

Diversité de la microflore indigène des vignobles bourguignons et rhodaniens

46

RÉSUMÉ Les baies de raisin abritent une grande variété de levures indigènes qui ont un impact sur le profil aromatique du vin. Nous avons étudié la biodiversité des levures indigènes naturellement présentes sur les baies de raisin, en fonction de l'origine de la parcelle et des pratiques culturales (biologique et conventionnelle) appliquées à la vigne. Les levures indigènes ont été isolées à partir de raisins ou de moûts issus de différentes parcelles en Bourgogne et en vallée du Rhône. Les différentes espèces de levures ont été identifiées par PCR puis confirmées par séquençage. *Hanseniaspora uvarum* est l'espèce majoritairement isolée en Bourgogne, tandis qu'en vallée du Rhône *Aureobasidium pullulans* est l'espèce prédominante. D'autres espèces appartenant aux genres *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces* et *Rhodotorula* ont été isolées en moindre proportion. En Bourgogne comme en vallée du Rhône, les modes de culture biologiques et conventionnels ne semblent pas impacter la diversité des levures sur raisin. Cependant, en vallée du Rhône les résultats montrent un effet millésime sur la biodiversité levurienne. Ce travail met également en évidence l'isolement de certaines souches non-*Saccharomyces* très peu décrites en littérature : *C. oleophila* et *M. viticola*.

MOTS CLÉS

LEVURE, BIODIVERSITÉ, NON-SACCHAROMYCES, BIO, CONVENTIONNEL

ABSTRACT Grape berries are home to a wide variety of wild yeasts that have a positive or negative impact on the flavor profile of wine. We studied the biodiversity of indigenous yeasts naturally present on grape berries, depending on the origin of plots and the farming systems (organic and conventional). Indigenous yeasts have been isolated from grapes or musts from different plots in Burgundy and Rhone Valley. The different yeast species were identified by PCR then confirmed by sequencing specific regions. *Hanseniaspora uvarum* is the species mainly isolated in Burgundy while in Rhone Valley, *Aureobasidium pullulans* is the predominant species. Other species belonging to genera *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Kluyveromyces* and *Rhodotorula* were isolated in smaller proportion. In Burgundy as in the Rhone valley, organic and conventional farming systems do not seem having an impact on the diversity of yeasts present on grapes. In Rhone valley, the results show a vintage effect on yeast biodiversity. This work also highlights some non-*Saccharomyces* yeasts scarcely isolated from grape berries: *C. oleophila* and *M. viticola*.

KEYWORDS

YEAST, BIODIVERSITY, NON-SACCHAROMYCES, ORGANIC, CONVENTIONAL

Mohand SADOUDI
Patrick VUCHOT
Inter Rhône
2260 route du Grès
84100 Orange
msadoudi@inter-rhone.com
04 90 11 46 22

Sandrine ROUSSEAU
Hervé ALEXANDRE
Raphaëlle
TOURDOT-MARECHAL
UMR-A 02-102 PAM-équipe
VALMIS,
Institut Jules Guyot-IUVV,
rue Claude Ladrey
BP27877, 21078 Dijon Cedex



Mohand SADOUDI

Diversity of indigenous microflora of vineyards from Burgundy and Rhone Valley



L'élaboration du vin est essentiellement basée sur la fermentation alcoolique (FA), qui peut être déclenchée spontanément par les levures indigènes naturellement présentes sur le raisin ou provoquée par levurage avec des levures sèches actives (LSA) commerciales.

L'inoculation des moûts de raisin avec des cultures pures de *Saccharomyces cerevisiae* constitue une des avancées technologiques dans la maîtrise des vinifications. L'utilisation des LSA permet la sécurisation des fermentations ainsi que la reproductibilité et la prévisibilité de la qualité du produit fini. Il a été admis que l'inoculation avec des espèces sélectionnées de *S. cerevisiae* permet l'élimination de toutes les espèces indigènes non-*Saccharomyces* (NS) au cours de la fermentation alcoolique. Bien que cette thèse ait été largement soutenue par les

chercheurs, les levures NS peuvent persister au cours des différentes étapes de vinification.

Les levures NS présentent des caractéristiques fermentaires impactant positivement ou négativement la qualité du vin. La production de composés indésirables mise en évidence chez certaines levures NS empêche généralement l'utilisation de certaines espèces levuriennes comme levains. A ceci s'ajoute le fait que la plupart des levures NS produisent peu d'éthanol et présentent une faible résistance au SO_2 . Cependant, si le rôle des levures *Saccharomyces* sur les arômes fermentaires et variétaux a été largement étudié, celui des levures NS n'est pas réellement clarifié à ce jour.

Depuis quelques années, plusieurs études ont été entreprises pour comprendre la participation des levures NS pendant la fermentation alcoo-

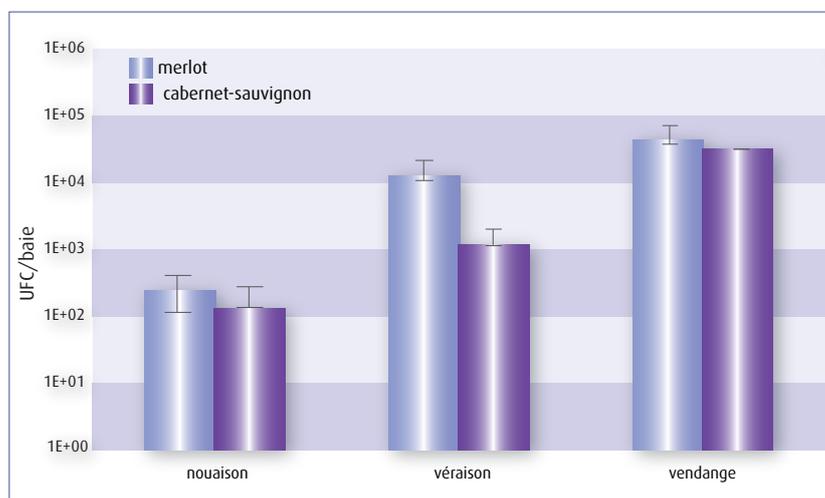


figure 1

Population de levures totales sur baies de raisin de merlot et de cabernet-sauvignon à différents stades phénologiques lors du millésime 2004 (Renouf, 2006).

lique et leur impact sur la complexité aromatique du vin produit. En effet, les professionnels de la filière estiment que la complexité de la flore peut, dans certains cas, être à l'origine de la complexité aromatique des vins. Face à ces constatations, l'étude de la diversité des levures indigènes et de leur impact sur la qualité du vin a suscité un grand intérêt chez les professionnels de la filière viticole.

• Écologie des levures non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*

Les levures sont présentes naturellement sur les sols, la surface des végétaux, notamment les baies de raisins, ou encore dans les domaines viticoles (Bokulich *et al.*, 2013 ; Mortimer & Polsinelli, 1999 ; Ocón *et al.*, 2010). Leur dissémination est assurée par le vent, les insectes et l'homme à travers ses différentes interventions sur l'environnement (Barata *et al.*, 2012 ; Ganter, 2006 ; Mortimer & Polsinelli, 1999).

La grappe de raisin constitue le principal réservoir naturel des levures œnologiques indigènes. Les espèces de levures présentes sur la surface des baies de raisin sont significativement limitées en nombre. La densité des levures évolue au cours de la maturation du raisin. A la vigne, les populations levuriennes cultivables sont faibles (10^2 à 10^3 UFC/g) sur les raisins immatures puis croissent jusqu'à 10^3 - 10^5 UFC/g au moment de la récolte (figure 1), (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004 ; Renouf *et al.*, 2005). De plus, les populations dénombrées sur des baies en sur-maturation ou sur des raisins

atteints de pourriture (ex: *Botrytis*) sont plus élevées et peuvent atteindre 10^5 et 10^7 UFC/g (Barata *et al.*, 2008 ; Nisiotou & Nychas, 2007). L'évolution des populations de levures peut être liée à l'augmentation de la surface de la baie et à la disponibilité de nutriments : au cours de la maturation de la grappe, les baies grossissent, la teneur en nutriments à la surface augmente, la concentration en sucre augmente et l'acidité diminue (Cadez *et al.*, 2010 ; Combina *et al.*, 2005).

La représentation des différentes levures varie au cours du développement de la baie de raisin selon plusieurs paramètres : le cépage, les conditions climatiques, le sol, les pratiques viticoles, l'âge de la vigne, l'état sanitaire de la grappe et le degré de maturité du raisin (Barata *et al.*, 2012 ; Barata *et al.*, 2008 ; Cadez *et al.*, 2010 ; Clavijo *et al.*, 2010 ; Cordero-Bueso *et al.*, 2011 ; Nisiotou *et al.*, 2007 ; Pretorius *et al.*, 1999 ; Valero *et al.*, 2007). Parmi ces paramètres, le cépage et le millésime sont deux variables souvent décrites comme capables d'influencer la diversité (Guerzoni & Marchetti, 1987 ; De La Torre *et al.*, 1999 ; Zahavi *et al.*, 2002 ; Nisiotou *et al.*, 2007 ; De La Torre *et al.*, 1999 ; Zahavi *et al.*, 2002). Dans des conditions pédoclimatiques similaires, des variations de populations de levures présentes ont été observées entre les cépages grenache et carignan (Sabate *et al.*, 2002) et entre les cépages mavroliatis et sefka ; Nisiotou & Nychas, 2007). Cependant, la corrélation entre le cépage et la diversité des levures est complexe. En effet, Sabate *et al.* (2002) ont constaté que pour un même cépage, les populations de levures peuvent varier dans une même parcelle. Concernant le millésime, différents auteurs ont observé une variation de la diversité levurienne en fonction du millésime (figure 2) (De La Torre *et al.*, 1999 ; Sabate *et al.*, 2002 ; Renouf, 2006).

Les incidences climatologiques sur les niveaux des populations levuriennes sur le raisin sont également importantes. Selon Combina *et al.*, (2005), les périodes de pluviosité avant la vendange ont une influence sur la diversité des espèces et favorisent une augmentation de la densité des levures, liée :

→ au grossissement des baies de raisin, en raison de la pluie, permettant la libération de petites larmes de jus sucré au niveau des zones



Genre	Cépage	Pays
<i>Aureobasidium</i>	Cabernet-Sauvignon, Chardonnay, Kraljevina, Modra frankinja, Rebula, Syrah, Verdicchio, Zametovka,	Afrique du sud, Australie, Espagne, Italie, Slovénie, Brésil
<i>Auriculibuller</i>	Rebula	Slovénie
<i>Brettanomyces/Dekkera</i>	Verdicchio	Italie, Chili
<i>Bullera</i>	Cabernet-Sauvignon	Afrique du sud
<i>Bulleromyces</i>	Rebula	Slovénie
<i>Candida</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Catalanesca, Kalecik karasi, Merlot, Semillon, Verdicchio, Visanto, Bical, Trebbiano, Muscat d'Alessandrie, Vino Cotto, Chardonnay, Moschofilero, Periquita, Tempranillo, Riesling, Barbera, Garnatxa, Grenache, Malbec, Periquita, Syrah, Tokaj aszu, Xarel.lo, Amarone, Limnio, Nosiola, Picolit, Ramandolo, Verdicchio	France, Afrique du sud Italie, Turquie, USA, Japon, Espagne, Portugal, Inde, Chili Nouvelle Zélande, Grèce, Germany, Chine
<i>Clavispora</i>	Limnio	Grèce
<i>Cryptococcus</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Merlot, Rebula, Verdicchio, Modra frankinja, Riesling, Chardonnay, Kraljevina, Modra frankinja, Zametovka, Cabernet,	France, Slovénie, Italie, Canada, Afrique du sud, Chine, Australie, Slovaquie
<i>Debaromyces</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Merlot, Modra frankinja, Syrah, Xarel.lo	France, Slovénie, Inde, Espagne, Chili
<i>Exophiala</i>	Cabernet-Sauvignon	Afrique du sud
<i>Hanseniaspora</i>	Chardonnay, Merlot, Vinsanto, Barbera, Bangalore Bleu, Cabernet, Cabernet-Sauvignon, Chenin Blanc, Grenache, Limnio, Sauvignon Blanc, Sefka, Syrah, Zinfandel, Catalanesca, Limnio, Mavrolitatis, Muscat Blanc, Tempranillo, Bical, Cabernet Franc, Emir, Garnatxa, Kalecik karasi, Kraljevina, Malbec, Modra frankinja, Moschofilero, Negroamaro, Periquita, Riesling, Semillon, Verdicchio, Xarel.lo, Zametovka	Australie, France, Italie, Espagne, Inde, Grèce, Portugal, Chine, Nouvelle Zélande, Turquie, Slovénie, Argentine, Canada, USA, Japon, Brésil, Chili
<i>Issatchenkia</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Merlot, Tempranillo, Catalanesca, Garnatxa, Syrah, Xarel.lo, Bangalore Bleu, Chardonnay, Chenin Blanc, Mavrolitatis, Muscat Blanc, Sefka, Syrah, Zinfandel, Moschofilero, Periquita, Verdicchio	France, Brésil, Espagne, Italie, Inde, Nouvelle Zélande, Grèce, Chine, Afrique du sud, Portugal
<i>Kazachstania</i>	Cabernet-Sauvignon	Afrique du sud
<i>Kluyveromyces</i>	Merlot, Moschofilero, Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Merlot, Inzolia, Barbera, Bical, Cabernet, Sauvignon, Emir, Grenache, Malbec, Mavrolitatis, Merlot, Semillon, Syrah	France, Italie, Espagne, Portugal, Turquie, Argentine, Grèce, USA, Chili, Slovaquie
<i>Lodderomyces</i>	Merlot	France
<i>Lipomyces</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Merlot	France
<i>Meira</i>	Cabernet-Sauvignon	Afrique du sud
<i>Metschnikowia</i>	Chardonnay, Riesling, Syrah, Visanto, Cabernet-Sauvignon, Tokaj aszu, Bical, Emir, Kalecik karasi, Kraljevina, Malbec, Mavrolitatis, Merlot, Modra frankinja, Moschofilero, Periquita, Trebbiano, Semillon, Verdicchio, Xarel.lo, Zametovka	Australie, Allemagne, Italie, Chine, Israël, Hongrie, Portugal, France, Espagne, Turquie, Slovénie, Argentine, Grèce, Chili
<i>Pichia</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Merlot, Visanto, Grenache, Syrah, Periquita, Moschofilero, Verdicchio, Zametovka, Bical, Chardonnay, Mavrolitatis, Catalanesca, Modra frankinja, Bangalore Bleu, Kalecik karasi, Malbec, Merlot	France, Italie, Chili, Chine, Espagne, Afrique du sud, Portugal, Slovénie, Nouvelle Zélande Grèce, Inde, Turquie, Argentine
<i>Rhodospodium</i>	Chardonnay, Syrah, Verdicchio, Cabernet-Sauvignon	Australie, Italie, Afrique du sud
<i>Rhodotorula</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Malbec, Riesling, Verdicchio, Kraljevina, Modra frankinja, Merlot, Zametovka, Chardonnay	France, Argentine, Canada, Italie, Slovénie, Australie, Italie, Afrique du sud
<i>Saccharomycopsis</i>	Bical	Portugal
<i>Sporidiobolus</i>	Riesling	Canada
<i>Sporisorium</i>	Cabernet-Sauvignon	Afrique du sud
<i>Sporobolomyces</i>	Cabernet Franc, Cabernet-Sauvignon, Merlot, Kraljevina, Modra frankinja, Riesling, Zametovka	France, Afrique du sud, Canada, Slovénie
<i>Torulasporea</i>	Visanto, Barbera, Merlot, Syrah, Verdicchio, Bical	Italie, Espagne, France, Chili, Portugal
<i>Ustilago</i>	Cabernet-Sauvignon	Afrique du sud
<i>Zygoascus</i>	Bical, Periquita, Garnatxa, Xarel.lo, Zinfandel	Portugal, Espagne, Inde
<i>Zygosaccharomyces</i>	Visanto, Trebbiano, Mavrolitatis, Syrah, Verdicchio, Vino Cotto, Tempranillo, Malbec	Italie, Grèce, Chili, Argentine

tableau 1

Genres de levures non-*Saccharomyces* isolés dans le monde en fonction du cépage.

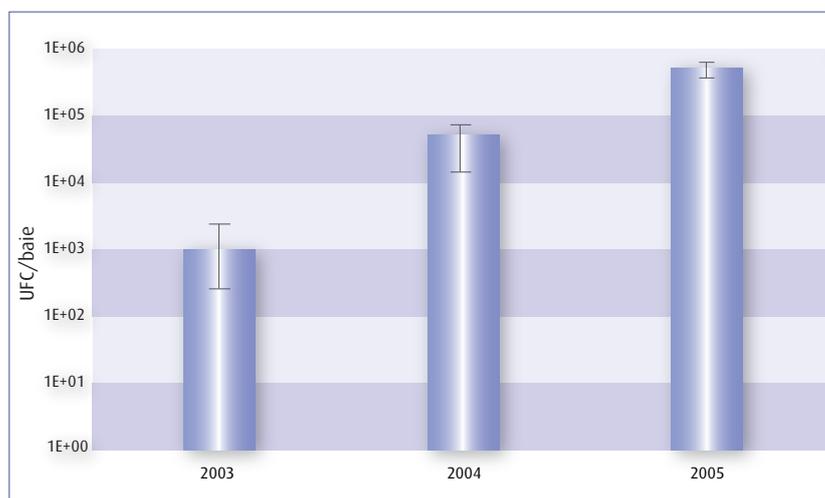


figure 2

Population de levures totales sur raisins rouges (merlot et cabernet-sauvignon) en fonction de trois millésimes (Renouf, 2006).

communes comme celle entre le pédicelle et la baie,

→ au phénomène d'exosmose. L'action de l'humidité présente à la surface des baies induit la libération de substances nutritives provenant de l'intérieur de la baie.

Bien que cette constatation affirmant que la population de levures est plus importante lors des millésimes froids et pluvieux ait été appuyée par différents auteurs, d'autres chercheurs sont d'un avis opposé. Non seulement, Comitini & Ciani, (2008) ont observé des densités levuriennes inférieures dans des années pluvieuses, mais Rementeria *et al.* (2003) ont constaté qu'un climat sec et chaud augmenterait le nombre de levures présentes sur baie.

L'état sanitaire des baies peut également influencer sur la diversité des levures présentes. Ainsi la présence de *Botrytis cinerea*, capable de pénétrer la surface de la baie et de libérer des nutriments, peut influencer la flore microbienne de la surface du raisin, avec dans certains cas, une augmentation de la population d'un facteur trois (Nisiotou & Nychas 2007). Par ailleurs, Sipiczki, (2006) a rapporté que les grappes atteintes de *Botrytis* favorisaient la présence d'espèces du genre *Metschnikowia* ayant un effet inhibiteur sur d'autres levures, notamment les *Brettanomyces*, moisissures et bactéries. Ce phénomène d'inhibition a été expliqué par un mécanisme de séquestration du fer (Sipiczki, 2006).

Le rôle de certains insectes présents au vignoble a également été décrit comme pou-

vant influencer la présence de levures sur baies, tels que les abeilles, les guêpes (Goddard *et al.*, 2010 ; Stefanini *et al.*, 2012). Attirés par les grappes endommagées, ces insectes au contact des baies favorisent l'adhésion des levures au niveau de leur tégument, permettant ainsi aux levures d'être disséminées. Le rôle des oiseaux migrateurs a également été suggéré comme vecteur de levures (Francesca *et al.*, 2012).

L'utilisation des produits phytosanitaires, lors des traitements de protection contre les bio-agresseurs de la vigne, peut avoir un effet sur les populations de levures du raisin. Cordero-Bueso *et al.* (2011) ont comparé sur trois ans, en Espagne, l'impact de productions, l'une conventionnelle et l'autre biologique, sur la diversité levurienne. Les résultats obtenus mettent en évidence une richesse spécifique plus importante dans les échantillons provenant de la parcelle en viticulture biologique. Une autre étude réalisée également en Espagne apporte les mêmes conclusions, à savoir une biodiversité des levures plus importante en mode biologique par rapport au mode conventionnel selon les pratiques locales habituelles (Tello *et al.*, 2012).

Par contre, (Milanovi *et al.*, 2013) ont présenté récemment une étude identique en Italie et n'arrivent pas à la même conclusion. Ces auteurs ont comparé la diversité levurienne présente sur baies provenant de deux parcelles conduites en viticulture biologique et conventionnelle. Ces auteurs mettent en évidence une diversité des espèces au sein de la modalité biologique inférieure à celle de la modalité conventionnelle.

• Origines des levures non-Saccharomyces

L'étude de l'écologie des levures NS connaît un essor important depuis ces dernières années, et se focalise non seulement sur la répartition des espèces rencontrées sur le raisin mais également sur leur succession durant la fermentation alcoolique (Barata *et al.*, 2012 ; Martini, Ciani *et al.*, 1996 ; Mora & Mulet, 1991 ; Renouf *et al.*, 2005 ; Setati *et al.*, 2012). Un grand nombre de levures NS peut coloniser la surface des baies de raisin. Le tableau 1 recense au niveau mondial, les différentes espèces de levures NS isolées sur grappe ou sur moût de raisin en fonction du cépage. Nous avons inventorié, dans 21 pays, 90



espèces différentes appartenant à 29 genres différents, isolées à partir de 44 cépages différents.

Les espèces de levures NS à la surface du raisin varient fortement au cours de la maturation. De la véraison à la maturation, une succession des espèces de levures NS est observée. A la véraison, les grappes sont essentiellement colonisées par les levures basidiomycètes (exemples: *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium*) et la levure *Aureobasidium pullulans*. A maturité du raisin, les levures Ascomycètes ayant un métabolisme oxydatif ou faiblement fermentaire prennent le relais et deviennent majoritaires (par exemple, les genres *Candida*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* et *Pichia*). *Hanseniaspora uvarum* (forme anamorphe: *Kloeckera apiculata*) est indéniablement l'espèce prédominante et représente entre 50 et 75 % de la population levurienne totale sur raisin mature (Pretorius, 2000). D'autres espèces appartenant aux genres

Candida, *Metschnikowia* et *Pichia* sont présentes en plus faibles proportions (Barata *et al.*, 2012 ; Pretorius *et al.*, 1999 ; Fleet, 1998). Lorsque les baies de raisin sont sérieusement endommagées, l'augmentation de la concentration de sucre à la surface favorise le développement des levures Ascomycètes à forte activité fermentaire comme *Pichia* spp., *Zygoascus hellenicus* (forme anamorphe: *Candida hellenica*) ou encore des levures d'altération comme *Zygosaccharomyces* spp..

• Origine des levures *Saccharomyces*, un sujet controversé?

L'origine des levures *Saccharomyces* intervenant lors des fermentations spontanées est encore un sujet controversé (Bisson & Joseph, 2009). Le désaccord réside dans les contributions relatives du vignoble et du chai quant à la source de cette levure du vin. En effet, une école soutient l'idée que, bien que minoritaires, les levures *Saccha-*

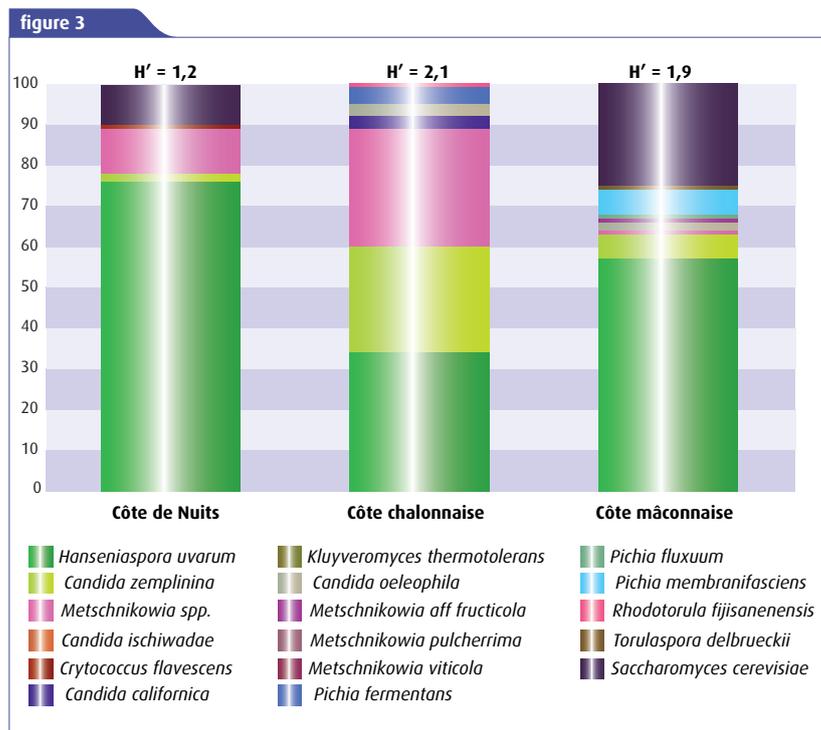
Régions	Mode de culture	Cépage	Nombre de parcelles	Total de colonies isolées et identifiées
Bourgogne	Bio	Chardonnay	3	126
	Conventionnel	Chardonnay	5	307
Vallée du Rhône	Bio	Syrah	1	20
	Bio	Grenache	1	20
	Bio	Clairette	2	40
	Conventionnel	Syrah	1	20
	Conventionnel	Grenache	1	20
	Conventionnel	Clairette	2	40

tableau 2

Caractéristiques des prélèvements effectués et nombre de colonies isolées et identifiées.

romyces proviennent de la surface des raisins, et que leur présence ou absence change d'une grappe à une autre et d'un cep à un autre, au sein d'une même parcelle (Combina *et al.*, 2005 ; Martini, 1993 ; Raspor *et al.*, 2006). D'autres estiment que *S. cerevisiae* est liée aux environnements artificiels comme le matériel vitivinicole et les différentes surfaces du chai (Martini *et al.*, 1993 ; Combina *et al.*, 2005 ; Raspor *et al.*, 2006). Une part de la controverse est liée à l'extrême difficulté d'isoler *S. cerevisiae* du raisin (Mortimer & Polsini, 1999 ; Valéro *et al.*, 2007). Mortimer & Polsini (1999) estiment qu'une baie de raisin sur 1000 est porteuse de *S. cerevisiae*. Cependant, ces mêmes auteurs ont

Répartition des genres et espèces de levures indigènes (%) en fonction du site d'isolement en Bourgogne.



trouvé que les grappes endommagées (naturellement dans le vignoble) portent des populations importantes avec 1 baie sur 4 porteuse de *S. cerevisiae*. En revanche, selon d'autres auteurs, *S. cerevisiae* est indétectable sur le raisin (Combina *et al.*, 2005 ; Raspor *et al.*, 2006). L'analyse directe de la présence des *Saccharomyces* a été entreprise par Valero *et al.* (2007), en utilisant du raisin récolté aseptiquement et aussitôt mis en fermentation dans des conditions stériles sans inoculation. Dans cette étude, 68 % des échantillons sont partis en fermentation. Toutefois, 42 % des fermentations ont été complètes et 28 % ont été dominées par *S. cerevisiae*. Dans une autre étude basée sur la manipulation aseptique du raisin, il a été montré que les espèces principalement observées au cours de la fermentation sont *C. stellata* et *S. cerevisiae* (Clemente-Jimenez *et al.*, 2004). Ces études montrent, en effet, que l'espèce *S. cerevisiae* peut être trouvée sur le raisin, avec dans certains cas, un taux de population suffisant pour amorcer la fermentation (Schuller *et al.*, 2005). Cependant, ce n'est pas toujours le cas, car la fermentation peut également être réalisée par la flore résidente du chai. En effet, durant les différentes étapes de transformation, le jus de raisin rentre en contact avec une large surface vinicole dans le chai, qui peut être un réservoir important de la microflore du vin (Bokulich *et al.*, 2013). En outre, certains scientifiques ont suggéré que *S. cerevisiae* s'est adaptée à l'environnement du chai et qu'elle n'a pas de véritable habitat naturel (Martini *et al.*, 2003). En effet, Sicardet *et al.*, 2011 ont rapporté que les activités humaines peuvent être associées à l'apparition de nouvelles espèces du genre *Saccharomyces* par hybridation interspécifique ou polyploïdisation.

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont isolé des levures commerciales dans des vignobles adjacents au chai, montrant ainsi que la dissémination des levures du chai vers le vignoble est facilitée par différents vecteurs potentiels tels que les insectes (Mortimer & Polsini, 1999 ; Valéro *et al.*, 2005 ; Clavijo *et al.*, 2010).

Indépendamment de ces études, il est fort possible que *S. cerevisiae* ait été introduite du vignoble au chai via différents vecteurs biotiques (les insectes par exemple) et qu'elle se

développe dans l'environnement du chai qui lui est plus favorable.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la biodiversité des levures indigènes dans différents vignobles bourguignons et de la vallée du Rhône et, plus particulièrement, l'impact de deux modes de culture, bio et conventionnel, sur la pluralité des espèces levuriennes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a porté essentiellement sur l'étude de la biodiversité de levures indigènes cultivables présentes sur baies de raisins et dans des moûts en tout début de FA, issus de différents domaines bourguignons (millésime 2010) et rhodaniens (millésimes 2011 et 2012) ne pratiquant pas le levurage. Dans un premier temps, la diversité a été étudiée dans différents sites de production en Bourgogne, compte tenu du grand nombre de parcelles prélevées et d'isolats de levures identifiés. Dans un deuxième temps, la répartition des espèces de levures ainsi que leurs proportions en fonction du mode de culture appliquée à la vigne a été réalisée.

→ Pour l'étude de la biodiversité en fonction de la situation géographique, les levures ont été isolées à partir de 22 parcelles de raisins chardonnay et pinot noir de trois sites de production en Bourgogne (Côte Chalonnaise, Côte de Nuits et Mâconnais).

→ Pour l'étude de la biodiversité en fonction du mode de culture, les levures ont été isolées à partir de 8 parcelles de chardonnay en Bourgogne et 8 parcelles de syrah, grenache et clairette en vallée du Rhône (tableau 2).

Les différents genres et espèces de levures ont été identifiés par techniques moléculaires (PCR et séquençage de régions spécifiques d'ADNr).

Les comparaisons de la biodiversité entre les différents sites de prélèvements et entre les pratiques culturales de chaque région ont été obtenues par le calcul des indices de Shannon et Weaver, $H' = -\sum ((N_i / N) * \log_2 (N_i / N))$.

N_i est le nombre d'individus d'une espèce donnée, i allant de 1 à S (nombre total d'espèces) et N le nombre total d'individus. Plus H' est

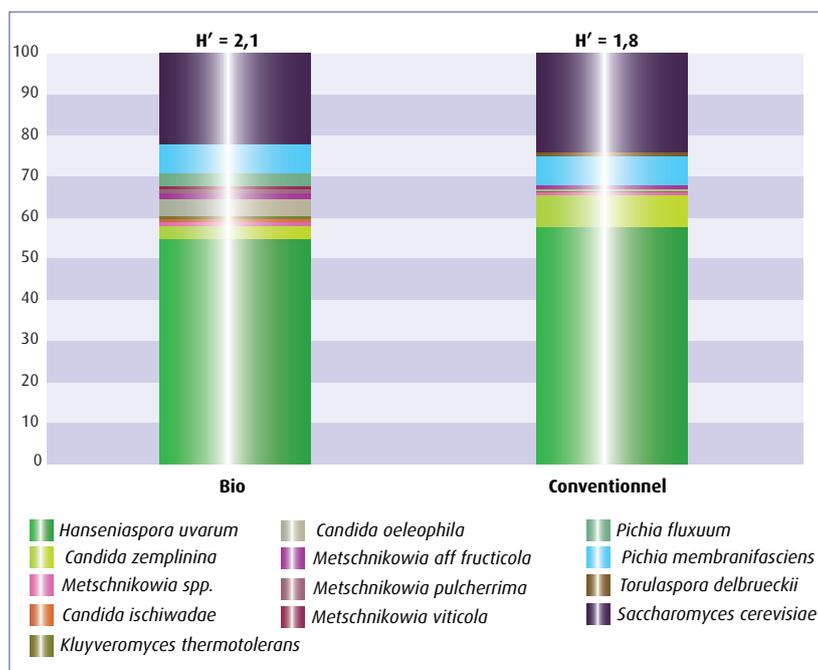


figure 4

grand, plus la diversité est importante. H' est minimal (= 0) si tous les individus appartiennent à une seule espèce, H' est également minimale si chaque espèce est représentée par un seul individu (Shannon, Weaver, 1949).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

• Biodiversité des levures indigènes en fonction de l'origine des parcelles en Bourgogne

965 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 9 genres et 17 espèces différents : *Hanseniaspora* (63,9 %), *Saccharomyces* (15 %), *Metschnikowia* (8,4 %), *Candida* (8,0 %), *Pichia* (3,6 %), *Cryptococcus* (0,4 %), *Torulasporea* (0,2 %), *Kluyveromyces* (0,2 %) et *Rhodotorula* (0,1 %) (figure 1). Ces différents genres de levures sont bien documentés dans la littérature comme présents sur raisin et en début de FA (Zott *et al.*, 2008 ; Barata *et al.*, 2012).

Dans cette étude, nous n'avons observé aucun effet du cépage sur la diversité des levures indigènes (résultats non montrés). Ceci est probablement dû au faible nombre d'échantillons par cépage d'une même zone géographique. Cependant, la diversité des levures ainsi que leur fréquence d'isolement sont variables d'un site de

Répartition de genres et espèces de levures indigènes (%) isolées en fonction du mode de culture en Bourgogne.

prélèvement à un autre. En effet, l'indice de Shannon et Weaver est maximal pour les isolats de la Côte Chalonnaise et du Mâconnais ($H' = 2,1$ et $H' = 1,9$, respectivement) comparé à celui calculé pour la Côte de Nuits ($H' = 1,2$).

L'espèce *Hanseniaspora uvarum* est l'espèce majoritairement isolée à partir des zones géographiques Côte de Nuits (76 %) et Mâconnais (57 %). Les isolats issus de la Côte Chalonnaise ont présenté une répartition similaire entre les genres *Hanseniaspora* (33,8 %), *Candida* (32,5 %) et *Metschnikowia* (28,6 %) (figure 3). Ces résultats sont en accord avec la bibliographie. En effet, les levures à faible activité fermentaire, comme principalement les espèces du genre *Hanseniaspora* et à un degré moindre des genres *Candida* et *Metschnikowia* prédominent sur raisin et dans les premiers stades de la FA.

Cette étude met en avant la variabilité des espèces au sein de chaque genre de levure, notamment dans les genres *Candida* (*C. zemplinina*, *C. oleophila*, *C. californica* et *C. ishiwadae*) et *Metschnikowia* (*M. pulcherrima*, *M. viticola*, *M. aff. fructicola* et autres *Metschnikowia* sp.). Cette étude met également en évidence des espèces très peu décrites sur les cépages char-

donnay et pinot noir (*C. ishiwadae*, *M. aff. fructicola*, *M. viticola*).

• Biodiversité des levures indigènes en fonction du mode de culture en Bourgogne et en vallée du Rhône

La diversité des levures indigènes a été comparée en fonction de deux modes de culture bio et conventionnel dans un site de production en Bourgogne (Mâconnais, millésime 2010, figure 4) et dans deux sites en vallée du Rhône (Châteauneuf-du-Pape et Roquemaure, millésimes 2011 et 2012, figure 5).

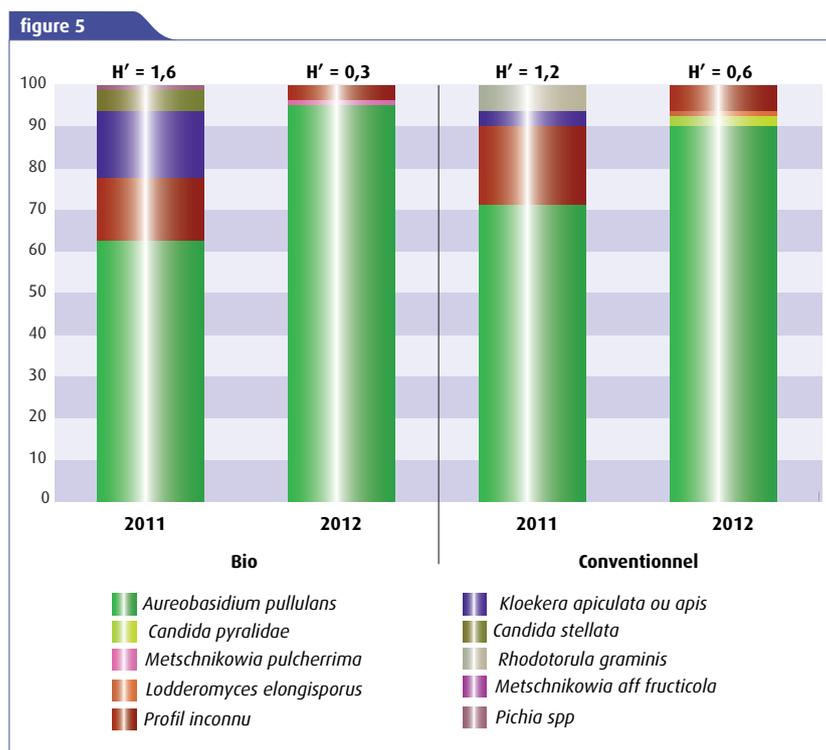
En Bourgogne : Les parcelles en biodynamie ont présenté une diversité légèrement plus importante, comparées à celles conduites en culture conventionnelle. En effet, les indices de Shannon et Weaver sont proches, mais l'indice calculé à partir des isolats en mode de culture bio est légèrement plus grand ($H' = 2,1$ en bio, $H' = 1,8$ en conventionnel, figure 4).

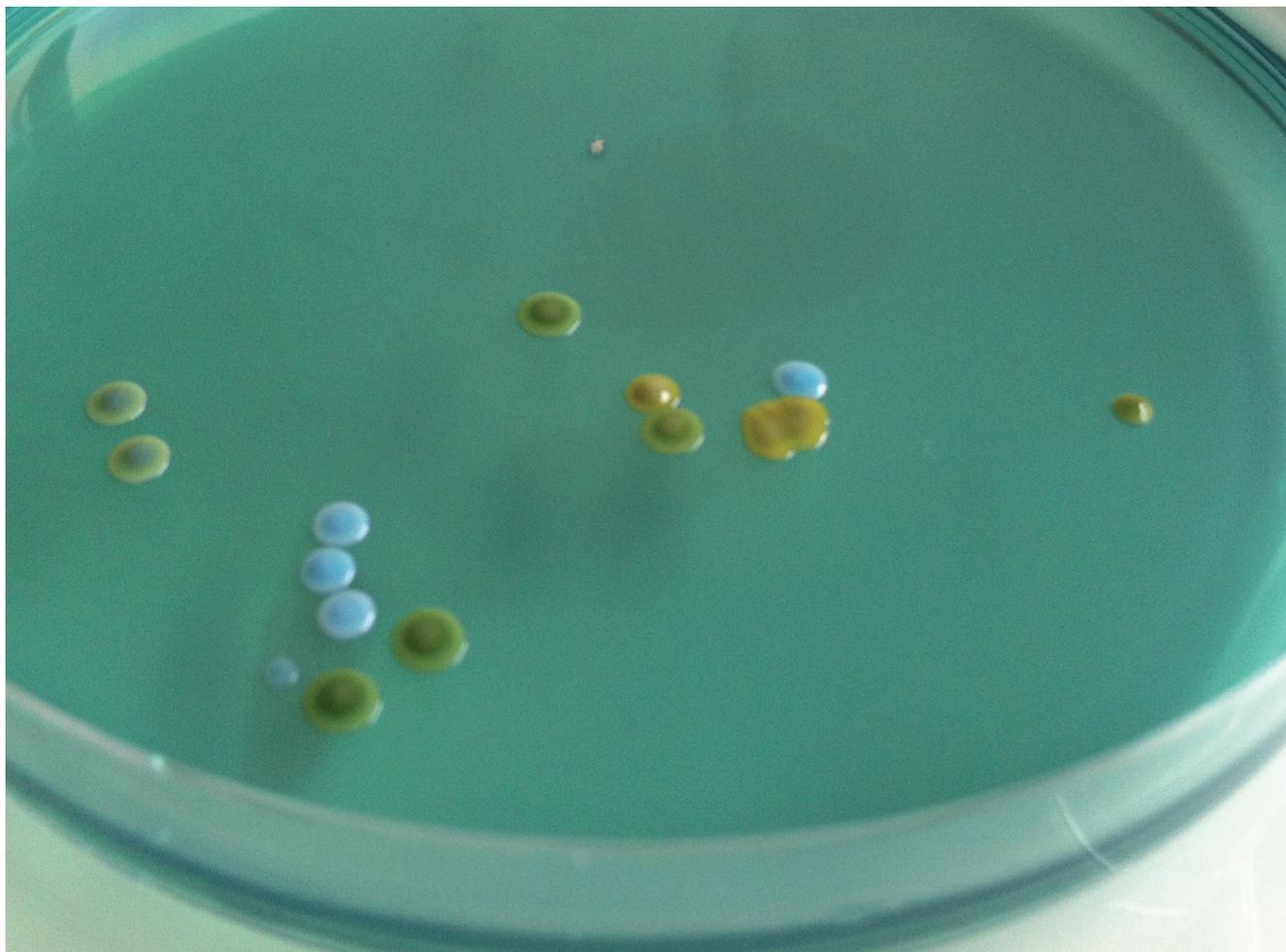
Bien que le nombre de levures isolées à partir des parcelles en mode conventionnel soit 3 fois plus grand qu'en bio, la variabilité inter-espèces est moins importante. En effet, pour 126 levures isolées de parcelles en bio, 12 espèces différentes ont été recensées, alors que pour 433 isolats issus de parcelles en mode conventionnel, seules 9 espèces ont été identifiées. Les espèces *C. ishiwadae*, *M. pulcherrima*, *M. viticola* et *P. membranifciens* n'ont été représentées qu'en mode bio. Cependant, l'espèce *T. delbrueckii* n'a été isolée qu'à partir des parcelles en mode conventionnel (figure 4). Bien que notre étude ne mette pas en évidence une grande différence de la biodiversité levurienne entre les deux modes de cultures, bio et conventionnel, d'autres études menées à ce sujet présentent des résultats différents.

Il est à noter selon l'étude réalisée par Setati *et al.*, (2012) que l'effet de l'hétérogénéité de la parcelle a un effet sur la diversité levurienne plus important que celui de la pratique culturale appliquée à la vigne. Ces résultats démontrent l'importance de l'échantillonnage dans ce type d'étude.

En vallée du Rhône : la biodiversité des levures indigènes a été étudiée sur deux années successives, 2011 et 2012. A chacune des deux campagnes de vendanges, 160 isolats de levures

Répartition de genres et espèces de levures indigènes (%) isolées en fonction du mode de culture en Vallée du Rhône.





sont identifiés. Il est à noter que certains profils PCR n'ont pas pu être déterminés et donc aucune identification n'a été définie. Au total, 320 isolats de levures ont été identifiés comme appartenant à 9 espèces différentes : *A. pullulans*, *C. stellata*, *C. pyralidae*, *K. apiculata*, *L. elongisporus*, *M. pulcherrima*, *Pichia* spp., *R. graminis* et l'espèce avec un profil inconnu.

L'espèce *Aureobasidium pullulans* est celle majoritairement isolée, à 80 % sur les deux millésimes. Cette levure est un microorganisme ubiquiste, c'est-à-dire qu'il peut coloniser différents environnements : l'air, le sol, la surface des fruits et des plantes. *Aureobasidium pullulans* est, en effet, le microorganisme le plus souvent isolé en forte proportion sur les baies saines. Renouf (2006) a identifié cette espèce dans le Bordelais, comme étant une des espèces majoritaires

sur les raisins non vérés. Sa proportion diminue ensuite très fortement jusqu'à devenir indétectable à maturité. Par contre, en Australie, Prakitchaiwattana *et al.* (2004) retrouvent *Aureobasidium pullulans* tout au long de la maturation des baies de raisin. Cette levure n'a pas d'impact direct sur la qualité du vin car on ne la retrouve jamais dans le moût. En effet, c'est une levure non-fermentaire. Cependant, cette levure pourrait avoir un effet indirect sur le vin. Selon Castoria *et al.*, (2001), *Aureobasidium pullulans* peut influencer la composition de la flore levurienne sur le raisin de par son activité antagoniste vis-à-vis d'autres microorganismes. Donc, des levures indésirables pourraient se retrouver dans le moût ou au contraire disparaître du raisin. L'étude des interactions entre cette espèce et les microorganismes du vin mériterait d'être approfondie et

apporterait des données importantes concernant la bio-protection et la réduction d'intrants.

Contrairement à la Bourgogne, l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas été isolée en vallée du Rhône. La raison en est que les isollements de levures ont été réalisés à partir de raisins et de moût en Bourgogne mais exclusivement à partir de raisins en vallée du Rhône. Comme expliqué en introduction, les chercheurs rapportent l'extrême difficulté d'isoler la levure *Saccharomyces* sur raisin (Mortimer & Polsini, 1999 ; Valéro *et al.*, 2007). Mortimer & Polsini, (1999) estiment qu'une baie de raisin sur 1000 est porteuse de *S. cerevisiae*, en tenant compte de la forte variabilité dans une parcelle ou encore au sein d'un même cep.

Comme constaté en Bourgogne, la biodiversité levurienne est globalement similaire quel que soit le mode de culture, bio ou conventionnel appliqué à la vigne. On note néanmoins une diversité légèrement plus importante en bio qu'en conventionnel pour l'année 2011 ($H'=1,6$ et $H'=1,2$, respectivement) et moindre pour l'année 2012 ($H'=0,3$ et $H'=0,6$, respectivement).

Cependant, quel que soit le mode de culture, la biodiversité est plus importante pour le millésime 2011 par rapport au millésime 2012 (figure 5). En effet, l'indice de Shannon et Weaver passe de 1,6 à 0,3 pour le bio et de 1,2 à 0,6 pour le conventionnel. Ces résultats montrent l'existence d'un effet millésime quant à la diversité des levures indigènes présentes sur le raisin. En effet, les incidences climatologiques sur les niveaux de populations de levures sont importantes. Les périodes de pluviosité avant la vendange ont, en effet, une influence sur la diversité des espèces (Combina *et al.*, 2005). Dans notre cas, 2011 et 2012 ont présenté des niveaux de précipitation différents, 80 mm en septembre 2011 et 20 mm en septembre 2012. Nos résultats sont en accord avec les travaux de plusieurs auteurs (Longo *et al.*, 1991; De La Torre *et al.*, 1999; Combina *et al.*, 2005; Cadez *et al.*, 2010) qui ont observé une diversité de levures plus importante lors des millésimes pluvieux. Cependant, Rementeria *et al.* (2003) ont constaté qu'un climat sec et chaud augmenterait le nombre de levures présentes sur baie.

CONCLUSION

Ces travaux mettent en lumière la prévalence de l'espèce *Hanseniaspora uvarum* en Bourgogne où les prélèvements proviennent principalement du moût de raisin, et la prédominance de l'espèce *Aureobasidium pullulans* où les échantillons sont issus directement du raisin.

Cette étude montre l'existence d'une variabilité des espèces au sein des genres de levure *Candida* (*C. zemplinina*, *C. oleophila*, *C. californica* et *C. ishiwadae*) et *Metschnikowia* (*M. pulcherrima*, *M. viticola*, *M. aff. fructicola* et autres *Metschnikowia* sp.), et met en évidence des espèces très peu décrites sur les cépages chardonnay et pinot noir (*C. ishiwadae*, *M. aff. fructicola*, *M. viticola*).

En Bourgogne comme en vallée du Rhône, le fait de travailler en bio ou en conventionnel semble ne pas impacter la biodiversité des levures. Mais il serait judicieux d'étudier au sein du mode de culture conventionnel l'impact des différents produits phytosanitaires employés sur la microflore du raisin.

Les résultats montrent l'existence d'un effet millésime concernant la diversité des levures en vallée du Rhône. Cet effet peut être directement relié aux incidences climatologiques et en particulier aux niveaux de précipitation.



BIBLIOGRAPHIE

- Barata A. *et al.*, 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, **153** (3), 243-259.
- Barata A., Seborro F., Belloch C., Malfeito-Ferreira M., & Loureiro V., 2008. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology*, **104** (4), 1182-1191.
- Bokulich N. A. *et al.*, 2013. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLoS ONE*, **8** (6), e66437.
- Cadez N. *et al.*, 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*, **10** (5), 619-630.
- Castoria R. *et al.*, 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, **22** (1), 7-17.
- Clavijo A. *et al.*, 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serrania de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, **143** (3), 241-245.
- Clemente-Jimenez J. M. *et al.*, 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, **21** (2), 149-155.
- Combina M. *et al.*, 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, **98** (5), 1055-1061.
- Comitini F. & Ciani M. 2008. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, **58** (3), 489-493.
- Cordero-Bueso G. *et al.*, 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, **145**(1), 132-139.
- De La Torre M. J. *et al.*, 1999. Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. *Microbios*, **100** (395), 27-40.
- Fleet G. H., 1998. The microbiology of alcoholic beverages. In B. J. B. Wood (Éd.), *Microbiology of Fermented Foods*, 217-262. Boston, MA: Springer US.
- Ganter P. F., 2006. Yeast and Invertebrate Associations. In D. G. Péter & P. C. Rosa (Éd.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, 303-370. Springer Berlin Heidelberg.
- Guerzoni E. & Marchetti R., 1987. Analysis of Yeast Flora Associated with Grape Sour Rot and of the Chemical Disease Markers. *Applied and Environmental Microbiology*, **53** (3), 571-576.
- Longo E. *et al.*, 1991. Effect of Climatic Conditions on Yeast Diversity in Grape Musts from Northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42** (2), 141-144.
- Martini A., 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research*, **4** (3), 165-176.
- Martini A. *et al.*, 1996. Direct Enumeration and Isolation of Wine Yeasts from Grape Surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47** (4), 435-440.
- Milanovi V. *et al.*, 2013. Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, **161** (3), 240-246.
- Mora J. & Mulet A., 1991. Effects of Some Treatments of Grape Juice on the Population and Growth of Yeast Species During Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42** (2), 133-136.
- Mortimer R. & Polsinelli M., 1999. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, **150** (3), 199-204.
- Nisiotou A. A. & Nychas G.-J. E., 2007. Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (8), 2765-2768.
- Nisiotou A. A. *et al.*, 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (21), 6705-6713.
- Ocón E. *et al.*, 2010. Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *European Food Research and Technology*, **230** (6), 885-891.
- Prakitchaiwattana C. J. *et al.* 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, **4** (8), 865-877.
- Pretorius I. S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* (Chichester, England), **16** (8), 675-729.
- Pretorius I. S. *et al.*, 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African Wine Industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, v. **20** (2) 61-74.
- Raspor P. *et al.*, 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, **109** (1-2), 97-102.
- Rementería A. *et al.*, 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the «Txakoli de Bizkaia» region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*, **86** (1-2), 201-207.
- Renouf V. 2006. Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres - Relation avec la qualité du Vin [PhD Thesis].
- Renouf V. *et al.*, 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **11** (3), 316-327.
- Sabate J. *et al.*, 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, **157** (4), 267-274.
- Schuller D. *et al.*, 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, **51** (2), 167-177.
- Setati M. E. *et al.*, 2012. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One*, **7** (12), e52609.
- Sicard D. & Legras J.-L., 2011. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*, **334** (3), 229-236.
- Sipiczki M., 2006. *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (10), 6716-6724.
- Stefanini I. *et al.*, 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109** (33), 13398-13403.
- Tello J. *et al.*, 2012. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, **112** (2), 302-315.
- Valero E. *et al.*, 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research*, **7** (2), 317-329.
- Zahavi T. *et al.*, (s.d.). Characterization of the yeast flora on the surface of grape berries in Israel. *Vitis*, **41** (4), 203-208.