



LA DIGITALE PCR LA TECHNOLOGIE AU SERVICE DE LA SENSIBILITÉ

La problématique *Brettanomyces* en œnologie reste depuis des années au cœur des recherches et des besoins de développements analytiques. Afin d'alimenter cette évolution, le laboratoire EXCELL investit aussi bien dans la recherche fondamentale au travers de thèses comme la thèse FilmBrett qu'au niveau de ses équipements et ses méthodes.

Depuis près d'un an, un nouvel outil a rejoint la batterie d'analyses des *Brettanomyces* disponible au laboratoire EXCELL. Il s'agit de la PCR digitale. Cette technique innovante a émergé au moment de la pandémie COVID car elle assurait une sensibilité permettant d'assurer le suivi épidémiologique du virus dans les eaux usagées. Très rapidement les microbiologistes d'EXCELL se sont concentrés à appliquer la technologie analytique à la cible la plus recherchée en microbiologie du vin : *Brettanomyces* !

I. Perfectionner une méthode robuste mais limitée

Les méthodes de PCR ont nettement progressé depuis les premières utilisations. Une première génération de PCR appelée **PCR en point final** consistait à multiplier un ADN cible avant de mettre en évidence sa présence ou son absence. Cette analyse qualitative permettait par exemple d'attester la présence de *Brettanomyces* sans pour autant connaître la concentration précise et donc le risque inhérent.

Par la suite la **PCR quantitative** (ou PCR « en temps réel ») s'est développée. La multiplication de l'ADN cible est alors suivie par fluorescence (chaque brin néosynthétisé s'accompagnait d'une augmentation de la fluorescence, ce dernier suivi en temps réel est donc corrélé à la quantité d'ADN et donc de cellules initialement présentes dans l'échantillon). Le nombre de multiplications nécessaires pour atteindre une fluorescence seuil correspond alors à une concentration en cellules dans l'échantillon. Il s'agit d'une quantification dynamique. Cette méthode

permet de quantifier nombreux microorganismes dont les *Brettanomyces* dans les vins et ainsi mettre en évidence des populations plus ou moins importantes pour évaluer les risques. Objectiver spécifiquement la population de *Brettanomyces* en temps réel a été une avancée majeure dans la prévention de la contamination.

Ces dernières années, basé sur l'amélioration des connaissances génétiques des souches de *Brettanomyces*, l'ajout d'une caractérisation des courbes de fusion des bruns d'ADN néosynthétisés lors de la réaction de polymérisation de la PCR a permis d'ajouter l'identification de certains groupes de souches spécifiques à la quantification de la population totale. Cette technique est appelée le **TYP\Brett**. Elle fournit la population totale de *Brettanomyces* mais également le pourcentage de souches triploïdes résistantes au SO₂ et le pourcentage de souches triploïdes propices aux phénomènes d'adhésion (thèse FilmBrett).

À ce jour, le TYP\Brett est la seule analyse qui compile la précision de l'analyse génétique et la caractérisation de traits physiologiques particulièrement utiles aux praticiens. En cas de niveau de population élevée de *Brettanomyces*, l'action œnologique sera différente si les souches sont résistantes ou non au SO₂.

Très avantageuse, la PCR présente trois relatives fragilités. L'itération suivante évoque celles-ci par ordre d'importance :

La première, souvent injustement évoquée, concerne le risque de détection d'ADN de cellules mortes. Sur ce point il est important de rappeler l'importance du choix de la séquence cible à amplifier. Plus la séquence est courte (ce qui facilite la spécificité) plus la question peut se poser. Au laboratoire EXCELL nous avons déterminé une séquence suffisamment longue pour réduire ce risque.

La seconde découle du fait que l'amplification de l'ADN est une réaction enzymatique (action de la Taq polymérase) et que de nombreux inhibiteurs présents dans les vins, notamment les tanins, peuvent perturber. Il faut donc au préalable purifier les ADN extraits ce qui peut potentiellement faire perdre en sensibilité (il faut imaginer ces purifications comme des micro-collages : un produit (souvent de la PVPP) est ajouté pour piéger les tanins et s'en suit une réaction de séparation lors de laquelle il est possible de perdre une petite partie de l'ADN. Au laboratoire EXCELL de nombreux travaux et un effort d'investissement il y a 3 ans a permis d'automatiser ces étapes et d'assurer un seuil de détection relativement bas de la PCR : 10 cellules par millilitre (alors que la plupart des autres techniques PCR proposées assurent seulement 100 cellules par millilitre en moyenne). Néanmoins dans certains cas comme le contrôle à la mise en bouteilles (où 10 cellules par millilitre correspondent tout de même à 7 500 cellules par bouteilles) ou bien les contrôles d'hygiène ou la recherche des *Brettanomyces* sur les raisins au vignoble, il nous semblait pertinent d'essayer de travailler à améliorer ce seuil

La troisième est que le suivi de l'apparition d'une fluorescence en temps réel nécessite une rigueur du matériel mais également une gamme afin de calibrer le nombre de cycles (multiplications d'ADN) correspondant à une certaine concentration. Au laboratoire EXCELL, à chaque série d'analyses de Q-PCR, une gamme de calibration est systématiquement repassée (+ contrôles positifs, contrôles négatifs des étapes d'extraction et d'amplification). Ces incontournables pour rendre un résultat satisfaisant d'un point de vue qualité alourdissent le coût de revient de l'analyse.

Afin de palier à ces limites, le recours à la nouvelle méthode, la PCR digitale, a semblé pertinent. La PCR digitale du laboratoire, appelée D-PCR, repose sur la première génération de PCR tout en les rendant quantitatives. Les avancées techniques en termes de micro-fluidique ont permis de mettre en place une dispersion d'un échantillon en des milliers de partitions.

Ainsi ce ne sont plus 1 mais près de 30 000 PCR point final qui sont réalisées par échantillon.

II. Comment cela fonctionne ?

La préparation d'une D-PCR est similaire à celle d'une Q-PCR, cependant avant de commencer les cycles de multiplication, les échantillons sont dispersés en 30 000 réactions. Cela a pour effet de diviser les ADN ciblés mais également les inhibiteurs. Si une réaction est bloquée par la présence d'inhibiteur, un seul faux négatif sera observé parmi plusieurs milliers. Par la suite la quantification repose sur une étude statistique des réactions positives et des réactions négatives. Il n'y a donc plus de suivi en temps réel de la fluorescence mais un dénombrement des réactions fluorescentes en fin d'analyse (Figure 1). L'analyse se protège donc d'une potentielle faille lors du suivi en temps réel. Elle repose donc sur une quantité dite « absolue ».

Enfin, l'utilisation de calculs statistiques permet de s'exempter de l'utilisation de gammes de calibration et ainsi limiter les besoins pour chaque analyse.

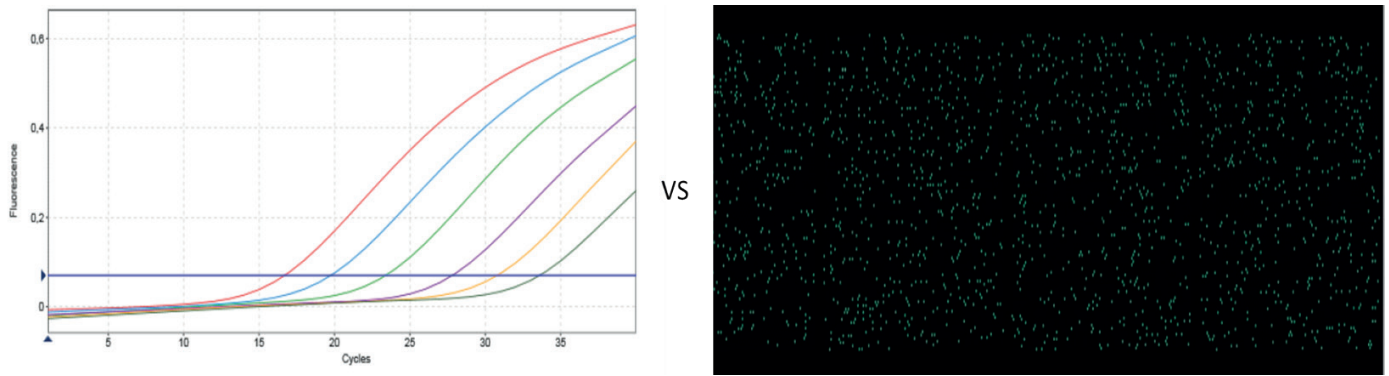


Figure 1 : Résultats bruts d'une Q-PCR (à gauche, l'exemple d'une gamme réalisée : le signal en rouge est produit à partir d'une population plus importante que celle du signal en bleu, elle-même liée à un population supérieure à celle du signal en vert...) et d'une D-PCR (à droite, les points de fluorescence verte sont les mélanges réactionnels positifs, ceux noirs sont négatifs).

La quantité de réactions mises en œuvre offrent une sensibilité de l'analyse accrue. Lorsque la Q-PCR permettait la détection à partir de 10 cellules par millilitres, la D-PCR permet la détection d'une cellule dans 10 millilitres d'échantillon. La sensibilité est donc 100 fois plus élevée lors d'une D-PCR.

Ce seuil peut se révéler important pour identifier le départ d'une contamination, comprendre la répartition des cellules au vignoble ou objectiver plus finement de l'absence de population après mise en bouteilles.

III. Les copies d'ADN

Dans le cas d'une D-PCR, puisque l'analyse se fait à l'échelle de la molécule d'ADN, la quantification est celle du nombre de copies d'ADN dans l'échantillon. Afin de simplifier la lecture des résultats, de nombreux échantillons ont été analysés au laboratoire et une corrélation entre la Q-PCR et la D-PCR a été développée. Ainsi les résultats d'une D-PCR sont indiqués en copies d'ADN mais également avec un équivalent en cellules par millilitres afin de faciliter l'interprétation et le pilotage induit par ces analyses.

IV. De nouvelles pistes de surveillances dans les itinéraires œnologiques

Durant ces vendanges, l'utilisation de la D-PCR a permis de mettre en évidence de faibles populations de *Brettanomyces* sur des raisins qui n'auraient pas pu être détectées par simple Q-PCR. Jusqu'alors les populations sur raisin étaient réputées pour être faibles et rares. Lors des analyses réalisées en 2023, il a été possible de montrer que l'occurrence de la présence de *Brettanomyces* n'était pas si faible que cela (près de 20% des échantillons de raisins ont été positifs). Des suivis des fermentations et des vins qui en découlent permettront de confronter ces inventaires au risque de déviation en phénols volatils (en lien avec les teneurs en précurseurs).

Pour conclure, cette présentation de la digitale PCR, nous évoquons le suivi de la mise en bouteilles d'un

partenaire du laboratoire qui jusqu'à présent réalisait le suivi de sa mise en bouteilles en Q-PCR. Le suivi en D-PCR a permis de montrer des détections dans 22% des bouteilles analysées post-mises.

La population moyenne était de 1 cellule /mL (soit 750 cellules par bouteille) avec des variations significatives entre les bouteilles. Toutes ces populations n'auraient pas été détectées en Q-PCR classiques (ni par les autres techniques d'analyses des *Brettanomyces*, cf. conclusion générale). Ces populations peuvent être à l'origine des évolutions parfois observées lors de la conservation en bouteilles. En affinant le seuil de détection la D-PCR s'impose comme l'analyse de choix pour le contrôle qualité des mises en bouteilles.

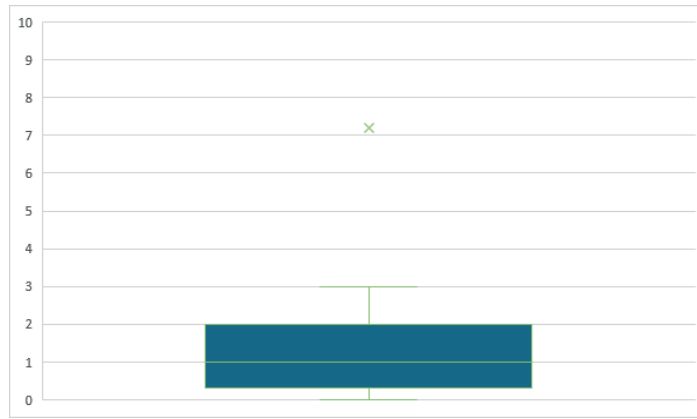


Figure 2 : Illustration des résultats de recherche de Brettanomyces par digitale PCR sur des échantillons de bouteilles prélevés après mise en bouteilles.

Conclusion générale

Le laboratoire EXCELL est le seul laboratoire disposant de toutes les techniques d'analyses microbiologiques pour le suivi de la problématique *Brettanomyces*. Cela permet de bénéficier des avantages de chaque technique (et de ses limites) en fonction des objectifs de l'analyse. Le tableau ci-dessous résume ces positionnements et indique les intérêts évidents de la D-PCR en termes de sensibilité et de coût (vs une Q-PCR).

	Critères de sélection				Période de mise en place de l'analyse microbiologique
	Rapidité	Spécificité	Sensibilité	Coût	
Observation microscopique à épifluorescence	+++	+	+	€€	<ul style="list-style-type: none"> • Fin de FA languissantes • Avant déclenchement de la FML (recherche d'<i>Oenococcus</i>) et observations des flores levuriennes concurrentielles • Lors d'une contamination suspecte (1^{ère} étape d'observation globale des populations)
Milieu de culture	-	++	+++	€	<ul style="list-style-type: none"> • Analyse préalable pour des contrôles d'implantation • Suivi analytique anticipé (délai) • Boîtes contact (contrôle de l'hygiène des surfaces)
PCR quantitative	+++	++	+++	€€€	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle rapide, notamment pendant les vinifications (lorsque la diversité microbienne est relativement importantes) • Possibilité de rechercher spécifiquement d'autres espèces de levures et de bactéries
D-PCR	+++	+++	++++	€€	<ul style="list-style-type: none"> • Pour contrôle pré et post mise en bouteilles • Prévenir un début de contamination (seuil de détection) • Adapté à l'analyse de raisins, moûts et vins • Utile dans les audits hygiène (sur eaux de rinçage du matériel, sur eaux stagnantes...).

	Critères de sélection				Période de mise en place de l'analyse microbiologique
	Rapidité	Spécificité	Sensibilité	Coût	
TYP/Brett	++	++++	+++	€€€	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi spécifique des populations de <i>Brettanomyces</i> • Outil décisionnel pour choisir le traitement le plus adapté en cas de contamination • Distinction des souches triploïdes résistantes au SO₂, des souches triploïdes adhérentes
Cytométrie en flux spécifique (sonde ARNr)	+++	+++	++	€€	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi des fins de fermentations : estimer un risque de ralentissement de l'activité fermentaire • Contrôle après une action de stabilisation de la microflore (ajout de chitosane, de SO₂...) ou de stress pour les microorganismes • Caractérisation de la viabilité des levains (crèmes de levures, prise de mousse...)

Figure 3 : Tableau comparatif des analyses réalisées au sein du laboratoire Excell sur la problématique *Brettanomyces*.

