RÉSOLUTION OIV-OENO 408-2011

OUTILS DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE POUR L'IDENTIFICATION DE LA LEVURE DE VINIFICATION SACCHAROMYCES CEREVISIAE ET D'AUTRES ESPÈCES DE LEVURES LIÉES À LA VINIFICATION

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

Vu l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION du groupe d'experts « Microbiologie »

DÉCIDE d'adopter les outils de biologie moléculaire suivants pour l'identification de la levure de vinification Saccharomyces cerevisiae et d'autres espèces de levures liées à la vinification

DÉCIDE d'inclure le préambule suivant lors de parution des Outils de biologie moléculaire pour l'identification de la levure de vinification Saccharomyces cerevisiae et d'autres espèces de levures liées à la vinification et des Outils de biologie moléculaire pour l'identification des bactéries lactiques [OENO-MICRO 09-409] du raisin et du vin

Préambule [à OENO-MICRO 09-408 et OENO-MICRO 09-409]

L'origine, le développement, les changements et la succession des différentes espèces de levures peuvent être suivis à l'aide de techniques moléculaires spécifiques permettant la différenciation et le typage des souches de levures. Différentes techniques ont été récemment employées pour l'étude de la microbiologie du processus de vinification. Ces méthodes sont sensibles et spécifiques, répondant aux différents besoins ; elles sont simples, rapides, reproductibles, efficaces, fiables et peu onéreuses. La mise en œuvre des méthodes d'identification moléculaire peut être effectuée sans culture préalable ou après enrichissement, ou également après isolement des micro-organismes. Cela permet de mieux connaître le système microbien qui se développe à la surface du raisin, ou dans le vin lui-même. Ce guide est destiné à venir en aide aux laboratoires effectuant des analyses microbiologiques pour l'identification de la levure Saccharomyces cerevisiae et autres espèces de levure [OENO-MICRO 09-408] liées à la vinification, et pour l'identification des bactéries lactiques [OENO-MICRO 09-409] du raisin et du vin. Les techniques présentées ici correspondent à l'application principale des techniques moléculaires disponibles. Pour les méthodes détaillées, se référer à la bibliographie.

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

Outils de biologie moléculaire pour l'identification de la levure de vinification Saccharomyces cerevisiae et d'autres espèces de levures liées à la vinification

Des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture peuvent être utilisées pour l'identification et la caractérisation des levures de vinification aux différentes étapes de la vinification, du vieillissement et du stockage.

MÉTHODES « DÉPENDANTES DE LA CULTURE »

IDENTIFICATION DES SOUCHES DE LEVURE AU NIVEAU DE L'ESPÈCE

ADNr PCR- RFLP (restriction fragments length polymorphism)

PRINCIPE. Cette méthode est « dépendante de la culture » puisqu'elle nécessite l'extraction de l'ADN d'une culture pure. Elle repose sur l'amplification de régions spécifiques des unités de répétition de l'ADNr (telles que les espaceurs internes transcrits, ITS1 et ITS2, et le gène imbriqué codant pour l'ARNr 5.8S, ou le gène de l'ARNr 26S). Ces régions comportent des séquences fortement conservées et des séquences qui présentent un fort degré de variabilité génétique entre des souches d'espèces différentes. Dans la majorité des cas, les produits amplifiés par PCR issus de souches de la même espèce et du même genre ont des tailles moléculaires identiques, et les espèces du même genre présentent des tailles similaires. La différence de séquence est mise en évidence par l'analyse de restriction en utilisant plusieurs endonucléases de restriction, telles que Cfo I, Hae III, Hinf I, DdeI et MboI. Les profils de restriction diffèrent suivant les espèces.

L'enzyme DdeI convient pour la différentiation entre H. uvarum et H. Guilliermondii, comme rapporté par Esteve-Zarzoso et al. (1999) et Cadez et al. (2002), tandis que l'enzyme MboI convient pour distinguer C. zemplinina de C. stellata (Sipicki, 2004).

D'autres enzymes de restriction doivent être utilisées pour différencier les espèces du genre Saccharomyces et leurs hybrides (Gonzales et al., 2006).

RÉSULTATS : Cette méthodologie a déjà été utilisée pour identifier environ 145 espèces de levures appartenant à 26 genres de levure différents. Les profils de restriction de toutes les espèces identifiées sont rapportés dans Esteve-Zarzoso et al. (1999) et Zanol et al. (2010). Les données relatives à ITS-5,8S sont disponibles en ligne (http://www.yeast-id.com

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

RÉFÉRENCES :

1. Esteve-Zarzoso et al., (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bacteriolo. 49: 329-337.
2. Fernández-Espinar et al. (2000). RFLP analysis of the ribosomal transcribed spacers and the 5.8 S rRNA gene region of the genus Saccharomyces: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. Antoine Van Leeuwenhoek 78: 87-97.
3. De Llanos et al. (2004). Identification of species of genus Candida by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Antoine Van Leeuwenhoek 85: 175-185.
4. Baleiras Couto et al. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. Int. J. Food Microbiol 102 : 49-56.
5. Zanol G., Baleiras-Couto M.M., Duarte F.L. (2010). Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. Ciência e Técnica Vitivinícola 25: 75-85.
6. Cadez N., Raspor P., de Cock A.W.A.M., Boekhout T., Smith M.Th. (2002). Molecular identification and genetic diversity within species of the genera Hanseniaspora and Kloeckera. FEMS Yeast Research 1 : 279-289
7. Sipiczki M. (2004). Species identification and comparative molecular and physiological analysis of Candida zemplinina and Candida stellata. J. Basic Microbiol. 44 : 471–479
8. González S.S., Barrio E., Gafner J., Querol A. (2006). Natural hybrids from Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus and Saccharomyces kudriavzevii in wine fermentations. FEMS Yeast Res 6 : 1221–1234

Séquençage de la région D1/D2 après amplification par PCR

PRINCIPE. Cette méthode est « dépendante de la culture » puisqu'elle nécessite l'extraction de l'ADN d'une culture pure. Elle repose sur l'amplification de la région D1/D2 du gène de l'ARN 26S et ensuite sur le séquençage de l'amplicon obtenu. La séquence de D1/D2 diffère selon les espèces de plus de 1%, et de moins de 1% selon

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

les souches appartenant à la même espèce.

RÉSULTATS : La séquence de la région D1/D2 du gène de l'ARN 26S permet la distinction entre la plupart des espèces de levures connues. La séquence de la région D1/D2 du gène de l'ARN 26S permet la classification et l'identification phylogénétique d'isolats inconnus, du fait que la base de données existante, est de loin la plus grande pour les gènes de levure.

RÉFÉRENCES :

1. Kurtzman et Robnett (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. J Clin Microbiol. 35:1216-23.

9. Kurtzman et Robnett (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek. 73, 4: 331-71.
10. Baleiras Couto et al. (2005) Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. Int. J. Food Microbiol 102 : 49-56.

IDENTIFICATION DE LEVURES DE VINIFICATION AU NIVEAU DE LA SOUCHE

RFLP (restriction fragments length polymorphism) d'ADN mitochondrial (ADNmt)

PRINCIPE : L'ADN mitochondrial (ADNmt) de S. cerevisiae est une petite molécule de 65-80 Kb dont le degré de variabilité peut être mis en évidence par une analyse de restriction. Le fort degré de polymorphisme de l'ADNmt permet d'analyser la variabilité de souches S. cerevisiae spécifiques au vin. C'est l'une des méthodes les plus utilisées pour caractériser des isolats de vin lors de la fermentation alcoolique. Querol et al. (1992) et López et al. (2001) ont simplifié la méthode d'analyse, qui. comprend l'extraction de l'ADN total d'un isolat de culture pure et une analyse de restriction avec les enzymes HinfI, ou RsaI (Guillamón et al., 1994 ; Schuller et al., 2004 ; Lopes et al., 2006).

RÉSULTATS : Cette technique permet de réaliser plusieurs identifications de souches en une courte période. Elle peut être utilisée dans la filière vinicole car elle est rapide,

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

fiable et ne nécessite aucun équipement PCR.

RÉFÉRENCES :

1. Querol et al. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. Syst. Appl. Microbiol. 15: 439-446.

11. Guillamón et al. (1994). Rapid characterization of four species of the Saccharomyces sensu stricto complex according to mitochondrial DNA patterns. Int. J. Bacteriol. 44: 708-714.
12. López et al. (2001). A simplified procedure to analyse mtDNA from industrial yeast. Int. J. Food Microbiology 68: 75-81.
13. Schuller D, Valero E., Dequin S., Casal (2004). Survey of molecular methods for the typing
14. of wine yeast strains. FEMS Microbiology Letters 231 : 19-26
15. Lopes C.A, Lavalle T.L, Querol A., Caballero A.C. (2006). Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine Saccharomyces cerevisiae diversity study. Antonie van Leeuwenhoek 89 : 147–156.

Amplification de séquences Delta (δ)

PRINCIPE : Les séquences delta sont des éléments de 0,3 Kb (334 bp) qui flanquent les rétrotransposons Ty1 dans la S. cerevisiae. Entre 35 et 55 copies de séquences delta ont été identifiées dans le génome de la levure, sous forme de rétrotransposons Ty1 ou d'éléments isolés. Cependant, ces séquences delta sont concentrées dans des régions génomiques unissant les gènes ARNt. Le nombre et la position de ces éléments connaissent une certaine variabilité intraspécifique que Ness et al. (1993) ont utilisée pour mettre au point des amorces spécifiques : δ1 et δ2 utiles pour la différentiation des souches S. cerevisiae. Legras et Karst (2003) ont optimisé cette technique en concevant deux nouvelles amorces : δ12 et δ21 situées près de δ1 et δ2. L'utilisation de δ12 et δ21 ou de δ12 avec δ2 met en lumière un plus grand polymorphisme se traduisant par un plus grand nombre de bandes sur le gel d'électrophorèse.

RÉSULTATS : Legras et Karst (2003) ont distingué 53 souches commerciales en utilisant les combinaisons δ12 et δ21 ou δ12 et δ2. Schuller et al. (2004) ont pu différencier un grand nombre de souches de levure de vinification avec les amorces δ 12 et δ2.

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

RÉFÉRENCES :

1. Ness et al., (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. J. Sci. Food Agric. 62: 89-94.

16. Legras et Karst, (2003). Optimisation of interdelta for Saccharomyces cerevisiae strain characterization. FEMS Microbiol. Lett. 221 : 249-255.
17. Schuller et al., (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. FEMS Microbiol. Lett. 231: 19-26.

Génotypage par micro satellites

PRINCIPE : Les microsatellites sont des séquences courtes, composées de répétitions en tandem de un à dix nucléotides. Ces séquences sont disséminées dans le génome de la levure, tant dans les régions codantes que non codantes, mais leur concentration est plus basse dans les régions codantes. Les marqueurs microsatellites sont des loci polymorphes dont la diversité allélique permet de différencier des souches d'une même espèce de levure. Plusieurs loci sont connus et peuvent être utilisés pour le typage des souches de S. cerevisiae (Legras et al. 2005). Les profils obtenus par la combinaison d'au moins six microsatellites permettent une différenciation sûre des souches de S. cerevisiae.

RÉSULTATS : les marqueurs microsatellites sont fréquemment utilisés comme marqueurs génétiques dans les études de cartographie génétique et dans la génétique des populations. La combinaison de six locus microsatellites se révèle être une technique hautement discriminante et reproductible, et permet en même temps de montrer les relations géographiques et technologiques entre les souches. Ces locus polymorphiques peuvent être facilement utilisés pour déterminer le profil des souches de S. cerevisiae durant la fermentation.

RÉFÉRENCES :

1. Schuller et al. (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. FEMS Microbiol. Lett. 231: 19-26.

18. Legras et al. (2005). Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of Saccharomyces cerevisiae strains. Int J Food Microbiol. 102: 73–83

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

19. Schuller et Casal (2007). The genetic structure of fermentative vineyard-associated Saccharomyces cerevisiae populations revealed by microsatellite analysis. Antonie van Leeuwenhoek 91:137–150

MÉTHODES « INDÉPENDANTES » DE LA CULTURE

PCR Quantitative (q-PCR)

CHAMP D'APPLICATION : Détection et quantification rapides de levures au niveau de l'espèce dans le moût ou le vin

PRINCIPE : Cette méthode peut utiliser des amorces de levure universelles conçues sur la base des domaines variables D1/D2 du gène ARNr 26S. C'est l'une des séquences de gènes présentes chez toutes les espèces connues de levures ascomycètes. La quantification est possible à partir de la détermination du nombre de cycles de polymérisation nécessaires pour dépasser un signal seuil. Plus la concentration d'ADN de l'espèce cible est élevée dans l'échantillon, moins le nombre de cycles nécessaires à dépasser le seuil est grand. Les courbes d'étalonnage permettent une quantification précise.

RÉSULTATS : Cette technique a été utilisée pour le dénombrement de cellules Candida stellata, Dekkera bruxellensis, Hanseniaspora uvarum et Saccharomyces cerevisiae dans des fermentations mixtes de milieu synthétique et de vin. L'analyse présente une linéarité sur 5 ordres de grandeur, et la limite de détection est d'environ 102 UFC/ml. La présence d'autres micro-organismes non ciblés du vin (levures et bactéries) dans les échantillons n'a pas d'impact significatif sur la PCR quantitative.

Une méthode rapide de PCRQ a été développée pour détecter et quantifier plusieurs levures non-Saccharomyces, en utilisant des amorces spécifiques pour C. zemplinina, T.delbrueckii, I. orientalis, et M. pulcherrima (Zott et al., 2010).

RÉFÉRENCES :

1. Hierro, Esteve-Zarzoso, Gonzalez, Mas and Guillamon et al. (2006). Real-Time Quantitative PCR (qPCR) and Reverse Transcription-qPCR for Detection and Enumeration of Total Yeasts in Wine. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7148–7155

20. Zott K, Claisse O, Lucas P, Coulon J, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. Food Microb. 27:559-567

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011

PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)

CHAMP D'APPLICATION : identification de levures au niveau de l'espèce dans le moût ou le vin.

PRINCIPE : Cette méthode s'appuie sur l'amplification de l'ADNr 26S de levure à l'aide des amorces universelles U1 (lié à un GC clamp) et U2. Les fragments d'amplification sont séparés en fonction de leur longueur et de leur composition nucléotidique dans un gel de polyacrylamide dénaturant (gradient de 20 à 60% d'urée et formamide). Les fragments d'amplification d'intérêt sont directement extraits du gel, puis séquencés afin d'identifier les espèces microbiennes en se référant à la banque de séquences d'ADN26S des levures. L'un des avantages de cette technique réside dans le fait qu'elle permet d'identifier également des levures viables mais non cultivables, dont l'ADN est aussi amplifié.

RÉSULTATS : Cette technique, utilisée pour l'analyse de populations microbiennes dans des échantillons de raisin et de vin, a permis l'identification de différentes espèces de levures (Candida diversa, Candida sorboxylosa, Candida stellata, Dekkera bruxellensis, Hanseniaspora occidentalis, Hanseniaspora uvarum, Issatchenkia hanoiensis, Issatchenkia occidentalis, Issatchenkia orientalis, Issatchenkia terricola, Kluyveromyces thermotolerans, Metschnikowia pulcherrima, Pichia kluyveri, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycodes ludwigii, Torulaspora delbrueckii, Zygosaccharomyces bailii). Les populations de levure supérieures à 103 cellules/mL sont correctement détectées et identifiées par PCR-DGGE. La PCR-DGGE n'est pas un outil quantitatif.

RÉFÉRENCES :

1. Cocolin L, Heisey A, and Mills D.A et al. (2001). Direct Identification of the Indigenous Yeasts in Commercial Wine Fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 52:1:49-53

Exemplaire certifié conforme Porto, 24 juin 2011
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2011