

Étude comparative des performances du kit œnobiote pour la détection de *Brettanomyces bruxellensis* dans des échantillons de vin

Le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] emploie la technologie Fastgene™ de RT-qPCR rapide pour détecter de manière précise la présence de *B. bruxellensis* dans un échantillon de vin au cours des différentes étapes de sa vinification. En plus d'indiquer la concentration de cette levure, ce test permet d'évaluer sa viabilité en mesurant simultanément des biomarqueurs d'ADN et d'ARN caractéristiques de *B. bruxellensis*. L'introduction d'une levure témoin dans l'échantillon permet de garantir la fiabilité du résultat et la bonne exécution de l'ensemble des manipulations de réalisation du test. Le procédé complet, de l'échantillonnage au résultat, nécessite moins de 30 minutes en incluant le prétraitement par micro-ondes avec le µWave Lyser suivi d'une RT-qPCR au moyen du thermocycleur Chronos, développé par œnobiote.


Par sa rapidité, sa précision et sa facilité de mise en œuvre, ce test offre une solution inégalée pour la prévention de l'altération des arômes du vin.

Une étude comparative a été menée par quatre partenaires français experts en œnologie et indépendants. Ces quatre partenaires ont analysé au total **101 échantillons** de vins (rouge, blanc et rosé) à différents stades de la vinification et issus de différentes régions viticoles. Cette étude compare les performances du kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] à celles des trois principales méthodes alternatives : **deux tests commerciaux de qPCR, la culture sur boîte de Petri et la cytométrie en flux anti-*Brettanomyces***. Les caractéristiques des différentes méthodes sont synthétisées dans le **Tableau 1**.

La culture sur boîte de Petri présente les inconvénients d'un délai d'une dizaine de jours pour l'obtention des résultats et l'impossibilité de détecter les levures se trouvant dans un état viable mais non cultivable (VNC). A contrario, la cytométrie en flux

permet une analyse rapide et détaillée mais requiert un équipement onéreux et peut souffrir d'un manque de spécificité. En comparaison, les méthodes qPCR offrent de meilleures sensibilité et spécificité mais les produits actuellement sur le marché nécessitent une étape d'extraction des acides nucléiques et ne donnent pas d'information sur la viabilité des levures.

Tableau 1. Tableau comparatif des principales caractéristiques des méthodes utilisées.

	Culture	qPCR	Cytométrie en flux anti- <i>Brettanomyces</i>	
Temps	5 à 10 jrs	2 à 3 h	1 à 2 h	<30 min
Sensibilité	+	+++	+	++
Détection des VNC	✗	✓	✓	✓
Robustesse	++	-	++	++
Facilité d'emploi	-	+	-	++
Qualité de quantification	+	+	-	+
Estimation viabilité	✗	✗	✓	✓

Le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] détecte les levures viables mais non cultivables.

Le **Tableau 2** résume la comparaison des performances entre le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] et la méthode de culture sur boîte de Petri pour 28 échantillons de vins. Le kit œnobiote montre une **meilleure sensibilité**, due à sa capacité de **détection des cellules VNC**. Seul un échantillon s'est révélé positif par culture, mais négatif lors de l'analyse par le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*], avec une concentration détectée de seulement 14 cellules/mL après 10 jours de culture.

Tableau 2. Résumé des résultats obtenus avec la culture et œnobiote.

Boîte de Petri	œnobiote [<i>Brettanomyces bruxellensis</i>]		Total
	POS	NEG	
POS	15	1	16
NEG	9	3	12
Total	24	4	28

La concentration des échantillons positifs par culture montre une bonne corrélation avec celle mesurée avec le kit œnobiote (cf. figure 1, $R^2=0,654$ en excluant un point de mesure qui s'apparente à un quasi-VNC).

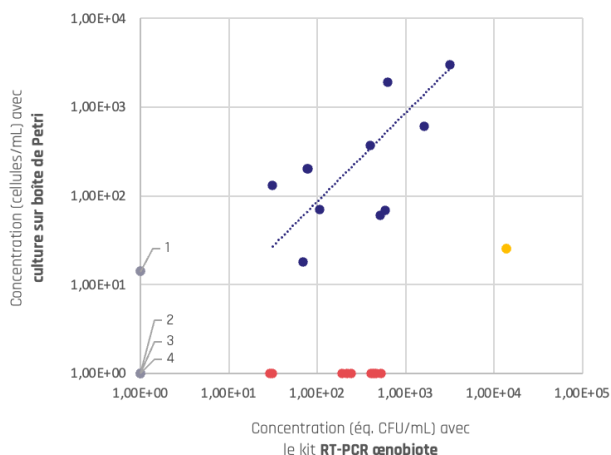


Figure 1. Corrélation entre les concentrations de *B. bruxellensis* mesurées avec la culture et le kit œnobiote - Les échantillons de vins positifs avec les deux méthodes d'analyse sont représentés en points bleus, avec

la droite de régression ($R^2=0,654$). Les échantillons de vins positifs avec le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] mais négatifs en culture sur boîte de Petri sont représentés en points roses sur l'axe des abscisses. Les trois échantillons de vins négatifs avec les deux méthodes sont représentés en point gris (2, 3 et 4). Le point gris (1) est l'échantillon très faiblement positif, avec une concentration de 14 cellules/mL après 10 jours de culture. L'échantillon s'apparentant à un quasi VNC est représenté par un point jaune.

Le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] est plus robuste et rapide que les kits de qPCR concurrents, et démontre une sensibilité < 10 CFU/mL.

Tableau 3. Résumé des résultats obtenus avec les kits concurrents de qPCR et œnobiote.

qPCR commerciales	œnobiote [<i>Brettanomyces bruxellensis</i>]			Total
	POS	NEG	INV	
POS	12	4	0	16
NEG	8	6	0	14
INV	2	8	2	12
Total	22	18	2	42

Le **Tableau 3** résume les résultats comparés de l'analyse de **42 échantillons** de vins avec la solution œnobiote et deux tests qPCR commercialisés par des entreprises concurrentes (voir notre Application Note à ce sujet pour plus de détails). Les protocoles de ces méthodes tierces utilisent un volume initial de 25 à 50 mL pour obtenir une meilleure sensibilité, à la différence du protocole œnobiote qui utilise un échantillon de 2 mL, choisi pour obtenir le meilleur compromis entre sensibilité, simplicité et robustesse du test.

La comparaison avec la Méthode 1 montre une meilleure sensibilité de la méthode tierce, notamment pour les échantillons très faiblement positifs (de concentration inférieure à 6 cellules/mL). En revanche, la solution œnobiote n'a engendré **que 2 résultats invalides**, à l'inverse de la Méthode 1 qui en a obtenu

10, soit 48%. Pour les échantillons détectés positifs avec les deux tests, les concentrations calculées montrent une bonne corrélation (cf. figure 2, $R^2=0,9461$).

La comparaison avec la Méthode 2 n'a donné **aucun résultat invalide** et démontre une **meilleure sensibilité** de la solution œnobiote, puisque 15 et 7 résultats positifs ont respectivement été obtenus avec œnobiote et la Méthode 2. Enfin, une corrélation correcte a été observée entre les quantifications des deux méthodes (cf. figure 2, $R^2=0,8241$).

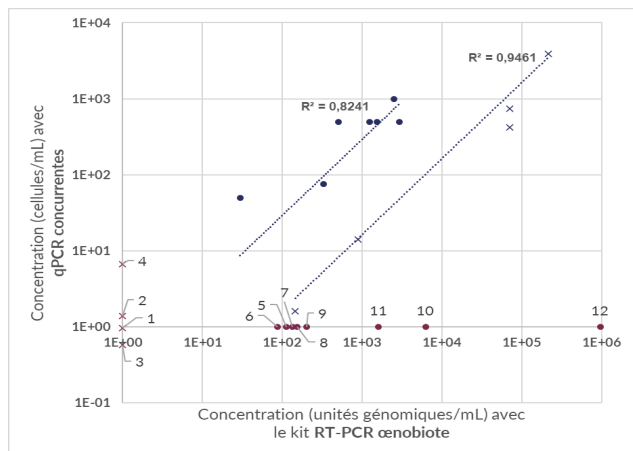


Figure 2. Corrélation entre les concentrations de *B. bruxellensis* mesurées avec le kit œnobiote et les qPCR concurrentes - Les croix (x) représentent la comparaison entre œnobiote et la Méthode concurrente 1, et les ronds (●) celle entre œnobiote et la Méthode concurrente 2. Les échantillons de vins positifs avec deux méthodes sont représentés en bleu, avec les droites de régression correspondantes. Les échantillons de vin négatifs avec une méthode et positifs avec l'autre sont représentés en violet (1 à 4, 5 à 12). Les échantillons négatifs avec les deux méthodes ainsi que les invalides ne sont pas représentés.

Le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] est plus sensible et plus quantitatif que la cytométrie en flux utilisant des anticorps anti-*Brettanomyces*.

Le **Tableau 4** montre les résultats pour les **33 échantillons** de vins analysés à la fois par cytométrie

en flux et par le kit œnobiote [*B. bruxellensis*], qui présente une **meilleure sensibilité**.

Tableau 4. Résumé des résultats obtenus avec la cytométrie de flux et œnobiote.

Cytométrie en flux anti- <i>Brettanomyces</i>	œnobiote [<i>Brettanomyces bruxellensis</i>]		Total
	POS	NEG	
POS	16	0	16
NEG	9	8	17
Total	25	8	33

Contrairement aux deux autres méthodes, pour les échantillons détectés positifs avec le kit œnobiote et la cytométrie en flux, les concentrations mesurées ne montrent pas de corrélation significative (cf. figure 3, $R^2=0,023$).

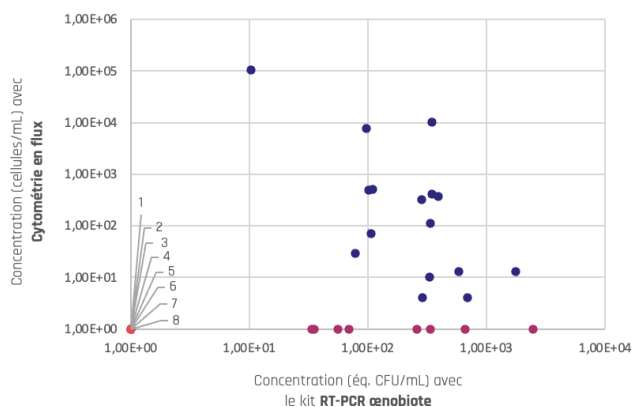


Figure 3. Corrélation entre les concentrations de *B. bruxellensis* mesurées avec la cytométrie en flux et le kit œnobiote - Les échantillons de vins positifs avec les deux méthodes sont représentés par des points bleus (droite de régression non représentée). Les échantillons de vins positifs avec le kit œnobiote [*B. bruxellensis*] mais négatifs en cytométrie en flux sont représentés par des points violets sur l'axe des abscisses. Enfin, les huit échantillons de vins négatifs avec les deux méthodes sont représentés par un point rose (1 à 8).

Le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] permet d'évaluer la viabilité des levures et l'impact d'un traitement.

En plus de démontrer une **sensibilité supérieure** à celle de la culture et de générer **moins de résultats invalides** que la méthode de qPCR tierce, la solution œnobiote introduit une dimension analytique supplémentaire : elle permet d'estimer la **viabilité de *B. bruxellensis*** par la mesure comparative de biomarqueurs en ARN et en ADN, fournissant ainsi des informations essentielles sur l'état métabolique de la levure. La **Figure 4** présente la distribution de l'**indice de viabilité de *B. bruxellensis***, mesuré sur les échantillons positifs.

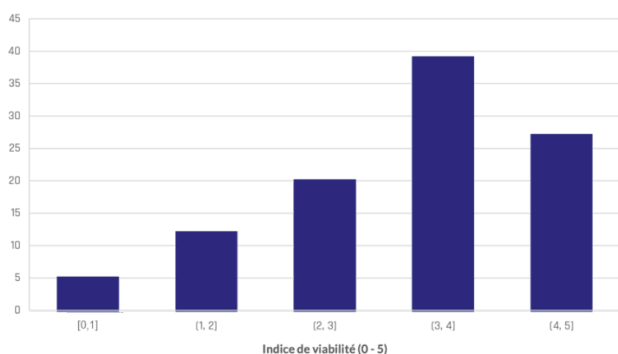


Figure 4. Distribution de l'indice de viabilité de *B. bruxellensis* - Parmi les échantillons testés, quatre correspondent à deux vins détectés comme positifs et ayant subi un traitement avec du sulfite ou du chitosan. L'analyse de ces vins avec le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] avant et deux jours après intervention montre l'effet de ces traitements sur la viabilité des *B. bruxellensis* (cf. figure 5). Dans les deux cas, le traitement a eu pour effet une réduction de la viabilité mesurée des cellules.

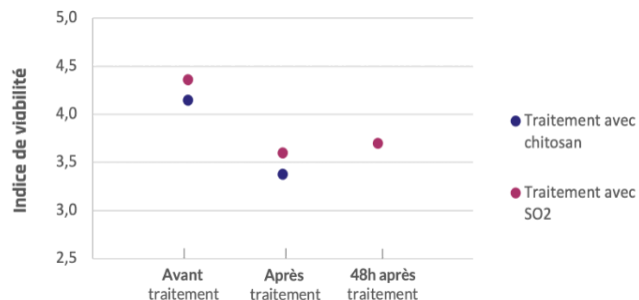


Figure 5. Effet du traitement aux sulfites et au chitosan sur la viabilité de *Brettanomyces bruxellensis* - En point bleu est représenté l'impact du traitement au chitosan pour un échantillon donné (avant et après traitement). En point violet est représenté l'impact d'un traitement aux sulfites jusqu'à 48 heures après traitement.

Dans le cadre de cette évaluation pilote, le kit œnobiote a été évalué par **trois laboratoires français indépendants** spécialisés dans l'analyse du vin. Cette évaluation a permis de comparer le kit à la culture traditionnelle, à un kit de qPCR tiers, et à la cytométrie en flux. L'étude a permis de mettre en évidence ses **avantages en termes de rapidité, de sensibilité, de spécificité et de facilité d'utilisation** (cf. tableau 1).

Le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] a démontré une meilleure sensibilité que la culture de levures grâce à sa détection des cellules VNC, et une meilleure robustesse que la méthode de qPCR tierce (absence d'invalides). De plus, par rapport à la cytométrie en flux utilisant des anticorps spécifiques à *B. bruxellensis*, le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] a détecté un nombre plus élevé d'échantillons positifs, offrant ainsi une sensibilité accrue et une meilleure corrélation avec les deux autres méthodes, notamment avec la culture en boîte de Petri, technique la plus couramment utilisée en laboratoire. Les tests réalisés sur un total de **101 échantillons** de vins ont validé l'efficacité de la solution œnobiote. Grâce à sa capacité à détecter rapidement et précisément *B. bruxellensis*, ainsi qu'à évaluer la viabilité et la concentration, le kit œnobiote [*Brettanomyces bruxellensis*] représente un outil innovant pour améliorer le contrôle de qualité du vin, et ainsi en réduire les risques d'altération.