



MICROFLORA

L'EXPERTISE EN MICROBIOLOGIE

Analyses microbiologiques innovantes en oenologie

Julie MAUPEU

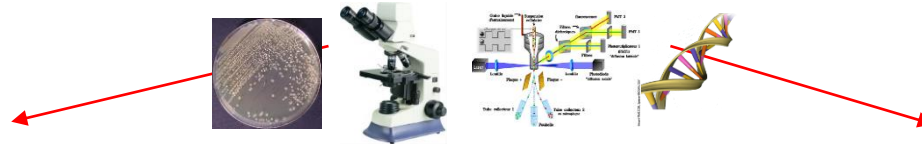
Rencontres INNOVINSEO
23 Mars 2018, Toulouse

Analyses microbiologiques en œnologie

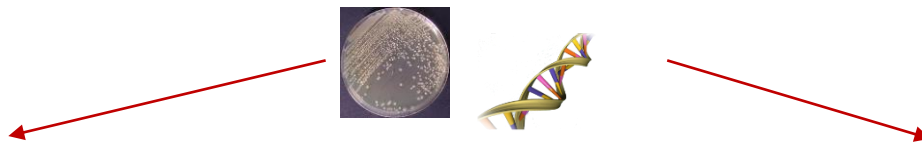
Levures

Groupe

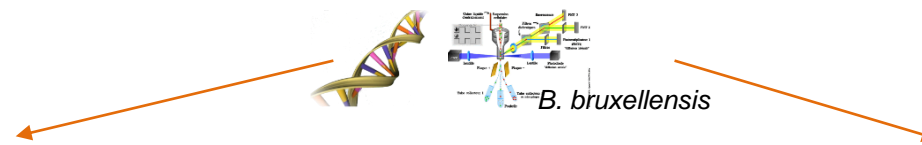
Bactéries



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

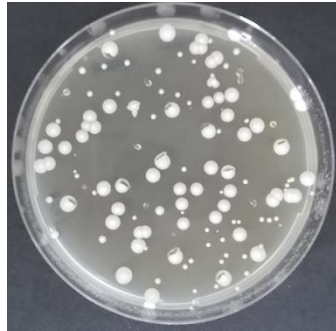


Saccharom **Dénombrement de groupes/espèces de microorganismes** *eni*

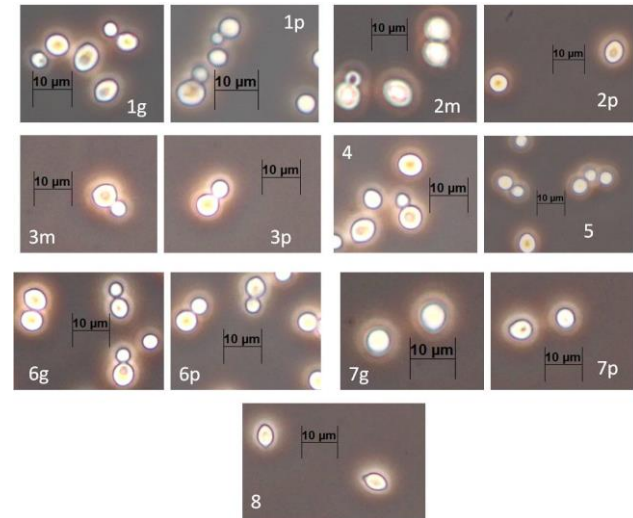
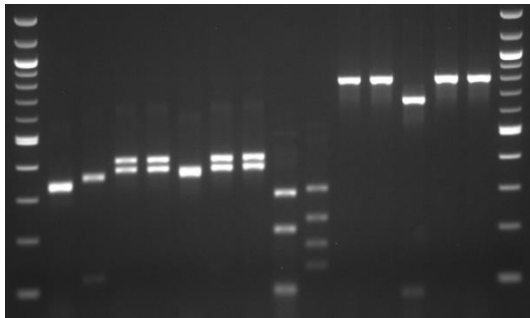


S. cerevisia **Dénombrement de groupes/espèces de microorganismes**
Identification d'espèce de levures/bactéries/moisissures *VF, CH16*

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

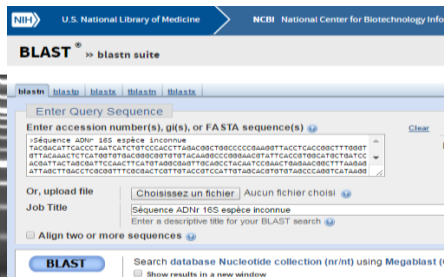
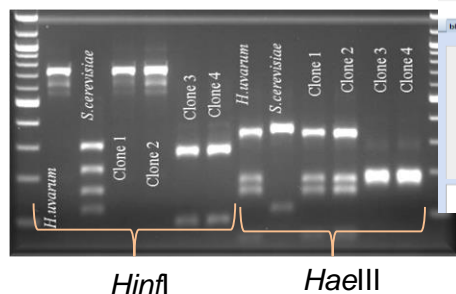


Identifications de microorganismes



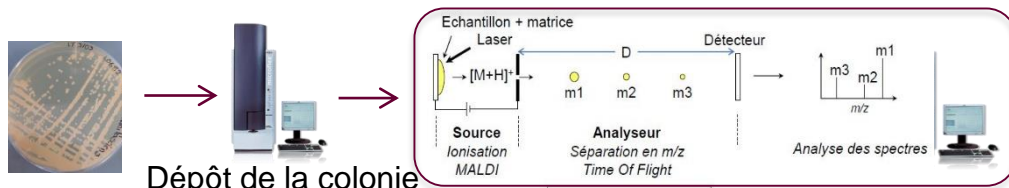
Techniques

- Identification PCR-RFLP et séquençage :



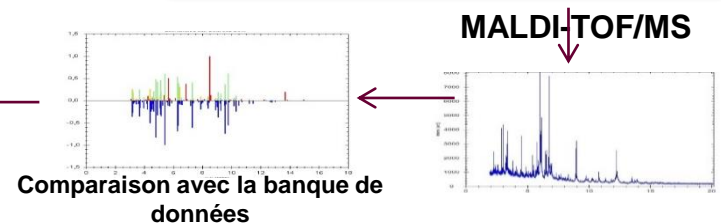
| | Temps | Coût |
|------------------------|-------|------|
| (PCR-RFLP+) séquençage | +++ | +++ |

- Identification par MALDI-TOF/MS



| | Temps | Coût |
|--------------|-------|------|
| MALDI-TOF/MS | + | + |

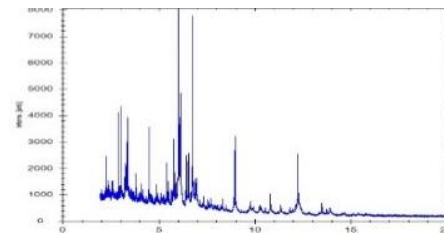
Identification de l'espèce de levure ou de bactérie



Étude menée 2015 : 90% de résultats similaires

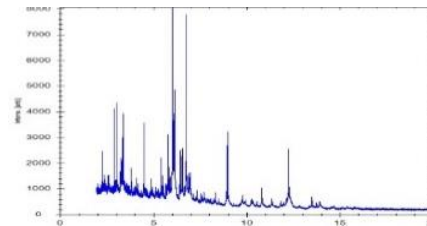
Applications principales et intérêts à ce jour

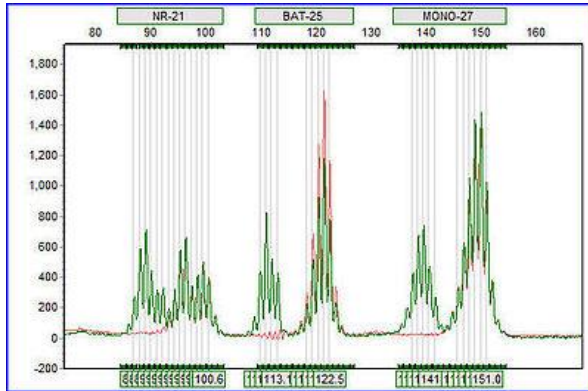
- **Diagnostic** microbien : Identifier **rapidement** et à **moindre coût** que par les méthodes d'analyse d'ADN (**re-fermentation, déviations olfactives, souches d'intérêt...**)
- **Rechercher** la présence d'une espèce de levures/bactéries rajoutées lors des vinifications (*T. delbrueckii*, *L. plantarum*...) 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.



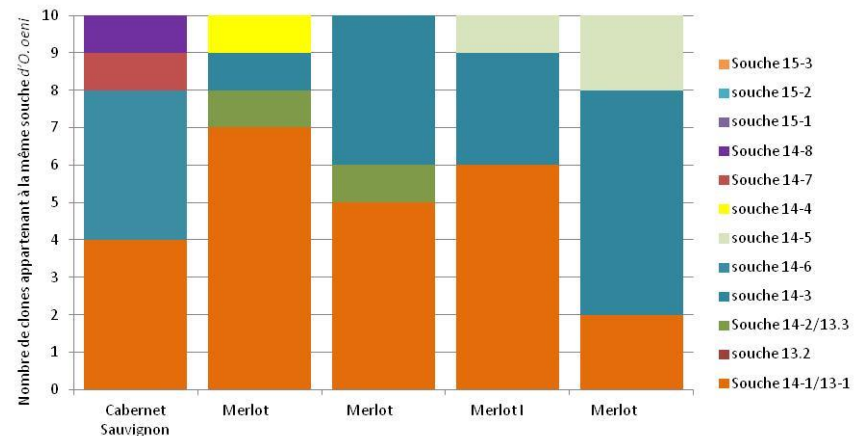
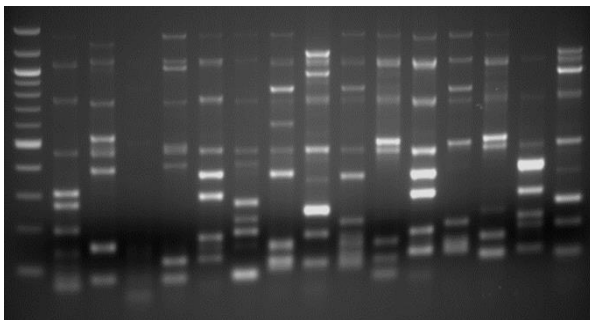
Applications pour demain

- **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 ?

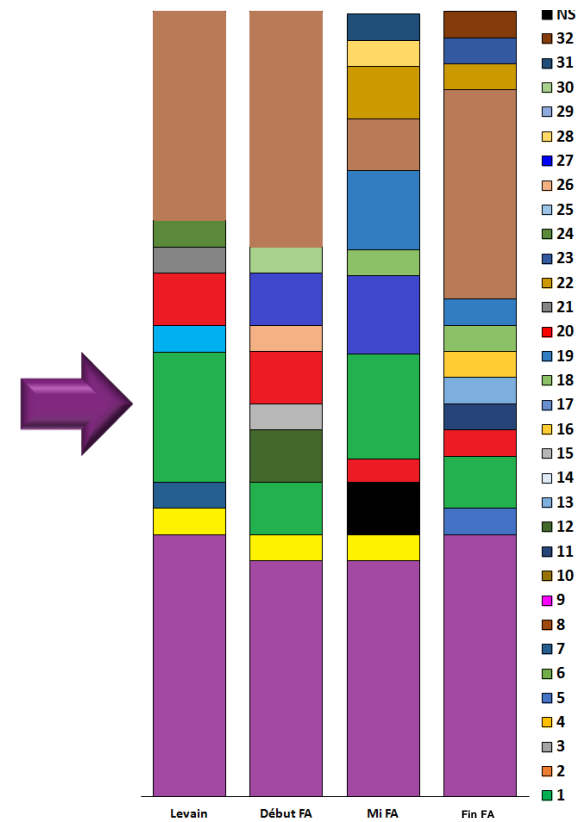
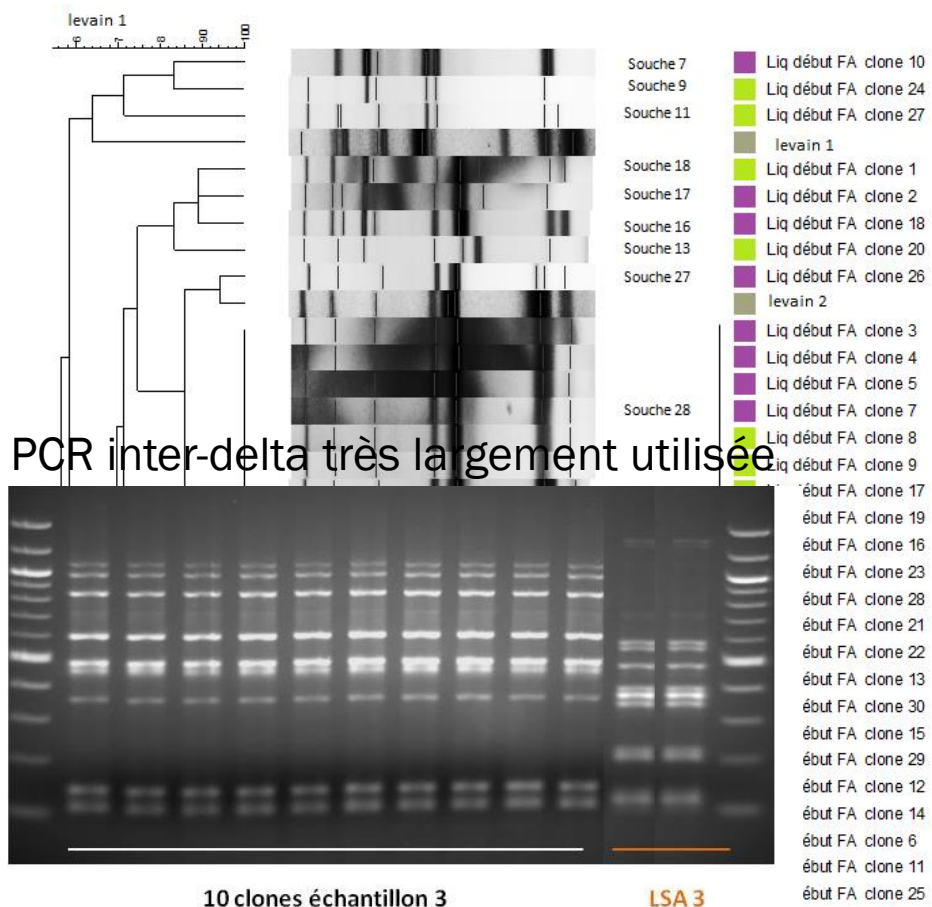




Différenciation des souches de levures/ bactéries



Différencier des souches de *S. cerevisiae*

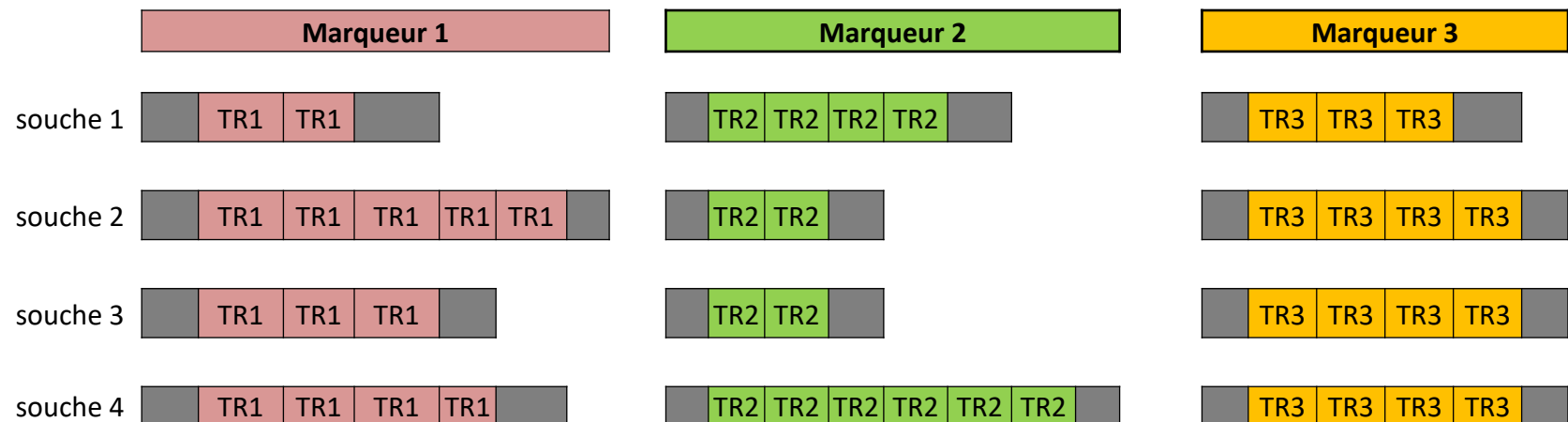


Connaitre la diversité des souches de *S. cerevisiae* qui se succèdent pendant la FA

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).

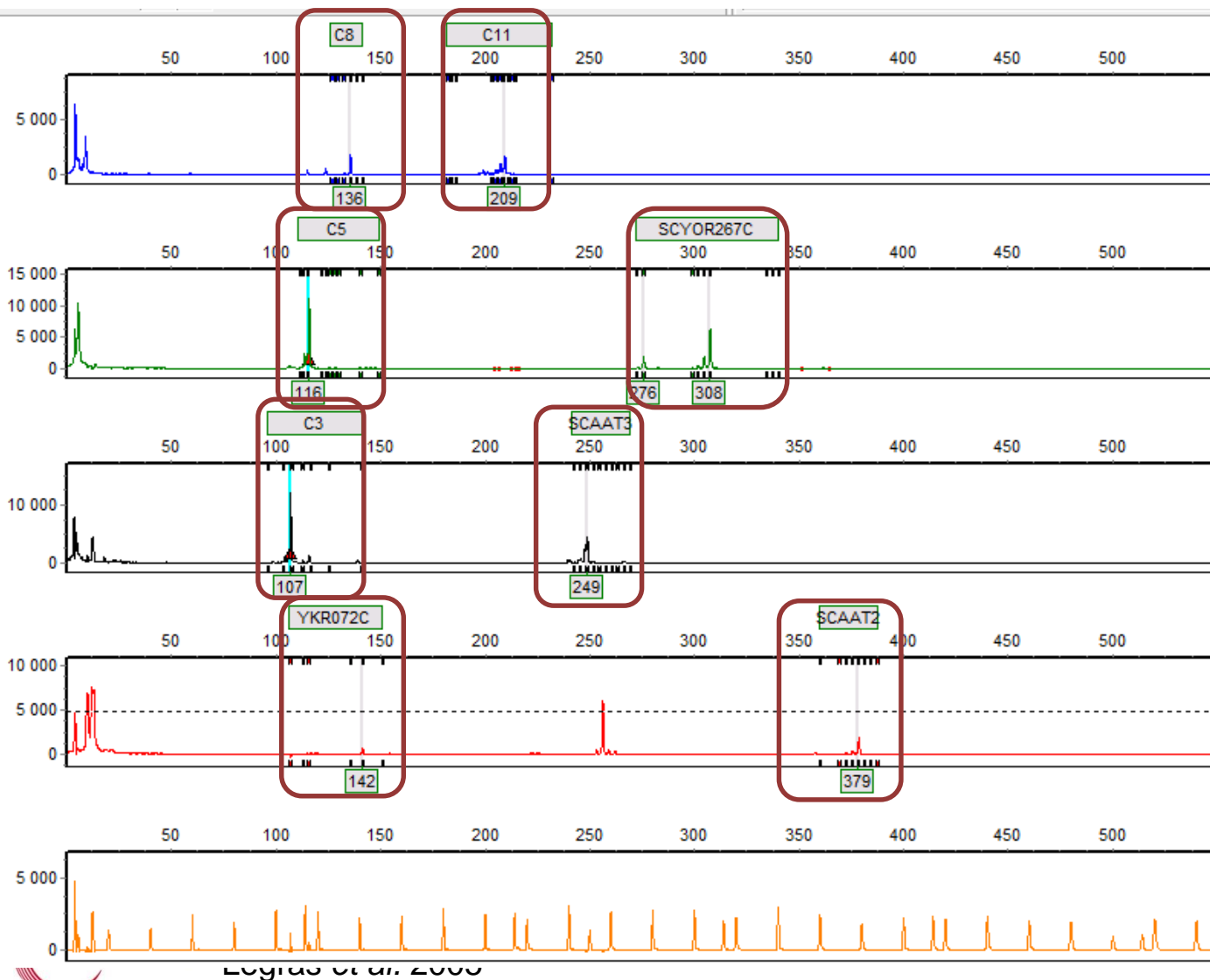
Le nombre de répétition est variable d'une souche à l'autre.



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

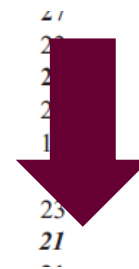
Comparaison du nombre de répétitions de l'ensemble des marqueurs obtenues pour chaque clone analysé

Discrimination souches *S. cerevisiae*: analyse des microsatellites



erly proposed or described as
YAK5 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

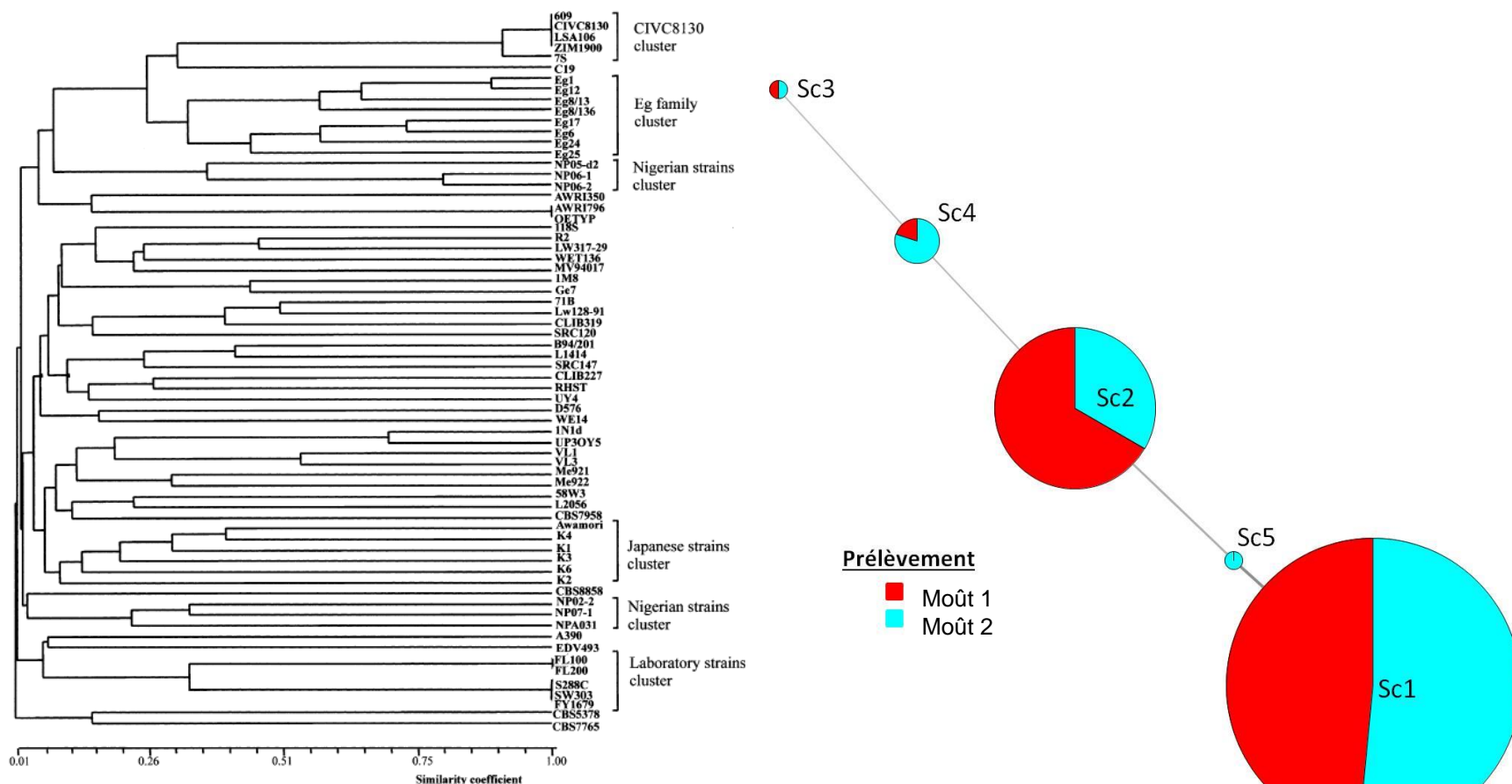
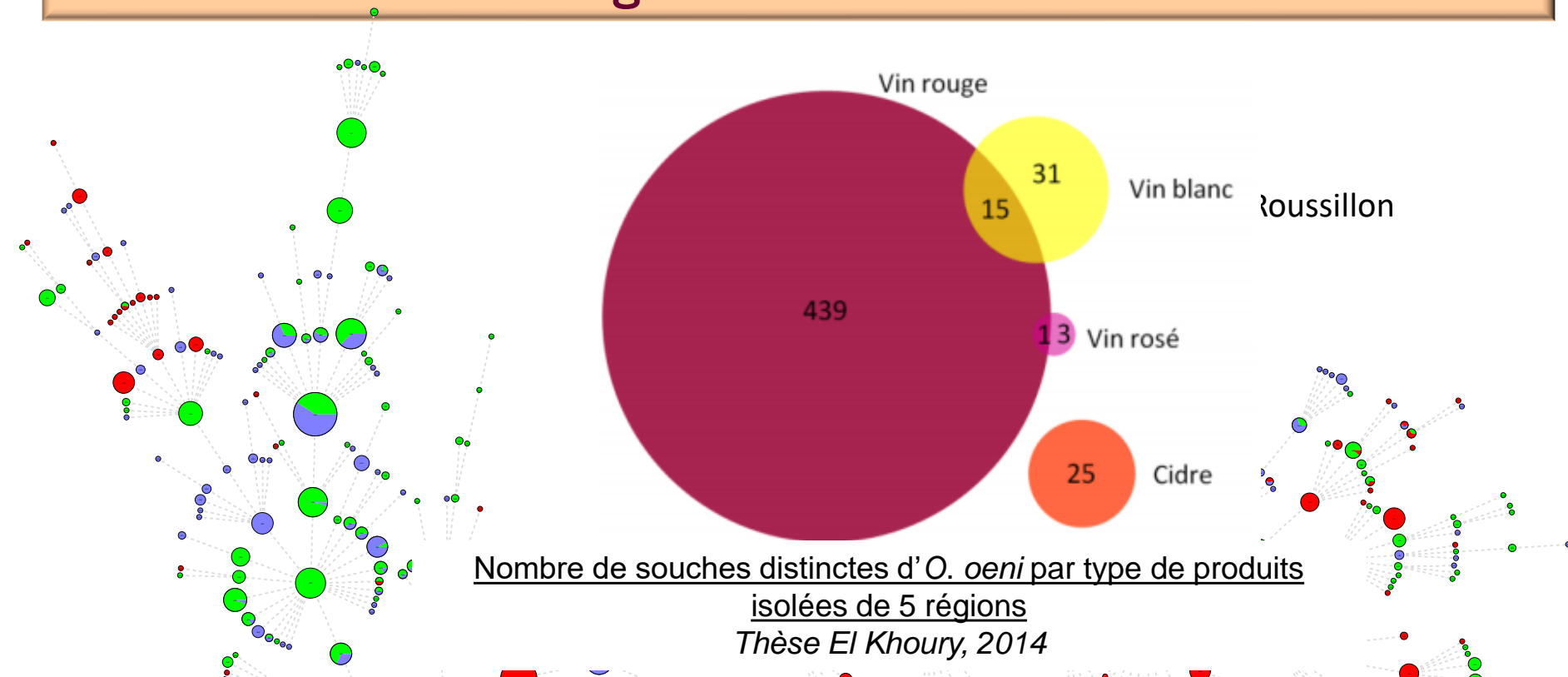


Fig. 2. Dendrogram showing the clustering of the 67 yeast strains used in the study after analysis with the six most polymorphic (SCYOR267C, SCAAT1, C11, C5, C4, YPL009). Distances between strains are calculated according to Jaccard Coefficient and the tree is with the UGPM method.

Legras et al., 2005

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

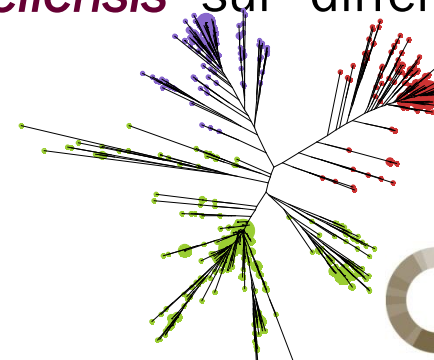
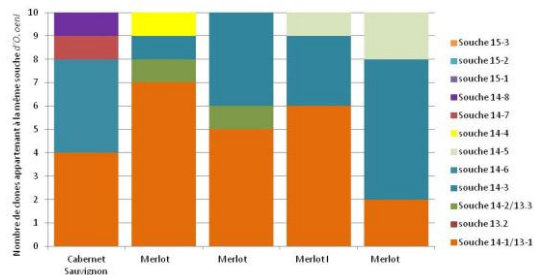
Analyse des souches d'*O. oeni* présentes dans des vins en cours de FML de différentes régions de France



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