



**MICROFLORA**

L'EXPERTISE EN MICROBIOLOGIE

# Analyses microbiologiques innovantes en oenologie

**Julie MAUPEU**

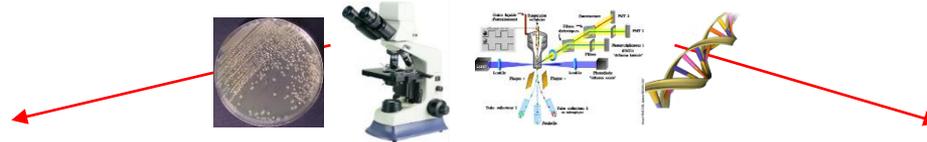
Rencontres INNOVINSEO  
23 Mars 2018, Toulouse

# Analyses microbiologiques en œnologie

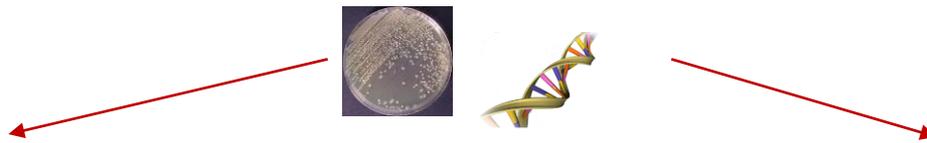
Levures

Groupe

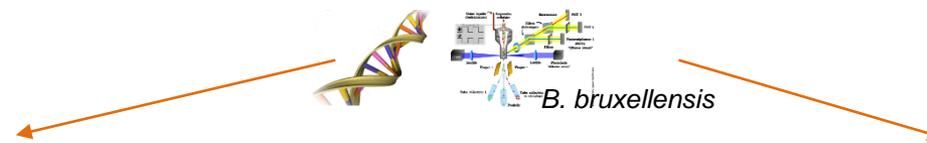
Bactéries



*Levures non Sacc* **Recherche/dénombrer des microorganismes** *éries lactiques*



*Saccharom* **Dénombrement de groupes/espèces de microorganismes** *eni*

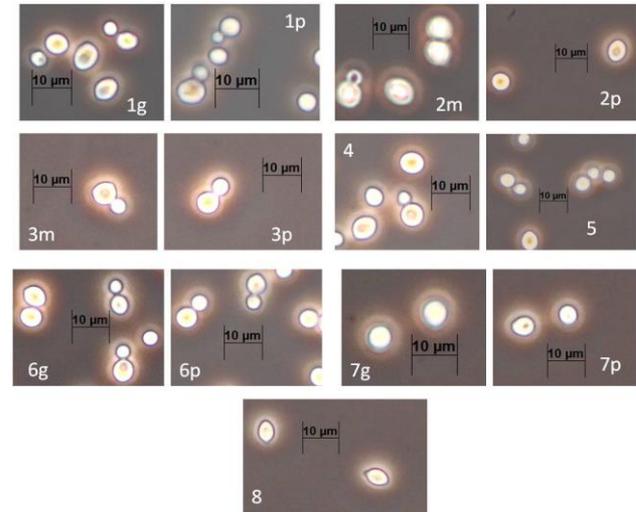
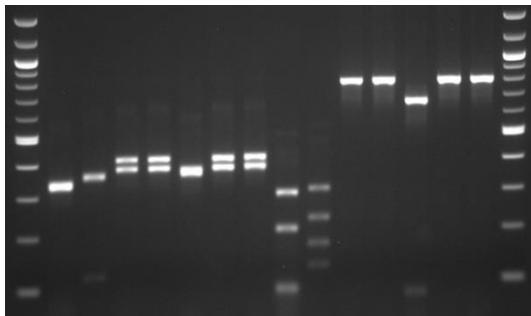


*S. cerevisia* **Dénombrement de groupes/espèces de microorganismes**  
**Identification d'espèce de levures/bactéries/moisissures** *VF, CH16*

**Rechercher/détecter/différencier des souches de levures ou bactéries:**  
**= uniquement biologie moléculaire PCR spécifiques (séquences particulières/ répétées/ RAPD)**

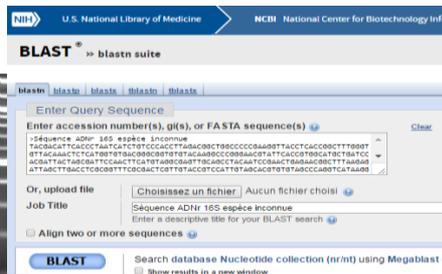
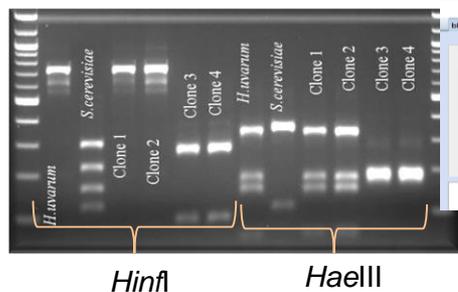


# Identifications de microorganismes



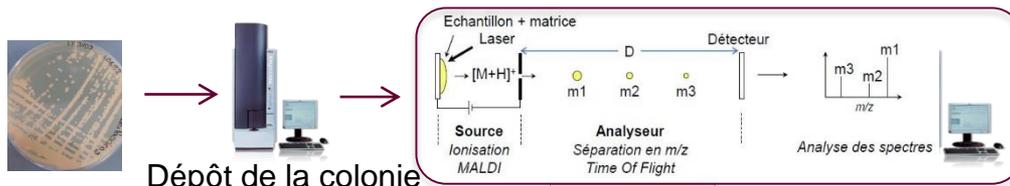
# Techniques

- Identification PCR-RFLP et séquençage :



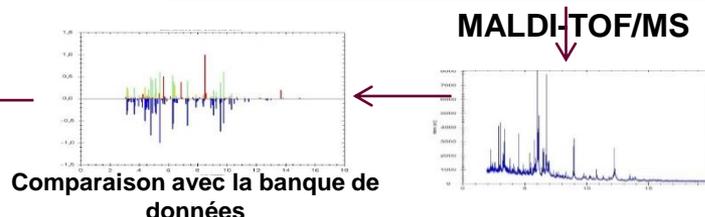
	Temps	Coût
(PCR-RFLP+) séquençage	+++	+++

- Identification par MALDI-TOF/MS



	Temps	Coût
MALDI-TOF/MS	+	+

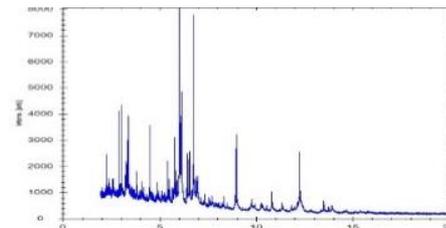
Identification de l'espèce de levure ou de bactérie



Étude menée 2015 : 90% de résultats similaires

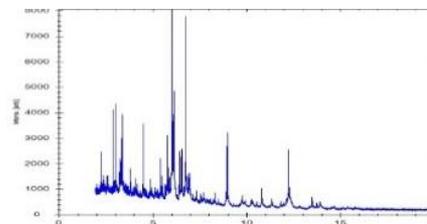
## Applications principales et intérêts à ce jour

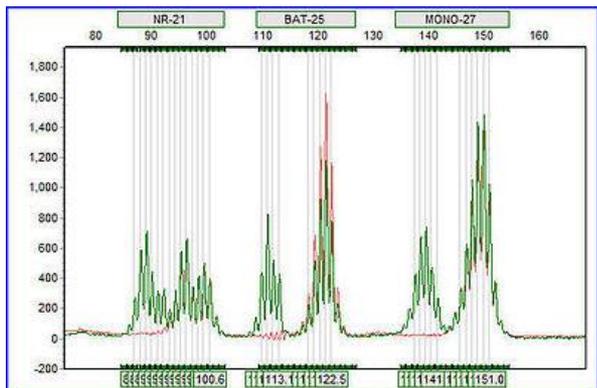
- **Diagnostic** microbien : Identifier **rapidement** et à **moindre coût** que par les méthodes d'analyse d'ADN (**re-fermentation, déviations olfactives, souches d'intérêt...**)
- **Rechercher** la présence d'une espèce de levures/bactéries rajoutées lors des vinifications (*T. delbrueckii*, *L. plantarum*...) pour la bioprotection notamment
- **Etudes d'écologie microbienne, analyses de diversité de la communauté microbienne** de la baie ou des moûts en identifiant un grand nombre de colonies.



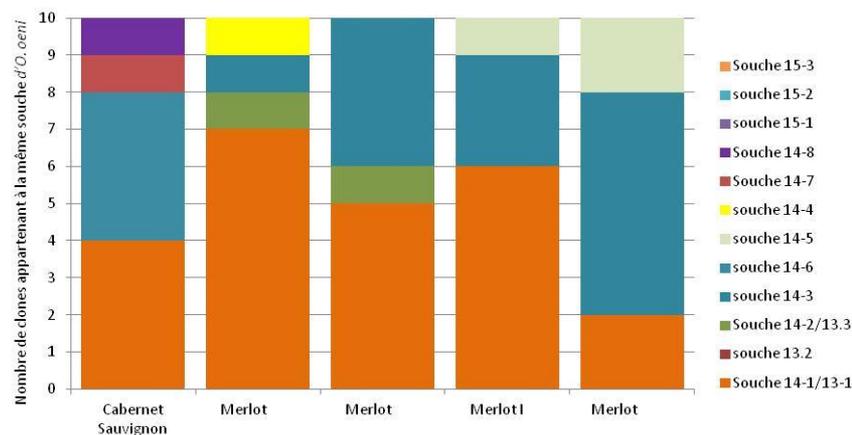
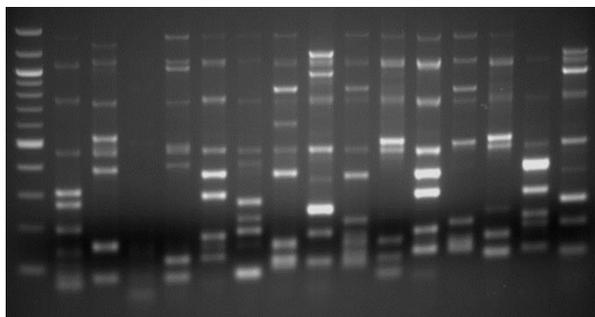
## Applications pour demain

- **Biocontrôle**: approfondir la caractérisation et le suivi démographique des agents ; impact sur le microbiote du raisin
- Comparaison **sensibilité** des microorganismes à certains composés
- Différenciation **sous-espèces/ souche** envisageable ?

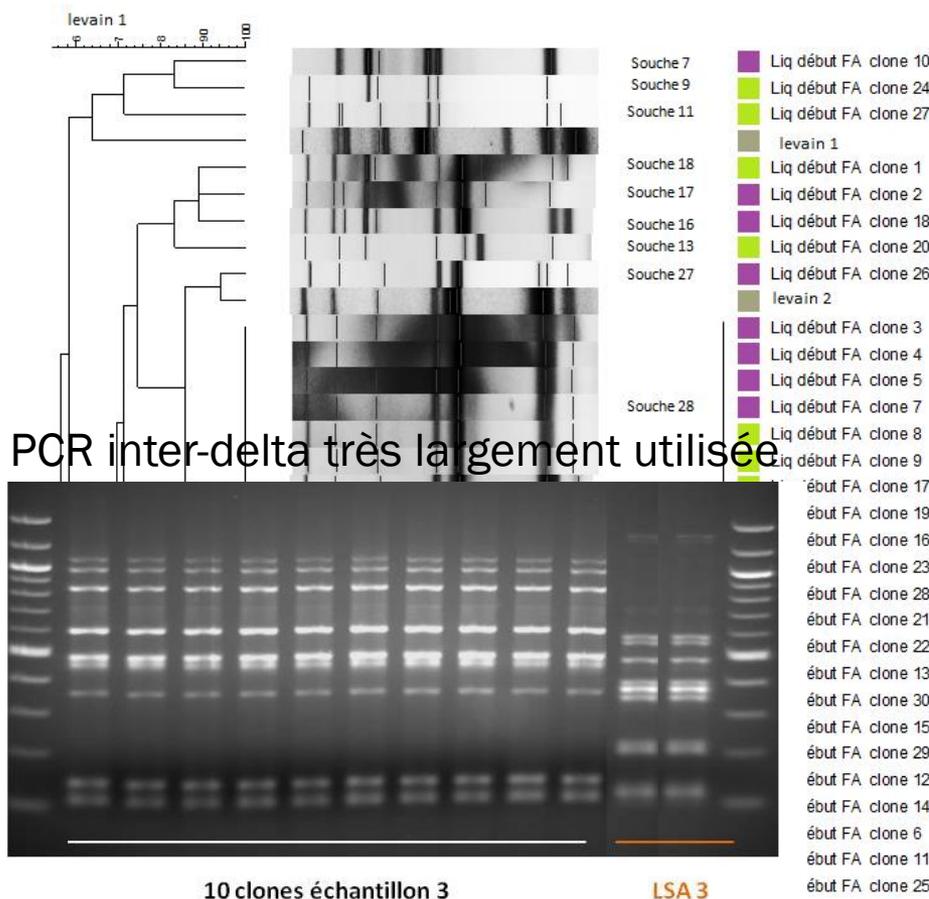




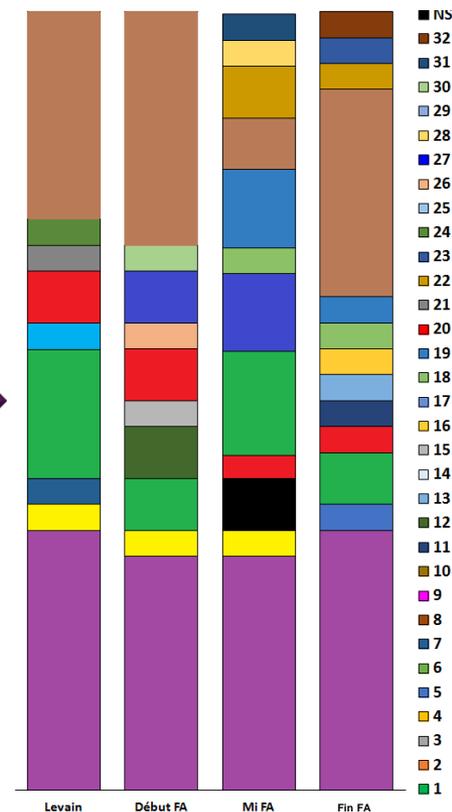
# Différenciation des souches de levures/ bactéries



# Différencier des souches de *S. cerevisiae*



PCR inter-delta très largement utilisée

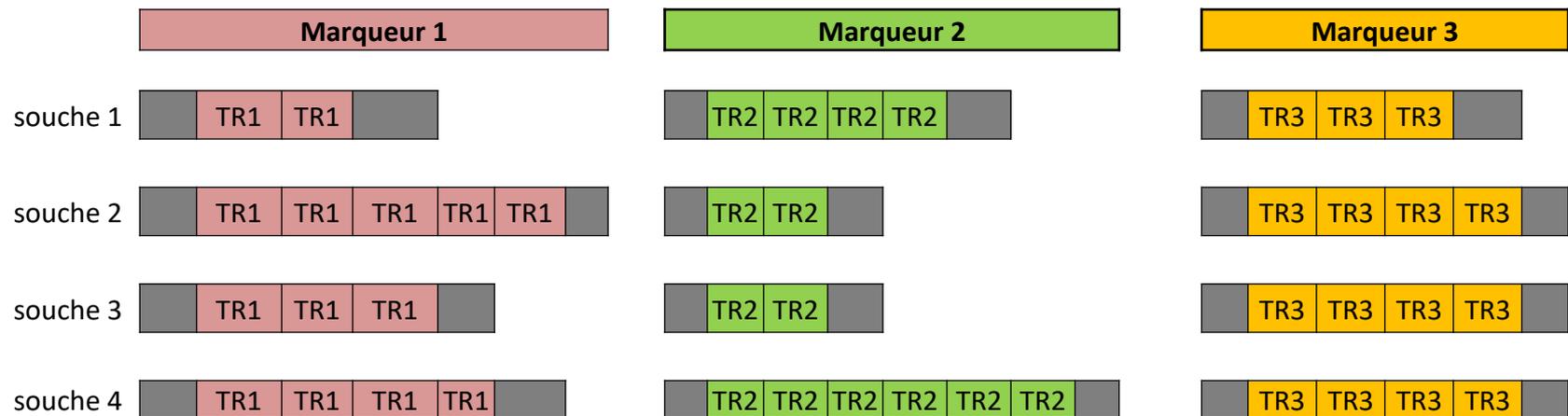


Connaitre la diversité des souches de *S. cerevisiae* qui se succèdent pendant la FA

## Discrimination des souches par analyses de séquences répétées

Amplification de séquences d'ADN formés par la succession d'une même séquence répétées en tandem (1 à 4 nucléotides).

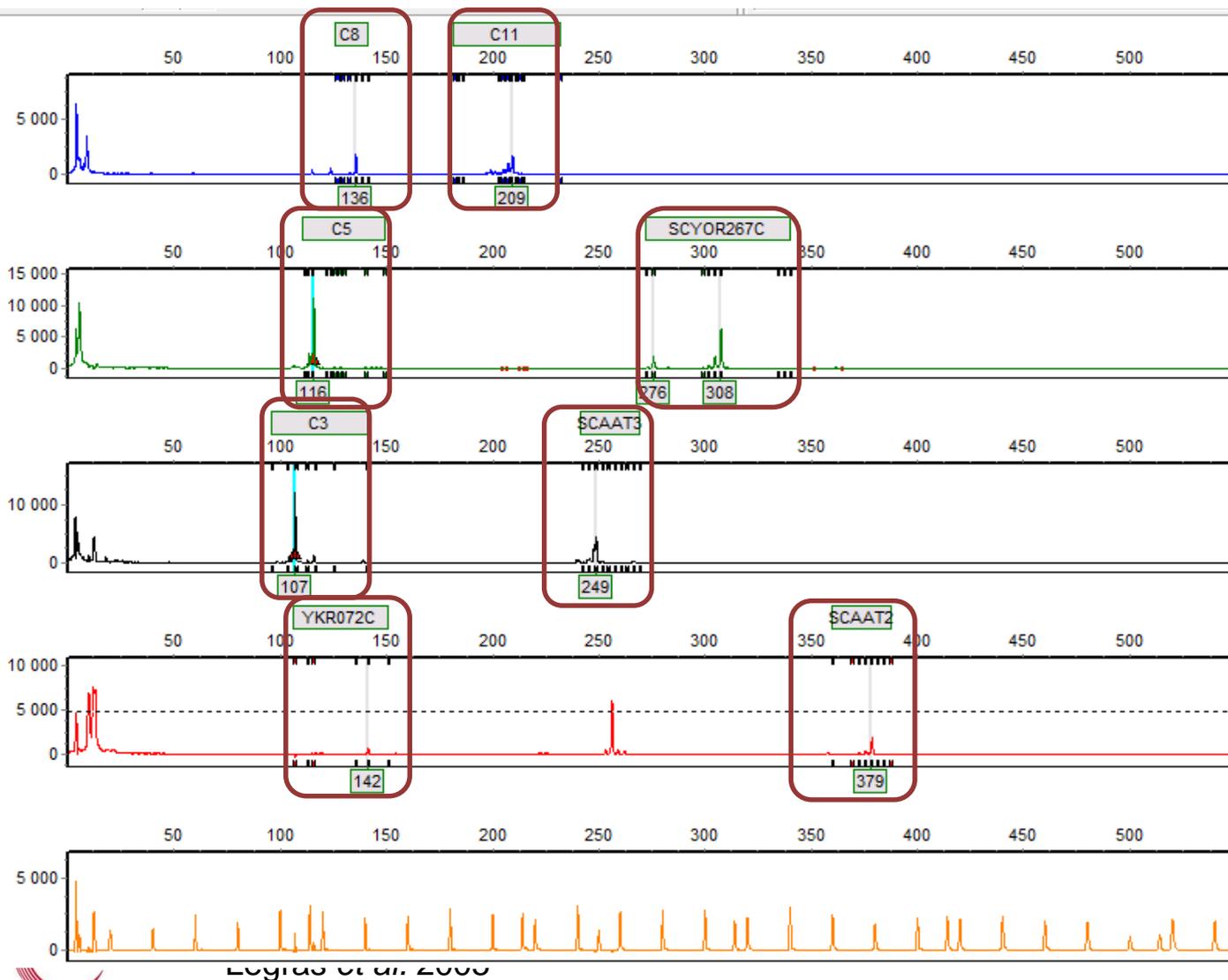
Le nombre de répétition est variable d'une souche à l'autre.



En général une dizaine de marqueurs microsatellites différentes sont utilisés pour discriminer des souches

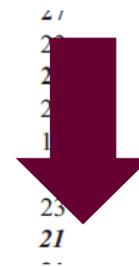
**Comparaison du nombre de répétitions de l'ensemble des marqueurs obtenues pour chaque clone analysé**

# Discrimination souches *S. cerevisiae*: analyse des microsatellites



erly proposed or described as  
CAT5, YIB177, YKR072C

Utilisation d'amorces  
marquées pour  
multiplexer les  
réactions



A chaque marqueur  
est associé 1 taille  
d'amplifiat = nombre  
de répétitions du  
microsatellite ciblé

10



# Discrimination souches *S. cerevisiae*: analyse des microsatellites

cuve	marqueur 1		marqueur 2		marqueur 3		marqueur 4		marqueur 5		marqueur 6		marqueur 7		marqueur 8		marqueur 9		marqueur 10		marqueur 11		marqueur 12		marqueur 13		marqueur 14		marqueur 15	
Y1-1	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-3	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-5	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-7	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-11	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-2	136	139	187	187	114	116	276	308	255	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-8	136	139	187	187	114	116	276	308	255	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-10	136	139	187	187	114	116	276	276	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y1-4	130	136	209	209	116	128	276	276	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y1-6	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y1-9	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y1-12	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y1-13	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y1-14	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y1-15	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153

A chaque clone analysé correspond 1 taille= nombre de répétition

La comparaison du nombre de répétition/taille pour chaque marqueur permet de comparer les souches de *S. cerevisiae*

Y2-23	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-3	130	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-5	130	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-11	130	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-19	130	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-25	130	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-26	130	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-27	130	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-28	130	136	209	209	116	128	276	308	261	264	108	108	142	142	376	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-6	136	136	209	209	116	128	276	308	264	264	108	108	142	142	373	376	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-8	130	136	130	136	116	116	308	308	264	264	108	108	142	142	376	373	121	121	273	302	225	237	103	103	89	95	245	254	153	153
Y2-9	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y2-10	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y2-22	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y2-24	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y2-29	136	139	187	187	114	116	276	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y2-2	136	139	187	187	114	116	308	308	249	255	108	114	142	142	376	379	121	121	251	273	198	210	103	103	95	95	245	251	153	159
Y2-13	130	136	187	211	130	140	276	276			114	114	142	142	370	379	121	121	254	254	204	204	103	103	98	98	245	254	156	159
Y2-17	130	136	187	211	130	140	276	276			114	114	142	142	370	379	121	121	254	254	204	204	103	103	98	98	245	254	156	159
Y2-21	130	136	187	211	130	140	276	276			114	114	142	142	370	379	121	121	254	254	204	204	103	103	98	98	245	254	156	159
Y2-30	130	136	187	211	130	140	276	276			114	114	142	142	370	379	121	121	254	254	204	204	103	103	98	98	245	254	156	159

# Discrimination souches *S. cerevisiae*: analyse des microsatellites

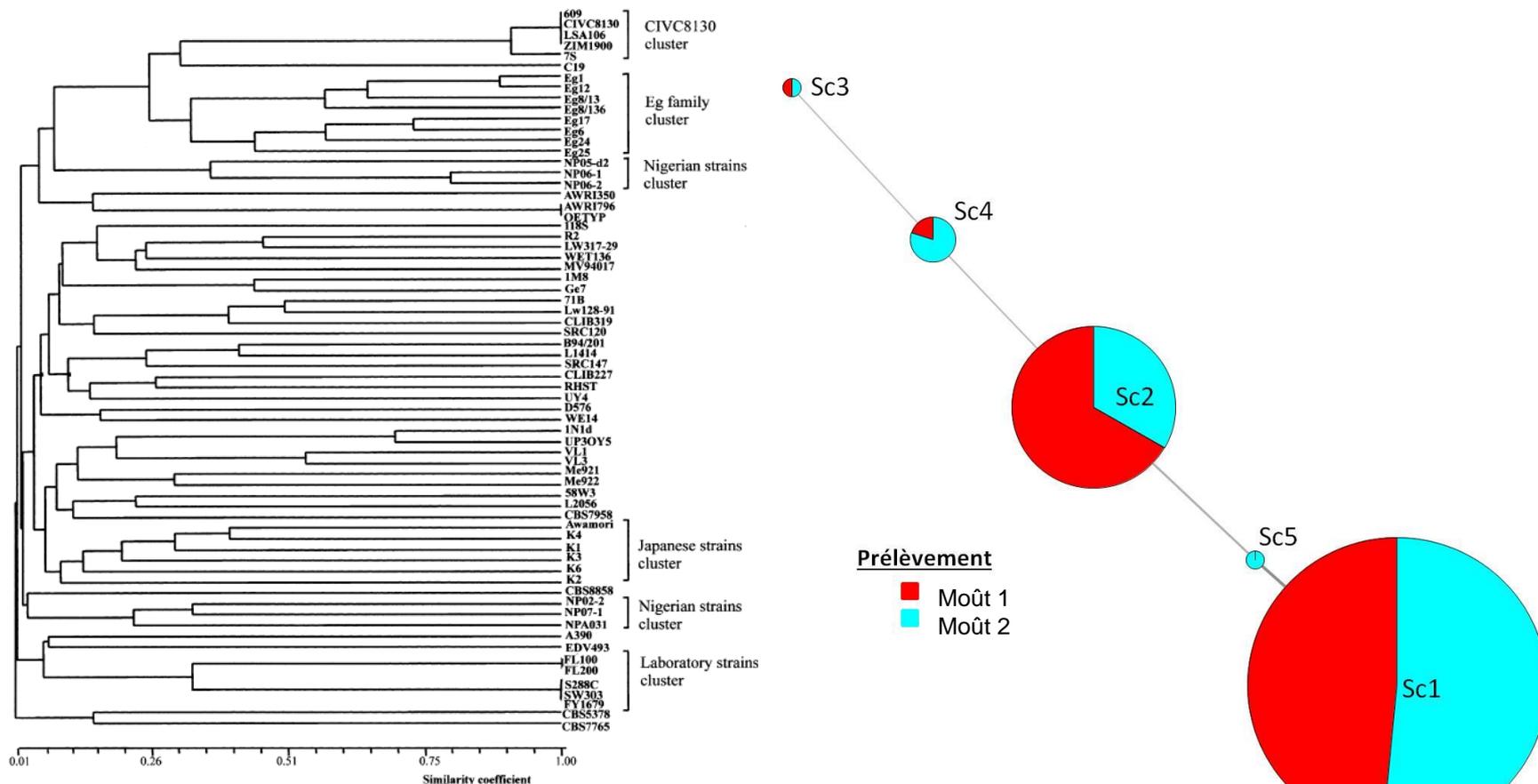
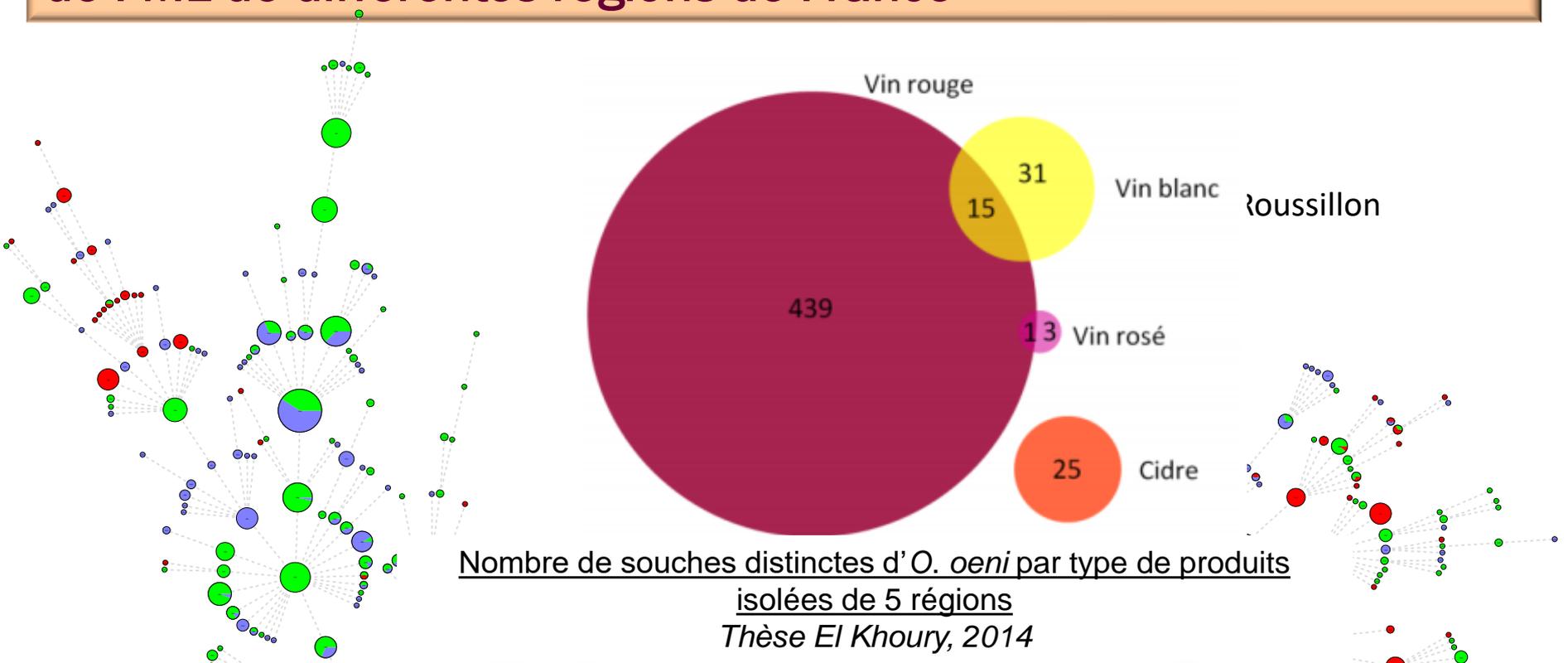


Fig. 2. Dendrogram showing the clustering of the 67 yeast strains used in the study after analysis with the six most polymorphic (SCYOR267C, SCAAT1, C11, C5, C4, YPL009). Distances between strains are calculated according to Jaccard Coefficient and the tree is with the UGPM method.

Legras et al., 2005

Avec les données, création de matrice de distance pour construire des dendrogrammes

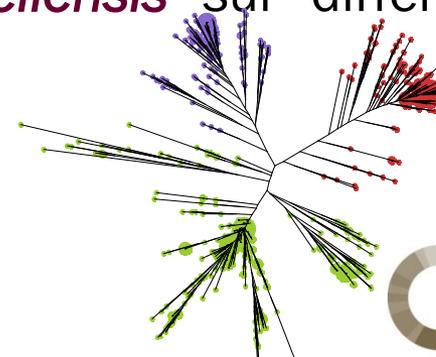
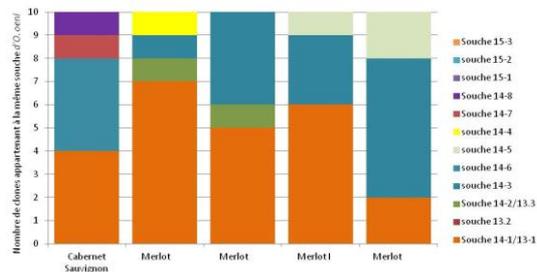
**Analyse des souches d'*O. oeni* présentes dans des vins en cours de FML de différentes régions de France**



**Souches semblent corrélées à type de produit, pas vraiment spécifiques de la région**

## Applications principales et intérêts à ce jour

- **Contrôle d'implantation de la souche de levures/bactéries** rajoutée lors des vinifications (*S. cerevisiae*/*T. delbrueckii*/*M. pulcherrima*/*M. thermotolerans* /*O. oeni* ...)
- **Diagnostic** microbien : Comparer la **souche d'altération** avec la souche de vinification- trouver origine contamination
- **Analyse de diversité de la communauté microbienne** des moûts en identifiant un grand nombre de colonies *S. cerevisiae*/ *O. oeni*.
- **Etudier la diversité** de souches *B. bruxellensis* sur différents lots, millésimes, origines...





**MICROFLORA**

L'EXPERTISE EN MICROBIOLOGIE

# Analyses microbiologiques innovantes en oenologie

**Julie MAUPEU**

Rencontres INNOVINSEO  
23 Mars 2018, Toulouse