliminées par deux lavages successifs de la suspension cellulaire dans 1 mL du même tampon pendant 30 minutes à 63°C ou 55°C.

Entre chaque lavage, les cellules sont culotées au fond du tube par une centrifugation à 20000 x g pendant 10 minutes. Les cellules hybridées sont finalement centrifugées une dernière fois (20000 x g, 10 minutes, 25°C) et remises en suspension dans 1 mL de PBS. La détection est ensuite menée par microscopie à épifluorescence ou par cytométrie en flux.

Les analyses de microscopie à épifluorescence sont réalisées avec un microscope Leica DLMB équipé d'une lampe à mercure HBO 100-W et d'un filtre pour Alexa Fluor® 488 (excitation 490 nm et émission 520 nm). Les images sont enregistrées grâce à une caméra digitale (Leica, Cambridge, UK).

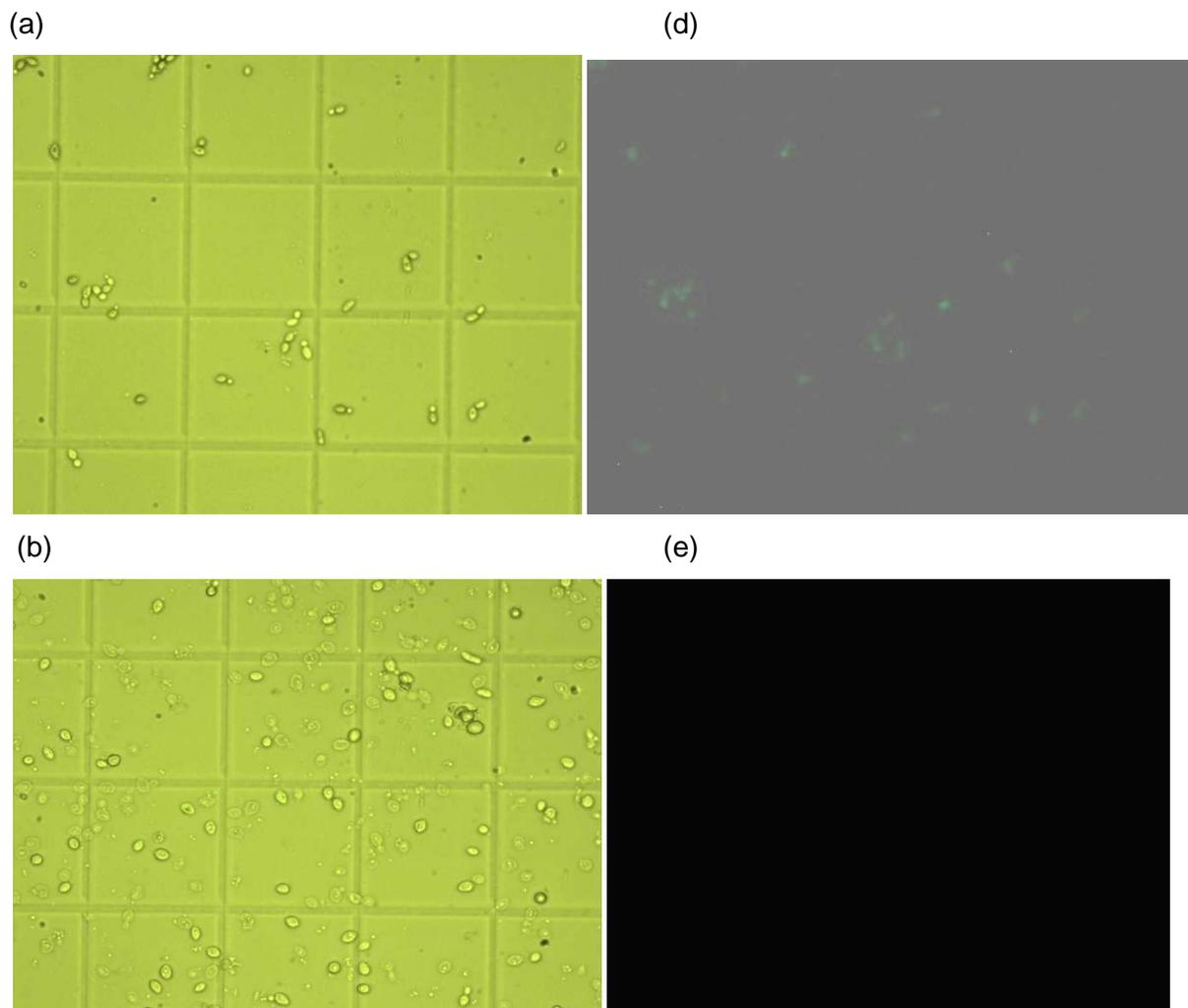
Les analyses de cytométrie en flux sont effectuées en triple avec un appareil Guava EasyCyte Plus SSC4C (Guava Technologies Inc., Hayward, USA). Cet instrument est équipé d'un laser linéaire de 488 nm, de détecteurs de taille (FSC) et de structure (SSC), et d'un détecteur de fluorescence (FI-1) avec un filtre de 525 nm (+/- 30 nm). Les cellules sont tout d'abord visualisées grâce au profil FSC/SSC, et la population de levures est sélectionnée. Afin d'obtenir un nombre significatif de cellules, une acquisition de 5000 événements est réalisée à chaque analyse. Le test est réalisé en triple pour chaque condition avec des cellules non hybridées comme contrôle négatif, en plaque 96 puits. L'autofluorescence des cellules est déterminée avec des cellules de levures traitées selon le protocole d'hybridation, mais sans sondes fluorescentes. Les données sont acquises par le logiciel Guava Cytosoft et analysées avec le logiciel Guava version 5.0.

## Résultats et Discussion

Dans de précédentes études, des sondes PNA et des sondes oligonucléotidiques ont été dessinées sur l'ARNr 26S de *Brettanomyces* dans le but de l'identifier par analyse FISH (Stender *et al.*, 2001; Röder *et al.*, 2007). Bien que la méthode de PNA-FISH s'avère efficace et sensible pour la détection de *Brettanomyces* (Stender *et al.*, 2001), les sondes PNA sont beaucoup trop coûteuses pour une analyse en routine dans les vins. Dans cette étude, nous avons utilisés des sondes oligonucléotidiques dessinées par Röder *et al.* (2007) et couplées à un fluorochrome pour la détection et la numération des cellules par cytométrie en flux.

Parmi les 40 sondes testées, les sondes 26S-D.brux.1.1, 26S-D.brux.1.2 et 26S-D.brux.5.1 ont été déterminées comme les plus efficaces vis-à-vis de *B. bruxellensis*, le microorganisme responsable de la production de phénols volatils.

La première étape de cette étude a été de valider la spécificité de ces sondes vis-à-vis de *Brettanomyces* mais également l'absence d'hybridation vis-à-vis des autres levures communément rencontrées en moût et en vin. D'autres espèces de levures ont donc été testées pour leur réactivité avec la sonde 26S-D.brux.5.1 (Figure 7: Images de microscopie de *B. bruxellensis* (a,d), *S. cerevisiae* (b,e), *Z. bailii* (c,f) après une hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques de l'ARN ribosomique 26S de *Brettanomyces* et couplées au fluorochrome Alexa Fluor® 488) ou avec le couple 26S-D.brux.1.1 et 26S-D.brux.1.2 (résultats non montrés).



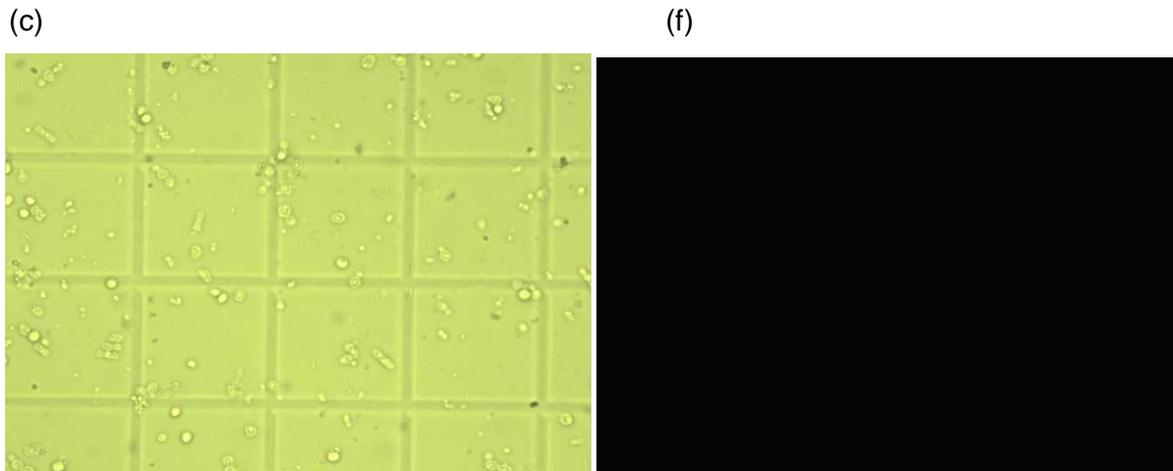


Figure 7: Images de microscopie de *B. bruxellensis* (a,d), *S. cerevisiae* (b,e), *Z. bailii* (c,f) après une hybridation *in situ* avec des sondes spécifiques de l'ARN ribosomique 26S de *Brettanomyces* et couplées au fluorochrome Alexa Fluor® 488

Micrographes en contraste de phase (a,b,c) et micrographes en épifluorescence (d,e,f) agrandis 400 fois

Il a été observé que toutes les souches de *Brettanomyces* testées par microscopie à épifluorescence émettent une fluorescence importante avec chacune des sondes. En revanche, les autres espèces de levures testées avec ces sondes ne montrent aucune fluorescence détectée par épifluorescence, ce qui prouve bien la spécificité des sondes envers la séquence de l'ARNr 26S de *B. bruxellensis*.

Pourtant, bien que l'analyse par FISH soit considérée comme efficace pour la numération de cellules dans des communautés mixtes de microorganismes, le comptage manuel en microscopie est long et pénible. C'est pourquoi, dans l'objectif d'une détection et d'une quantification rapide et efficace de *Brettanomyces* en vin, nous avons associé la technique de détection par FISH avec la technique de numération par cytométrie en flux qui a déjà été montrée comme efficace pour l'identification et la quantification des microorganismes dans les aliments (Hartmann *et al.*, 2005; Dinoto *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2007). En effet, la cytométrie en flux peut permettre la numération de 10000 cellules en moins d'une minute (Malacrino *et al.*, 2001; Thornton *et al.*, 2002).

La détection et la numération de *Brettanomyces* a donc été mise au point en vin synthétique en utilisant les sondes précédemment décrites couplées au fluorochrome Alexa Fluor® 488. La Figure 8 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de *B. bruxellensis* (A), *S. cerevisiae* (B) et *Z. bailii* (C) cultivées en vin synthétique et hybridées avec la sonde 26S-D.brux.5.1A montre que 84 et 91% ( $\pm 3\%$ ) des levures *B. bruxellensis* sont respectivement hybridées par le couple de sondes 26S-D.brux.1.1 et 26S-D.brux.1.2 ou par la sonde 26S-D.brux.5.1 seule. De plus, ces mêmes sondes ne s'hybrident pas avec les autres espèces de

levures retrouvées en vin, comme *S. cerevisiae* ou *Z. bailii* (<5%) (Figure 8 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de *B. bruxellensis* (A), *S. cerevisiae* (B) et *Z. bailii* (C) cultivées en vin synthétique et hybridées avec la sonde 26S-D.brux.5.1B, C).

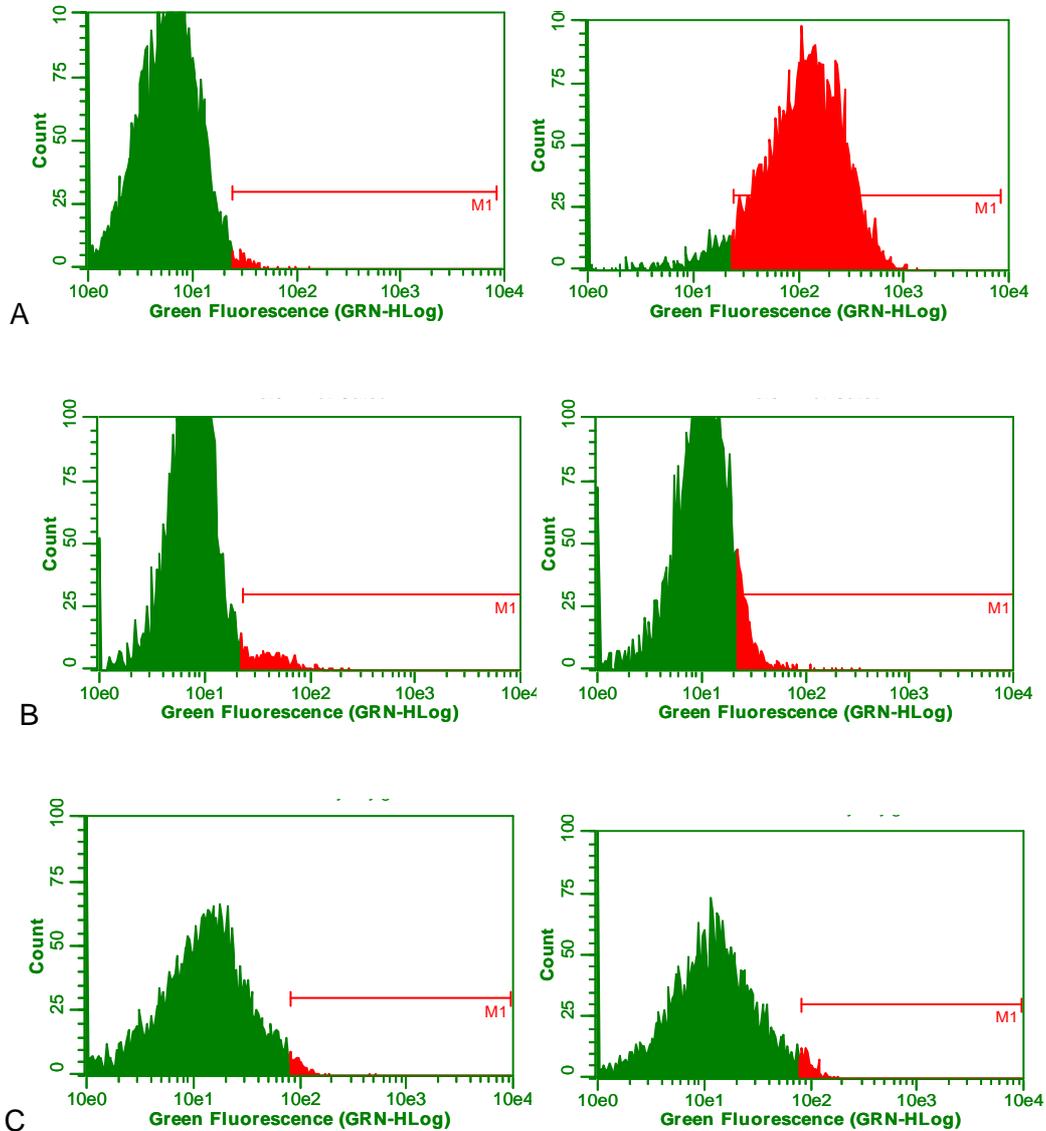


Figure 8 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de *B. bruxellensis* (A), *S. cerevisiae* (B) et *Z. bailii* (C) cultivées en vin synthétique et hybridées avec la sonde 26S-D.brux.5.1

Les histogrammes de cytométrie en flux montrent l'intensité de fluorescence verte (GRN – HLog) en abscisse et le nombre de cellules comptées en ordonnées. Les histogrammes de gauche montrent l'autofluorescence des levures, et les histogrammes de droite la fluorescence détectée pour les levures hybridées par la sonde 26S-D.brux.5.1.

Des essais ont ensuite été menés pour identifier et quantifier *Brettanomyces* directement en vin rouge par une analyse FISH-FCM. Malheureusement, un faible signal entre 33 et 52% a

tout d'abord été obtenu (Figure 9 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de *B. bruxellensis* cultivées en vin rouge et hybridées avec la sonde 26S-D.bru.5.1) en fonction de la sonde utilisée.

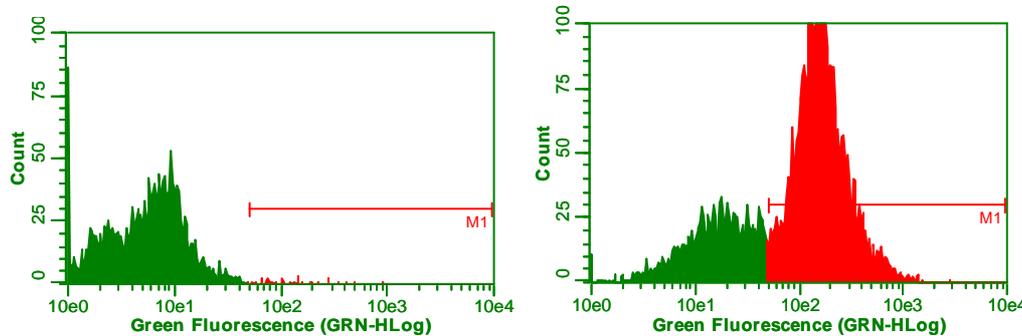


Figure 9 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de *B. bruxellensis* cultivées en vin rouge et hybridées avec la sonde 26S-D.bru.5.1

Les histogrammes de cytométrie en flux montrent l'intensité de fluorescence verte (GRN – HLog) en abscisse et le nombre de cellules comptées en ordonnées. Les histogrammes de gauche montrent l'autofluorescence des levures, et les histogrammes de droite la fluorescence détectée pour les levures hybridées par la sonde 26S-D.bru.5.1.

Cette faible hybridation peut s'expliquer par les problèmes classiques rencontrés avec la technique de FISH : cible des sondes inaccessible ou imperméabilité des parois cellulaires (Bottari *et al.*, 2006). Le vin rouge contient en effet de nombreux composés qui peuvent se fixer sur les parois levuriennes comme les composés phénoliques (Vasserot, *et al.*, 1997). Il a été supposé que ces composés phénoliques ou que d'autres métabolites empêchaient l'accès des sondes aux acides nucléiques cibles. Afin d'améliorer l'hybridation, différents traitements ont été testés pour éliminer les composés fixés sur la paroi des levures (Tableau 3 : Effet de différents protocoles de perméabilisation effectués avant l'hybridation avec différentes sondes sur le pourcentage de cellules de *B. bruxellensis* fluorescentes). Ce tableau montre les différents traitements de perméabilisation testés pour obtenir un signal de fluorescence maximal. Le Triton X-100 a été utilisé comme détergent couplé à une sonication ou à une augmentation de température pour éliminer les phénols et autres composés fixés à la paroi cellulaire. Les protéases ont été testées car elles permettent une déstructuration des protéines de la paroi, exposant ainsi les glucanes situés en dessous (Salazar et Asenjo, 2007). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'utilisation du Triton X-100 à 40°C : 66 et 80% de *B. bruxellensis* LO2E2 sont respectivement hybridées avec le couple 26S-D.bru.1.1 et 26S-D.bru.1.2 ou avec la sonde 26S-D.bru.5.1 seule. Des résultats similaires ont été obtenus avec les autres souches de *B. bruxellensis* testées (résultats non montrés).

Tableau 3 : Effet de différents protocoles de perméabilisation effectués avant l'hybridation avec différentes sondes sur le pourcentage de cellules de *B. bruxellensis* fluorescentes

Traitement	Sonde	% de fluorescence*
PBS	Brett 1,1+1,2	33
	Brett 5,1	52
PBS Triton	Brett 1,1+1,2	53
	Brett 5,1	76
<b>PBS Triton 40°C</b>	<b>Brett 1,1+1,2</b>	<b>67</b>
	<b>Brett 5,1</b>	<b>80</b>
PBS Triton sonicateur	Brett 1,1+1,2	40
	Brett 5,1	80
protéase 4,8U/mL	Brett 1,1+1,2	71
	Brett 5,1	47
protéase 48U/mL	Brett 1,1+1,2	66
	Brett 5,1	46

\* Ratio entre cellules fluorescentes et cellules totales déterminées par cytométrie en flux.

Afin de prouver que ce protocole de perméabilisation n'affecte pas la spécificité des sondes, une hybridation sur la levure *S. cerevisiae* cultivée en vin rouge a également été testée (Figure 10 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de *S. cerevisiae* cultivées en vin rouge, traitées avec Triton X-100 à 40°C avant d'être hybridées avec la sonde 26S-D.brux.5.1). On peut voir que ce traitement des parois ne change pas le signal de fluorescence qui reste en dessous de 5% avec la sonde 26S-D.brux.5.1 seule et de 8% avec le couple de sonde 26S-D.brux.1.1 et 26S-D.brux 1.2.

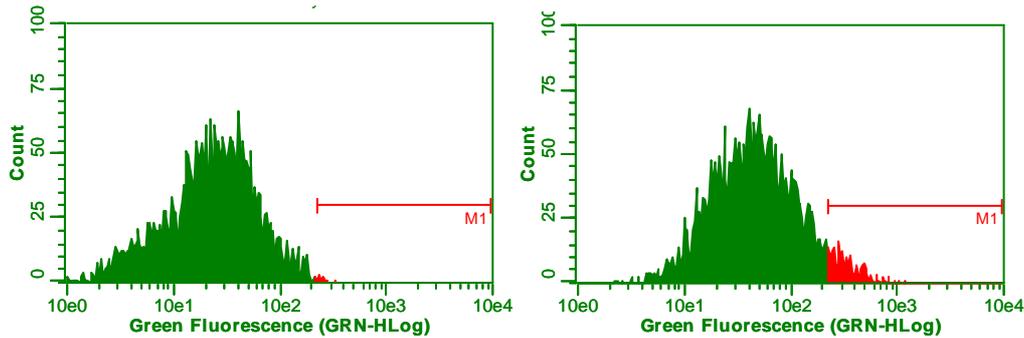


Figure 10 : Histogrammes de FCM obtenus après FISH de cellules de *S. cerevisiae* cultivées en vin rouge, traitées avec Triton X-100 à 40°C avant d'être hybridées avec la sonde 26S-D.bru.5.1

Les histogrammes de cytométrie en flux montrent l'intensité de fluorescence verte (GRN – HLog) en abscisse et le nombre de cellules comptées en ordonnées. Les histogrammes de gauche montrent l'autofluorescence des levures, et les histogrammes de droite la fluorescence détectée pour les levures hybridées par la sonde 26S-D.bru.5.1.

Après ces vérifications, la quantification directe de *B. bruxellensis* en vin rouge a été testée avec cette technique de FISH-FCM. Un vin rouge filtré a été contaminé avec une souche de *B. bruxellensis* et laissé à 28°C pendant quelques jours pour la croissance de la levure. Des échantillons de ce vin ont ensuite été prélevés et différentes dilutions ont été réalisées avant la quantification des cellules de *Brettanomyces* par FISH-FCM ou par numération en cellule de Thoma et microscopie.

Les six points de la courbe de calibration ont été préparés en vin rouge de  $10^2 - 10^7$  cellules/mL de LO2E2 (Figure 11 : Corrélation entre le log théorique par dilution des cellules de *B. bruxellensis* cultivées en vin, en fonction du log des cellules de *B. bruxellensis* hybridées par la sonde 26S-D.bru.5.1 (A) et les sondes 26S-D.bru.1.1 et 26S-D.bru.1.2 (B) et détectées par FCM). Le log de cellules/mL théorique par dilutions en fonction du log de cellules/mL mesuré par FISH-FCM est représenté par une droite de régression. La quantification de *Brettanomyces* en vin est plus efficace en utilisant le couple de sonde 26S-D.bru.1.1 et 26S-D.bru.1.2 (Figure 11 : Corrélation entre le log théorique par dilution des cellules de *B. bruxellensis* cultivées en vin, en fonction du log des cellules de *B. bruxellensis* hybridées par la sonde 26S-D.bru.5.1 (A) et les sondes 26S-D.bru.1.1 et 26S-D.bru.1.2 (B) et détectées par FCM).

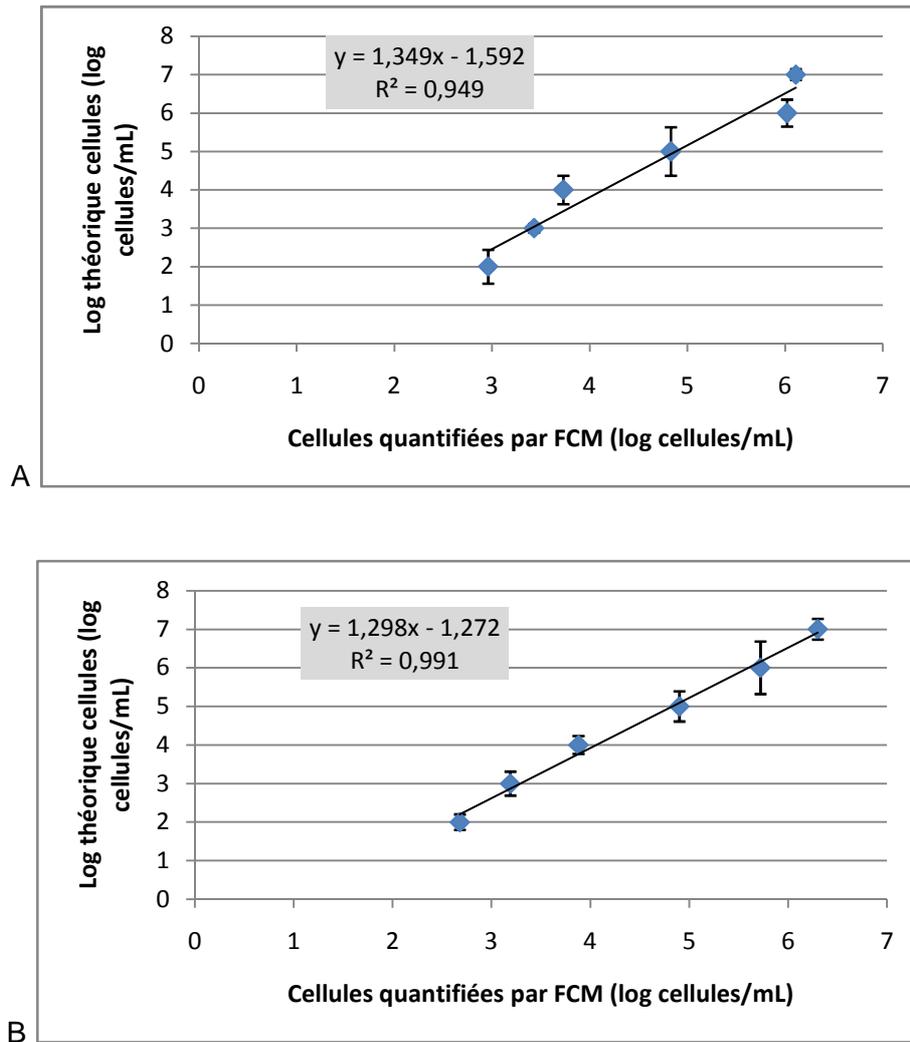


Figure 11 : Corrélation entre le log théorique par dilution des cellules de *B. bruxellensis* cultivées en vin, en fonction du log des cellules de *B. bruxellensis* hybridées par la sonde 26S-D.brux.5.1 (A) et les sondes 26S-D.brux.1.1 et 26S-D.brux.1.2 (B) et détectées par FCM. Les mesures sont la moyenne de trois répétitions indépendantes.

En diluant un vin rouge contaminé, il a été montré que la limite de détection pour *B. bruxellensis* par FISH-FCM est de  $10^2$  cellules/mL et que cette méthode est linéaire entre  $10^2$  et  $10^7$  cellules/mL. Cette limite permet une détection de la présence de *B. bruxellensis* avant que la contamination du vin ne soit irréversible. En effet, il a été montré que la production de phénols volatils devenait significative pour une population de *B. bruxellensis* supérieure à  $10^3$  cellules/mL (Chatonnet *et al.*, 1995).

En résumé, cet article propose pour la première fois une méthode permettant une détection rapide et efficace et une quantification de *B. bruxellensis* directement en vin. Nos résultats font apparaître qu'en présence de *S. cerevisiae*, la technique utilisée pouvait conduire à de faux positifs. Cependant, les risques majeurs de développement de *Brettanomyces* se

situent au niveau de l'élevage, pendant lequel la population de *S. cerevisiae* vivante est faible ou inexistante. Ainsi, la combinaison de la technique de FISH et de la technique de cytométrie en flux constitue un réel progrès pour la gestion des contaminations par *B. bruxellensis*. Ceci grâce à sa vitesse de réalisation, sa relative simplicité, ses avantages économiques et sa sensibilité appropriée à des analyses qualité en routine.

**Remerciements** : Cette étude a été financée par le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne, Inter-Rhône, le Conseil Régional de Bourgogne et France AgriMer.

## Références

- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., Neviani, E.,** 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis : current state and prospects. 73, 485-494.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.N.,** 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. American Journal of Enology and Viticulture 46, 463-468.
- Collado, M.C., Sanz, Y.,** 2006. Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by use culture methods and fluorescence *in situ* hybridization coupled with flow cytometry techniques. Veterinary Microbiology 121 (3-4), 299-306.
- Delaherche, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A.,** 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. 97, 910-915.
- Dinoto, A., Marques, T.M., Sakamoto, K., Fukiya, S., Waranabe, J., Ito, S., Yokoto, A.,** 2006. Population dynamics of *Bifidobacterium* species in human feces during raffinose administration monitored by fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry. Applied Environmental Microbiology 72 (12), 7739-7747.
- Egli, C.M., Henick-Kling, T.,** 2001. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. American Journal of Enology and Viticulture 52(3), 241-247.
- Gerbaux, V.,** 2007. Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans un vin rouge par cytométrie de flux. Revue des Œnologues 123, 21-24.
- Hartmann, H., Stender, H., Schäfer, A., Auterrieth, I.B., Kempf, V.A.,** 2005. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by a combination of fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes and flow cytometry. Journal of Clinical Microbiology 43 (9), 4855-4857.
- Hayashi, N., Arai R., Tada, S., Taguchi, H., Ogawa, Y.,** 2007. Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. Food Microbiology 24(7-8), 778-785.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., Dellaglio, F.,** 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. Journal of Microbiological Methods 45 (2), 127-134.
- Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., Egli, C.M.,** 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. Food Microbiology 196, 3-14.
- Phister, T., Mills, D.,** 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. Applied Environmental Microbiology 69, 7430-7434.
- Pradelles, R., Alexandre, H., Ortiz-Julien, A., Chassagne, D.,** 2008. Effect of yeast cell-wall characteristics on 4-ethylphenol sorption capacity in model wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (24), 11854-11861.
- Röder, C., Köning, H., Fröhlich, J.,** 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. FEMS Yeast Research 6, 1013-1026.
- Salazar, O., Asenjo, J.A.,** 2007. Enzymatic lysis of microbial cells. Biotechnology Letters 29, 985-994.
- Silva, P., Cardoso, H., Geros, H.,** 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. American Journal of Enology and Viticulture 55, 1, 65-72.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldeg-Nielsen, J.J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O’Keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J.,** 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by Fluorescence *In Situ* Hybridization using peptide nucleic acid probes. Applied Environmental Microbiology 67, 938-941.
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., Remize, F.,** 2009. Design and

performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology* 129, 237-243.

**Thornton, R., Godfrey, W., Gilmour, L., Alsharif, R.,** 2002. Evaluation of yeasts viability and concentration during wine fermentation using flow cytometry. Becton Dickinson.

**Vasserot, Y., Caillet, S., Maujean, A.,** 1997. Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 433-437.

**Wagner, M., Horn, M., Daims, H.,** 2003. Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterization of prokaryotes. 6, 302-309.

**CHAPITRE 2**  
**ETUDE ET CARACTERISATION DE L'ETAT VIABLE NON**  
**CULTIVABLE CHEZ *BRETTANOMYCES***

**Article 2:**

Characterization of the “Viable but non culturable” (VBNC) state in the yeast  
*Brettanomyces*

**Cet article a été soumis à Applied and Environmental Microbial.**

Virginie Serpaggi<sup>1</sup>, Fabienne Remize<sup>1,2</sup>, Ghislaine Recorbet<sup>3</sup>, Eliane Gaudot-Dumas<sup>3</sup>,  
Anabelle Sequeira-Le Grand<sup>4</sup>, Hervé Alexandre<sup>1\*</sup>

- 1- Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, Université de Bourgogne, rue Claude Ladrey, BP 27877, F-21078 Dijon Cedex, France
- 2- Present address : CTCPA, ZA aéroport, site Agroparc, BP 21203, F-84009 Avignon cedex, France
- 3- UMR 1088 INRA/CNRS 5184/UB Plante-Microbe-Environnement, INRA-CMSE, Dijon, France
- 4- Plate-forme de Cytométrie, IFR100 Santé STIC, Fac. Médecine, Université de Bourgogne, 7, Bd Jeanne D'Arc, 21000-Dijon

Corresponding author:

Hervé Alexandre

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin

Université de Bourgogne

Rue Claude Ladrey, BP 27877

F-21878 DIJON Cedex

Phone: +33-3-80-39-63-93

Fax : +33-3-80-39-62-65

rvalex@u-bourgogne.fr

Running Title: **Viable but non culturable state in *Brettanomyces***

Key words: Viable But NonCulturable, *Brettanomyces bruxellensis*, flow cytometry, proteomic, yeast, volatile phenol

## Summary

Although the viable but not culturable (VBNC) state has been studied in detail in bacteria, it has been suggested that maintenance of viability with loss of culturability also exists in eukaryote cells, such as in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. To provide conclusive evidences for the existence of a VBNC state in this yeast, we investigated its capacity to become viable and non culturable after a sulfite stress and its ability to recover culturability after stressor removal. Sulfite addition resulted in inducing loss of culturability but maintenance of viability. Increasing the pH medium to decrease the concentration in toxic SO<sub>2</sub> allowed yeast cell to become culturable again, thus demonstrating the occurrence of a VBNC state in *Brettanomyces* upon SO<sub>2</sub> exposure. Relative to culturable *Brettanomyces*, VBNC yeast cells were found to display a 22% decrease in size on the basis of laser granulometry. Assays for 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol, volatile phenols produced by *Brettanomyces*, indicated that spoilage compound production could persist in VBNC cells. These morphological and physiological changes in VBNC *Brettanomyces* were coupled to extensive protein pattern modifications, as inferred by comparative two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analyses. According to the identification of 53 proteins out off the 168 spots whose abundance was significantly modified in treated cells relative to control, we propose that the SO<sub>2</sub>-induced VBNC state in *Brettanomyces* is characterized by a reduced glycolytic flux coupled to changes in redox homeostatis/protein turnover-related processes. This study points out the existence of common mechanisms between yeast and bacteria upon VBNC entry.

## Introduction

The spoilage yeast *Brettanomyces* is responsible for producing volatile phenols in wine that are associated with unpleasant aromas, which may thus compromise beverage quality and productivity (Du Toit *et al.*, 2005). Although a large number of culture-based techniques are currently available for assessing the presence of this undesirable spoilage yeast during winemaking processes, in most cases, *Brettanomyces* is not detected, but some wines nonetheless present volatile phenol compound-associated aromas a few months or years later, a dilemma which could potentially account for the ability of *Brettanomyces* to enter a viable but non culturable (VBNC) state (Agnolucci *et al.*, 2010).

The VBNC phenotype, which is characterized by an inability of cells to divide on bacteriological media, even though they are still alive and maintain metabolic or cellular activity, has been widely observed and described in bacteria. Evidence for the presence of cells that are viable but not culturable is provided by viability assays (Kell *et al.*, 1998), which involve the direct investigation of various cell functions, such as respiration, membrane potential or integrity and enzymatic activity (Leo *et al.*, 2000; Rudi *et al.*, 2005; Divol *et al.*, 2005). Fluorescent probes also can serve to count viable cells by microscopy or flow cytometry (FCM). VBNC bacteria frequently differ from normal culturable cells in terms of their size and the chemical composition of the cell wall (Byrd, 1992; Oliver, 2005). Additionally, macromolecular synthesis and respiration rates decrease as cells enter a VBNC state (Lai *et al.*, 2009). By contrast, ATP levels and membrane potential remain generally high (Lindback *et al.*, 2010).

The basis for a VBNC hypothesis therefore involves demonstration of the recovery of culturability in VBNC cells. This “resuscitation” has been the subject of heated debate (Kell *et al.*, 1998), but the recovery of cell division in the VBNC population has been unambiguously described for numerous bacterial species (Zhong *et al.*, 2009; Dhiaf *et al.*, 2008). According to Barcina and Arana (2009), the VBNC phenotype may be considered as an integral part of the life cycle of non differentiating bacteria.

Most studies on VBNC cells have focused on pathogenic bacteria, including *Vibrio*, *Campylobacter*, *Shigella* and *Enterococcus* (Bogosian *et al.*, 2000; Tholozan *et al.*, 1999; Rahman *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 2002), which, despite some controversy (Jacob, 2010), are considered to generate a potential public health risk (Oliver, 2005) because chemical and environmental factors have been reported to induce a VBNC state, including nutrient starvation, extreme temperatures and osmotic concentrations, oxygen, and food preservatives (Oliver, 2010).

Contrarily to bacteria, the VBNC state in other microorganisms, including particularly eukaryotes, has received much less attention. However, it has been suggested that in wine, yeast cells may attain a state in which they are viable but not culturable (Millet and Lonvaud,

2000). In particular, recent studies have indicated that sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>), an antimicrobial agent used in food preservation, induces a VBNC state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces* (Du Toit *et al.*, 2005; Agnolucci *et al.*, 2010). These latter authors reported a capacity of *Brettanomyces* to enter a VBNC state after a sulfite treatment ranging from 0.2 to 1.0 mg.l<sup>-1</sup> on several strains and they mentioned a potential regain of culturability after stressor removal. Unfortunately, neither the protocol nor the data relative to resuscitation have been provided to strengthen this conclusion. Consequently, the VBNC state existence in *Brettanomyces* has never been either conclusively demonstrated to exist, or characterized.

A variety of microorganisms are exposed to the toxine sulfide (representing the sum of H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup> and S<sub>2</sub>), but most studies dedicated to the effect of SO<sub>2</sub> on living organisms have focused on animals. Sulphur dioxide has been shown to form adducts with aldehydes, ketones, thiamine, and cysteine residues in proteins; and sulfite forms adducts with NAD, nucleosides and nucleotides. Sulfite also generates lyses of disulfide bonds in native proteins, a process called sulfitolysis (WHO Food Additives Series 21). With regard to yeasts, transcript profiling changes in *Saccharomyces cerevisiae* cells upon sulfite exposure in their exponential growth phase have been shown to include up-regulation of genes involved in carbohydrate metabolism and down-regulation of genes having function in protein biosynthesis and transcription (Park and Hwang, 2008). By contrast, irreversible inhibition of colony formation in *S. cerevisiae* by sulfite has been ascribed to the SO<sub>2</sub>-driven activation of ATP hydrolysis (Schimz and Holzer 1979; Schimz *et al.* 1980), and to inhibition of the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Hinze and Holzer, 1986).

By reason of the importance of the spoilage yeasts in wine technology, the current study was aimed at monitoring the effects of sulfite on the entry of eukaryotic *Brettanomyces* cells into the VBNC state and their resuscitation capability. In view of the aforementioned modifications of protein integrity and functioning in response to SO<sub>2</sub>, we reasoned that a broader range of proteins than that previously revealed using targeted enzyme-based activity assays might be affected. Because co/post translational protein modifications escape methods of transcript profiling-based experiments, a comparative proteomic approach was thus performed between control and VNBC cells, which allowed suggesting putative mechanisms involved in loss of cultivability upon sulfite exposure.

## Materials and Methods

### *Yeast strain and culture conditions*

*Brettanomyces bruxellensis* strain LO2E2, isolated from Burgundy red wine by the *Institut Technique de la Vigne et du Vin* (Beaune, France) was used in the current study. It was grown on YPD agar (10 g.l<sup>-1</sup> yeast extract, 10 g.l<sup>-1</sup> Bacto-peptones, 20 g.l<sup>-1</sup> glucose, 20 g.l<sup>-1</sup>

agar) at 28°C for five days as starter inocula. VBNC studies were performed in a synthetic wine medium (10 % v/v ethanol, 3 g.l<sup>-1</sup> D-L malic acid, 0.01 % acetic acid, 0.1 g.l<sup>-1</sup> potassium sulfate, 0.025 g.l<sup>-1</sup> magnesium sulfate, 1 g.l<sup>-1</sup> yeast extract, 1.5 g.l<sup>-1</sup> glucose, 1.5 g.l<sup>-1</sup> fructose). The pH was adjusted at 3.5, and the medium was passed through filters with 0.2 µm pores (Millipore, Molsheim, France) and then supplemented with 10 mg.l<sup>-1</sup> of *p*-coumaric and ferulic acid as precursors for volatile phenol production. A YPD-grown colony was used to inoculate 10 ml of this synthetic wine, which was then incubated at 28°C for 3 days. The generated biomass was used to inoculate one liter of synthetic wine, to obtain a cell density of about 10<sup>5</sup> cells.ml<sup>-1</sup> and this culture was incubated at 28°C until a population of 10<sup>7</sup> cells.ml<sup>-1</sup> was reached.

#### *Induction of entry and exit from the VBNC state*

A stationary-phase culture of *Brettanomyces* in synthetic wine was used to obtain VBNC cells. One liter of culture with a population of 10<sup>7</sup> cells.ml<sup>-1</sup> was stressed by adding sulfur dioxide. This was achieved by adding 1.28 ml of a solution of sodium metabisulfite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) at 4 g.l<sup>-1</sup>. This metabisulfite solution containing 67.4% of SO<sub>2</sub>, we obtained a final concentration of 30 mg.l<sup>-1</sup> of free SO<sub>2</sub>, which corresponds to a final concentration of 0.8 mg.l<sup>-1</sup> of molecular SO<sub>2</sub> for a synthetic wine at pH 3.5 and 10% (v/v) ethanol.

Exit from the VBNC metabolic state was induced by eliminating the component inducing the cell stress. Sulfur dioxide is present in different forms: combined, free or molecular. The molecular form is the only active form on cells, and its proportion was dependent on the pH of the medium. Increasing the pH by adding NaOH until the pH of the medium reached 4.0 was sufficient to decrease the concentration of molecular sulfur dioxide to almost 0 mg.l<sup>-1</sup>. All the studies related to entry into and exit from the VBNC state were performed in independent triplicate biological experiments.

#### *Culturability and viability assays*

For the determination of total, viable and culturable populations, samples of *Brettanomyces* cultures were removed at various times after incubation at 28°C in synthetic wine medium. Cell culturability was assessed by a spread plate procedure on YPD agar. The percentage of cells that were culturable is expressed with respect to total cell counts. Cell viability was determined by staining with fluorescein diacetate (FDA). The ability of FDA to stain viable cells is based on its cleavage, in living cells, by membrane esterases during active metabolism (Schnürer and Rosswall, 1982). Cells were stained for 15 minutes with FDA, at a final concentration of 15 µM, in 0.5 M sodium phosphate buffer at pH 7.0. The suspension of FDA-stained cells was analyzed by flow cytometry with a Guava EasyCyte Plus SSC4C cytometer (Guava Technologies Inc., Hayward, USA) using blue line excitation at 488 nm.

Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were used to determine the size and structure of cells. Green fluorescence was read using PMT3 detector with 525 nm +/- 30nm filter. Measurements were processed with Guava Cytosoft software and the results are expressed as the number of total and viable yeast per milliliter of original sample.

VBNC cells were identified as the cells responsible for the difference between the numbers of culturable and viable cells.

#### *Cell size measurement by granulometry*

Cell sizes were measured for three different treatments: cultures without sulfite (control), cultures with sulfite addition after 3 days of growth (VBNC cells), and cultures with sulfite addition after 3 days of growth and sulfite elimination after 4 days of treatment (exit VBNC cells). Control cells, VBNC cells and exit VBNC cells were collected after 11 days of culture. Yeast cell size was determined by laser granulometry (Mastersizer Hydro 2000 SM, Malvern Instruments, Malvern, UK). Cells in synthetic wine medium were sonicated for 30 seconds to break up aggregates (pulses of 2 s ON and 1 s OFF) before measurement. Then 200 ml of cells suspension were washed twice with physiological water (0.9% w/v NaCl), and after a centrifugation at 5000 x g during 10 minutes, the pellet was resuspended in 10 ml of physiological water for subsequent analysis. Cell size measurement is performed with agitation of 2000 rpm and at a turbidity of 11% obtained by adding the heavy suspension in the measuring circuit of laser particle size. Cell size was assayed for triplicate independents biological cultures for each treatment.

#### *Cell size measurement by flow cytometry*

Beads of various sizes (1 µm, 2 µm, 3 µm and 6 µm) were used to create a calibration curve. A suspension containing the four different beads at  $10^6$  particles.ml<sup>-1</sup> was analyzed by flow cytometry with a Guava EasyCyte Plus SSC4C flow cytometer (Guava Technologies Inc., Hayward, USA). The logarithm of the mean forward diffraction values from 488 nm laser as a function of size, based on the values obtained with 1, 2 and 6 micron beads, was plotted as a calibration curve. This curve was used to determine the size of *Brettanomyces* cells in control, VBNC and resuscitation states.

#### *Cell preparation and observation by scanning electron microscopy*

Normal and VBNC cells suspensions in synthetic wine were layered on polylysine glass cover slips for 1 hour. Cells attached on glass cover slips were then fixed in 100mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde overnight at 4°C. After fixation, cells were washed five times in the same buffer for 30 min, dehydrated through a

graded ethanol series and a critical-point drying was then performed. Samples were then sputter coated with gold-palladium and observed in a SEM (FEI XL 30).

#### *Volatile phenol production*

Cells were grown in synthetic wine, with volatile phenol precursors (ferulic acid and *p*-coumaric acid). Culture supernatant was sampled at various growth times and volatile phenols were extracted with a Lichrolut® EN Solid Phase Extraction Column. Columns are activated with two successive methanol washes, rinsed with MilliQ water. Three milliliters of sample were introduced in the column, and after aspiration of all the volume, were eluted with 1 ml of dichloromethane. Extracted and concentrated volatile phenols were analyzed by gas chromatography (Focus GC apparatus, Thermo-Finnigan). The instrument included a CP Wax 57 CB capillary column (25 m × 0.25 mm i.d., 0.2 µm bonded phase) (Varian) and an FID detector. The internal standard was 1 mg.l<sup>-1</sup> of 3,4-dimethylphenol. Three independent biological experiments were analyzed in triplicate.

#### *Proteome study by two-dimensional electrophoresis*

##### *Protein extraction*

Proteins were extracted from the yeast biomass in phenol, as previously described (Bestel-Corre *et al.* 2002). For each treatment, 2-Dimensional Electrophoresis was performed for three different yeast protein samples, each consisting of a biomass pellet of about 1 g, and three independent biological experiments were analyzed. Yeast pellets were ground in liquid nitrogen and homogenized in 10 ml of 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, lysis buffer containing 0.7 M sucrose, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, 10 mM thiourea, 2 mM PMSF and 2% (v/v) β-mercaptoethanol. One volume of Tris-buffered phenol was added and the mixture was agitated for 30 minutes. The phenolic phase was separated by centrifugation and rinsed with another 10 ml of lysis buffer. Proteins were precipitated overnight at -20°C, after the addition of five volumes of methanol and 0.1 M ammonium acetate. The pellet was recovered by centrifugation, rinsed with cold methanol and acetone, dried under nitrogen gas and resuspended in 200 µl of 9 M urea, 4% w/v CHAPS, 0.5% v/v Triton X-100, 100 mM DTT and 2% v/v IPG buffer pH 3-10 (Amersham Biosciences). Lipids and nucleic acids were removed by ultracentrifugation for 30 minutes at 170000xg (Airfuge, Beckman Coulter). The protein content of the supernatant was quantified by the modified Bradford method, as described by Ramagli and Rodriguez (1985), with BSA as the standard. For each set of conditions, proteins were extracted from three independent liquid cultures.

### *2-DE analysis*

2-DE was performed as previously described (Aloui *et al.* 2009). Precast 18 cm linear pH 3-10 IPG strips (BioRad) were rehydrated overnight with 400 µg of yeast proteins in 400 µL of 8 M urea, 2% v/v CHAPS, 20 mM DTT, 2% v/v IPG buffer pH 3-10 and bromophenol blue. Isoelectric focusing was carried out for 70 kVh, with a gradually increasing voltage, at 20°C. Strips were then either stored at -80°C or immediately equilibrated. The second dimension was SDS-PAGE in custom-made pH 8.8 12% polyacrylamide gels (Hoefer DALT, Amersham Biosciences). Electrophoresis was run at 10°C and 90 V until the dye front reached the bottom of the gel. The 2-DE gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, as described by Mathesius *et al.* (2001).

### *Image analysis*

Stained gels were scanned with the Labscan Version 2.0 (BioRad). Image analysis was carried out with Progenesis SameSpots version 2.0 software (Nonlinear Dynamics) according to the manufacturer's instructions. Quantification was performed independently for three biological experiments, corresponding to a total of six gels (two treatments x three independent analytical gels). For each treatment, only protein spots displaying significant differences ( $p < 0.05$ ) in abundance between the conditions tested in three independent biological experiments were considered to display differential accumulation, as assessed by the ANOVA analysis included in software.

### *Mass spectrometry-based protein identification*

MS-based protein identification was performed as described in Quintana *et al.* (2009). Spots of interest were manually excised, washed in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.1 M for 10 min and dehydrated in ACN for 10 min. Dry spots were incubated successively in 10 mM TCEP/0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 30 min at 37°C, in 55 mM iodacetamide/0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 20 min, in 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 5 min and in ACN for 5 min. Digestion was performed for 2 h at 37°C in a 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /10% ACN solution containing 10 ng/µl of trypsin (V528, Promega USA). For MALDI-TOF analysis, peptide samples resulting from protein digests were loaded onto a Ground Steel target, mixed with 1 µl of matrix solution (3.5 mg/ml CHCA in ACN 50%, TFA 0.25%) and allowed to dry. The target was introduced in a mass spectrometer MALDI-TOF (UltrafleX, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Ionization was performed in MS and MS/MS (PSD-LIFT technology) by irradiation of a nitrogen laser (337 nm) operating at 50 Hz. Data were acquired at a maximum accelerating potential of 25 kV in the positive and reflectron modes. The MALDI mass spectra were calibrated using the Peptide Calibration Standards from Bruker Daltonics. The software packages Ultraflex version 3.0, Flex control, Flex Analysis and Biotoools version 3.2 were used to record and analyse the mass spectra. Protein

identification was carried out using peptide mass fingerprints (PMFs) and peptide fragmentation patterns as inputs to search Uniprot and the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) nonredundant (nr) database using the Mascot search engine and only matches with  $p < 0.05$  for random occurrence were considered to be significant. Methionine oxidation was accepted as a variable modification, carbamidomethyl modification of cysteine as a global modification, and a maximum of one miss cleavage was allowed specifying trypsin as the proteolytic enzyme. Mass deviation tolerance was set at 80 ppm in MS mode and 0.5 Da in MS/MS mode. For peptide mass fingerprinting, a minimum of four peptides matches and 15% sequence coverage were accepted. When peptide matching happened unsuccessful, identification was attempted using tandem mass spectra and protein identification was validated with at least two unique peptides at disparate sites within a protein. Identification with only one peptide was also allowed provided the protein belonged to the taxonomy “Fungi”. When necessary, MS/MS spectra were interpreted *de novo* using Biotoools (3.2 version, Bruker Daltonics). The MS BLAST search was performed against the nrdb95 protein database following the procedure described by Shevchenko et al. (2001) and hits were considered statistically confident according to the MS BLAST scoring scheme (Habermann et al. 2004).

#### *Statistical analysis for size and volatile phenol compound measurements*

Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent biological replicates. Statistical comparisons were made by one-way analysis of variance followed by Tukey's comparison test (XLstat software). A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered to be significant.

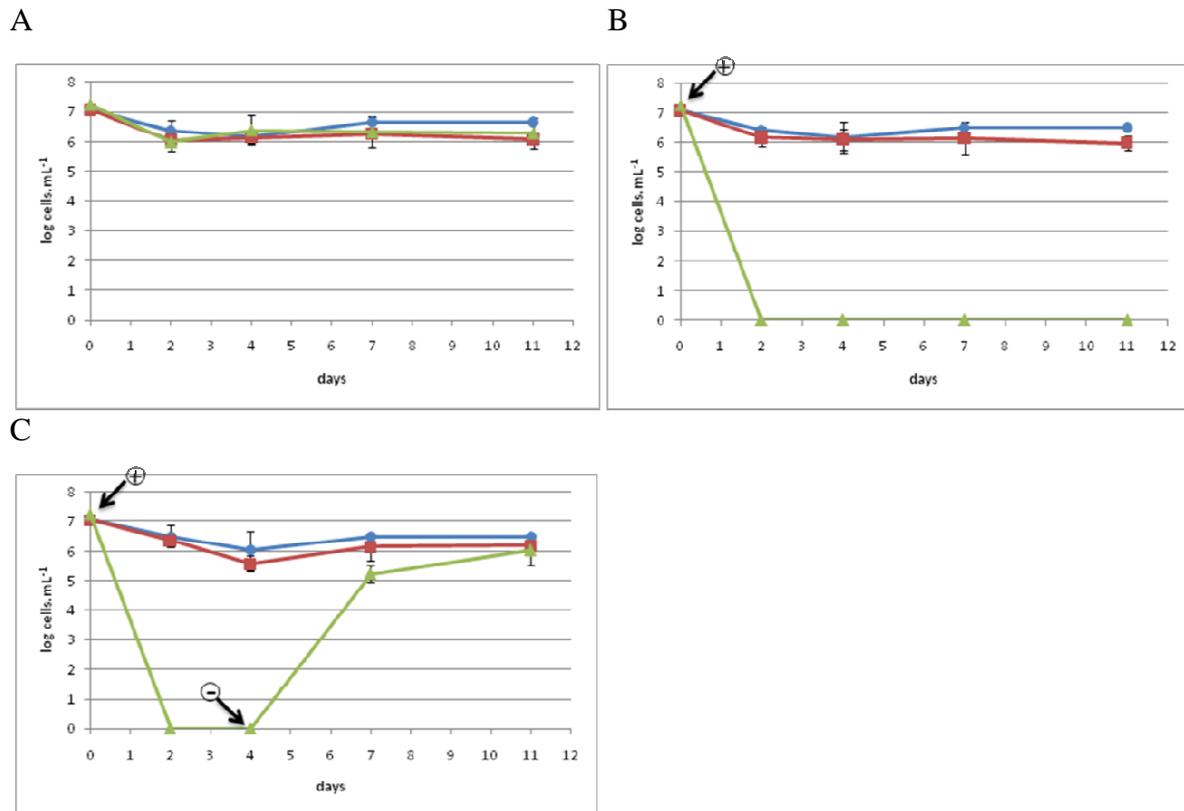
## **Results**

#### *Evidences for a VBNC state (induction and exit)*

Sulfite has been suggested to induce VBNC state in *Brettanomyces* (Du Toit *et al.*, 2005; Agnolucci *et al.*, 2010). We therefore used this compound as a stress factor for studying this stage in this yeast. To monitor the conversion of *Brettanomyces* cells to the VBNC state, flow cytometry counts of total or viable cells and CFU (colony forming unit) counts were compared. In the absence of sulfite, all cells remained viable and culturable in medium simulating wine over a period of 11 days at 28°C (Fig. 1A). Entry into the VBNC state was induced by incubation with various concentrations of SO<sub>2</sub>, ranging from 0.3 to 1.0 mg.l<sup>-1</sup> usually found in wine (data not shown). When 0.8 mg.l<sup>-1</sup> SO<sub>2</sub> (in the active form, H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) was added at time 0 (Fig. 1B), all cells remain viable and the viable cells became unculturable after 24 hours.

We investigated the ability of cells to exit from VBNC state by using various strategies to decrease sulfite concentration: sulfite extraction by nitrogen entrainment or sulfite oxidation

by oxygen, or dilution of the medium to limit the concentration of this compound. Because these techniques failed to succeed, we tried to increase pH from 3.5 to 4.0. At the highest pH,  $\text{SO}_2$  is found exclusively in the bisulfite form ( $\text{HSO}_3^-$ ). Bisulfite possesses a low, and largely insignificant, antiseptic affect on yeast cells. Two days after elimination of molecular  $\text{SO}_2$ , cells became culturable again (Fig. 1C). The stability of the total population during this increase in viability and culturability provides evidence that, rather than growth being limited to a small proportion of viable cells, the cells already present regain the ability to multiply.



**FIG. 1.** Changes in total (●), viable (▪), and culturable (▲) *Brettanomyces* cells in various conditions.

(A) Growth control condition in synthetic wine. (B) Growth in synthetic wine and with the addition of  $0.8\text{mg.l}^{-1}$  sulfite on day 0. (C) Growth in synthetic wine with the addition of  $0.8\text{mg.l}^{-1}$  sulfite on day 0 and sulfite elimination on day 4. The values shown are the means of three independent experiments  $\pm$  standard deviation.

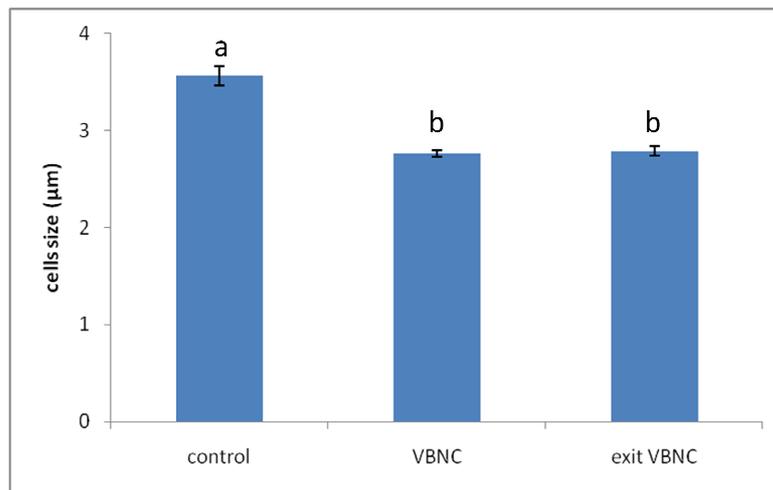
⊕  $0.8\text{mg.l}^{-1}$  molecular  $\text{SO}_2$  addition to  $10^7$  cells. $\text{ml}^{-1}$  in stationary phase.

⊖ molecular  $\text{SO}_2$  removal by pH increase to 4.0.

#### VBNC state characterization

We analyzed VBNC cells relative to that arising from other treatments with the aim at identifying morphological differences. Size of *Brettanomyces* cells was determined by

granulometry on three different independent cell cultures (control, VBNC and exit VBNC). We found that cells in VBNC state were significantly smaller than control cells (Fig. 2). Furthermore, five days after exit from VBNC state, cells remained significantly smaller than control cells. We found that control cells were  $3.6 \mu\text{m} \pm 0.1$  (diameter), whereas cells in the VBNC state were  $2.8 \mu\text{m} \pm 0.1$  and resuscitated cells were  $2.8 \mu\text{m} \pm 0.1$ . Entry into the VBNC state thus results in a 22% decrease in size (Fig. 2).

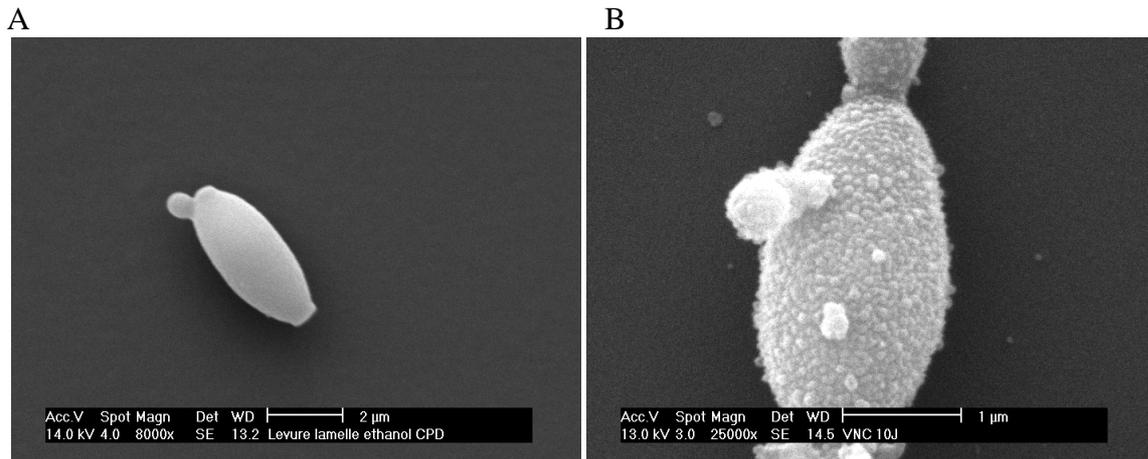


**FIG. 2.** Measurement, by granulometry, of *Brettanomyces* cells in the control state, the VBNC state (3 days after sulfite addition), and after exit from the VBNC state (5 days after sulfite elimination). The values presented are the means of three independent experiments  $\pm$  standard deviation.

Group a is significantly different from group b at p-value < 0.05.

Additionally, cells size of control and VBNC cells was measured by flow cytometry. The obtained results confirmed the smaller size of cells in VBNC state and the stabilization of this smaller size after exit from the VBNC state (data not shown).

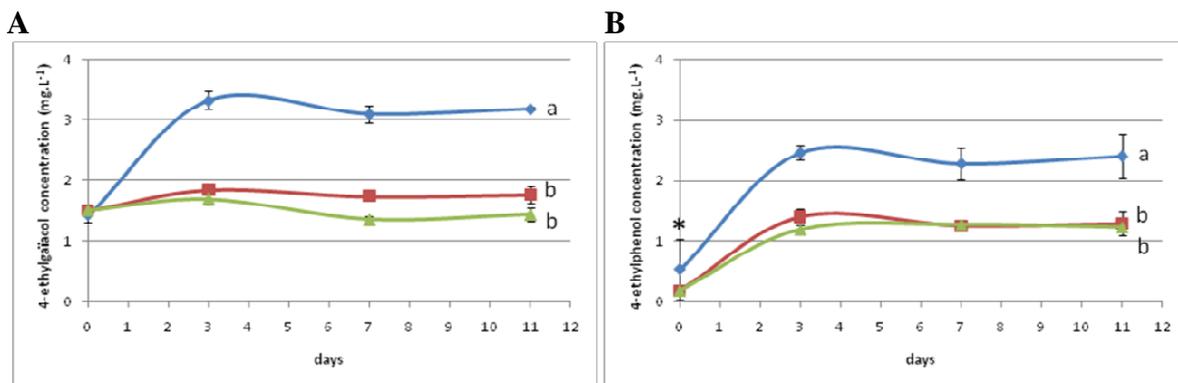
We investigated morphological changes associated with VBNC state in *Brettanomyces* using scanning electron microscopy (SEM) (Fig. 3). Firstly, cells of both VBNC and control cells displayed budding, demonstrating that this cells were fixed in their physiological state at the time of sulfite addition. Secondly, control micrograph (Fig. 3A) showed that cells surface is smooth, whereas after sulfite treatment (Fig. 3B), the cell surface roughness was modified.



**FIG. 3.** Control (A) and VBNC (B) *Brettanomyces* cells observed by SEM.

One of the *Brettanomyces* characteristics is its ability to produce volatile phenol compounds from phenolic acids, thereby spoiling wine aromas. We therefore assessed the production of volatile phenol compound in VBNC state and during growth in the absence of stress.

Fig. 4 shows that control cells produced  $3.5 \pm 0.2 \text{ mg.l}^{-1}$  of 4-ethylguaiacol (4EG) and  $2.5 \pm 0.1 \text{ mg.l}^{-1}$  of 4-ethylphenol (4EP) after few days at 28°C in synthetic wine. Cells in VBNC state (sulfite addition at day 0 for curves VBNC and VBNC resuscitation) displayed a stabilization of 4EG production, but continued to generate 4EP in presence of sulfite. However, the 4EP production in VBNC cells is significantly lower compared to control cells (Fig. 4).



**FIG. 4.** 4-ethylguaiacol (A) and 4-ethylphenol (B) concentrations ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) for control cells (●), VBNC cells (■) and cells after VBNC resuscitation (▲).

Group a is significantly different from group b at  $p < 0.001$  for days 3, 7 and 11.

(\*) the values for day 0 differ significantly from those for the following days.

As a way to investigate whether a VBNC state may generate protein modifications at a large-scale, we compared two-dimensional electrophoretic proteins patterns between control and sulfite-stressed cultures of *Brettanomyces* using three independent biological protein extracts for each treatment. Following Coomassie blue staining, most of the detected spots were found concentrated in a 5-9 pH and 20-100 kDa MW range in both conditions (Fig. 5 and 6). Analysis of 2-DE data with Nonlinear Progenesis Same Spots software revealed the existence of significant ( $p < 0.05$ ) qualitative and quantitative differences in protein abundance for 168 spots between control and VBNC state. Of these 168 spots, the 96 more abundant (46 and 50 for the VBNC state and control, respectively) were manually excised and submitted to mass spectrometry analysis and database interrogations, which resulted in the identification of 54 proteins (Tables 1 and 2).

According to the FunCat classification scheme (Ruepp *et al.* 2004), the protein spots identified, which underwent change in abundance in the VBNC state relative to control condition were found (Tables 1 and 2) to belong to glycolysis /gluconeogenesis pathways (fructose biphosphate aldolases, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (GAPDHs), 3-phosphoglycerate kinases, phosphoglycerate mutases, enolases); energy/phosphate production (adenylate kinase, pyrophosphatase IPP1); NADH/NAD<sup>+</sup> balance (alcohol dehydrogenase III, kynurenine-3-monooxygenase, cytochrome P450), stress/oxidative stress response (HSPs, glutaredoxin-like, thioredoxin peroxidase, peroxiredoxin) and proteolysis (carboxypeptidase Y inhibitor, metallopeptidase dug 1).

Among the 53 proteins identified, 12 were present in lower abundance in the VBNC state compared to control conditions, whereas 41 were more abundant in VBNC cells (Fig. 5 and 6 and Tables 1 and 2). Noteworthy, comparison of protein profiles coupled to mass spectrometry also indicated that a large majority of VBNC-responsive spots corresponded to protein isoforms that exhibited a shift in electrophoretic mobility relative to that theoretically predicted and/or to that observed in control cells conditions (Fig. 5 and 6 and Tables 1 and 2). Notably, among the proteins whose abundance increased in VBNC cells, we observed a reduced molecular mass for 14 enolase isoforms (13, 23, 32, 1115, 1221, 1277, 1279, 1302, 1349, 1617, 1994, 2068, 2069, 2323) and a *pI* modification was noticed for four enolases (115, 271, 285, 1071) exhibiting an experimental molecular mass similar to that predicted (Table 2). A lower-molecular mass isoform pattern also was observed for nine GAPDH proteins (4, 11, 26, 1483, 1504, 1524, 1564, 2086, 2186) that displayed an increase accumulation upon SO<sub>2</sub> concomitant to a *pI* shift for two other isoforms (378, 389) that retained their theoretical mass (Table 2). In VBNC cells, isoelectric point increases were also observed for carbohydrate metabolism-related enzymes: fructose biphosphate aldolase (435, 1013), phosphoglycerate mutase (1288, 110, 1325, 1303) and phosphoglycerate kinase

(773) (Table 2). With regard to NAD<sup>+</sup>/NADH production, both a NADH dehydrogenase (2293) and an O-methylsterigmatoscyistin oxidoreductase (338) displayed a higher accumulation in VBNC cells but corresponded to lower molecular mass isoforms than those predicted (Table 2). Likewise, two alcohol dehydrogenase III isoforms (938, 939) showed a reduced abundance in treated yeasts (Table 1). Concomitantly, the quantitative level of NADPH-dependent enzyme kynurenine-3-monooxygenase (574), was found reduced compared to controls (Table 1). Also in relation to energetic metabolism, abundances in an adenylate kinase (1373) and an inorganic pyrophosphatase (24) were increased upon SO<sub>2</sub> exposure (Table 2). Regarding to proteins having function in stress response, we noticed an enhanced accumulation in treated cells of a mature heat shock protein (Hsp70 (43), Table 2), whereas, according to their experimental molecular mass relative to that predicted, three putative HSP precursors (52, 293, 100, Table 1) displayed a reduced abundance (Table 1). With regard to cell redox homeostasis- and reactive oxygen species detoxification-related processes, proteomic data indicated an enhanced accumulation of a 22 kDa peroxiredoxin (231) in VBNC cells (Table 2), coupled to a decreased abundance for a 29 kDa glutaredoxin (316) and a 17.7 kDa thioredoxin peroxidase (316, 200, Table 2). Finally, changes in protein turnover-associated mechanisms upon SO<sub>2</sub> exposure were represented by a reduced abundance of a carboxypeptidase Y inhibitor and a metallopeptidase (341, 529, Table 1).

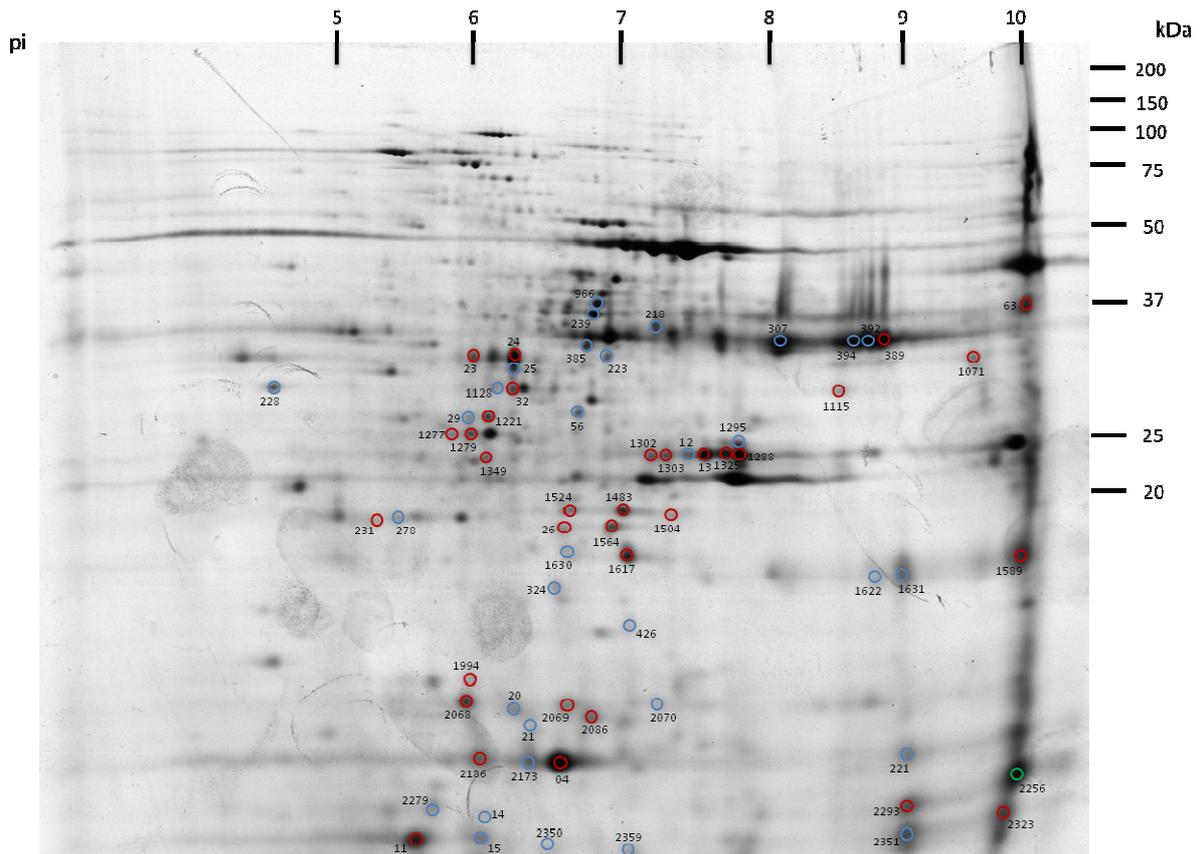
**TABLE 1.** Proteins present at lower abundance in the VBNC state isolated from a 2-DE gel of total proteins from *Brettanomyces*.

Spot number	Protein name	Accession number	Theoretical		Experimental	
			MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI
938	Alcohol dehydrogenase III	Q75G88	38	8,26	37	8,9
939	Alcohol dehydrogenase III	Q6BMN4	36	7,02	37	9,1
341	Carboxypeptidase Y inhibitor	P14306	24	6,07	25	6,6
2256	Enolase	Q6C1F3	47	5,01	<15	9,7
316	Glutaredoxin like	XP_002555650	25	4,72	29	5,8
529	Gys-gly metallopeptidase dug1	Q9P6I2	52,8	5,27	60	5,8
52	HSP60 precursor	O74261 Q59U15	60	5,22	70	6,3
293	HSP 70	Q9U777	72	5,32	75	5,8
100	HSP SSC1 precursor	P12398	70	5,48	75	6,4
574	Kynurenine 3 monooxygenase		66	8,85	50	6,4
200	Peroxiredoxine tpx1	O74887	21	5,37	17,7	5
1152	Ubiquinone biosynthesis monooxygenase (COQ6)	P53318	53	6,52	32	7,5

**TABLE 2.** Proteins induced in the VBNC state isolated from a 2-DE gel of total proteins from *Brettanomyces*.

Spot number	Protein name	Accession number	Theoretical		Experimental	
			MW (kDa)	pI	MW (kDa)	pI
1373	Adenylate kinase	Q6CK57	25	6,53	25	10
13	Enolase	Q6C1F3	47	5,01	27	7,6
23	Enolase	Q870B9	47	5,34		
		P42894	47	5,49	34	6
32	Enolase	P42894	47	5,49		
		Q756H2	46	5,36	32	6,3
		Q6AAB8	45	4,59		
115	Enolase	Q6C1F3;P42894	47	5,01	47	7,3
271	Enolase	Q6C1F3	47	5,01	48	7,9
285	Enolase	Q6C1F3	47	5,01	50	7,1
1071	Enolase	Q6C1F3	47	5,01	34	9,5
1115	Enolase	Q6C1F3	47	5,01	32	8,5
1221	Enolase	P42894	47	5,49	30,5	6,1
1277	Enolase	P42894	47	5,49		
		Q6W3C0	47	5,36	28,5	6,1
		Q5XIV3	47	7,08		
1279	Enolase	Q756H2	46	5,36	28,5	6
		Q601S2	49	5,83		
1302	Enolase	Q6C1F3	47	5,01	27	7,3
1349	Enolase	P42894	47	5,49	27	6,1
		P42894	47	5,49		
1617	Enolase	Q756H2	46	5,36	20	7
		Q6C1F3	47	5,01		
		P42894	47	5,49		
1994	Enolase	Q5YQ30	44	4,5	17	5,6
2068	Enolase	P42894	47	5,49		
		Q6C1F3	47	5,01	16	6
2069	Enolase	P42894	47	5,49		
		Q6C1F3	47	5,01	16	6,6
		P42894	47	5,49		
2323	Enolase	Q756H2	46	5,36	<15	9,7
		Q6C1F3	47	5,01		
435	Fructose biphosphate aldolase	XP_002480088	39,7	5,73	35,5	7,1
1013	Fructose biphosphate aldolase	Q6C4K5	39	5,51	35,5	7,7
4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	O59841	36	6,66	15	6,5
11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q8SRJ8	36	8,52	<15	5,6
26	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q8SRJ8	36	8,52	22	6,6
378	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	V01301	35	6,46	35,5	8,1
		Q757I2	35	5,39		
389	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q6M6L3	53	5,66	35,5	8,9
1483	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q92263	35	6,54	23	7
1504	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P48812	36	7,69	22	7,5
1524	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P00358	35	6,46	23	6,6
1564	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q92263	35	6,54	22	6,9
2086	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Q8SRJ8	35	8,52	16	6,8
2186	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Q6FSM4	35	6,46	15	6,1
43	Hsp70 chaperone BiP, putative	XP_001272734	73	4,87	73	5,9
24	Inorganic pyrophosphatase	P83777; Q59Y59; Q59YB5	32	5,13		
		Q9COT9	32	5,24	34	6,3
338	O-methylsterigmatocystin oxidoreductase (Cytochrome P450)	XP_001839948	59	7,27	37	8,1
773	Hypothetical protein MGL_4179 - phosphoglycerate kinase	XP_001728700	44	5,83	43	10
	3-phosphoglycerate kinase	XP_001384704	44	5,61		
1288	Dilute domain-containing protein YPR089W	O13585; Q86ZS6	103	4,95		
	Phosphoglycerate mutase 1 family	ZP_06348185	22	5,46	27	7,9
1303	Phosphoglycerate mutase	XP_500435	27	5,78	27	7,5
110	putative protein CaO19,9837	XP_713964	26	4,86	27	9,6
1325	Phosphoglycerate mutase like	XP_500435	27	5,78	27	7,8
231	Peroxioredoxine PRXS	O74887	21	5,37		
		Q5MJG6	22	5,07	22	5,3





**FIG. 6.** Intracellular protein profile of *Brettanomyces* cells maintained in sulfite stress for three days.

Green spots correspond to identified proteins whose quantity is lower in VBNC state.

Red spots correspond to identified proteins whose quantity is higher in VBNC state.

Blue spots correspond to non-identified proteins.

## Discussion

Sulfur dioxide ( $\text{SO}_2$ ) is the preservative most commonly added to as a way to control the growth of spoilage microbes during wine-making, but its effects on *B. bruxellensis* populations are poorly understood. Although the existence of VBNC-like phenomena in *B. bruxellensis* upon  $\text{SO}_2$  addition has been suggested by Du Toit *et al.* (2005), Millet *et al.* (1995) and Agnolucci *et al.* (2010), nor the ability to regain culturability, nor morphological and large-scale metabolic changes so far have been conclusively described. However, the VBNC state is regarded as a significant mean of survival if the cells are able to increase metabolic activity and to become culturable again (Oliver, 2010). In the current study, we managed to confirm the ability of *Brettanomyces* to enter a VBNC state, and we clearly demonstrated for the first time, resuscitation from this state. Actually, our results indicated that *B. bruxellensis* became non culturable after one day in response to sodium metabisulphite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) addition but remained viable as assessed by fluoresceine diacetate

labeling (Fig. 1). This observation agrees with the antimicrobial action of sulfite that has been ascribed to the dissolved  $\text{SO}_2$  form (Schimz 1980), and with the hypothesis according to which potassium metabisulfite may induce a viable but non culturable state in the spoilage yeast *Brettanomyces* (Agnolucci *et al.*, 2010). Moreover, stressor removal by pH modification in the growth medium allowed VBNC cells exiting non culturability, thus demonstrating the resuscitation ability of *Brettanomyces* VBNC cells (Fig. 1). Proving for a true resuscitation of cells from the VBNC state, using simple reversal of the stress (temperature shift, starvation inhibition), was previously described in prokaryotic cells (Oliver 2010), but to our knowledge, this is the first demonstration in eukaryotes.

The ability to control the conditions for VBNC entry/exit of *Brettanomyces*, thus allowed us going further in the characterization of this state. Although *Brettanomyces* is not a pathogenic microorganism *per se*, wine spoilage by compounds produced by this yeast is a worldwide problem in oenology-related processes. As a result, it happens very important to assess whether or not spoilage compounds production persists in VBNC cells upon  $\text{SO}_2$  exposure. To investigate this point, we compared, between control, VBNC and exit VBNC cells, amounts of volatile phenols, which are regarded as the main contaminant components in wine. Consistent with the results obtained by Agnolucci *et al.* (2010), our data confirmed the ability of VBNC *Brettanomyces* to produce 4EP and 4EG, even though their amounts were roughly half reduced compared to control (Fig. 4). Consequently, VBNC *Brettanomyces* cells also can be regarded as wine spoilage microorganisms upon sulfite treatment. This conclusion is partly reminiscent of what observed with pathogenic bacteria after entering a VBNC state for which virulence capacity has frequently been shown to be preserved (Rahman *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2008; Oliver and Bockian, 1995).

In bacteria, a frequent phenomenon that parallels VBNC entry is a reduction in cells size that has been ascribed as a mechanism to minimize energy needs (McDougald *et al.*, 1998). To test whether this morphological change may also occur in *Brettanomyces*, both granulometry- and cytometry-based-quantification methods were compared for  $\text{SO}_2$ -stressed cells and control treatments. Results showed a 22% size decrease in VBNC *Brettanomyces* cells relative to that recorded for viable and culturable cultures (Fig. 2), thus suggesting that a modification in energy-related processes also occurs upon VBNC entry. This observation was previously hypothesized in  $\text{SO}_2$ -treated *Brettanomyces* (Agnolucci *et al.*, 2010), but data were not provided by the authors to support this proposition. Furthermore, our results are consistent with findings for VBNC psychrophilic marine *Vibrio* bacterial cells that have been shown to undergo a 1  $\mu\text{m}$  diameter decrease in size after two weeks of starvation (Novitsky *et al.*, 1976). In *V. cincinnatiensis*, normal cells were found to be mostly curved rods

displaying a 1.8  $\mu\text{m}$ -length, whereas entry into the VBNC state resulted in a gradual change in shape, from curved rods to coccoids, with a mean radius of 0.2  $\mu\text{m}$  (Zhong *et al.*, 2009).

Concomitant to a cells size decrease, we also recorded additional morphological changes corresponding to granular material deposits on the VBNC yeast cell wall (Fig. 3). Surface modifications upon VBNC state entry have been reported in bacteria (Citterio *et al.*, 2004; Signoretto *et al.*, 2002) and have been observed by Namiki *et al.* (2011) after protoplast regeneration in the yeast *Candida glabrata*, in which they were described as mannoproteins having role in cell wall modifications. Additionally, cell wall vesicles have been identified as peroxisomes in *Candida tropicalis* (Osumi, 1998). In *Brettanomyces*, cell surface changes also may result from a sulfite stress in that Park and Hwang (2008) reported a two/three fold induction in genes encoding cell wall mannoproteins in *S. cerevisiae* upon  $\text{SO}_2$  exposure. Taken together, the morphological changes we detected upon sulfite treatment demonstrate that in *Brettanomyces*, the VBNC state is clearly distinct from control stage, and argue for the conservation of common shape responses upon non culturability in yeast and bacteria.

Whether some molecular bases for VNBC entry also may be shared between eukaryotic and prokaryotic cells so far have remained unexplored. Actually, in yeasts such as in *S. cerevisiae*, proteomic and transcriptional responses have been studied, in particular for sulfite and oxidative stresses (Kim *et al.*, 2007; Park and Hwang, 2008), but not for the VBNC stage. Likewise, although about 60 prokaryotic species have been reported to enter a VBNC state (Oliver, 2005), less than 10 have been subjected to molecular analyses. In order to reveal at a large-scale putative key actors of the VBNC state in yeast, we have thus compared in the current study the two-dimensional protein profiles between VBNC *Brettanomyces* cells and controls, which allowed us proposing oxidative stress as a driving-factor for VBNC entry.

Overall, one of the main results of the retrieved proteomic data pointed to an extensive protein modification pattern in VBNC cells compared to control in respect to lower molecular mass products and  $pI$  shifts relative to predicted mature forms (Fig. 6). The appearance of putative degradation protein products, which is consistent with the reduced accumulation of a carboxypeptidase Y inhibitor (Table 1), was particularly evident for key enzymes belonging to the glycolytic pathway such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and enolase (Table 2), suggesting a reduction in the glycolytic flux. These observations agree with previous studies reporting GAPDH as one of the most sulfite sensitive enzymes of the glycolytic pathway whose inhibition is responsible for the ATP depletion in *S. cerevisiae* cells (Hinze and Holzer, 1986; Maier *et al.*, 1986). It has been proposed that the rapid decrease in the ATP content in response to a low concentration of sulfite would lead to an interruption of all ATP dependent processes (Schimz and Holzer, 1979), which might thus corroborate the reduction in cells size we observed in *Brettanomyces* after VBNC entry (Fig. 2).

In the mean time, there were also evidences that SO<sub>2</sub> triggered protein modifications (pI shifts or degradation) in several NADH/NADPH dependent mitochondrial enzymes, including a kynurenine-3-monooxygenase, an alcohol dehydrogenase III and a cytochrome P450 (Table 1 and 2). Overall, both reduction in the glycolytic pathway and in mitochondrial oxydo-reductases suggest these cofactors may not be available enough in VBNC *Brettanomyces* cells as proposed in sulfite treated *S.cerevisiae* (Park and Hwang, 2008). NADPH is required for numerous biosynthesis enzymatic reactions and antioxidant mechanisms involving glutathione (GSH) and thioredoxine. In this respect, a Cys-Gly metallopeptidase Dug1 having a role in GSH degradation, displayed a decreased abundance in VBNC cells, supporting an increase need in antioxidant molecules upon SO<sub>2</sub> addition. Likewise, we observed a reduced accumulation in two type III alcohol dehydrogenases that may function as glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase enzymes (Table 1). Concordant with the existence of changes in redox potential in VBNC cells induced by SO<sub>2</sub> relative to controls, was the detection of modifications in a glutaredoxine-like and in two peroxiredoxines isoforms (Tables 1 and 2). Peroxiredoxines constitute a family of thiol-specific peroxidases that reduce peroxides and are able to protect *S.cerevisiae* cells against death (Iraqi et al., 2009). In parallel, an increase in a Hsp 70 chaperone was observed concomitantly to the decrease in putative Hsp precursors (Tables 1 and 2), thus pointing to the involvement of a stress protection mechanism in the VBNC state in *Brettanomyces*. Remarkably, a role for oxidative stress coupled to a Hsp production has been recognized to function in VBNC induction in some bacteria including *V. vulnificus* (Oliver, 2010; Abe et al., 2007), suggesting that common molecular mechanisms may also exist between bacteria and yeast upon VBNC entry. Actually, culturability tests have revealed that *V. vulnificus* bacterial wild-type cells were sensitive to oxidative stress due to hydrogen peroxide and/or xenobiotic addition compared to a VBNC suppression mutant in temperature-induced shock conditions (Abe et al., 2007). Besides these mechanisms, it is likely that toxic compounds that accumulate in VBNC bacterial cells are excreted to sustain viability (Abe et al., 2007). In addition to protein profile modifications, we also observed vesicle-like structures previously described as peroxisomes (Osumi, 1998), on VBNC *Brettanomyces* cells (Fig. 3). Noteworthy, although identified with scoring spectra below our criteria (data not shown), several mannose-1-phosphate guanyltransferase isoforms were detected as differentially accumulated in VBNC *Brettanomyces* cells relative to controls (spots number 346 and 450). Because these enzymes are involved in cell wall synthesis where they are required for glycosylation, it thus may be that mannose metabolism and mannoproteins could also play role in the VBNC state of *Brettanomyces* (Namiki et al. 2011), as previously suggested in *S. cerevisiae* upon SO<sub>2</sub> exposure (Park and Hwang 2008).

Taken together, the data presented allow demonstrating conclusively the existence of a VBNC state in the spoilage yeast *Brettanomyces* upon SO<sub>2</sub> addition, as inferred from cell viability/culturability- and resuscitation-based experiments. The current study also showed that the VBNC state in *Brettanomyces* cells shares common morphological/physiological points with that of bacteria in that, as in prokaryotic cells, entry into the VBNC state in the yeast leads to a decrease in cell size and to the conservation of spoilage capacity. Additionally, our results also suggest for the first time conservation at a large-scale of some molecular mechanisms between yeast and bacteria upon VBNC entry. Notably, proteomic data argue for a reduced glycolytic flux coupled to changes in redox cell homeostasis and protection mechanisms in VBNC yeast cells relative to controls, as reported in several studies concerning the VBNC state in bacteria. Nonetheless, similar to previous proteomic studies in prokaryotic VBNC cells (Lai *et al.*, 2009; Heim *et al.*, 2002), no protein candidate could be suggested to be specific to VBNC *Brettanomyces*, so that it is still unknown whether the VBNC state in *Brettanomyces* is more related to sulfite toxicity than to an oxidative stress-independent response.

### **Acknowledgements**

We thank Christelle Guillier for technical assistance in proteomic experiments, the CLinical and Innovation Proteomic Platform for MALDI experiments and Maud Darsonval for microbiological technical assistance. We also thank Jeannine Lherminier and Aline Bonnotte for SEM experiments. This work was supported by BIVB, Inter-Rhône, FranceAgriMer and Regional Council of Burgundy.

Supporting Information

Table S1: Proteins with lower abundance in the VBNC state isolated from the 2-DE gel of total proteins from *Brettanomyces*

Spot number	Technique	Number of peptides	Sequences	Protein name	Accession number	Reference organism	Putative protein localization	Putative activity
52	MS/MS	2	KINVAAGTNPMLDRLG KLRGQVQYCAVKA	HSP60 precursor	Q74261	<i>Candida albicans</i>	Mitochondrial	Participates in assembly and/or disassembly of proteins in stress response
100	MS/MS	2	KNAVCTPAVAFNDQRQI KDAGLSTSDISEVLLVGGMSRMPJM	HSP 90.1 precursor	P12398	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrial matrix, Nucleus	Stress response
200	MS/MS	1	RQMTINDLPVGRS	Peroxisomal protein 1	Q74887	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cytoplasm, Nucleus	Physiologically important antioxidant that constitutes an enzymatic defense against sulfur-containing radicals.
293	De Novo	3	THLGGED TTSVVA DAVYTF	HSP 70	Q9U777	<i>Syngasteria platydictya</i>	Mitochondrial matrix, Nucleus	Stress response
316	MS/MS	1	KFGFTDLDLDTFRQI	Glutaredoxin like	XP_002555650	<i>Lactobacillus fermentans</i>	Cytoplasm, Nucleus	Cell redox homeostasis
341	MS/MS	1	RVYELLYCQI RVTYELLYCQI	Carboxypeptidase Y inhibitor	P14306	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cytoplasm	Specific and potent inhibitor of carboxypeptidase Y
528	MS/MS	1	KRFVLTGELRIG	Glycyl-methyltransferase dng1	Q9H612	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cytoplasm	Proteolysis. Has a Gly-Cys dipeptidase activity
574	MalDI	11	KCCQLPERVAVYAGVGGQLALAFQDRIG RASQPSNMLALSTRIG RSLNMLALSTRIGTGLRS KLGQVDFEHDKSAKLR RAGTTPPPALDASAHKWKY RAGTTPPPALDASAHKWLRLG RIRSSGGVDGKLR KIRSGHLEAFHLDAHILHIVPRH RKYMFIDLDQHESELYVALLYTKE RKYMFIDLDQHESELYVALLYTKE RALKWQPVTVLTL	Kromerine 3 monooxygenase	KM10_USTH4	<i>Ustilago zeylanidis</i>	Mitochondrial	Oxidation reduction
938	De novo	1	RFDTEALDF	Alcohol dehydrogenase III	Q68H14	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Mitochondrial	Oxidation reduction
939	De novo	1	RADSAEALDF	Alcohol dehydrogenase III	Q68H14	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Mitochondrial	Oxidation reduction
1152	De novo	2	DSMLKHLIENIQA MNYDAVG	Ubiquitinone biosynthesis monooxygenase (C01061)	P53318	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Membrane/ mitochondrial	Ubiquitinone biosynthesis
2256	MS/MS	1	RAVPSGASTSVHEALRLD	Endase	Q6C1E3	<i>Verticillium dactylophora</i>	Cytoplasm	Glycolysis

Table S2: Proteins induced in the VBNC state isolated from the 2-DE gel of total proteins from *Brettanomyces*

Spot number	Technique	Number of peptides	Sequences	Protein name	Accession number	Protein localization	Putative activity
4	De novo	2	VDNIEGVS <sup>TR</sup> AGLEKTTT	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q598A1	Cytoplasm	Glycolysis
11	De novo	2	VDNIEGVS EYAV	Glycerinaldehyde 3 phosphate dehydrogenase	Q85R18	Cytoplasm	Glycolysis
12	MSMS de novo	1	R.AIVPSGASTGVEALELR.D STGVHEALELR	Enolase	Q66LF3 Q870B9	Cytoplasm	Glycolysis
23	MSMS	1	K.IQIVGDDLVITNPKR.L	Fructose	P42894	Cytoplasm	Glycolysis
24	MSMS De novo	1 2	R.IHVPDGRKENQFAISGECK.N GKPVSPFHDIPLVADE FAFS	Inorganic pyrophosphatase [PP1]	P83777; Q359V59; Q559Y85 Q9C0T9	Cytoplasm	Hydrolase
26	De novo	2	VDNIEGVS <sup>HR</sup> FVAVS	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q85R18	Cytoplasm	Glycolysis
32	MSMS De novo	1 2	K.IQIVGDDLVITNPKR.L K.VNIGISLTSIOAAK.D THTTTADL AVAI	Enolase	P42894 Q756H2	Cytoplasm	Glycolysis
43	MSMS De novo	2 3	K.ADYDDNIVYGGSTL.L K.NQAALNPENTVTDAR.L VLTVPAYFENDAKR TVPAYFMDA VITVPAYFENDAKR	HSF70-chaperone Dfp, putative HSF 55B HSF70	XP_001227274.4 Q707X3 CAC844J2	Cytoplasm	Response to unfolded protein - stress response
110	MSMS	1	R.MAARFAATK.R	Hypothetical protein protease	XP_713964	Cytoplasm	Hypothetical protein protease
115	MSMS MSMS	1 1	R.AIVPSGASTGVEALELR.D K.IQIVGDDLVITNPKR.L	Enolase	Q66LF3 P42894	Cytoplasm	Glycolysis
231	MSMS De novo	1 2	R.QTINDIPVGR.S DYGVLLEDGVA LEAFK	Peroxisomal protein PXXS	Q748R7 Q5MUGG	Cytoplasm, Nucleus	Cell redox homeostasis
271	MSMS	2	R.AIVPSGASTGVEALELR.D K.IQIVGDDLVITNPKR.L	Enolase	Q66LF3	Cytoplasm	Glycolysis
285	MSMS De novo	1 1	R.AIVPSGASTGVEALELR.D ELGDDKAVF	Enolase	Q66LF3	Cytoplasm	Glycolysis
338	MSMS	1	R.KAQAELDAVIGRGL	O-tetrahydropyridinotetrahydroxyacetone oxidoreductase (Cytochrome P450)	XP_001839948	Mitochondrial	Oxidation reduction
378	De novo	1	VDNIEGVS <sup>IR</sup> VDNIEGVS <sup>TR</sup>	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	W033U1 Q75712	Cytoplasm	Glycolysis
389	De novo	2	WVYINFFKGS TTDQDN	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q6M6L3	Cytoplasm	Glycolysis
495	MSMS	1	K.GVAVNSNQESIVGAVGAVHRS	Fructose biphosphate aldolase	XP_002480088	Cytoplasm	Glycolysis
773	MSMS	2	R.VDFNVVPIDGERTNQR.L K.AVILASHIGRPNGER.V	Hypothetical protein MGL_4179 - phosphotriesterase kinase 3-phosphoglycerate kinase	XP_001728700 XP_001384704	Cytoplasm	Glycolysis
1013	De novo	3	VLAIRKVGNPFGDDELNRK VGNPFGDD VLMQVYGNPFGDDELNRK	Fructose biphosphate aldolase	Q66TK5	Cytoplasm	Glycolysis
1071	MSMS	1	R.AIVPSGASTGVEALELR.D	Enolase	Q66LF3	Cytoplasm	Glycolysis
1115	MSMS	1	R.AIVPSGASTGVEALELR.D	Enolase	Q66LF3	Cytoplasm	Glycolysis
1221	MSMS	1	K.IQIVGDDLVITNPKR.L	Enolase	P42894	Cytoplasm	Glycolysis

Table S2 (continued)

Spot number	Technique	Number of peptides	Sequences	Protein name	Accession number	Protein localization	Putative activity
1277	MSMS	1	KIQIYGGDILVYINPKRL	Enolase	P42894	Cytoplasm	Glycolysis
	De novo	2	KDSYKAGWGMVSHRS GDKAVFAGR GKYLDD		Q6W3C0 Q5XIV3		
1279	MSMS	1	KVNIQISLSTESIQAAKD	Enolase	Q756H2	Cytoplasm	Glycolysis
	De novo	2	DTTADLAVAV DDILVTIN		Q6U1S2		
1288	MSMS	1	RLSLSAHAIQRLL	Dilute domain-containing protein YP_R0891W	Q13585; Q862S6	Golgi apparatus	Protein of unknown function; exhibits genetic interaction with ERG11 and protein-protein interaction with Hsp82p
	De novo	2	SVNTPPPNG AAHGMS		ZP_06348185		
1302	MSMS	1	RAIVPSGASTGR/HEALELR.D	Phosphoglycerate mutase 1 family	Q6CLE3	Cytoplasm	Glycolysis
1325	MSMS	1	KTVLIAHGSLR.A	Phosphoglycerate mutase like	XP_500435	Cytoplasm	Glycolysis
1349	MSMS	1	KIQIYGGDILVYINPKRL	Enolase	P42894	Cytoplasm	Glycolysis
1373	MSMS	1	KGFLLDGFPR.L	Adenylate kinase	Q6CK57	Cytoplasm / Mitochondrion	Small ubiquitous enzyme involved in energy metabolism and nucleotide synthesis that is essential for maintenance and cell growth
1483	De novo	2	YDNEGYSTR AGICLTPSEVK	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q92263	Cytoplasm	Glycolysis
1504	De novo	2	YDNEGYSNR NNDAMYD	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P488L2	Cytoplasm	Glycolysis
1524	De novo	2	YDNEGY SHKD	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P00358	Cytoplasm	Glycolysis
1564	De novo	2	YDNEGYSTR AGICLTPSEVK	Glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q92263	Cytoplasm	Glycolysis
1617	MSMS	1	KIQIYGGDILVYINPKRL	Enolase	P42894	Cytoplasm	Glycolysis
	De novo	4	KVNIQISLSTESIQAAKD IEEELGDKAIFA ETEDVTIAD IVGDILTV IKKEY		Q756H2 Q6CLE3		
1994	MSMS	1	KIQIYGGDILVYINPKRL	Enolase	P42894	Cytoplasm	Glycolysis
	De novo	2	DTTADLAVAV DQIGDK		Q5YQ30		
2068	MSMS	1	KIQIYGGDILVYINPKRL	Enolase	P42894	Cytoplasm	Glycolysis
	De novo	4	IEEELGDKAIFA IVGDILVTIN SGETEDVTIAD KTGEEI		Q6CLE3		
2069	MSMS	1	KIQIYGGDILVYINPKRL	Enolase	P42894	Cytoplasm	Glycolysis
	De novo	3	EELGDKAIFA EIVTADLAV DDILVTIN		Q6CLE3		
2086	De novo	2	YDNEGYSHR EYVNS	glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Q8SR18	Cytoplasm	Glycolysis
2186	De novo	2	WYDNEGYSNR ASWYDNEGYNS	glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Q6FSM4	Cytoplasm	Glycolysis
	MSMS	1	KIQIYGGDILVYINPKRL		P42894		
2323	MSMS	1	RVNIQISLSTESIQAAKD	Enolase	Q756H2	Cytoplasm	Glycolysis
	De novo	1	RAIVPSGASTGR/HEALELR.D		Q6CLE3		

---

**References**

- Abe, A., E. Ohashi, H. Ren, T. Hayashi, and H. Endo.** 2007. Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*. *Microbiol. Res.* **162**:130–138.
- Agnolucci, M., F. Rea, C. Sbrana, C. Cristani, D. Fracassetti, A. Tirelli, and M. Nuti.** 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* **143**:76-80.
- Aloui, A., G. Recorbet, A. Gollotte, F. Robert, B. Valot, V. Gianinazzi-Pearson, S. Aschi-Smiti, and E. Dumas-Gaudot.** 2009. On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. *Proteomics* **9**:420-433.
- Barcina, I., and I. Arana.** 2009. The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **8**:245–255.
- Bestel-Corre, G., E. Dumas-Gaudot, V. Poinot, M. Dieu, J. F. Dierick, D. van Tuinen, J. Remacle, V. Gianinazzi-Pearson, and S. Gianinazzi.** 2002. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* **23**:122-137.
- Bogosian, G., N.D. Aardema, E.V. Bourneuf, P.J.L. Morris, and J.P. O'Neil.** 2000. Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* **182**:5070-5075.
- Byrd, J.J., J.G. Leahy, and R.R. Colwell.** 1992. Determination of plasmid DNA concentration maintained by nonculturable *Escherichia coli* in marine microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2266–2270.
- Citterio, B., A. Casaroli, L. Pierfelici, M. Battistelli, E. Falcieri, and W. Baffone.** 2004. Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiol.* **27**:353-360.
- Dhiaf, A., A. Bakhrouf, and K.P. Witzel.** 2008. Resuscitation of eleven-year VBNC *Citrobacter*. *J. Water Health* **6**:565-568.
- Divol, B., and A. Lonvaud-Funel.** 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* **99**:85-93.
- Du Toit, W.J., I.S. Pretorius, and A. Lonvaud-Funel.** 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbio.* **98**:862-871.
- Habermann, B., J. Oegema, S. Sunyaev, and A. Shevchenko.** 2004. The power and the

- limitations of cross-species protein identification by mass spectrometry-driven sequence similarity searches. *Mol. Cell. Proteomics*. **3**:238–249.
- Heim, S., M.M. Lleo, B. Bonato, C.A. Guzman, and P. Canepari.** 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.* **184**:6739-6745.
- Hinze, H., and H. Holzer.** 1986. Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch. Microbiol.* **145**:27-31.
- Iraqi, I., G. Faye, S. Ragu, A. Masurel-Heneman, R.D. Kolodner, and M.E. Huang.** 2008. Human peroxiredoxin Prx1 is an orthologue of yeast Tsa1, capable of suppressing genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* **68**:1055–1063.
- Jacob, J.** 2010. The systemic practice of misinterpretation of scientific data. Universal-Publishers Boca Raton, USA.
- Kell, D.B., A.S. Kaprelyants, D.H. Weichart, C.L. Harwood, and M.R. Barer.** 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Ant. van Leeuwenhoek* **73**:169-187.
- Kim, I., H. Yun, and I. Jin.** 2007. Comparative proteomic analyses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 strain against menadione-induced oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**:207-217.
- Lai, C.J., S.Y. Chen, I.H. Lin, C.H. Chang, and H.C. Wong.** 2009. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* **135**:118–124.
- Lindback, T., M.E. Rottenberg, S.M. Roche, and L.M. Rorvik.** 2010. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolated from salmon, patients and environment. *Vet. Res.* **41**:8.
- Lleò, M.M., S. Pierobon, M.C. Tafi, C. Signoreto, and P. Canepari.** 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4564-4567.
- Maier, K., H. Hinze, and L. Leuschel.** 1986. Mechanism of sulfite action on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Biophys. Acta Bioenerg.* **28**:120-130.
- Mathesius, U., G. Keijzers, S.H. Natera, J.JJ Weinman, M.A. Djordjevic, and B.G. Rolfe.** 2001. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **1**:1424–1440.
- McDougald, D., S.A. Rice, D. Weichart, and S. Kjelleberg.** 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**:1–9.

- Millet, V., N. Vivas, and A. Lonvaud-Funel.** 1995. The development of the bacterial microflora in red wine during ageing in barrels. *Journal Des Sciences et Techniques de la Tonnellerie* **1**:137-150.
- Millet, V., and A. Lonvaud-Funel.** 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl Microbiol.* **30**:136-141.
- Namiki, Y., K. Ueno, H. Mitni, E.V. Virtudazo, M. Ohkusu, K. Shimizu, S. Kawamoto, H. Chibana, and M. Yamaguchi.** 2011. Scanning and negative-staining electron microscopy of protoplast regeneration of a wild-type and two chitin synthase mutants in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *J. Electron. Microsc.* **0**: 1-9.
- Novitsky, J.A., and R.Y. Morita.** 1976. Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine *Vibrio*. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**:617–622.
- Oliver, J.D.** 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**:93-100.
- Oliver, J.D.** 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:415–425.
- Oliver, J.D., and R. Bockian.** 1995. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microb.* **61**:2620–2623.
- Osumi, M.** 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron.* **29**:207-233.
- Park, H., and Y. Hwang.** 2008. Genome-wide transcriptional responses to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol.* **46**:542-548.
- Quintana M., O. Palicki, G. Lucchi, P. Ducoroy, C. Chambon, C. Salles, and M. Morzel.** 2009. Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. *J. Proteomics.* **72**:822-30.
- Rahman, I., M. Shahamat, M.A.R. Chowdhury, and R.R Colwell.** 1996. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:115-120.
- Ramagli, L.S. and L.V. Rodriguez.** 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**:559-563.
- Rudi, K., K. Naterstad, S.M. Dromtorp, and H. Holo.** 2005. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**:301-306.
- Ruepp, A., A. Zollner, D. Maier, K. Albermann, J. Hani, M. Mokrejs, I. Tetko, U.**

- Guldener, G. Mannhaupt, and M. Munsterkotter.** 2004. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research*. **32**:5539–5545.
- Sun, F., J. Chen, L. Zhong, X.H. Zhang, R. Wang, Q. Guo, and Y. Dong.** 2008. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **64**:37–44.
- Signoretto, C., M.M. Lleò, and P. Canepari.** 2002. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol.* **44**:125-131.
- Schimz, K.L.** 1980. The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **125**:89–95.
- Schimz, K.L., and I.T. Holzert.** 1979. Rapid decrease of ATP content in intact cells of *Saccharomyces cerevisiae* after incubation with low concentrations of sulfite. *Arch. Microbiol.* **121**:225- 229.
- Schnürer, J., and T. Rosswall.** 1982. Fluorescein Diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microb.* **43**:1256-1261.
- Tholozan, J.L., J.M. Cappelier, J.P. Tissier, G. Delattre, and M. Federighi.** 1999. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1110-1116.
- WHO Food additives series 42.** Sulfur dioxide and sulfites. World Health Organization, Geneva, 1999.
- Zhong, L., J. Chen, X.H. Zhang, and Y.A. Jiang.** 2009. Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**:247-252

## **Conclusion et perspectives**

L'objectif de ces travaux était double. Il s'agissait d'une part de mieux comprendre l'état VNC décrit à plusieurs reprises chez les levures, notamment chez *Brettanomyces*. D'autre part, l'apport de connaissances sur cet état physiologique particulier pouvait servir de levier pour comprendre des observations réalisées dans des cas pratiques et proposer des moyens de contrôle de cette levure plus pertinents.

Les résultats obtenus en protéomique comparative par électrophorèse bidimensionnelle permettent de conclure à une diminution de l'activité métabolique au sein des cellules VNC. En effet, les modifications de l'abondance des protéines identifiées suggèrent une diminution du flux glycolytique et une augmentation du turnover des protéines. Le stress oxydant causé par l'ajout de sulfite pourrait limiter la disponibilité des cofacteurs NADH et NADPH. Dans la voie de la glycolyse, la glycéraldéhyde-3-phosphatase qui est NAD<sup>+</sup> dépendante est connue pour être l'activité la plus sensible au stress oxydant. Son blocage se répercute sur la glycolyse dans son ensemble et limite donc la formation d'ATP dans la cellule. En lien avec cette hypothèse, les dosages de phénols volatils réalisés montrent une diminution de la production de ces composés par les cellules pendant un état VNC.

L'observation par granulométrie et par cytométrie d'une nette diminution de la taille moyenne des cellules en VNC comparées aux cellules en conditions normales de croissance, est cohérente avec la diminution de l'énergie cellulaire disponible et de l'activité métabolique. Elle est en accord avec les observations faites chez les cellules procaryotes, et laisse donc penser que l'état métabolique VNC chez les levures n'est pas catégoriquement différent de celui décrit chez les bactéries.

L'étude protéomique de l'état VNC chez *Brettanomyces* a montré, comme chez certaines bactéries, un lien fort entre le stress oxydatif et l'état VNC. Les voies métaboliques liées au stress oxydatif et à la détoxification semblent bien être mises en jeu. Cette étude met donc en question le rôle des oxydants dans l'entrée des cellules en état VNC. L'état VNC est-il la suite logique d'une réponse à un stress oxydatif ? Ou bien cet état métabolique peut-il être induit par d'autres voies ? Pour répondre à cette question, il serait très intéressant de trouver un autre moyen d'induire une entrée en VNC chez une levure.

Afin d'apporter d'autres connaissances sur l'état VNC des eucaryotes, il serait plus simple et plus efficace de travailler sur une levure dont le génome est séquencé, afin de déterminer au

mieux les protéines et gènes impliqués dans cet état par des études de comparaison de transcriptome et de protéome. En effet pour le moment aucun marqueur n'a pu être mis en évidence de l'état VNC, y compris chez les procaryotes. La possibilité de transformation génétique de *S. cerevisiae* donnerait la possibilité de pratiquer une mutagenèse aléatoire par mini-transposons et de rechercher des mutants résistants à l'entrée en état VNC, afin de déterminer quelles voies de signalisation et de métabolisme cellulaire sont les plus sollicitées.

L'étude de la bibliographie nous a indiqué que le sulfitage pouvait être à l'origine de l'entrée des cellules de *Brettanomyces* dans cet état VNC. Nous avons pu montrer que l'ajout de sulfite dans le milieu entraînait effectivement une entrée des cellules de *Brettanomyces* en état VNC. Selon la littérature, un facteur entraînant régulièrement la sortie de l'état VNC des cellules, est l'élimination de l'agent stressant. Après avoir testé plusieurs méthodes d'élimination du SO<sub>2</sub> actif du milieu (oxygénation, bullage en gaz inerte, dilution du milieu de culture), nous nous sommes finalement arrêtés sur une méthode physico-chimique consistant à augmenter le pH du milieu, limitant ainsi la part de SO<sub>2</sub> actif. Avec ces conditions, les cellules VNC ont pu être ressuscitées. D'un point de vue plus fondamental, il serait intéressant d'étudier la capacité des cellules à sortir de l'état VNC lorsqu'elles sont soumises à un stress sulfite plus long que celui appliqué pendant cette étude. Il serait en effet important de déterminer en conditions réelles au bout de combien de temps l'efficacité du sulfitage devient insuffisante et si des cellules en VNC sont toujours présentes et capable de sortir de cet état pour redevenir cultivables. De la même façon, il n'a pas été possible de déterminer si les cellules retrouvaient une capacité de production de phénols volatils identique à celle observée chez les cellules non stressées après une sortie de l'état VNC de plus longue durée.

D'un point de vue œnologique, nous avons précisé les conditions de sulfitage critiques pour l'état VNC de *Brettanomyces*. Une concentration en SO<sub>2</sub> moléculaire d'environ 0,8 mg/L, qui correspond à 30 mg/L de SO<sub>2</sub> libre, est optimale pour induire l'état VNC en vin synthétique. Or, c'est une dose qui peut être rencontrée régulièrement en condition réelles de vinification. Le risque de l'état VNC de *Brettanomyces* en vin est donc très probable et expliquerait les difficultés de détection rencontrées au court des vinifications en cas de contamination.

La méthode FISH-FCM de détection spécifique de *Brettanomyces* que nous avons développée est efficace, sensible et fiable. La mise en place de cette technique permet de quantifier directement *Brettanomyces* en vin contaminé, sans étape de concentration ni

d'isolement sur milieu gélosé spécifique. Grâce à sa rapidité (48h) et à son faible coût comparé à des méthodes de biologie moléculaire, l'hybridation *in situ* couplée à la cytométrie en flux pourrait effectivement être une nouvelle alternative pour la détermination des contaminations des vins.

Afin de valider la méthode dans les conditions œnologiques réelles, il sera nécessaire de réaliser diverses études en vins contaminés pour :

- déterminer la répétabilité de la méthode en menant l'étude sur une cinquantaine d'échantillons naturellement contaminés provenant de différents cépages,
- déterminer les limites de détection et de quantification de la méthode FISH-FCM en réalisant des mesures sur des populations allant de  $10^2$  à  $10^7$  cellules/ml et en les comparant aux résultats obtenus par quantification sur milieu gélosé,
- déterminer l'efficacité de la méthode à différents stades de l'élaboration du vin (moût, moût en FA, avant FML, après FML).

Ces étapes de vérification sont actuellement en cours dans le cadre d'une étude financée par Oséo.

Si ces étapes sont validées, la méthode de FISH-FCM pourrait alors être considérée comme une nouvelle méthode applicable en routine pour la détection et la quantification de *Brettanomyces* directement en vin. Cette méthode offre des possibilités d'évolution et d'amélioration importantes. En effet, l'utilisation de Quantum-Dot (Q-Dot) qui ont une intensité de fluorescence largement supérieure à celle offerte par les fluorochromes plus couramment utilisés comme les Alexa® peut être envisagée. La création de sondes spécifiques peut également être proposée pour plusieurs microorganismes différents. Par exemple dans le vin, on pourrait imaginer réaliser un suivi de FA ou de FML tout en vérifiant les contaminations éventuelles, et ce en une seule lecture avec cette technique de FISH-FCM. La cytométrie en flux et la maîtrise des marqueurs fluorescents pourraient permettre de multiplier les cibles détectées, grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques. Au-delà de la détection spécifique d'un microorganisme, on peut imaginer la détection d'un état métabolique, d'une protéine ou du produit d'une voie enzymatique. Par exemple, pour une détection de *Brettanomyces*, il pourrait être possible de détecter l'activité Vinyle Phénol Réductase en utilisant un substrat modifié donnant un produit fluorescent, dans ce cas précis un éthyl-4-phénol ou un éthyl-4-gaïacol.

Dans les cas où les levures *Brettanomyces* sont en état VNC dans un vin, la sortie de cet état au cours du temps, en lien avec la diminution de la teneur en SO<sub>2</sub> est une hypothèse très plausible. Le démontrer nécessiterait des études en cave sur plusieurs mois. La diminution de taille des cellules de *Brettanomyces* en VNC ayant été démontrée, il serait nécessaire de quantifier l'impact de ce changement de taille sur l'efficacité des filtrations

menées sur des vins contaminés. Ainsi, la méthode habituelle d'élimination qui nécessite d'abord un sulfitage, puis une filtration, pourrait éventuellement être modifiée pour une méthodologie inverse : d'abord une filtration pour éliminer un maximum de cellules, puis un sulfitage si nécessaire. On éviterait ainsi de diminuer la taille des cellules que l'on veut éliminer avant une étape de filtration.

Pour conclure, cette étude a permis d'enrichir les connaissances sur l'état VNC chez *Brettanomyces*. Ainsi, ces données pourront permettre une approche plus précise de la problématique de la contamination des vins par cette levure d'altération.

## Références bibliographiques

- Abe A, Ohashi E, Ren H, Hayashi T & Endo H** (2007) Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*. *Microbiological Research* **162**: 130-138.
- Adams BL, Bates TC & Oliver JD** (2003) Survival of *Helicobacter pylori* in a Natural Freshwater Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7462-7466.
- Agnolucci M, Rea F, Sbrana C, Cristani C, Fracassetti D, Tirelli A & Nuti M** (2010) Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology* **143**: 76-80.
- Agnolucci M, Vigentini I, Capurso G, et al.** (2009) Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *International Journal of Food Microbiology* **130**: 238-244.
- Aguilar Uscanga MG** (1998) Caractérisation cinétique et métabolique d'une souche de *Brettanomyces*. INP Toulouse.
- Aguilar Uscanga MG, Delia ML & Strehaiano P** (2000) Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis* : growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can J Microbiol* **46**: 1046-1050.
- Aguilar Uscanga MG, Délia ML & Strehaiano P** (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**: 157-162.
- Arvik T & Henick-Kling T** (2005) Synthèse: Apparition de *Brettanomyces bruxellensis*, multiplication et impact sur les arômes du vin. pp. 1-9.
- Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S & Makino S-i** Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology* **159**: 709-717.
- Asakura H, Makino S-i, Takagi T, Kuri A, Kurazono T, Watarai M & Shirahata T** (2002) Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiology Letters* **212**: 87-93.

- B**arata A, Caldeira J, Botelho R, Pagliara D, Malfeito-Ferreira M & Loureiro V (2008) Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology* **121**: 201-207.
- Barbin P** (2006) Contrôle et éléments de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. INP Toulouse.
- Barcina I & Arana I** (2009) The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **8**: 245-255.
- Barer MR** (1997) Viable but non-culturable and dormant bacteria: time to resolve an oxymoron and a misnomer? *J. Med. Microbiol.* **46**: 629-663.
- Barrett T** (1998) An investigation into the molecular basis of the viable but nonculturable response in bacteria. University of Aberdeen.
- Besnard V, Federighi M, Declercq E, Jugiau F & Cappelier J-M** (2002) Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* **33**: 359-370.
- Beumer RR, de Vries J & Rombouts FM** (1992) *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *International Journal of Food Microbiology* **15**: 153-163.
- Blondin B, Ratomahenina R, Arnaud A & Galzy P** (1982) A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnology and Bioengineering* **24**: 2031-2037.
- Boaretti M, del Mar Lleo M, Bonato B, Signoretto C & Canepari P** (2003) Involvement of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology* **5**: 986-996.
- Bogosian G & Bourneuf EV** (2001) A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep.* **2**: 770-774.
- Bogosian G, Morris PJJ & O'Neil JP** (1998) A Mixed Culture Recovery Method Indicates that Enteric Bacteria Do Not Enter the Viable but Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1736-1742.
- Bogosian G, Aardema ND, Bourneuf EV, Morris PJJ & O'Neil JP** (2000) Recovery of Hydrogen Peroxide-Sensitive Culturable Cells of *Vibrio vulnificus* Gives the Appearance of Resuscitation from a Viable but Nonculturable State. *J. Bacteriol.* **182**: 5070-5075.

**Bouix M, Grabowski A, Charpentier M, Leveau JY & Duteurtre B** (1999) Rapid detection of microbial contamination in grape juice by flow cytometry. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **33**: 31-38.

**Chaney D, Rodriguez S, Fugelsang K & Thornton R** (2006) Managing high-density commercial scale wine fermentations. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 689-698.

**Chatonnet P & Dubourdiu D** (1999) Using Electronic Odor Sensors To Discriminate among Oak Barrel Toasting Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 4319-4322.

**Chatonnet P, Dubourdiu D & Boidron JN** (1995) The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**: 463-468.

**Chatonnet P, Bourdiu D, Boidron J-N & Pons M** (1992) The origin of Ethylphenols in wines. *J. Sci Food Agric* **60**: 165-178.

**Chatonnet P, Dubourdiu D, Boidron J-N & Lavigne V** (1993) Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci Food Agric* **62**: 191-202.

**Chatonnet P, Masneuf I, Gubbiotti MC & Dubourdiu D** (1999) Prévention et détection des contaminations par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage des vins. *Rev. Fr. Oenol.* **179**: 20-24.

**Chiu S-W, Chen S-Y & Wong H-c** (2008) Localization and Expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under Different Stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7016-7022.

**Ciani M, Maccarelli F & Fatichenti F** (2003) Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**: 419-422.

**Citterio B, Casaroli A, Pierfelici L, Battistelli M, Falcieri E & Baffone W** (2004) Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiol.* **27**: 353-360.

**Colwell RR** (2000) Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Infect. Chemother* **6**: 121-125.

**Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ, Henick-Kling T & Bisson LF** (2006) Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**: 139-147.

**Cook KL & Bolster CH** (2007) Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 573-583.

**Cunningham E, O'Byrne C & Oliver JD** (2009) Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food Control* **20**: 1141-1144.

**Curtin CD, Bellon JR, Henschke PA, Godden PW & De Barros Lopes MA** (2007) Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research* **7**: 471-481.

**Day AP & Oliver JD** (2004) Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *J. Microbiol* **42**: 69-73.

**del Alamo M, Bernal JL, del Nozal MJ & Gómez-Cordovés C** (2000) Red wine aging in oak barrels: evolution of the monosaccharides content. *Food Chemistry* **71**: 189-193.

**del Mar Lleo M, Pierobon S, Tafi MC, Signoretto C & Canepari P** (2000) mRNA Detection by Reverse Transcription-PCR for Monitoring Viability over Time in an *Enterococcus faecalis* Viable but Nonculturable Population Maintained in a Laboratory Microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4564-4567.

**Delaherche A, Claisse O & Lonvaud-Funel A** (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy'*Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 910-915.

**Dhiaf A, Bakhrouf A & Witzel KP** (2008) Resuscitation of eleven-year VBNC *Citrobacter*. *J. Water Health.* **6**: 565-568.

**Divol B & Lonvaud-Funel A** (2005) Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology* **99**: 85-93.

**Dominguez C, Guillen DA & Barroso CG** (2002) Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta* **458**: 95-102.

**du Toit WJ, Pretorius IS & Lonvaud-Funel A** (2005) The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* **98**: 862-871.

**F**arthing JB, Rodriguez SB & Thornton RJ (2007) Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* populations in high-sugar Chardonnay fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**: 527-533.

**Fischer-Le Saux M, Hervio-Heath D, Loaec S, Colwell RR & Pommepuy M** (2002) Detection of Cytotoxin-Hemolysin mRNA in Nonculturable Populations of Environmental and Clinical *Vibrio vulnificus* Strains in Artificial Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5641-5646.

**Freer SN** (2002) Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**: 271-275.

**Fugelsang KC & Zoecklein BW** (2003) Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**: 294-300.

**G**arcía MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD & Abu Kwaik Y (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology* **9**: 1267-1277.

**Gilis JF** (1999) Etude de contamination de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*. INP Toulouse.

**Gourmelon M, Cillard J & Pommepuy M** (1994) Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol* **77**: 105-112.

**Guilloux-Benatier M, Chassagne D & Alexandre H** (2001) Influence de l'autolyse des levures après fermentation sur le développement de *Brettanomyces* dans le vin. *Int Sci Vigne Vin* **35**: 157-164.

**Gunasekera TS, Attfield PV & Veal DA** (2000) A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1228-1232.

**Gunasekera TS, Sorensen A, Attfield PV, Sorensen SJ & Veal DA** (2002) Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1988-1993.

**Harris V, Ford C, Jiranek V & Grbin P** (2008) *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**: 997-1006.

**Harris V, Ford C, Jiranek V & Grbin P** (2009) Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**: 1117-1127.

**Hayashi N, Arai R, Tada S, Taguchi H & Ogawa Y** (2007) Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. *Food Microbiology* **24**: 778-785.

**Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M, Rahman I, Stelma G, Grim C & Colwell RR** (1997) Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3585-3588.

**Heim S, Del Mar Lleo M, Bonato B, Guzman CA & Canepari P** (2002) The Viable but Nonculturable State and Starvation Are Different Stress Responses of *Enterococcus faecalis*, as Determined by Proteome Analysis. *J. Bacteriol.* **184**: 6739-6745.

**Hellborg L & Piskur J** (2009) Complex Nature of the Genome in a Wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* **8**: 1739-1749.

**Hereztyn Y** (1986) Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**: 127-132.

**Herrero M, Quiros C, Garcia LA & Diaz M** (2006) Use of Flow Cytometry To Follow the Physiological States of Microorganisms in Cider Fermentation Processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6725-6733.

**Jacob J** (2010) *The systemic practice of Mininterpretation of scientific data*. Boca Raton, Florida.

**Kana BD, Gordhan BG, Downing KJ, et al.** (2008) The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Molecular Microbiology* **67**: 672-684.

**Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR & Barer MR** (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 169-187.

**Kim I, Yun H & Jin I** (2007) Comparative proteomic analyses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377 strain against menadione-induced oxidative stress. *J. Microbiol. Biotechnol* **17**: 207-217.

**Kobayashi M, Shimizu H & Shioya S** (2007) Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **103**: 451-456.

**Lai C-J, Chen S-Y, Lin IH, Chang C-H & Wong H-c** (2009) Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology* **135**: 118-124.

**Larue F, Rozes N, Froudriere I, Couty C & Ferreira GP** (1991) Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **25**: 149-165.

**Lazaro B, Carcamo J, Audicana A, Perales I & Fernandez-Astorga A** (1999) Viability and DNA Maintenance in Nonculturable Spiral *Campylobacter jejuni* Cells after Long-Term Exposure to Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4677-4681.

**Lindbäck T, Rottenberg M, E., Roche S, M. & Rørvik L, Marit** (2010) The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Vet. Res.* **41**: 08.

**Lleò MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M & Canepari P** (2001) Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *Journal of Applied Microbiology* **91**: 1095-1102.

**Lonvaud-Funel A & Renouf V** (2005) Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barriques usagées. *Rev Française OEnologie* **211**.

**Maalej S, Denis M & Dukan S** (2004) Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response. *Microbiology* **150**: 181-187.

- Malacrinò P, Zapparoli G, Torriani S & Dellaglio F** (2001) Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* **45**: 127-134.
- Martorell P, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Fernández-Espinar MT, Loureiro V & Querol A** (2006) Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology* **106**: 79-84.
- Medawar W, Strehaiano P & Délia M-L** (2003) Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media. *Food Microbiology* **20**: 527-532.
- Millet V & Lonvaud-Funel A** (2000) The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* **30**: 136-141.
- Miot-Sertier C & Lonvaud-Funel A** (2007) Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 555-562.
- Mitrakul CM, Henick-Kling T & Egli CM** (1999) Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiology* **16**: 3-14.
- Muela A, Seco C, Camafeita E, Arana I, Orruño M, López JA & Barcina I** (2008) Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 28-36.
- Mukamolova GV, Kaprelyants A & Kell DB** (1995) Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**: 289-295.
- Mukamolova GV, Turapov OA, Kazarian K, Telkov M, Kaprelyants AS, Kell DB & Young M** (2002) The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Molecular Microbiology* **46**: 611-621.
- Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, Demina GR, Kell DB, Kaprelyants AS & Young M** (2006) Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Molecular Microbiology* **59**: 84-98.
- Murat M.L. & Gindreau E** (2006) Prévention du risque *Brettanomyces* par l'utilisation d'outils analytiques innovants et la gestion rigoureuse du process d'élaboration. *Revue des oenologues* **121**: 23-27.

**N**ilsson L, Oliver JD & Kjelleberg S (1991) Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* **173**: 5054-5059.

**Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N & Hase T** (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28**.

**Nyström T** (2001) Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archives of Microbiology* **176**: 159-164.

**O**liver JD (1993) Formation of viable but nonculturable cells. *Starvation in bacteria*, (Press P), New York.

**Oliver JD** (2000) The public health significance of viable but nonculturable bacteria. ASM Press, Washington DC.

**Oliver JD** (2005) The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology* **43**: 93-100.

**Oliver JD** (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 415-425.

**Oliver JD & Bockian R** (1995) In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2620-2623.

**P**ai SR, Actor JK, Sepulveda E, Hunter RL & Jagannath C (2000) Identification of viable and non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA. *Microbial Pathogenesis* **28**: 335-342.

**Panutdaporn N, Kawamoto K, Asakura H & Makino SI** (2006) Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella Typhimurium* strain LT2. *International Journal of Food Microbiology* **106**: 241-247.

**Park H & Hwang Y-S** (2008) Genome-wide transcriptional responses to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Microbiology* **46**: 542-548.

**Peynaud E & Domercq S** (1956) Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archives of Microbiology* **24**: 266-280.

**Phister TG & Mills DA** (2003) Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7430-7434.

**Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH & Heard GM** (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* **4**: 865-877.

**Quiros C, Herrero M, Garcia LA & Diaz M** (2009) Quantitative Approach to Determining the Contribution of Viable-but-Nonculturable Subpopulations to Malolactic Fermentation Processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2977-2981.

**Rahman I, Shahamat M, Chowdhury MA & Colwell RR** (1996) Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 115-120.

**Rayne S & Eggers NJ** (2008) 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol Concentrations in Barreled Red Wines from the Okanagan Valley Appellation, British Columbia. *Am. J. Enol. Vitic.* **59**: 92-97.

**Renouf V, Claisse O & Lonvaud-Funel A** (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**: 149-164.

**Renouf V, Delaherche A, Claisse O & Lonvaud-Funel A** (2008) Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **35**: 27-33.

**Renouf V, Falcou M, Miot-Sertier C, Perello MC, De Revel G & Lonvaud-Funel A** (2006) Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 1208-1219.

**Rice SA, McDougald D & Kjelleberg S** (2000) *Vibrio vulnificus*: a physiological and genetic approach to the viable but nonculturable response. *J. Infect. Chemother* **6**: 115-120.

**Rodrigues N, Gonçalves G, Pereira-da-Silva S, Malfeito-Ferreira M & Loureiro V** (2001) Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 588-599.

**Rodriguez SB & Thornton RJ** (2008) Use of flow cytometry with fluorescent antibodies in real-time monitoring of simultaneously inoculated alcoholic-malolactic fermentation of Chardonnay. *Letters in Applied Microbiology* **46**: 38-42.

**Rodríguez Vaquero MJ, Alberto MR & Manca de Nadra MC** (2007) Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **18**: 587-593.

- Romano A, Perello MC, Lonvaud-Funel A, Sicard G & de Revel G** (2009) Sensory and analytical re-evaluation of "Brett character". *Food Chemistry* **114**: 15-19.
- Rozès N, Garcia-Jares C, Larue F & Lonvaud-Funel A** (1992) Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acid analysis. *J. Sci. Food Agric* **59**: 351-357.
- Rudi K, Moen B, Dromtorp SM & Holck AL** (2005) Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1018-1024.
- Ruyskensvelde J.P., Vincent B., Naudin R., et al.** (2006) *Brettanomyces* et phénols volatils. *Les cahiers itinéraires d'itv France*.
- S****hung-Chang J., Lee F.L. & L. B** (1985) *Direct evidence of relationship between Dekkera and Brettanomyces.*
- Signoretto C, Lleo MM & Canepari P** (2002) Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol.* **44**: 125-131.
- Silva P, Cardoso H & Geros H** (2004) Studies on the Wine Spoilage Capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**: 65-72.
- Smith MT & Grinsven AM** (1984) *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 143-148.
- Sponholz WR** (1997) L'attività enzimatica dei lieviti e la stabilità del colore rosso dei vini. Vol. 24 ed.^eds.), p.^pp. 34-36.
- Stender H, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, et al.** (2001) Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from Wine by Fluorescence In Situ Hybridization Using Peptide Nucleic Acid Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 938-941.
- Suarez R, Suarez-Lepe JA, Morata A & Calderon F** (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* **102**: 10-21.
- Sun F, Chen J, Zhong L, Zhang X-h, Wang R, Guo Q & Dong Y** (2008) Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 37-44.

**T**chobanov I, Gal L, Guilloux-Benatier M, *et al.* (2008) Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiology Letters* **284**: 213-217.

**Telkov MV, Demina GR, Voloshin SA, et al.** (2006) Proteins of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases. *Biochemistry* **71**: 414-422.

**Tessonnière H, Vidal S, Barnavon L, Alexandre H & Remize F** (2009) Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology* **129**: 237-243.

**Tholozan JL, Cappellet JM, Tissier JP, Delattre G & Federighi M** (1999) Physiological Characterization of Viable-but-Nonculturable *Campylobacter jejuni* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1110-1116.

**Tonchev TA & Bambalov GK** (1968) Damage of dry wine as a result of the development of the yeast *Brettanomyces*. *Lozarstov i Vinarstov* **17**: 30-33.

**V**an Der Walt JP (1970) *The genus Dekkera*. Amsterdam.

**Vasserot Y, Caillet S & Maujean A** (1997) Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**: 433-437.

**Vivas N & Glories Y** (1993) Les phénomènes d'oxydo-réduction liés à l'élevage en barrique des vins rouges : aspect technologique. *Revue française d'oenologie* **142**: 33-38.

**Vora GJ, Meador CE, Bird MM, Bopp CA, Andreadis JD & Stenger DA** (2005) Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 19109-19114.

**W**hitesides MD & Oliver JD (1997) Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1002-1005.

**Wijsman MR, Dijken JP, Kleeff BHA & Scheffers WA** (1984) Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custers effect). *Antonie van Leeuwenhoek* **50**: 183-192.

**Wong HC & Wang P** (2004) Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 359-366.

**Woolfit M, Rozpedowska E, Piskur J & Wolfe KH** (2007) Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic Cell* **6**: 721-733.

**Xu HS, Roberts NC, Singleton FL, Atwell RW, Grimes DJ & Colwell RR** (1982)

Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment *Microb. Evol.* **8**: 313-323.

**Zhong L, Chen J, Zhang Xh & Jiang Ya** (2009) Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into

viable but nonculturable state and its resuscitation. *Letters in Applied Microbiology* **48**: 247-252.

## Résumé

L'état Viable Non Cultivable (VNC) a été observé et décrit chez de nombreuses espèces bactériennes. Mais cet état métabolique a également été suggéré chez certaines cellules eucaryotes, et notamment chez les levures du vin comme *Brettanomyces*. L'état VNC chez cette levure a donc été étudié afin d'en déterminer les conditions d'entrée et de sortie, ainsi que les modifications morphologiques et métaboliques associées à cet état VNC. Une addition de sulfite (0,8 mg/L de SO<sub>2</sub> moléculaire) induit un état VNC chez *Brettanomyces*, et une inactivation de ce sulfite par modification du pH du milieu permet une sortie de l'état VNC de la levure par un regain de cultivabilité. Dans les conditions VNC, la taille moyenne des cellules de *Brettanomyces* a été déterminée comme diminuée de 22% comparée à leur taille en condition contrôle. Ensuite, la capacité des cellules à produire des phénols volatils, éléments de contamination des vins, est conservée même lorsque les cellules sont en état Viable Non Cultivable. De plus, l'étude comparative des protéomes entre cellules de *Brettanomyces* témoin et cellules en état VNC montre une modification du métabolisme avec une diminution de la synthèse d'ATP compensée par une augmentation des protéines impliquées dans d'autres voies métaboliques de production d'énergie. Cette étude met donc en évidence pour la première fois l'existence de l'état VNC chez une espèce eucaryote et montre des points communs avec l'état VNC chez les cellules procaryotes. L'existence de cet état VNC chez *Brettanomyces* peut également engendrer des erreurs de détection. Un nouvel outil de détection par hybridation *in situ* et lecture par cytométrie en flux a donc été mis en place. Cette méthode permet ainsi la mise en évidence des cellules de *Brettanomyces* présentes en vin de façon efficace et rapide.

## Abstract

The viable but not culturable (VBNC) state has been studied in detail in bacteria. It has been suggested that the VBNC state also exists in eukaryote cells, such as wine yeasts, including *Brettanomyces* in particular. We investigated the VBNC state in this yeast, focusing on the conditions for entry and exit, and the morphological and metabolic modifications associated with this state. We added sulfite (0.8 mg.L<sup>-1</sup> molecular SO<sub>2</sub>) to induce the VBNC state. Increasing the pH of the medium inactivated the sulfite, allowing the cells to exit from the VBNC state and to become culturable again. In these conditions, we found that *Brettanomyces* VBNC cells were smaller than culturable cells, and that spoilage by volatile phenols could persist during VBNC state. Furthermore, according to our proteome comparison, it seems that the blockade of ATP synthesis was compensated by an increase in energy-producing metabolism pathway. This study provides the first insight into the VBNC state in eukaryote cells, showing common trend to the VBNC state of prokaryotic cells. The existence of VBNC state in *Brettanomyces* cells can also provoke errors of detection. A new tool of detection by fluorescence *in situ* hybridization and reading by flow cytometry was thus set up. This method allows the revealing of *Brettanomyces* cells presence in wine in an efficient and fast way.

## Mots-clefs

*Brettanomyces*, Viable Non Cultivable, Contamination, Vin, Protéome, Hybridation *in situ*, Cytométrie en flux.