



L'identification des levures et bactéries œnologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

Amélie Vallet-Courbin¹, Marine Lucas¹, Lucie Dutilh¹, Cécile Miot-Sertier², Sara Windholtz², Patrick Lucas², Isabelle Masneuf-Pomarede², Julie Maupeu¹

¹ Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISVV, F33882 Villenave d'Ornon, France

² Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1366 OENOLOGIE, ISVV, F-33140 Villenave d'Ornon, France

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été adaptée afin d'être utilisée comme outil innovant d'identification au niveau de l'espèce des levures et bactéries isolées d'échantillons variés (moûts, vins, boissons). L'analyse d'un grand nombre de clones permet d'apprécier la diversité des espèces de levures, bactéries acétiques et lactiques présentes dès les phases pré-fermentaires, au cours des fermentations, pendant l'élevage ou après conditionnement. Dans le cas d'altération de produits, cet outil innovant participera à une meilleure maîtrise des risques microbiologiques.

Contexte

L'identification des microorganismes au niveau de l'espèce par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) est la méthode de référence depuis plus de quinze ans dans le secteur biomédical¹. Elle permet d'identifier les microorganismes de manière fiable et rapide pour orienter les professionnels de santé vers les traitements thérapeutiques appropriés. Sa rapidité, fiabilité, simplicité et son faible coût en font une alternative de choix aux méthodes d'identification basées sur le séquençage de l'ADN^{2,3}. Elle a déjà séduit d'autres secteurs comme celui de l'agroalimentaire^{4,5}. Des travaux récents y ont eu recours pour identifier les levures présentes dans des produits et boissons fermentés comme la bière ou le vin^{6,7}. Cependant, pour une identification robuste des levures et des bactéries d'intérêt œnologique, il faut associer l'appareil – un spectromètre de masse de type MALDI-TOF – à une base de données de spectres protéiques spécifiques de souches de levures et bactéries de l'environnement œnologique. Les travaux résumés dans cet article permettent de proposer la spectrométrie de masse MALDI-TOF comme méthode de routine pour l'analyse microbiologique des moûts et des vins.

Principe de la méthode d'analyse

L'identification des microorganismes se déroule en cinq étapes (figure 1) : 1/ Il est d'abord indispensable de disposer de colonies de levures ou de bactéries isolées sur un milieu nutritif gélosé, à partir d'échantillons de moût ou de vin. 2/ Chaque colonie ou fraction de colonie à identifier est ensuite déposée sur une cible adaptée permettant l'identification simultanée de plus de 90 isolats en une heure environ. 3/ Après un traitement rapide de toutes les colonies à analyser, la cible est déposée dans le spectromètre de masse et soumise à l'analyse. Chaque colonie est ainsi analysée avec un faisceau laser permettant de détruire les cellules, de fractionner leurs protéines en polypeptides et de les ioniser afin d'être analysés par le spectromètre de masse. 4/ L'ensemble des polypeptides de chaque colonie produit un spectre protéique, spécifique à une espèce de levure ou de bactérie. 5/ Ce spectre est enfin comparé à ceux référencés dans la banque de données de spectres du fabricant (BDD). La colonie déposée sur la cible est ainsi identifiée en moins d'une heure au niveau de l'espèce si la comparaison est satisfaisante. Mais si cette colonie appartient à une espèce de levure ou bactérie absente de cette bibliothèque ou bien présente mais avec des souches références trop éloignées de l'environnement œnologique, l'espèce n'est pas identifiée. La base de données du fabricant utilisée dans cette étude

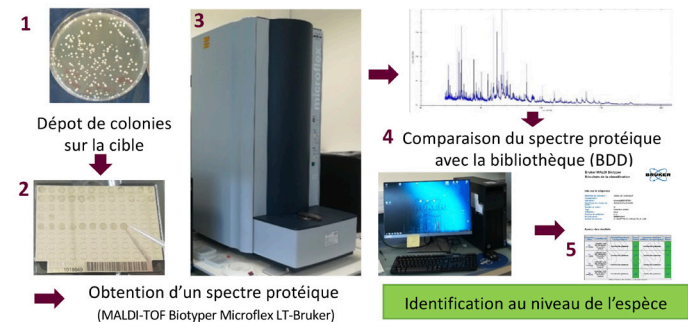


FIGURE 1. Étapes d'identification d'une espèce de microorganismes par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

contient plus de 9000 spectres protéiques, référencés à partir de souches de levures et bactéries rarement d'origine œnologique.

Base de données spécifique aux microorganismes œnologiques

La base de données de spectres de référence du fabricant (BDD) s'est avérée assez efficace pour identifier certaines espèces d'intérêt comme les levures *Hanseniaspora uvarum* et *Kluyveromyces lactis* (présentes en phases pré fermentaires) ou la bactérie lactique pouvant réaliser la fermentation malolactique *Lactiplantibacillus plantarum* (nommée précédemment *Lactobacillus plantarum*). Ces travaux, initiés en 2015, se sont révélés moins satisfaisants pour d'autres espèces, comme *Saccharomyces cerevisiae*⁶ ou l'agent majeur de la fermentation malolactique *Oenococcus oeni*, trop aléatoirement correctement identifiés. Pour la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*, l'efficacité d'identification a été estimée à seulement 46 % avec cette seule base de données de spectres (BDD). Des résultats tout aussi peu satisfaisants sont observés pour les levures *Torulasporea delbrueckii* et *Metschnikowia* sp. (utilisées en bioprotection sur moût) et *Zygosaccharomyces bailii* (à l'origine d'altérations), encore moins bien identifiées. Enfin, l'identification est impossible pour les espèces œnologiques qui ne sont pas référencées dans cette base de données de spectres, comme les levures *Starmarella bacillaris* et *Trigonopsis cantarelli* ou des bactéries acétiques du genre *Acetobacter*. Pour permettre une identification fiable des espèces œnologiques, une base de données « OENO » référençant les spectres protéiques de 217 isolats de levures et bactéries issus du Centre de Ressources Biologiques de l'ISVV (CRB Oeno) et représentatifs des principales espèces du moût et du vin a été construite.

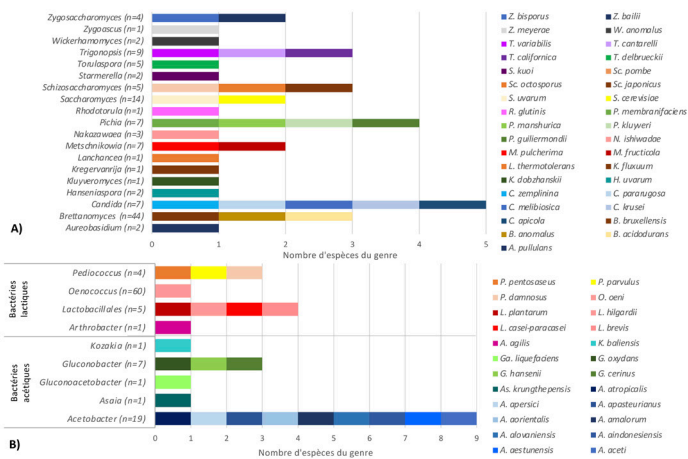


FIGURE 2. Nombre d'espèces des 19 genres de levures (A) (118 isolats) et des 9 genres de bactéries (B) (99 isolats) rajoutés à la base de données œnologique (le nombre de souches de chaque genre est noté entre parenthèse).

Elle se compose des spectres protéiques de 118 isolats de levures, correspondant à 35 espèces différentes (figure 2- A), dont une quinzaine initialement absente de la base de données de spectres du fabricant. Grâce aux connaissances actuelles, les 44 souches de *B. bruxellensis* référencées appartiennent à des groupes génétiques plus ou moins résistants au SO₂⁸.

Une centaine d'isolats de bactéries dont 17 espèces de bactéries acétiques et 9 espèces de bactéries lactiques (figure 2-B) sont aujourd'hui référencés dont 7 étaient initialement absentes, tout particulièrement pour le genre de bactéries acétiques *Acetobacter*. Les 60 souches d'*Oenococcus oeni* référencées dans la base de données de spectres « OENO » sont de différents groupes génétiques adaptés au moût ou aux différents types de vins⁹.

Validation de la méthode pour l'analyse de moûts et de vins

Pour tester l'efficacité de la méthode, plus de 10 000 colonies de levures et bactéries provenant de moûts¹⁰ et de vins ont été analysées en utilisant la base de données de l'appareil seule ou complétée par la nouvelle base de données de spectres « OENO » au cours de différents travaux lors des millésimes 2020 et 2021.

La figure 3 montre que la base de données « OENO » améliore considérablement l'identification de toutes les espèces de levures et bactéries, quels que soient les produits dont elles sont issues. L'ajout de la bibliothèque « OENO » permet d'identifier avec succès plus de 99 % d'isolats de levures contre seulement un tiers avec la bibliothèque du fabricant (BDD) seule (Figure 3-A).

Un peu moins de la moitié des bactéries œnologiques sont identifiées avec la seule bibliothèque BDD, alors qu'avec l'ajout de la base de données de spectres « OENO », 91 % des isolats bactériens sont identifiables avec succès.

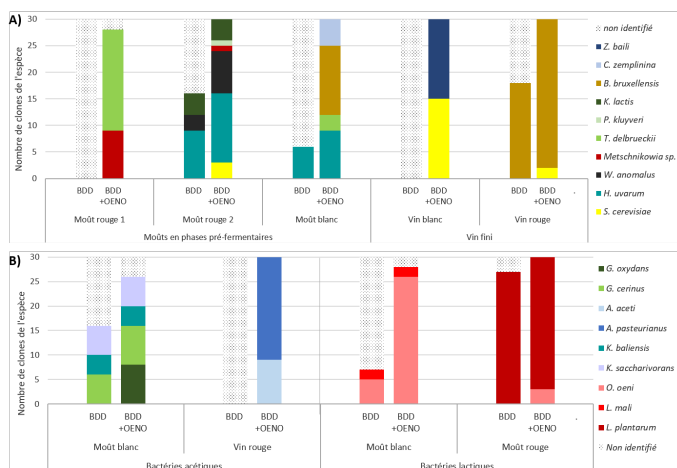


FIGURE 3. Proportion de chaque espèce de levures (A) et de bactéries (B) parmi 30 clones analysés par MALDI-TOF/MS et isolés de moûts ou vins en utilisant la base de données de spectres du fabricant (BDD) ou enrichie de la bibliothèque spécifique des microorganismes œnologiques (BDD+OENO).

Cette nouvelle base de données est indispensable pour l'analyse de la biodiversité microbienne des moûts mais également pour identifier rapidement les agents d'altérations des vins comme *B. bruxellensis*.

Conclusion

La construction d'une nouvelle base de données « OENO » a permis d'adopter la spectrométrie de masse MALDI-TOF comme analyse de routine pour identifier avec fiabilité les levures et bactéries œnologiques préalablement isolées sur milieu nutritif gélosé en une heure à l'ISVV. Cette méthode peut être employée pour l'analyse microbiologique des moûts et des vins, ainsi que pour des études de biodiversité, notamment dans un contexte de réduction de doses de SO₂.

Remerciements : Les auteurs remercient le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux (CIVB) et le Conseil Régional de la Région Nouvelle Aquitaine pour leur soutien financier, ainsi que le centre de Ressources Biologiques Œnologiques de l'ISVV (CRBO), pour la fourniture des souches de levures et bactéries utilisées.

1 Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A. and D.M. Wolk, 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: A Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiol. Rev.* (26) 547–603. <http://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>

2 Kurtzman C.P. and Robnett C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Anton. Leeuw.*(73)331-371. <http://doi.org/10.1023/a:1001761008817>

3 Sato H., Yanagida F., Shinohara T. and Yokotsuka K., 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *J. Biosc.* (90), 335-337. [http://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80091-2](http://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80091-2)

4 Quero L., Girard V., Pawtowski A., Tréguer S., Weill A., Arend S., Celliere B., Polsinelli S., Monin V., Van Belkum A., Vasseur V., Nodet P., and Mounier J. (2018). Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiol.* (81) 76-88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>

5 Zhang J., Plowman J., Tian B., Clerens S. and On S.L (2021). Application of MALDI-TOF analysis to reveal diversity and dynamics of winemaking yeast species in wild fermented, organically produced, new Zealand Pinot Noir wine. *Food Microbiol.*, 99-103824. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103824>

6 Usbeck J.C., Wilde C., Bertrand D., Behr J. and Vogel R.F (2014). Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Appl Microbiol Biotech.* (98), 3737-3752. DOI 10.1007/s00253-014-5586-x

7 Gutiérrez C., Gómez-Flechoso M A., Belda I., Ruiz I., Kayali N., Polo L. and Santos A. (2017). Wine yeasts identification by MALDI-TOF MS: Optimization of the preanalytical steps and development of an extensible open-source platform for processing and analysis of an in-house MS database. *Int. J. of Food Microbiol.*, 2 (254), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.003>

8 Avramova M., Vallet-Courbin A., Maupeu J., Masneuf-Pomarede I. and Albertin W. (2018). Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis* sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. *Frontiers in Microbiol.*, (9) 1260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>

9 El Khoury M., Campbell-Sills H., Salin F., Guichoux E., Claisse O. and Lucas P.M. (2017). Biogeography of *Oenococcus oeni* reveals distinctive but nonspecific populations in wine-producing regions. *Appl. And Env. Microbiol.* 83 (3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02322-16>

10 Windholtz S., Dutilh L., Lucas M., Maupeu J., Vallet-Courbin A., Farris L., Coulon J. and Masneuf-Pomarede I. (2021). Population Dynamics and Yeast Diversity in Early Winemaking Stages without Sulfites Revealed by Three Complementary Approaches. *Appl. Sci.*, 11(6), 2494. <https://doi.org/10.3390/app11062494>