

## COMPARAISON DE DEUX TECHNIQUES D'IDENTIFICATION DES SOUCHES DE LEVURES DE VINIFICATION BASÉES SUR LE POLYMORPHISME DE L'ADN GÉNOMIQUE : RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR) ET ANALYSE DES CARYOTYPES (ELECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ)

Isabelle MASNEUF et D. DUBOURDIEU

Institut d'Œnologie, 351 cours de la Libération, 33405 Talence cedex (France)

**Résumé :** Une nouvelle technique de la biologie moléculaire, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'identification des souches de levures de vinification. Mise en œuvre directement sur levures entières, elle permet d'obtenir des profils variables selon les souches, par l'amplification de séquences d'ADN génomique. Utilisée sur lies, la PCR constitue un outil rapide et sensible pour le contrôle d'implantation des levains en vinification. Cependant, le pouvoir discriminant de la PCR est inférieur à celui de l'électrophorèse en champ pulsé pour la caractérisation des souches de levures indigènes. Elle doit être considérée comme une technique complémentaire d'identification des souches de *S. cerevisiae*.

### INTRODUCTION

Différentes techniques de la biologie moléculaire ont été appliquées à l'identification des souches de levures de vinification appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* : l'analyse des profils de restriction de l'ADN mitochondrial (DUBOURDIEU *et al.*, 1987 ; HALLET *et al.*, 1989), l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champs pulsés (BLONDIN *et al.*, 1990) et l'hybridation de l'ADN génomique par utilisation de sondes moléculaires spécifiques (DEGRÉ *et al.*, 1989). Ces trois méthodes s'avèrent capables de différencier entre elles la plupart des levures industrielles ainsi que les levures indigènes rencontrées au cours de fermentations spontanées, mais la plus facile à mettre en œuvre est l'analyse des caryotypes. Une quatrième technique est depuis peu utilisée, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Découverte en 1985 par SAIKI *et al.*, elle a d'abord été appliquée à l'identification de différentes espèces de plantes et de bactéries, ainsi qu'à la détection des virus. NESS *et al.* (1993) ont récemment utilisée la PCR pour identifier les souches de *Saccharomyces cerevisiae*. La technique est basée sur l'amplification de séquences d'ADN génomique comprises entre les éléments répétés  $\delta$ , générant des profils variables selon les souches. Pour une souche donnée, ces profils sont reproductibles et stables au cours de la multiplication végétative.

Nous proposons ici un protocole simplifié de cette technique mise en oeuvre sur levures entières et comparons son pouvoir discriminant des souches de vinification à celui de l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### I — SOUCHES DE LEVURES UTILISÉES

Les levures indigènes ont été prélevées à différents stades de la fermentation alcoolique en vinification en rouge dans différents crus de la région bordelaise. Elles appartiennent toutes à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

### II — OLIGONUCLÉOTIDES

Les oligonucléotides amorces sont synthétisés dans un automate, Applied Biosystème 341. Les séquences oligonucléotides sont celles préconisées par NESS et *al.* (1992) ; l'oligonucléotide  $\delta 1$  a pour séquence 5' CAAAATTCACCTATA/TTCTCA 3' et l'oligonucléotide  $\delta 2$  5' GTGGATTTTTATTCCAACA 3'

### III — CONDITIONS D'AMPLIFICATION

La réaction d'amplification est réalisée directement sur levures entières après croissance sur milieu solide (YPG agar) jusqu'à la phase stationnaire ; une colonie est alors mise en suspension dans 1 ml d'eau milliQ stérile. Pour les levures sèches actives, l'amplification est réalisée directement sur les "vermicelles" réhydratés dans de l'eau milliQ stérile. La réaction d'amplification peut également être réalisée à partir de lies prélevées à la fin de la fermentation alcoolique et remises en croissance sur milieu solide YPG.

Après deux lavages successifs à l'eau milliQ, les cellules sont portées à la température de 95°C pendant 10 min afin de perméabiliser les enveloppes cellulaires.

Les cycles d'amplification sont réalisés par un automate, DNA Thermal Thermocycler 480, Perkin Elmer. Le volume réactionnel final, 40  $\mu$ l, contient 2 à 4.10<sup>6</sup> cellules / ml, 4  $\mu$ l de tampon Promega (KCL 500 mM, tris-HCL 100mM, Triton X-100 1 p. cent, MgCL<sub>2</sub> 25mM), 1  $\mu$ M de chaque oligonucléotide, 200  $\mu$ M de chaque dNTP\* (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), substrats de l'enzyme, et enfin 2,5 unités de Taq DNA polymérase Promega. Le processus d'amplification décrit par NESS et *al.*(1993), comprend de 34 cycles selon la programmation suivante : 95°C pendant 30 s pour l'étape de dénaturation, 45°C pendant 30 s (pour les 4 premiers cycles) et 42°C pendant 30s ( pour les 30 autres cycles) pour l'étape d'hybridation et 72°C pendant 2 min pour l'étape de synthèse.

Les fragments résultant de l'amplification sont analysés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1,8 p. cent, en présence de bromure d'éthidium. L'ADN visualisé sous UV à 524 nm est photographié (film polaroid négatif, type 665)

---

dNTP\* : désoxyribonucléotide triphosphate, dATP : désoxyadénoside 5'triphosphate, dCTP : désoxycytosine 5'triphosphate, dGTP : désoxyguanosine 5' triphosphate, dTTP : désoxythymidine 5' triphosphate

#### IV — ANALYSES DE CARYOTYPES PAR ÉLECTROPHORÈSE À CHAMPS PULSÉS

L'analyse des caryotypes par électrophorèse à champs pulsés est réalisée dans les conditions décrites par FRÉZIER *et al.* (1992).

### RÉSULTATS

#### I — PROFILS D'AMPLIFICATION PAR PCR DES SOUCHES INDUSTRIELLES

Sur les 21 souches de levures sèches industrielles analysées (tableau I), différenciées par les analyses de caryotypes dans des travaux antérieurs, 20 présentent des profils d'amplification différents; 2 souches seulement (522M et SIHA3) ont le même profil d'identification.

TABLEAU I

**Levures sèches industrielles œnologiques utilisées**

Dénominations commerciales	Souches	Origines
Zymaflore VL1	VL1	Institut d'Œnologie de Bordeaux
Actiflore F5	F5	Institut d'Œnologie de Bordeaux
Zymaflore F10	F10	Institut d'Œnologie de Bordeaux
Zymaflore VL3a	VL3a	Institut d'Œnologie de Bordeaux
Zymaflore VL3b	VL3b	Institut d'Œnologie de Bordeaux
Zymaflore VL3c	VL3c	Institut d'Œnologie de Bordeaux
522 Davis	522D	Université de Davis
Levuline ALS	EG8	INRA Colmar
Levuline BRG	BRG	Université de Bourgogne
Siha Levactif 3	Siha 3	Darmstadt
Siha Heffe 7	Siha 7	Darmstadt
Actiflore Killer	K1	INRA ICV
Œnoprox L1597	L1597	ITV Val de Loire
Actiflore Bayanus	B0213	Lallemand
ICV D47	D47	ICV
ICV D254	D254	ICV
Œnoferm M1	M1	Université de Massey
Œnoferm M2	M2	Université de Massey
Vin 7	Vin 7	Courtesy of Anchor Yeast
N 96	N 96	Courtesy of Anchor Yeast
WE 14	WE 14	Courtesy of Anchor Yeast

La figure 1 rapporte, à titre d'exemple, les résultats obtenus pour 9 souches. Ceci confirme, sur un plus grand nombre de souches les premiers résultats déjà obtenus par NESS et *al.*(1993). En outre, la PCR peut être mise en oeuvre sur cellules entières, sans extraction préalable de l'ADN génomique. Dans ces conditions, l'analyse de 25 souches requiert 2 heures pour la préparation des souches, 3 heures d'amplification et 3 heures de migration en électrophorèse.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Fig. 1 — Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,8 p. cent des fragments amplifiés des souches industrielles.  
1 : Témoin négatif, 2 : F10, 3 : VL1, 4 : VL3a, 5 : BO213, 6 : 522,  
7 : L1597, 8 : ALS, 9 : K1, 10 : VB20

## II — CONTROLES D'IMPLANTATION DES LEVAINS EN VINIFICATION PAR PCR

La PCR peut être appliquée au contrôle d'implantation des levures sèches actives dans un moût de raisin ensemencé; les analyses sont effectuées, sur biomasse totale, à partir des lies dont les profils d'amplification sont comparés à ceux de la souche de levure inoculée. La figure 2 donne l'exemple d'implantations réussies, où les profils des lies et du levain sont identiques. La figure 3, montre que l'implantation des souches A, D et E a échoué tandis que les souches B et C se sont implantées, sur le même moût dans des conditions de vinification identiques.

Le seuil de détection d'une souche contaminante, présentant un profil d'amplification différent du levain étudié, a été déterminé au laboratoire par mélange des 2 souches en proportions variables. On compare les profils d'amplifications des mélanges à ceux des souches pures. Dans l'exemple donné à la figure 4, la souche contaminante est facilement détectée à 1p. cent, en accord avec les résultats de NESS et *al.* obtenus sur ADN extraits. Cependant, dans des fermentations en cave, plusieurs souches minoritaires indigènes peuvent coexister avec la souche ensemencée. On peut donc estimer que la PCR effectuée à partir des lies permet d'apprécier un taux d'implantation du levain au moins égal à 90 p. cent, lorsque le profil d'amplification des lies et du levain sont identiques.

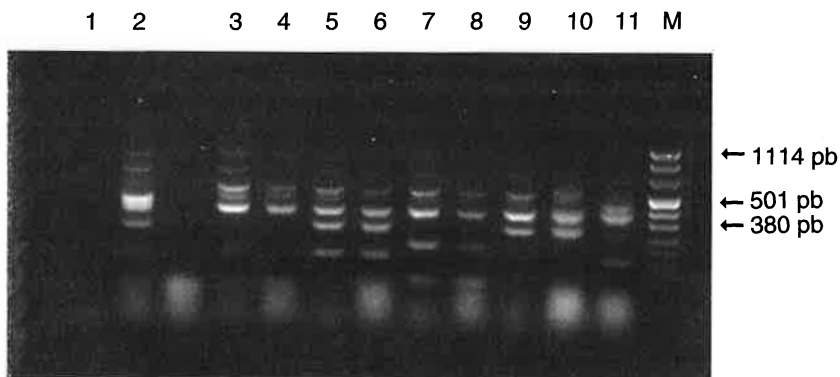


Fig. 2 — Exemple d'implantation réussie  
1 : témoin négatif, 2 : LSA A, 3 : LSA B, 4 : Lie B, 5 : LSA C, 6 : Lie C, 7 : LSA D, 8 : Lie D, 9 : LSA E, 10 : Lie E, 11 : Lie A, M : marqueur de taille.

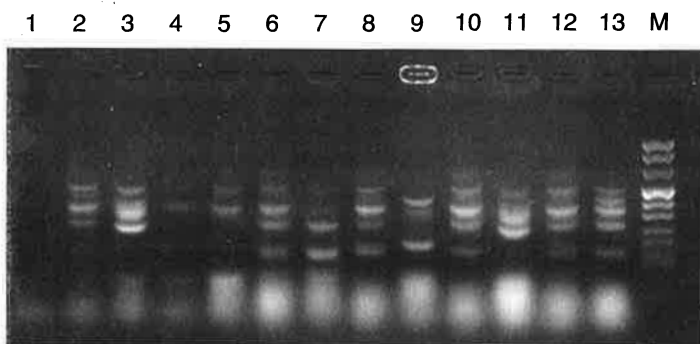


Fig. 3 — Exemple d'implantation non réussie  
1 : Témoin négatif, 2 : Lie A, 3 : LSA A, 4 : Lie B, 5 : LSA B, 6 : Lie C, 7 : LSA C, 8 : Lie D, 9 : LSA D, 10 : Lie E, 11 : LSA E, 12 : Lie F, 13 : Lie G, M : marqueur de taille.

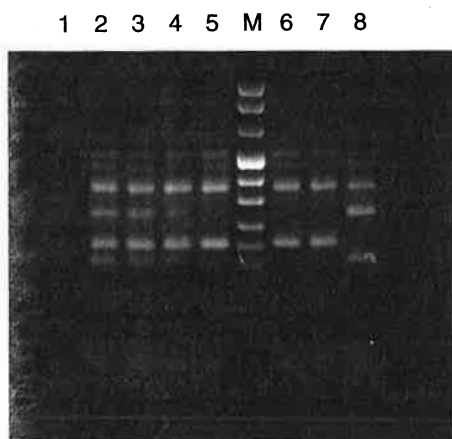


Fig. 4 — Détermination du seuil de détection d'une souche contaminante  
1 : Témoin négatif, 2 : souche A 70%, souche B 30%, 3 : souche A 80%, souche B 20%, 4 : souche A 90%, souche B 10%, 5 : souche A 99%, souche B 1%, M : marqueur de taille  
6 : souche A 99,9%, souche B 0,1%, 7 : souche A, 8 : souche B.

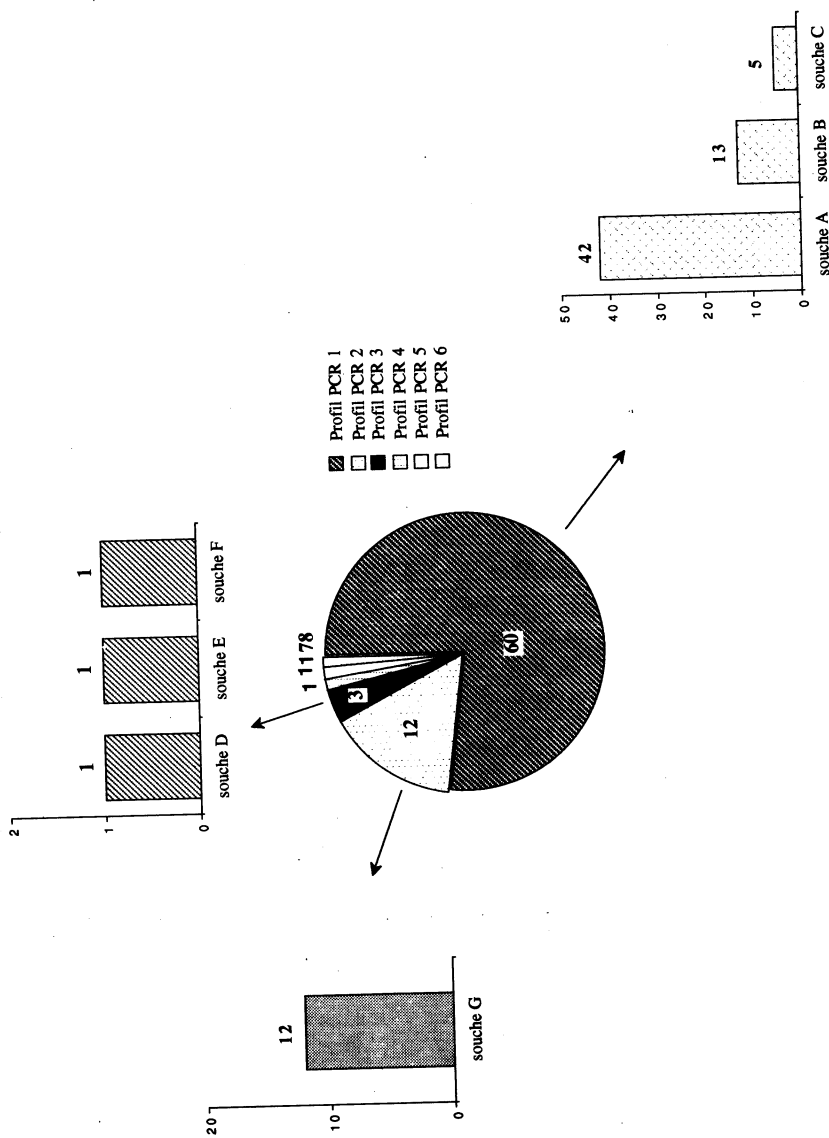


Fig. 5 — Comparaison du pouvoir discriminant de la PCR et de l'ECP.  
 Classification de 78 souches de levures isolées dans une fermentation spontanée de vendange rouge

### III — PROFILS D'AMPLIFICATION PAR PCR DES SOUCHES INDIGENES DE *S.CEREVISIAE*

Le prélèvement au hasard, après étalement sur milieu solide, de 78 colonies de *Saccharomyces cerevisiae* provenant d'un vin en fermentation spontanée a été effectué. Sur chaque colonie on réalise d'une part une amplification par PCR, d'autre part une analyse de caryotype par électrophorèse à champs pulsés (figure 5). On obtient 6 profils d'amplification différents et 10 caryotypes distincts. Les colonies présentant des profils d'amplification différents possèdent des caryotypes différents, l'inverse n'est pas systématique. Ainsi, les 60 colonies ayant en PCR le profil 1 n'ont pas toutes le même caryotype; 42 possèdent le caryotype A, 13 le caryotype B, 5 le caryotype C; de même, les 3 colonies caractérisées en PCR par le profil 3 ont chacune un caryotype différent. On doit donc en conclure que le pouvoir discriminant de la PCR est inférieur à celui de l'analyse des caryotypes pour la différenciation des souches indigènes de *S.cerevisiae* provenant d'un même prélèvement (une même cuve dans cet exemple). Il apparaît en outre que les souches indigènes provenant de caves différentes du vignoble bordelais et distinguées par leurs caryotypes possèdent en commun certaines séquences amplifiées identiques en PCR (500 et 350 pb) (figure 6).

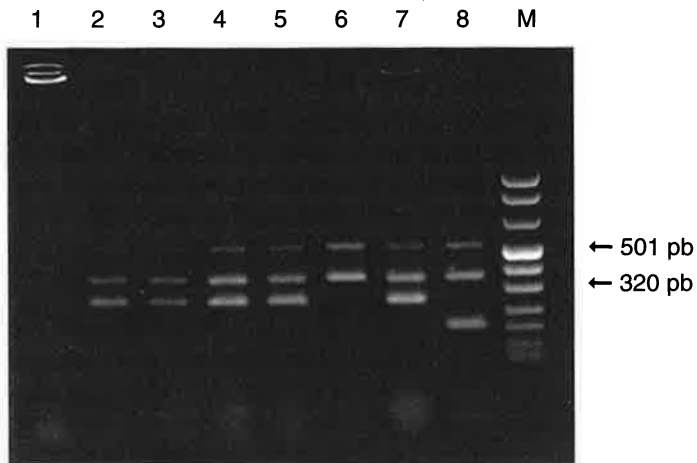


Fig. 6 — Electrophorèse sur gel d'agarose à 1,8% des fragments amplifiés des souches indigènes.  
1 : Témoin négatif, 2 à 8 : souches indigènes différentes, M : Marqueur de taille

### DISCUSSION ET CONCLUSION

La technique de la PCR constitue un outil rapide et sensible pour le contrôle d'implantation des levains de vinification. Elle peut s'appliquer sur lies prélevées soit en fin de fermentation alcoolique, soit plusieurs jours après la fermentation alcoolique. Cependant, cette technique d'identification des souches de *S.cerevisiae* est moins discriminante que l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé pour la caractérisation des levures

indigènes ; le polymorphisme étudié par PCR est plus faible que celui mis en évidence par électrophorèse en champ pulsé concernant la taille des chromosomes et la ploïdie des souches. La PCR, plus rapide, permet néanmoins d'effectuer un premier tri dans une population de levures indigènes ; en effet, si les profils d'amplification différents entre eux caractérisent des souches de levures différentes, les colonies présentant un même profil d'amplification peuvent correspondre à des souches différentes. Ces colonies nécessitent alors une analyse complémentaire par électrophorèse en champ pulsé afin d'affiner la discrimination.

Manuscrit reçu le 25 Février 1994 ; accepté pour publication le 28 mars 1994

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLONDIN B., VEZINHET F. et HALLET J.N., 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tool for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 568-571.
- DEGRE R., THOMAS D. Y., MAILHOT K, MORIN A. et DUBORD C., 1989. Wine yeast identification. *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 309-315.
- DUBOURDIEU D., SOKOL A., ZUCCA J., THALOUARN A., DATTEC A. et AIGLE M., 1987. Identification des souches de levures isolées de vins par l'analyse de leurs ADN mitochondrial. *Conn. Vigne Vin*, **21**, n°4, 267-278.
- FREZIER V. et DUBOURDIEU D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, n°4.
- HALLET J. N., GRANUGUY B., DANIEL P. et POULARD A., 1989. Caractérisation de souches levuriennes des moûts et des lies par le polymorphisme de restriction de leur ADN mitochondrial. *4e Symposium International d'œnologie de Bordeaux*. Actualités œnologiques. Dunod.
- NESS F., LAVALLEE F., DUBOURDIEU D., AIGLE M. and DULAU L., 1993. Identification of yeast using PCR. *ASEV 43rd Annual Meeting*, june 25-27.
- SAIKI R., GELFAUD D. H., STUFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERHLICH H. A. and ARNCHEIM N., 1985. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.