



La microbiologie au laboratoire EXCELL et ses nouveautés !

LES MÉTHODES DISPONIBLES AU LABORATOIRE : LA MICROBIOLOGIE PUISSANCE 4

1 LA MICROSCOPIE À ÉPIFLUORESCENCE

Le microscope est l'outil indispensable de tout laboratoire. Le principe de l'épifluorescence est de rendre fluorescentes les cellules viables en utilisant leur activité estérase intracellulaire et un substrat de cette estérase, l'acétate de fluorescéine. Si les cellules sont viables elles hydrolysent l'acétate et libèrent la fluorescéine, fluorescente en vert. **Le niveau d'intensité de fluorescence est lié à l'intégrité des membranes cellulaires et à l'activité métabolique des cellules.** Lorsque les cellules sont mortes aucune fluorescence n'est émise. Les cellules vivantes apparaissent vertes sur le fond noir, avec un contraste très net, même pour des vins rouges très colorés. **Un dénombrement des populations de levures et bactéries est possible en déterminant le nombre moyen de cellules visualisées dans plusieurs champs microscopiques différents.**

L'épifluorescence permet **une vision globale de la charge microbienne et l'observation de la morphologie des cellules** permet de distinguer certaines populations très caractéristiques : par exemple le suivi des chainettes d'*Oenococcus oeni* est très utile pour estimer le début des fermentations malolactiques. Les cellules non cultivables qui échappent à l'analyse par les méthodes sur boîtes de Petri sont aussi comptées en épifluorescence. L'inconvénient majeur est le seuil de détection. Il est au mieux compris entre 10^2 et 10^3 cellules par millilitre de vin ce qui est suffisant pour s'assurer de l'implantation de germes bénéfiques (suivi des levures en cours de FA ou de bactéries pour la gestion de la FML) mais insuffisant pour gérer préventivement les problématiques d'altération microbienne (*Brettanomyces...*).

2 LES MILIEUX DE CULTURE

Il y a déjà plus d'une dizaine d'années, constatant que l'immense majorité des milieux de culture prêts à l'emploi étaient peu adaptés aux germes œnologiques, le laboratoire SARCO avait développé **des milieux de culture spécifiques des germes du vin** en se basant sur les recommandations de l'OIV et les recettes proposées par Lonvaud et al. 2010.

Depuis ces milieux ont connu de constantes optimisations afin de gagner en spécificité et en rapidité de lecture. De nombreux travaux ont aussi été menés pour rationaliser les outils de production. Cette production est désormais régie par un process strict et contrôlé : salle spécifique et équipe de spécialistes dédiés, autoclaves et automates adaptés, règles strictes d'hygiène (nous avons récemment intégré des lampes UV actives la nuit qui concourent à assainir les surfaces de travail...).

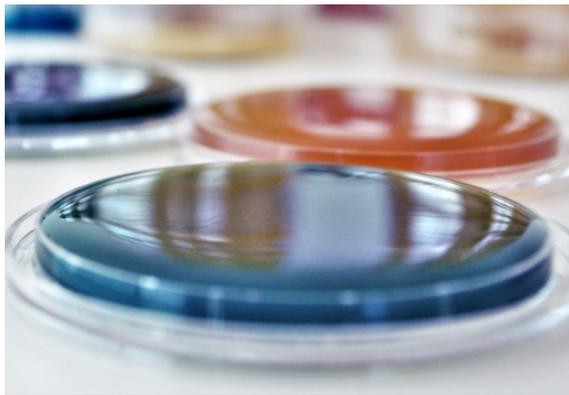
Un protocole de suivi qualité avec des tests de fertilité, sélectivité et spécificité à chaque lot de production assure la conformité de nos productions. La participation aux différentes chaînes inter-laboratoires permet également de consolider nos exigences de qualité et de reproductibilité de nos milieux.

Des développements ont également été menés pour proposer des milieux de culture spécifiques des microorganismes de la bière et des jus de fruits. Nous avons aussi intégré le dénombrement des germes pathogènes en suivant les recommandations de l'ANSES.

Au laboratoire pour l'inoculation des géloses nous travaillons avec des ensemencements en surface, en filtration et avec l'usage d'un automate assurant des ensemencements en spirale permettant de couvrir une large gamme de population. A chaque dénombrement deux boîtes de Petri sont ainsi systématiquement ensemencées.



Milieu de culture gélosé ensemencé en spirale



Boîtes de Petri en version contact

En outre nous pouvons proposer des milieux de cultures destinés à l'analyse des surfaces lors des contrôles d'hygiène (sol, mur, intérieur de cuves ou de barriques)..

Archaïques aux yeux de certains, les milieux de culture restent, comme la microscopie, des outils essentiels. Lors d'expertises complexes, ils permettent d'accéder physiquement à la biomasse ce qui assure par la suite d'associer des tests génétiques et des test physiologiques. Lors des analyses plus courantes, ils présentent un net avantage de coût. Leur inconvénient est évidemment le délai de lecture imposé par la croissance des cellules à la surface des géloses nécessaire à l'obtention du dôme cellulaire qui permet le dénombrement.

Nos capacités de production évoquées ci-dessus permettent aujourd'hui une grande flexibilité et nous pouvons également réaliser des développements à façon à la demande de partenaire (comme le développement de milieux liquide par exemple).

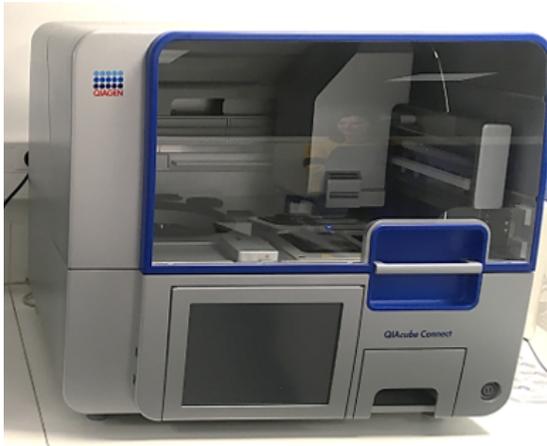
3 LA PCR

L'analyse microbiologique œnologique a connu un virage essentiel dans les années 2000 avec l'essor de la biologie moléculaire. La PCR est rapidement devenue une **technique de référence en offrant rapidité et spécificité**. En parallèle de cette intégration progressive de la PCR en œnologie, les dispositifs analytiques continuaient à se développer et à se préciser.

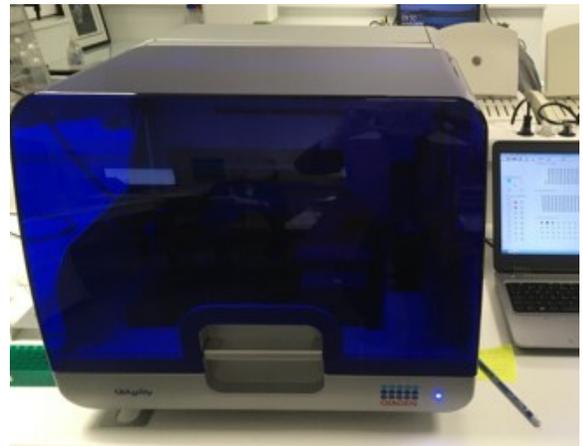
En 2018, 10 ans après l'acquisition de son premier thermocycleur, le laboratoire EXCELL a enclenché un important travail de modernisation de ses outils de biologie moléculaire. L'objectif était de pouvoir proposer des techniques de PCR basées sur les dernières innovations afin de ne pas se limiter à ce qui était originellement proposé en œnologie.

Ces travaux ont abouti à l'automne 2019 à l'intégration de nouveaux automates et à la validation de nouvelles méthodes encore plus performantes (**seuil de détection abaissé d'un facteur 10 !**).

D'abord plusieurs robots ont permis d'automatiser certaines étapes. Les premiers automates assurent l'optimisation de l'étape d'extraction de l'ADN et les seconds se chargent de l'étape de préparation des mix PCR. Puis nous avons sélectionné un nouveau thermocycleur, hyper-précis basé notamment sur la technique HRM (High Resolution Melting Curves) apportant un gain de sensibilité inégalé.



Automate d'extraction de l'ADN



Automate de préparation du mix d'amplification



PCR en temps réel

A la suite de ces travaux de sélection d'un matériel de pointe nous avons tenu à redévelopper les techniques de PCR en s'affranchissant des kits « tout préparés » disponibles dans le commerce et en concevant en interne nos mélanges réactionnels. Ces travaux assurent une vraie agilité permettant de s'adapter précisément à chaque cas de figure rencontré notamment en termes de sensibilité et de précision.

Si la Q-PCR *Brettanomyces* demeure la principale demande, nous pouvons aujourd'hui réaliser des PCR quantitatives spécifiques de nombreuses autres levures et bactéries : Q-PCR *Torulaspota*, Q-PCR *Metschikowia*, Q-PCR *Lachancea*, Q-PCR *Oenococcus oeni*... Nous disposons aussi de protocoles multiplex permettant de grouper plusieurs cibles en une seule réaction. Ce genre de dispositif est, par exemple, adapté au suivi des phases fermentaires notamment lors des stratégies de bio-protection où il est ainsi possible de suivre avec précision le développement des principales espèces de levures non-*Saccharomyces*.

Le test TYP\Brett développé fin 2018 pour détecter spécifiquement les souches de *Brettanomyces* résistantes au SO₂ profite aussi de ces innovations puisqu'il est désormais possible de réaliser le test en temps réel en basant la détection des différents groupes de souches par l'analyse des courbes de fusion (technologie HRM) lors des réactions PCR. Un article est en cours de finalisation, il vous sera prochainement proposé, il traitera spécifiquement de ce développement basé sur la technique HRM inédite en œnologie.

Le principe de la cytométrie de flux est le comptage de cellules selon des critères de tailles et de granulométrie définis. Les cellules contenues dans l'échantillon et rendues fluorescentes, défilent devant un faisceau laser. Le marquage peut utiliser les mêmes bases que l'épifluorescence ou d'autres systèmes plus complexes et le dénombrement consiste à mesurer la fluorescence émise par les cellules lors de leur passage devant le détecteur. Dans d'autres domaines agro-alimentaires (produits à base de lait, jus de fruits...) mais aussi pour certains diagnostics médicaux la cytométrie de flux a connu aussi d'importants développements ces dernières années.

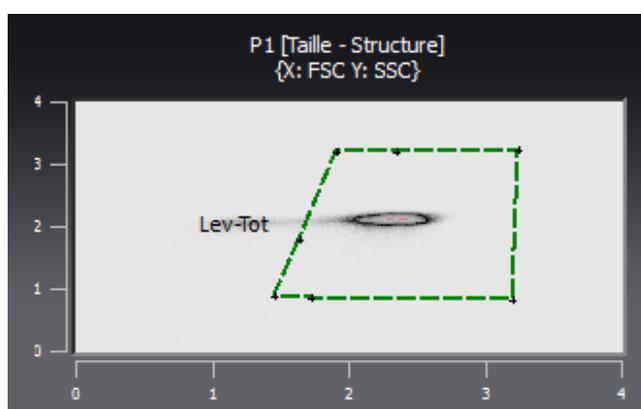
Au sein de nos laboratoires, il s'agit de la dernière technique à avoir été intégrée car les premiers dispositifs proposés en œnologie ne donnaient pas entièrement satisfaction. Les seuils de détection étaient relativement élevés et des dépendances fortes avec certaines caractéristiques de la matrice (turbidité, charge en polyphénols...) perturbaient la robustesse des essais. En 2018 un nouveau travail de sélection des outils a été mené, d'abord afin de caractériser précisément les populations de levures totales pour répondre aux demandes de caractérisation des levains liquides dans le cadre de prestations en brasserie ou de sélection de microorganismes indigènes en œnologie ou encore dans le suivi de process de prise de mousse. Puis nous avons travaillé sur un test spécifique de *Brettanomyces* en se basant sur un système de sondes ARN.

L'ARN messenger présente les mêmes avantages de spécificité que l'ADN ciblé en PCR mais cette cible se démarque par deux avantages essentiels :

1- L'ARN est une molécule simple brin donc plus fragile que l'ADN qui est double brin.

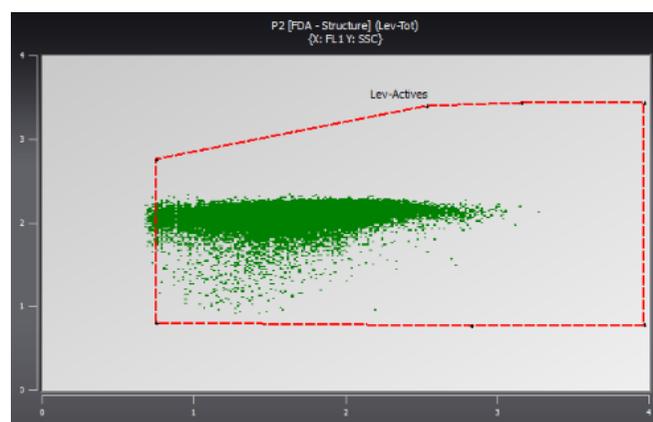
La probabilité de détecter des ARN issus de cellules mortes ou en déclin est donc nettement moins importante que celle de détecter de l'ADN de ces mêmes cellules

2- L'ARN messenger (ciblé par l'analyse) est issu de l'activité de transcription des gènes en protéines et donc le signe d'une véritable activité cellulaire. L'ARN messenger renseigne donc sur l'activité de la population microbienne ciblée ce qui permet de qualifier les populations (le risque d'altération par les phénols volatils est évidemment immédiatement plus important lorsque la population de *Brettanomyces* est une phase de croissance).



Exemple de dénombrement de la population de levures totales en cytométrie de flux

Exemple de dénombrement de la population de levures actives en cytométrie de flux



La cytométrie de flux est donc une alternative très intéressante mais son seuil de détection reste supérieur à celui de la PCR (cf. tableau ci-dessous). La technologie des sondes (sondes ARN spécifiques) implique aussi des coûts notables des consommables employés a fortiori lorsque, à des fins d'assurance qualité, de nombreux contrôles (contrôles positifs, contrôles négatifs, calibration...) sont intégrés dans les protocoles comme cela est le cas dans notre laboratoire. Dans tous les cas, Il est totalement illusoire de concevoir la cytométrie comme une technique « bon marché ».

A CHAQUE TECHNIQUE SON POSITIONNEMENT

Chaque technique présente donc ses avantages et ses inconvénients. Le fait de travailler au laboratoire chacune de ces techniques, nous permet d'adapter la technique à utiliser au stade de l'itinéraire et/ou à la problématique.

Le tableau ci-dessous résume ce pilotage.

	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 (1ère étape d'observation globale des populations)
Milieu de culture	-	++	+++	€	<ul style="list-style-type: none"> • Préparation à la mise en bouteilles : contrôler la population pour 75 cl de vin • Contrôle post-mise • 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 pendant les vinifications (lorsque la diversité microbienne est relativement importante)
Cytométrie en flux	+++	+++	++	€€	<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...)
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

Il est également essentiel de considérer que les analyses microbiologiques ne sont que des éléments de compréhension de phénomènes biochimiques et que les dosages des composés produits par ces métabolismes doivent également être suivis avec attention. Par exemple pour l'acidité volatile, les suivis analytiques ne consistent pas toujours à dénombrer les bactéries acétiques. De même pour les phénols volatils, outre les analyses microbiologiques évoquées ici, il ne faut pas oublier que la base consiste à analyser régulièrement les teneurs en phénols volatils, à condition bien sûr que ces dosages soient réalisés avec le maximum de soin possible (à cet égard nous vous invitons à relire notre article paru à l'automne 2019 intitulé « Assurer le suivi des phénols volatils avec qualité! »).

NOUVEAUTÉ : LA MESURE DE LA VITALITÉ BIOLOGIQUE DES SOLS VITICOLES

Au travers de certains développements (mesure du Delta C13, analyse du cuivre et d'autres résidus dans les sols...), le laboratoire EXCELL souhaite également proposer des outils analytiques en amont des vendanges.

Conscient de l'importance de la vie microbienne des sols viticoles, le laboratoire EXCELL a donc développé un test estimant la vie microbienne globale présente dans le sol. Son principe est basé sur l'ATP (adénosine-triphosphate), molécule impliquée dans le transfert de l'énergie au sein des cellules vivantes.

Le protocole mis au point au laboratoire consiste à :

- 1- remettre en suspension l'échantillon à analyser dans une solution stérile n'affectant pas la viabilité des microorganismes en présence
- 2- réaliser la mesure d'ATP intracellulaire microbien
- 3- quantifier le taux d'humidité de l'échantillon

L'ensemble de ces paramètres permettront de déterminer la **vitalité biologique par masse de matière sèche de vos sols**. Les résultats obtenus sont très prometteurs et permettent de confronter certains phénomènes (réponse au stress hydrique, présence résiduelle de cuivre ou d'autres résidus dans les sols...).

Il s'agit d'un des gros volets de développement de notre laboratoire pour l'année 2020 : n'hésitez donc à pas nous solliciter si vous souhaitez plus d'information à ce sujet.

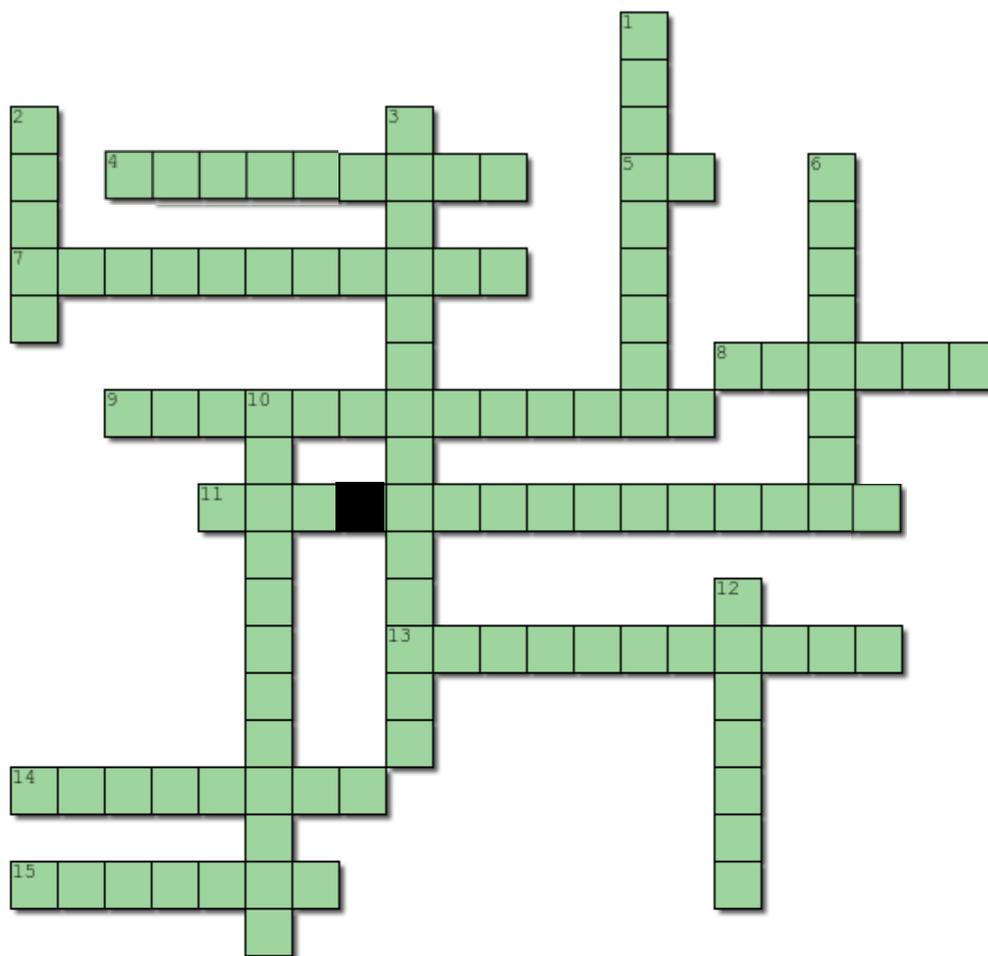
Pour tout renseignement technique :

Laëtitia Etourneau, Responsable du département Biologie : letourneau@labexcell.com

Sébastien Paillard, Responsable du secteur Expertises : spillard@labexcell.com

Vincent Renouf, Directeur Général : vrenouf@labexcell.com

Ci-dessous un jeu de mots croisés microbiologique pour rendre ludique cette science essentielle qu'est la microbiologie du vin. Les 3 premiers gagnants se verront proposer une journée d'immersion au sein de notre laboratoire pour suivre le traitement des échantillons et réaliser avec nos experts les analyses microbiologiques les plus sophistiquées. Les 5 gagnants suivants se verront remettre un livre de référence sur le sujet.



HORIZONTAL

4. Test de détection spécifique des *Brettanomyces* résistantes au SO₂ disponible au laboratoire EXCELL
5. En PCR quantitative cycle d'amplification à partir duquel le signal de détection devient supérieur au bruit de fond
7. Ancien nom d'*Oenococcus*
8. Bière de tradition dans laquelle *Brettanomyces* aime se développer
9. Principal genre de bactéries acétiques à la surface des raisins
11. Inventeur du microscope
13. Par ordre alphabétique les acronymes des 3 molécules connues impliquées dans les goûts de souris dont le dosage est possible au laboratoire EXCELL
14. Phénomène de régulation métabolique qui chez *Saccharomyces* réduit le métabolisme respiratoire en cas de concentrations élevées en sucres
15. Professeur d'œnologie de Bordeaux à l'origine de la découverte de l'enzyme malolactique

VERTICAL

1. Molécule produite par certaines bactéries lactiques voire par quelques levures et à l'origine des perceptions beurrées dans les vins
2. Sol qui en période de stress hydrique présente généralement une vitalité biologique relativement faible dans les premiers horizons
3. Élément constitutif des parois des bactéries dont la différence d'épaisseur permet de distinguer les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif
6. Molécule produite par certaines moisissures voire quelques bactéries sur les raisins et à l'origine des arômes de « betteraves »
10. Moisissure « inoffensive » noire très présente dans les chais traditionnels à la surface des murs, des plafonds
12. Autre nom du genre *Brettanomyces*

Une fois remplie, pour participer au jeu concours merci de nous renvoyer la grille avec vos coordonnées à cbergia@labexcell.com