UNIVERSITE DE BOURGOGNE-FRANCHE COMTE
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne – Franche Comte

Discipline : Œnologie-Ampélologie
Spécialité : **Microbiologie**

Présentée et soutenue publiquement le 25 janvier 2016

par

CÉDRIC GRANGETEAU

Biodiversité fongique du raisin au vin :

Impact de l'activité anthropique.

Membres du jury

Pr Isabelle Masneuf-Pomarède	Bordeaux Sciences Agro	Rapporteur
DR Serge Casaregola	INRA, Thiverval-Grignon	Rapporteur
Pr Marielle Adrian	Université de Bourgogne	Examinateur
Dr Jean-Luc Legras	INRA, Montpellier	Examinateur
Dr Michèle Guilloux-Bénatier	Université de Bourgogne	Directrice de thèse
M. Jean-Philippe Gervais	BIVB, Beaune	Membre invité
Dr Sandrine Rousseaux	Université de Bourgogne	Membre invité

Cette thèse a été réalisée à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot à Dijon, au sein de l'équipe VAlMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress) de l'UMR uB/Agrosup Dijon PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques). Elle a pu exister grâce au soutien financier du conseil régional de Bourgogne et du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury pour leur contribution : Marielle Adrian pour avoir assumé le rôle de présidente du jury, Isabelle Masneuf-Pomarede et Serge Casaregola pour avoir accepté la charge de rapporteur, Jean-Luc Legras pour avoir examiné ce travail ainsi que Jean-Philippe Gervais pour avoir participé à ce jury.

Je tiens également à remercier Didier Sauvage et Florent Bidaut du Vinipôle Sud Bourgogne pour m'avoir permis de réaliser les prélèvements sur leur parcelle expérimentale. Ils ont toujours été disponibles et disposés à tout mettre en œuvre pour que ce projet se réalise dans les meilleures conditions.

Merci à tout le personnel du pôle technique du BIVB pour avoir réalisé la vinification des vins produits au cours de cette étude.

Ce travail n'aurait pu exister et surtout aboutir sans ma directrice de thèse, Michèle Guilloux-Bénatier, que je tiens particulièrement à remercier pour m'avoir accordé sa confiance et remotivé lorsque c'était nécessaire. Je lui suis extrêmement reconnaissant pour son implication et sa grande disponibilité malgré les nombreuses autres charges qu'elle occupe. Son aptitude à voir le côté positif de chaque situation et à fortement relativiser face aux problèmes est pour une grande part dans l'aboutissement de ce projet.

Je remercie également Sandrine Rousseaux, ma co-encadrante de thèse, qui malgré une façon très particulière de motiver et d'encourager a toujours voulu aider ce projet à avancer.

Je tiens à remercier Hervé Alexandre pour m'avoir accueilli au saint de son laboratoire mais aussi et surtout pour la grande attention qu'il a porté à mes travaux ainsi qu'à ses conseils précieux sans lesquels ce travail ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui.

Je tiens à remercier Mélanie Lelièvre, Sebastien Terrat, Samuel Dequiedt et Lionel Ranjard sans qui le pyrosequençage ne serait pour moi qu'une vague méthode décrite sommairement lors d'un cours de master.

Un grand merci à Régis Gougeon et Philippe Schmitt-Kopplin grâce à qui les moûts et les vins ont pu être analysés par FT-ICR-MS. L'analyse de ces résultats m'a valu quelques migraines mais cela en valait la peine je crois.

Merci également à Daniel Gerhards et Christian von Wallbrunn sans qui je serai sans doute encore en train de chercher une méthode efficace pour discriminer des milliers d'isolats attendant patiemment à -80°C.

Merci à Jordi Ballester pour m'avoir initié à l'analyse sensorielle et merci à Alban, Frédéric, Maxence, Roxane, Sidonie et Thomas pour avoir réalisé les études sensorielles en 2012 et 2013.

Je remercie Sophie Trouvelot de m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement en me confiant les Travaux pratiques de microbiologie du Master 1 Vigne Vin Terroir.

Un grand merci aux doctorants avec qui j'ai partagé la plus grande partie de ma vie durant ces trois ans et qui sont devenus plus que des collègues : Magali, Momo, Charlie, Chloé, Maud, Cédric, Alex, Bao, Jana, Clément, Youzhong et Arnaud. Je remercie Magali et Charlie pour leur accueil qui m'a permis de découvrir le monde des thésards dans les meilleures conditions.

Un grand merci à Mohand qui m'a initié à la microbiologie du vin et qui a partagé souvent jusque tard dans la nuit toutes ses connaissances sur nos amies les levures (et parfois sur bien d'autres sujets).

Une pensée particulière pour Chloé qui j'en suis sûr a passé bien plus de temps à Munich qu'en France car ses périodes d'absences paraissaient toujours plus longues que celles où elle était présente. Merci pour sa collaboration et sa patience envers un pauvre microbiologiste lors les explications du FT-ICR-MS.

Merci à Alex et Maud pour ces trois ans et qui sont devenus des amis avec qui j'ai vraiment partagé une expérience unique. Merci aussi à Cédric qui était lui aussi présent depuis le début ou presque.

Je tiens également à remercier Scott, Julien, Cécilia, Tiphaine et Sara pour leur participation à ce travail sans laquelle certaines expérimentations n'auraient sans doute jamais été réalisées.

Enfin je tiens à remercier ma famille pour son soutien tout au long de cette aventure. Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours poussé à aller au bout de mes projets sans m'imposer de limite. Un grand merci à ma sœur qui a toujours cru en moi et qui avec Lionnel et Lilian sont toujours là pour me changer les idées. Qu'ils trouvent dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leur soutien sans lequel rien n'aurait été possible.

Merci

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre I – Introduction Bibliographique 1

1 Ecologie des populations fongiques présentes sur vigne 4

1.1 Les moisissures présentes sur la vigne 4

1.1.1 Les parties ligneuses 4

1.1.2 Les parties herbacées 6

1.1.3 Les baies de raisin 7

1.2 Les levures présentes sur la vigne 7

1.2.1 Les parties ligneuses 7

1.2.2 Les parties herbacées 8

1.2.3 Les baies de raisin 10

1.3 Les sources de microorganismes présents sur le cep 11

1.4 Influence des interactions fongiques sur le développement et la diversité des populations 12

1.5 Influence des facteurs naturels sur le développement et la diversité des populations fongiques 13

1.5.1 Le vignoble 13

1.5.2 Le climat 14

1.6 Influence des activités anthropiques sur le développement et la diversité des populations fongiques 16

1.6.1 Effets recherchés 16

1.6.2 Effets non intentionnels 18

2 Les levures et la fermentation alcoolique 22

2.1 Origine des levures présentes dans le moût de raisin 22

2.1.1 Baies de raisin 22

2.1.2 Cuverie 24

2.1.3 Autres sources potentielles (air, hommes, insectes, …) 25

2.2 Évolution de la biodiversité levurienne du moût de raisin au vin 27

2.2.1 Influence de la composition du moût de raisin 27

2.2.2 Influence des pratiques œnologiques 31

2.2.3 Influence des interactions levuriennes 35

2.3 Influence de la biodiversité levurienne sur la composition du vin 36

3 Les méthodes d'analyses en écologie microbienne 40

3.1 Quantification des populations présentes dans un échantillon 41

3.2 Détection et quantification d'espèces spécifiques au sein d'un consortium microbien 43

3.3 Caractérisation de la population microbienne totale 45

3.3.1 Méthodes globales/Caractérisation directe 45

3.3.2 Les méthodes culture-dépendante 53

3.4 Discrimination intra-spécifique 57

3.4.1 Méthodes moléculaires 57

3.4.2 Méthodes non moléculaires 62

Chapitre II – Matériels et méthodes 65

1 Echantillonnage du matériel biologique 65

1.1 Parcelle expérimentale 65

1.2 Matériel biologique 65

1.2.1 Protocole 2012 (Fig. 11) 67

1.2.2 Protocole 2013 (Fig. 12) 67

1.2.3 Protocole 2014 (Fig. 13) 71

2 Isolement, culture et conservation des levures 71

3 Identification des populations fongiques 73

3.1 Identification des espèces levuriennes par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) 73

3.2 Discrimination des souches de levures pour 4 espèces 73

3.2.1 *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora guilliermondii* et *Hanseniaspora uvarum* 73

3.2.2 Saccharomyces cerevisiae 74

3.3 Identification des populations fongiques (levures et moisissures) par pyroséquençage 75

3.3.1 Extraction d'ADN 75

3.3.2 Pyroséquençage de l'ADNr 18S 76

3.3.3 Analyses bio-informatiques des séquences obtenues 76

3.4 Indice de Diversité 78

4 Analyses des milieux 79

4.1 Analyses classiques 79

4.1.1 Suivi de la fermentation alcoolique 79

4.1.2 Analyses des moûts et des vins 79

4.2 Analyse chimique non ciblée 79

Chapitre III – Évaluation de la spectrocopie IR-TF pour l'étude de la biodiversité levurienne. 81

1 La spectroscopie IR-TF : un outil puissant pour l'étude de la biodiversité inter- et intra-spécifique des levures cultivables isolées à partir du moût de raisin. 82

2 Echantillonnage et représentativité 109

Chapitre IV – Origine des levures présentes dans le moût de raisin. 117

1 Evolution des différents genres levuriens au cours de la fermentation alcoolique en conditions stériles et en cuverie 118

2 Origine des souches de levures Saccharomyces cerevisiae 122

3 Origine des levures non-Saccharomyces 124

3.1 Diversité des souches de levures du genre *Hanseniaspora* dans la cave : Quelle est leur implication dans la fermentation alcoolique ? 126

3.2 La cuverie : Véritable niche écologique ou habitat transitoire pour les levures non-*Saccharomyces* ? 134

Chapitre V – Les facteurs anthropiques : modulation des populations fongiques du raisin au vin et répercussions sur les caractéristiques du vin. 158

Conclusions et perspectives 188

Références bibliographiques 193

Annexes 233

Liste des Annexes

Annexe 1. Calendriers de traitements 233

Annexe 2. Suivi des souches de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique pour le millésime 2012 237

Annexe 3. La protection phytosanitaire, une affaire de goût ? 238

Annexe 4. Copper and sulfur *in vitro* tolerance of wine relevant strains : a focus on the genera *Candida* and *Metschnikowia* 245

Liste des Figures

Figure 1. Répartition des principaux genres de moisissures et de levures sur les différents compartiments du cep de vigne. 5
Figure 2. Principaux genres de levures présents au cours du développement de la baie du raisin. 9
Figure 3. Origine supposée des genres levuriens les plus couramment isolés dans les moûts de raisin : les baies de raisin (1), la cuverie (matériel, surface, air) (2) et les insectes présents dans la cuverie (drosophiles) (3) 21
Figure 4. Principaux facteurs influençant la communauté levurienne dans le moût et au cours de la FA et influence sur la composition du vin. 26
Figure 5. Principaux types d'interactions entre populations levuriennes au cours de la FA 34
Figure 6. Méthodes cultures dépendantes et cultures indépendantes utilisées dans l'analyse des populations fongiques. 39
Figure 7. Organisation des différentes sous-parties de l'ADN ribosomique des levures. 48
Figure 8. Principe du pyroséquençage. 52
Figure 9. Principe de la spectroscopie IR-TF 58
Figure 10. Vue satellite (Google earth) et plan de la parcelle expérimentale. Les rangs sur lesquels les prélèvements ont été réalisés (rangs 3 et 5) sont colorés en rouge. 66
Figure 11. Protocole d'échantillonnage pour le millésime 2012 pour les FA réalisées en conditions stériles (A) et les FA réalisées en cuverie (B). Dans les deux cas, des fermentations avec et sans SO_2 ont été réalisées. 68
Figure 12. Protocole d'échantillonnage pour le millésime 2013 pour les baies et les FA réalisées en cuverie (A). Pour la modalité Conventionnel (C), prélèvements de baies directement sur les ceps dans le bloc C divisée en 3 (haut, milieu et bas) et directement à partir de la récolte (B). Des échantillons pour le pyroséquençage ont été prélevés pour l'ensemble des modalités. 70
Figure 13. Protocole d'échantillonnage des baies pour le millésime 2014 72
Figure 14. Développement de colonies sur boites de Pétri impactées lors des prélèvements d'air. 72
Figure 15. Répartition des différents genres levuriens isolés des baies issues du haut, du milieu et du bas de la parcelle et des caisses pour la modalité C. 110
Figure 16. Répartition des genres levuriens au cours de FA menées au laboratoire (A) et en cuverie (B) (millésime 2012) avec ou sans ajout de SO_2, pour les 3 modalités (O, C et E). L'identification est réalisée par spectroscopie IR-TF. 119
Figure 17. Répartition en nombre d'isolats des souches de Saccharomyces cerevisiae isolées durant les fermentations alcooliques (FA) en présence et en absence de SO_2 au laboratoire (conditions stériles) et en cuverie. 123

Liste des Tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des principales propriétés des méthodes de détection, d'identification et de discrimination _____ *42*

*Tableau 2. Paramètres bioinformatiques et bases de données utilisées dans l'analyse des résultats du pyroséquençage*_____ *77*

Tableau 3. Genres levuriens identifiés par spectroscopie IR-TF dans les moûts de raisin (T0) pour les 3 modalités O, C et E en conditions de laboratoire ou en cuverie. (Les noms de genres identifiés correspondent au cumul des genres isolés dans les moûts avant le sulfitage). _____ *121*

Tableau 4. Genres levuriens identifiés par spectroscopie IR-TF au cours de la fermentation alcoolique pour les 3 modalités O, C et E en conditions de laboratoire ou en cuverie en présence ou en absence de SO_2*.*_____ *121*

Communications orales

Grangeteau C., Rousseaux S., Roullier-Gall C., Ballester J., Gerhards D., Von Wallbrunn C., Schmitt-Kopplin P., Guilloux-Benatier M., Alexandre H.

Do agricultural practices have an impact on yeast grape biodiversity and on sensory quality of wine ? 3rd edition of the International Conference Series on Wine Active Compounds, Beaune, France, 26-28 Mars 2014

Rousseaux S., **Grangeteau C.,** Alexandre H., Guilloux-Benatier M.

Remaniement de la diversite levurienne des baies de raisin par les operations fermentaires utilisees en vinification en blanc.2nd edition of symposium on sustainable development in agriculture and horticulture, Craiova, Roumanie, 13-14 Novembre 2014

Grangeteau C., Gerhards D., Rousseaux S., Von Wallbrunn C., Alexandre H., Guilloux-Benatier M.

Non-Saccharomyces yeast resident of cellar are involved in grape must fermentation? Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, 18-19 Juin 2015.

Grangeteau C., Gerhards D., Rousseaux S., Von Wallbrunn C., Alexandre H., Guilloux-Benatier M.

Diversity and involvement of the cellar yeast in the fermentation of grape must: example of *Hanseniaspora* genus.10th International Symposium of Enology of Bordeaux, Oeno 2015, Bordeaux, France, 29 Juin-01 Juillet 2015

Grangeteau C., Rousseaux S., Ranjard L., Alexandre H., Guilloux-Benatier M.

Pyroséquençage : outil analytique global des effets de différentes protections phytosanitaires sur les populations fongiques. World Congress of Vine and Wine, Mayence, Allemagne, 5-10 Juillet 2015

Communications affichées

Grangeteau C., Rousseaux S., Gerhards D., Debeaulieu A., Kirch F., Hardy R., Von Wallbrunn C., Guilloux-Benatier M., Alexandre H.

Study of the agricultural and enological practices impacts on biodiversity of wine grape yeast and sensory quality of wines. Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, 13-14 Juin 2013.

Grangeteau C., Rousseaux S., Gerhards D., Terrat S., Von Wallbrunn C., Ranjard L., Guilloux-Benatier M., Alexandre H.

Which method to choose for best characterization of yeast biodiversity in musts? 24th International ICFMH conference - FOOD MICRO, Nantes, France, 1-4 Septemb***re*** 2014

Sadoudi M., Tourdot-Maréchal R., **Grangeteau C.,** Longin C., Alexandre H., Rousseaux S.

Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts associated with pinot noir and chardonnay: focus on genera C*andida* and *Metschnikowia* combined with their oenological characteristics. 24th International ICFMH conference - FOOD MICRO, Nantes, France, 1-4 Septembre 2014

Grangeteau C., Voelcker C., Boiron T., Alexandre H., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S.

Copper and sulfur *in vitro* tolerance of wine relevant strains: a focus on the genera *Candida* and *Metschnikowia*. 10th International Symposium of Enology of Bordeaux, Oeno 2015, Bordeaux, France, 29 Juin-01 Juillet 2015

Grangeteau C., Rousseaux S., Gerhards D., Von Wallbrunn C., Alexandre H., Guilloux-Benatier M.

From the grape berries to the cellar: intraspecific biodiversity of two non-*Saccharomyces* yeasts belonging to the genera *Candida* and *Hanseniaspora.* 32th International Specialized Symposium on Yeasts, Pérouse, Italie 13-17 Septembre 2015

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

Grangeteau C., Gerhards D., Rousseaux S., Von Wallbrunn C., Alexandre H., Guilloux-Benatier M.
Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: what is their involvement in grape must fermentation? Food Microbiology Journal Volume 50, September 2015, Pages 70–77.

Grangeteau C., Gerhards D., Terrat S., Von Wallbrunn C., Dequiedt S., Alexandre H., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S.
FT-IR spectroscopy: a powerful tool for the characterization of the cultivable yeasts isolated from grape must at strain level. Journal of Microbiological Methods (accepté).

Grangeteau C., Rousseaux S., Gerhards D., Von Wallbrunn C., Alexandre H., Guilloux-Benatier M.
The cellar, a real ecological niche or a transient habitat for non-*Saccharomyces* yeasts? FEMS Microbiology Ecology (soumis).

Introduction générale

Depuis plus de 7500 ans, l'Homme tente de contrôler les phénomènes naturels que sont le développement de la vigne, la maturation du raisin et la production d'éthanol par les levures afin de produire du vin. Au cours de ces millénaires, différentes techniques ont été développées souvent de manière empirique dans le but de produire des vins de meilleure qualité. Depuis les travaux d'Antonie van Leeuwenhoek puis ceux de Louis Pasteur qui démontrent en 1857 que la fermentation alcoolique est liée à la présence d'êtres vivants, de nombreuses connaissances ont été acquises permettant de mieux comprendre le rôle de ces populations microbiennes sur le processus d'élaboration du vin. Depuis le siècle dernier, les enjeux de la filière concernent non seulement la vinification mais également la viticulture. Ainsi au vignoble, la prise de conscience collective concernant l'usage des produits phytosanitaires a eu pour conséquence une augmentation des surfaces en viticulture biologique (les surfaces ont quasiment triplé depuis 2007 d'après l'agence française pour le développement et la promotion de l'agriculture biologique, www.agencebio.org), le développement d'une viticulture raisonnée (plus de 11 000 hectares certifiés par Terra Vitis, www.terravitis.com), la mise en place de différentes mesures telles que le plan Ecophyto avec des objectifs prévoyant une réduction de 50% des intrants, et un développement d'outils d'aide à la décision (POD Mildium, Optidose…)(Léger, 2008). Parallèlement en œnologie, des évolutions ont lieu : adoption en 2012 par la Commission Européenne d'une charte de vinification en agriculture biologique et orientation de certains vinificateurs vers une vinification avec zéro intrant dont notamment l'absence de dioxyde de soufre.

Toutes ces évolutions nécessitent de se pencher sur les modifications que peuvent engendrer cette diversité de pratiques vitivinicoles afin d'en comprendre les différents effets et ainsi fournir aux acteurs de la filière viti-vinicole les connaissances nécessaires pour choisir l'itinéraire technique le plus adapté. Plusieurs études se sont penchées d'une part sur les effets des pratiques viticoles sur les populations microbiennes présentes sur baies de raisin et d'autre part sur les effets des pratiques œnologiques sur les populations levuriennes présentes au cours de la fermentation alcoolique. Cependant peu de connaissances sont disponibles sur le suivi des impacts cumulés des pratiques réalisées au vignoble et en cave sur le processus de fermentation alcoolique.

Le but de cette thèse est de déterminer :

- l'influence de différents modes de protection phytosanitaire sur les populations fongiques de la baie de raisin
- de voir si les différences observées au vignoble se maintiennent dans le moût de raisin et au cours de la fermentation alcoolique suite à différentes opérations pré-fermentaires, tout en tenant compte de l'influence potentielle de la flore résidante de cave.

Ce manuscrit est organisé en 5 chapitres.
Le premier chapitre présente sous forme d'une étude bibliographique les connaissances actuelles sur i) l'écologie des populations fongiques présentes sur un cep de vigne à savoir leur répartition et leur source ainsi que l'influence de différents facteurs naturels et de l'activité humaine sur ces populations, ii) l'origine des populations levuriennes présentes dans le moût de raisin, leur évolution au cours de la fermentation alcoolique et leur influence sur la composition du vin, iii) les différentes méthodes disponibles pour l'étude des populations fongiques d'un point de vue global mais également au niveau inter- et intraspécifique.

Le second chapitre présente les protocoles d'acquisition des échantillons et les principales méthodes utilisées et analyses réalisées au cours de cette thèse.

Le troisième chapitre présente une évaluation de la méthodologie, principalement de la spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF), pour caractériser la biodiversité d'un échantillon et étudier la biodiversité intraspécifique de levures non-*Saccharomyces* ainsi que l'établissement de protocoles de prélèvements des échantillons au vignoble.

Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus sur l'origine des levures présentes dans le moût de raisin et au cours de la fermentation alcoolique. Les différentes études abordées dans ce chapitre s'intéressent notamment i) à l'origine de la flore *Saccharomyces* présente, ii) à l'origine de la flore non-*Saccharomyces* présente, et iii) au suivi de souches appartenant à trois espèces de non-*Saccharomyces* dans une cuverie sur deux millésimes afin de voir la persistance possible de souches d'un millésime à l'autre et éventuellement leur capacité de réimplantation dans le moût de raisin l'année suivante.

Le cinquième et dernier chapitre présente les résultats obtenus sur l'influence des différentes pratiques humaines étudiées sur les populations fongiques, de la baie de raisin jusqu'au vin, et

leur répercussion sur les caractéristiques du vin. Cette étude s'intéresse notamment à l'impact de trois modes de protection phytosanitaire de la vigne sur les populations fongiques de la baie de raisin et à la persistance de ces effets dans le moût de raisin au cours de la fermentation alcoolique malgré les remaniements de populations occasionnés par le pressurage, le débourbage et l'utilisation de dioxyde de soufre.

Ce manuscrit se cloture par une conclusion générale reprenant les principaux résultats et exposant les perspectives à venir concernant l'étude de l'influence de l'activité anthropique sur les populations microbiennes dans l'environnement viti-vinicole.

Chapitre I – Introduction bibliographique

1 Ecologie des populations fongiques présentes sur vigne

La vigne comme toutes les plantes abrite de nombreuses populations microbiennes à la surface de ses organes et à l'intérieur de ses tissus. Ces populations se composent de bactéries, de levures et de moisissures. Cette étude se focalise sur les populations fongiques (levures et moisissures) regroupant d'une part des espèces dommageables pour la plante, pour le niveau de récolte (production et état sanitaire) et pour la qualité *in fine* du vin produit, et d'autre part des espèces essentielles à la transformation du moût de raisin en vin. Les différentes parties de la plante constituent des niches écologiques différentes pour les populations fongiques présentes (Fig. 1).

1.1 Les moisissures présentes sur la vigne

1.1.1 Les parties ligneuses

Les parties ligneuses de la vigne sont essentiellement constituées par le porte-greffe, le tronc, les bras et les sarments. La cellulose et l'hémicellulose des tissus végétaux ainsi que les exsudats provenant des plaies de taille sont des sources de nutriments suffisamment importantes pour le maintien et/ou le développement d'une population fongique. Différents auteurs ont ainsi caractérisé une grande diversité de moisissures à partir des tissus du bois (Munkvold, 1993 ; Magyar et al., 2011 ; Bruez et al., 2014). Pour les espèces, il s'agit de *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Erysiphe necator, Epicoccum nigrum, Eutypa lata, Plasmopara viticola, Phomopsis viticola, Rhizopus stolonifer* et *Ulocladium atrum* et pour les genres de *Aspergillus, Botryosphaeria, Calosphaeria, Cladosporium, Colletotrichum, Collophora, Cylindrocarpon, Diplodia* (anamorphe de *Botryosphaeria*), *Fusarium, Fomitiporia, Greeneria, Penicillium, Phaeoacremonium, Phaeomoniella* et *Pyrigemmula* (Fig.1). Pour Bruez et al. (2014), les genres majoritaires retrouvés systématiquement quelle que soit l'époque de l'année dans les tissus du tronc (Cabernet Sauvignon) et du porte-greffe (101 14 MG) sont principalement *Botrysphaeria, Diplodia, Neofusicoccum* (famille Botryosphaeriaceae) et *Trichoderma* (famille Hypocreaceae). Ces auteurs identifient aussi tout au long de l'année sur les ceps d'autres genres mais dans une proportion moins importante ; il s'agit par ordre décroissant des genres *Penicillium, Mucor, Rhizopus, Bionectria, Fusarium, Aspergillus, Alternaria, Phoma* et *Pilidiella*. Les genres *Cladosporium* (avec 23 isolats sur 1186 isolats totaux) et *Paraconiothyrium* (avec 9 isolats sur 1186 isolats totaux) sont aussi retrouvés mais il n'y a pas de persistance de ces deux genres tout au long de l'année. Trente-cinq autres genres très minoritaires ont aussi été identifiés dans cette étude de

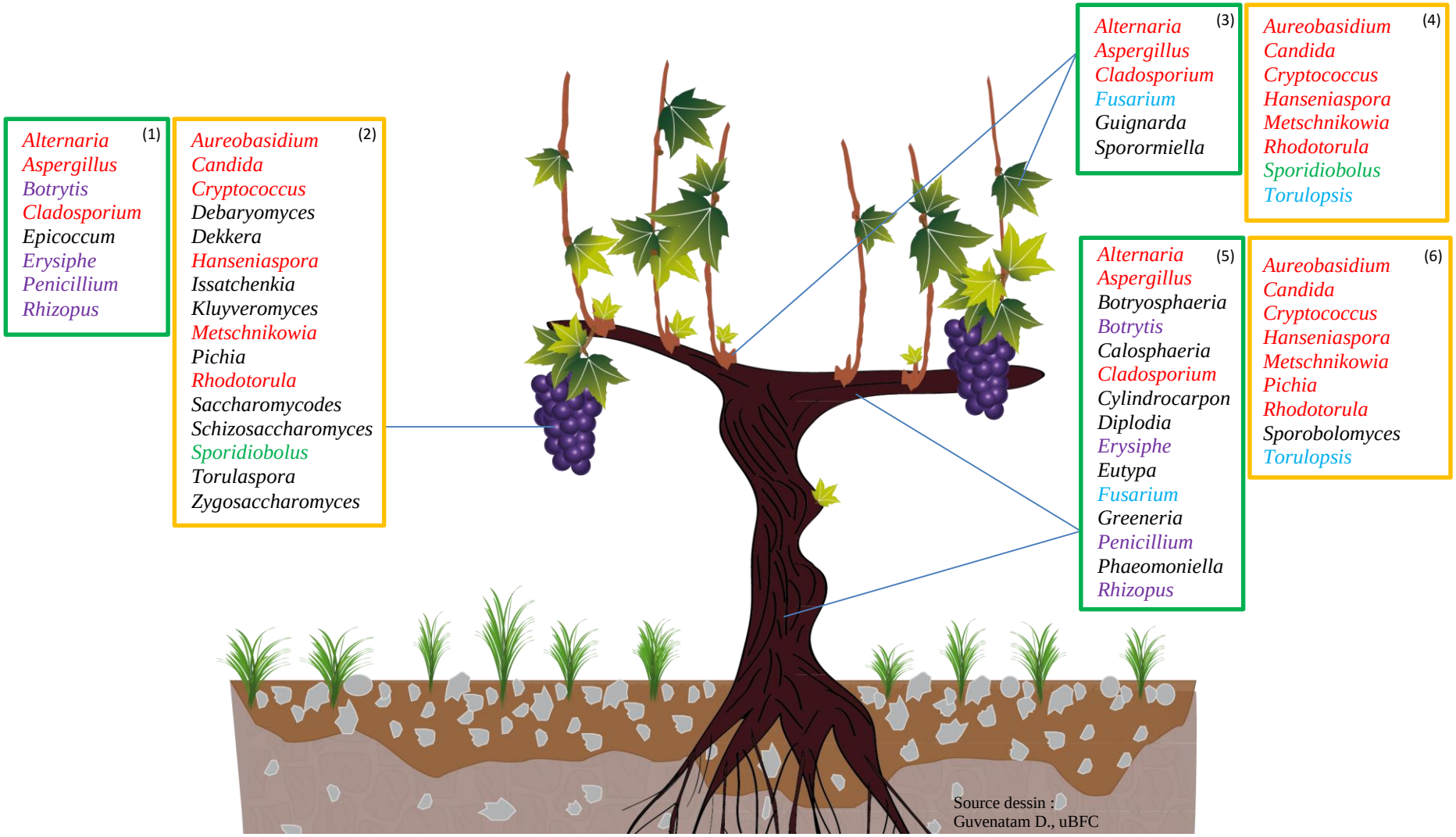


Figure 1. Répartition des principaux genres de moisissures et de levures sur les différents compartiments du cep de vigne.
(1) et (2) baies de raisin ; (3) et (4) parties herbacées (feuilles et bourgeons) ; (5) et (6) parties ligneuses (tronc et bras)
En rouge : les genres communs aux parties herbacées, ligneuses et baies; en bleu : les genres communs aux parties herbacées et ligneuses; en violet : les genres communs aux parties ligneuses et aux baies; en vert : les genres communs aux parties herbacées et aux baies; en noir : les genres spécifiques d'un compartiment ou rarement isolés dans les autres compartiments.
D'après : (1) Bokulich et al. (2014) ; Rousseaux et al. (2014) ; Taylor et al. (2014); (2) Sabate et al. (2002) ; Fleet et al. (2002) ; Prakitchaiwattana et al. (2004) ; Raspor et al. (2006) ; Nisiotou et Nychas (2007) ; Chavan et al. (2009) ; Barata et al. (2012a); (3) Falk (1996) ; Musetti et al. (2006) ; Dimakopoulou et al. (2008); Schmid et al. (2011) ; Grube et al. (2011) ; Pinto et al. (2014) ; (4) Belin (1981) ; Dimakopoulou (2008) ; Francesca et al. (2009) ; Cordero et al. (2011b) ; Grube (2011) ; Schmid et al. (2011) ; (5) Magyar et al. (2011) ; Munkvold (1993) ; Bruez et al. (2014) ; (6) Belin et Henry (1973) ; Sabate et al. (2002), Francesca et al. (2009) ; Cordero-Bueso et al. (2011b).

manière très ponctuelle (1 ou 2 fois au cours de l'année). Les variations de population au cours de l'année concernent essentiellement les genres minoritaires. De plus, Bruez et al. (2014) n'observent pas de différence significative au niveau des moisissures qui colonisent les parties ligneuses présentant ou non des symptômes de l'esca. Pourtant, parmi les nombreux genres trouvés, certains sont ou pourraient être responsables de maladies du bois. On peut ainsi citer les champignons de la famille des Botryosphaeriaceae responsables de nombreux symptômes sur la vigne nommés actuellement "dépérissement à *Botryosphaeria*" (Phillips, 2000 ; Blancard et Lecomte, 2014) dont certaines espèces telles que *B. obtusa* et *B. stevensi* sont vraisemblablement impliquées dans la maladie Black Dead Arm (BDA) dite apoplexie lente (Larignon et al., 2009). D'autres espèces *Phaeoacremonium aleophilum, Phaeomoniella chlamydospora, Eutypa lata, Fomitiporia mediterranea* sont décrites comme impliquées dans la maladie de l'esca (Rooney et al., 2001 ; Fischer et al., 2002 ; Fischer et Kassemeyer, 2003) et les genres *Ilyonectria* et *Campylocarpon* sont associés à la maladie Blackfoot dite la « maladie des pieds noirs de la vigne » (Halleen et al., 2006).

Certaines des moisissures isolées des parties ligneuses sont également associées à des pertes quantitatives et qualitatives de la matière première. On peut notamment citer les espèces *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Erysiphe necator* et les genres *Aspergillus, Cladosporium, Colletotrichum, Greeneria* et *Penicillium* ainsi que l'oomycète *Plasmopara viticola* (Munkvold, 1993 ; Cortesi et al., 1997 ; Grove, 2004 ; Loureiro et al., 2012). Les parties ligneuses peuvent vraisemblablement servir de réservoir pour ces microorganismes durant la période hivernale.

1.1.2 Les parties herbacées

Les parties herbacées sont composées essentiellement par les bourgeons, les rameaux et les feuilles. Différents genres de moisissures ont été isolés à la surface et à l'intérieur de ces tissus. Les plus fréquemment isolés sont *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium* et *Fusarium* (Falk, 1996 ; Musetti et al., 2006 ; Dimakopoulou et al., 2008 ; Grube et al., 2011 ; Schmid et al., 2011) (Fig.1). Récemment, Pinto et al. (2014), en utilisant le pyroséquençage de deux régions de l'ADN ribosomique, ont identifié sur les feuilles de la variété Tempranillo, prélevées au cours du cycle végétatif, majoritairement les genres *Sporormiella, Alternaria* et *Guignardia* (par ordre décroissant) et dans une proportion beaucoup plus faible, les genres *Colacogloea, Cronartium, Kurtzmanomyces, Lewia, Puccinia* et *Ustilago*. Ces auteurs observent des variations importantes dans la proportion de ces différents genres au cours du cycle végétatif :

augmentation de la proportion des genres *Alternaria* et *Sporomiella* entre mai et juillet alors que dans le même temps celle du genre *Guignardia* diminue.

1.1.3 Les baies de raisin

Une grande diversité de moisissures peut coloniser la baie (Fig. 1). Rousseaux et al. (2014) ont ainsi recensé plus de 70 genres différents. Parmi eux, 7 genres sont plus fréquemment retrouvés sur raisins : *Alternaria spp., Aspergillus spp., Botrytis spp., Cladosporium spp., Epicoccum spp., Penicillium spp.* et *Rhizopus spp* (Bokulich et al., 2014 ; Taylor et al., 2014). Il est à noter que la plupart de ces genres sont également couramment isolés des parties ligneuses du cep (Fig. 1). Les populations évoluent en fonction du stade de développement de la baie de raisin. Au cours de la maturation (entre la véraison et la maturité), la proportion du genre *Aspergillus* augmente alors que celle des genres *Alternaria* et *Cladosporium* diminue (Bau et al., 2005 ; Bellí et al., 2006 ; Gomez et al., 2006 ; Melki Ben Fredj et al., 2007). Au moment de la récolte, les baies même lorsqu'elles sont apparemment saines abritent une population importante de moisissures. Sur des grappes mûres de Chardonnay et de Malbec, la population fongique est comprise entre $1{,}3.10^4$ et $5{,}4.10^6$ UFC/g (Da Rocha Rosa et al., 2002). Les genres les plus fréquents sur baies matures sont *Aspergillus*, *Botryti*s et *Penicillium* même si d'autres genres ont aussi été identifiés : *Phythophthora*, *Moniliella*, *Alternaria* et *Cladosporium* (par ordre décroissant).

1.2 Les levures présentes sur la vigne

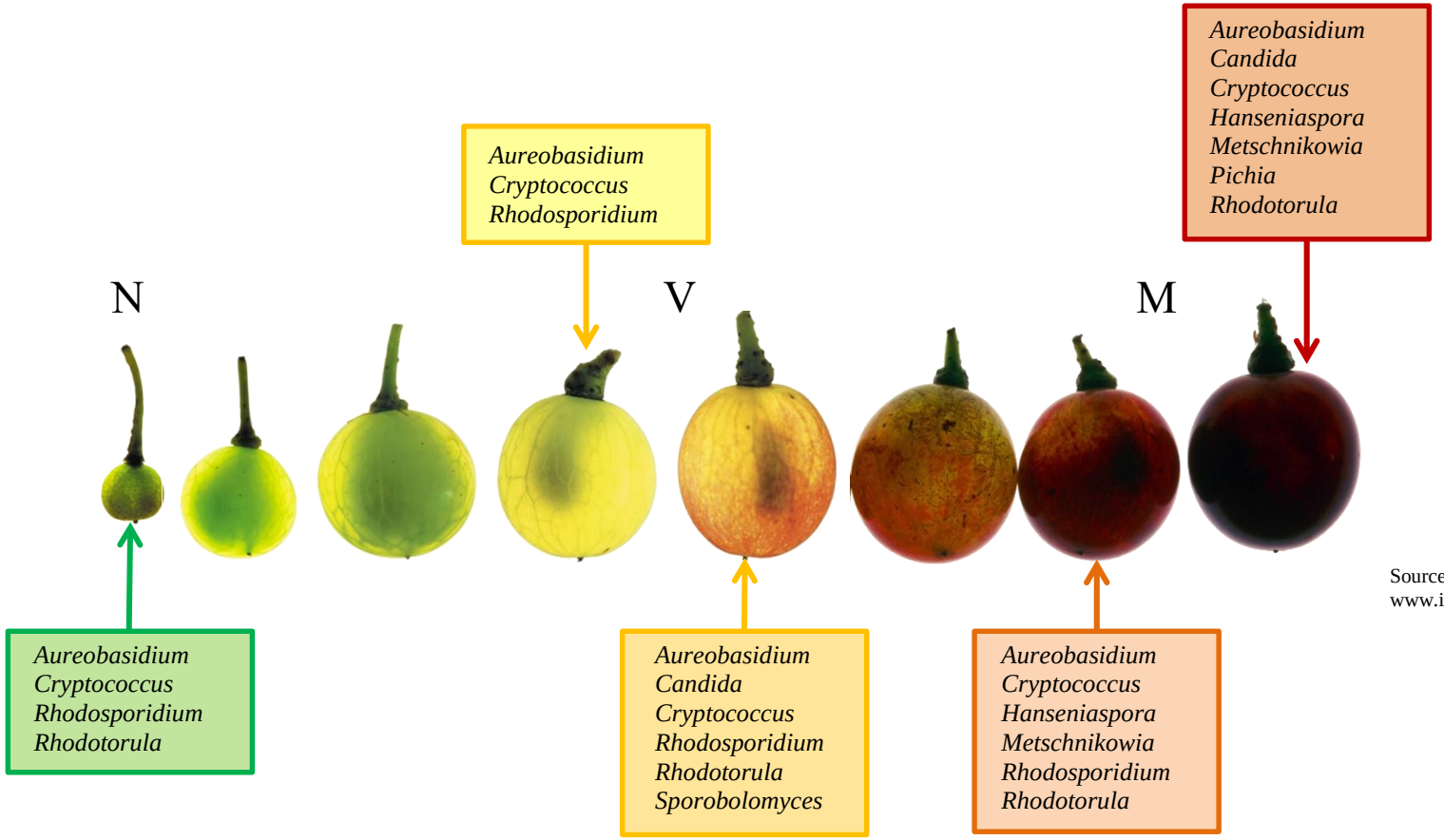
1.2.1 Les parties ligneuses

Les parties ligneuses de la vigne, tronc et sarments, ne semblent pas constituer un environnement très propice au développement des levures (Belin et Henry, 1973). Quelques cellules éparses ont cependant été isolées sur le tronc au milieu des nombreux grains de sable provenant du sol alors que sur l'écorce des sarments et à l'intérieur des tissus des sarments, notamment au niveau des formations lenticellaires, ces auteurs dénombrent des populations de levures plus importantes. Les parties ligneuses sont essentiellement colonisées par le genre *Aureobasidium* qui représente entre 4% et 100% sur les sarments et entre 21% et 93% sur le tronc (Fig. 1). Il faut néanmoins noter de fortes variations de ce genre en fonction de la période de l'année (Belin et Henry, 1973). Cordero-Bueso et al. (2011b) montrent d'ailleurs que le principal réservoir naturel des levures serait le tronc pendant le repos végétatif alors que, pendant le cycle végétatif, le sol et les baies de raisin seraient le réservoir principal. Pour Sabate et al. (2002), l'espèce *Aureobasidium* représente 35% de la population levurienne isolée dans

l'écorce du tronc quelques semaines avant la récolte, suivie par ordre décroissant de *Cryptococcus uniguttulatum* (25%), *Candida zeylanoides* (15%), *Rhodotorula* sp. (15%) et *Filobasidium capsuligenum* (10%). D'autres espèces sont également isolées mais en proportions plus faibles ; il s'agit de *Cryptococcus infirmo-miniatus, Torulopsis candida, Cryptococcus albidus, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula aurantiaca, Sporobolomyces roseus, Sporobolomyces holsaticus* avec des espèces plus ou moins fermentaires comme *Candida capsulagina, Hanseniaspora uvarum, Metschnikowia pulcherrima, Pichia farinosa et Saccharomyces cerevisiae* (Belin et Henry, 1973) (Fig. 1). Concernant cette dernière espèce, sa survie à long terme dans le tronc n'est guère possible. En effet, après dissémination volontaire d'une levure commerciale réalisée sur un vignoble près de Madrid, cette dernière n'est plus retrouvée dans le bois après 24 mois (Cordero-Bueso et al., 2011b).

1.2.2 Les parties herbacées

Différentes types de levures et de champignons levuriformes ont été isolés à la surface des bourgeons et des feuilles (Fig.1) tels que *Aureobasidium pullulans* (Dimakopoulou, 2008 ; Grube, 2011), *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia fructicola* (Francesca et al., 2009), *Sporidiobolus pararoseus* (Schmid et al., 2011), et *Saccharomyces spp.* au moment de la récolte (Cordero-Bueso et al., 2011b) avec des niveaux de populations faibles : 25,1 CFU/g (Fransceca et al., 2009). Pour Belin (1981), c'est *Aureobasidium pullulans* qui est l'espèce majoritaire sur feuille et ce durant la majorité du cycle végétatif mais il décrit également la présence de *Candida capsulagina, Cryptococcus infirmo-miniatus, Rhodotorula glutinis, Rhodotorula minuta* et *Torulopsis hansenii.* Pinto et al. (2014) identifient, parmi les populations présentes sur les feuilles, non seulement des moisissures en majorité, mais également une présence assez élevée de *Aureobasidium pullulans* variant de 5 à 40% de la population fongique totale, ainsi que d'autres genres ou espèces mais très minoritaires identifiées grâce à l'utilisation de la technique de pyroséquençage : *Bulleromyces albus, Candida tropicalis, Debaryomyces hansenii, Lachancea thermotolerans, Rhodotorula, Saccharomyces cerevisiae, Sporobolomyces* et *Trichosporon domesticum.* La plupart des auteurs semblent donc s'accorder sur la présence ubiquiste et la prédominance de l'espèce *Aureobasidium pullulans* sur les parties herbacées même si on peut également noter la présence fréquente d'autres genres comme *Candida, Cryptoccocus, Hanseniaspora, Metschnikowia* ou *Rhodotorula.* Ainsi par exemple, Sabate et al. (2002) identifient sur des feuilles de Carignan et de Grenache, les levures suivantes : *Aureobasidium pullulans* (35%),



Source photo : www.inra.fr

Figure 2. Principaux genres de levures présents au cours du développement de la baie du raisin.
N = nouaison, V = véraison, M = maturité (récolte)
D'après : Rosini et al. (1982) ; Prakitchaiwattana et al. (2004) ; Renouf et al. (2005)

Crytococcus laurentii (30%), *Cryptococcus uniguttulatum* (25%), *Cryptococcus ater* (5%) et *Rhodotorula* (5%).

1.2.3 Les baies de raisin

La baie de raisin mature abrite une population importante de levures généralement comprise entre 10^3 et 10^6 CFU/g de baie pouvant être constituée de nombreux genres et espèces (Fleet et al., 2002). Dans sa thèse de doctorat, Sadoudi (2014) a ainsi recensé 90 espèces différentes appartenant à 29 genres isolés sur les grappes de raisin ou dans le moût de raisin. Les genres *Aureobasidium, Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Dekkera, Hanseniaspora, Issatchenkia, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Saccharomycodes, Schizosaccharomyces, Sporidiobolus, Torulaspora* et *Zygosaccharomyces* sont les plus fréquemment trouvés (Sabate et al., 2002 ; Fleet et al., 2002 ; Prakitchaiwattana et al., 2004 ; Raspor et al., 2006 ; Nisiotou et Nychas, 2007 ; Chavan et al., 2009 ; Barata et al., 2012a) (Fig. 1). Cependant les proportions de ces genres sur baies matures peuvent fortement varier d'une étude à l'autre. Pour exemple, le genre *Hanseniaspora*, souvent décrit comme majoritaire, entre 50% à 75% (Fleet et Heard, 1993 ; Sabate et al., 2002), n'est parfois pas isolé dans d'autres études (De la Torre et al., 1999). L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* souvent prépondérante au cours de la fermentation alcoolique est par ailleurs rarement isolée de la baie de raisin (Mortimer et Polsini, 1999 ; Valero et al., 2007).

Les populations de levures présentes changent au cours des différentes phases de développement de la baie de raisin entre la nouaison et la maturité (Fig. 2). Après la nouaison, les genres et espèces *Aureobasidium pullulan, Cryptococcus* et *Rhodotorula* sont souvent prédominants (Rosini et al., 1982 ; Prakitchaiwattana et al., 2004). Leur proportion diminue ensuite peu à peu. Sur les baies matures, les Ascomycètes sont majoritaires (*Candida, Hanseniaspora, Metschnikowia* et *Pichia*) (de la Torre et al., 1999 ; Rementeria et al., 2003 ; Renouf, 2006 ; Barata et al., 2012a) et encore plus sur les baies endommagées (Prakitchaiwatana et al., 2004 ; Barata et al., 2008). Au cours de la maturation du raisin, la quantité de sucres dans la baie de raisin augmente fortement ainsi que les exsudats suite à des microlésions de la pellicule situées principalement autour des stomates (Pucheu-Planté et Seguin, 1981). Ceci pourrait expliquer les changements observés dans les populations de levures.

1.3 Les sources de microorganismes présents sur le cep

Comme nous avons pu le voir, certaines espèces fongiques sont communes aux différentes parties du cep de vigne (Fig. 1). Les parties ligneuses pourraient donc servir de réservoir durant la saison hivernale en l'absence des parties herbacées et des baies de raisin. Le sol peut abriter aussi de nombreuses espèces communément isolées sur la vigne. Ainsi parmi les microorganismes nuisibles retrouvés dans le sol et sur la vigne, on peut citer des champignons comme *Armillaria* responsable de la *Armillaria root disease*, *Cylindrocarpon* (Hood, 1991 ; Pertot et al., 2008), *Fusarium oxysporum* considéré comme le principal pathogène de la vigne au Brésil (de Andrade, 1995) et *Phaeoacremonium aleophilum*, *P. inflatipes* et *P. chlamydospora* responsables de l'esca.

Le sol est également un réservoir de spores de *Plasmopara viticola*, agent du mildiou (Kennelly et al., 2007) et de *Erysiphe necator*, agent de l'oïdium (Cortesi et al., 1997). Des espèces comme *Aureobasidium pullulans*, *Filobasidium capsuligenum* et *Hanseniaspora uvarum* peuvent également être présentes dans le sol (Sabate et al., 2002). De plus, il a récemment été démontré (Mandl et al., 2015) que des levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* inoculées dans le sol pouvaient pénétrer par les racines et ensuite coloniser les différents tissus de la vigne pour finalement être retrouvées sur la baie. Le sol peut donc constituer une source directe de microorganismes pour la baie de raisin.

Par ailleurs, il est connu que la dissémination d'un grand nombre de maladies de la vigne est le résultat du transport des agents responsables sous forme de spores par le vent (Agrios, 2005). Quant aux levures appartenant principalement aux espèces *Aureobasidium pullulans*, *Candida spp*., et *Hanseniaspora uvarum*, elles ont été isolées dans l'air des vignobles au moment de la récolte mais aussi pendant la maturation du raisin (4 semaines précédant la récolte) (Garijo et al., 2008). Ceci montre une dissémination possible des levures couramment isolées sur les baies avec sans doute le passage de certaines populations de pied à pied voire de parcelle à parcelle. Des disséminations par différents insectes ont également été démontrées. Barata et al. (2012b) ont mis en évidence le transport de microorganismes responsables de la pourriture acide par la mouche *Drosophila melanogaster*. Quant à la dissémination de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur environ 10 km, elle serait le fait des abeilles alors que le transport sur une plus grande distance serait plutôt lié à l'activité humaine (Goddard et al., 2010). Les guêpes (*Vespo cabro* et *Polistess spp.*) seraient vectrices mais aussi réservoirs durant l'année pour la levure

Saccharomyces cerevisiae (Stefanini et al., 2012). Francesca et al. (2012) décrivent que des oiseaux migrateurs servent aussi de vecteurs pour les levures. Par contre, le séjour des levures dans l'estomac de ces oiseaux est limité à 12 heures donc ils ne peuvent vraisemblablement pas servir de réservoir.

1.4 Influence des interactions fongiques sur le développement et la diversité des populations

De nombreuses interactions directes ou indirectes peuvent intervenir entre les microorganismes influençant ainsi les niveaux de populations au sein d'une communauté en favorisant ou en limitant le développement de certaines espèces. Ainsi, *Botrytis cinerea* va fortement influencer la communauté levurienne des baies. Il pénètre dans les tissus de la pellicule libérant une partie des sucres présents à l'intérieur et ainsi favorise la prolifération de levures fermentaires (*Candida zemplinina* et *Metschnikowia pulcherrima*) ou d'altération comme *Zygosaccharomyces bailii* (Nisiotou et Nychas, 2007). Barata et al. (2008) ont observé une augmentation de la population de levures liée à la présence de la pourriture acide (4.73 log UFC/g sur baie saines contre 7.48 log UFC/g sur baies endommagées) ainsi qu'une augmentation de la diversité et un changement dans la proportion des différentes espèces. Ainsi sur des baies saines, les espèces *Hanseniaspora uvarum* et *Metschnikowia pulcherrima* sont les plus souvent isolées alors que sur des baies atteintes par la pourriture acide, les espèces majoritaires sont *Hanseniaspora uvarum mais aussi Candida stellata* et *Candida vanderwaltii*. De plus, les espèces *Hanseniaspora osmophilla, Issatchenkia terricola, Zygoascus hellenicus* et *Zygosaccharomyces bailii* ont été isolées sur des baies atteintes par la pourriture acide mais pas sur baies saines.

De nombreux antagonismes ont été observés sur baies. *Aureobasidium pullulans* peut limiter le développement de *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus carbonarius* sur le raisin (Schena et al., 1999, 2003 ; Dimakopoulou et al.,. 2008). Ces antagonismes se font suite à des compétitions pour les nutriments et par la production d'enzymes lytiques (Zhang et al., 2010). En effet, certaines souches de l'espèce *Pichia membranifasciens* peuvent empêcher le développement de *Botrytis cinerea* par la production de β-1,3-glucanase (Masih et al, 2001). L'espèce *Epicoccum nigrum* limite le développement de *Monilinia laxa* (Madrigal et al., 1991), agent de la moniliose des arbres fruitiers (rare sur vigne), par la production d'un antibiotique la flavipine (Madrigal et Melgarejo, 1995). *Alternaria alternata* produit des dicétopipérazines diminuant de manière drastique la sporulation de *Plasmopara viticola* (Musetti et al., 2006). Les levures de l'espèce

Metschnikowia pulcherrima ont, pour certaines, la capacité d'inhiber la germination des conidies de *Botrytis cinerea* et la croissance des hyphes de *Mucor piriformis* et de *Botrytis cinerea*. La présence de cette espèce empêche également le développement de l'espèce *Candida zemplinina*. Les effets de *Metschnikowia pulcherrima* sont liés à la production d'un pigment (la pulcherrimine) conduisant à la déplétion du fer libre dans le milieu (Sipiczki, 2006).

1.5 Influence des facteurs naturels sur le développement et la diversité des populations fongiques

Il est couramment admis que la microflore de la baie de raisin varie en fonction de la localisation géographique, du climat, de l'âge du vignoble, du cépage et du millésime. Dans une étude récente, Bokulich et al. (2014) démontrent à l'échelle de la Californie que la zone viticole, le cépage cultivé et les conditions environnementales façonnent de manière non-aléatoire le consortium microbien (fongique et bactérien) présent à la surface des baies de raisin. Pour ces auteurs, il existe donc un « terroir microbien » qui influence de manière déterminante les caractéristiques des raisins de cuve.

1.5.1 Le vignoble

L'origine géographique est souvent présentée comme un facteur influençant les populations présentes sur les baies de raisin. Par exemple, le genre *Aspergillus* est souvent prédominant dans les vignobles méridionaux comme l'Espagne (Bau et al., 2005) ou tropicaux comme l'Argentine et le Brésil (Da Rocha Rosa et al., 2002) alors que ce genre apparaît comme minoritaire voire absent dans les vignobles français, en particulier dans les vignobles septentrionaux où le genre *Penicillium* est isolé fréquemment (Sage et al., 2002 ; Diguta et al., 2011).

A une échelle géographique plus réduite, Li et al. (2010) ont comparé les espèces de levures présentes sur des pieds de variété Chardonnay cultivés dans différentes régions viticoles chinoises. La diversité et la répartition des populations de levures dépendent de la région où est implanté le vignoble. Ainsi, *Hanseniaspora uvarum* est présent à 73% dans la région du Changli (NE de la Chine) et seulement à 33% dans la région du Wuwei (NO de la Chine). Certaines espèces semblent spécifiques d'une région telle que *Cryptococcus carnescens* isolée uniquement dans la région de Wuwei. Taylor et al. (2014) observent également des variations au niveau de la diversité ainsi que dans la proportion du genre *Cryptococcus* dans les différentes régions de Nouvelle-Zélande étudiées. Pour ces auteurs, l'existence d'une spécificité régionale

dans les populations pourrait être liée à une non-dispersion de certaines espèces entre des zones géographiquement éloignées sans pour autant exclure l'impact du climat.

Concernant le cépage, Abrunhosa et al. (2001) ont rapporté que dans plusieurs vignobles portugais les genres *Alternaria* et *Cladosporium* étaient plus fréquemment isolés à partir de cépages rouges que de cépages blancs. Medina et al. (2005) ont comparé les populations de champignons filamenteux présents sur les baies de 5 cépages différents, le Moscatel (cépage blanc), le Bobal, le Grenache, le Monastrell et le Tempranillo (cépages rouges). Une population moins importante ($6.7x10^2$ UFC/mL) a été dénombrée pour le cépage blanc par rapport aux quatre cépages rouges (environ 10^4 UFC/mL). Les genres *Alternaria* et *Aspergillus* sont les genres majoritaires pour le Muscat (respectivement 47,5% et 45% de la population) alors que sur les 4 cépages rouges c'est le genre *Cladosporium* qui est le plus isolé (entre 36 et 92%). Le genre *Phoma* représente 23% de la population sur cépage Tempranillo mais il n'a pas été isolé pour les autres cépages. Ces résultats montrent une variation importante des genres présents et de leurs proportions en fonction des cépages. En accord avec ces observations, Chiotta et al. (2009) ont obtenu un plus grand nombre d'isolats de l'espèce *Aspergillus carbonarius* sur le cépage Cabernet Sauvignon par rapport aux autres cépages rouges Malbec, Syrah et Bonarda, tous cultivés en Argentine.

Concernant les populations de levures, Sabate et al. (2002) ont observé qu'une plus grande proportion de Basidiomycètes était isolée sur la variété rouge Grenache par rapport à la variété rouge Carignan sur laquelle étaient présentes les espèces *Hanseniaspora uvarum* et *Candida zeylanoides* non isolées sur la variété Grenache. Une autre étude (Raspor et al., 2006) montre une forte proportion de Basidiomycètes sur la variété de raisins blancs Kaljevina alors que pour les variétés Zametovka et Modra frankinja (raisins rouges), le ratio entre Ascomycètes et Basidiomycètes était de 1:1 avec une forte proportion de *Aureobasidium pullulans*.

Cependant, que ce soit pour les moisissures ou les levures, certains auteurs n'ont pas constaté d'influence du cépage sur les populations présentes sur baies (Poulard et al., 1981 ; Rementeria et al., 2003 ; Lasram et al., 2007).

1.5.2 Le climat

Le climat regroupe différents paramètres tels que la température, l'intensité du rayonnement ultraviolet, la pluviométrie, l'exposition et le vent. D'un point de vue général, l'humidité et la température constituent des paramètres clés dans le développement des microorganismes et donc dans la structuration des populations. En viticulture, ces 2 critères sont utilisés comme

indicateurs du risque épidémiologique (Sall, 1980 ; Lalancette, 1988 ; Broome, 1995) pour les trois principaux agents responsables des maladies cryptogamiques de la vigne *Plasmospora viticola*, *Erysiphe necator* et *Botrytis cinerea*. Par exemple, pour *Plasmopara viticola*, l'importance des infections primaires est liée à la pluviométrie survenant au printemps et à l'automne et est favorisée par des températures élevées au printemps. Une période de sécheresse prolongée peut bloquer la maturation des oospores et donc limiter l'infection (Rouzet et Jacquin, 2003).

Une forte pluviométrie ou des épisodes de grêles provoquent l'éclatement des baies qui peuvent être alors colonisées par différentes moisissures (Dubos, 2002). Par ailleurs, des températures élevées favorisent la présence de *Aspergillus carbonarius* (Belli et al., 2006). L'intensité du rayonnement ultraviolet (UV) peut également avoir un impact sur les populations fongiques. Dalla Marta et al. (2008) ont ainsi montré qu'une exposition plus importante aux UV conduisait à une diminution de l'infection de la vigne par *Plasmopara viticola*.

Par ailleurs, de nombreux auteurs ont montré une corrélation entre la pluviosité et les populations de levures présentes sur baies (Querol et al., 1990 ; Combina et al., 2005 ; Brilli et al., 2014). Le gonflement des baies suite à un épisode pluvieux entraîne la formation de microlésions au niveau de la pellicule du raisin. La libération du jus de la baie vers l'extérieur conduit à une augmentation du ratio osmotique ce qui permet le développement des microorganismes (Longo et al., 1991). Les précipitations et la température vont également influer sur la proportion des différentes populations levuriennes. Une forte pluviosité va par exemple entraîner une forte proportion de *Metschnikowia pulcherrima* au détriment des levures appartenant au genre *Hanseniaspora* (Combina et al., 2005). Au contraire ces dernières seraient favorisées par une fin d'été et un début d'automne sec et chaud (Rementeria et al., 2003) ; elles seraient donc plus abondantes dans des régions au climat doux (Yanagida et al., 1992). En accord avec ces résultats, Brilli et al. (2014) ont montré une corrélation positive entre des températures élevées et la proportion du genre *Hanseniaspora* et une corrélation négative pour le genre *Candida*. Concernant la température, un certain nombre de levures appartenant notamment aux espèces *Aureobasidium pullulans* et *Sporobolomyces roseus* ne seraient plus capables de se développer après une exposition de 5 h à 40°C (Belin, 1981). Pour ce dernier auteur, étant donné que cette température peut être atteinte durant les mois d'été, ceci pourrait expliquer la baisse de diversité et de densité de la population observée dans son étude durant le mois d'août.

1.6 Influence des activités anthropiques sur le développement et la diversité des populations fongiques

1.6.1 Effets recherchés

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses espèces fongiques peuvent coloniser la baie de raisin. Afin de se prémunir du développement de certaines maladies cryptogamiques, différentes mesures prophylactiques peuvent être mises en place. Plusieurs auteurs ont montré que l'effeuillage permet de réduire principalement la pourriture grise, et dans une moindre mesure, l'oïdium et la pourriture acide (Zoecklein et al., 1992 ; Scholdberg et al., 2008 ; Austin et Wilcox, 2011 ; Sternad Lemut et al., 2011, 2015). Cette pratique permet en effet de se placer dans des conditions moins favorables au développement de maladies sur les baies, en augmentant la température au niveau de la zone des grappes, en améliorant l'exposition des grappes aux UV et leur aération. Le système de conduite de la vigne modifie également l'exposition aux UV et le microclimat au niveau des grappes. Pereira de Bem et al. (2015) montrent qu'un positionnement vertical des bois permet de réduire les dommages liés à la présence de *Botrytis cinerea* sur les grappes de raisin et à celle de *Plasmopara viticola* sur les feuilles par rapport à un positionnement en Y (ou taille en lyre). De plus, les infections liées à *Erysiphe necator* peuvent être réduites sur grappes par un positionnement vertical des bois par rapport à une taille en pergola (Austin et Wilcox, 2011). L'effet du système de conduite sur le développement de maladies peut varier en fonction du climat général et s'avérer insuffisant lors de millésimes à forte pression de maladies (Austin et Wilcox, 2011).

D'autres moyens se développent dans le but de limiter le développement des agents phytopathogènes. On peut citer notamment, l'utilisation d'agents biologiques de contrôle qui peuvent agir sur leur cible par compétition physique ou nutritionnelle, par parasitisme, par production de substances limitant la croissance et / ou la sporulation des phytopathogènes ou par production de substances stimulant les réactions de défenses de la plante (éliciteurs). Plusieurs préparations commerciales utilisant des champignons non phytopathogènes (*Trichoderma* spp. et *Aureobasidium pullulans*) ou des bactéries (genres *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* et *Pseudomonas*) ou des molécules élicitrices comme l'acide β-aminobutyrique (Dubreuil, 2010 ; Adrian et al., 2011) sont aujourd'hui à l'essai ou déjà commercialisées comme le fenugrec (Martinez et Loison, 2006).

Mais à l'heure actuelle, la protection des cultures et plus particulièrement de la vigne contre des bioagresseurs est réalisée par l'application de traitements à base de molécules chimiques de

synthèse dans le cadre de la viticulture raisonnée et à l'aide de cuivre et de soufre en viticulture biologique. De nombreuses matières actives sont commercialisées et peuvent être classées en fonction de leur mode d'action. Le but ici n'est pas de faire une liste de toutes les substances actives pouvant être utilisées en viticulture mais de donner les principaux modes d'action des fongicides et les phytopathogènes cibles. On peut ainsi citer :

i) les molécules inhibitrices de la respiration mitochondriale qui regroupent près d'un tiers des fongicides parmi lesquels le dinocap efficace contre l'oïdium mais qui n'est plus autorisé actuellement.

ii) les inhibiteurs de la biosynthèse des lipides tels que les dicarboximides utilisés contre *Botrytis cinerea*.

iii) les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols membranaires dont la plupart sont des triazoles comme le triadiménol utilisé contre la pourriture noire, le rougeot parasitaire et l'oïdium ou le penconazole utilisé contre l'oïdium.

iv) les fongicides agissant sur la formation des parois cellulaires tels que le diméthomorphe utilisé contre la pourriture noire et le mildiou.

v) les molécules affectant la transduction de signaux comme les phénylpyrolles agissant sur la transduction de signaux osmotiques qui sont les dérivés d'une molécule naturelle (la pyrrolnitrine) tel que le fludioxonil utilisé contre la pourriture grise.

vi) les inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine comme le pyriméthanil et le cyprodinil utilisés contre *Botrytis cinerea* même si certaines souches s'avèrent résistantes (Fritz et al., 2003).

vii) les inhibiteurs de la formation des microtubules tels que les benzimidazoles présents dans les fongicides à large spectre pour lesquels de nombreuses souches de phytopathogènes sont devenues résistantes.

viii) les molécules multi-sites qui inhibent simultanément plusieurs fonctions essentielles des champignons. On observe ainsi très peu de résistance vis-à-vis de ces molécules (Leroux, 2003). On peut citer les dithiocarbamates (mancozèbe, manèbe) et les phtalimides (folpel) et des produits phytosanitaires à base de cuivre contre le mildiou ou de soufre contre l'oïdium. Ces deux dernières matières actives représentent presque l'intégralité des fongicides autorisés en viticulture biologique avec en plus l'huile essentielle d'orange douce et le bicarbonate de potassium.

1.6.2 Effets non intentionnels

Compte tenu de leur mode d'action et en fonction de leur formulation, certains produits phytosanitaires ne sont pas spécifiques du phytopathogène contre lequel ils sont utilisés. Conner et al. (1983) ont testé *in vitro* l'effet de 25 produits phytosanitaires (14 fongicides, 7 insecticides et 4 herbicides) sur 2 souches de levures *Saccharomyces cerevisiae*. La plupart des insecticides et herbicides n'ont pas d'effet, quelles que soient la souche de levure et les doses testées (entre 1 et 200 mg/L de matière active par produit), excepté le dicofol (un insecticide) et 2 herbicides qui inhibent la croissance des levures, à faible dose (5 mg/L) pour le dicofol et à doses élevées pour les 2 herbicides testés (entre 100 et 200 mg/L). Quant aux fongicides, ils peuvent être répartis en 3 classes : ceux n'ayant pas d'effet (sulfate de cuivre et soufre), ceux inhibant la croissance des levures à forte dose (bénomyl, iprodione, procymidone, triadiméfon, triforine, vinclozolin et zinèbe) et ceux inhibant la croissance même à faible dose (dinocap, captan, mancozèbe et manèbe). Ces résultats mettent en évidence l'effet non intentionnel de certains produits de traitement. Il est également important de prendre en compte que les doses homologuées varient considérablement selon les matières actives appliquées. Ainsi, Cordero-Bueso et al. (2014) ont comparé l'effet de 2 fongicides aux doses maximales autorisées (le soufre et le penconazole) utilisés dans la protection contre l'oïdium. Quelle que soit la protection appliquée au vignoble, les espèces *Rhodotorula mucilaginosa* et *Lachancea thermotolerans* sont majoritaires dans le moût. Néanmoins, dans les moûts de raisins provenant de ceps traités au soufre, il est retrouvé une forte proportion de souches de l'espèce *S. cerevisiae* et de l'espèce *H. guilliermondii*. Par contre dans les moûts provenant de ceps traités au penconazole, l'espèce *S. cerevisiae* est moins présente et l'espèce *H. guillermondii* est absente. Les tests réalisés *in vitro* montrent effectivement une forte résistance au soufre de *S. cerevisiae* et de *H. guillermondii* supérieure à 10 mg/L et une très faible résistance de ces 2 espèces au penconazole inférieure à 0,05 mg/L. Cadez et al. (2010) ont comparé l'effet de trois fongicides utilisés contre *Botrytis cinerea* : l'iprodione, le pyriméthanil et le cyprodinil en association avec le fludioxonil. L'étude des populations présentes sur baies au moment de la récolte montre un nombre plus élevé de levures sur les baies traitées par rapport au témoin (baies non traitées) sans modification significative de l'abondance des espèces prédominantes. Pour ces auteurs, l'impact des traitements effectués sur les populations de levures isolées reste très faible comparé à ce qu'ils observent en fonction du mode d'échantillonnage (prélèvements de baies ou de grappes entières) ou en fonction des conditions climatiques (millésime froid et humide et millésime sec et chaud). Les tests réalisés *in vitro* montrent que l'ensemble des espèces Basidiomycètes testées (*Auriculibuller fuscus*, *Bulleromyces albus*, *Cryptococcus adeliens*is,

Cryptococcus flavescens, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus wieringae*, *Cryptococcus zeae*, *Erythrobasidium hasegawianum*, *Filobasidium floriforme*, *Holtermanniella takashimae*, *Kwoniella mangroviensis*, *Pseudozyma prolifica*, *Rhodotorula bacarum*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula nothofagi*, *Rhodotorula phylloplana* et *Sporidiobolus pararoseus*) sont inhibées par le pyriméthanil qui n'a, par contre, aucun effet sur la croissance du genre *Hanseniaspora* et de *Metschnikowia pulcherrima*. Les levures testées du genre *Hanseniaspora* ne sont pas non plus inhibées par les autres fongicides alors que celles appartenant à l'espèce *Metschnikowia pulcherrima* sont inhibées par l'iprodione. L'utilisation notamment du pyriméthanil permettrait de lutter contre *Botrytis cine*rea et de sélectionner sur la baie des levures potentiellement fermentaires, *Hanseniaspora* et *Metschnikowia* (Cadez et al., 2010). Cependant les résultats des tests *in vitro* ne sont pas en accord avec leurs observations réalisées au vignoble sur les baies de raisin. En effet, certaines levures sensibles aux trois fongicides (*in vitro*) ont été isolées sur des baies traitées. Les auteurs supposent que les fongicides ont un effet sur les populations levuriennes au moment de leur application mais que, durant le délai sanitaire sans traitement avant la récolte, les populations de levures pourraient recoloniser la baie et donc minimiser l'impact de ces traitements.

La production de raisin de qualité nécessite généralement l'application de plusieurs produits phytosanitaires différents tout au long du cycle végétatif. Certains auteurs ont donc choisi d'évaluer les effets non intentionnels de différentes stratégies de protection phytosanitaire dans leur ensemble plutôt que les effets de chacun des produits utilisés. Ainsi, dans différentes études, les effets de deux stratégies de protections différentes ont été comparés avec des observations réalisées sur des vignobles non traités (Guerra et al., 1999 ; Comitini et Ciani, 2008). Les deux stratégies de protection comparées correspondent à une protection dans le cadre de la viticulture biologique (cuivre et soufre), la seconde à une viticulture conventionnelle (molécules de synthèse). La population levurienne est plus faible dans les parcelles traitées en conventionnel. Guerra et al. (1999) montrent notamment l'impact important sur l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* qui n'est plus isolée pour ce mode de protection. Comitini et Ciani (2008) décrivent que les levures fermentaires comme *Hanseniaspora* ou *Metschnikowia* sont prépondérantes pour les vignobles témoin et en protection biologique, alors que dans les parcelles avec un mode de protection conventionnelle c'est l'espèce *Aureobasidium pullulans* qui est majoritaire. Dans une étude similaire, Cordero-Bueso et al. (2011a) observent une diversité plus importante d'espèces de levures et de souches de *Saccharomyces cerevisiae* pour une parcelle avec une protection biologique par rapport à une parcelle avec une protection

conventionnelle. Cette étude utilise le moût comme milieu d'auto-enrichissement dans le but d'obtenir un maximum de levures fermentaires et notamment de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette étape complique l'interprétation des résultats obtenus concernant l'effet du mode de protection sur les populations de levure présentes sur grappe. Martins et al. (2014) utilisent une technique de rinçage des baies afin d'étudier les populations présentes à la surface des baies de raisin. Ces auteurs obtiennent des résultats similaires aux travaux de Cordero-Bueso et al. (2011a) mais également de Tello et al. (2012) à savoir une biodiversité levurienne plus importante des raisins pour les parcelles ayant reçues une protection biologique. De plus, contrairement à Comitini et Ciani (2008), une proportion beaucoup plus importante de l'espèce *Aureobasidium pullulans* est quantifiée sur les baies des parcelles biologiques par rapport aux baies provenant de parcelles en conventionnel. Martins et al. (2014) mettent en avant une correspondance entre la biodiversité des levures sur la baie et les doses de cuivre utilisées au cours du millésime. Une étude similaire réalisée par Milanovic et al. (2013) montre une plus faible diversité des espèces de levures isolées dans des parcelles en protection biologique. Par ailleurs, contrairement aux résultats de Comitini et Ciani (2008), l'espèce *Metschnikowia pulcherrima*, largement trouvée dans les échantillons issus de la protection conventionnelle, ne l'a été qu'occasionnellement dans les échantillons issus de la protection biologique.

L'ensemble de ces études semble s'accorder sur un impact de la protection phytosanitaire sur les populations de levures ou de champignons levuriformes, microorganismes non cibles des produits appliqués. Cependant beaucoup de ces résultats sont contradictoires. Certaines espèces semblent se maintenir ou être favorisées ou au contraire éliminées par la même protection phytosanitaire. Plusieurs paramètres peuvent expliquer ces différences : le cépage, l'âge du vignoble, la localisation géographique … déjà évoqués dans le paragraphe 1.5. et qui évidemment diffèrent d'une étude à l'autre. Le mode de prélèvement (baies, grappes entières, moûts de raisin) ainsi que la technique d'identification comprenant ou non des étapes de culture peuvent aussi beaucoup influencer les résultats. Les matières actives utilisées et la

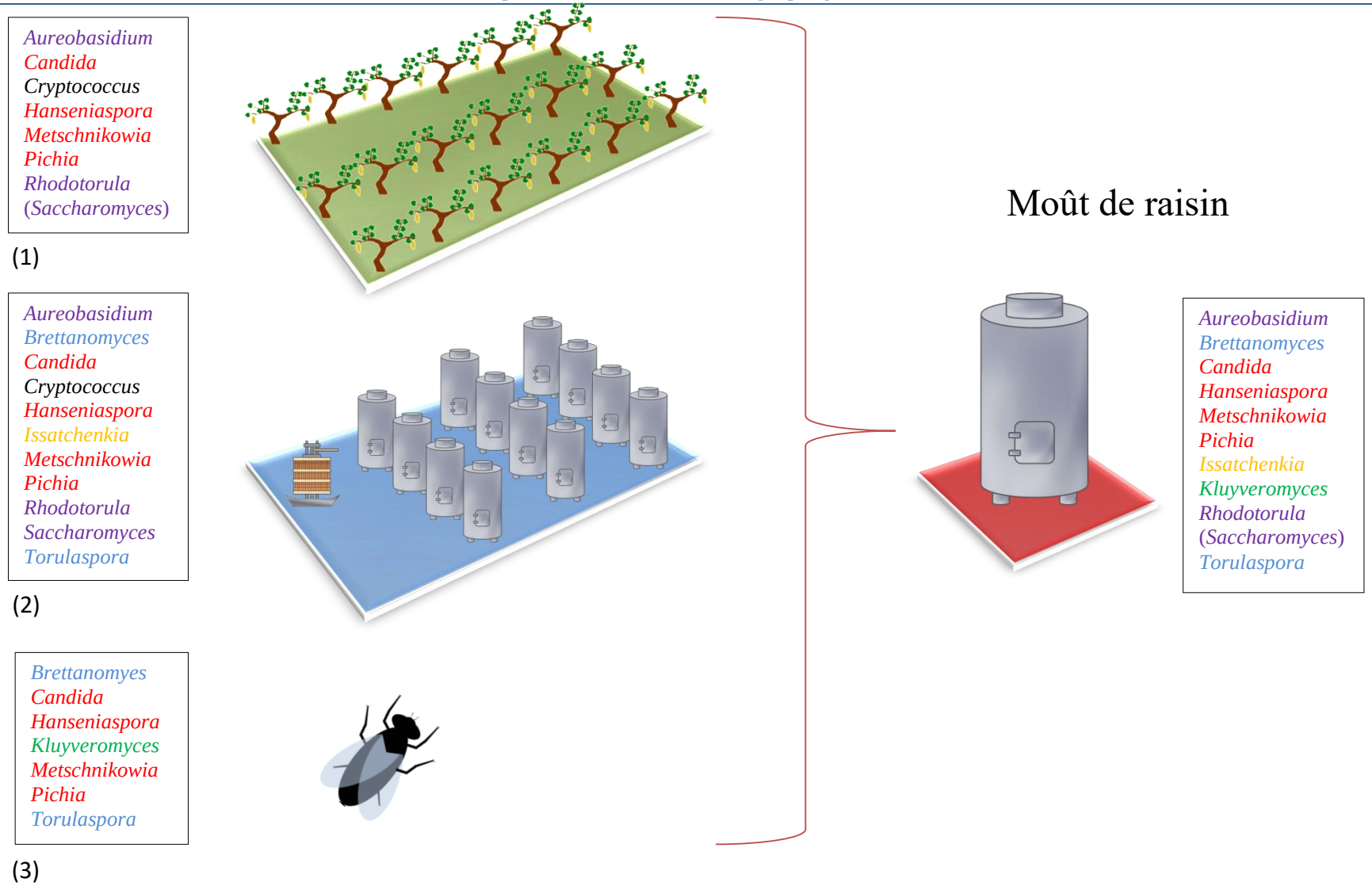


Figure 3. Origine supposée des genres levuriens les plus couramment isolés dans les moûts de raisin : les baies de raisin (1), la cuverie (matériel, surface, air) (2) et les insectes présents dans la cuverie (drosophiles) (3)

En rouge : les genres communs aux moûts, aux baies de raisin, à la cuverie et aux insectes; en bleu : les genres communs aux moûts, à la cuverie et aux insectes; en violet : les genres communs aux moûts, aux baies de raisin et à la cuverie; en jaune : les genres communs aux moûts et à la cuverie; en vert : les genres communs aux moûts et aux insectes; : en noir : les genres communs aux moûts et à la cuverie.

D'après : Belin, (1979) ; Fleet et al., (1984) ; Heard et Fleet, (1986) ; de la Torre et al., (1999) ; Sabate et al., (2002) ; Dias et al., (2003) ; Rementeria et al., (2003) ; Clemente-Jiménez et al., (2004) ; Martorell et al., (2006) ; Renouf (2006) ; Sangorrin et al., (2007) ; Zott et al., (2008) ; Ocon et al., (2010) ; Barata et al., (2012a) ; Bokulich et al., (2013) ; David et al., (2014) ; Perez-Martin et al., (2014) ; Lam et Howell, (2015).

dose d'application peuvent également expliquer les résultats contradictoires. Quant au délai variable avant récolte, il peut permettre une plus importante recolonisation des baies par certaines espèces gommant ainsi certains effets des produits phytosanitaires (Cadez et al., 2010). De plus, Setati et al. (2012) montrent que l'effet de l'hétérogénéité de la parcelle est supérieur à l'effet de la protection phytosanitaire sur la diversité levurienne rendant difficile l'obtention d'un échantillonnage représentatif.

2 Les levures et la fermentation alcoolique

Il est connu depuis longtemps que la fermentation alcoolique est dirigée par les levures avec en premier lieu, les levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* qui ont longtemps été considérées comme les seules responsables de ce processus de fermentation. On sait aujourd'hui que différentes levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* (NS) sont présentes dans les moûts et qu'un certain nombre d'entre elles participe à la fermentation alcoolique. En revanche l'origine de ces levures, les paramètres influençant leurs dynamiques, qu'ils soient anthropiques ou naturels, ne sont pas encore très bien connus et font l'objet de nombreuses études.

2.1 Origine des levures présentes dans le moût de raisin

Il est aujourd'hui largement admis que les principales sources de levures dans le moût de raisin sont les baies de raisin et le matériel de vinification (Fleet et Heard, 1993 ; Mortimer et Polsinelli, 1999). Cependant, la part apportée par chacune de ces deux sources est encore mal définie. De plus, les autres sources potentielles comme l'air, les insectes ou le vinificateur lui-même ont été pour le moment peu ou pas étudiées (Fig. 3).

2.1.1 Baies de raisin

Comme cela est décrit dans le paragraphe 1.2, les baies de raisin hébergent une vaste communauté de levures. Si l'on compare les genres les plus couramment identifiés sur les baies matures à savoir *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* et *Pichia* (de la Torre et al., 1999 ; Rementeria et al., 2003 ; Renouf, 2006 ; Barata et al., 2012a) avec ceux les plus couramment identifiés dans les moûts à savoir *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* et *Pichia* et, occasionnellement, *Brettanomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* et *Zygosaccharomyces* (Clemente-Jiménez et al., 2004 ; David et al., 2014 ; Fleet et al., 1984 ; Heard et Fleet, 1986 ; Perez-Martin et al., 2014 ; Zott et al., 2008), on s'aperçoit que ce sont majoritairement les mêmes (Fig. 3). Plusieurs auteurs

montrent également que les espèces majoritairement isolées sur les baies sont également majoritaires dans le moût correspondant obtenu après pressurage. Parish et al. (1985) mettent ainsi en évidence que les espèces majoritaires dans les moûts étudiés et au cours de la fermentation alcoolique (*Hanseniaspora osmophilia*, *Pichia membranifaciens* et *Saccharomyces cerevisiae*) étaient également présentes sur les baies à l'exception de *Brettanomyces custersii* et *Pichia besseyii*. De plus, bien que les espèces *Hanseniaspora osmophilia* et *Saccharomyces cerevisiae* aient été isolées au cours de la fermentation dans l'ensemble des moûts correspondants à 4 vignobles différents, elles n'ont été isolées que dans deux de ces 4 vignobles. Sabate et al. (2002) montrent que les deux espèces majoritaires retrouvées dans les moûts (*Aureobasidium pullulans* et *Hanseniaspora uvarum*) étaient également présentes dans les vignobles correspondants ce qui n'est pas le cas pour les espèces *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri* et *Rhodotorula mucilaginosa* présentes uniquement dans les moûts.

On peut donc supposer que ces espèces étaient peut-être trop minoritaires sur baies pour être détectées mais qu'elles se sont ensuite développées en moûts. Il est également possible que ces levures présentes dans les moûts aient une autre origine que la baie de raisin. Dans le cas de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, beaucoup d'auteurs se sont interrogés sur l'origine des souches *Saccharomyces cerevisiae* présentes au cours de la fermentation étant donné que cette espèce est relativement peu isolée sur le raisin. En effet, Mortimer et Polsini (1999) estiment que 1 baie de raisin sur 1000 est porteuse de *S. cerevisiae*. Selon d'autres auteurs, *S. cerevisiae* serait même indétectable sur le raisin (Combina et al., 2005 ; Raspor et al., 2006). L'analyse directe de la présence de levures du genre *Saccharomyces* a été entreprise en utilisant du raisin récolté aseptiquement et aussitôt mis en fermentation dans des conditions stériles sans inoculation afin de ne pas augmenter la proportion de *Saccharomyces* au cours de la fermentation (Clemente-Jimenez et al., 2004 ; Valero et al., 2007). Dans ces conditions, 28% des fermentations sont dominées par *Saccharomyces cerevisiae*. Ces conditions de culture stérile, pouvant être considérées comme une étape d'enrichissement, permettent donc d'isoler des souches de *Saccharomyces cerevisiae* présentes au vignoble. Par une étude intraspécifique, Mercado et al. (2007) ont ainsi montré que des souches de *Saccharomyces cerevisiae* présentes au vignoble étaient également isolées au cours de la fermentation alcoolique en cave, dans des moûts obtenus à partir de baies de raisin issues des mêmes parcelles. Néanmoins, pour cette étude, seule 1 souche sur les 11 isolées dans les moûts ou au cours de la fermentation en 2001 et aucune des 27 isolées dans les moûts ou au cours de la fermentation en 2002 ne

correspondaient à des souches présentes au vignoble. Les auteurs confirment donc que les levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* présentes au cours de la fermentation alcoolique peuvent provenir du raisin mais que la majorité d'entre elles provient d'une autre source.

2.1.2 Cuverie

Le matériel de vinification présent dans la cuverie est reconnu comme étant également une source directe pour les levures retrouvées en moûts. En effet, de nombreuses levures ont été isolées sur le matériel de cuverie avant et pendant la période des fermentations (Fig. 3). Les principaux genres isolées sur le matériel ou les surfaces de la cuverie sont *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus, Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula, Saccharomyces* et *Torulaspora* (Belin, 1979 ; Sabate et al., 2002 ; Sangorrin et al., 2007 ; Ocon et al., 2010 ; Bokulich et al., 2013). Martorell et al. (2006) ont également décrit que les levures d'altération *Dekkera bruxellensis* et *Pichia guilliermondii*, productrices de 4-ethylphénol, pouvaient être isolées sur du matériel vinaire et/ou sur certaines surfaces de la cuverie. Bokulich et al. (2013) en utilisant une approche métagénomique (séquençage Illumina, détaillée dans le troisième paragraphe) ont identifié un grand nombre d'espèces sur les différents matériels de la cuverie entrant en contact direct (conquet, fouloir, pressoir, cuve, tuyaux, filtres) ou non (élévateur, pompe, tonneau, embouteilleur, sol, égouttoir, évier) avec le moût et pouvaient donc constituer une source non négligeable de levures exogènes. De plus, plusieurs études ont montré que, bien que les populations changeaient au cours de l'année, des levures et notamment l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* pouvaient être isolées sur le matériel au cours de l'année en dehors des périodes de fermentation (Bokulich et al., 2013 ; Garijo et al., 2008 ; Ocón, et al., 2013). Le matériel ne serait donc pas juste un vecteur d'échanges de levures entre les raisins provenant de différentes parcelles et le moût, mais semble constituer un véritable réservoir de levures permettant la constitution d'une flore de cuverie. En accord avec cette hypothèse, Sabate et al. (1998) ont trouvé qu'un grand nombre de souches de *Saccharomyces cerevisiae* étaient communes aux fermentations de deux millésimes consécutifs. De plus, Santamaria et al. (2005) ont montré la persistance d'une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* dans la cuverie et sa participation à la fermentation, deux ans après sa dernière utilisation comme ferment dans cette même cuverie. Par ailleurs plusieurs études montrent, pour l'espèce *Saccharomyces cerevisiae,* l'implication des souches présentes en cuverie dans la fermentation alcoolique (Le Jeune et al., 2006 ; Mercado et al., 2007 ; Santamaría et al., 2005). Mercado et al. (2007) montrent ainsi que parmi les 11 souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées dans le moût ou au cours de la fermentation en 2001 et les

27 isolées en moût ou au cours de la fermentation en 2002, 2 étaient déjà présentes sur le matériel vinaire avant l'arrivée de la vendange en 2001 et 10 en 2002. En dehors de ces études portant toutes sur *Saccharomyces cerevisiae*, aucune étude n'a démontré les transferts de levures non-*Saccharomyce*s (NS) du matériel de cuverie vers les moûts. Le fait qu'une partie des levures NS présentes dans les moûts proviennent du matériel de cuverie reste donc une simple hypothèse.

2.1.3 Autres sources potentielles (air, hommes, insectes, …)

En dehors des deux sources principales que constituent le raisin et le matériel vinaire, d'autres sources ont également été envisagées mais restent encore peu étudiées. Ainsi, l'air peut être une source importante de microorganismes ainsi qu'une voie de dissémination des microorganismes que ce soit pour des bactéries, des moisissures, des levures fermentaires ou d'altération comme *Brettanomyces* (Garijo et al., 2008 ; Ocón et al., 2011 ; Ocón et al., 2013 ; Pérez-Martíne al., 2014). La proportion de levures du genre *Saccharomyces* dans l'air de la cuverie a été, suivant les études, décrite comme importante (Perez-Martin et al., 2014) ou au contraire plutôt faible (Ocon et al., 2013b) avec une augmentation du nombre total de levures et du pourcentage de *Saccharomyces cerevisiae* lors de la période de vinification (Garijo *et al.* 2008). Néanmoins la transmission de souches de levures d'une cuve à l'autre passant par l'air comme supposé par Garijo et al. (2008) n'a pas encore été démontrée.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les mouches (*Drosophila melanogaster*) pouvaient abriter et transporter des levures (Fig. 3). Des souches productrices de 4-ethylphénol appartenant aux espèces *Brettanomyces bruxellensis* (Martorell et al., 2006), *Pichia guilliermondii*, *Candida cantarelli* et *Kluyveromyces lactis* (Dias et al., 2003) ont ainsi été isolées sur des mouches présentes dans la cuverie, laissant ainsi supposer que ces insectes pourraient être des vecteurs de certaines levures d'altération. De plus, Lam et Howell (2015) ont mis en évidence que les mouches présentes en cuverie portaient principalement les espèces *Hanseniaspora uvarum*, *H. valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, et *Torulaspora delbrueckii* mais ils n'ont pas détecté l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Ces mouches pourraient donc ainsi être vectrices de certaines levures retrouvées au cours de la fermentation alcoolique mais cela n'a pas encore été démontré.

Bien que la peau humaine soit connue depuis longtemps pour abriter de nombreuses espèces de levures (Marples, 1965), à notre connaissance, l'apport de levures dans les moûts lié à la

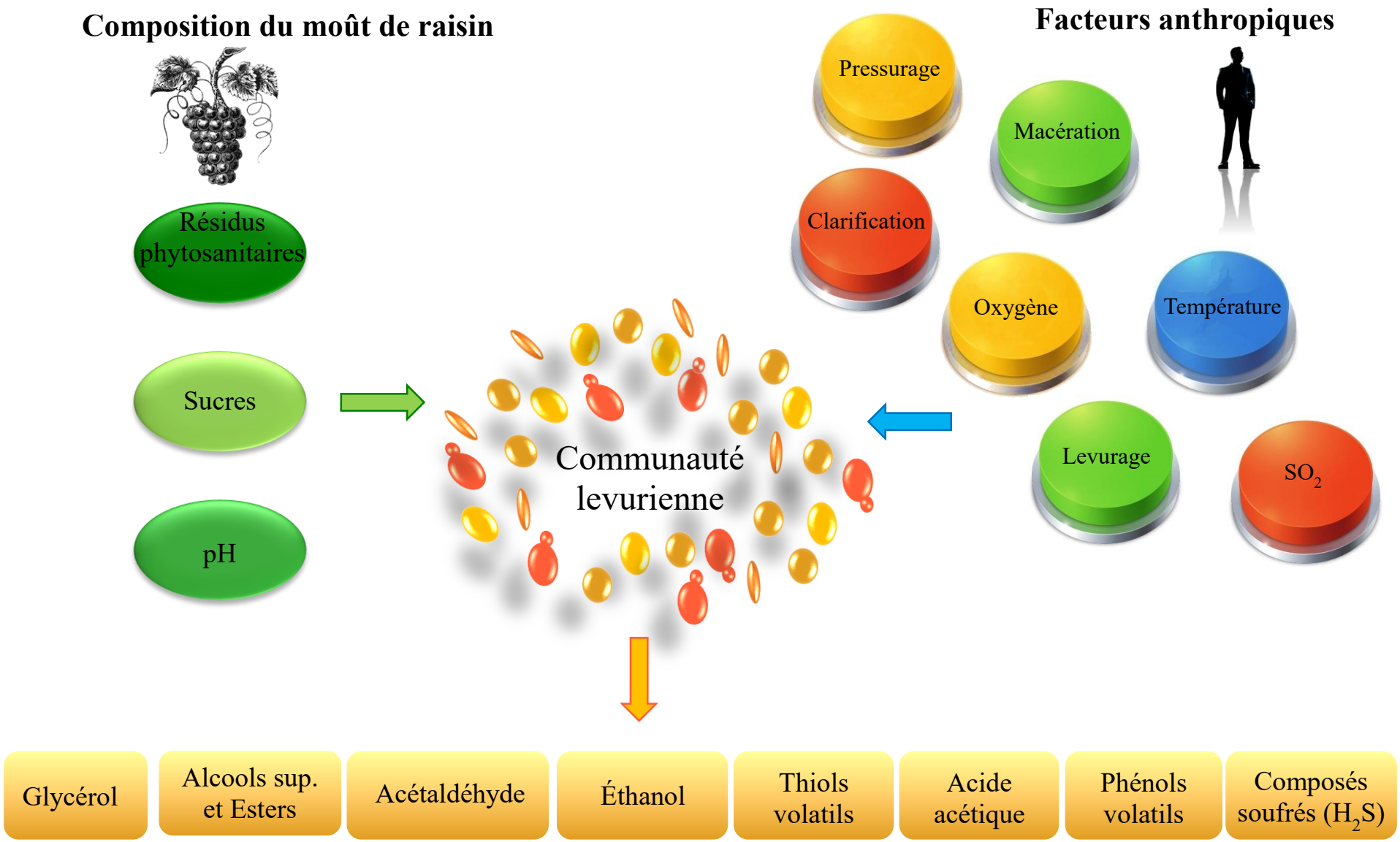


Figure 4. Principaux facteurs influençant la communauté levurienne dans le moût et au cours de la FA et influence sur la composition du vin.
D'après : Benda et al. (1982), Lafon-Lafourcade et al. (1983), Bisson et Kunkee (1991), Mora et Mullet (1991), Zironi et al. (1993), Chatonnet et al. (1995), Ciani et Picciotti (1995), Constanti et al. (1997, 1998), Charoenchai et al. (1998), Cabras et al. (1999, 2000), Julien et al. (2000), Hansen et al. (2001), Strauss et al. (2001), Beltran et al. (2002), Dias et al. (2003), Romano et al. (2003), Combina et al. (2005), Du Toit et al. (2005), Moreira et al. (2005), Calhela et al. (2006), Ferreira et al. (2006), Renouf (2006), Sturm et al. (2006), Suárez et al. (2007), Valles et al. (2007), Cus et Raspor (2008), Andorra et al., 2010a, Salvado et al. (2011), Zott et al. (2011), Rodriguez et al. (2012), Albertin et al. (2014b), Takahashi et al. (2014), Bokulich et al. (2015), Maturano et al. (2015).

présence de l'Homme dans la cuverie et à son contact potentiel avec les moûts n'a pour le moment pas été étudié. On ignore si l'Homme peut servir de réservoir pour des espèces de levures fermentaires et son rôle en tant que vecteur n'a pas encore été démontré.

2.2 Évolution de la biodiversité levurienne du moût de raisin au vin

Les populations de levures présentes dans le moût peuvent évoluer depuis le début de la fermentation alcoolique (FA) (étapes pré fermentaires) jusqu'à la fin de la FA. Ces changements sont liés en partie à l'implantation de levures présentes dans la cuverie (comme décrit dans le paragraphe précédent) mais également à des sélections ou des développements préférentiels de certaines levures en fonction de la composition des moûts (Fig. 4). De plus, certaines pratiques œnologiques utilisées lors de la vinification peuvent également modifier les populations présentes ainsi que les interactions entre levures dans le milieu (Fig. 4 et Fig. 5).

2.2.1 Influence de la composition du moût de raisin

Charoenchai et al. (1998) ont étudié l'effet du pH et de la concentration en sucres de moûts de raisin sur le taux de croissance et le niveau de population maximale pour différentes souches appartenant aux espèces *Candida colliculosa*, *Candida pulcherrima* (forme anamorphe de *Metschnikowia pulcherrima*), *Candida stellatta*, *Kloeckera apiculata* (forme anamorphe de *Hanseniaspora uvarum*), *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii*. Les résultats de cette étude montrent que pour des pH compris entre 3 et 4, il n'y a pas d'effet de l'acidité sur le taux de croissance des différentes souches mais que la population maximale est plus importante pour l'espèce *Pichia anomala* pour un pH de 3,5. Le taux de croissance et la population maximale de ces espèces sont également mesurés lors de fermentations à 20°C pour des moûts à pH 3,5 avec une concentration initiale en sucres de 200 g/L et 300 g/L. La population maximale est plus faible pour l'ensemble des espèces lorsque la concentration en sucres est la plus élevée. En revanche le taux de croissance est plus faible dans ces conditions, uniquement pour les espèces *Candida stellatta*, *Pichia anomala* et *Torulaspora delbrueckii*. Par ailleurs, quelle que soit la concentration en sucres, la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* présente le taux de croissance le plus élevé et la population maximale la plus élevée. Pourtant certains auteurs ont noté que pour des fermentations avec des concentrations en sucres supérieures à 200 g/L, les espèces *Candida stellatta*, *Hanseniaspora uvarum*, et *Torulaspora delbrueckii* pouvaient avoir une capacité de croissance supérieure à celle de *Saccharomyces cerevisiae* (Benda et al., 1982 ;

Lafon-Lafourcade et al., 1983). Cette contradiction apparente pourrait être liée à des différences entre souches. Ferreira et al. (2006) ont comparé la vitesse de fermentation et les concentrations en sucres résiduels pour différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* avec différentes concentrations initiales en sucres (approximativement 200, 250 et 300 g/L). Les auteurs montrent que pour les fermentations avec 200 g/L de sucres, il n'y a pas de sucres résiduels et que la vitesse de fermentation est la même quelle que soit la souche considérée. En revanche à 300 g/L, aucune souche ne consomme l'intégralité des sucres fermentescibles et la quantité de fructose non fermenté ainsi que la vitesse de fermentation sont dépendantes de la souche. De plus, les souches ayant la vitesse de fermentation la plus rapide à 250 g/L ne sont pas nécessairement les plus rapides à 300 g/L. La quantité initiale de sucres pourrait donc avoir une influence importante sur les dynamiques des différentes espèces mais aussi sur les différentes souches de levures présentes au cours de la fermentation alcoolique.

Par ailleurs, la concentration en sucres va avoir une répercussion sur la production d'éthanol au cours de la FA qui peut également influer sur les populations levuriennes. En effet, plusieurs études ont montré que l'accumulation de l'éthanol au cours de la FA entraîne un déclin de la biodiversité (Constanti et al., 1997 ; Beltran et al., 2002 ; Combina et al., 2005). De nombreux genres de levures non-*Saccharomyces* comme *Candida, Hanseniaspora, Issatchenkia, Kluyveromyces, Metschnikowia* et *Pichia,* sont présentes uniquement lors des premières étapes de la FA en raison de leur faible tolérance à l'éthanol comprise généralement entre 3% et 10% v/v (Jolly et al., 2014). Salvado et al. (2011) ont ainsi étudié comment la concentration en éthanol (entre 0 et 25% v/v) pouvait influencer la compétition entre *Saccharomyces cerevisiae* et plusieurs espèces non-*Saccharomyces* (*Candida zemplinina, Hanseniaspora uvarum, Kluyveromyces marxianus, Pichia fermentans* et *Torulaspora delbrueckii*). Les auteurs montrent que le taux de croissance maximale de toutes les levures testées diminue lorsque la concentration en éthanol augmente et qu'aucune levure n'est capable de croître avec plus de 16% v/v d'éthanol. De plus, la production d'éthanol ne semble donner aucun avantage écologique à *Saccharomyces cerevisiae* tant que la concentration ne dépasse pas les 9% v/v.

La quantité d'oxygène dissous peut également influer sur la dynamique des populations de levure. Hansen et al. (2001) ont comparé les dynamiques de levures non-*Saccharomyces* (*Kluyveromyces thermotolerans* et *Torulaspora delbrueckii*) en culture mixte avec *Saccharomyces cerevisiae* en fonction de la disponibilité en O_2 au cours de la fermentation. Quel que soit le système de fermentation, la croissance et la survie de *Saccharomyces cerevisiae* ne sont pas affectées. De même pour les 2 espèces non *Saccharomyces,* la population maximale

(7.2 log CFU/mL pour *K. thermotolerans* et 6.8 log CFU/mL pour *T. delbrueckii*) est atteinte après 2 jours de fermentation quel que soit le système de fermentation. Pour les fermentations avec une quantité limitante en O_2 (0,1 mg/L), les populations diminuent rapidement et *T. delbrueckii* et *K. thermotolerans* ne sont respectivement plus détectées après 6 et 8 jours de fermentation. Dans les conditions moins limitantes en O_2 (2 mg/L), les populations des espèces non-*Saccharomyces* diminuent plus lentement et les 2 espèces sont respectivement encore détectées après 8 et 10 jours de fermentation. Une faible disponibilité en oxygène entraînerait donc une disparition plus rapide des levures non-*Saccharomyces*. Néanmoins les besoins en oxygène de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* varient en fonction des souches (Julien et al., 2000) et certaines pourraient ne pas être avantagées par une faible teneur en oxygène par rapport aux non-*Saccharomyces*.

Les traitements phytosanitaires appliqués au vignoble peuvent également influer sur les populations levuriennes avant et au cours de la fermentation alcoolique. La persistance ou non des produits phytosanitaires au cours des étapes de vinification est très variable selon les études et les molécules étudiées (Cabras, 2000 ; Calhela et al., 2006). Cabras et al. (1999) ont testé l'effet de l'azoxystrobine, cyprodinil, fludioxonil, mépanipyrim, pyriméthanil et tétraconazole sur des populations de *Saccharomyces cerevisiae* et *Kloeckera apiculata* (forme anamorphe de *Hanseniaspora uvarum*) et la production d'éthanol pour des fermentations en milieu YNBG (Yeast Nitrogen Base Glucose) en monoculture. Excepté le tétraconazole, ces fongicides peuvent être détectés dans le moût à des concentrations inférieures à 1 mg/L, concentrations pouvant diminuer lors des étapes de clarification des moûts (Cabras, 2000). Ces mêmes fongicides ont été testés à des concentrations comprises entre 0,8 et 5,5 mg/L selon le produit, ce qui correspond approximativement à 10 fois la concentration de ces fongicides retrouvée sur grappe (Cabras et al., 1997 ; Cabras et al., 1998). Aucun des produits testés ne semblent affecter les populations de *Saccharomyces cerevisiae* mais une légère augmentation de la teneur en éthanol est observée. Pour *Kloeckera apiculata*, après 10 jours de FA, la population est plus élevée pour l'ensemble des fongicides testés (8.10^7 cellules/mL) contre 5.10^7 cellules/mL (pour le témoin). De plus, excepté pour le cyprodinile, la quantité d'alcool produite est plus importante en présence de fongicides. Calhela et al. (2006) ont testé l'effet du procymidone, benomyle, iprodione sur la croissance des espèces *Candida utilis, Rhodotorula glutinis, Saccharomyces cerevisiae, Zygosaccharomyces bailli* et *Zygosaccharomyces rouxii*. L'ensemble des produits testés ont un effet négatif sur la croissance *in vitro* des levures et des différences de sensibilité en fonction des espèces sont observées. *Saccharomyces cerevisiae* et

Zygosacchromyces rouxii semblent résister à des concentrations plus importantes pour tous les produits phytosanitaires testés. Quant au benomyl, il semble présenter la toxicité la plus importante pour l'ensemble des levures testées. Par ailleurs, Cus et Raspor (2008) ont mis en évidence un effet du pyrimethanil sur les dynamiques des populations levuriennes au cours de fermentations spontanées. Les auteurs ont comparé, pour 3 millésimes consécutifs (2002 à 2004), les dynamiques de populations et de fermentations de moûts issus de grappes d'une même parcelle divisée en 2 (l'une traitée au pyrimethaniol, un anti-*Botrytis,* et l'autre témoin). Les résidus de pyrimethanil retrouvés en moût varient en fonction des millésimes (entre 0,58 et 1,44 mg/L). Les auteurs montrent que le pyrimethanil a un effet négatif sur la population de *Hanseniaspora uvarum* au cours de la fermentation. En revanche, le pourcentage de levures *Saccharomyces cerevisiae* au cours et en fin de fermentation est plus important en présence de pyrimethanil surtout pour 2003 et 2004 (0% pour le témoin contre 100% en fin de fermentation en présence de pyrimethanil). De plus, la présence du pyrimethanil diminue la proportion de *Candida stellatta* en moût et au cours de la fermentation.

La concentration en cuivre dans les moûts peut également avoir un effet sur les populations levuriennes. Le cuivre sous ses différentes formes (sulfate de cuivre, oxychlorure de cuivre, hydroxyde de cuivre) est la matière active d'un grand nombre de matières commerciales appliquées au vignoble. Bien qu'à faibles concentrations, le cuivre soit un métal lourd essentiel pour les microorganismes (Gadd, 1992), de nombreuses études ont montré un effet négatif sur *Saccharomyces cerevisiae* lorsque la concentration intracellulaire est trop importante (Tohoyama et al., 1995 ; Adamo et al., 2012 ; Azenha et al., 2000). En effet, lorsque le cuivre atteint une concentration trop importante (supérieure à 2,5 µM Cu^{2+}), il provoque une perte rapide de K^+ cellulaire, ce qui entraine une rupture de l'intégrité de la membrane plasmique et la mort cellulaire (Avery et al., 1996). Ferreira et al. (2006) montrent que l'effet du cuivre (0,25 mM Cu^{2+}) sur la croissance de levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* dépend très fortement de la souche considérée. La phase de latence peut être allongée de manière très importante pour certaines souches en présence de cuivre jusqu'à être multiplié par 10 passant de 10 heures à plus de 95 heures. L'inhibition ou le ralentissement de la fermentation alcoolique semble directement liée aux effets sur la croissance de la population. Pour les souches pour lesquelles aucun effet du cuivre n'est observé sur la croissance, le déroulement de la fermentation alcoolique est le même que ce soit avec ou sans cuivre. La présence de cuivre peut également être inhibitrice pour d'autres levures dont la résistance varie également fortement en fonction des espèces et des souches considérées (Vadkertiova et al., 2006). Cependant si

l'utilisation des fongicides à base de cuivre est réalisée dans le respect des bonnes pratiques viticoles (respect des doses homologuées et du délai avant récolte), la concentration en cuivre dans les moûts est trop faible pour influencer la fermentation alcoolique.

2.2.2 Influence des pratiques œnologiques

L'une des premières étapes réalisées sur la vendange de raisins blancs est le pressurage. Peu d'études ont examiné l'effet de cette étape sur les populations de levures et notamment l'impact des différents modes de pressurage. Valles et al. (2007) ont comparé dans le cadre de la production de cidre, l'effet d'un pressurage mécanique et d'un pressurage pneumatique sur les populations de levures présentes dans le jus. Les auteurs montrent qu'une proportion importante (64% en 2001 et 50% en 2002) de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* et *S. bayanus*) est présente après un pressurage mécanique alors qu'aucune de ces deux espèces n'est détectée après un pressurage pneumatique. La proportion de l'espèce *Hanseniaspora uvarum* est quant à elle plus faible avec le pressoir mécanique. Concernant les espèces *Hanseniaspora osmophila* et *Hanseniaspora valbyensis*, leurs proportions semblent en revanche dépendre plus du millésime que du type de pressoir utilisé. Sturm et al. (2006) notent pour des moûts de Riesling que les levures non-*Saccharomyces* persistent plus longtemps au cours de la fermentation si le pressurage est précédé d'un foulage ou d'une macération. Maturano et al. (2015) ont montré un impact important de la température sur l'évolution des populations de levures au cours des macérations pré-fermentaires (7 jours) pour les vins rouges (Cabernet Sauvignon et Malbec). Ainsi une macération effectuée à 14°C entraîne un développement de levures avec une forte augmentation de la proportion de *Hanseniaspora uvarum*. Pour des macérations effectuées à 8°C ou 2,5°C, la population de levures totales n'augmente pas mais les proportions de *Candida zemplinina* et de *Saccharomyces cerevisiae* augmentent. Ceci confirme le caractère psychrotolérant de *Candida zemplinina* (Sipiczki et al., 2003).

Après le pressurage, une étape de clarification du jus (débourbage) est réalisée. Mora et Mulet (1991) ont montré pour des moûts de Chenin et de Prensal que le débourbage à froid réduit la quantité totale de levures et affecte particulièrement la croissance de certaines espèces comme *Hansenula anomala*, *Issatchenkia terricola* et *Saccharomyces cerevisiae* alors que d'autres comme *Candida zemplinina* ou *Hanseniaspora uvarum* ne semblent pas très sensibles à cette pratique et deviennent ou restent après le débourbage les espèces majoritaires.

Quelle que soit la vinification (en blanc ou en rouge), la température peut-être régulée tout le long de la fermentation alcoolique et avoir également un impact sur la dynamique des

populations levuriennes. Charoenchai et al. (1998) ont étudié l'effet de la température au cours de la FA pour des moûts synthétiques et pour différentes souches appartenant aux espèces *Candida colliculosa*, *Candida pulcherrima*, *Candida stellatta*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii*. Les auteurs montrent que pour des températures comprises entre 10°C et 25°C, plus la température augmente plus le temps de doublement de la population diminue excepté pour l'espèce *P. anomala* et pour une des deux souches de *T. delbrueckii* pour laquelle l'optimum de croissance est atteint à 20°C. Salvado et al. (2011) ont étudié l'influence de la température vis-à-vis de la compétition entre *Saccharomyces cerevisiae* et plusieurs espèces non-*Saccharomyces* (*Candida zemplinina, Kluyveromyces marxianus, Hanseniaspora uvarum, Pichia fermentans* et *Torulaspora delbrueckii*) pour des cultures réalisées en milieu YNB (Yeast Nitrogen Base) supplémenté avec 20 g/L de glucose. Les auteurs montrent que seules *Candida zemplinina, Kluyveromyces marxianus* et *Pichia fermentans* sont capables de croître en dessous de 4°C et que *Kluyveromyces marxianus* et *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de croître à plus de 45°C. Quant aux températures optimales, elles diffèrent en fonction de l'espèce. Les espèces *Candida zemplinina, Hanseniaspora uvarum, Pichia fermentans* et *Torulaspora delbrueckii*, ont une température optimale de croissance proche de 25°C alors que la température optimale pour *Saccharomyces cerevisiae* est d'environ 31°C et près de 39°C pour *Kluyveromyces marxianus.* Compte tenu de ces différences et du taux optimal de croissance de chaque espèce il apparaît que des températures supérieures à 15°C au cours de la fermentation donnent un avantage considérable à *Saccharomyces cerevisiae* dans la compétition inter-espèce. Il est à noter que si la température de fermentation est supérieure à 36°C, c'est alors *Kluyveromyces marxianus* qui aurait un avantage vis-à-vis de *Saccharomyces cerevisiae*, mais cette température n'est jamais atteinte en vinification en blanc.

La grande majorité des vinificateurs utilisent le dioxyde de soufre (SO_2) pour ses différentes propriétés : antioxydante, antioxydasique et antiseptique afin de privilégier le développement de flore d'intérêt (Ribereau-Gayon et al., 2004). Les doses d'emploi sont très variables entre 0 à 10-12 g/hL de moût de raisin. Takahashi et al. (2014) montrent que l'utilisation de SO_2 entraîne une réduction de la biodiversité des levures en moût et tout au long de la fermentation alcoolique et empêche le développement du genre *Candida*. L'utilisation du SO_2 entraîne également une diminution plus rapide du genre *Hanseniaspora* au cours de la fermentation alcoolique au profit notamment de *Saccharomyces cerevisiae* (Constanti et al., 1998). Bokulich et al. (2015) ont étudié l'effet de différentes concentrations (entre 0 et 150 mg/L) de SO_2 sur les

populations bactériennes et fongiques lors de fermentations de moûts de Chardonnay. Les fermentations sont plus lentes et prolongées avec les faibles concentrations (< à 25 mg/L) en raison du développement de bactéries ou de champignons rentrant en compétition avec les levures. L'ajout de 25 mg/l de SO_2 permet d'empêcher le développement d'espèces bactériennes et fongiques. En revanche, l'augmentation des doses jusqu'à 100 mg/L n'entraîne aucun effet supplémentaire sur les populations ou le déroulement des fermentations. Au-delà de cette concentration, les fermentations sont plus lentes que celles effectuées avec des doses comprises entre 25 et 100 mg/L.

Albertin et al. (2014b) ont étudié les effets synergiques ou antagonistes de plusieurs pratiques pré-fermentaires pour des moûts de Chardonnay : la température lors des macérations pré-fermentaires (10°C ou 15°C), le degré de clarification (90 NTU ou 250 NTU), l'utilisation du SO_2 (0 ou 25 mg/L) et le levurage sur les populations de *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora* spp., *Saccharomyces* spp. et *Torulaspora delbrueckii*. Les auteurs ont montré que les effets étaient différents en fonction des genres ou des espèces de levures considérées mais aussi et surtout qu'il existe des effets synergiques ou antagonistes entre certaines pratiques. Ainsi, un faible degré de clarification semble favoriser le développement de *Candida zemplinina* mais principalement si la température de pré-fermentation est de 10°C. L'utilisation du SO_2 semble favoriser le genre *Saccharomyces* indépendamment des autres pratiques. Par contre si l'inhibition du genre *Hanseniaspora,* liée à l'utilisation du SO_2, est observée lors de macérations à 10°C, ce n'est pas le cas pour une température de 15°C. L'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* comme starter levurien conduit à une augmentation de la population maximale atteinte par l'espèce *Hanseniaspora uvarum*. En revanche si aucun effet n'est observé sur la population maximale de *Candida zemplinina,* la population maximale de *Torulaspora delbrueckii* est diminuée. Egli et al. (1998) montrent que le levurage avec deux souches commerciales de *Saccharomyces* limite la croissance des levures non-*Saccharomyces* et conduit à une diminution de la diversité des souches de *S. cerevisiae* isolées au cours de la fermentation. La sévérité de ces effets dépend cependant de la souche commerciale utilisée. Par ailleurs, Salvado et al. (2011) ont montré que l'effet du

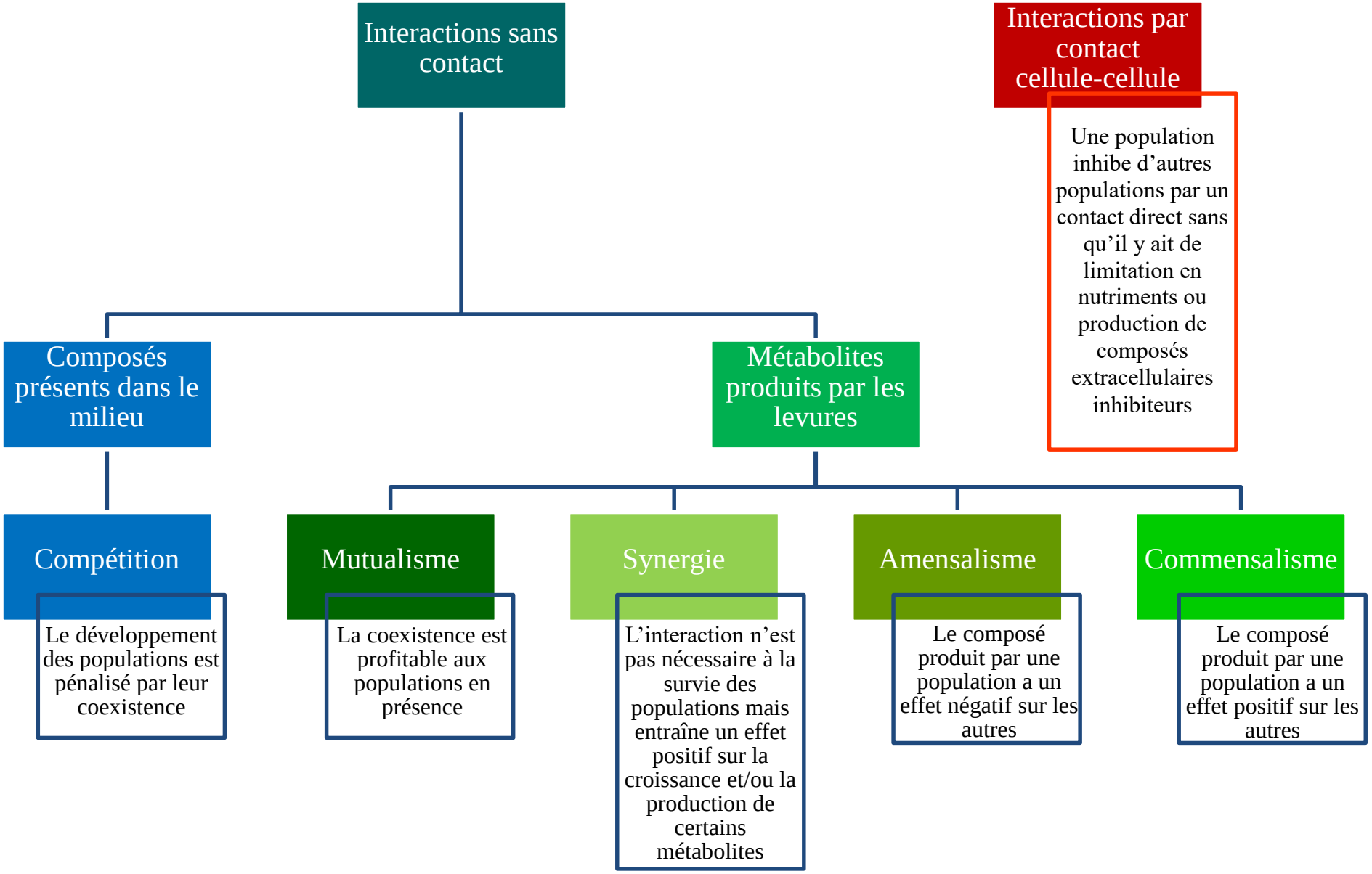


Figure 5. Principaux types d'interactions entre populations levuriennes au cours de la FA
D'après Renouf (2006), Zott (2008), Sadoudi (2012), Liu et al. (2015).

levurage est avant tout dépendant de la concentration du levain commercial au moment de l'ensemencement.

2.2.3 Influence des interactions levuriennes

De nombreuses interactions peuvent avoir lieu au cours de la fermentation alcoolique entre les différents types de microorganismes présents (Liu et al., 2015). Dans cette partie ne seront développées que les interactions entre les populations de levures (Fig. 5). Plusieurs auteurs ont étudié la capacité de certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* à produire des protéines extracellulaires qui permettent l'élimination d'autres levures sensibles à ces protéines. Ces souche dites *killer* ont été identifiées comme majoritaire en fin de fermentation alcoolique, montrant ainsi leur capacité à s'imposer au cours de la fermentation tout en permettant que celle-ci se termine (Fleet, 2003). Cependant Perez et al. (2001) ont montré que l'ajout de 2% à 6% de levures *killer* conduisait à l'élimination des autres levures du genre *Saccharomyces* et à un arrêt de la fermentation alcoolique. On peut également citer la fraction protéique (2-10 KDa) du surnageant d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* (souche CCMI885) qui présente un effet levuricide sur l'espèce *Kluyveromyces marxianus* et levurostatique sur les espèces *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans* et *Torulaspora delbrueckii*. (Alberganria et al., 2010). Plusieurs études ont également mis en avant une activité *killer* chez les levures non-*Saccharomyces*. Certaines souches appartenant aux espèces *Pichia anomala*, *P. membranifasciens*, et *Kluyveromyces wickerhamii* sont capables de produire respectivement les toxines PMKT2, PIKT et KWKT actives contre des levures du genre *Brettanomyces*. Ciani et Fatichenti (2001) ont montré que la toxine produite par la souche DVPG6076 de l'espèce *Kluyveromyces phaffi* avait une activité levuricide contre des levures du genre *Hanseniaspora* lorsque le pH est compris entre 3,0 et 5,0.

Plusieurs autres types de composés tels que acides gras, acide acétique ou acétaldéhyde peuvent également inhiber la croissance de certaines espèces ou souches de levures (Bisson,1999 ; Fleet, 2003 ; Giannattasio et al., 2005 ; Ivey, 2013). L'espèce *Metschnikowia pulcherrima* est capable de produire l'acide pulcherimique, lui permettant ainsi d'empêcher le développement de plusieurs genres comme *Brettanomyces*, *Candida* et *Hanseniaspora* (Oro et al., 2014).

Comme nous l'avons déjà vu, la résistance à l'éthanol peut fortement varier en fonction des espèces voire des souches. De ce fait, la production d'éthanol par certaines levures est considérée comme une forme amensale d'interactions pour les levures résistantes, notamment

Saccharomyces cerevisiae, leur permettant peu à peu de s'imposer au cours de la fermentation alcoolique (Fig. 5).

La compétition pour les nutriments et divers composés est également une interaction très importante dans la régulation des populations de levures (Fig. 5). Ainsi la forte présence de levures non-*Saccharomyces* peut conduire à la consommation des composés azotés et des vitamines dans les premiers jours de la fermentation alcoolique, limitant de ce fait la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* pour le reste de la fermentation alcoolique (Fleet, 2003). La consommation de l'azote due à une forte croissance de *Torulaspora delbrueckii* lors des premières étapes de la fermentation alcoolique peut empêcher la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et conduire à des fermentations alcooliques languissantes (Taillandier et al., 2014). De même, la consommation rapide par *Hanseniaspora vinae* et *Metschnikowia pulcherrima* de l'azote et des vitamines, lorsque ceux-ci sont en quantités limitées, induit une croissance plus lente de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* et donc des fermentations alcooliques très languissantes surtout en présence de *Metschnikowia pulcherrima* (Medina et al., 2012). En revanche, Lage et al. (2014) montrent que la présence de *Hanseniaspora uvarum* induirait un léger ralentissement de la croissance et surtout une limitation de la population maximale de *Saccharomyces cerevisiae* indépendamment de la quantité d'azote disponible. Mortimer et al. (2000) montrent que l'effet de *Kloeckera apiculata* sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* pourrait être lié à la consommation de la thiamine présente dans le milieu. Certains auteurs ont également mis en évidence un mécanisme de régulation de la croissance par contact cellule-cellule. Ainsi, Renault et al. (2013) ont étudié des co-cultures de *Saccharomyces cerevisiae* et *Torulaspora delbrueckii* séparées ou non physiquement. Les auteurs observent une mort rapide de *Torulaspora delbrueckii* lorsqu'elle n'est pas séparée de *Saccharomyces cerevisiae* alors que s'il n'y a pas de contact physique et seulement la possibilité d'échange de molécules, l'espèce *Torulaspora delbrueckii* se maintient. Nissen et al. (2003) ont également observé ce phénomène pour des co-cultures de *Saccharomyces cerevisiae* avec *Torulaspora delbrueckii* ou *Kluyveromyces thermotolerans*.

2.3 Influence de la biodiversité levurienne sur la composition du vin

De nombreuses espèces peuvent être présentes au cours de la fermentation alcoolique. La production de glycérol, d'acétaldéhyde, d'acide acétique, d'éthanol ou de divers métabolites secondaires produits par cette biodiversité levurienne peuvent fortement varier en fonction des espèces voire des souches présentes (Romano et al., 2003), et ainsi faire varier les caractéristiques organoleptiques du vin produit. Le but de ce paragraphe n'est pas de faire

l'inventaire de l'ensemble des métabolites produits ou non par chaque espèce de levures, décrit par Jolly et al. (2014). En revanche, nous allons voir comment la présence de certaines espèces ou les modifications des communautés levuriennes peuvent modifier la composition des vins produits (Fig. 4).

Certaines levures peuvent produire des composés indésirables. En effet, les levures telles que *Brettanomyces*, *Candida*, *Pichia membranifaciens* et *Zygosaccharomyces* peuvent produire des composés comme l'acide acétique, les phénols volatils, le sulfure d'hydrogène qui sont préjudiciables pour la qualité organoleptique du vin (Chatonnet et al., 1995 ; Dias et al., 2003 ; Suárez et al., 2007). L'espèce *Brettanomyces bruxellensis* est habituellement associée à des odeurs de gouache, de clou de girofle, de cuir, de sueur de cheval et d'écurie (Mateo-Vivarach et al., 2006, 2007; Lambrechts et Pretorius, 2000) dues à la production de phénols volatils essentiellement, le 4-éthylphénol et le 4-éthylgaïacol dans le vin (Chatonnet et al., 1999a,b ; Du Toit et al., 2005). Quelques espèces comme *Candida cantarelli, Candida wickerhamii, Debaryomyces hansenii, Kluyveromyces lactis* et *Pichia guilliermondii* sont aussi capables de produire du 4- éthylphénol en milieu synthétique (Dias et al., 2003). Cependant cette capacité semble relativement rare parmi les levures retrouvées habituellement dans l'environnement vin (Viana et al., 2008).

Les levures du genre *Hanseniaspora* sont souvent associées à une forte production d'acide acétique (0,5 à 2,25 g/L) et d'acétate d'éthyle (380 à 400 mg/L) (Ciani et Picciotti, 1995 ; Caridi et Ramondino, 1999 ; Rojas et al., 2003). Cependant, une grande variabilité intraspécifique existe et certaines souches ont une production d'acide acétique comparable à celle de *S. cerevisiae* (Owuama et Saunders, 1990 ; Romano et al., 1992, 1997 ; Ciani et Maccarelli, 1998). Strauss et al. (2001) ont montré la capacité de certaines levures NS telles que *Candida pulcherima*, *Candida stellata* et *Kloeckera apiculata* à produire de l'H_2S (odeur d'œuf pourri). Cependant cette production est avant tout dépendante de la souche, comme le confirment les résultats de Butzke et Park (2011) qui notent également une influence des conditions de fermentation.

La présence de certaines espèces peut également avoir un impact très positif sur les caractéristiques des vins. Certaines levures sont capables par exemple de révéler les arômes variétaux tels que les thiols volatils dont la 4-méthyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) et le 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH) à l'origine des arômes respectivement « buis » et « pamplemousse». (Murat, 2001 ; Tominaga et al., 2000). Plusieurs études ont montré que les espèces

Saccharomyces cerevisiae et *Saccharomyces uvarum* étaient capables de libérer ces arômes avec des variations importantes en fonction des souches (Murat, 2001a ; Howell et al., 2004 ; Dubourdieu et al., 2006). Zott et al. (2011) mettent en évidence la capacité de certaines levures non-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora uvarum*, *Issatchnekia orientalis*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia membranifasciens* et *Torulaspora delbrueckii*) à libérer ces arômes, capacité variable en fonction de l'espèce mais aussi en fonction de la souche. Pour la 4MSP, l'ensemble des non-*Saccharomyces* libère une quantité significativement plus faible (entre 0 et 40 ng/L) que celle libérée par *Saccharomyces cerevisiae* (90 ng/L en moyenne). En revanche, pour la 3SH certaines souches de *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii* et la majorité des souches de *Metschnikowia pulcherrima* sont capables de libérer une quantité plus importante (entre 210 et 260 ng/L) que *Saccharomyces cerevisiae* (190 ng/L environ). Les levures du genre *Hanseniaspora* sont également capables de produire des composés pouvant contribuer positivement aux caractéristiques organoleptiques du vin. Elles ont par exemple été décrites comme fortes productrices d'esters volatils et de glycérol par rapport à *Saccharomyces cerevisiae* (Benda, 1982 ; Lafon-Lafourcade, 1983). De même, l'espèce *Metschnikowia pulcherrima* est décrite comme produisant de fortes concentrations d'esters volatils (Bisson et Kunkee, 1991 ; Rodriguez et al., 2010)

Des études montrent que la présence de *Torulaspora delbrueckii* au cours de la fermentation peut conduire à une réduction des teneurs en acide acétique par rapport à des mono-cultures de *Saccharomyces cerevisiae* (Bely et al., 2008 ; Renault et al., 2009). Cette espèce peut également augmenter la quantité d'acide succinique produite (Ciani et Maccarelli, 1998). De la même manière, la présence de *C. stellata* dans des moûts de Pinot gris conduit à une forte quantité d'acide succinique et à la baisse des teneurs en acide acétique et en alcools supérieurs par rapport à *S. cerevisiae* (Ciani et Maccarelli, 1998).

Outre le fait de produire des composés ayant un impact négatif ou positif en monoculture qui ne représente pas la réalité de la production de vin, il existe des interactions entre genres et/ou espèces levuriennes qui contribuent également à la modification des vins produits. Moreira et al. (2005) ont observé qu'en culture pure *H. uvarum* a une forte production de méthionol (odeur de chou) et de méthyl-2-tétrahydrothiophen-3-one (odeur de viande) comparées aux monoculture de *Hanseniaspora guilliermondii* et de *Saccharomyces cerevisiae*. En revanche

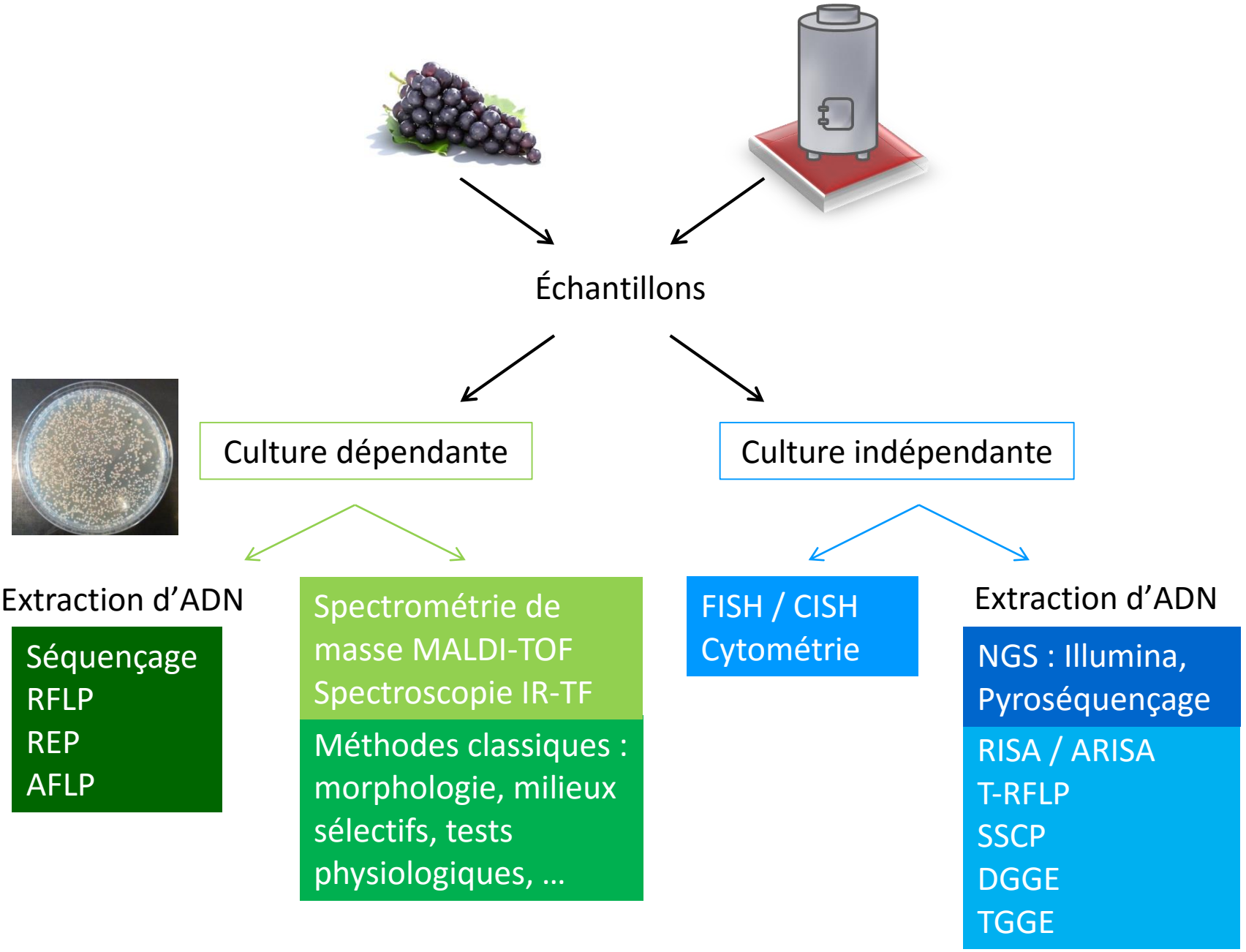


Figure 6. Méthodes cultures dépendantes et cultures indépendantes utilisées dans l'analyse des populations fongiques.

en co-culture avec *Saccharomyces cerevisiae*, les deux espèces du genre *Hanseniaspora* présentent une production proche de celle de la culture pure de *Saccharomyces cerevisiae*. De plus la présence de *Hanseniaspora guilliermondii* ou *Hanseniaspora uvarum* en co-fermentation avec *Saccharomyces cerevisiae* peut générer des concentrations élevées en alcools supérieurs, acétate et esters d'acétate (Zironi et al., 1993 ; Andorra et al., 2010b ; Moreira et al., 2011).

Par ailleurs, Sadoudi et al. (2012) ont montré des effets synergiques ou antagonistes entre une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) et des souches appartenant aux espèces *Candida zemplinina* (Cz), *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) et *Torulaspora delbrueckii* (Td) concernant la production de molécules aromatiques lors de fermentations de moûts de Sauvignon blanc. En effet, le profil sensoriel obtenu lors de la fermentation pour les couples (Sc-Cz et Sc-Mp) était très différent de ceux obtenus pour les fermentations avec chacune des deux espèces utilisées séparément. Bien que les concentrations en alcool supérieurs produits par *Metschnikowia pulcherrima* ou *Saccharomyces cerevisiae* soient similaires, l'utilisation des deux espèces en co-culture conduit à une production plus importante d'alcools supérieurs. Les auteurs montrent également que le vin obtenu à partir de la co-culture est notamment caractérisé par des niveaux élevés d'acides gras, d'esters et de terpénols et des concentrations réduites en thiols volatils par rapport aux mono-cultures.

La composition et l'évolution des communautés levuriennes avant et au cours de la fermentation alcoolique peuvent donc être déterminante dans les caractéristiques organoleptiques des vins produits. Comme nous l'avons vu les origines et les facteurs influençant ces communautés sont extrêmement diverses et de nombreuses connaissances sont encore nécessaires afin de comprendre comment chacun de ces paramètres peut se répercuter sur la qualité du vin final.

3 Les méthodes d'analyses en écologie microbienne

L'analyse des populations fongiques dans différents environnements peut se faire selon plusieurs objectifs : quantification des populations présentes, détection de populations spécifiques, identification des genres, des espèces voire des souches présentes dans le consortium microbien. Cette analyse s'appuie donc sur différentes méthodes avec une approche culture dépendante ou non, moléculaire ou non (Fig. 6) dont le choix dépend de l'objectif recherché dans l'étude. Les différentes méthodes aujourd'hui disponibles présentent

des avantages et des limites inhérentes à l'approche choisie ou particulière à la méthode elle-même. Plusieurs types de données peuvent être obtenus lors de l'étude d'une communauté comme sa taille et la diversité fonctionnelle ou taxonomique des populations (à plusieurs niveaux de résolution). Le tableau 1 récapitule les principales caractéristiques des méthodes présentées ci-dessous.

3.1 Quantification des populations présentes dans un échantillon

La plupart des études utilisent la mise en culture sur milieux standards ou sélectifs pour déterminer les populations cultivables présentes dans un échantillon. Ces dénombrements reposent sur le principe qu'un microorganisme, après incubation, génère une colonie repérable macroscopiquement. Néanmoins, les microorganismes peuvent exister sous la forme de groupements d'individus qui pourtant ne formeront qu'une seule colonie. Ainsi, les résultats de dénombrements seront exprimés en Unité Formant Colonie (UFC) et non en nombre de cellules. Staley et Konopka (1985) parlent de 'great plate count anomaly' pour décrire le vaste écart fréquemment observé entre le nombre de cellules présentes dans un échantillon et le nombre de colonies formées sur les milieux standards. Certains auteurs utilisent aussi la méthode du nombre le plus probable (standard ou optimisée en plaque) pour estimer les populations présentes (Watanabe et al., 2010). Différentes stratégies visant à diminuer l'écart entre les conditions *in vivo* et *in vitro* ont été développées et ce notamment vis-à-vis des bactéries marines ou du sol : dilution des cultures, temps d'incubation, ajout de molécule signal cellule/cellule, chambre de diffusion... (Button et al., 1993 ; Bruns et al., 2002 ; Kaeberlein et al., 2002 ; Rappé et al., 2002 ; Sait et al., 2002 ; Cho et Giovannoni, 2004 ; Stevenson et al., 2004). Cependant malgré toutes ces stratégies qui ont permis d'accéder à des microorganismes qui n'avaient jamais pu être cultivés, un milieu de culture peut difficilement reproduire l'ensemble des conditions auxquelles est soumis un microorganisme dans un environnement complexe (Davis et al., 2005). Par ailleurs, toutes ces méthodes dites culture dépendantes donnent uniquement accès aux populations cultivables sur le ou les milieux choisis pour l'étude.

Afin de s'affranchir des problèmes liés aux étapes de culture, un comptage direct par microscopie optique, par cytométrie de flux ou par mesure de l'ATP peut aussi être utilisé (Jarvis et al., 1983). De même, l'utilisation de la PCR quantitative (qPCR) permet le dénombrement de populations fongiques présentes dans un environnement. Ainsi, Bleve et al. (2003) ont utilisé, après extraction de l'ADN, des amorces universelles permettant

Tableau 1. Récapitulatif des principales propriétés des méthodes de détection, d'identification et de discrimination

Méthode	Culture dépendante	Niveau de résolution taxonomique	Discrimination des souches	Quantitative	Semi-quantitative	Qualitative	Références
FISH / CISH	Non	Détection Espèce ou souche		✓			Cocolin et al., 2004
qPCR	Non	Détection Espèce ou souche		✓			Phister et Mills, 2003
RISA / ARISA	Non	Identification partielle[a]	Non			✓	Pancher et al., 2012
T-RFLP	Non	Espèce	Non			✓	Bokulich et al., 2011
SSCP	Non	Espèce	Non			✓	Martins et al., 2014
DGGE / TGGE	Non	Espèce	Non			✓	David et al., 2014
Illumina	Non	Famille	Non		✓		Mayo et al., 2014
Pyrosequençage	Non	Genre	Non		✓		Taylor et al., 2014
PCR-RFLP	Oui	Espèce	Non		✓		Esteve zarzoso et al.,1999
AFLP	Oui	Espèce	Oui		✓		De Barros Lopes et al., 1999
REP-PCR	Oui	Espèce	Non		✓		Hierro et al., 2006b
Spectroscopie IR-TF	Oui	Espèce	Oui		✓		Oelofse et al., 2010
MALDI-TOF-MS	Oui	Espèce	Non		✓		Kántor et Kačániová, 2015
MLST	Oui	Espèce	Oui		✓		Ayoub et al., 2006
RAPD	Oui	Pas d'identification[b]	Oui		✓		El-fiky et al., 2012
ISSR-PCR	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Andrade et al., 2006
URP-PCR	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Pathania et al., 2010
ISS-PCR	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Hierro et al., 2004
ERIC-PCR	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Hierro et al., 2006b
mtDNA-RFLP	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Martorell et al., 2006
Caryotypage	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Esteve-Zarzoso et al., 2001
REA-PFGE	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Renault et al., 2009
Microsatellites	Oui	Pas d'identification	Oui		✓		Masneuf et al., 2015
PCR-delta	Oui	Pas d'identification	Oui (*S. cerevisiae*)		✓		Legras et al., 2003

a : Difficulté de faire correspondre les profils obtenus avec les espèces présentes dans l'échantillon

b : Ces méthodes permettent de discriminer les souches mais ne fournissent généralement pas de profils spécifiques pour l'identification des espèces.

l'amplification du gène Actb présent chez l'ensemble des champignons et codant l'actine. En utilisant la reverse transcriptase qPCR (RT-qPCR), Bleve et al. (2003) ne détectent que les populations vivantes (cultivables ou viables non cultivables) alors qu'en qPCR toutes les populations vivantes et mortes sont dénombrées. Hierro et al. (2006a) ont dénombré uniquement les levures vivantes du vin par RT-qPCR à l'aide d'amorces ciblant la région D1/D2 du gène 26S rDNA. Une autre possibilité est l'utilisation en qPCR des mêmes amorces mais après un prétraitement à l'éthidium monoazide ou au propidium monoazide, molécules capables de pénétrer uniquement les cellules mortes et ainsi de se lier à l'ADN pour permettre sa précipitation et donc son élimination avant l'étape d'amplification (Andorrà et al., 2010b).

Ces 2 techniques (qPCR ou RT-qPCR) permettent un dénombrement fongique rapide et sans étape de culture mais ne semblent pas adaptées pour détecter des populations inférieures à 10^3 UFC/mL que ce soit en moût ou en vin pour la qPCR (Andorrà et al., 2010b) ou pour la RT-qPCR dans des yaourts contaminés artificiellement (Bleve et al., 2003).

3.2 Détection et quantification d'espèces spécifiques au sein d'un consortium microbien

Au-delà du nombre de microorganismes présents dans un échantillon, il apparaît parfois nécessaire de détecter plus spécifiquement un genre et/ou une espèce particulière. En œnologie, ceci concerne des microorganismes d'intérêt comme *Saccharomyces cerevisiae*, principale espèce impliquée dans la fermentation alcoolique, ou des levures non-*Saccharomyces* intéressantes par exemple pour leur capacité à produire des composés d'arôme recherchés (Sadoudi et al., 2012). Mais cela peut concerner aussi la recherche de la présence ou non dans les échantillons, d'espèces responsables d'altération sur les baies de raisin comme *Aspergillus* spp., *Penicillium expansum* (La Guerche et al., 2005) ou de déviations organoleptiques en vin comme par exemple *Zygosaccharomyces bailii* et *Brettanomyces bruxellensis* (Serpaggi et al., 2012). Des milieux de culture spécifiques peuvent alors être nécessaires. C'est le cas notamment pour l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* pour laquelle un milieu a été mis au point, enrichi en précurseurs des phénols volatils synthétisés par cette levure (Gerbaux et al., 2000). Mais cette méthode présente l'inconvénient majeur de devoir attendre au moins une semaine pour avoir des colonies ; la détection de la levure est donc trop longue et ne permet pas au vinificateur d'avoir une réaction rapide et efficace d'élimination de cette flore. Par ailleurs, la mise en évidence chez cette levure d'un état viable mais non cultivable a incité les chercheurs à trouver des méthodes de détection non basées sur la cultivabilité des cellules (Millet et Lonvaud-Funel, 2000 ; Serpaggi et al., 2012).

Ainsi, des techniques d'hybridation à l'aide de sondes spécifiques ont été mises au point. Si les sondes hybridées sont marquées avec un marqueur fluorescent ou chimioluminescent, les microorganismes ciblés peuvent être directement visualisés *in situ*. On parle des méthodes FISH pour l'hybridation fluorescente *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridization) et CISH pour l'hybridation chromogénique *in situ* (Chromogenic *In Situ* Hybrydization). Certains auteurs ont ainsi utilisé des sondes spécifiques marquées avec la digoxigénine pour détecter *B. bruxellensis* dans le vin (Cocolin et al., 2004) ou une souche particulière de *Candida* fructophile non cultivable (Mills et al., 2002) par hybridation slot blot de l'ARN. Ces 2 techniques, FISH et CISH, ont notamment été utilisées pour des détections spécifiques de *Aureobasidium pullulans, Brettanomyces bruxellensis, Candida glabrata, Candida parapsilosis, Candida stellata, Debaryomyces hansenii, Hanseniaspora uvarum, Pichia anomala, Pichia membranaefaciens, Rhodotorula glutinis, Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces baillii* (Stender et al., 2001 ; Andrews et al, 2002 ; Xufre et al., 2006 ; Röder et al., 2007 ; Connell et al., 2002 ; Perry-O'Keefe et al., 2001 ; Kosse et al., 1997 ; Spears et al., 1999). La combinaison de la méthode FISH avec la détection par cytométrie en flux a permis de détecter et de quantifier en milieu vin spécifiquement *B. bruxellensis* (Serpaggi et al., 2010).

D'autres techniques utilisent des amorces complémentaires de séquences nucléotidiques spécifiques des organismes étudiés. Ces amorces peuvent être utilisées en PCR pour la détection d'une espèce spécifique au sein d'un consortium (Sancho et al., 2000) ou en PCR multiplex pour la détection simultanée de plusieurs espèces comme *Saccharomyces bayanus Saccharomyces cerevisiae*, et leurs hybrides (Torriani et al., 2004) ainsi qu'en RT-PCR pour la détection des espèces vivantes comme *Candida krusei* (Casey et Dobson, 2003) ou *Saccharomyces cerevisiae* et *S. bayanus/S. pastorianus* (Josepa et al., 2000). Des amorces spécifiques peuvent également être utilisées en qPCR permettant non seulement de détecter les espèces présentes mais aussi d'évaluer le nombre de microorganismes pour chacune des espèces étudiées. La détection et la quantification de l'espèce *B. bruxellensis* dans le vin ont ainsi été réalisées par différents auteurs (Phister et Mills, 2003 ; Delalerche et al., 2004). Cette méthode a également été utilisée par Hierro et al. (2007) pour suivre l'évolution de *S. cerevisiae* et du genre *Hanseniaspo*ra au cours de la fermentation alcoolique. Un suivi au cours de la fermentation a également été réalisé en utilisant des amorces d'oligonucléotides spécifiques de non-*Saccharomyces* rencontrées en œnologie (*Candida zemplinina, Hanseniaspo*ra spp., *Issatchenkia orientalis, Metschnikowia pulcherimma, Saccharomyces* spp. et de *Torulaspora delbrueckii*) (Zott et al., 2010). La méthode qPCR semble en effet très adaptée pour le suivi

d'une espèce en particulier, avec pour certaines espèces un seuil de détection extrêmement bas de l'ordre de 10 cellules/mL. Cependant pour le suivi d'un grand nombre d'espèces, cette méthode est trop longue et trop coûteuse.

3.3 Caractérisation de la population microbienne totale

Il est important non seulement de quantifier les populations présentes dans un échantillon mais aussi de pouvoir les caractériser. En effet, les études de biodiversité peuvent avoir des objectifs différents : (i) avoir une vue d'ensemble de toutes les populations présentes, (ii) mettre en évidence des populations particulières (d'intérêt ou d'altération) ou (iii) sélectionner certaines populations dans le but d'études physiologiques… Un grand nombre de méthodes analytiques existent. Le choix de la méthode se réalise en fonction des populations microbiennes à étudier et selon les objectifs recherchés par le scientifique.

3.3.1 Méthodes globales/Caractérisation directe

Afin d'avoir une vision globale des communautés microbiennes, des méthodes basées sur le principe d'empreintes moléculaires de ces communautés et plus récemment sur la métagénomique ont été développées. Ces méthodes sont toutes cultures-indépendantes et permettent donc de ne pas exclure les microorganismes viables mais non cultivables (VNC). Par contre, elles tendent à surestimer les populations en détectant aussi les cellules mortes. Ces méthodes nécessitent des étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN pouvant entraîner certains biais. Lors de l'extraction directe de l'ADN total à partir d'un échantillon, l'efficacité de la lyse cellulaire va être déterminante pour la représentativité de l'ADN extrait par rapport aux populations présentes dans l'échantillon. En effet, l'efficacité de la lyse cellulaire varie fortement en fonction du protocole utilisé mais aussi des espèces de microorganismes présents. Par exemple, Karakousis et al. (2006) mettent en évidence cette différence d'extractibilité pour les espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus, Altenaria* spp,, *Penicillium chrysogenum*, *Bipolaris australiensis* et *Candida albicans*. Un protocole non adapté pourrait donc conduire à une sous-estimation de certaines populations. Par ailleurs, un protocole d'extraction trop sévère pourrait conduire à une altération de l'ADN et empêcher l'obtention de séquences amplifiées de qualité (Wintzingerode et al., 1997). Lors de l'extraction d'ADN à partir d'échantillons environnementaux, il y a une forte probabilité d'extraire en même temps des inhibiteurs de PCR (polyphénols, acides humiques, polysaccharides, …). Ces composés peuvent être éliminés suite à des étapes de purification qui peuvent alors entraîner une perte de l'ADN extrait. Des protocoles d'extraction avec l'ajout de fortes concentrations en NaCl pour éliminer les polysaccharides et l'utilisation de la polyvinylpyrrolidone (PVP) pour éliminer les polyphénols

ont été développés (Porebski et al., 1997). Lors de l'amplification, l'utilisation de la sérum albumine bovine (BSA) ou de la T4 Gene 32 protéine permet de limiter l'effet inhibiteur de certains composés comme les acides humiques lors de l'étape d'amplification (Kreader, 1996).

Au cours de l'amplification, il peut y avoir une amplification préférentielle de certaines séquences par rapport à d'autres. En effet, des ratios importants au niveau de l'abondance des séquences peuvent limiter l'amplification des séquences les plus présentes en faveur des séquences les moins présentes dans l'échantillon (Suzuki et Giovannoni, 1996) conduisant à une conclusion erronée concernant le ratio des populations dans l'échantillon de départ. Par ailleurs, un fort pourcentage de GC entraine une résistance plus importante de la séquence à la dénaturation et diminue de ce fait le taux d'amplification (Head et al., 1998 ; Polz et Cavanaugh, 1998). Enfin, des erreurs lors des étapes d'élongation peuvent conduire à la formation de « chimères » ou d'hétéroduplex rendant difficile ou impossible une attribution taxonomique à partir de la séquence obtenue (Muyzer, 1999).

3.3.1.1 Empreintes moléculaires

Le principe des techniques à empreintes moléculaires est d'évaluer la diversité des populations présentes dans un échantillon en se basant sur la variabilité taxonomique d'une séquence cible de l'ADN. Les méthodes vont essentiellement varier par leur principe de séparation de l'ADN basée soit sur la taille des fragments amplifiés, soit sur leur constitution ou leur conformation secondaire.

La technique **RISA** (rRNA Intergenic Spacer Analysis) se base sur la grande variabilité de taille des espaces inter-transcrits (ITS) ou des espaces inter-géniques (IGS) correspondant aux espaces externes (ETS) transcrits et aux régions non-transcrites (NTS) de l'ADN ribosomique (Fig. 7). Il est possible également d'utiliser l'**ARISA** (Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis), basée sur le même principe. L'amplification est réalisée à l'aide d'amorces dont l'une est couplée à un fluorochrome pour une détection par électrophorèse capillaire permettant d'obtenir une différentiation plus précise de la taille des fragments. L'automatisation permet d'étudier rapidement l'ensemble des communautés fongiques d'un échantillon. Cette technique a notamment été utilisée pour étudier les communautés fongiques endophytes de la vigne (Pancher et al., 2012). Plusieurs espèces peuvent cependant avoir des régions IGS ou ITS de taille identique (Horton, 2002) et certaines espèces peuvent présenter plusieurs copies de tailles différentes (Avis et al., 2006). La relation directe entre les profils obtenus par RISA ou ARISA et les espèces présentes ne peut donc pas être obtenue systématiquement.

La **T-RFLP** (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) est également basée sur la séparation des fragments selon leur taille. Cependant il s'agit des fragments terminaux de la séquence obtenue après amplification puis digestion par des enzymes de restriction d'une région cible de l'ADN. Les fragments obtenus varient en fonction de la composition de la séquence initiale et non uniquement de leur taille. Ces fragments terminaux, amplifiés avec une amorce marquée en 5', sont visualisables sous forme d'un électrophorégramme où le positionnement des pics représente les différentes tailles des fragments et la hauteur des pics la proportion des fragments dans l'échantillon analysé. La précision de la méthode dépend de la variabilité taxonomique de la séquence amplifiée et des enzymes de restriction utilisées. De plus la présence de la variation intragénomique de l'ADN ribosomique peut lorsque cette région est celle ciblée conduire à l'obtention de plusieurs pics pour une seule espèce (Avis et al., 2006). Cette technique a notamment été utilisée pour caractériser les communautés de levures durant la fermentation alcoolique (Bokulich et al., 2011).

La **SSCP** (Single-Strand Conformation Polymorphism) consiste en une séparation par électrophorèse d'ADN simples brins en fonction de leur conformation tridimensionnelle. Cette conformation résultant d'appariements internes va varier en fonction de la composition de la séquence nucléotidique. Cette technique, qui peut être automatisée (CE-SSCP), permet la détection de variations génétiques affectant un seul nucléotide et peut donc fournir plusieurs bandes pour une seule espèce si le gène ou la séquence cible sont présents plusieurs fois dans le génome sans être identiques. De plus trois bandes correspondants aux doubles brins non dénaturés, simples brins Watson et simples brins Crick sont généralement obtenus pour chaque espèce (Schwieger et Tebbe, 1998). L'utilisation d'une amorce phosphorylée à l'extrémité 5' lors de l'amplification permettra d'obtenir un ADN double brin avec un brin phosphorylé. Ce brin peut ensuite être éliminé par un traitement avec l'exonucléase lambda conduisant à l'obtention d'un ADN simple brin sans possibilité de ré-appariement et donc à la diminution du nombre de bandes par microorganisme. La dynamique des populations levuriennes colonisant la baie de raisin au cours du processus de maturation a été étudiée par SSCP (Martins et al., 2014).

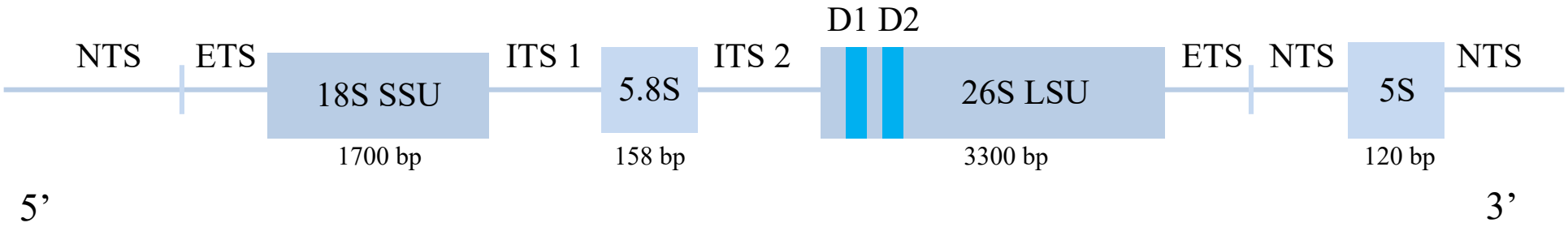


Figure 7. Organisation des différentes sous-parties de l’ADN ribosomique des levures.
NTS : non-transcribed spacer, **ITS** : internal transcribed spacer, **ETS :** external transcribed spacer, **SSU :** small sub-unity, **LSU :** large sub-unity.
D’après T. Deak , (2007), Handbook of Food Spoilage Yeasts, Second Edition

La **DGGE** *(*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la **TGGE** (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) sont deux techniques basées sur la migration de fragments d'ADN en conditions dénaturantes entraînant une séparation progressive des brins. La dénaturation peut être faite en fonction d'un gradient chimique utilisant le formamide ou l'urée (DGGE) ou d'un gradient de température (TGGE). La mobilité du fragment d'ADN dans le gel d'acrylamide dépend de son degré de dénaturation. Une molécule double brin ou complètement dénaturée a une forte mobilité électrophorétique alors qu'une molécule partiellement dénaturée possède une mobilité beaucoup plus faible. Grâce au gradient chimique ou de température, la dénaturation va être progressive et plus ou moins rapide en fonction du pourcentage de GC de la séquence. Ainsi un fragment d'ADN riche en GC se dénaturera moins vite et migrera donc plus loin qu'un brin pauvre en GC. Afin d'éviter la dénaturation totale des produits PCR et par conséquence leur élution du gel, une structure à très haute température de fusion, le «GC clamp » est associée à l'ADN lors de l'amplification (Myers et al., 1985). Ces deux méthodes permettent donc d'obtenir des profils en fonction du pourcentage en GC des fragments amplifiés. Elles sont très sensibles et permettent de distinguer deux fragments divergents d'une seule paire de bases (Muyzer, 1999). Chaque bande obtenue correspond théoriquement à une seule espèce. Il est donc possible d'identifier les micro-organismes présents dans un échantillon donné en comparant le profil obtenu aux profils d'espèces connues et utilisés comme référence. L'identification peut également être réalisée par séquençage après excission de la bande et purification. Ces deux techniques sont longues et fastidieuses à mettre en œuvre et ne permettent pas d'étudier les séquences très riches en GC (Wu et al., 1999) et les écosystèmes très complexes. En effet ces méthodes ne permettent pas la détection des espèces minoritaires surtout si certaines espèces majoritaires représentent un nombre de microorganismes 100 fois plus important (Prakitchaiwattana, Fleet and Heard 2004). Néanmoins la DGGE et dans une moindre mesure la TGGE ont été utilisées pour l'étude des populations de levures présentes sur baies de raisin, dans le moût de raisin et le vin (Hernán-Gómez et al., 2000 ; Prakitchaiwattana et al., 2004 ; Nisiotou et al. 2007 ; Renouf et al., 2007 ; Urso et al., 2008 ; Milanovic et al., 2013 ; David et al., 2014) ainsi que des communautés fongiques présentes à la surface de baies de raisins (Doaré-Lebrun et al., 2006 ; Laforgue et al., 2009).

3.3.1.2 Approches métagénomiques

Compte tenu des limites présentées par les techniques d'empreintes moléculaires et grâce au développement des techniques de séquençage de seconde génération, des méthodes d'analyses des populations basées sur une approche métagénomique ont été développées. Elles reposent

sur le séquençage massif de fragments d'ADN lus par un processus de « lavage/lecture » durant lequel se succèdent des étapes d'incorporation des nucléotides marqués, de lavage des nucléotides non incorporés et de lectures. L'efficacité de ces étapes n'étant pas de 100%, une partie des lectures devient plus asynchrone à l'ajout de chaque base provoquant une augmentation des erreurs au fur et à mesure que le séquençage se prolonge. Ceci limite donc la longueur maximale des séquences fiables obtenues (Mashayekhi et Ronaghi, 2007). Néanmoins toutes les techniques de séquençage de seconde génération permettent d'obtenir plusieurs milliers de séquences pour chaque échantillon analysé et ainsi d'avoir un taux de recouvrement des populations présentes assez élevé. Des populations trop minoritaires pour être détectées par d'autres méthodes culture dépendante ou culture indépendante peuvent être détectées par une approche métagénomique (David et al., 2014). L'analyse des populations est pseudo-quantitative par comparaison entre le nombre de séquences par « operationnal taxonomic unit » (OTU) et le nombre total de séquences obtenues. De plus l'approche métagénomique permet de prendre en compte la distance phylogénique entre les OTU qui reflète en partie les différences de fonctions métaboliques et de rôles écologiques (Lozupone et Knight, 2005). Cependant la détection d'ADN provenant de cellules déjà mortes peut conduire à une surestimation de certaines populations. Comme pour la qPCR, l'utilisation d'éthidium monoazide ou de propidium monoazide peut empêcher l'amplification de l'ADN issu des cellules mortes (Nocker et al., 2010).

La région choisie du génome pour l'étude doit être ubiquitaire dans la communauté étudiée et présenter une variabilité taxonomique suffisante pour permettre une identification précise (Valente et al., 1999 ; Peterson et Kurtzman, 1991). Pour les communautés fongiques, les portions du génome ciblées sont généralement les régions 18S et/ou ITS de l'ADN ribosomique. Cependant la variabilité du nombre de copies et la variabilité intragénomique de l'ADN ribosomique (Ganley et Kobayashi, 2007 ; Simon et Weiss, 2008 ; Thornhill et al., 2007) peuvent conduire à une surestimation de la biodiversité ou à des erreurs concernant la proportions de certaines populations.

Les deux techniques de séquençage utilisées couramment pour la caractérisation des communautés fongiques sont le pyroséquençage haut débit développé par la société "454 Life Sciences" (Connecticut USA) (Margulies et al., 2005) et la technique de séquençage Illumina (Bennett, 2004). Pour le pyroséquençage (Fig. 8), après une première étape d'amplification de la région d'intérêt, une seconde étape est réalisée permettant la fixation (i) de séquences d'identification pour chaque échantillon (le séquençage de 30 à 50 échantillons en simultané

pour un seul run nécessite la présence de ces séquences pour savoir à quel échantillon appartient chacune des séquences obtenues) et (ii) d'adaptateurs permettant la fixation des fragments sur des billes. Les fragments sont ensuite placés en conditions favorisant la fixation d'un seul fragment par bille (loi des grands nombres) et une PCR en émulsion est réalisée pour obtenir plusieurs millions de copies d'un même fragment sur chaque bille. Les billes (une bille par puits) sont ensuite placées dans les puits d'une plaque (plusieurs centaines de milliers de puits) pour l'étape de séquençage puis des microbilles, sur lesquelles sont fixées les enzymes nécessaires à la création du signal de visualisation, sont ajoutées. Lors du séquençage, les nucléotides sont ajoutés un par un dans le milieu réactionnel. Lorsque qu'un nucléotide complémentaire de celui présent sur le brin lu est ajouté, il est incorporé au brin en cours de synthèse et libère un pyrophosphate. Une ATP sulfurylase utilise ce pyrophosphate pour former un ATP qui est utilisé à son tour par une luciférase pour oxyder une luciférine. Cette réaction conduit à la production d'oxyluciférine et donc d'un signal lumineux (une apyrase dégrade les nucléotides en surplus). Ce signal lumineux est détecté par une caméra et traduit en chromatogramme (Rothberg et Leamon, 2008). Le pyroséquençage a récemment été utilisé pour la caractérisation des populations fongiques sur les feuilles de vigne (Pinto et al., 2014 ; Perazzolli et al., 2014), les grappes (Taylor et al., 2014), dans les moûts et au cours de la FA (David et al., 2014).

La technique Illumina repose sur l'utilisation de nucléotides modifiés porteurs d'un fluorochrome spécifique pour chaque base et d'un terminateur labile. Suite à l'incorporation, le milieu réactionnel est nettoyé pour supprimer les nucléotides non-incorporés en excès. Les fluorochromes sont ensuite excités et leur émission lumineuse est captée par le séquenceur. A la fin de chacun des cycles, le fluorochrome et le terminateur en 3' sont clivés pour que la réaction de séquençage puisse continuer. La technique Illumina dans le domaine du vin a surtout été utilisée pour suivre les changements de populations de l'environnement de la cuverie durant la période des fermentations alcooliques (Bokulich et al., 2013), pour caractériser la biodiversité microbienne des vignobles californiens et les différents facteurs pouvant les influencer (Bokulich et al. 2014) ainsi que pour déterminer l'influence du SO_2 sur la diversité des populations fongiques au cours de la fermentation (Bokulich et al., 2015). La technique Illumina permet d'obtenir un nombre de séquences plus importantes (~ 10^9 séquences sur le Hiseq2000) par rapport au pyroséquençage (~ 10^6 séquences sur le 454 FLX

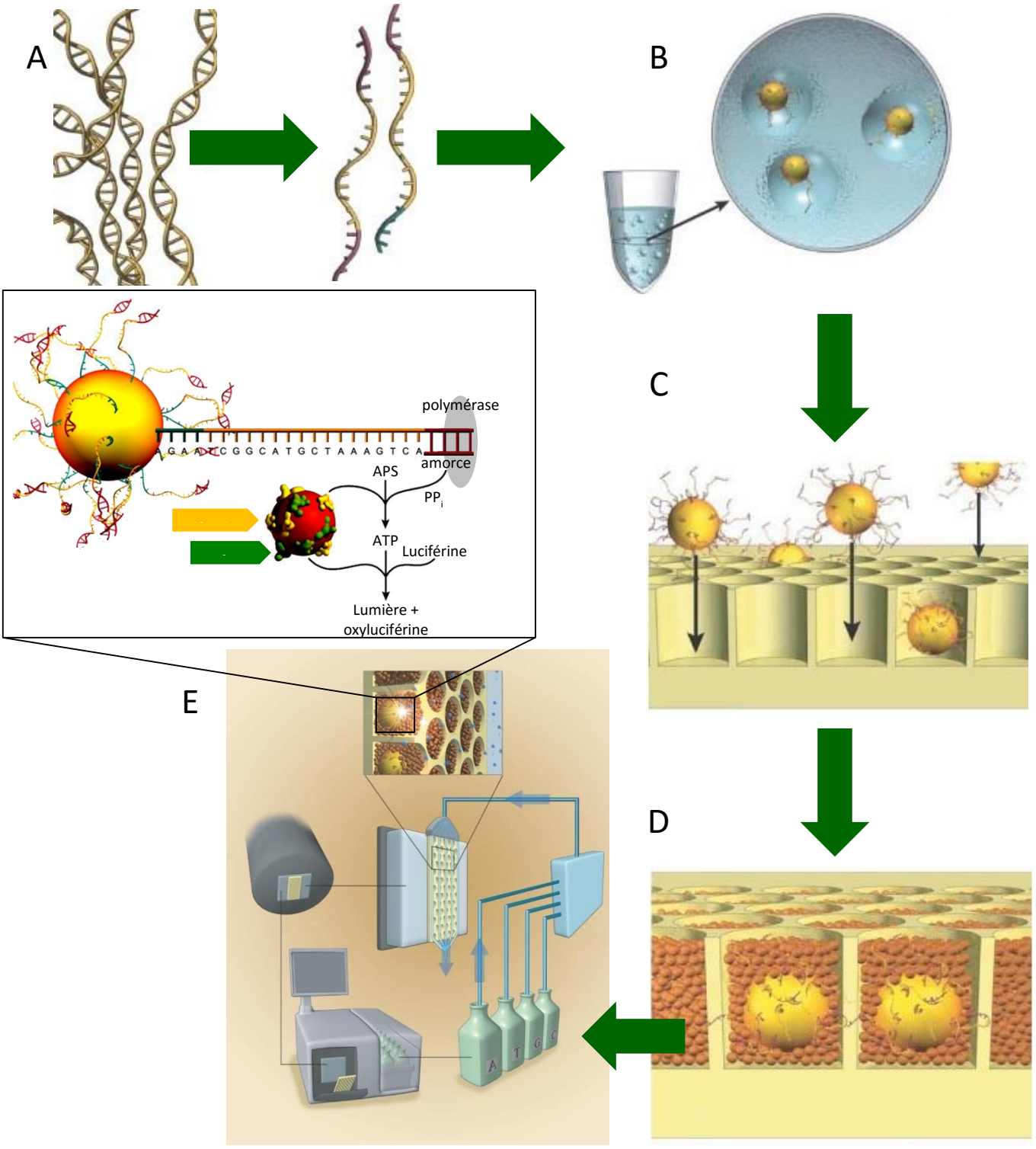


Figure 8. Principe du pyroséquençage.
A) L'ADN génomique est dénaturé et ligaturé à des adaptateurs permettant leur fixation sur des billes. **B**) Les fragments sont liés aux billes dans des conditions favorisant la fixation d'un seul fragment par bille. Une PCR en émulsion (chaque bille est emprisonnée dans un « micro-milieu » aqueux contenant tous les éléments nécessaires à la réalisation d'une PCR) est réalisée permettant d'obtenir des billes portant chacune plusieurs millions d'exemplaires d'un unique fragment d'ADN. **C**) L'émulsion est cassée, les brins d'ADN sont dénaturés, et les billes portant des fragments d'ADN simple brin sont déposés dans les puits d'une plaque en fibres optiques. **D**) Des billes plus petites portant les enzymes nécessaires à la production du signal (sulfurylase et luciférase) sont déposées dans chaque puits. **E**) Les nucléotides sont ajoutés un par un et lorsque le nucléotide correspond à celui présent sur le brin lu, il est incorporé au brin en cours de synthèse et libère un pyrophosphate. Une ATP sulfurylase utilise ce pyrophosphate pour former un ATP qui est utilisé à son tour par une luciférase pour oxyder une luciférine. Cette réaction conduit à la production d'oxyluciférine et donc d'un signal lumineux détecté puis traduit en chromatogramme.
D'après Margulies et al., (2005) et Rotberg et Leamon (2008)

Titanium +). Ce nombre plus important de séquences pour l'Illumina permet d'augmenter le nombre d'échantillons étudiés simultanément et donc de considérablement diminuer le coût par échantillon (Kuczynski et al., 2012). Les séquences obtenues par pyroséquençage sont plus longues (jusqu'à 600 pb) quecelles obtenues par la technique Illumina (150 pb) permettant théoriquement une meilleure résolution taxonomique. Ainsi de nombreuses études utilisant le pyroséquençage identifient les populations présentes au niveau du genre voire de l'espèce alors que les études utilisant l'Illumina n'identifient pas les espèces et rarement les genres (Mayo et al., 2014).

3.3.2 Les méthodes culture-dépendante

L'analyse directe des communautés permet d'obtenir une caractérisation globale des populations présentes dans un écosystème. Cependant ces méthodes ne prennent pas en compte l'activité métabolique des microorganismes ou leur participation au système fonctionnel de l'écosystème. De plus, la résolution taxonomique de la plupart de ces méthodes est aujourd'hui encore assez limitée. Les méthodes nécessitant une étape de culture bien que présentant certains biais, déjà abordés dans le paragraphe 3.1, permettent de garder en collection les microorganismes isolés pour des analyses postérieures visant à les caractériser plus précisément au niveau taxonomique et/ou physiologique.

3.3.2.1 Choix de l'ADN cible

L'identification la plus fiable pour un microorganisme est actuellement réalisée par le séquençage d'une partie de son génome. Après amplification et séquençage, la séquence nucléotidique obtenue est comparée à une base de données afin d'obtenir une identification du microorganisme étudié. L'utilisation d'amorces complémentaires de séquences très conservées permet de réaliser l'amplification sur un grand nombre de microorganismes différents. Ainsi peu d'informations préalables sur le microorganisme isolé sont nécessaires. Cependant l'identification précise nécessite une variabilité des séquences amplifiées en fonction de l'espèce. L'ADN ribosomique avec une alternance de régions conservées et très variables constitue une cible privilégiée pour les techniques d'identification moléculaire (Fig. 7). Les régions conservées se situent au niveau des gènes codant la petite sous-unité 18S, et la grande sous-unité 5.8S, 5S et 26S de l'ADN ribosomique. Les régions variables correspondent aux espaces internes (ITS) et externes (ETS) transcrits ou les régions non-transcrites (NTS) (Fig. 7). Les régions les plus utilisées sont la région 18S, la région 26S et les ITS (Valente et al., 1999 ; Kurtzman, 2003). La région ITS est, parmi ces 3 régions, celle qui présente le plus haut degré de polymorphisme et donc le meilleur niveau de résolution taxonomique. Elle a largement été

utilisée pour l'identification d'espèces levuriennes (James et al., 1996 ; Naumov et al., 2000 ; Cadez et al., 2003) et permet de distinguer des espèces proches comme *Filobasidium elegans et F. floriforme, Hanseniaspora guillermondii* et *H. uvarum, Saccharomyces bayanus et S. pastorianus.* La région 18S est la plus conservée et ne permet généralement pas la différenciation de certaines espèces proches (James et al., 1997 ; Naumov et al., 2000 ; Daniel et Meyer, 2003). La région 26S est historiquement la plus utilisée et pour un large nombre de microorganismes notamment ceux non cultivables ou difficilement cultivables en conditions de laboratoire. De ce fait, malgré une résolution taxonomique plus faible que la région ITS, la région 26S est encore largement utilisée. Les relations phylogénétiques entre les levures *Arxiozyma*, *Candida*, *Eremothecium*, *Hanseniaspor*a, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Pachytichospora*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Tetrapisispora*, *Torulaspora* et *Zygosaccharomyces*, ont été établies à partir de la divergence dans les différentes parties de l'ADNr (18S, 26S, ITS), des gènes nucléaires de copie unique (facteur élongation de la traduction de l'actine-1, l'ARN polymérase II) et des gènes mitochondriaux (petite sous-unité d'ADNr, cytochrome oxydase II) (Daniel et al., 2001 ; Kurtzman et Robnett, 2003 ; Daniel et Meyer, 2003).

3.3.2.2 Les méthodes moléculaires

Le séquençage malgré les améliorations apportées par la seconde génération de séquenceurs, reste une méthode longue et coûteuse pour l'identification d'un très grand nombre d'isolats. Ainsi d'autres méthodes moléculaires ont été développées pour détecter cette variabilité des séquences nucléotidiques sans passer par un séquençage. C'est par exemple le cas de la **PCR-RFLP**. Cette technique repose sur l'obtention de profils de restriction de la séquence d'intérêt par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse créant un profil de restriction spécifique pour chaque espèce de levure (Esteve-Zarzoso et al., 1999) ou de moisissures (Diguta et al., 2011). La région ITS de l'ADN ribosomique est, compte tenu de sa forte variabilité inter-espèce et de son degré de conservation intra-espèce, une cible privilégiée pour cette méthode même si la région 26S a également été utilisée (Zanol et al., 2010). Cette méthode largement employée s'appuie sur une large banque de profils de restriction disponibles (Guillamón et al., 1998 ; Esteve-Zarzoso et al., 1999 ; Granchi et al., 1999 ; Sabate et al., 2002 ; de Llanos Frutos et al., 2004 ; Solieri et al., 2006 ; Nisiotou et al., 2007 ; Nisiotou et Nichas, 2007 ; Valles et al., 2007 ; Barata et al., 2008 ; Tofalo et al., 2009 ; Diguta et al., 2011 ; Wang et Liu, 2013) permettant une identification précise et fiable. Néanmoins la PCR-RFLP nécessite l'emploi séparé de plusieurs enzymes de restriction

pour différencier certaines espèces très proches. Par exemple il est nécessaire d'utiliser l'endonucléase *Mbo*I pour différencier les espèces *Candida stellatta* et *Starmerella bacillaris* (synonyme *Candida zemplinina*) (Sipiczki, 2004) et l'enzyme *DdeI* pour différentier les espèces du genre *Hanseniaspora* (*H . guilliermondii, H. osmophila, H. uvarum* et *H. valbyensis*) (Esteve-Zarzoso et al., 1999) et certaines espèces comme *Metschnikowia pulcherrima* et *Metschnikowia fructicola* ne peuvent pas être discriminées par cette méthode.

Compte tenu des limites énoncées pour la technique PCR-RFLP, il est possible de faire appel à d'autres techniques permettant de visualiser les variations entre espèces intervenant sur l'ensemble du génome. La technique **AFLP** (Amplification Fragment Length Polymorphism) est une technique basée à la fois sur une digestion enzymatique des fragments d'ADN mais aussi sur des étapes d'amplification spécifique. La méthode se déroule en trois étapes i) une digestion de l'ADN total par une ou plusieurs enzymes de restriction suivie d'une ligation d'adaptateurs aux extrémités cohésives des fragments de restriction, ii) des amplifications spécifiques de certains fragments avec des amorces complémentaires des adaptateurs et des sites de restriction et iii) une séparation des fragments amplifiés par électrophorèse (Vos et al., 1995). Ces différentes étapes permettent d'obtenir des profils très complexes mais suffisamment similaires entre différents microorganismes d'une espèce donnée pour aboutir à une identification par comparaison avec des profils de souches de référence (de Barros Lopes et al., 1999). Cependant les nombreuses étapes rendent cette méthode longue et très couteuse à mettre en place sur un grand nombre de microorganismes (Benito, 2005).

La **REP-PCR** (Repetitive Extragenic Palindromic) est une méthode beaucoup plus simple et rapide à mettre en place. Cette technique repose sur l'utilisation d'amorces ciblant des éléments palindromiques répétitifs extra géniques, séparant les zones codantes sur le génome (Versalovic et al., 1991). Les fragments amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse et le profil d'amplification obtenu permet de différencier les différentes espèces de levures (Hierro et al., 2006b ; Olstorpe et al., 2008). Cependant cette technique présente des problèmes de répétabilité assez importants (Hierro et al., 2006b).

3.3.2.3 Les méthodes non moléculaires

Les méthodes d'identification des microorganismes ont longtemps reposées uniquement sur des critères phénotypiques puisque les approches génétiques n'étaient pas disponibles. Les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques des levures ou moisissures isolées étaient alors comparées à celles décrites pour les genres et espèces connues afin d'obtenir une

identification. Cependant il était généralement nécessaire de réaliser une centaine de tests pour obtenir une identification fiable (Barnett et al., 2000 ; Kurtzman et al., 2011) rendant ces méthodes particulièrement longues et fastidieuses.

Il existe aujourd'hui des méthodes non-moléculaires permettant une identification rapide, précise et fiable, avec un coût par échantillon très faible (Sow et al., 2015). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (**IR-TF)** ou la spectrométrie de masse (**MS**) couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (**MALDI)** et un analyseur à temps de vol **(TOF)** sont deux méthodes basées sur la mesure d'un spectre obtenu par ionisation ou irradiation. Ce spectre peut être assimilé à une empreinte phénotypique permettant par comparaison avec une base de données l'identification des microorganismes à différents niveaux taxonomiques. Les deux techniques nécessitent une normalisation des cultures pour éviter les effets liés aux différences des conditions de croissance. La technique MALDI-TOF est une méthode d'ionisation douce permettant la désorption des peptides et des protéines à partir de cellules entières des microorganismes cultivés. Les ions sont séparés et détectés selon leur masse moléculaire et leur charge par spectrométrie de masse. Le spectre mesuré correspond à la composition en protéines de la paroi cellulaire. Cette méthode permet une identification très fiable pour de nombreuses espèces de levures et de bactéries (Relloso et al., 2015). La technique MALDI-TOF MS a notamment été utilisée pour l'identification de levures d'intérêt médical (Marklein et al., 2009 ; Stevenson et al., 2010 ; Sow et al., 2015) mais aussi pour l'identification des levures présentes sur baies de raisin (Kántor et Kačániová, 2015).

La technique IR-TF est une technique qui détecte les vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. Le spectre d'absorption obtenu permet ainsi de caractériser la composition chimique d'un échantillon complexe (Lee et al., 1986). Concernant l'identification des microorganismes, la méthode repose sur l'irradiation des microorganismes par une lumière infra-rouge à différentes longueurs d'ondes. Les différents composants de la cellule (protéines, acides gras, polysaccharides,…) absorbent la lumière, produisant ainsi un profil spécifique d'absorption. La comparaison du profil obtenu avec une base de données appropriée permet, par le calcul de la distance entre les spectres basée sur le coefficient de corrélation de Pearson, d'obtenir une liste des spectres les plus similaires et, selon le microorganisme étudié, l'identification au niveau du genre et/ou de l'espèce (Naumann et al., 1991 ; Wenning et al., 2002) (Fig. 9). Cette technique a notamment été appliquée i) à l'identification de levures d'intérêt alimentaire (Kümmerle et al., 1998) ii) à la différenciation de plusieurs espèces de levures pathogènes appartenant au genre *Candida* (Schmalreck et al., 1998 ; Sandt et al., 2006 ; Toubas et al., 2007) iii) à la

différenciation et l'identification des espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* présentes dans l'air (Fischer et al., 2006) et iv) à l'identification d'espèces de champignons responsables d'altération de produits alimentaires (Shapaval et al., 2012). Cette technique nécessite de comparer les spectres obtenus avec une base de données contenant l'ensemble des espèces susceptibles d'être présentes dans l'environnement étudié. La composition des parois des microorganismes étant très dépendante des conditions de culture, il est souvent nécessaire que la base de données soit créée pour chaque laboratoire si les conditions de culture ne sont pas strictement les mêmes.

3.4 Discrimination intra-spécifique

Pour tout environnement étudié (médical, agroalimentaire, environnemental…), il apparaît très souvent nécessaire que la caractérisation des microorganismes se fasse jusqu'au niveau de la souche. En effet, beaucoup de caractéristiques (résistance, métabolites d'intérêt ou non) sont espèces mais aussi souches-dépendantes.

3.4.1 Méthodes moléculaires

La **MLST** (Multilocus Sequence Typing) utilise la séquence nucléotidique de plusieurs gènes pour identifier des microorganismes ; elle est jugée fiable et reproductible (Ayoub et al., 2006 ; Muñoz et al., 2009). En utilisant des régions génétiques présentant un fort taux de polymorphisme, une différenciation des souches est possible. Elle peut être utilisée pour la création d'une base de données pouvant être mise à jour, développée et utilisée par de nombreux laboratoires permettant la comparaison des souches isolées partout dans le monde (Taylor et Fisher, 2003 ; Bougnoux et al., 2004). Néanmoins pour réaliser ces comparaisons, il est nécessaire que les mêmes gènes soient utilisés. De plus les régions permettant une identification fiable et une discrimination précise des souches ne sont pas les mêmes en fonction de l'espèce considérée. Il est donc nécessaire de déterminer pour chaque espèce étudiée, les gènes et les amorces devant être utilisés pour une efficacité maximum. La discrimination des souches d'un certain nombre d'espèces fongiques incluant *Candida albicans* (Bougnoux et al., 2002), *Candida glabrata* (Dodgson et al., 2003), *Candida tropicalis* (Tavanti et al., 2005), *Candida krusei* (Jacobsen et al., 2007), *Candida dubliniensis* (McManus et al., 2008), *Cryptococcus gattii* (Feng et al., 2008), *Cryptococcus neoformans* (Meyer et al., 2009), *Geotrichum candidum* (Alper et al., 2013) et *Saccharomyces cerevisiae* (Ayoub et al., 2006 ; Muñoz et al., 2009) a déjà été réalisée avec cette méthode.

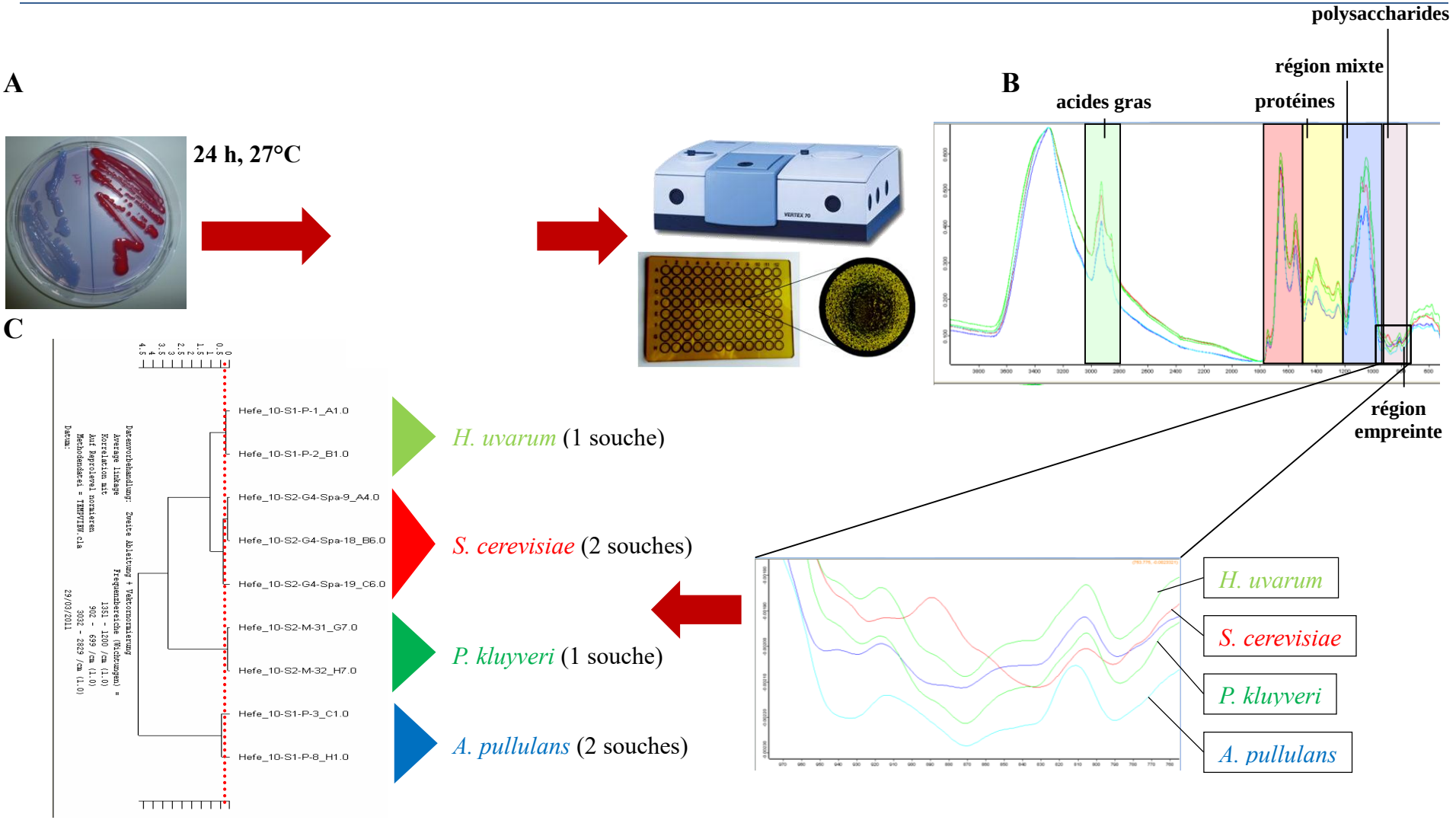


Figure 9. Principe de la spectroscopie IR-TF

A) Standardisation sur milieu YGC-Agar des cultures de microorganismes précédemment isolés. Les cellules sont récoltées avec une öse et resuspendues dans de l'eau déminéralisée puis transférées sur une plaque de séléniure de zinc pour être séchées afin de former un film transparent. **B**) Les infra-rouges moyens (4000-500 longueur d'ondes /cm^2) sont utilisés pour exciter les liaisons moléculaires et un spectre d'absorption peut ainsi être mesuré. Une absorption spécifique est attribuée à plusieurs composants de la cellule (acides gras, protéines, région mixte polysaccharides et une région d'empreinte). Le spectre obtenu pour un microorganisme inconnu peut être comparé à des spectres de référence. La distance mesurée entre les spectres est calculée sur la base du coefficient de Pearson et permet d'obtenir une liste des spectres de référence les plus proches et ainsi une identification au niveau de l'espèce. **C**) La dérivée seconde des spectres est ensuite utilisée pour une analyse de classification hiérarchique basée sur la distance des spectres sur les gammes de fréquences 3032 cm^{-1} à 2829 cm^{-1}, 1351 cm^{-1} à 1200 cm^{-1} et 901 cm^{-1} à 699 cm^{-1}. La classification en sous-groupes est effectuée en définissant une distance spectrale en tant que valeur pour la séparation au niveau de la souche. D'après Kümmerle et al. (1998) et Gerhards et al. (2015)

La **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) est basée sur l'utilisation à basse température (35 à 39°C) d'amorces courtes (8 à 10 nucléotides) permettant l'amplification non spécifique de fragments d'ADN répartis de manière aléatoire sur le génome (Hadrys et al., 1992). Les fragments amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse et les profils obtenus correspondent à des combinaisons entre le nombre et la taille des fragments amplifiés qui permettent une discrimination au niveau de l'espèce voire au niveau de la souche (Cordero-Bueso et al., 2011a ; El-Fiky et al., 2012). Bien que la technique soit rapide et ne nécessite aucune information préalable sur les microorganismes analysés pour comparer les souches, elle présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Le plus important d'entre eux est la difficulté à reproduire les profils obtenus pour une souche spécifique entre laboratoires. Les procédures doivent être normalisées avec soin, puisque de petites variations dans l'extraction de l'ADN ou encore le type de thermocycleur utilisé peuvent changer les profils obtenus. De plus, des différences peuvent aussi être observées au sein d'un même laboratoire (Ivey et Phister, 2011). Compte tenu de ces problèmes de répétabilité, d'autres techniques ont été développées.

Le principe de la **ISSR-PCR** (Inter-Simple Sequence Repeat) consiste en l'amplification des régions placées entre deux séquences répétitives. Les amorces sont donc basées sur une séquence répétitive, telle que (CAA)n, et peuvent posséder une région 3' dégénérée (Bornet *et al.* 2002). Ceci permet l'obtention d'un profil d'amplification basé sur un système de marqueurs multilocus permettant la détection du polymorphisme intraspécifique. Cette technique de typage ne nécessite aucune connaissance préalable de la séquence ADN cible. Plusieurs chercheurs ont démontré que l'analyse ISSR détecte généralement un plus haut degré de polymorphisme que celui détecté par RFLP ou même par RAPD (Nagaoka et Ogihara, 1997 ; Devarumath et al., 2002). Cette technique a été peu utilisée chez les levures, on peut tout de même citer la discrimination de souches de l'espèce *S. cerevisiae* (Andrade et al., 2006 ; El-Assal et al., 2011). Le degré de polymorphisme détecté est variable en fonction des espèces (Andrade et al., 2006). Le niveau de discrimination peut donc être trop faible pour arriver à une discrimination au niveau de la souche pour certaines espèces.

L'URP-PCR (Universal Rice Primer) repose sur l'utilisation d'amorces dont les séquences complémentaires sont présentes en différents endroits du génome pour de nombreux organismes (animaux, bactéries, champignons, levures, plantes) (Kang et al., 2002 ; Jana et al., 2005 ; Aggarwal et al., 2010). Une seule amorce d'environ 20 pb est utilisée pour cette méthode avec une température d'hybridation d'environ 45°C, température supérieure à celles

généralement utilisées pour la technique RAPD. Du fait d'une amorce plus longue et d'une température d'hybridation plus élevée, l'URP-PCR présente un taux de reproductibilité plus important que la RAPD et permet de détecter des variabilités inter et intra-spécifiques avec un niveau de détection du polymorphisme plus élevé que l'ISSR et la RAPD (Sharma et al., 2005). Cependant cette technique ayant encore été peu utilisée pour l'étude des levures (Pathania et al., 2010), peu d'informations sont disponibles sur la précision, la reproductibilité et la fiabilité de cette technique pour ce type de microorganismes.

La méthode **ISS-PCR** (Intron Splice Site) utilise des amorces spécifiques des sites d'épissage des introns afin de cibler des régions très variables du génome (Lopes et al., 1996). Cette technique permet pour certaines espèces de détecter des variabilités intra-spécifiques avec notamment un bon taux de discrimination des souches pour les espèces *Candida boidinii, Candida stellata, Hanseniaspora uvarum, Issatchenkia terricola, Saccharomyces bayanus* et *Zygosaccharomyces rouxii* (Hierro et al., 2004). Cependant pour certaines espèces comme *Dekkera bruxellensis, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Torulaspora delbrueckii* ou *Zygosaccharomyces bailii*, des profils identiques peuvent être obtenus pour plusieurs souches différentes (Hierro et al., 2004). Des profils contradictoires peuvent aussi être obtenus pour une seule et même souche de *Dekkera bruxellensis* (Oelofse et al., 2009).

La méthode **ERIC-PCR** (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) utilise des amorces ciblant des séquences consensus intergéniques répétitives (Sharples et Lloyd, 1990 ; Hulton et al,. 1991). Les fragments amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse et le profil d'amplification obtenu permet de discriminer les souches pour certaines espèces de levures comme *Candida stellata* ou *Issatchenkia terricola* mais pas pour *Hanseniaspora uvarum* (Hierro et al., 2006b).

La technique **AFLP** décrite dans le paragraphe 3.3.2.2 permet l'obtention de profils très complexes permettant d'avoir une conservation des profils suffisante pour identifier l'espèce tout en ayant une variabilité suffisamment importante à l'intérieur des espèces pour discriminer les différentes souches (de Barros Lopes et al., 1999). Néanmoins, cette méthode reste longue et très couteuse à mettre en place sur un grand nombre de microorganismes (Benito, 2005).

La **PCR-delta** utilise des amorces ciblant les éléments delta correspondant à la séquence LTR (Long Terminal Repeat) flanquant les rétro-transposons TY1 et TY2 présents en plusieurs copies dans le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les éléments delta sont présents 300 fois dans le génome de la souche *S. cerevisiae* S288C. Ce nombre très élevé de copies

couplé au changement de position de ces éléments delta en fonction des souches de levures en font de très bons marqueurs du polymorphisme. La méthode a été proposée pour la première fois par Ness et al. (1993). Legras et al. (2003) ont développé de nouvelles amorces permettant de mieux discriminer les différentes souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Bien que plusieurs espèces comme *S. bayanus var. uvarum, S. exiguus* et *S. kluyveri* possèdent des séquences présentant une forte homologie avec les éléments TY1 ou TY2 de *S. cerevisiae,* aucune amplification n'est obtenue pour les éléments delta. Cette méthode semble donc réservée à l'étude des souches de *Saccharomyces cerevisiae* ou d'espèces très proches comme l'espèce *Saccharomyces carlsbergensis*.

La **mtDNA-RFLP** (Restriction Fragments Length Polymorphism of Mitochondrial DNA) est basée sur les différences du pourcentage de GC entre l'ADN nucléaire (40%) et l'ADN mitochondrial (20%). L'utilisation d'enzymes de restriction reconnaissant les régions riches en GC comme *Msp*I, *Hae*III, *Cfo*I conduit pour l'ADN nucléaire à l'obtention de fragments trop courts pour leur détection par électrophorèse alors que ceux obtenus pour l'ADN mitochondrial sont détectables. Le fort taux de polymorphisme de l'ADN mitochondrial permet de discriminer les souches pour des espèces du genre *Saccharomyces* (Querol et al., 1992 ; Sabate et al., 1998) et certaines espèces non-*Saccharomyces* comme *Candida zeylanoides, Debaryomyces hansenii, Debaryomyces polymorphus, Dekkera bruxellensis, Pichia carsonii, Pichia guilliermondii,* et *Yarrowia lipolytica,* (Romano et al., 1996 ; Martorell et al., 2006 ; Andrade et al., 2006). Cette technique est souvent utilisée car elle permet l'analyse d'un grand nombre de souches dans un temps relativement court. C'est une méthode rapide, simple, fiable et économique qui ne nécessite pas de matériel sophistiqué ou de personnel spécialisé (Fernandez-Espinar et al., 2001). Ne nécessitant pas d'amplification de l'ADN, cette technique permet donc d'éviter les problèmes et les biais liés à la PCR. Le polymorphisme de l'ADN mitochondrial n'est cependant, pour certaines espèces comme *Candida parapsilosis, Saccharomyces bayanus* ou *Saccharomyces pastorianus,* pas suffisant pour discriminer les différentes souches (Fernádez-Espinar et al., 2000; Rycovska, 2004).

Le **caryotypage** permet par l'utilisation de techniques d'électrophorèse en champs pulsé, une séparation de l'ADN chromosomique non digéré en fonction de sa taille (Carle et Olson, 1984). En fonction du nombre et de la taille des chromosomes présents pour une souche, un motif de bandes spécifiques peut être obtenu. Cette technique a notamment été utilisée pour le typage de souches de *Hanseniaspora uvarum, Metschnikowia pulcherrima* et *S. cerevisiae* (Schütz et Gafner, 1993 ; Egli et al., 1998 ; Esteve-Zarzoso et al., 2001)). Cependant comme souligné par

plusieurs auteurs, le caryotype permet l'identification des espèces (Carle et Olson, 1985 ; Bidenne et al., 1992 ; Versavaud et al., 1995), mais n'est souvent pas suffisant pour discriminer les souches à l'intérieur d'une espèce (Pedersen, 1986a et b ; Meaden, 1990 ; Boekhout et al., 1993). Certaines études utilisent la **REA-PFGE** c'est-à-dire la comparaison de profils de restriction après digestion de l'ADN chromosomique par des endonucléases reconnaissant des sites faiblement présents dans le génome. Ceci permet d'obtenir un nombre de fragments suffisant pour une meilleure discrimination des souches que celle obtenue par la PFGE et suffisamment faible pour une analyse simple. Cette technique a notamment permis la différentiation de souches de *Brettanomyces bruxellensis* (Miot-Sertier et Lonvaud-Funel, 2007) et de *Torulaspora delbrueckii* (Renault et al., 2009).

La méthode dite des « **microsatellites** » est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides complémentaires des régions flanquantes des séquences répétitives présentes dans l'ADN cible. Elle permet une très bonne discrimination des souches (Legras et al., 2005) et une meilleure reproductibilité que la RAPD car les températures d'hybridation utilisées sont plus élevées (Dalle et al., 2000). Elle a notamment été utilisée pour la différentiation de souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Hennequin et al., 2001 ; Legras et al., 2005, 2007 ; Schuller et al., 2007), *Saccharomyces uvarum* (Masneuf-Pomared et al., 2007 ; Zhang et al., 2015) et plus récemment pour les espèces *Brettanomyces bruxellensis* (Albertin et al., 2014c), *Starmerella bacilllaris* (Masneuf-Pomarede et al., 2015) et *Torulaspora delbrueckii* (Albertin et al., 2014a). La limite de cette méthode est la disponibilité des génomes nécessaires pour le développement des marqueurs microsatellites spécifiques pour chaque espèce étudiée.

3.4.2 Méthodes non moléculaires

Des méthodes non moléculaires ont été utilisées pour le typage des souches. Les plus anciennes s'appuient sur un typage phénotypique ou morphologique, sur le sérotypage, sur le résistogramme (pour exemple, résistance à l'acide borique, à l'arséniate de sodium, au sulfate de cuivre ou à l'acrylamide) ou sur l'assimilation de différents substrats carbonés. Ceci a notamment été développé pour l'espèce *Candida albicans* (Merz et al., 1990 ; Odds et al., 1991). Le biotypage des souches de levures en fonction de leur sensibilité à certaines toxines (KSP : Killer sensitive pattern) a souvent été utilisé pour des souches d'intérêt clinique (Morace et al., 1984 ; Coutinho et Paula, 1998 ; Buzzini et Martini, 2001a, b) mais aussi d'intérêt industriel comme pour des isolats du genre *Saccharomyces* (Vaughan-Martini et al., 1996 ; Buzzini et al., 2004) mais aussi des genres *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* et *Zygosaccharomyces* (Vaughan-Martini et al., 1988 ; Buzzini et Martini, 2000a). Plusieurs

auteurs montrent que les résultats obtenus par la méthode KSP ne sont pas en accord avec ceux obtenus par des méthodes moléculaires comme la mtDNA-RFLP ou la RAPD (Corte et al., 2005 ; Lopes et al., 2006).

Csoma et al. (2010) utilisent une combinaison de méthodes moléculaires (caryotypage, RFLP du gène *MET2* et des régions ITS et NTS de l'ADNr) et physiologiques (fermentation du mélibiose et du mannitol, tolérance aux sucres, au cuivre et à l'éthanol, activité « killer », capacité fermentaire et production de divers métabolites) pour caractériser des souches de *Saccharomyces* au cours de fermentation alcoolique spontanée. Chaque isolat présente un profil unique pour l'ensemble de ces caractéristiques génétique et physiologique. Mais, les résultats de Csoma et al. (2010) montrent également des changements dans le génome des levures au cours de leur reproduction végétative ce qui rend très complexe le typage moléculaire des souches. Les méthodes utilisant les propriétés physiologiques ont de plus l'avantage de fournir non seulement une information taxonomique mais également de nombreuses informations fonctionnelles sur les microorganismes étudiés. Néanmoins ces méthodes sont souvent très lourdes à mettre en place avec la nécessité d'en utiliser plusieurs. De plus l'information taxonomique reste parfois trop imprécise ou trop peu fiable notamment pour des études cherchant à déterminer l'origine des microorganismes trouvés dans l'environnement étudié.

La technique **MALDI-TOF-MS** présentée dans le paragraphe 3.3.2.3 permet pour certaines espèces de discriminer différentes souches car les profils obtenus sont suffisamment proches pour appartenir à la même espèce (que l'on peut identifier par comparaison avec une base de données) mais trop éloignés pour appartenir à la même souche. Ainsi Usbeck et al. (2014) ont pu discriminer plusieurs souches de levures industrielles *Saccharomyces* utilisées en vinification. Bien que l'analyse par cluster des profils obtenus permette d'avoir des informations sur les relations entre certaines souches, la discrimination n'a permis d'obtenir que seulement 8 groupes de souches, alors que par PCR-DELTA 24 groupes ont été distingués. Kántor et Kačániová (2015) ont identifié par MALDI-TOF-MS, 9 espèces de levures présentes sur baies de raisin dont 4 souches différentes pour *Saccharomyces cerevisiae*. Pour les 8 autres espèces de levures, la technique n'a pas permis une discrimination jusqu'à la souche. Dhieb et al. (2015), ont comparé la technique MALDI-TOF-MS avec la technique des microsatellites et ont montré que la technique du MALDI-TOF-MS ne permettait pas de différencier les différents « clades » à l'intérieur de l'espèce *Candida albicans*. Le niveau de discrimination semble donc très variable en fonction des espèces considérées et dans la majorité des cas les variations du

protéobiome semblent trop faibles à l'intérieur des espèces pour discriminer au niveau de la souche.

La **spectroscopie IR-TF** présentée dans le paragraphe 3.3.2.3 permet sans manipulation supplémentaire à celles nécessaires pour l'identification de l'espèce, de réaliser une discrimination au niveau de la souche par une analyse en classification hiérarchique (Udelhoven et al., 2000). Si on s'attache uniquement à la discrimination des différentes souches entre elles, une base de données n'est pas nécessaire puisque les spectres sont directement comparés entre eux. Cette méthode a déjà permis de discriminer les souches pour des espèces très différentes ayant un fort intérêt d'un point de vue clinique ou industriel : i) des souches de plusieurs espèces de *Candida* (Sandt et al., 2003 ; Essendoubi et al., 2007 ; Toubas et al., 2007), ii) des souches de levures *Saccharomyces* utilisées en brasserie (Timmins et al., 1998b), iii) de suivre l'implantation de souches starter de plusieurs espèces de levures utilisées dans la production de fromage (Goerges et al., 2008) et iv) de différencier plusieurs souches de *Brettanomyces bruxellensis* (Oelofse et al., 2010).

Chapitre II – Matériels et méthodes

1 Echantillonnage du matériel biologique

1.1 Parcelle expérimentale

Dans cette étude, la totalité du raisin ayant servi pour les prélèvements au vignoble et la production de vin provient d'une parcelle plantée en 1986, située en Bourgogne à Davayé en Saône-et-Loire (46°18'32.2"N, 4°44'17.9"E, 258 m d'altitude). Elle appartient au lycée viticole de Macon-Davayé. Depuis 2007, des essais sur la comparaison de différents modes de conduite et plus particulièrement sur différentes protections phytosanitaires sont menés sur cette parcelle par le Vinipôle Sud Bourgogne. Le cépage est le Chardonnay (clone 76) greffé sur Fercal. La densité de plantation est de 8 700 pieds/ha et la taille pratiquée est la demi-arcure. La parcelle est constituée de 10 rangs non traités servant d'indicateur de pression de maladies, de 4 rangs « tampons » traités de manière à éviter la propagation des maladies vers le reste de la parcelle et de 3 blocs de 8 rangs chacune (Fig. 10). Sur le premier bloc, le mode de protection appliqué correspond aux pratiques locales en matière de protection phytosanitaire basée sur la récolte de données à partir d'un réseau de domaines viticoles. On le note C pour conventionnel. Sur le second bloc, il s'agit d'un mode de protection biologique appliqué selon le cahier des charges de la viticulture biologique ; il est noté O. Sur le troisième bloc, il s'agit d'un mode de protection dit Ecophyto correspondant à une diminution des intrants de 30% par rapport au mode conventionnel avec un pilotage via des outils d'aide à la décision ; il est noté E. Le calendrier de traitements, pour ces 3 blocs parcellaires, au cours du cycle végétatif des trois années d'études (2012, 2013 et 2014) est donné en Annexe 1.

Les prélèvements de baies ou de grappes de raisin ainsi que la récolte totale pour la production de vin ont été effectués sur les rangs 3 et 5 de chaque bloc de manière à être le plus représentatif de la protection phytosanitaire employée et éviter les effets des rangs de bordure (Fig. 10).

1.2 Matériel biologique

Le code utilisé pour identifier les échantillons provenant de baies de raisin, après une technique d'enrichissement, du moût de raisin obtenu en cuverie après débourbage (clarification) ou des moûts au cours de la fermentation alcoolique est spécifié sur chaque protocole.

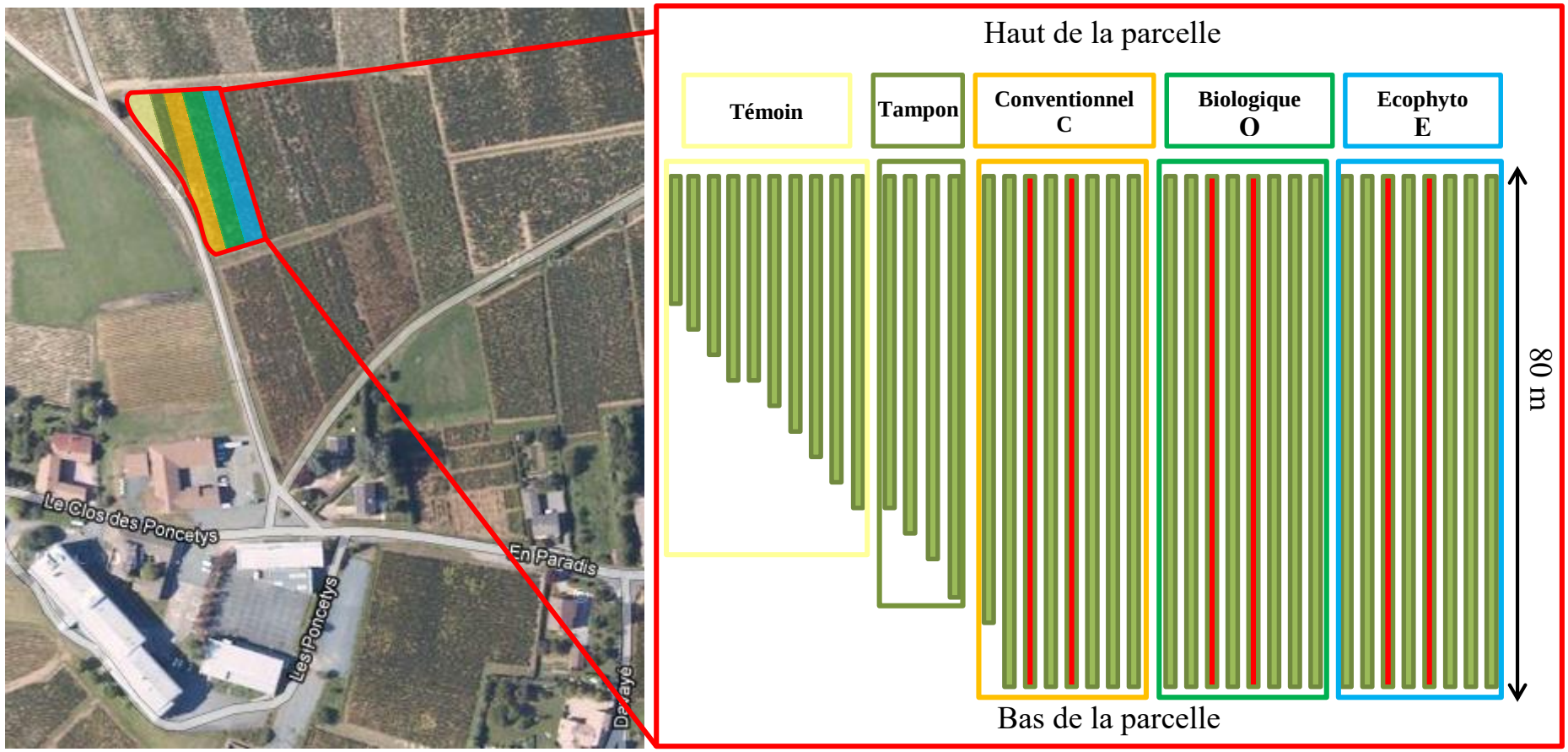


Figure 10. Vue satellite (Google earth) et plan de la parcelle expérimentale. Les rangs sur lesquels les prélèvements ont été réalisés (rangs 3 et 5) sont colorés en rouge.

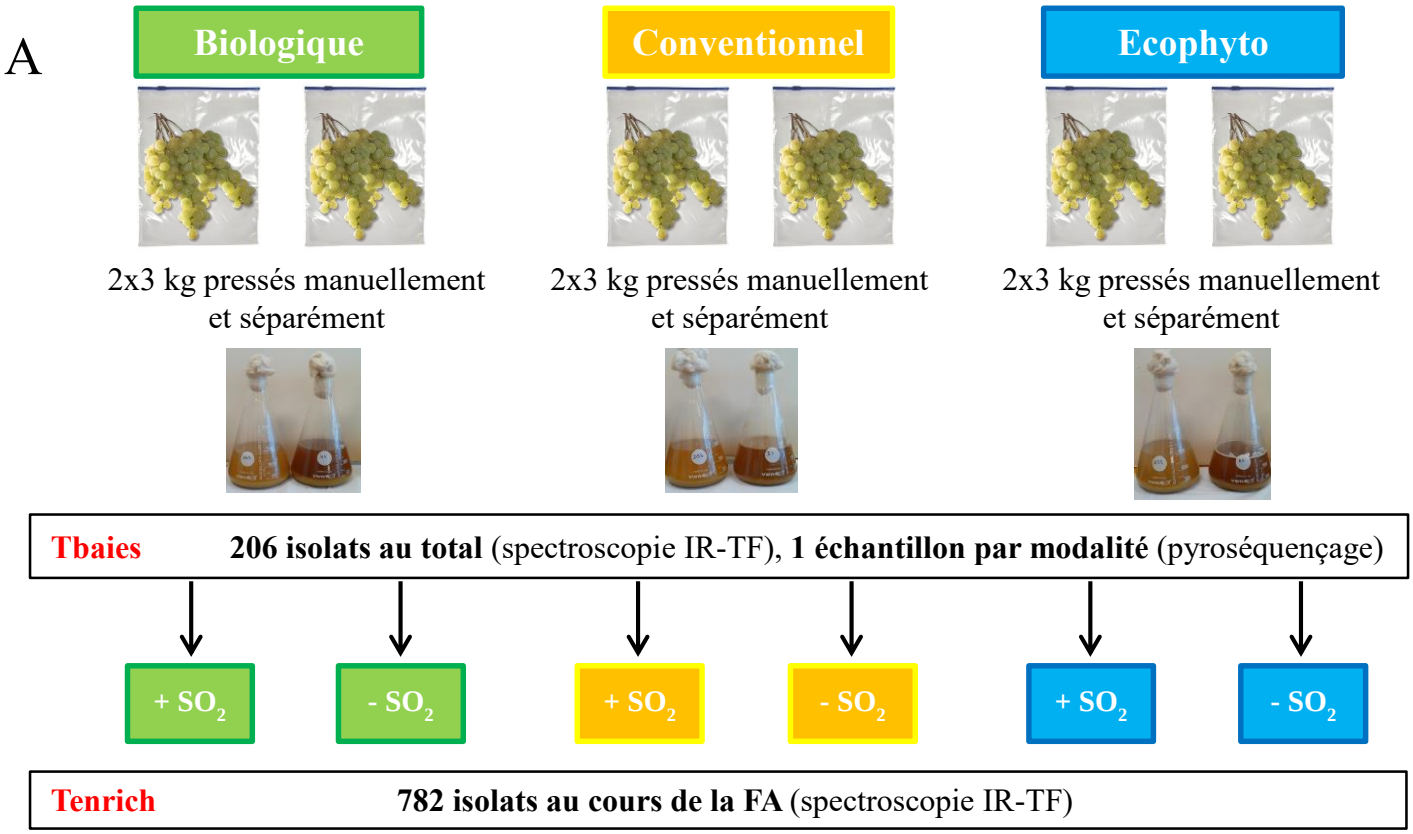
1.2.1 Protocole 2012 (Fig. 11)

Pour chaque modalité de protection phytosanitaire, 2 x 3 kg de grappes de raisin arrivées à maturité ont été prélevés aseptiquement sur différents pieds répartis le long des rangs 3 et 5 (une grappe par pied). Ces grappes ont été placées dans des sacs stériles, ramenées au laboratoire (IUVV, Dijon) dans une glacière et pressées manuellement directement dans les sacs. Le moût de raisin obtenu pour chaque sac a été placé aseptiquement dans un erlenmeyer stérile de 2 L (2 erlenmeyers par mode de protection). Un prélèvement de 50 mL de moût de raisin a été ensuite réalisé pour chaque erlenmeyer (Tbaies). L'addition de dioxyde de soufre à la dose de 50 mg/L a été réalisée avec du métabisulfite de potassium dans un des deux erlenmeyers de chaque modalité. Des prélèvements de 50 mL ont ensuite été réalisés dans chaque erlenmeyer 3 jours, 6 jours et 12 jours après le premier prélèvement et en fin de fermentation alcoolique (lorsque la concentration en sucres ne diminue plus) (Tenrich) (Fig. 11A).

Parallèlement, la totalité des grappes restantes sur les deux rangs de vigne précédemment cités a été récoltée manuellement et placée en caisse de 20 kg. La récolte, respectivement 160 kg, 156 kg et 152 kg pour les modalités O, C et E a été ensuite transportée dans la cuverie expérimentale du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB, Beaune). Dès son arrivée, la récolte a été pressée à l'aide d'un pressoir pneumatique XPRO 5 (Bücher Vaslin, Zurich, Suisse) et un rinçage du pressoir est effectué entre chaque modalité. Le moût de raisin ainsi obtenu a été placé une nuit à 10°C pour sédimentation des bourbes (débourbage), puis séparé en 2 lots dans 2 cuves en inox de 50 L chacune. Pour chaque cuve, un prélèvement de 50 mL de moût a été ensuite réalisé (T0). L'addition de dioxyde de soufre à la dose de 30 mg/L a été réalisée avec une solution sulfureuse dans une seule des deux cuves de chaque modalité. Des prélèvements de 50 mL ont été ensuite réalisés dans chaque cuve au cours de la fermentation alcoolique à différents temps : après 3 jours (T3), 6 jours (T6), 9 jours (T9) et en fin de fermentation alcoolique (lorsque la densité ne diminue plus) (Tf) (Fig. 11B).

1.2.2 Protocole 2013 (Fig. 12)

La totalité des grappes des deux rangs de vigne (3 et 5) de chaque modalité a été récoltée manuellement et placée en caisse de 20 kg. La récolte, respectivement 102 kg, 117 kg et 78 kg pour les modalités O, C et E, a été ensuite transportée dans la cuverie expérimentale du BIVB (Beaune, France). Dès son arrivée, 300 baies ont été prélevées sur l'ensemble des caisses pour



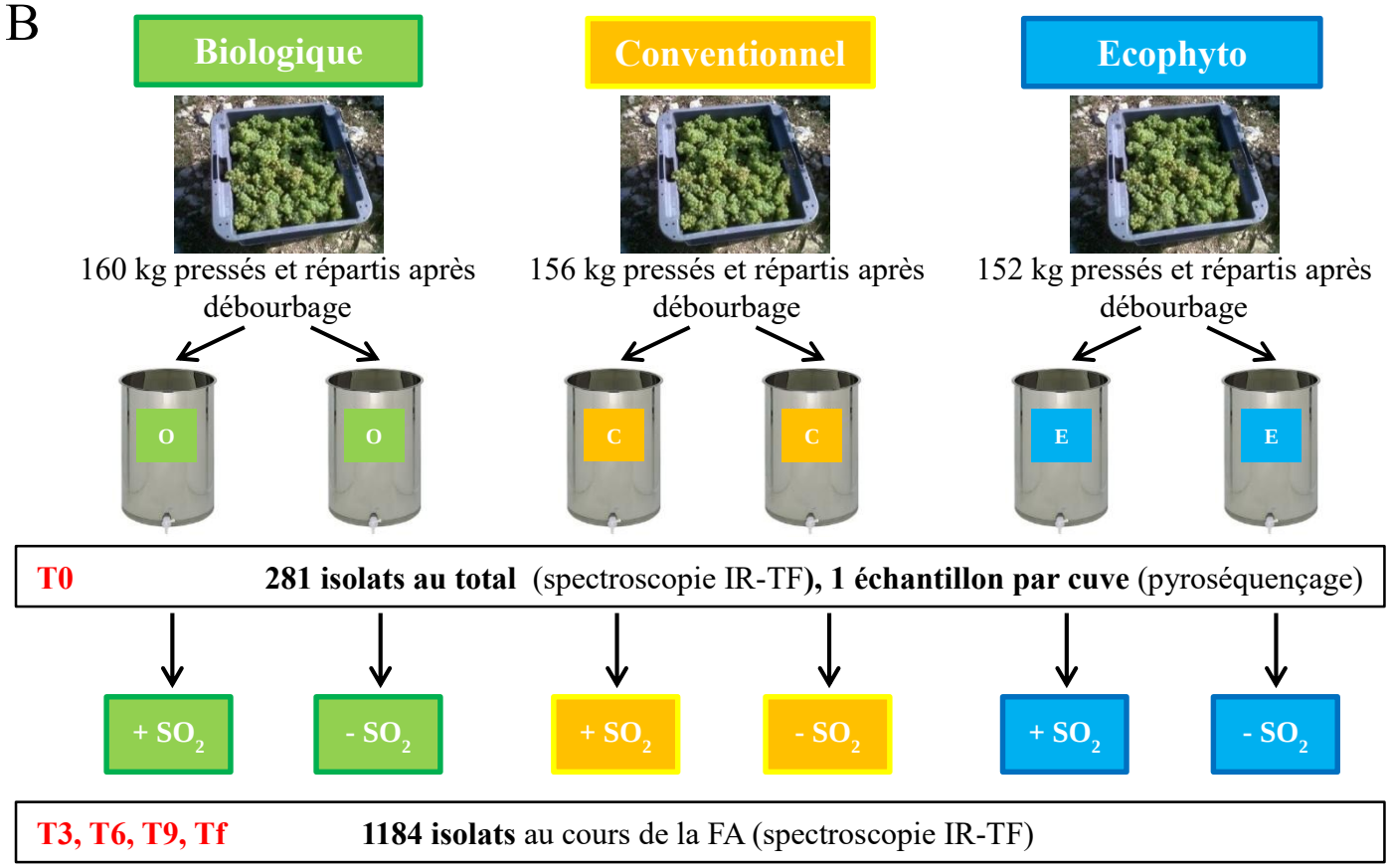


Figure 11. Protocole d'échantillonnage pour le millésime 2012 pour les FA réalisées en conditions stériles (A) et les FA réalisées en cuverie (B). Dans les deux cas, des fermentations avec et sans SO_2 ont été réalisées.

l'étude par pyrosequençage puis la récolte a été pressée à l'aide d'un pressoir vertical FASER-PLAST AG (Rickenbach, Suisse). Le moût de raisin ainsi obtenu a été placé une nuit à 10°C pour sédimentation des bourbes (débourbage), puis séparé en 4 lots dans 4 cuves en inox de 20 L chacune. Pour chaque cuve, un prélèvement de 50 mL de moût a été ensuite réalisé (T0). L'addition de dioxyde de soufre à la dose de 30 mg/L a été réalisée avec une solution sulfureuse dans 2 des 4 cuves de chaque modalité. Des prélèvements de 50 mL ont ensuite été réalisés dans chacune des cuves au cours de la fermentation alcoolique à différents temps : après 3 jours (T3), 6 jours (T6), 9 jours (T9) et en fin de fermentation alcoolique (lorsque la densité ne diminue plus) (Tf) (Fig. 12A).

Juste avant la récolte et uniquement pour la modalité Conventionnel (C) qui a été divisée en trois parties : haut, milieu et bas des rangs, des prélèvements de baies ont été réalisés aseptiquement sur chaque pied répartis le long des rangs 3 et 5, (respectivement 340, 330 et 280 baies, pour le haut, le milieu et le bas). Enfin, 300 baies ont été également prélevées après récolte au niveau des caisses de 20 kg de cette modalité. Les différents échantillons de baies ont été placés dans des sacs stériles, ramenés au laboratoire (IUVV, Dijon) dans une glacière et pressés manuellement directement dans les sacs. Le moût de raisin obtenu pour chaque sac est placé aseptiquement dans un erlenmeyer stérile de 2 L. Un prélèvement de 50 mL de moût de raisin a été ensuite réalisé pour chaque erlenmeyer (Tbaies et Tbaies caisse) (Fig. 12B).

Des prélèvements ont été également réalisés sur le sol et à la surface du matériel vinaire avant l'arrivée de la vendange. Au total, 12 prélèvements ont été réalisés à l'aide d'un écouvillon. Après avoir frotté les différentes surfaces par stries, chaque écouvillon a été placé dans un tube contenant 1 mL d'eau physiologique (NaCl à 0.9% w/v) puis vortexé pendant 5 min avant analyse.

Des prélèvements d'air (débit 100 $L.min^{-1}$) ont été réalisés avant l'arrivée de la vendange et au cours de la fermentation alcoolique en utilisant un échantillonneur d'air microbien MAS-100 Eco (MBV, Stäfa, Suisse) placé à 1,50 m du sol. Pour chaque prélèvement, une boîte de milieu YPD (0.5% w/v d'extrait de levure, 1% w/v de peptone, 2% w/v de glucose et 2% w/v d'agar) supplémenté avec du chloramphénicol à 200 ppm pour inhiber le développement des bactéries est placée dans l'échantillonneur d'air afin de dénombrer et d'isoler des levures. Le volume d'air analysé pour chaque gélose est de 500 L, avec trois répétitions par prélèvement.

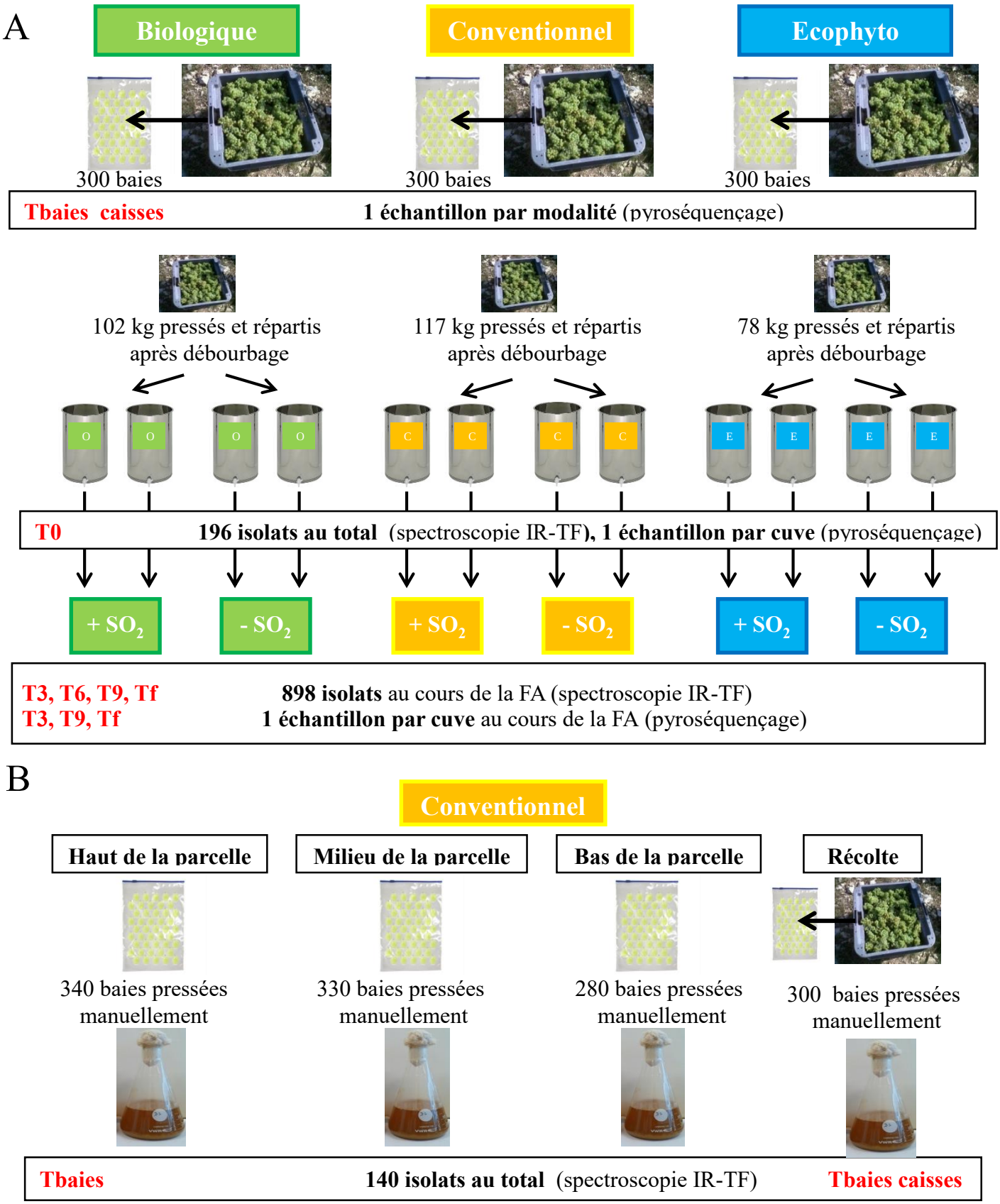


Figure 12. Protocole d'échantillonnage pour le millésime 2013 pour les baies et les FA réalisées en cuverie (A). Pour la modalité Conventionnel (C), prélèvements de baies directement sur les ceps dans le bloc C divisée en 3 (haut, milieu et bas) et directement à partir de la récolte (B). Des échantillons pour le pyroséquençage ont été prélevés pour l'ensemble des modalités.

1.2.3 Protocole 2014 (Fig. 13)

Le prélèvement de 10 baies de raisin par pied de vigne a été effectué pour la totalité des pieds des rangs 3 et 5 de chaque modalité, soit un total de 860 baies pour la modalité O, 950 pour la modalité C et 980 pour la modalité E. Les baies ont été prélevées aseptiquement, placées dans des sacs stériles et ramenées au laboratoire (IUVV, Dijon) dans une glacière ; elles ont été pressées manuellement directement dans les sacs. Le moût obtenu pour chaque modalité a été placé aseptiquement dans un erlenmeyer stérile de 2 L. Un prélèvement de 50 mL de moût a été ensuite réalisé pour chaque erlenmeyer (Tbaies) (Fig. 13).

2 Isolement, culture et conservation des levures

Pour chaque prélèvement, des dilutions en série ont été réalisées et 3 x 100 µL de chaque dilution ont été étalés sur milieu solide YPD (0.5% w/v d'extrait de levure, 1% w/v de peptone, 2% w/v de glucose et 2% w/v d'agar supplémenté avec du chloramphénicol à 200 ppm pour inhiber le développement de bactéries). Les boites de Pétri ont été incubées à 28°C. Les populations de levures ont été ensuite estimées par comptage des colonies développées et le résultat est donné par la moyenne des 3 répétitions en unités formant colonies par mL (UFC/mL).

Pour les prélèvements au niveau du sol de la cuverie et des surfaces du matériel vinaire, 3 x 100 µL de la solution physiologique dans laquelle l'écouvillon a été placé, ont été étalés sur milieu YPD gélosé et incubés 24-48 h, voire plus si nécessaire, à 28°C.

Pour les prélèvements d'air, les boites de Pétri impactées ont été incubées 24-48 h, voire plus, à 28°C. Les populations de levures ont été ensuite évaluées par comptage des colonies développées (Fig. 14). Cette valeur a été convertie en nombre le plus probable de microorganismes collectés par boîte de Pétri (MPN) en utilisant la table de correction statistique basée sur la loi de Feller (1968). Le résultat est exprimé par la moyenne des 3 répétitions en MPN/m^3.

Pour l'ensemble des prélèvements, selon la quantité de colonies présentes, toutes les colonies (si colonies <50) ou au maximum 50 colonies par réplicat sont sélectionnées aléatoirement, purifiées sur milieu gélosé YPD, puis cultivées en milieu liquide YPD à 28°C et enfin stockées à -80°C dans ce même milieu additionné de glycérol (20% v/v concentration finale).

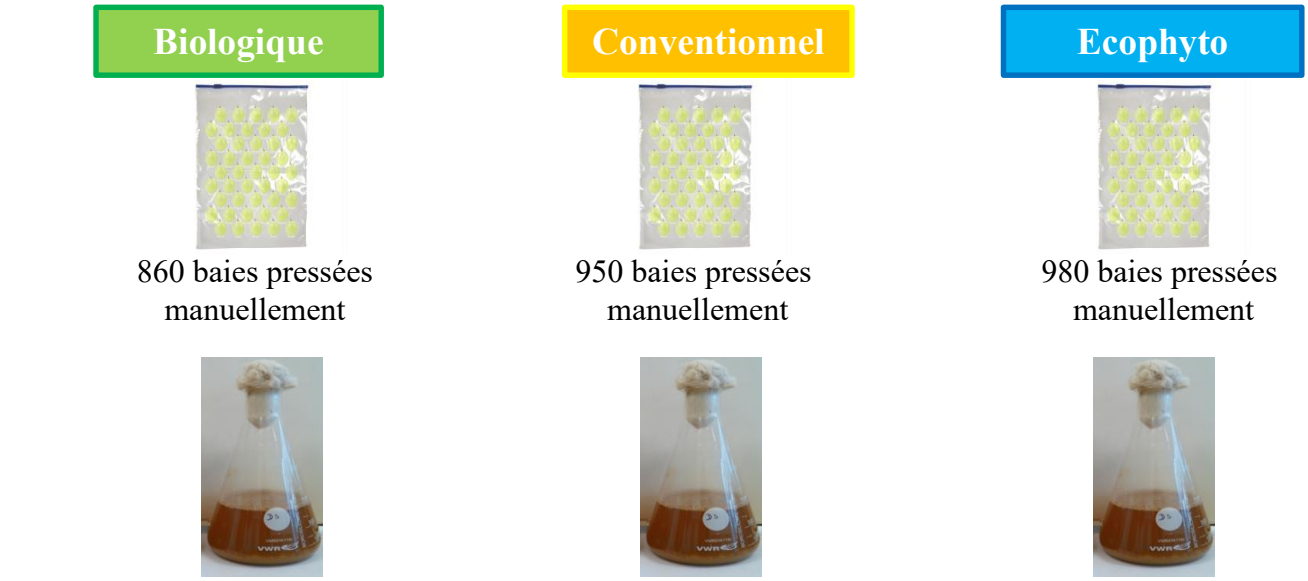


Figure 13. Protocole d'échantillonnage des baies pour le millésime 2014

Figure 14. Développement de colonies sur boites de Pétri impactées lors des prélèvements d'air.

3 Identification des populations fongiques

3.1 Identification des espèces levuriennes par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)

L'identification des levures isolées a été réalisée en collaboration avec l'Institut de Microbiologie et Biochimie de Geisenheim (Allemagne) par spectroscopie IR-TF en utilisant un spectromètre Tensor TM 27 couplé à une unité HTS-XT permettant l'analyse en microplaque (Bruker, Ettlingen, Allemagne). Les cultures sont normalisées sur un milieu gélosé YGC (extrait de levure 0.5% p/v, glucose 2% p/v, chloramphénicol 0.02% p/v et agar 2% p/v) pendant 24 h ± 0.5 h à 27°C (Kümmerle et al., 1998). Les levures sont récupérées en frottant délicatement la gélose avec une öse de 10 µL et resuspendues dans 100 µL d'eau déminéralisée. 25 µL de cette suspension sont transférés sur une plaque 96 puits en séléniure de zinc qui est ensuite séchée dans un dessiccateur à 42°C pendant 1h pour former un film transparent permettant la mesure par spectroscopie IR-TF.

Les infrarouges moyens de longueurs d'ondes comprises entre 4 000 et 500 cm^{-1} (25.000 - 2.500 nm) sont utilisés pour provoquer une vibration des liaisons chimiques provoquant ainsi une absorption spécifique des infrarouges. Un spectre d'absorption peut ainsi être mesuré et calculé pour chaque puits correspondant chacun à un microorganisme inconnu précédemment isolé. Le spectre de chaque microorganisme à identifier est ensuite comparé à une banque de spectres de référence. La distance entre les spectres est calculée en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson (Pearson, 1895). Le résultat est donné sous la forme d'une liste des spectres les plus proches, présents dans la base de données (Helm et al., 1991) permettant une identification au niveau de l'espèce. La base de données utilisée dans cette étude correspond à 3000 souches appartenant à 215 espèces communément isolées dans le domaine de l'œnologie.

3.2 Discrimination des souches de levures pour 4 espèces

3.2.1 *Candida zemplinina*, *Hanseniaspora guilliermondii* et *Hanseniaspora uvarum*

La discrimination des souches par une analyse par classification hiérarchique (HCA) des spectres obtenus par spectroscopie IR-TF a été réalisée pour trois espèces : *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora uvarum* et *Candida zemplinina* reclassifiée *Starmerella bacillaris* (Duarte et al., 2012). La HCA est une analyse multivariée qui a pour but de trouver des groupes relativement homogènes. Les données sont organisées en groupes basés sur leurs

dissimilarités avec quantification de celles-ci sous forme de distances représentées à l'aide d'un dendrogramme. Le dendrogramme est calculé par la méthode du lien moyen et en corrélation avec la normalisation du niveau de reproductibilité. La dérivée seconde des spectres est utilisée pour l'analyse et les plages de fréquences utilisées sont de 3 032 cm^{-1} à 2 829 cm^{-1}, de 1 351 cm^{-1} à 1 200 cm^{-1} et de 901 cm^{-1} à 699 cm^{-1}. L'algorithme de calcul est intégré dans le programme OPUS servant également pour le contrôle du spectromètre infrarouge.

Pour chacune des souches de *Starmerella bacillaris* identifiées par spectroscopie IR-TF, un séquençage de la région ITS de l'ADNr a été effectué afin de vérifier leur appartenance à une seule et même espèce. A partir de la solution cellulaire stockée à -80°C, une extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le kit d'extraction InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie). 25 µL de suspension levurienne sont incorporés dans 25 µL de la solution InstaGene Matrix puis vortexés pendant 30 sec et incubés à 56°C pendant 30 min. La solution est ensuite centrifugée à 4 000 rpm pendant 5 min. 2 µL du surnageant sont incorporés dans un mix PCR avec les amorces ITS1 et ITS4 (White et al., 1990). Le séquençage est effectué sur les fragments générés par PCR dans les deux orientations (Beckman Coulter Genomics, Grenoble, France) en utilisant les mêmes amorces que pour l'amplification. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été déposées dans la base de données NCBI Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Les alignements des séquences nucléotidiques ont été faits avec le logiciel clustal X (Thompson et al., 1997). Plusieurs séquences obtenues à partir de la base de données GenBank ont été incluses pour les alignements. L'arborescence a été reconstruite en utilisant le logiciel Mega version 6.0 à l'aide du modèle de distance Kimura 2 paramètres (Kimura, 1980) et la méthode « du plus proche voisin » (Saitou et Masatoshi, 1987).

3.2.2 Saccharomyces cerevisiae

La discrimination des souches de levure appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* a été réalisée par PCR-delta. Cette méthode utilise des amorces ciblant les éléments delta présents en plusieurs copies dans le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et dont la position change en fonction des souches (Ness et al., 1993). L'amplification et la séparation des fragments amplifiés sur gel d'agarose permettent ainsi l'obtention de profils spécifiques en fonction de la souche. A partir de la solution cellulaire stockée à -80°C, une extraction d'ADN a été réalisée pour chaque isolat en utilisant le kit d'extraction InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie). 25 µL de suspension levurienne sont incorporés dans 25 µL de la solution InstaGene Matrix puis vortexés 30 sec et incubés à 56°C pendant 30 min. La solution est ensuite centrifugée à 4 000 rpm pendant 5 min. 2 µL du surnageant sont incorporés

dans un mix PCR avec les amorces delta 12 et delta 21 (Legras et al,. 2003). Les fragments amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5% (1,5 g agarose QSP 100 mL de TAE1X), auquel on ajoute 5 µL de bromure d'éthidium ($C_{21}H_{20}BrN_3$, Biosolve 05412399) à 100 µg/mL, agent intercalant des acides nucléiques fluoresçant aux UV (BET:$C_{21}H_{20}BrN_3$, Biosolve 05412399). 7 µL de produit de PCR sont déposés par puits et 4 µL de marqueur de poids moléculaire 50 pb (Fermentas,#SM0322) sont déposés à chaque extrémité du gel afin de procéder à une estimation du poids moléculaire des fragments amplifiés. Après une migration de 60 min à 90 volts, la visualisation des fragments est réalisée sous UV (Gel Doc ™ XR, Biorad). Les profils obtenus sont alors comparés grâce à une matrice binaire (valeur 0 pour l'absence ou 1 pour la présence d'une bande en fonction de la taille des bandes obtenues) puis un dendrogramme de dissimilarité est calculé en se basant sur l'indice de Dice en utilisant l'algorithme UPGMA.

3.3 Identification des populations fongiques (levures et moisissures) par pyroséquençage

3.3.1 Extraction d'ADN

À partir des échantillons de moûts de raisin, avant et au cours de la fermentation alcoolique et de vins, 5 mL d'échantillon sont centrifugés pendant 5 min à 4°C à 3 000 g. Le culot est remis en suspension dans 5 mL d'eau déminéralisée puis filtré à travers la laine de verre. La suspension est à nouveau centrifugée (mêmes conditions). Le culot est remis en suspension dans 200 µL de tampon de lyse (2% v/v Triton X-100, 1% v/v de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM d'EDTA pH 8). La suspension cellulaire est ensuite homogénéisée avec 0,3 g de billes de verre (0,5 mm de diamètre) en présence de 200 µL de phénol/chloroforme /alcool isoamylique (50/48/2) en utilisant un broyeur-homogénéiseur (Precellys 24, France). Le mélange est ensuite agité au vortex pendant 1 min et placé sur de la glace pendant 1 min. Cette étape est répétée trois fois. 200 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) sont ajoutés et le mélange billes/cellules est centrifugé pendant 10 min à 16 000 g à 4°C. La phase aqueuse est ensuite recueillie. L'ADN est précipité avec 2,5 volumes d'éthanol à 100% (v/v) et centrifugé à 16 000 g à 4°C pendant 10 min. Le culot est ensuite lavé avec de l'éthanol 70%, (v/v), séché et mis en suspension dans 50 µL d'eau traitée au DEPC (Thermo Fisher Scientific, Inc.Waltham, MA, USA). Les concentrations en ADN des échantillons ont ensuite été normalisées (50 ng/µL) en mesurant l'absorbance à 260 nm, et le cas échéant en ajoutant de l'eau traitée au DEPC, avant un stockage à - 20°C.

3.3.2 Pyroséquençage de l'ADNr 18S

Les populations fongiques présentes dans chaque échantillon ont été caractérisées en utilisant le 454 pyroséquençage de l'ADN ribosomique.

Un fragment de la région 18S de l'ADNr avec une variabilité de séquence et de taille appropriée (environ 350 bases) au pyroséquençage 454 a été amplifié en utilisant les amorces FR1 (5'-ANCCATTCAATCGGTANT-3') et FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') selon Chemidlin Prévost-Bouré et al. (2011). Pour chaque échantillon, 5 ng d'ADN ont été utilisés pour une de PCR de 25 µL réalisée dans les conditions suivantes: 94°C pendant 3 min, 35 cycles de 1 min à 94°C, 52°C pendant 1 min et 72°C pendant 1 min, suivi par 5 min à 72°C. Une deuxième PCR de 9 cycles a ensuite été réalisée dans des conditions de PCR similaires avec des produits de PCR purifiés et des identificateurs de multiplexage de dix paires de bases ont été ajoutés aux amorces en position 5' pour identifier spécifiquement chaque échantillon et éviter les biais PCR. Enfin, les produits de PCR ont été purifiés en utilisant un kit d'extraction de gel MinElute (Qiagen, Courtaboeuf, France) et quantifiés en utilisant le kit de coloration PicoGreen (Molecular Probes, Paris, France). Le pyroséquençage a été réalisé soit sur un appareil GS Junior (système de séquençage 454 de Roche) par la plateforme GenoSol (INRA, Dijon, France, http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/) soit sur un appareil GS FLX Titanium (système de séquençage 454 de Roche) par la société Genoscreen (Lille, France, http://www.genoscreen.com/).

3.3.3 Analyses bio-informatiques des séquences obtenues

Les analyses bio-informatiques des séquences obtenues par pyroséquençage ont été effectuées en utilisant le pipeline GnS-PIPE développé par la plateforme Genosol (INRA, Dijon, France) (Terrat *et al.* 2012), ou en utilisant le pipeline Qiime développé par scikit-bio (Caporaso et al., 2010). Les paramètres choisis pour chaque étape sont les mêmes pour les deux pipelines et peuvent être trouvés dans le tableau 2. Les séquences obtenues ont été triées en fonction des adaptateurs d'identification multiplex puis celles qui ne répondaient pas aux critères (a) de leur longueur, (b) du nombre d'ambiguïtés (Ns), et (c) de la séquence des amorces ont été éliminées. Un programme PERL a ensuite été appliqué pour une déréplication rigoureuse (c'est-à-dire regroupement des séquences strictement identiques). Les séquences uniques ont été ensuite alignées en utilisant l'alignement Infernal (Cole et al., 2009), et regroupés en unités

Tableau 2. Paramètres bioinformatiques et bases de données utilisées dans l'analyse des résultats du pyroséquençage

Étapes	Paramètres	
Preprocessing	Longueur minimum	300
	Nombre d'ambiguïtés tolérées	0
	Détection de la séquence de l'amorce proximale	Complete et parfaite
	Détection de la séquence de l'amorce distante	Parfaite mais potentiellement incomplète
Clustering	Niveau de similarité (%)	95
	Ignorer les différences de longueur des homopolymères	Oui
Filtre	Seuil du niveau de similarité pour le clustering	95
	Base de données taxonomique	SILVA (r111)
	Niveau taxonomique	Phylum
	Seuil de similarité ou de confiance (%)	85
Taxonomie	Base de données taxonomique	SILVA (r111)
	Méthode ou outil de comparaison	MegaBLAST
	Seuil de similarité ou de confiance (%)	80
Analyses	Niveau de similarité (%)	95
	Ignorer les différences de longueur des homopolymères	Oui
	Calcul d'une matrice de distance Unifrac	Oui

taxonomiques opérationnelles (OTU) en utilisant un programme de PERL. Ce programme regroupe les séquences les plus rares avec celles plus abondantes constituant le « cœur » de l'OTU utilisé pour l'assignation taxonomique et ne tient pas compte des différences de longueurs des homopolymères. Une étape de filtrage a ensuite été effectuée pour vérifier les singletons (séquences détectées une seule fois et non en cluster), qui pourraient être des artéfacts, tels que des chimères de PCR en fonction de la qualité de leur assignation taxonomique. Les séquences répondant à tous les facteurs de tri ont ensuite été utilisées pour l'assignation taxonomique par similarité avec les séquences présentes dans les bases de données de référence SILVA (Quast et al., 2013). L'ensemble des données brutes sont disponibles sur la base de données EBI (http://www.ebi.ac.uk/ena).

3.4 Indice de Diversité

L'indice de Shannon (H') est utilisé afin d'évaluer la biodiversité d'un écosystème pour une communauté considérée comme infinie ou de taille indéfinissable. Il prend en compte à la fois la richesse spécifique et l'abandance relative des différentes espèces (Pielou 2006). Cet indice est considéré comme plus sensible que l'indice de Simpson (D') aux variations d'abondance des espèces rares (Peet, 1974). Il est défini par :

$$H' = \sum_{i=1}^{S} Pi \, (\log_2 Pi)$$

i une espèce donnée

S le nombre total d'espèces

n_i le nombre d'individus de l'espèce i

N le nombre total d'individus

Pi la proportion de l'espèce i avec $Pi = n_i/N$

Dans cette étude l'indice de Shannon est utilisé pour évaluer la biodiversité à partir des genres ou espèces identifiés par spectroscopie IR-TF, ou par pyroséquençage en utilisant alors le nombre de séquences pour le calcul de Pi.

4 Analyses des milieux

4.1 Analyses classiques

4.1.1 Suivi de la fermentation alcoolique

En cuverie, le suivi de la fermentation alcoolique a été effectué par la mesure de la densité à l'aide d'un densimètre électronique. Pour les fermentations stériles réalisées en erlenmeyer au laboratoire, le suivi a été effectué par le dosage par méthode colorimétrique des sucres réducteurs du milieu avec l'acide 3,5-dinitrosalycilique (Miller, 1959).

Les dosages du glucose, du fructose et de l'éthanol au cours de la fermentation ont été réalisés à l'aide de kits enzymatiques (Biosentec, Auzeville Tolosane, France).

4.1.2 Analyses des moûts et des vins

Le dosage des sucres réducteurs, de l'azote assimilable (azote ammoniacal et acides aminés excepté la proline), de l'acide malique, de l'éthanol, et de l'acide acétique ont été réalisés par spectroscopie IR-TF (FOSS, France).

4.2 Analyse chimique non ciblée

Des analyses non-ciblées des métabolites des vins en 2012 et des moûts de raisin et des vins en 2013 ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de Biogéochimie Analytique du Helmholtz Zentrum (Munich, Allemagne). Ces analyses ont été effectuées par spectrométrie de masse à transformée de Fourier et à résonnance cyclotronique des ions avec ionisation par électrospray (FT-ICR-MS). La préparation des échantillons a consisté en une simple dilution du vin dans du méthanol ultra-pur dans les proportions 50 µL/950 µL. Les moûts de raisin ont été préalablement filtrés à l'aide de cartouches BEH C18 (colonnes SPE Backerbond) permettant notamment l'élimination des sucres puis acidifiés avec de l'acide formique dilué (2% v/v) jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 1,5 et 2. Les cartouches C18 sont alors conditionnées par passages successifs de 1 mL de méthanol et 1 mL d'acide formique dilué dans de l'eau ultra pure (2%). Le passage du solvant dans la cartouche a été réalisé à l'aide d'une pompe à vide. 1 mL de moût acidifié est ensuite passé au travers de la cartouche C18, puis de nouveau 1 mL d'acide formique dilué, et enfin 500 µL de méthanol qui sont alors récupérés dans des flacons ambrés et conservés à -20°C pour l'analyse.

Les échantillons de moûts de raisin et de vins ont ensuite été analysés par un spectromètre de masse FT-ICR Solarix (Brucker Daltonics, Brème, Allemagne), équipé d'un aimant

supraconducteur de 12 Tesla (Magnex, UK). L'instrument est équipé d'une source d'ionisation par électrospray Apolo II avec la capacité d'ionisation en mode négatif ou positif. Les échantillons ont été injectés directement dans une source micro électrospray avec un débit de 120 µL/h. L'injection peut être faite manuellement ou à l'aide d'un auto-injecteur d'une capacité de 84 échantillons. Une calibration externe utilise une solution d'arginine à 5 ppm (tolérance de 0,2 ppm) qui est un acide aminé connu pour sa polymérisation en dimère, trimère, etc. et sa très bonne ionisation. Cette solution est préparée quotidiennement avant chaque début de run. Les spectres ont été enregistrés en ionisation négative et pour des valeurs comprises entre m/z 100 et 1000. Pour chaque échantillon 300 accumulations d'un signal de 4 MW (megawords) ont été enregistrés.

Les spectres obtenus par analyse FT-ICR-MS ont ensuite été calibrés en interne à l'aide de composés de masses exactes connues dont certains composés ubiquitaires dans les vins. Cette méthode a notamment été utilisée sur des vins pour caractériser les effets du millésime, du terroir, du cépage, du processus de vinification, du vieillissement, de l'origine des chênes utilisés pour l'élevage en barriques et comprendre l'évolution des pratiques de vinification en champagne depuis le 19ème siècle (Cooper et Marshall, 2001 ; Gougeon et al., 2009, 2011 ; Villagra et al., 2012 ; Roullier-Gall et al., 2014 ; Jeandet et al., 2015).

Chapitre III – Évaluation de la spectrocopie IR-TF pour l'étude de la biodiversité levurienne.

L'écologie microbienne nécessite l'accès à l'ensemble des communautés présentes dans un échantillon. Si à l'heure actuelle, des techniques avec des résolutions performantes se développent telles que les séquençages de seconde génération, elles restent cependant encore couteuses et difficiles d'utilisation en routine pour n'importe quel laboratoire. De plus, ces techniques ne permettent pas toutes, pour le moment, une résolution au niveau de l'espèce et aucune ne peut réaliser une discrimination au niveau de la souche.

Pourtant, il semble nécessaire de développer un outil puissant permettant de réaliser des études de biodiversité et dans le même temps de caractériser les isolats présents dans un échantillon au niveau de la souche. Ce besoin de caractériser au niveau de la souche est de plus en plus nécessaire dans la filière étant donné que les potentiels d'intérêt œnologique des levures sont espèce et surtout souche dépendant. Si la biodiversité intraspécifique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été largement étudiée, à l'heure actuelle, excepté les travaux récemment publiés sur l'utilisation de marqueurs microsatellites, aucune méthode n'est actuellement disponible pour l'étude de levures non-*Saccharomyces*.

Ainsi au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la capacité de la spectroscopie IR-TF à répondre à nos objectifs : pouvoir caractériser la biodiversité d'un échantillon et étudier la biodiversité intraspécifique de levures non-*Saccharomyces*.

Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus sur la biodiversité levurienne présente sur baies de raisin, provenant de 3 parcelles différentes. Cette biodiversité a été analysée par spectroscopie IR-TF et par pyroséquençage, utilisé dans ce travail comme méthode de référence. L'intérêt de la spectroscopie IR-TF pour une étude intraspécifique est montré pour un genre levurien non-*Saccharomyces,* ainsi que la méthodologie de l'échantillonnage et de sa représentativité par rapport à l'environnement étudié.

1 La spectroscopie IR-TF : un outil puissant pour l'étude de la biodiversité inter- et intra-spécifique des levures cultivables isolées à partir du moût de raisin.

Accepté pour publication dans Journal of Microbiological Methods (Novembre 2015) : MIMET-D-15-00807.

FT-IR spectroscopy: a powerful tool for studying the inter- and intraspecific biodiversity of cultivable yeasts isolated from grape must

Cédric Grangeteau[a], Daniel Gerhards[b], Sebastien Terrat[c], Samuel Dequiedt[c], Hervé Alexandre[a], Michèle Guilloux-Benatier[a], Christian von Wallbrunn[b], Sandrine Rousseaux[a*]

[a]UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, IUVV, rue Claude Ladrey, BP 27877, 21000 Dijon, France

[b]Institut für Mikrobiologie und Biochemie Zentrum Analytische Chemie und Mikrobiologie – Hochschule Geisenheim University, Geisenheim, Germany

[c]INRA, UMR 1347 Agroécologie-Plateforme Genosol, 17, rue Sully, BP 86510, 21000 Dijon, France

[*] Corresponding author : sandrine.rousseaux@u-bourgogne.fr; phone +33380.39.62.61

Abstract

The efficiency of the FT-IR technique for studying inter- and intra-biodiversity of cultivable yeasts present in different must samples was examined. In first, the capacity of the technique FT-IR to study the global diversity of a given sample was compared to the pyrosequencing method, used as a reference technique. Seven different genera (*Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia* and *Pichia*) were isolated and identified by FT-IR and were also identified by pyrosequencing. Thirty-eight other genera were identified by pyrosequencing, but together they represented less than 6% of the average total population of 6 musts. Except for the genus *Metschnikowia*, the differentiation at species level was only possible by FT-IR. Among the species identified, some of them present organoleptic potentials in winemaking, particularly *Starmerella bacillaris* (synonym *C. zemplinina*). So in a

second time, we evaluated the capacity of the FT-IR technique to discriminate the isolates of this species. Few techniques were able to study intraspecific NS yeast biodiversity. The results obtained were validated by using a classic method as ITS sequencing. Biodiversity at strain level was high: 19 different strains were identified from 58 isolates. FT-IR spectroscopy seems to be an accurate and reliable method for identifying major genera present in the musts which were identified too by pyrosequencing. But the two biggest advantages of the FT-IR are the capacity for studying intraspecific NS yeast biodiversity and the possibility to manage a lot of number of strains.

Keywords: FT-IR spectroscopy, wine yeast, *Candida*, strain typing, pyrosequencing

Introduction

Recently, high-throughput sequencing technologies have been used to characterize microorganism populations present in different fermented beverages such as tea (Lyu *et al.* 2013), kefir (Marsh *et al.* 2013), botrytized wines (Bokulich *et al.* 2012) and on grapes (Bokulich *et al.* 2014; Taylor *et al.* 2014), as well as to monitor a grapevine microbiome during a vegetative cycle (Pinto *et al.* 2014). Among these techniques, pyrosequencing provides theoretically higher taxonomic resolution than other high-throughput sequencing techniques (Bokulich and Mills 2012) and gives access to much greater biodiversity compared to other methods such as DGGE and rDNA RFLP (David *et al.* 2014). Pyrosequencing makes it possible to obtain a photograph of the genera and sometimes species (Bokulich and Mills 2012) present in a given sample at a given time. This is especially true if the 18S rDNA region is chosen because the level of conservation allows studying very phylogenetically distant genera (Valente *et al.* 1999). However, the degree of variability is often inadequate for identification at the species level, particularly for closed related species (Peterson and Kurtzman 1991). At present no technique has been developed for both the study of the total microbial diversity of a sample and the identification of microorganisms present at the species and/or strain level. Yet it appears necessary to develop a powerful tool permitting to realize studies of global biodiversity (for example, impacts of vineyard management on yeast biodiversity) and in the same time to characterize isolates present in a sample at the strain level. This need for characterizing at strain level is increasing because the oenological potentials of wine relevant yeasts are species and/or strain dependent.

Different techniques have been used in order to have both a global view regarding biodiversity of an environment and to identify up to the strain level the nature of the microorganisms.

These techniques are mostly based on a molecular approach which often requires several amplification and/or restriction stages (Masneuf-Pomarede *et al.* 2015). Moreover, these techniques often take a long time to implement and some species remain difficult to identify with this kind of approach (Esteve-Zarzos *et al.* 2001; Sipiczki 2004). One of the main solutions chosen to differentiate certain very close species is to sequence one or several genes (Molnár and Prillinger 2005), but this approach has proven to be time consuming and expensive for use on a very large number of isolates.

Thus other methods have been developed such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) which is used to identify isolates according to the different components of the cell. FT-IR is a technique based on the absorption of infrared radiation by the sample analyzed. This technique detects the characteristic vibrations of the chemical bonds. The absorption spectrum obtained makes it possible to characterize the chemical composition of a complex sample. FT-IR was used to characterize the composition of biomembranes such as those of microorganisms (Lee and Chapman 1986). This technique is based on the irradiation of microorganisms by infra-red light at different wavelengths. The different components of the cell (proteins, fatty acids, polysaccharides, etc.) absorb light and produce specific absorption profiles. This rapid and accurate technique has been used in many studies for the identification of fungi and yeast in comparison with a database (Essendoubi *et al.* 2005; Kümmerle *et al.* 1998; Shapaval *et al.* 2012; Timmins *et al.* 1998a; Wenning *et al.* 2002). Furthermore, the FT-IR is one of the few methods capable of discriminating strains of the same species without being necessary to perform additional experiments by analyzing the hierarchical classification of the profiles obtained (Udelhoven *et al.* 2000). In particular, this technique was applied to the differentiation of strains of the species *Saccharomyces cerevisiae* used in beer brewing (Timmins *et al.* 1998b), and monitoring the implantation of starter strains used in cheese production (Goerges *et al.* 2008). Although this technique has attracted interest in many fields (Lecellier *et al.* 2014; Wenning *et al.* 2002, Wenning *et al.* 2013), it has rarely been used for an in-depth ecological study applied to wine (Adt *et al.* 2010; Grangeteau *et al.* 2015; Oelofse *et al.* 2010). In fact, only two studies have used the FT-IR technique to discriminate non-*Saccharomyces* yeasts at strain level.

Yet, in recent years, there has been increased interest in the role of non-*Saccharomyces* yeasts during the fermentation process. Some non-*Saccharomyces* strains were studied in co-culture with *Saccharomyces cerevisiae*. These non-*Saccharomyces* yeasts belonging to the genera *Candida, Hanseniaspora, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia and Torulaspora* (Ciani *et*

al. 2010) can contribute to the sensory characteristics of wine and thus positively impact the wine organoleptic quality (Ciani *et al.* 2010; Comitini *et al.* 2011; Lambrechts and Pretorius, 2000; Moreira *et al.* 2005; Rodríguez *et al.* 2010; Sadoudi *et al.* 2012). Some of them are able to survive during alcoholic fermentations (Comitini *et al.* 2011; Mills *et al.* 2002; Rantsiou *et al.* 2012; Sadoudi *et al.* 2012). Among the non-*Saccharomyces* yeasts isolated the species *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) seems to be an ubiquitous genus associated with grape. Most works have focused on this species from a winemaking perspective: *C. zemplinina* have been described as an osmotolerant fructophilic strain with low capacity to produce acetic acid (Comitini *et al.* 2011; Magyar and Tóth 2011; Rantsiou *et al.* 2012; Sadoudi *et al.* 2012; Sipiczki 2003; Soden *et al.* 2000; Tofalo *et al.* 2012). Moreover, mixed cultures with *S. cerevisiae* and *C. zemplinina* led to the reduction of acetic acid content (Rantsiou *et al.* 2012). It appears important to study the diversity of this species and allow distinguishing the different strains which could present oenological characteristics of interest. But so far, few tools are available.

Thus the aim of this study was to estimate the capacity of the FT-IR technique to study the diversity of yeasts present in different samples of musts. The efficiency of the FT-IR technique was compared to the pyrosequencing method, used as a reference technique to examine the global diversity of a given sample. After assessing the FT-IR technique as reliable tool to study the biodiversity of culturable yeasts, we have studied the ability of the FT-IR to discriminate isolates not only at the species level but also at the strain level. We have chosen to focus this work on the determining the inter- and intraspecific traits of the genus *Candida*.

Materials and methods

Sampling method

The diversity of yeasts was studied using ripe Chardonnay grapes harvested from three plots (C, E and O) located in a French Burgundy vineyard (46°18'32.2"N, 4°44'17.9"E, 258 m altitude), planted in 1987.

For each plot, all the bunches of 2 rows were collected (100 vine stocks), corresponding to 160 kg and pressed with a pneumatic press. After being left overnight at 10°C, the resulting musts were divided into two biological repetitions (50 L each) and one sample for each repetition was

collected immediately (a total two samples per plot). These samples are referred to in the rest of the article as plot C: C1 and C2, plot O: O1 and O2, and plot E: E1 and E2.

Study of yeast diversity by pyrosequencing

DNA extraction for pyrosequencing

5 mL of must (C1, C2, O1, O2, E1 and E2) were collected and centrifuged for 5 min at 4°C at 3000g. The pellet was suspended in 5mL milliQ water and filtered through glass wool to separate cells from must debris. The filtered suspension was centrifuged again (5 min at 4°C, at 3000g). The pellet was resuspended in 200 µL of lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.1 mM EDTA pH 8), and the cells were homogenized in a bead beater instrument (Precellys 24, France) with 0.3 g of glass beads (0.5 mm in diameter) in the presence of 200 µL phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:48:2). The mixture was vortexed for 1 min and placed on ice for 1 min. This step was repeated three times. Then 200 µL TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8) was added and the bead/cell mixture was centrifuged for 10 min at 16000g at 4°C after which the aqueous phase was collected. The DNA was precipitated from this aqueous phase with 2.5 volumes of 100% ethanol and centrifuged at 16 000g at 4°C for 10 min, then the pellet was washed with 70% ethanol, dried and suspended in 50 µL of DEPC-treated water (Thermo Fisher Scientific, Inc.Waltham, MA, USA). The DNA concentrations of the samples were then standardized (50 ng/µL) by measuring optical density at 260 nm, and adding DEPC-treated water as appropriate before storage at - 20°C.

Pyrosequencing of 18S rRNA gene sequences

Microbial diversity was determined for each must by using 454 pyrosequencing of ribosomal genes. A 18S rRNA gene fragment with sequence variability and appropriate size (about 350 bases) for 454 pyrosequencing was amplified using the primers FR1 (5'-ANCCATTCAATCGGTANT-3') and FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Chemidlin Prévost-Bouré *et al.* 2011). For each sample, 5 ng of DNA was used for a 25 µL PCR conducted under the following conditions: 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 5 min at 72°C. A second PCR of 9 cycles was then conducted under similar PCR conditions with purified PCR products and ten base pair multiplex identifiers were added to the primers at position 5' to specifically identify each sample and avoid PCR bias. Finally, the PCR products were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen staining Kit

(Molecular Probes, Paris, France). Pyrosequencing was carried out on a GS Junior apparatus (Roche 454 Sequencing System) by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France, http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/).

Bioinformatic analysis of 18S rRNA gene sequences

The bioinformatics analyses were performed using the GnS-PIPE initially developed by the Genosol platform (INRA, Dijon, France) (Terrat *et al.* 2012), and recently optimized. The parameters chosen for each bioinformatics step can be found in supplementary material. First, all the 18S raw reads were sorted according to the multiplex identifier sequences. The raw reads were then filtered and deleted based on: (a) their length, (b) their number of ambiguities (Ns), and (c) their primer(s) sequence(s). A PERL program was then applied for rigorous dereplication (i.e. clustering of strictly identical sequences). The dereplicated reads were then aligned using Infernal alignment (Cole *et al.* 2009), and clustered into operational taxonomic units (OTU) using a PERL program that groups rare reads to abundant ones, and does not count differences in homopolymer lengths. A filtering step was then carried out to check all single-singletons (reads detected only once and not clustered, which might be artifacts, such as PCR chimeras) based on the quality of their taxonomic assignments.

The high-quality reads retained were then taxonomically assigned using similarity approaches against dedicated reference databases from *SILVA* (Quast *et al.* 2013) (see supplementary material). The raw data sets are available on the EBI database system under project accession number (awaiting attribution).

Study of yeast diversity by FT-IR spectroscopy

Yeast isolation

Serial dilutions were performed for each sample of must (C1, C2, O1, O2, E1 and E2) and 100 µL of each dilution was plated in triplicate at 28°C on YPD agar (0.5% w/v yeast extract, 1% w/v, peptone, 2% w/v glucose and 2% w/v agar) supplemented with chloramphenicol (200 ppm) to inhibit bacterial development. After 24-48 hours at 28°C, the yeast population was counted and 50 colonies were randomly selected from the three Petri dishes of a given dilution, cultivated in YPD and after the control of the purity of the selected colony, each was then stored at −80°C in YPD broth supplemented with glycerol (20% v/v final concentration).

Supplementary material

Bioinformatics parameters and databases used in the analysis of pyrosequencing results.

Step	Parameter	Targeted rDNA gene 18S
Preprocessing	Length threshold	300
	Number of ambiguities tolerated	0
	Detection of proximal primer sequence	Complete and perfect
	Detection of distal primer sequence	Perfect, but potentially incomplete
Clustering	Chosen level of similarity (%)	95
	Ignoring differences in homopolymer lengths	Yes
Filtering	Chosen clustering similarity threshold	95
	Used taxonomic database	SILVA (r111)
	Chosen taxonomic level	Phylum
	Similarity or confidence threshold (%)	85
Taxonomy	Used taxonomic database	SILVA (r111)
	Method or tool of comparison	MegaBLAST
	Similarity or confidence threshold (%)	80
Analysis	Chosen level of similarity (%)	95
	Ignoring differences in homopolymer lengths	Yes
	Computation of a Unifrac distance matrix	Yes

Identification of yeast isolates

Identification of yeast isolates was performed by Fourier-Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy using a Tensor^{TM} 27 spectrometer coupled with an HTS-XT unit (Bruker, Ettlingen, Germany). From the pure culture of frozen stock, a cell culture of each colony was standardized on YGC-Agar (0.5% w/v yeast extract, 2% w/v glucose, 0.02% w/v chloramphenicol and 2% w/v agar) for 24 h ± 0.5 h at 28 °C (Kümmerle, Scherer and Seiler 1998). Then the cells were harvested by carefully scraping the agar plate with a 10 µL plastic loop and suspended in 100 µL of sterile demineralized water. An aliquot of 25 µL of the suspension was transferred to a 96-well zinc selenide (ZnSe) optical plate (sample holder) and dried in a desiccator at 42°C ± 2°C for 1 h to form a thin transparent film suitable for FT-IR measurements. The recording of spectra was done using a 6 cm^{-1} resolution, 10 kHz scan speed, Blackman-Harris 3-Term apodization and zerofilling of 4 as measurement parameters. Data processing was performed using the OPUS^{TM} Version 6 software (Bruker, Ettlingen, Germany).

The mid-infrared range of 4 000-500 wave length/cm^2 (25 000 – 2 500 nm) is used to excite atoms in molecular bonds, causing them to vibrate. A spectrum can be measured and calculated by light absorption. This specific absorption is attributed to several cell components (polysaccharides, fatty acids, proteins, mixed region, *fingerprint*-region) (Lee and Chapman 1986) used for identification (Kümmerle *et al.* 1998). A spectrum of an unknown yeast species is compared to a collection of reference spectra and the distance measured between the spectra designated as d value is calculated based on the Pearson product moment correlation coefficient. To enhance the resolution of complex bands and to minimize difficulties evolving from inevitable baseline shifts the second derivations of the original spectra were calculated. This makes it possible to obtain a list of the most similar spectra of the database (Helm *et al.* 1991), leading to identification at the species level. At the time of the study the database consists of about 3 000 strains belonging to 215 species representing all wine relevant species, in example 593 strains belonging to 74 different *Candida* species are represented. Identification results are shown by the software as a list of the most similar spectra, including the measured spectral distances (hit quality; HQ). Only the first hit in these lists were counted as identification, if the HQ is <1.5.

Strain typing

Based on the hierarchical cluster analysis (HCA) data obtained from the FT-IR spectra a differentiation on strain level was performed for the isolates belonging to the genus *Candida*. The dendrogram was calculated using the Average Linkage algorithm and correlation with normalization to reproducibility level. The algorithm is part of the OPUS software package and is implemented under the "Cluster analysis" option. The second derivatives of the spectra were used. The frequency ranges were 3,032 cm^{-1} to 2,829 cm^{-1}, 1,351 cm^{-1} to 1,200 cm^{-1}, and 901 cm^{-1} to 699 cm^{-1}.

Classification into sub-clusters was done by defining a spectral distance as a value for separation on the strain level. A value of 0.3 was chosen as spectral distance, in line with Kümmerle *et al.* 1998.

DNA sequencing and sequence analysis

For each different strain of *S. bacillaris* identified by FT-IR, a sequencing of the ITS region has been achieved, to validate the results obtained by FT-IR. Genomic DNA was prepared from YPD agar yeast cultures after 2 days of incubation, using the InstaGene Matrix kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, 25 µl of yeast suspensions in 25 µl of InstaGene matrix are incubated at 56°C for 30 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. 2 µl of supernatant are added to PCR mix. Sequencing was performed on 5.8-ITS DNA fragments generated by PCR. The primers ITS1/ITS4 were used (White *et al.* 1990). Beckman Coulter Genomics (England) sequenced the PCR products in both orientations. Nucleotides sequences have been deposited in the NCBI GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ : KT281985 to KT282003). Nucleotide alignments were generated for the partial ITS sequence with Clustal x software (Thompson *et al.* 1997). Several sequences obtained from GenBank were included in the phylogeny. Molecular phylogenies were reconstructed with Mega software version 6.0, with the K2P distance model (Kimura 1980) and the Neighbour joining method (Saitou and Masatoshi 1987).

Results and discussion

Characterization of the yeast biodiversity of grape must by pyrosequencing

Populations present in the grape musts were identified by pyrosequencing. 172 996 sequences were obtained in the pyrosequencing run from the 6 samples analyzed. After demultiplexing, removal of short and bad quality sequences and reverse primer trimming, 144 463 high-quality sequences remained. OTU clustering and taxonomic assignment was performed using these

sequences and singletons, and non-fungal taxa and suspected artefacts were removed. The final dataset contained 82 868 sequences. Between 1 366 and 23 722 sequences per sample were obtained (Table 1). These sequences were clustered according to their similarity and yielded 52-342 OTUs per sample. Figure 1 show rarefaction curves based on 95% sequence identity for each sample. The number of OTUs per sample indicates that yeast communities present in must are not very complex but rarefaction curves show that these habitats have not been sampled exhaustively.

Table 1. Summary of 454 pyrosequencing data, estimated operational taxonomic unit (OTU) richness, sample coverage of 18S rDNA libraries of fungi from Chardonnay grape must samples O1 and O2 (plot O), samples C1 and C2 (plot C) and samples E1 and E2 (plot E).

Grape musts	O1	O2	C1	C2	E1	E2
Raw reads	7132	4729	27613	8524	11180	29883
High-quality reads kept after filtering steps	4364	3470	20761	6578	7650	23722
Number of OTUs (5% distance level) – *genus* level	123	103	342	121	193	301
Estimated sample coverage (ESC)*	0.57	0.59	0.59	0.62	0.56	0.66

* Cx = 1 – (N*x*/*n*), where N*x* is the number of unique high-quality reads and *n* is the total number of high-quality reads.

In this study, only the yeasts and yeast-like genera are studied: thus 46 genera could be identified by amplicon sequencing (Table 2). This technology provides access to all genera, whether cultivable or non-cultivable, even if they are in minority. Only 8 of 46 genera represent 0.8% to 33% of the total yeast population (average of 6 musts): *Metschnikowia*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Sporobolomyces* and *Sporidiobolus* (in order of importance) (Table 2). These yeast genera are usually identified in must regardless of the identification method used (Barata *et al.* 2012; David *et al.* 2014;

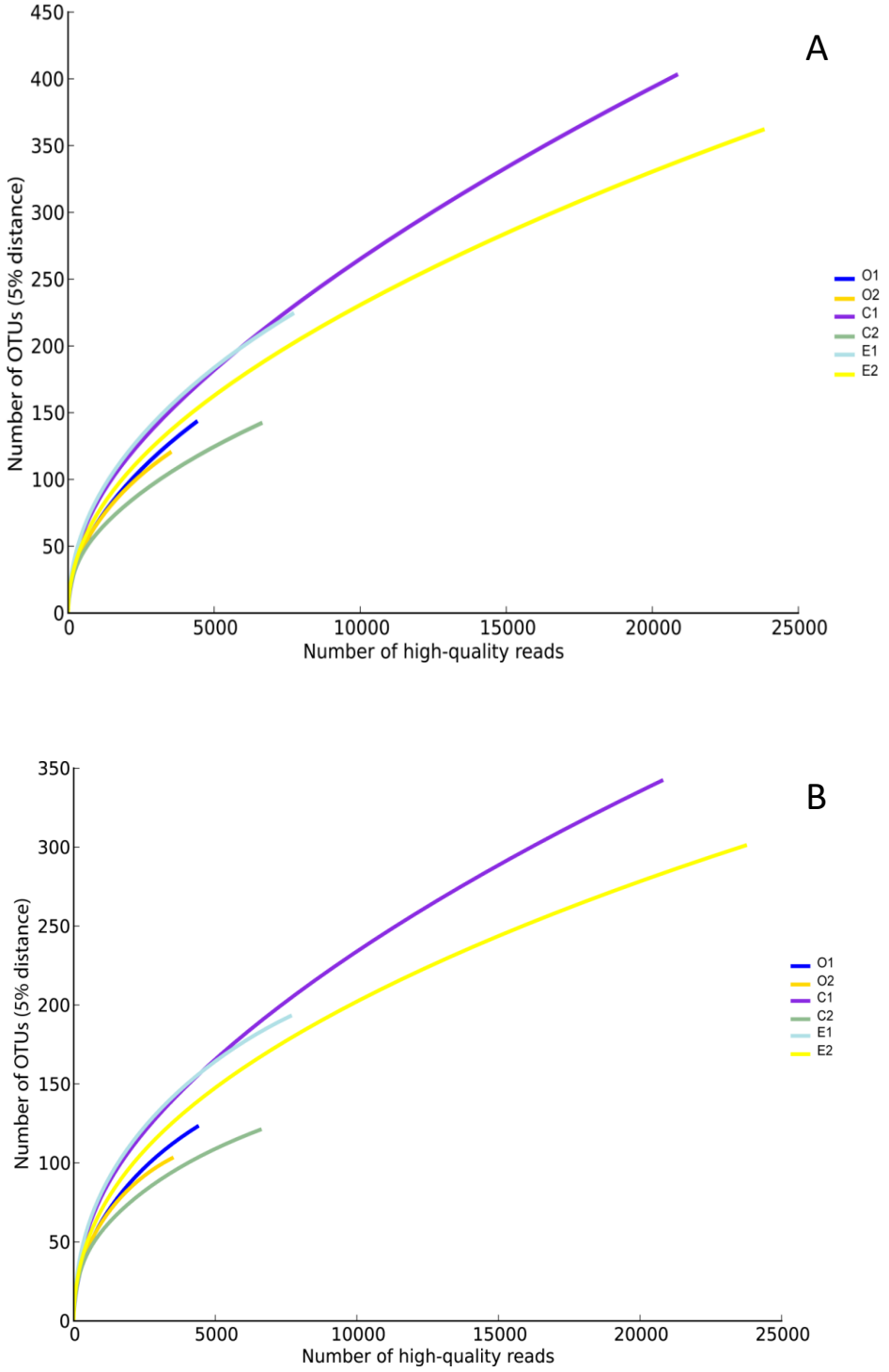


Fig. 1. Rarefaction curves for total high-quality 18S rDNA reads from Chardonnay grape must samples O1 and O2 (plot O), samples C1 and C2 (plot C) and samples E1 and E2 (plot E), obtained at a 5% distance level (A) and rarefaction curves normalized with respect to high-quality 18S rDNA library sizes at a 5% distance level (B).

Table 2. Percentage distribution (%) of yeast genera identified by pyrosequencing of 6 grape musts. Genera are listed in descending order according to their %

Genus	Grape musts					
	O1	**O2**	**C1**	**C2**	**E1**	**E2**
Metschnikowia	22.15	34.35	33.12	36.26	32.20	38.73
Aureobasidium	59.00	27.66	13.33	15.83	25.91	13.72
Cryptococcus	9.10	7.62	11.13	6.93	14.57	15.36
Candida	1.22	9.57	14.96	14.96	9.76	12.90
Hanseniaspora	4.72	10.18	15.88	14.52	4.73	4.53
Pichia	0.27	4.99	4.26	4.18	4.01	6.87
Sporobolomyces	0.91	0.32	2.62	2.72	3.39	2.84
Sporidiobolus	0.53	0.16	0.81	0.33	2.04	1.50
Bulgaria	0.38	0.12	1.28	1.22	0.46	0.18
Cystofilobasidium	0.15	0.08	0.36	0.63	0.74	1.13
Malassezia	0.08	2.15	0.05	-[a]	0.50	0.30
Saccharomyces	0.04	1.70	0.03	0.66	0.14	0.11
Rhodotorula	0.72	-	0.25	0.66	0.44	0.31
Mrakia	0.04	0.49	0.01	0.72	0.06	0.01
Glaciozyma	0.04	0.04	0.36	0.06	0.50	0.31
Starmerella	-	0.08	0.23	0.06	0.12	0.25
Wickerhamomyces	-	-	0.22	-	-	0.36
Tilletiopsis	0.04	0.16	0.13	0.06	0.16	-
Galactomyces	0.11	-	0.29	-	-	0.08
Issatchenkia	-	-	0.28	0.06	-	-
Kluyveromyces	0.11	-	0.14	-	-	-
Bensingtonia	-	-	0.06	-	-	0.12
Derxomyces	-	-	0.01	0.06	0.06	0.04
Hannaella	0.04	-	0.01	-	0.06	0.07
Dioszegia	0.15	-	-	-	-	-
Debaryomyces	-	-	0.05	-	-	0.10
Torulaspora	-	-	0.06	-	0.06	0.02
Trichosporon	-	0.08	-	-	0.02	0.02
Arthroderma	-	0.08	-	0.03	-	-
Hortaea	0.08	-	0.01	-	0.02	-
Rhodosporidium	-	-	0.01	0.06	-	0.03
Dipodascopsis	0.08	-	0.01	-	-	0.01
Kazachstania	-	0.08	0.01	-	-	0.01
Kockovaella	-	0.04	-	-	0.02	0.01
Geomyces	-	0.04	0.01	-	-	-
Lipomyces	-	-	-	-	0.02	0.02
Sirobasidium	0.04	-	-	-	-	-
Ustilago	-	-	-	-	-	0.03
Lachancea	-	-	-	-	-	0.02
Eremothecium	-	-	0.02	-	-	-
Filobasidiella	-	-	0.01	-	-	-
Kregervanrija	-	-	0.01	-	-	-
Vanderwaltozyma	-	-	0.01	-	-	-
Zygosaccharomyces	-	-	0.01	-	-	-
Bullera	-	-	-	-	-	0.01
Cyberlindnera	-	-	-	-	-	0.01
Schizosaccharomyces	-	-	-	-	-	-

[a] : not detected

Milanovi *et al.* 2013; Raspor *et al.* 2006; Subden *et al.* 2003). The remaining 38 genera identified were present in very low proportion, ≤ 0.5% of total population identified (average of 6 musts) (Table 2). To our knowledge, some of these genera (*Arthroderma, Bensingtonia, Derxomyces, Dipodascopsis, Eremothecium, Galactomyces, Geomyces, Glaciozyma, Hortaea, Kockovaella, Mrakia, Sirobasidium, Tilletiopsis, Vanderwaltozyma*) had never been identified and described in grape must. We observed that some genera (*Bullera, Cyberlindnera, Dioszegia, Eremothecium, Filobasidiella, Kregervanrija, Lachancea, Sirobasidium, Ustilago, Vanderwaltozyma* and *Zygosaccharomyces*) were in extreme minority and identified only in one sample, while others were present at very low percentage, ≤ 0.5% of total population identified (average of 6 musts) in the 6 samples (*Bulgaria, Cystofilobasidium, Glaciozyma, Mrakia* and *Saccharomyces*).

It should be noted that differences were observed between the populations identified by pyrosequencing for both must samples from the same plot (Table 2). These results suggest the need to use a larger number of samples and / or to increase the volume sampled to obtain results that are more reproducible and more representative of the diversity of the sample analyzed.

Characterization of the yeast biodiversity of grape must by FT-IR spectroscopy

Populations of cultivable yeasts in musts comprised between 3.8 x 10^3 and 5.3 x 10^4 CFU/mL (Table 3), which corresponds to the population usually found in grape must (Fleet 2003; Romano *et al.* 2006). The results of the identification of the 281 isolates at species level by FT-IR are given Table 3.

The 6 majority genera identified by pyrosequencing (> 4%) were also isolated and identified by FT-IR, but at different percentages. Only the genera *Metschnikowia* and *Pichia* were isolated in similar proportions to those found by pyrosequencing. The difference in the growth rate on YPD medium for the other 4 genera may have led to over or under-representation at the time of isolation. Indeed, the growing conditions seem to favor the development of the genus *Hanseniaspora* (>30%), *Issatchenkia* (1%) and the species *S. bacillaris* (20%). But these conditions are not favorable to the development of the genera *Aureobasidium* and *Cryptococcus*. The species *Cryptococcus laurentii* is described as incapable of growing optimally, at 28 °C (Smirnou *et al.* 2014), and the culture conditions pH 6.5 and temperature 30 °C are found to be most favorable for the better growth of *A. pullulans* (Jadhav and Gawai 2012).

Table 3. Percentage distribution (%) of yeast genera isolated from grape musts and identified by FT-IR spectroscopy.

Genus	Species	Grape musts					
		O1	**O2**	**C1**	**C2**	**E1**	**E2**
Hanseniaspora	*H. guilliermondii*	15.55	6.82	15.91	20.00	8.33	6.00
	H. uvarum	24.44	29.55	25.00	20.00	14.58	14.00
Metschnikowia	*spp*	37.78	47.73	15.91	18.00	37.50	28.00
Candida	*C. zemplinina*[a]	-[b]	2.27	31.82	24.00	27.08	36.00
Aureobasidium	*A. pullulans*	22.22	9.09	6.82	12.00	6.25	-[b]
Pichia	*P. farinosa*	-	-	-	2.00	-	-
	P. galeiformis	-	-	-	-	-	2.00
	P. membranifaciens	-	-	-		6.25	10.00
Cryptococcus	*C. adeliensis*	-	2.27	-	-	-	-
	C. laurentii	-	-	-	-	-	4.00
	C. magnus	-	2.27	-	-	-	-
Issatchenkia	*I. hanoiensis*	-	-	2.27	-	-	-
	I. scutulata	-	-	-	2.00	-	-
	I. terricola	-	-	2.27		-	-
Number of isolates		45	44	44	50	48	50
Yeast population (CFU/mL)		$4.9x10^3$ (±4%)	$3.8x10^3$ (±13%)	$4.3x10^4$ (±7%)	$5.3x10^4$ (±6%)	$3.4x10^4$ (±9%)	$2.9x10^4$ (±7%)

[a] recently renamed *Starmerella bacillaris*, -[b] : not detected

The presence of viable but nonculturable yeasts led to an underestimation of some genera by FT-IR. This physiological state has already been shown in wine (Divol and Lonvaud-Funel 2005) and is detected by flow cytometry (Salma *et al.* 2013; Serpaggi *et al.* 2012). These hypotheses could partly explain the differences observed between pyrosequencing and FT-IR spectroscopy. Otherwise, the possible detection of already dead yeast by pyrosequencing could lead to an overestimation of some genera. To solve this problem PMA- PCR or EMA- PCR could be used to eliminate the DNA of dead cells upstream of the extraction step (Andorrà *et al.* 2010; Nocker *et al.* 2007). Finally, the variability in the number of copies and intragenomic variation of rDNA (Ganley and Kobayashi 2007; Simon and Weiss 2008; Thornhill *et al.* 2007) may lead to misinterpretation concerning biodiversity or population composition using a metagenomic approach.

The genera not identified by FT-IR but identified by pyrosequencing were minority genera and each one represented less than 1% of the total yeast population, except for *Sporobolomyces* with 2.1 % (average of 6 musts).

The genus *Saccharomyces*, the main actor of alcoholic fermentation (AF), was also present in all the samples characterized by pyrosequencing, but in very low proportion (between 0.03% and 1.7%) and it was never isolated in the musts studied. Previous works using culture dependent methods have also reported the absence of the genus *Saccharomyces* (Barata *et al.* 2012; David *et al.* 2014; Martini *et al.* 1996; Mortimer and Polsinelli, 1999). The scarce presence and low proportion of this genus before AF was confirmed by the results obtained by both the methods used in our study.

Pyrosequencing allows identifying a large number of genera including minority genera and obtaining an accurate and realistic picture of the populations present in an ecosystem. Although not all the genera present were accessible for identification by FT-IR, the majority genera were isolated and identified. David *et al.* (2014) have compared the ability of different methods (DGGE, PCR ITS-RFLP) to pyrosequencing method to study the diversity of a sample and they achieve the same results: the majority genera are identified whatever the methods used compared to pyrosequencing but these methods do not give access to minority genera.

For the seven majority isolated genera, different species were identified by FT-IR, for the genera *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia* and *Pichia*. The 2 species identified for the genus *Hanseniaspora* are commonly described in the literature (Beltran *et al.* 2002; Chavan *et al.* 2009; Li *et al.* 2010). Despite a low representation for the genera *Cryptococcus*, *Issatchenkia* and *Pichia*, three different species were identified by FT-IR (Table 3). Three of these species *I. scutulata*, *P. farinosa* and *P. galeformis* have in our knowledge never been isolated and described on grape berries. As already reported in the literature, the species *Aureobasidium pullulans* was isolated in this study (Pardo *et al.* 1989; van Keulen *et al.* 2003). Discrimination of several very close species of the genus *Metschnikowia* (Kurtzman et Droby, 2001; Nguyen *et al.* 2006; Suh *et al.* 2004) is not currently possible with this method. By pyrosequencing method used in this study, no identification at species level is possible. It is a disadvantage of this technique for the moment.

Although twenty species belonging to the genus *Candida* were reported on grape berries (Sadoudi 2014), all 58 isolates in this work were identified by FT-IR as the species *Candida zemplinina*, recently renamed *Starmerella bacillaris* (Duarte *et al.* 2012). This species is widely described as one of the majority species present on grapes and during fermentation (Csoma and Sipiczki 2008). Various oenological interesting characteristics have been highlighted for *Starmerella bacillaris* (Tofalo *et al.* 2009; Magyar and Tóth 2011; Rantsiou *et al.* 2012;

Englezos *et al.* 2015). However, these characteristics are strain dependent. So, we have continued this work by studying intraspecific diversity by FT-IR to see the variability and distribution of different strains within the different plots. Are there specific strains? This level of resolution is currently impossible with a metagenomic approach.

Using HCA of the FT-IR spectra of 58 isolates, 19 different profiles corresponding to 19 different strains were obtained (Fig. 2). These results were confirmed by sequencing. The ITS sequence of a representative strain of each profile was obtained and a phylogenetic tree was calculated (Fig. 3). So for this species we confirmed that all the branches above a spectral distance of 0.3 were sub-clusters, i.e. different strains, according to Kümmerle *et al.* (1998) and applied in a previous work for the species *Hanseniaspora guilliermondii* and H. *uvarum* (Grangeteau *et al.* 2015).

No common strain in 6 musts was isolated and identified. Only strain A was isolated in two musts from two different plots (C and E), likewise with strain D found in musts from plots C and O. It would be interesting to follow the evolution of these strains during alcoholic fermentation and see if these strains are adapted to the conditions of vinification. Among the 19 strains identified, 11 strains (strains B, E, F, H, I, J, K, M, N, R and S) were isolated only once, demonstrating considerable intra-specific diversity in the musts studied. Our results confirmed previous works using different molecular methods to study intraspecific diversity (Tofalo *et al.* 2012, Masneuf-Pomarede *et al.* 2015).

In view of the intra-specific variability of enological characteristics between yeast species (Tofalo *et al.* 2012; Viana *et al.* 2008) and the development of commercial non-*Saccharomyces* starters, it is becoming essential to discriminate non-*Saccharomyces* yeast at species and strain levels. The FT-IR spectroscopy method seems highly appropriate for this kind of work.

FT-IR spectroscopy is widely employed in the food industry and the medical sector but has rarely been applied to wine. The results obtained demonstrate that FT-IR is an accurate and reliable method for identifying major genera present in musts. It is the first time that this method has served to study wine microbial ecology. The two biggest advantages of the FT-IR are the capacity for studying intraspecific NS yeast biodiversity and the possibility to manage a lot of number of strains. And compared to FT-IR, 454 pyrosequencing is expensive and no identification at strain levels is possible. Moreover, the use of FT-IR

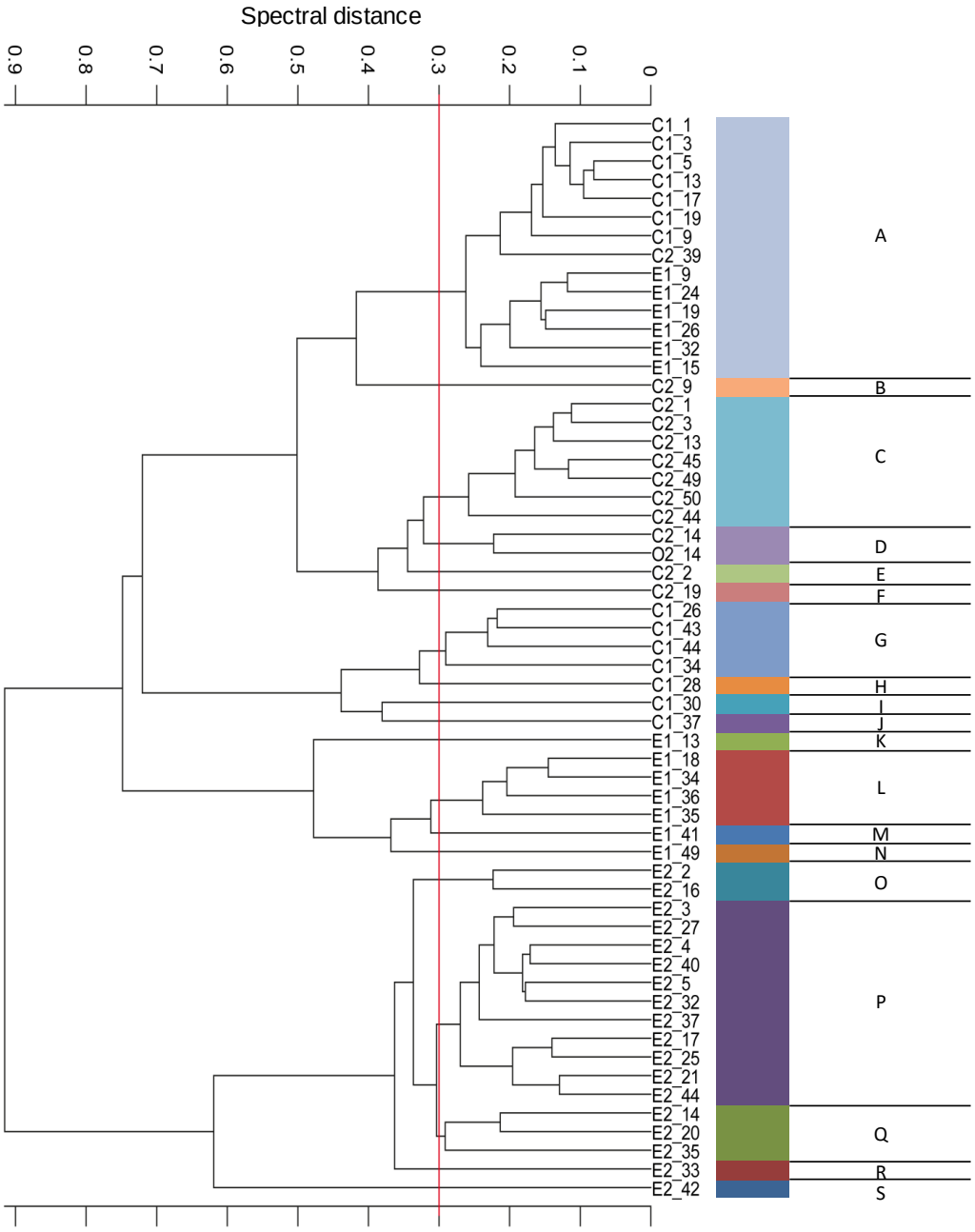


Fig. 2. Hierarchical classification of the average second derivative of 58 spectra of *Starmellera bacillaris* isolates of 6 grape musts using the spectral windows 3,032 cm^{-1} to 2,829 cm^{-1}, 1,351 cm^{-1} to 1,200 cm^{-1}, and 901 cm^{-1} to 699 cm^{-1}. Red line represents the threshold at 0.3 for strain discrimination.

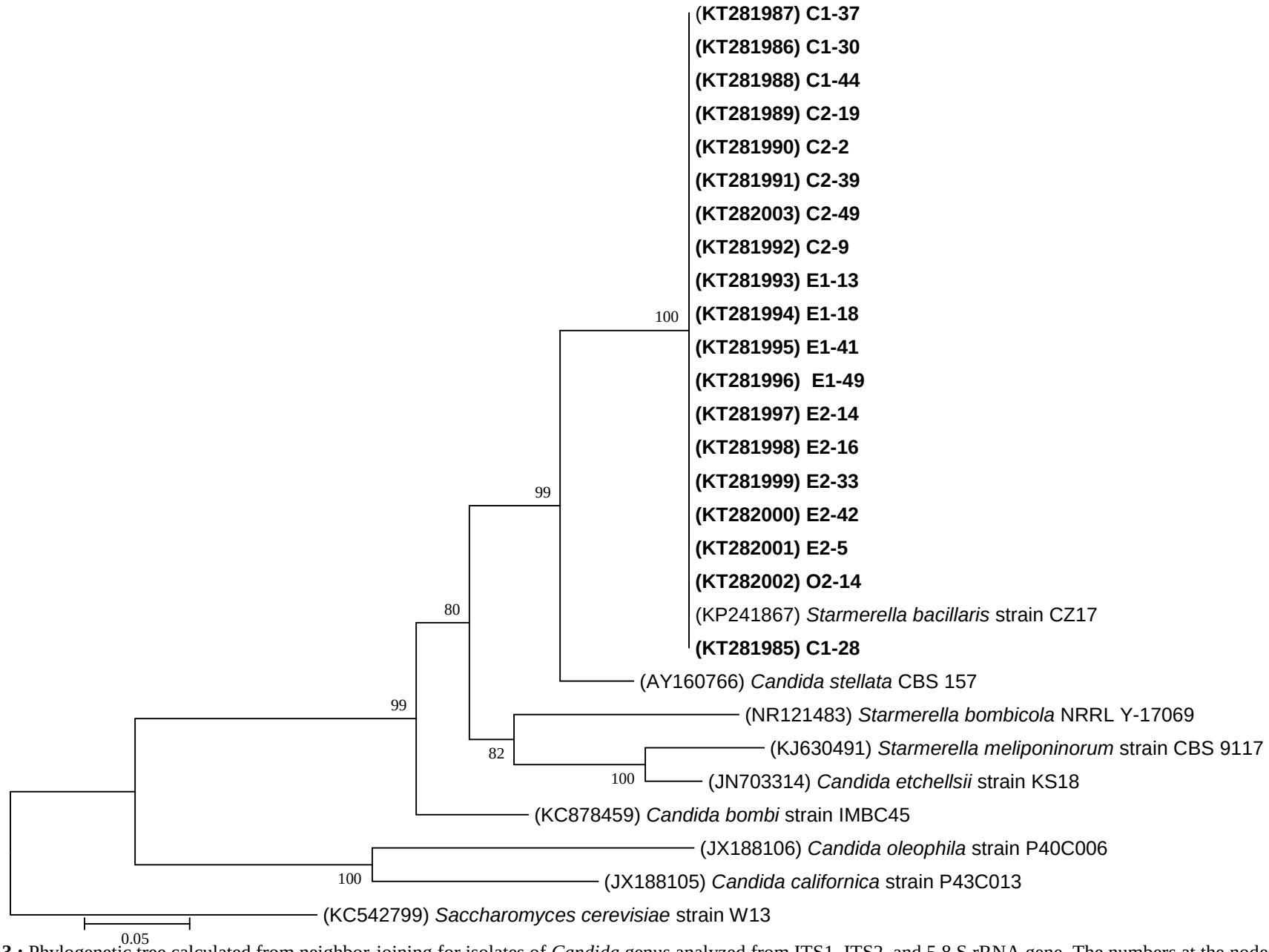


Fig. 3 : Phylogenetic tree calculated from neighbor-joining for isolates of *Candida* genus analyzed from ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene. The numbers at the nodes indicate the bootstrap support in percentage based on 1000 replication. Branch lengths are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. *Saccharomyces cerevisiae* was used as outgroups. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

provides access to living microorganisms, which are of great interest in enology because they can possibly develop during the winemaking process. Our work confirms the low interspecific diversity of the genus *Candida* in musts, as only one species was identified by the FT-IR method.

However the considerable biodiversity at the intraspecific level in the musts studied was highlighted by hierarchical cluster analysis and demonstrated the power of intraspecific discrimination by FT-IR. As demonstrated for the genus *Saccharomyces*, the wine environment also reveals a wide variety of yeast strains belonging to non-*Saccharomyces* strains. Given the physiological variability that can exist within a species, access to strain biodiversity provides more effective screening and selection of new enological strains of interest. The FT-IR technology would track the implementation of a given species of non-*Saccharomyces* yeast from the vineyard to the end of AF and study the persistence of these NS strains from one year to another.

Acknowledgments

This work was funded by the Regional Council of Burgundy and the Interprofessional Office of Burgundy wines.

A thanks to the Institute of Microbiology and Biochemistry of the Hochschule Geisenheim University for cooperation and to have the access to the FTIR spectroscopy unit.

References

Adt I, Kohler A, Gognies S. FTIR spectroscopic discrimination of Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces bayanus strains. *Can J Microbiol* 2010;**801**:793–801.

Aggarwal R, Tripathi A, Yadav A. Pathogenic and genetic variability in Tilletia indica monosporidial culture lines using universal rice primer-PCR. *Eur J Plant Pathol* 2010;**128**:333–42.

Albertin W, Miot-Sertier C, Bely M *et al.* Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *Int J Food Microbiol* 2014;**178**:87–97.

Andorrà I, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM *et al.* Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 2010;**144**:257–62.

Andrade MJ, Rodriguez M, Sánchez B *et al.* DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol* 2006;**107**:48–58.

Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 2012;**153**:243–59.

Barata A, Seborro F, Belloch C *et al.* Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew

and sour rot. *J Appl Microbiol* 2008;**104**:1182–91.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D *et al.* Yeasts: Characteristics And Identification, 3Rd Edition (English) Third edition Edition. 2000.

de Barros Lopes M, Rainieri S, Henschke PA *et al.* AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int J Syst Bacteriol* 1999;**49**:915–24.

Beltran G, Torija MJ, Novo M *et al.* Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol* 2002;**25**:287–93.

Benito ÁG. enumeration of acetic acid bacteria. 2005:1–128.

Bokulich A. N, Ohta M, Richardson PM *et al.* Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. Mormile MR (ed.). *PLoS One* 2013;**8**:e66437.

Bokulich A. N, Thorngate JH, Richardson PM *et al.* Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**:E139–48.

Bokulich N a, Joseph CML, Allen G *et al.* Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PLoS One* 2012;**7**:e36357.

Bokulich N a, Mills D a. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Rep* 2012;**45**:377–89.

Bornet B, Muller C, Paulus F *et al.* Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (Brassica oleracea var . botrytis L .). 2002;**896**:890–6.

Carle GF, Olson M V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1984;**12**:5647–64.

Chavan P, Mane S, Kulkarni G *et al.* Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiol* 2009;**26**:801–8.

Chemidlin Prévost-Bouré N, Christen R, Dequiedt S *et al.* Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One* 2011;**6**:e24166.

Ciani M, Comitini F, Mannazzu I *et al.* Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 2010;**10**:123–33.

Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P. Contribution of winery-resident Saccharomyces cerevisiae strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004;**85**:159–64.

Cocolin L, Mills DA, Ej C *et al.* Wine Yeast Inhibition by Sulfur Dioxide: A Comparison of Culture-Dependent and Independent Methods Materials and Methods. *Am J Enol Vitic* 2003;**54**:125–30.

Cole JR, Wang Q, Cardenas E *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2009;**37**:D141–5.

Comitini F, Gobbi M, Domizio P *et al.* Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with Saccharomyces cerevisiae. *Food Microbiol* 2011;**28**:873–82.

Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A *et al.* Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int J Food Microbiol* 2011;**145**:132–9.

Csoma H, Sipiczki M. Taxonomic reclassification of Candida stellata strains reveals frequent occurrence of Candida zemplinina in wine fermentation. *FEMS Yeast Res* 2008;**8**:328–36.

Dalle F, Franco N, Lopez J *et al.* Comparative genotyping of Candida albicans bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:4554–9.

David V, Terrat S, Herzine K *et al.* High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014, DOI: 10.1007/s10295-014-1427-2.

Devarumath RM, Rani V, Marimuthu S *et al.* RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing Camellia sinensis (China type) and C. assamica ssp. assamica (Assam-India type). *Plant Cell Rep* 2002;**21**:166–73.

Diguta CF, Vincent B, Guilloux-Benatier M *et al.* PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiol* 2011;**28**:1145–54.

Divol B, Lonvaud-Funel a. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J Appl Microbiol* 2005;**99**:85–93.

Divol B, du Toit M, Duckitt E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;**95**:601–13.

Duarte FL, Pimentel NH, Teixeira A *et al.* Saccharomyces bacillaris is not a synonym of Candida stellata: Reinstatement as Starmerella bacillaris comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012;**102**:653–8.

El-Assal S, Abd-alla S, Seada M. Molecular and biochemical studies of some yeast strains. *African J Biotechnol* 2013;**10**:1309–19.

EL-Fiky Z, Hassan G, Emam A. Quality Parameters and RAPD-PCR Differentiation of Commercial Baker's Yeast and Hybrid Strains. *J Food Sci* 2012;**77**:312–7.

Englezos V, Rantsiou K, Torchio F *et al.* Exploitation of the non- Saccharomyces yeast Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina) in wine fermentation : Physiological and molecular characterizations. *Int J Food Microbiol* 2015;**199**:33–40.

Essendoubi M, Toubas D, Bouzaggou M *et al.* Rapid identification of Candida species by FT-IR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2005;**1724**:239–47.

Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 1999a;**49 Pt 1**:329–37.

Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 1999b;**49 Pt 1**:329–37.

Esteve-zarzoso B, Belloch C, Uruburul F *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5 . 85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. 1999:329–37.

Esteve-Zarzoso B, Peris-Torán MJ, Ramón D *et al.* Molecular characterisation of Hanseniaspora species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001;**80**:85–92.

Feller W. *An Introduction to Probability Theory and Its Applications*. 3nd ed. John Wiley & Sons Inc. (ed.)., 1968.

Fernádez-Espinar MT, Esteve-Zarzoso B, Querol a *et al.* RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus Saccharomyces: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2000;**78**:87–97.

Fischer G, Braun S, Thissen R *et al.* FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J Microbiol Methods* 2006;**64**:63–77.

Fleet G. Yeasts in fruit and fruit products. *Yeasts Food Benef Detrimental Asp* 2003:13–54.

Ganley ARD, Kobayashi T. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats : Total rDNA

repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. 2007:184–91.

Garijo P, Santamaría P, López R *et al.* The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int J Food Microbiol* 2008;**125**:141–5.

Goerges S, Mounier J, Rea MC *et al.* Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South german red smear cheese. *Appl Environ Microbiol* 2008;**74**:2210–7.

Granchi L, Bosco M, Messini a *et al.* Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J Appl Microbiol* 1999;**87**:949–56.

Grangeteau C, Gerhards D, Rousseaux S *et al.* Diversity of yeast strains of the genus Hanseniaspora in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiol* 2015;**50**:70–7.

Guillamón J, Sabaté J, Barrio E. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch …* 1998:387–92.

Hadrys H, Balick M, Schierwater B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol* 1992;**1**:55–63.

Helm D, Labischinski H, Naumann D. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: A stepwise correlation approach. *J Microbiol Methods* 1991;**14**:127–42.

Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P *et al.* Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J Appl Microbiol* 1998;**84**:865–76.

Hierro N, González a, Mas A *et al.* New PCR-based methods for yeast identification. *J Appl Microbiol* 2004;**97**:792–801.

Hierro N, González A, Mas A *et al.* Diversity and evolution of non-Saccharomyces yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res* 2006;**6**:102–11.

Jadhav D, Gawai D. Effect Of pH And Temperature on Growth of Phylloplane Yeast Aureobasidium pullulans (De Bary) G. Arnaud. 2012;**2**:159–62.

Jana TK, Singh NK, Koundal KR *et al.* Genetic differentiation of charcoal rot pathogen , Macrophomina phaseolina , into specific groups using URP-PCR. 2005;**164**:159–64.

Le Jeune C, Erny C, Demuyter C *et al.* Evolution of the population of Saccharomyces cerevisiae from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol* 2006;**23**:709–16.

Kang H-W, Park D, Go S *et al.* Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol Cells* 2002;**13**:281–7.

van Keulen H, Lindmark DG, Zeman KE *et al.* Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 2003;**83**:149–54.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;**16**:111–20.

Kümmerle M, Scherer S, Seiler H. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 1998;**64**:2207–14.

Kurtzman CP, Droby S. Metschnikowia fructicola, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Syst Appl Microbiol* 2001;**24**:395–9.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The Yeasts : A Taxonomic Study 978-0-444-52149-1 | Elsevier. 2011.

Lambrechts MG, Pretorius IS. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African J Enol Vitic*

2000;**21**:97–129.

Lecellier A, Mounier J, Gaydou V *et al.* Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol* 2014;**168-169**:32–41.

Lee DC, Chapman D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. *Biosci Rep* 1986;**6**:235–56.

Legras J-L, Ruh O, Merdinoglu D *et al.* Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of Saccharomyces cerevisiae strains. *Int J Food Microbiol* 2005;**102**:73–83.

Li S-S, Cheng C, Li Z *et al.* Yeast species associated with wine grapes in China. *Int J Food Microbiol* 2010;**138**:85–90.

de Llanos Frutos R, Fernández-Espinar MT, Querol A. Identification of species of the genus Candida by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004;**85**:175–85.

Lopes B, Soden A, Henschke PA *et al.* PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol* 1996;**62**:4514–20.

Lyu C, Chen C, Ge F *et al.* A preliminary metagenomic study of puer tea during pile fermentation. *J Sci Food Agric* 2013;**93**:3165–74.

Magyar I, Tóth T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of Candida stellata, Candida zemplinina, Saccharomyces uvarum and Saccharomyces cerevisiae. *Food Microbiol* 2011;**28**:94–100.

Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C *et al.* Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PLoS One* 2013;**8**:e69371.

Martini A, Ciani M, Scorzetti G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am J Enol Vitic* 1996;**47**:435–40.

Masneuf-Pomarede I, Juquin E, Miot-Sertier C *et al.* The yeast Starmerella bacillaris (synonym Candida zemplinina) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Res* 2015;**15**:1–11.

Mercado L, Dalcero a, Masuelli R *et al.* Diversity of Saccharomyces strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol* 2007;**24**:403–12.

Milanović V, Comitini F, Ciani M. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *Int J Food Microbiol* 2013;**161**:240–6.

Mills DA, Johannsen EA, Cocolin L. Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-Affected Wine Fermentations. *Appl Environ Microbiol* 2002;**68**:4884–93.

Molnár O, Prillinger H. Analysis of yeast isolates related to Metschnikowia pulcherrima using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of Metschnikowia andauensis sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2005;**28**:717–26.

Moreira N, Mendes F, Hogg T *et al.* Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol* 2005;**103**:285–94.

Mortimer R, Polsinelli M. On the origins of wine yeast. *Res Microbiol* 1999;**150**:199–204.

Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *TAG Theor Appl Genet* 1997;**94**:597–602.

Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*

1991;**351**:81–2.

Nguyen NH, Suh S-O, Erbil CK *et al.* Metschnikowia noctiluminum sp. nov., Metschnikowia corniflorae sp. nov., and Candida chrysomelidarum sp. nov., isolated from green lacewings and beetles. *Mycol Res* 2006;**110**:346–56.

Nisiotou A a, Spiropoulos AE, Nychas G-JE. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:6705–13.

Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. Viable Saccharomyces cerevisiae cells at high concentrations cause early growth arrest of non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 2003;**20**:331–41.

Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD *et al.* Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 2007;**73**:5111–7.

Ocón E, Garijo P, Sanz S *et al.* Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control* 2013a;**30**:585–9.

Ocón E, Garijo P, Sanz S *et al.* Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination. *Food Control* 2013b;**34**:261–7.

Ocón E, Gutiérrez a R, Garijo P *et al.* Presence of non-Saccharomyces yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiol* 2010;**27**:1023–7.

Ocón E, Gutiérrez a R, Garijo P *et al.* Factors of influence in the distribution of mold in the air in a wine cellar. *J Food Sci* 2011;**76**:M169–74.

Oelofse a., Malherbe S, Pretorius IS *et al.* Preliminary evaluation of infrared spectroscopy for the differentiation of Brettanomyces bruxellensis strains isolated from red wines. *Int J Food Microbiol* 2010;**143**:136–42.

Pardo I, García MJ, Zúñiga M *et al.* Dynamics of Microbial Populations during Fermentation of Wines from the Utiel-Requena Region of Spain Dynamics of Microbial Populations during Fermentation of Wines from the Utiel-Requena Region of Spain. 1989.

Pathania N, Kanwar SS, Jhang T *et al.* Application of different molecular techniques for deciphering genetic diversity among yeast isolates of traditional fermented food products of Western Himalayas. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;**26**:1539–47.

Pérez-Martín F, Seseña S, Fernández-González M *et al.* Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int J Food Microbiol* 2014;**190**:44–53.

Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T *et al.* Cellular death of two non-Saccharomyces wine-related yeasts during mixed fermentations with Saccharomyces cerevisiae. *Int J Food Microbiol* 2006;**108**:336–45.

Peterson SW, Kurtzman CP. Ribosomal RNA Sequence Divergence Among Sibling Species of Yeasts. *Syst Appl Microbiol* 1991;**14**:124–9.

Pinto C, Pinho D, Sousa S *et al.* Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS One* 2014;**9**:e85622.

Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 2004;**4**:865–77.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;**41**:D590–6.

Rantsiou K, Dolci P, Giacosa S *et al.* Candida zemplinina can reduce acetic acid produced by Saccharomyces cerevisiae in sweet wine fermentations. *Appl Environ Microbiol* 2012;**78**:1987–94.

Raspor P, Milek DM, Polanc J *et al.* Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations

of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int J Food Microbiol* 2006;**109**:97–102.

Rodríguez ME, Lopes C a, Barbagelata RJ *et al.* Influence of Candida pulcherrima Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *Int J Food Microbiol* 2010;**138**:19–25.

Romano P, Capece a., Jespersen L. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. *Yeasts in Food and Beverages.* 2006, 13–53.

Rycovska a. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in Candida parapsilosis. *Microbiology* 2004;**150**:1571–80.

Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B *et al.* Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res* 2002;**157**:267–74.

Sabate J, Cano J, Querol a. *et al.* Diversity of Saccharomyces strains in wine fermentations: Analysis for two consecutive years. *Lett Appl Microbiol* 1998;**26**:452–5.

Sadoudi M, Tourdot-Maréchal R, Rousseaux S *et al.* Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-Saccharomyces and Saccharomyces yeasts. *Food Microbiol* 2012;**32**:243–53.

Sadoudi M. Intérêt biotechnologique des levures indigènes non- Saccharomyces. 2014.

Saitou N, Masatoshi N. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol* 1987;**4**:406–25.

Salma M, Rousseaux S, Sequeira-Le Grand A *et al.* Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in Saccharomyces cerevisiae. *PLoS One* 2013;**8**:e77600.

Sandt C, Madoulet C, Kohler a *et al.* FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. *J Appl Microbiol* 2006;**101**:785–97.

Sannino C, Francesca N, Corona O *et al.* Effect of the natural winemaking process applied at industrial level on the microbiological and chemical characteristics of wine. *J Biosci Bioeng* 2013;**xx**, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.03.005.

Santamaría P, Garijo P, López R *et al.* Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int J Food Microbiol* 2005;**103**:49–56.

Schmalreck AF, Tränkle P, Vanca E *et al.* [Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans (Candida albicans, Exophiala dermatitidis) and algae pathogenic for animals (Prototheca spp.) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional method. *Mycoses* 1998;**41 Suppl 1**:71–7.

Serpaggi V, Remize F, Recorbet G *et al.* Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast Brettanomyces. *Food Microbiol* 2012;**30**:438–47.

Shapaval V, Schmitt J, Møretrø T *et al.* Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *J Appl Microbiol* 2012:1–9.

Sharma M, Gupta SK, Sharma TR. Characterization of Variability in Rhizoctonia solani by Using Morphological and Molecular Markers. *J Phytopathol* 2005;**153**:449–56.

Simon UK, Weiss M. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Mol Biol Evol* 2008;**25**:2251–4.

Sipiczki M. Candida zemplinina sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;**53**:2079–83.

Sipiczki M. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of Candida zemplinina

and Candida stellata. *J Basic Microbiol* 2004;**44**:471–9.

Smirnou D, Hrubošová D, Kulhánek J *et al.* Cryptococcus laurentii Extracellular Biopolymer Production for Application in Wound Management. *Appl Biochem Biotechnol* 2014;**174**:1344–53.

Soden a, Francis IL, Oakey H *et al.* Effects of co-fermentation with Candida stellata and Saccharomyces cerevisiae on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine Res* 2000;**6**:21–30.

Solieri L, Landi S, De Vero L *et al.* Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. *J Appl Microbiol* 2006;**101**:63–71.

Subden RE, Husnik JI, van Twest R *et al.* Autochthonous microbial population in a Niagara Peninsula icewine must. *Food Res Int* 2003;**36**:747–51.

Suh S-O, Gibson CM, Blackwell M. Metschnikowia chrysoperlae sp. nov., Candida picachoensis sp. nov. and Candida pimensis sp. nov., isolated from the green lacewings Chrysoperla comanche and Chrysoperla carnea (Neuroptera: Chrysopidae). *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;**54**:1883–90.

Taylor MW, Tsai P, Anfang N *et al.* Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ Microbiol* 2014;**16**:2848–58.

Tello J, Cordero-Bueso G, Aporta I *et al.* Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 2012;**112**:302–15.

Terrat S, Christen R, Dequiedt S *et al.* Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb Biotechnol* 2012;**5**:135–41.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;**25**:4876–82.

Thornhill DJ, Lajeunesse TC, Santos SR. Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Mol Ecol* 2007;**16**:5326–40.

Timmins EM, Howell S a, Alsberg BK *et al.* Rapid differentiation of closely related Candida species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:367–74.

Timmins EM, Quain DE, Goodacre R. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeast* 1998;**14**:885–93.

Tofalo R, Chaves-López C, Di Fabio F *et al.* Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *Int J Food Microbiol* 2009;**130**:179–87.

Tofalo R, Schirone M, Torriani S *et al.* Diversity of Candida zemplinina strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiol* 2012;**29**:18–26.

Toubas D, Essendoubi M, Adt I *et al.* FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of Candida. *Anal Bioanal Chem* 2007;**387**:1729–37.

Udelhoven T, Naumann D, Schmitt J. Development of a Hierarchical Classification System with Artificial Neural Networks and FT-IR Spectra for the Identification of Bacteria. *Appl Spectrosc* 2000;**54**:1471–9.

Valente P, Ramos JP, Leoncini O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can J Microbiol* 1999;**45**:949–58.

Valles BS, Bedriñana RP, Tascón NF *et al.* Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol* 2007;**24**:25–31.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to

fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**:6823–31.

Viana F, Gil J V, Genovés S *et al.* Rational selection of non-Saccharomyces wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiol* 2008;**25**:778–85.

Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;**23**:4407–14.

Wang C, Liu Y. Dynamic study of yeast species and Saccharomyces cerevisiae strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. *Food Microbiol* 2013;**33**:172–7.

Wenning M, Seiler H, Scherer S. Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy , a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. 2002;**68**:4717–21.

White T, Bruns T, Lee S *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc a Guid to* 1990.

2 Echantillonnage et représentativité

Outre la fiabilité des méthodes d'identification, il est important que l'échantillon prélevé soit représentatif de l'ensemble de l'environnement que l'on cherche à caractériser afin d'obtenir la vision la plus réaliste possible des populations présentes dans cet environnement. Comme cela a déjà été démontré, cette représentativité est particulièrement difficile à obtenir pour les populations fongiques présentes sur les baies de raisin en raison de la forte variabilité intra-parcellaire pouvant exister (Setati et al., 2012).

Afin de s'assurer que notre méthodologie d'échantillonnage était représentative, les deux rangs (3 et 5) de la modalité C (conventionnel) ont été divisés en 3 blocs dans le sens de la longueur afin d'évaluer la variabilité spatiale des populations au sein d'une même modalité (Fig. 12B). Pour chacun de ces blocs, 10 baies par pied ont été prélevées le long de ces 2 rangs puis pressées en conditions stériles et un prélèvement de moût a été réalisé pour analyse de la population fongique cultivable par spectroscopie IR-TF (Tbaies Haut, Milieu et Bas). De plus, pour cette modalité, les grappes restantes de l'ensemble des rangs 3 et 5 ont été récoltées, mises en caisse et transportées jusqu'à la cuverie du BIVB. 300 baies au total ont alors été prélevées à partir de ces caisses, puis pressées en conditions stériles et un prélèvement de moût a été réalisé pour analyse de la population fongique cultivable par spectroscopie IR-TF (Tbaies caisses). Ceci est réalisé dans le but de pouvoir comparer les populations obtenues à partir des prélèvements de baies provenant des 3 blocs (Tbaies Haut, Milieu et Bas) aux populations obtenues à partir du prélèvement de baies provenant des caisses après récolte (Tbaies caisses). A partir des 4 moûts ainsi obtenus, 50, 45, 45 et 45 isolats ont été respectivement identifiés pour le haut, le milieu, le bas de la parcelle et pour le prélèvement Tbaies caisses. Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure 15.

Seuls deux genres, *Aureobasidium* et *Cryptococcus* sont communs aux 4 moûts avec des pourcentages variables d'un prélèvement à l'autre. Le genre *Aureobasidium* est le genre majoritairement isolé pour les 4 moûts ; en effet, il représente 60 à 80% de la population fongique identifiée. Le genre *Cryptococcus* est lui présent entre 11 et 28%. Certains genres s'avèrent spécifiques d'un prélèvement. Ainsi, le genre *Sporobolomyces*, à raison de 2 isolats, n'est isolé que dans le cas du prélèvement Tbaies caisses. Il est possible que ce genre se soit implanté lors de la récolte ou lors du transport à partir du matériel de récolte ou des caisses (Ribéreau-Gayon et al., 2004).

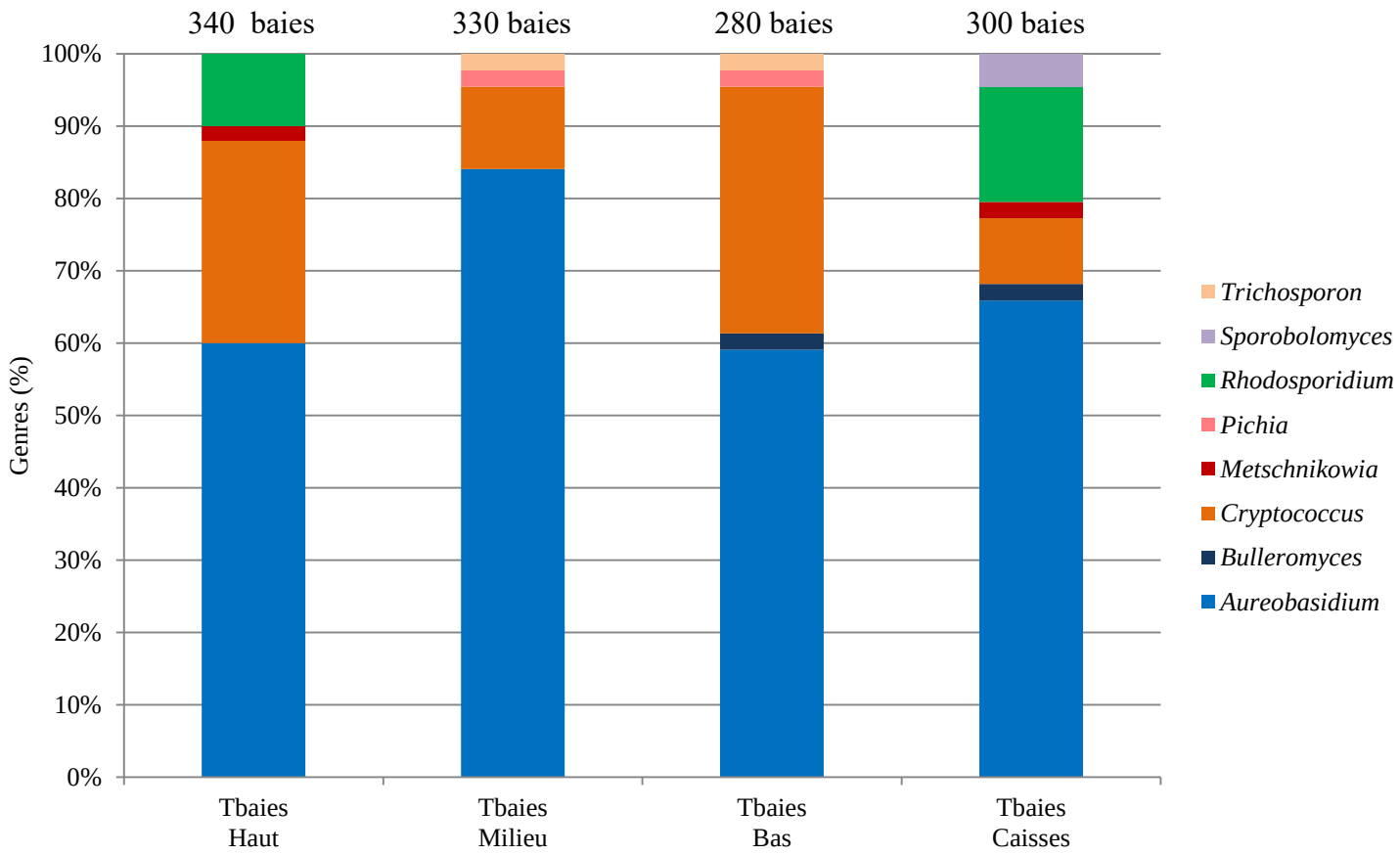


Figure 15. Répartition des différents genres levuriens isolés des baies issues du haut, du milieu et du bas de la parcelle et des caisses pour la modalité C.

D'autres genres ne se retrouvent que pour deux prélèvements sur les 4. C'est le cas pour les genres *Metschnikowia* et *Rhodosporidium,* isolés à partir des prélèvements Tbaies Haut et Tbaies Caisses, pour le genre *Bulleromyces,* isolé à partir des prélèvements Tbaies Bas et Tbaies Caisses, et pour les genres *Pichia* et *Trichosporon,* isolés uniquement pour les prélèvements Tbaies Milieu et Tbaies Bas.

Il est à noter que les trois genres les plus isolés à partir de l'échantillon Tbaies caisses : *Aureobasidium, Cryptoccoccus* et *Rhodosporidium* représentent également le plus grand nombre d'isolats sur l'ensemble des 3 blocs de la parcelle. Bien que des variabilités intra-parcellaires existent dans les proportions des genres levuriens isolés, ces variations concernent plus particulièrement des genres très minoritaires. En effet, les genres *Bulleromyces, Metschnikowia, Pichia* et *Trichosporon* n'ont été isolés au maximum qu'une seule fois par échantillon. Leur absence dans certains échantillons peut sans doute être attribuée à un trop faible nombre d'isolats plus qu'à une réelle absence dans le bloc parcellaire. En effet comme le montrent les résultats du paragraphe 1 de ce chapitre, 50 isolats semblent être insuffisants pour un recouvrement de la totalité des populations présentes et beaucoup de genres minoritaires peuvent être ignorés.

Néanmoins, la technique de spectroscopie IR-TF ainsi que le mode de prélèvement des baies et le nombre d'isolats que nous avons utilisés pour caractériser la biodiversité fongique des baies de raisin permettent d'avoir aisément accès aux genres majoritaires levuriens présents sur les baies.

Chapitre IV - Origine des levures présentes dans le moût de raisin.

Compte tenu de son rôle important lors de la fermentation alcoolique, l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* a été étudiée par de très nombreux auteurs afin de déterminer son origine, sa capacité de dissémination et de persistance dans différents environnements. Ces études ont mis en avant la faible présence voire l'absence de cette espèce sur les baies de raisin (Mortimer et Polsini, 1999 ; Combina et al., 2005 ; Valero et al., 2007), démontrant ainsi que la baie de raisin constitue une source très occasionnelle des levures de cette espèce retrouvée dans les moûts ou au cours de la fermentation alcoolique. À l'inverse, des levures de l'espèce *S. cerevisiae* sont régulièrement retrouvées dans les différents compartiments de la cuverie (matériels vinaire, murs, sol, air) (Ocon et al., 2010 ; Bokulich et al., 2013 ; Pérez-Martin et al., 2014). Plusieurs études ont montré que certaines souches de *S. cerevisiae* étaient capables de persister pendant plusieurs années dans l'environnement de la cuverie et de participer à la fermentation alcoolique (Ciani et al., 2004 ; Santamaria et al., 2005 ; Mercado et al., 2007). Pour cette espèce, l'environnement de la cuverie semble donc constituer une niche écologique à part entière et la principale source de levures *Saccharomyces* retrouvées dans les moûts de raisin.

Pour les levures non-*Saccharomyces* en revanche, aucune étude à notre connaissance n'a clairement déterminé l'origine de ces levures dans les moûts. La double origine baies de raisin/cuverie avancée par de nombreux auteurs (Fleet et Heard, 1993; Mortimer et Polsinelli, 1999 ; Jolly et al., 2014) n'est en réalité qu'une hypothèse basée sur la présence de certaines espèces à la fois sur les baies de raisin, dans les moûts et la cuverie. La persistance de levures non-*Saccharomyces* dans l'environnement de la cuverie est encore plus sujet à questionnement. En effet Ocon et al. (2013b) et Bokulich et al. (2013) montrent une succession des espèces présentes dans cet environnement au cours de l'année.

L'objectif de cette étude était d'estimer quelle est la part des levures présentes dans le moût de raisin et au cours de sa fermentation alcoolique en cuverie qui proviennent directement de la baie de raisin. Lors de ce travail, la discrimination au niveau de la souche, nécessaire pour identifier l'origine des microorganismes, a été réalisée pour l'espèce *S. cerevisiae* mais aussi pour les espèces *Starmellaria bacillaris* (synonyme *Candida zemplinina*), *Hanseniaspora guilliermondii* et *Hanseniaspora uvarum*. Ces trois espèces non-*Saccharomyces* sont souvent majoritaires lors des premiers jours de la FA (Combina et al., 2005; Fleet, 2008; Zott et al., 2008) et peuvent influer fortement sur les propriétés organoleptiques des vins produits (Mateo et al., 1991 ; Moreira et al., 2011 ; Romano et al., 2003). Il apparaissait donc important de déterminer l'origine de leur présence en moût. Ceci a été rendu possible grâce à la spectroscopie IR-TF permettant l'identification et la discrimination au niveau de la souche pour un grand

nombre d'isolats (214 isolats pour *Candida zemplinina*, 342 pour *H. guilliermondii* et 810 pour *H. uvarum*).

Ainsi, dans un premier temps, l'origine de la flore *Saccharomyces* présente dans les moûts a été déterminée. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'origine de la flore non-*Saccharomyces* présente dans les moûts étudiés. Enfin la persistance des levures non-*Saccharomyces* a été étudiée d'un millésime à l'autre dans l'environnement de la cuverie ainsi que la capacité de certaines souches à s'implanter l'année suivante.

1 Evolution des différents genres levuriens au cours de la fermentation alcoolique en conditions stériles et en cuverie

Au cours du millésime 2012, 2 protocoles de fermentations ont été appliqués : des fermentations en laboratoire à partir de baies récoltées, pressées et fermentées en conditions stériles et des fermentations réalisées en cuverie. Ces fermentations ont été effectuées en présence et en absence de dioxyde de soufre (SO_2) à partir des raisins issus des trois modes de protection phytosanitaire. Les effets spécifiques de chacune de ces protections phytosanitaires sur la biodiversité des levures présentes sur baies de raisin, dans les moûts de raisin et au cours de la fermentation alcoolique seront développés dans le chapitre 5. Le but ici est d'examiner les différences de populations entre les fermentations réalisées en conditions stériles et celles réalisées en cuverie. Les moûts de raisin issus des trois modes de protection seront examinés séparément afin de comparer les populations levuriennes de chaque cuve, identifiées par spectroscopie IR-TF, avec son équivalent en conditions stériles. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 16.

En laboratoire (conditions stériles) sans SO_2, les dynamiques de fermentation sont différentes en fonction des modalités. Ainsi, la fermentation alcoolique n'est complète que pour la modalité C en lien vraisemblablement avec la présence de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* en fin de fermentation isolée uniquement pour cette modalité. En présence de SO_2, les dynamiques de fermentation sont plus uniformes mais la fermentation n'est complète pour aucune des modalités et seules des espèces appartenant au genre *Metschnikowia* sont présentes en fin de fermentation. Par ailleurs, suite à l'ajout de SO_2 aucune population cultivable n'a été observée à T3j pour les fermentations O et E et à T3j et T6j pour la fermentation C.

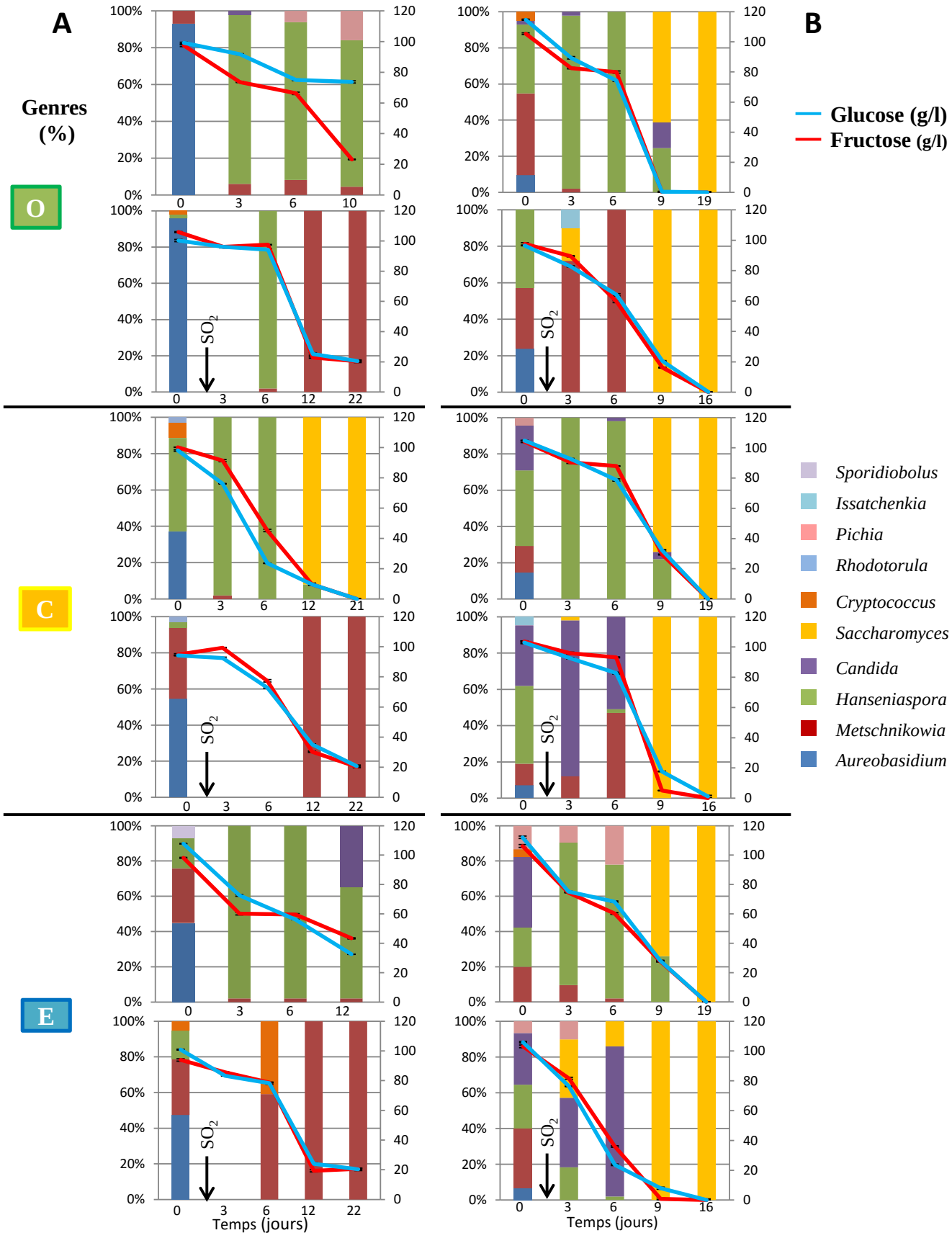


Figure 16. Répartition des genres levuriens au cours de FA menées au laboratoire (A) et en cuverie (B) (millésime 2012) avec ou sans ajout de SO_2, pour les 3 modalités (O, C et E). L'identification est réalisée par spectroscopie IR-TF.

En condition cuverie, toutes les fermentations alcooliques sont complètes. Elles durent entre 16 et 19 jours et seule l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est présente à la fin de la fermentation alcoolique. Les trois fermentations en présence de SO_2 sont plus rapides (16 jours) que celles sans SO_2 (19 jours). Ceci est lié à l'implantation plus rapide de *Saccharomyces cerevisiae* qui à T9j pour les fermentations O, C et E représente 100% des isolats alors qu'elle ne représente respectivement que 61%, 74% et 74 % des isolats pour les fermentations O, C et E sans SO_2. Ces résultats confirment le rôle du SO_2 dans l'implantation de la levure *S. cerevisiae* qui lui procure un avantage au détriment d'autres types de levures non-*Saccharomyces* connues pour être majoritairement moins résistantes au sulfitage (Henick-Kling et al., 1998).

En comparant les populations isolées et identifiées dans les moûts à T0 en conditions stériles à celles isolées et identifiées en cuverie (Tableau 3), on observe un nombre plus important de genres pour les moûts de la cuverie. Il semble qu'il y ait un apport de genres exogènes non-*Saccharomyces* par rapport aux genres isolés sur baies de raisin. Les genres *Candida, Issatchenkia* et *Pichia* ont été isolés dans les moûts en cuverie (T0) mais n'ont pas été isolés à T0 en conditions stériles. Plus particulièrement, le genre *Candida* a été isolé avec des proportions importantes pour les moûts C et E de la cuverie (entre 15 et 20%). De plus, certains genres isolés dans les moûts en conditions stériles (T0) ne sont plus isolés dans les moûts en cuverie. Il est possible que ces genres soient présents en proportion trop faible pour être détectés en cuverie. Par exemple, le genre *Sporidiobolus* ne représente que 2 isolats dans un seul moût en conditions stériles. Il est peut-être également présent dans les moûts en cuverie mais n'a pas été isolé. Par ailleurs il est possible que certains genres comme *Rhodotorula* n'aient pas perdurés suite à l'étape de clarification réalisée avant l'échantillonnage des moûts de la cuverie.

Au cours des fermentations alcooliques, des évolutions de populations sont observées par rapport aux populations identifiées dans les moûts (T0).

En conditions stériles, de nouveaux genres sont isolés alors qu'ils n'ont pas été isolés dans les moûts à T0, tels que les genres *Candida*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* et *Saccharomyces* (Fig. 16 et Tableau 4). Ces résultats mettent en évidence un effet enrichissement du milieu. Ainsi pour la modalité C sans SO_2, cette étape d'enrichissement a permis d'isoler des levures du genre *Metschnikowia* mais surtout de l'espèce *S. cerevisiae* qui représente 100% des isolats en fin de FA. Cette étape permet également l'isolement : des

Tableau 3. Genres levuriens identifiés par spectroscopie IR-TF dans les moûts de raisin (T0) pour les 3 modalités O, C et E en conditions de laboratoire ou en cuverie. (Les noms de genres identifiés correspondent au cumul des genres isolés dans les moûts avant le sulfitage).

Modalité	Genres identifiés en conditions de laboratoire	Genres identifiés en conditions de cuverie
O	*Aureobasidium* *Cryptococcus* *Hanseniaspora* *Metschnikowia*	*Aureobasidium* *Candida* *Cryptococcus* *Hanseniaspora* *Metschnikowia*
C	*Aureobasidium* *Cryptococcus* *Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Rhodotorula*	*Aureobasidium* *Candida* *Issatchenkia* *Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Pichia*
E	*Aureobasidium* *Cryptococcus* *Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Sporidiobolus*	*Aureobasidium* *Candida* *Cryptococcus* *Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Pichia*

Les noms de genres en bleu correspondent aux genres qui ont été isolés dans les moûts (T0) en cuverie mais non isolés dans les moûts (T0) en conditions stériles.

Tableau 4. Genres levuriens identifiés par spectroscopie IR-TF au cours de la fermentation alcoolique pour les 3 modalités O, C et E en conditions de laboratoire ou en cuverie en présence ou en absence de SO_2.

Modalité	Genres identifiés en conditions de laboratoire		Genres identifiés en conditions de cuverie	
	Sans SO_2	**Avec SO_2**	**Sans SO_2**	**Avec SO_2**
O	*Candida* *Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Pichia*	*Hanseniaspora* *Metschnikowia*	*Candida* *Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Saccharomyces*	*Issatchenkia* *Metschnikowia* *Saccharomyces*
C	*Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Saccharomyces*	*Metschnikowia*	*Candida* *Hanseniaspora* *Saccharomyces*	*Candida* *Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Saccharomyces*
E	*Candida* *Hanseniaspora* *Metschnikowia*	*Cryptococcus* *Metschnikowia*	*Hanseniaspora* *Metschnikowia* *Pichia* *Saccharomyces*	*Candida* *Hanseniaspora* *Pichia* *Saccharomyces*

Les noms de genres en rouge correspondent aux genres qui ont été isolés au cours de la fermentation alcoolique mais non isolés dans les moûts correspondants (T0).

genres *Candida*, *Hanseniaspora* et *Pichia* pour la modalité O sans SO_2, uniquement du genre *Metschnikowia* pour la modalité O avec SO_2, et du genre *Candida* pour la modalité E sans SO_2 (Fig. 16 et Tableau 4).

En cuverie, quelle que soit la modalité étudiée et la présence ou non de SO_2, une implantation de levures *S. cerevisiae* est observée. Elles sont isolées dès le 3ème jour de FA pour les moûts issus des 3 modalités avec SO_2 (Fig. 16 et Tableau 4) et représentent 100% des isolats en fin de FA quelle que soit la modalité et la présence ou non de SO_2. Pour la modalité O avec SO_2, le genre *Issatchenkia* est nouvellement isolé à T3. Dans ce même moût, on observe également la disparition du genre *Hanseniaspora* dès T3. D'une manière générale en présence de SO_2 et avec l'implantation de l'espèce *S. cerevisiae*, le genre *Hanseniaspora* est très peu isolé pour les 3 modalités. Ceci semble lié à la présence du SO_2 mais également à l'augmentation de la teneur en éthanol qui inhibe alors ce genre levurien (Gao et Fleet, 1988; Heard et Fleet, 1988).

2 Origine des souches de levures *Saccharomyces cerevisiae*

On peut s'interroger sur l'origine des levures *S. cerevisiae* isolées dans les 6 cuves. En effet, sur les 6 fermentations réalisées en conditions stériles, nous avons isolé des levures de cette espèce uniquement pour la modalité C sans SO_2. Ce résultat confirme la présence minoritaire de l'espèce *S. cerevisiae* voire son absence sur les baies de raisin (Mortimer et Polsini, 1999 ; Combina et al., 2005 ; Valero et al., 2007).

Il semble ainsi probable que des souches de levures de cette espèce s'implantent dans le moût de raisin au cours de la FA et que ces souches proviennent de l'environnement de la cuverie comme déjà démontré (Ciani et al., 2004).

Afin de confirmer l'origine des souches de *S. cerevisiae* isolées au cours de la FA, tous les isolats (648), identifiés par spectroscopie IR-TF comme appartenant à cette espèce, ont été discriminés au niveau de la souche par PCR delta. Ainsi, 53 souches différentes ont été identifiées pour l'ensemble des isolats de cette espèce (Fig. 17). Pour les fermentations en conditions stériles pour la modalité C, unique modalité pour laquelle des souches de *S. cerevisiae* ont été isolées, seules 3 souches différentes ont été identifiées. Parmi ces 3 souches, la souche 39 est très majoritaire (54 isolats sur 93 isolats au total). Cette souche est également retrouvée au cours de la FA pour la même modalité C vinifiée dans la cuverie avec ajout de

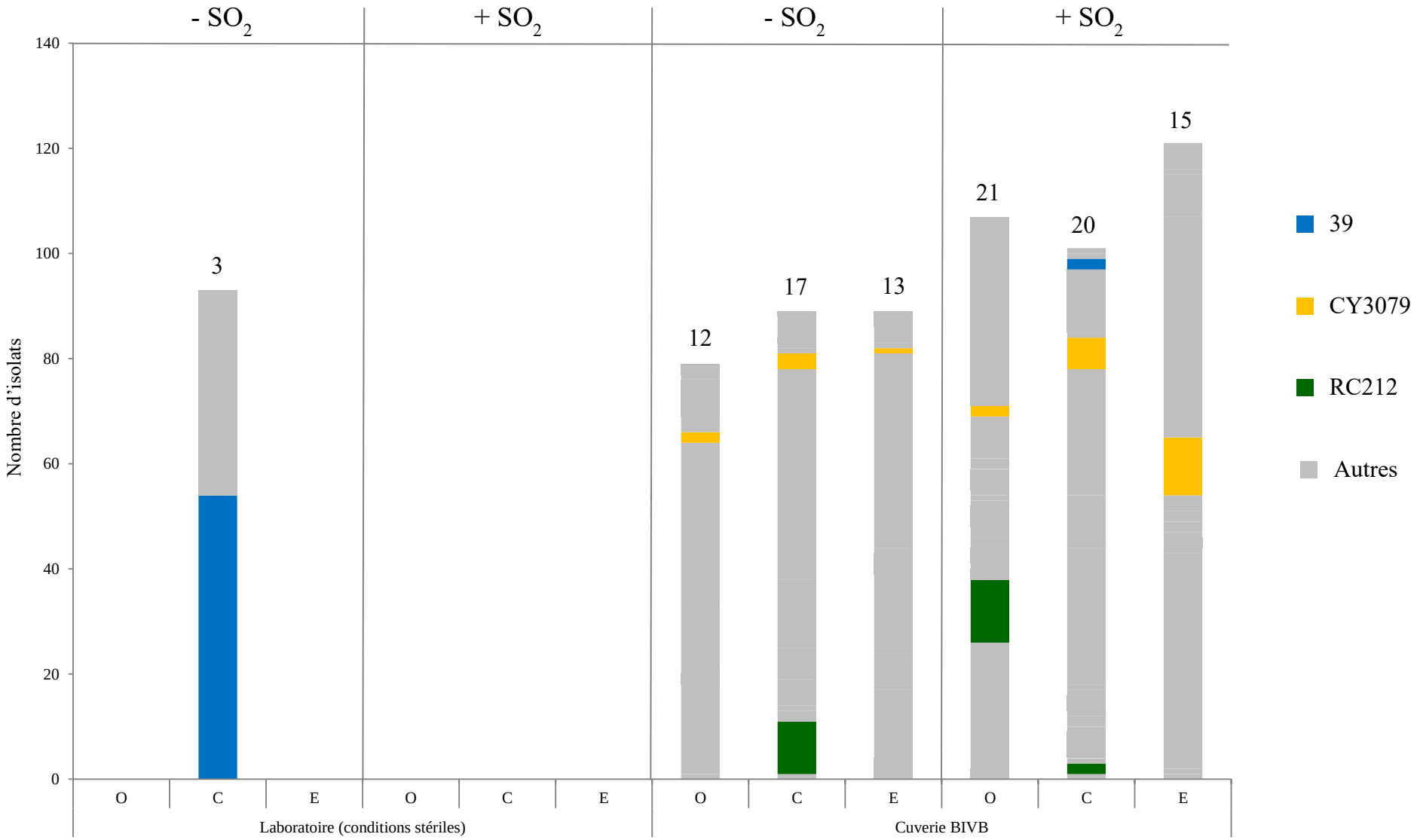


Figure 17. Répartition en nombre d'isolats des souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées durant les fermentations alcooliques (FA) en présence et en absence de SO_2 au laboratoire (conditions stériles) et en cuverie.
Les chiffres correspondent au nombre de souches différentes identifiées pour chaque FA.
O : Biologique ; C : Conventionnel ; E : Ecophyto

SO_2. Ce résultat permet de confirmer qu'une faible proportion de souches de levures *S. cerevisiae* présentes au cours de la FA provient de la baie de raisin.

Pour les fermentations réalisées en condition cuverie, entre 12 et 21 souches différentes ont été identifiées au cours de la FA pour chaque cuve. De plus, une succession de nombreuses souches est observée au cours de la FA en cuverie (Annexe 2), comme déjà décrit par Vezhinet et al. (1992). Néanmoins dans notre étude, la grande majorité des souches semble provenir de l'environnement de la cuverie confirmant ainsi les résultats déjà obtenus par d'autres auteurs (Ciani et al., 2004 ; Mercado et al. 2007). En effet, la souche commerciale RC212 habituellement utilisée dans la cuverie du BIVB pour l'ensemencement des moûts rouges a été isolée au cours des fermentations de la modalité C avec et sans SO_2 et de la modalité O avec SO_2. Quant à la souche commerciale CY 3079 utilisée par le BIVB pour l'ensemencement des moûts blancs, elle est retrouvée au cours de la FA dans les 6 cuves. Ces résultats confirment ceux obtenus par Santamaria et al. (2005) montrant que des souches ayant servies à l'ensemencement dans une cuverie peuvent être isolées lors des fermentations alcooliques même pour des cuves où ces souches n'ont pas été utilisées.

3 Origine des levures non-*Saccharomyces*

L'isolement de nouveaux genres levuriens non-*Saccharomyces* à partir des moûts de cuverie mais également au cours des FA par rapport aux moûts obtenus stérilement permet d'émettre plusieurs hypothèses.

En effet, plusieurs genres non-*Saccharomyces* ont été identifiés dans les moûts ou au cours de la fermentation alcoolique (*Candida*, *Issatchenkia* et *Pichia*) alors qu'ils n'étaient pas détectés lors des fermentations correspondantes en conditions stériles. Il est possible que ces levures soient apportées par un contact avec le matériel de vinification abritant de nombreux genres de levures (Ocon et al., 2010 ; Bokulich et al., 2013). Il est également possible que l'air soit un vecteur de levures leur permettant de passer de cuve en cuve notamment par le dégagement du dioxyde de carbone au cours des fermentations comme supposé par Garijo et al. (2008). Tout comme les souches de levures *S. cerevisiae*, on peut aussi émettre l'hypothèse de la persistance de souches de levures non-*Saccharomyces* dans l'environnement de la cuverie d'une année sur l'autre ce qui permettrait leur implantation l'année suivante (Santamaria et al., 2005).

Afin de vérifier ces hypothèses, pour le millésime 2013, en plus des prélèvements de baies de raisin, de moûts de raisin, avant et au cours de la FA, un échantillonnage des levures a été réalisé

sur le matériel, le sol et dans l'air de la cuverie avant l'arrivée de la vendange et au cours de la FA. Par contre, il était nécessaire de développer une méthode permettant la discrimination d'un grand nombre d'isolats de levures non-*Saccharomyces* non seulement au niveau de l'espèce mais également au niveau de la souche. En effet à l'heure actuelle, très peu de techniques répondant à ces critères sont disponibles. Grâce à la spectroscopie IR-TF, l'ensemble des levures isolées (1375) ont été identifiées au niveau de l'espèce puis discriminées au niveau de la souche par une analyse par classification hiérarchique des spectres obtenus par spectroscopie IR-TF.

Nous avons tout d'abord appliqué la méthodologie développée à la discrimination de l'ensemble des isolats appartenant au genre *Hanseniaspora* afin d'étudier la diversité des souches de ce genre et de déterminer l'origine des souches de ce genre présentes dans les moûts de raisin et au cours de la FA (paragraphe 3.1). Dans un second travail, le suivi depuis le vignoble jusqu'à la cuverie, la persistance et la capacité de ré-implantation dans le moût de l'année suivante pour le genre *Hanseniaspora* et le genre *Candida* ont également été étudiés en appliquant la même méthode d'analyse et de discrimination jusqu'à la souche (paragraphe 3.2).

3.1 Diversité des souches de levures du genre *Hanseniaspora* dans la cave : Quelle est leur implication dans la fermentation alcoolique ?

Food Microbiology 50 (2015) 70–77

Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation?

Cédric Grangeteau [a], Daniel Gerhards [b], Sandrine Rousseaux [a, *], Christian von Wallbrunn [b], Hervé Alexandre [a], Michèle Guilloux-Benatier [a]

[a] UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, IUVV, Rue Claude Ladrey, BP 27877, 21000 Dijon, France
[b] Institut für Mikrobiologie und Biochemie Zentrum Analytische Chemie und Mikrobiologie – Hochschule Geisenheim University, Geisenheim, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 December 2014
Received in revised form
9 March 2015
Accepted 16 March 2015
Available online 3 April 2015

Keywords:
Hanseniaspora
Diversity
Winery
Grape must
FT-IR spectroscopy

ABSTRACT

Isolated yeast populations of Chardonnay grape must during spontaneous fermentation were compared to those isolated on grape berries and in a winery environment before the arrival of the harvest (air, floor, winery equipment) and in the air through time. Two genera of yeast, *Hanseniaspora* and *Saccharomyces*, were isolated in grape must and in the winery environment before the arrival of the harvest but not on grape berries. The genus *Hanseniaspora* represented 27% of isolates in the must and 35% of isolates in the winery environment. The isolates of these two species were discriminated at the strain level by Fourier transform infrared spectroscopy. The diversity of these strains observed in the winery environment (26 strains) and in must (12 strains) was considerable. 58% of the yeasts of the genus *Hanseniaspora* isolated in the must corresponded to strains present in the winery before the arrival of the harvest. Although the proportion and number of strains of the genus *Hanseniaspora* decreased during fermentation, some strains, all from the winery environment, subsisted up to 5% ethanol content. This is the first time that the implantation in grape must of populations present in the winery environment has been demonstrated for a non-*Saccharomyces* genus.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Saccharomyces cerevisiae has long been considered as the only yeast involved in wine production (Fleet, 1993). In particular, it has been demonstrated that a large number of indigenous strains of *S. cerevisiae* participate in alcoholic fermentation (Vezinhet et al., 1992). These strains of *S. cerevisiae* can originate not only from the vineyard but also from the winery environment (Ciani et al., 2004; Mercado et al., 2007; Valero et al., 2007). Some of these strains of the winery environment, described as persistent over several years, have been found in grape musts prior to fermentation and observed to become dominant during fermentation to the detriment of strains from the vineyard (Le Jeune et al., 2006; Mercado et al., 2007; Santamaría et al., 2005).

Nonetheless, although *S. cerevisiae* is the dominant species at the end of fermentation, many non-*Saccharomyces* species can be found in grape must. Some of these species can persist and participate in fermentation and the sensorial improvement of the wines produced (Ciani et al., 2010; Medina et al., 2013; Romano et al., 2003). Mention can be made in particular of the implication of yeast strains belonging to the genera *Candida*, *Hanseniaspora* and *Metschnikowia* (Combina et al., 2005; Fleet, 2008; Zott et al., 2008). Among these genera, *Hanseniaspora*, described as being significantly present in musts, can develop during the initial stages of fermentation (Fleet, 1993; Pretorius, 2000). This genus participates in the sensorial profile of the wines produced (Mateo et al., 1991) through its capacity to produce higher alcohols and volatile esters (Moreira et al., 2011; Romano et al., 2003). As with the species *S. cerevisiae*, different non-*Saccharomyces* yeast genera have also been isolated in the winery environment (Belin, 1979; Bokulich et al., 2013; Ocón et al., 2010, 2013). This raises several questions: i) what is the origin of the non-*Saccharomyces* yeasts found in musts during fermentation? ii) does implantation of non-*Saccharomyces* flora in the winery occur? iii) is there a succession of different strains?

Given the relatively recent interest for non-*Saccharomyces* genera, complete genomes are not yet available for all the species

* Corresponding author.
E-mail address: sandrine.rousseaux@u-bourgogne.fr (S. Rousseaux).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.009
0740-0020/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

found in fermenting musts (Jolly et al., 2014). This makes it difficult to develop molecular methods to perform the intra-specific discrimination of these yeasts reliably, reproducibly and quickly (Albertin et al., 2014; De Benedictis et al., 2011; Smole Mozina et al., 1998). Therefore Fourier transform infra-red spectroscopy (FT-IR) could be an alternative technique of choice for intra-specific discrimination. This technique is based on the irradiation of yeasts by infra-red light at different wavelengths. The different components of the cell (proteins, fatty acids, polysaccharides, etc.) absorb light and produce specific absorption profiles. According to the microorganism studied, comparing the profile obtained with an appropriate database permits identification at genus, species (Naumann et al., 1991; Wenning et al., 2002) and even strain level following the analysis of the hierarchical classification of profiles obtained (Udelhoven et al., 2000). In particular, this technique was applied to: i) the identification of yeasts of interest for food processing (Kümmerle et al., 1998), ii) the differentiation of several species of pathogenic yeasts belonging to the genus *Candida* (Schmalreck et al., 1998; Sandt et al., 2006; Toubas et al., 2007), iii) the differentiation of strains of the species *S. cerevisiae* used in brewing (Timmins et al., 1998), and iv) monitoring the implantation of starter strains used in cheese production (Goerges et al., 2008). This technique is both fast and reproducible (Erukhimovitch et al., 2007; Haag et al., 1996) and, of all the methods used to identify yeast species, it is one of the few capable of discriminating strains of the same species without it being necessary to perform additional experiments (Udelhoven et al., 2000). In spite of these advantage, to our knowledge this technique has not yet been used in the wine production sector, probably due to the lack of a specific database (Wenning and Scherer, 2013).

This study focuses on the genus *Hanseniaspora,* described in the literature as being present both in the winery environment and in grape must (Pérez-Martín et al., 2014). The objective was to characterise strains of the genus *Hanseniaspora* present in fermenting must using FT-IR spectroscopy to determine their origin (grape and/or winery).

2. Materials and methods

2.1. Samples

2.1.1. Grape berries

Samples of grape berries were taken from a plot of Chardonnay planted in 1986 and located in Burgundy, France (46°18′32.2″N, 4°44′17.9″E, 258 m altitude) for the 2013 vintage. A total of 960 berries (10 berries/vine stock) were sampled aseptically from 96 vine stocks (corresponding to 2 rows of the plot), placed in a sterile bag and pressed manually directly in the bag. Immediately after pressing, a sample (50 mL) was taken in triplicate to analyse diversity. This sample corresponds to the yeast populations isolated from grape berries and noted Tberries in this study.

2.1.2. During alcoholic fermentation

In parallel, all the grapes remaining on the two rows of vines mentioned previously (96 vine stocks) were harvested manually and placed in 20 kg crates. The harvest (102 kg) was then transported to the winery and pressed mechanically (vertical screw press, FASER-PLAST AG, Rickenbach, Switzerland). The must obtained was left for one night at 10 °C, then separated into two batches in 2 different vats (15.5 L in each vat). The composition of the must is given in Table 1. For each vat, a sample of 50 mL of must was then taken and noted T0. Glucose, fructose, malic acid and acetic acid were determined with enzymatic kits, according to the manufacturer's instructions (Bio-SenTec, France). Alcoholic fermentation was monitored by ethanol production which was determined by enzymatic kit following the manufacturer's instructions (Bio-SenTec, France). Samples were taken during fermentation: at 0.4% (v/v) ethanol (T1), at 5.1% (v/v) ethanol (T2), at 8.9% (v/v) ethanol (T3) and at 11.9% (v/v) ethanol (end of fermentation, Tf). Smaller samples of 50 mL were taken from each main sample.

Table 1
Analytical characteristics of the must.

Components	Values
Reducing sugars (g L^{-1})	212
pH	3.1
Total acidity (g tartaric acid.L^{-1})	8.3
Potassium (mg L^{-1})	1141
L-malic acid (g L^{-1})	4.9
Tartaric acid (g L^{-1})	6.4
Assimilable nitrogen (mg N L^{-1})	195

2.1.3. On the floor and winery equipment

Samples were taken from the floor and the surface of the winery equipment before the arrival of the harvest (T-1). A total of 12 samples were taken using swabs. After having rubbed the different surfaces by streaking, each swab was placed in a tube containing 1 mL of water supplemented with NaCl (at 0.9% w/v) then vortexed for 5 min before analysis.

2.1.4. Winery air sampling

Samples of air (flow rate 100 L min^{-1}) were taken before the arrival of the harvest (T-1) and during fermentation (from T0 to Tf) using a microbial air sampler, MAS-100 Eco (MBV, Stäfa, Switzerland) placed 1.50 m above the floor. For each sample, a dish with YPD medium (0.5% w/v yeast extract, 1% w/v peptone, 2% w/v glucose and 2% w/v agar supplemented with chloramphenicol at 200 ppm to inhibit the development of bacteria) was placed in the air sampler to count and isolate the yeasts. The volume of air analysed for each agar gel was 500 L, with three repetitions per sample.

2.2. Yeast isolation

Serial dilutions were performed and 3 × 100 μL of each dilution were spread on the YPD medium described previously and incubated for 24–48 h at 28 °C. The yeast populations were then estimated by counting the colonies developed and the result was obtained by averaging the three repetitions.

For the samples taken from the winery floor and the surfaces of the winery equipment, 3 × 100 μL of the NaCl solution (0.9% (w/v) in which the swab was placed were spread on the YPD medium described previously and incubated for 24–48 h at 28 °C.

For the air samples, the Petri dishes exposed were incubated for 24–48 h at 28 °C. The yeast populations were then evaluated by counting the colonies developed. This value was converted into the most probable number of microorganisms collected per Petri dish (MPN) using the statistical correction table based on Feller's law (Feller, 1968). The result was expressed by the average of the 3 repetitions in MPN/m^3.

For all the samples, according to the colonies present, all or 50 colonies per replicate were selected randomly, purified in YPD medium, then cultivated in liquid YPD medium (24–48 h at 28 °C) and finally stored at −80 °C in YPD medium supplemented with glycerol (20% v/v final concentration). The number of isolates obtained for each sample is presented in Table 2.

2.3. Yeast identification by FT-IR

Identification of yeast isolates was performed by Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy using a Tensor™ 27

Table 2
Distribution of *Hanseniaspora* strains defined by FT-IR spectra, in different environments of the winery, in air and in must during alcoholic fermentation. Distribution is given in number of isolates and in percentage.

Species	Profiles	Berries	Material	Soil	Air								Must				
			T-1	T-1	T-1	T0	T1	T2	T3	T4	T5	Tf	T0	T1	T2	T3	Tf
H. guilliermondii	A	-[a]	–	2 (2%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	–	–	3 (3%)	–	–	1 (33%)	1 (2%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	C	–	–	22 (21%)	–	–	–	11 (20%)	–	1 (11%)	1 (20%)	–	–	1 (3%)	–	–	–
	D	–	–	30 (28%)	–	–	–	9 (16%)	–	–	–	–	2 (8%)	4 (12%)	1 (25%)	–	–
	E	–	1 (2%)	8 (7%)	–	–	–	4 (7%)	–	–	–	–	1 (4%)	–	–	–	–
	F	–	–	–	–	–	–	1 (2%)	–	–	–	–	1 (4%)	–	–	–	–
	G	–	2 (4%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	H	–	–	1 (1%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
H. uvarum	A′	–	–	–	1 (100%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	B′	–	–	–	–	–	–	1 (2%)	–	1 (11%)	1 (20%)	–	8 (31%)	15 (44%)	–	–	–
	C′	–	–	1 (1%)	–	–	–	3 (5%)	–	–	–	–	2 (8%)	4 (12%)	1 (25%)	–	–
	D′	–	–	2 (2%)	–	–	–	–	–	–	–	–	1 (4%)	5 (15%)	1 (25%)	–	–
	E′	–	–	4 (4%)	–	–	–	–	–	–	–	–	4 (15%)	2 (6%)	–	–	–
	F′	–	1 (2%)	3 (3%)	–	–	–	13 (23%)	–	–	1 (20%)	–	4 (15%)	1 (3%)	1 (25%)	–	–
	G′	–	–	30 (28%)	–	–	–	1 (2%)	–	–	–	–	1 (4%)	1 (3%)	–	–	–
	H′	–	–	1 (1%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	I′	–	1 (2%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	J′	–	28 (61%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	K′	–	13 (28%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	L′	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2 (8%)	1 (3%)	–	–	–
	M′	–	–	–	–	–	2 (67%)	8 (14%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	N′	–	–	–	–	–	–	2 (4%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	O′	–	–	–	–	–	–	2 (4%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	P′	–	–	–	–	–	–	1 (2%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	Q′	–	–	–	–	–	–	–	–	7 (78%)	–	–	–	–	–	–	–
	R′	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1 (20%)	–	–	–	–	–	–
	S′	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1 (20%)	–	–	–	–	–	–
Total number of isolates per sample[b]		140	245	286	4	0	30	60	49	50	95	8	99	100	99	100	100

[a] Non detected.
[b] Number of isolates obtained for each sample (all genera yeast).

spectrometer coupled with an HTS-XT unit (Bruker, Ettlingen, Germany). After standardized cell culture on YGC-Agar (0.5% w/v yeast extract, 2% w/v glucose, 0.02% w/v chloramphenicol and 2% w/v agar) for 24 h ± 0.5 h at 27 °C (Kümmerle et al., 1998), the cells were harvested by carefully scraping the agar plate with a 10 μL plastic loop and resuspended in 100 μL of sterile demineralized water. An aliquot of 25 μL of the suspension was transferred to a 96-well zinc selenide (ZnSe) optical plate and dried in a desiccator to form a thin transparent film suitable for FT-IR measurements.

The mid-infrared range of 4000-500 wave length/cm^2 (25.000–2.500 nm) is used to excite atoms in molecular bonds, causing them to vibrate. A spectrum can be measured and calculated by light absorption. This specific absorption is attributed to several cell components (polysaccharides, fatty acids, proteins, mixed region, *fingerprint*-region) (Lee & Chapman, 1986) used for identification (Kümmerle et al., 1998). A spectrum of an unknown yeast species is compared to a collection of reference spectra and the distance measured between the spectra is calculated based on the Pearson product moment correlation coefficient. This makes it possible to obtain a list of the most similar spectra of the database (Helm et al., 1991), leading to identification at the species level. This database consists of about 3000 strains belonging to 215 species representing all wine relevant strains.

2.4. Strain typing

Typing of strains belonging to the genus *Hanseniaspora* was performed by a hierarchical cluster analysis of the spectra obtained by FT-IR. The dendrogram was calculated using the Average Linkage algorithm and correlation with normalization to reproducibility level. The algorithm is part of the OPUS software package and is implemented under the "Cluster analysis" option. The second derivatives of the spectra were used. The frequency ranges were 3032 cm^{-1} to 2829 cm^{-1}, 1351 cm^{-1} to 1200 cm^{-1}, and 901 cm^{-1} to 699 cm^{-1}.

3. Results and discussion

3.1. Strain typing method

The fact that FT-IR spectroscopy can differentiate microorganisms below the species level is well documented (Rebuffo-Scheer et al., 2007; Tindall et al., 2000; Wenning et al., 2014). In this study we identified 292 isolates of the genus *Hanseniaspora* belonging to two species, *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum.* Differentiation on the strain level was based on the hierarchical cluster analysis (HCA) data obtained from the FT-IR spectra of *Hanseniaspora* isolates. Classification into sub-clusters was done by defining a spectral distance as a value for separation on the strain level. All the branches above this value were sub-clusters, ie different strains. The value chosen was a spectral distance of 0.3, in line with Kümmerle et al. (1998).

For example, Fig. 1 demonstrates an HCA of the FT-IR spectra of a selection of 25 *H. uvarum* isolates and 19 *H. guilliermondii* isolates. According to the value defined of 0.3, two main clusters representing 2 strains could be differentiated for *H. uvarum* and four main clusters representing 4 strains were differentiated for *H. guilliermondii.*

3.2. The populations identified in the different environments

The aim of this study was to compare populations isolated in the vineyard and in the winery with those isolated in the must in order

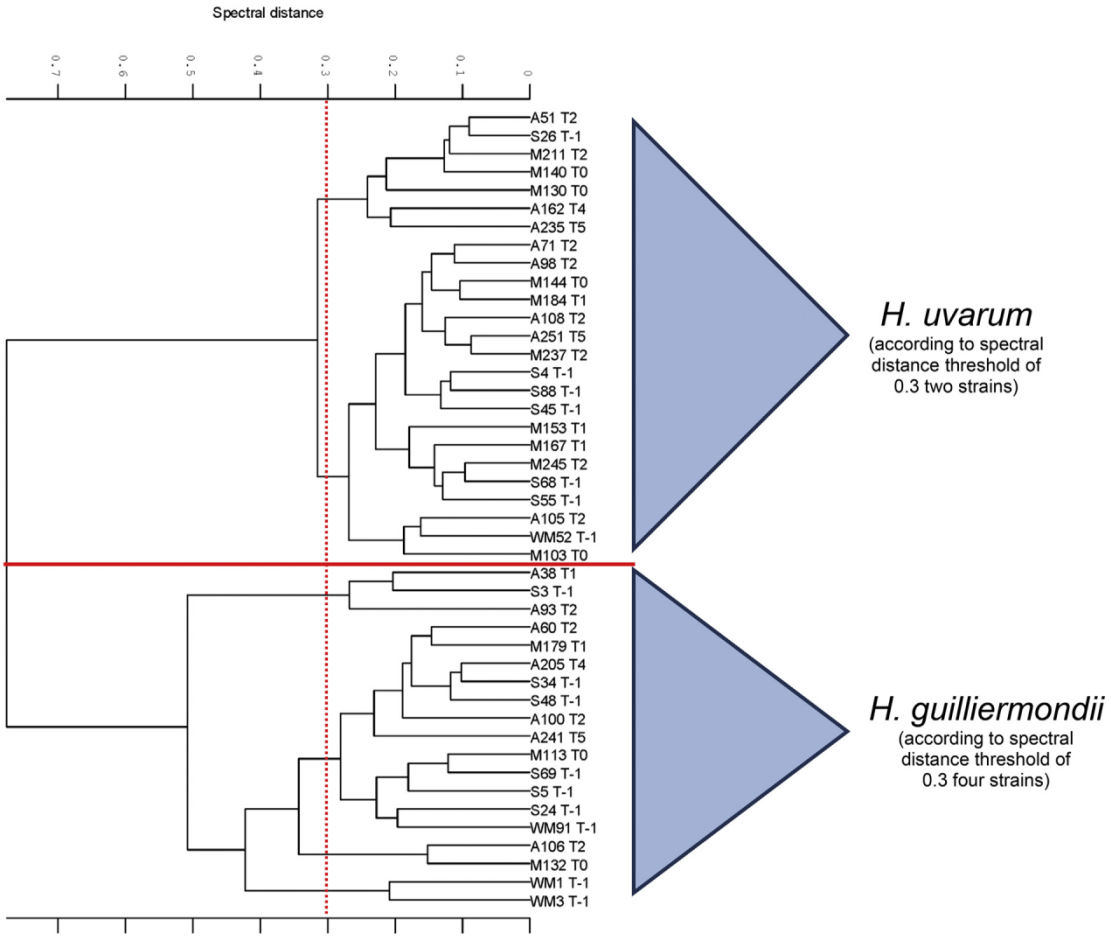


Fig. 1. Hierarchical classification of the average second derivative of 44 spectra of *Hanseniaspora* isolates using the spectral windows 3032 cm^{-1} to 2829 cm^{-1}, 1351 cm^{-1} to 1200 cm^{-1}, and 901 cm^{-1} to 699 cm^{-1}. The (---) line represents the threshold at 0.3 for strain discrimination.

to determine the origin of the yeast populations participating in alcoholic fermentation. The populations isolated on grape berries, in the winery environment and in the must were identified by FT-IR. A total of 1375 isolates were identified.

3.2.1. Populations present on grape berries and in the grape must

The yeast populations isolated from the berries (Tberries) are presented in Fig. 2a. 140 isolates were obtained and we identified eight genera of which two predominated: *Aureobasidium* (66.4%) and *Cryptococcus* (24.3%). The presence and dominance of these two genera on the berries has already been observed in other studies (Barata et al., 2012). The genera *Bulleromyces* (0.7%), *Rhodosporidium* (3.6%), *Pichia* (1.4%), *Acremonium* (1.4%) and *Trichosporon* (1.4%), isolated in low percentages in our study, are described in the literature as marginal (Cadez et al., 2010; Comitini & Ciani, 2008; Milanović et al., 2013). It is noteworthy that the genus *Metschnikowia* represented only 0.7% of the isolates and that the genus *Hanseniaspora* was not isolated for the 2013 vintage whereas it represented 28% of the isolates in 2012 (results not presented here). The presence of these two genera on the berries varies greatly as a function of the studies considered and also for certain studies as a function of vintage (Prakitchaiwattana et al., 2004; Sabate et al., 2002). In addition, no strain of yeast belonging to the genus *Saccharomyces* was isolated, confirming that this genus is rarely isolated on berries (Mortimer & Polsinelli, 1999; Raspor et al., 2006; Valero et al., 2007).

The yeast populations isolated in must before and during fermentation are shown in Figs. 2b and 3d. Although 8 yeast genera were isolated on the berries, only 4 genera (Fig. 2b) were isolated in the must following pressing and settling (T0). This considerable reduction of diversity can be explained by a change of conditions in the must (osmotic pressure, pH stress, oxygen stress) (Sannino et al., 2013). Of the 4 genera isolated in the musts, only 2 were also isolated on grape berries (*Metschnikowia* and *Pichia*). The genus *Metschnikowia* was isolated up to T2 and the genus *Pichia* up to T3. On the other hand, we observed the presence at T0 of genera of *Saccharomyces* (8% of the isolates) and *Hanseniaspora* (27% of the isolates) that had not been isolated on the berries. The implantation of the genus *Saccharomyces* increased, making it the predominant genus from T2 onwards (5.1% ethanol). As for the genus *Hanseniaspora*, its proportion in the must increased during the first days of fermentation up to 0.4% ethanol (T1) after which it was detected up to 5.1% ethanol (T2), though in low proportion. These observations confirm the results in the literature describing this genus as being unable to resist high ethanol concentrations (Cocolin et al., 2000; Combina et al., 2005; Gao and Fleet, 1995; Heard and Fleet, 1985). In addition, Pérez-Nevado et al. (2006) highlighted antagonism between strains of the genus *Hanseniaspora* and a strain of *S.*

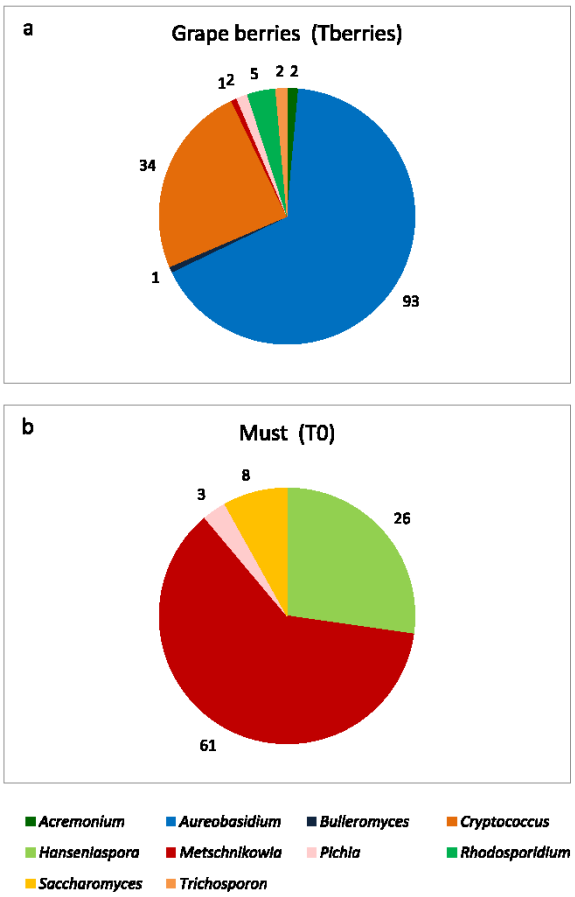


Fig. 2. a. Number of isolates by yeast genus on berries (Tberries). b. Number of isolates by yeast genus in the grape must after pressing (T0).

cerevisiae. These two mechanisms could explain the non-persistence of this genus several days after the onset of fermentation. Other genera appeared during AF: the genus *Kluyveromyces* was isolated after T1 and up to the end of fermentation (Tf) but still in low proportion (between 1% and 9%). The genus *Candida* was isolated only at Tf. These two genera have already been described as being found in marginal proportions at the end of alcoholic fermentation (Mills et al., 2002).

3.2.2. The populations present in the winery environment

We identified 3 genera in the air before the arrival of the harvest (T-1): *Hanseniaspora* (25%), *Pichia* (50%) and *Saccharomyces* (25%) (Fig. 3a). No yeast was isolated at T0 when the harvest arrived. The populations in the air before the arrival of the harvest were very small (2.7 MPN/m^3) (Fig. 4). This low population of yeasts in the winery air before alcoholic fermentation has already been described (Garijo et al., 2008; Ocón et al., 2013). The populations isolated in the air then increased during fermentation before falling again from T4 onwards (10.2% ethanol) (Fig. 4). At T2, the genus *Hanseniaspora* constituted the majority (95% of isolates) though it was not isolated at T3 and was isolated in minority at T4 and T5. The genus *Saccharomyces* became predominant in the air following sampling at T3 and up to sampling at T5, but was no longer detected at the end of fermentation (Tf) when the populations present in the air decreased (Fig. 4). Only the genus *Cryptococcus* was isolated in the air at the end of fermentation. These results agree with those of Ocón et al. (2013) and Garijo et al. (2008) who stated that the presence of the genus *Saccharomyces* in the air was strong during the fermentation period but that it was either in minority or absent before and at the end of fermentation. In this study we highlight the presence of a large number of genera in the vat room (*Bulleromyces*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* and *Trichosporon*) with a large proportion of potentially fermenting genera during most of the fermentation period (Fig. 3a). This diversity with a predominance of fermenting genera has already been observed (Pérez-Martín et al., 2014), but to our knowledge this is the first time that the genera *Bulleromyces* and *Trichosporon* have been isolated in the air of a winery during the fermentation period.

Regarding the samples taken from the floor before the arrival of the harvest, 4 genera, of which two were predominant, *Hanseniaspora* (55%) and *Metschnikowia* (37%), were isolated as were 2 other genera but in very low proportions: *Cryptococcus* (8%) and *Saccharomyces* (0.5%) (Fig. 3c). The genera *Hanseniaspora* and *Metschnikowia* had already been isolated in the winery environment though in lower proportions (Ocón et al., 2010; Bokulich et al., 2013).

A total of 7 genera were identified on the winery equipment: *Aureobasidium, Cryptococcus, Hanseniaspora, Issatchenkia, Metschnikowia, Pichia* and *Rhodotorula* (Fig. 3b). As in the air, the genera *Hanseniaspora* (19%) and *Crytococcus* (67%) were predominant before the arrival of the harvest (T-1). The marked presence of the genus *Cryptococcus* in this environment had already been described by Ocón et al. (2010). Since it had not been isolated in the must, these observations appear to confirm that this genus is poorly adapted to must conditions, although it can colonise the surfaces of berries and equipment.

According to the results obtained, the genus *Hanseniaspora* was present in the must but not isolated on grape berries. Furthermore, it was the only genus isolated in the winery air, on the floor and on the vat room equipment before the arrival of the harvest. The must could therefore be "contaminated" by the strains present in the winery environment. In order to answer this question, we used FT-IR spectrometry to discriminate all the isolates of this genus up to the strain level in order to identify the origin of these isolates in the must.

3.3. Intra-specific variability of isolates of the genus Hanseniaspora as a function of environment

Using FT-IR spectroscopy, we discriminated 292 isolates of the genus *Hanseniaspora* belonging to two species, *H. guilliermondii* and *H. uvarum*, found on the winery equipment and floor, and in the air and grape must during alcoholic fermentation (Table 2). These two species had already been isolated in the grape must and air of a winery (Pérez-Martín et al., 2014). 27 different strains were obtained: 8 strains for the species *H. guilliermondii* and 19 strains for the species *H. uvarum*. These results show considerable intra-specific diversity for the genus *Hanseniaspora*, and more especially for the species *H. uvarum*.

Before the arrival of the harvest (T-1), a large number of different strains (7 strains for the species *H. guilliermondii* and 10 strains for the species *H. uvarum*) were identified in the winery environment. Each compartment of the winery was colonised by several different strains, demonstrating for the first time considerable intra-specific diversity within the genus *Hanseniaspora* in the vat room. However, certain strains were specific to a single compartment (strains A, H, H′ for the floor, strains G, I′, J′, K′ for the winery equipment and strains A′, M′, N′, O′, P′, Q′, R′, S′ for the air). No profile was found in all the compartments of the winery before

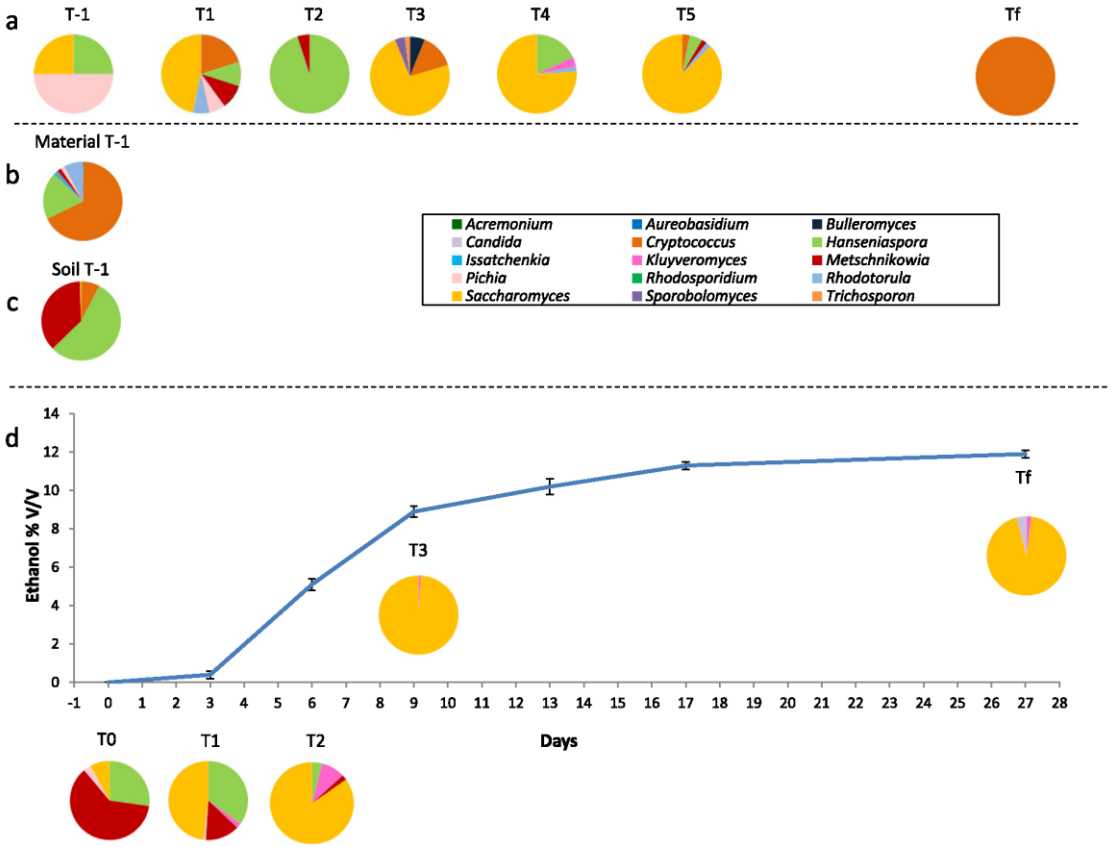


Fig. 3. Changes in yeast genera proportion: a. in air before arrival of the harvest (T-1) and during the time (T1 to Tf); b. on wine making equipment before arrival of the harvest (T-1); c. on soil before arrival of the harvest (T-1) and d. in the must during alcoholic fermentation (T0 to Tf). The curve (——) represents the concentration (% v/v) in ethanol over time.

the arrival of the harvest (T-1). Nonetheless, the strains present only on the floor or the winery equipment at T-1 were then isolated in the air during fermentation (strains B, C, D, E, C′, F′, G′). This appears to show that the dissemination of populations belonging to the genus *Hanseniaspora* was facilitated by intense human activity during the fermentation period, as described by Ocón et al. (2011) for populations of moulds present in the air.

As with the winery environment, we observed a wide diversity of strains in the grape must. The 26 isolates belonging to the genus *Hanseniaspora* isolated in the must after settling corresponded to 10 different strains. The population of the genus *Hanseniaspora* in the must was therefore polyclonal. However, we observed a reduction in the number of strains during alcoholic fermentation. Thus at T0 (0% ethanol), 10 strains were detected, 9 strains were present at T1 (0.4% ethanol) and only 4 different strains at T2 (5.1% ethanol) were obtained. As described above, no yeast belonging to the genus *Hanseniaspora* was isolated in the must above this ethanol content. However, this genus resisted fermentation conditions differently according to strain. Indeed, the strain D for the species *H. guilliermondii*, and strains C′, D′ and F′ for the species

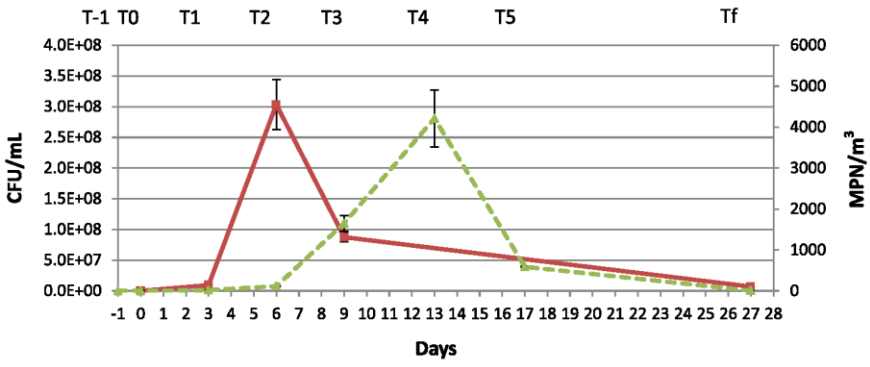


Fig. 4. Evolution of yeast populations in air (——) expressed in MPN/m^3 and in must during alcoholic fermentation (——) expressed in CFU/mL.

H. uvarum persisted up to an ethanol content of 5.1% whereas the other strains were no longer detected.

Despite the considerable diversity of strains in the winery environment, only part of this diversity was implanted in the must. Of the 17 strains discriminated before the arrival of the harvest (T-1) in the winery environment, only 8 were found in the must at T0, i.e. strains C, D, E for the species *H. guilliermondii* and strains C′, D′, E′, F′, G′ for the species *H. uvarum*. Only certain strains of the genus *Hanseniaspora* appeared adapted to must conditions. The isolates corresponding to these 8 strains represented 58% of the yeasts belonging to the genus *Hanseniaspora* isolated in the musts after settling. The possibility of implantation in the musts of the non-*Saccharomyces* yeasts present in the winery, notably of the genus *Hanseniaspora*, had already been assumed by Bokulich et al. (2013), though they were unable to confirm it. The implantation in the musts of strains of the genus *Hanseniaspora* residing in the winery was very significant as from the first day. Indeed, all the strains were present at T0 except for profile C, detected in sample T2 though not before at T1. This shows that there was either no or very little implantation of new strains belonging to the genus *Hanseniaspora* during fermentation.

It is particularly noteworthy that these 8 strains were also found on the floor at T-1. Surprisingly, none of these strains was found in the air at T-1 or after settling (T0). This can undoubtedly be explained by the low number of isolates obtained for these two samples.

Although we highlighted the dissemination of strains of the genus *Hanseniaspora* from the floor to the must in relation with intense human activity, another route of dissemination could be observed. Indeed, a much larger number of strains were detected in the airborne sample taken at T2 in comparison to T-1, T0 or T1 and most of these strains were detected in the musts (T1 and T2). This appears to show that in addition to dissemination from the floor, yeasts can also be disseminated from vat to vat, likely through the release of carbon dioxide during alcoholic fermentation (Garijo et al., 2008).

The persistence of isolates of the genus *Hanseniaspora* appeared to be significant in the air since strains of this genus were isolated in the airborne samples at T4 and T5 whereas they were no longer detected in the must (strains C, B′, F′, L′, Q′, R′, S′). Some of these strains (strains Q′, R′ and S′) appeared to have origins other than those of the environments analysed.

4. Conclusions

FT-IR spectroscopy was used to discriminate the isolates of yeasts belonging to the genus *Hanseniaspora* up to the strain level. Thus for the first time, the intra-specific diversity of two species (*H. guilliermondii* and *H. uvarum*) belonging to a genus other than *Saccharomyces* was studied in a winery environment and in grape must before and during alcoholic fermentation. This made it possible to highlight considerable intra-specific diversity of cultivable yeasts in the winery environment and throughout fermentation, recalling the results obtained for the species *S. cerevisiae*. This study allowed us to demonstrate the implantation in the grape must of 2 species of yeast belonging to the genus *Hanseniaspora* residing in the winery. It is the first time that this mechanism has been shown for a non-*Saccharomyces* genus.

It would be interesting to perform this study on other non-*Saccharomyces* yeast genera to obtain better global understanding of the participation of vineyard and winery yeasts in relation to the populations present in the must.

Furthermore, it would also be interesting to reproduce this study over several years to verify the capacity of non-*Saccharomyces* populations to persist from one year to another in the winery environment. Another interesting perspective would be to take into account the viable but not cultivable (VBNC) yeasts, however FT-IR could not be used for this purpose. This would provide knowledge on whether the winery has its own flora or whether these populations are brought in by the grape must each year and then diffused by the equipment or the air.

Acknowledgements

This work was supported by the Regional Council of Burgundy and the Interprofessional Office of Burgundy wines.

References

Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M., 2014. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. PLoS One 9, e94246.
Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. Int. J. Food Microbiol. 153, 243–259.
Belin, J., 1979. Contribution a l'étude des levures des chais-taxonomie, répartition des levures. Mycopathology 67, 67–81.
Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2013. Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. PLoS One 8, e66437.
Čadež, N., Zupan, J., Raspor, P., 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. FEMS Yeast Res. 10, 619–630.
Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., Martini, A., 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek 85, 159–164.
Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Res. 10, 123–133.
Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiol. Lett. 189, 81–87.
Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. Int. J. Food Microbiol. 99, 237–243.
Comitini, F., Ciani, M., 2008. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. Ann. Microbiol. 58, 489–493.
De Benedictis, M., Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., Tufariello, M., Grieco, F., 2011. An optimized procedure for the enological selection of non-Saccharomyces starter cultures. Antonie von Leeuwenhoek 89 (2), 189–200.
Erukhimovitch, V., Tsror, L., Hazanovsky, M., Talyshinsky, M., Souprun, Y., Huleihel, M., 2007. Early and rapid detection of potato's fungal infection by Fourier transform infrared microscopy. Appl. Spectrosc. 61, 1052–1056.
Feller, W., 1968. An Introduction to Probability Theory and its Applications, third ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
Fleet, G.H., 1993. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. CRC Press, London, pp. 27–54.
Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res. 8, 979–995.
Gao, C., Fleet, G.H., 1995. Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. Food Microbiol. 12, 65–71.
Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. Int. J. Food Microbiol. 125, 141–145.
Goerges, S., Mounier, J., Rea, M.C., Gelsomino, R., Heise, V., Beduhn, R., Cogan, T.M., Vancanneyt, M., Scherer, S., 2008. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South german red smear cheese. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2210–2217.
Haag, H., Gremlich, H., Bergmann, R., Sanglier, J.J., 1996. Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy. J. Microbiol. Methods 27, 157–163.
Helm, D., Labischinski, H., Naumann, D., 1991. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. J. Microb. Methods 14, 127–142.
Heard, G.M., Fleet, G.H., 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Appl. Environ. Microbiol. 50, 727–728.
Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Res. 14, 215–237.
Kümmerle, M., Scherer, S., Seiler, H., 1998. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2207–2214.
Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., Lollier, M., 2006. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. Food Microbiol. 23, 709–716.
Lee, D.C., Chapman, D., 1986. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. Biosci. Rep. 6, 235–256.
Mateo, J.J., Jimenez, M., Huerta, T., Pastor, A., 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. Int. J. Food Microbiol. 14, 153–160.

Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M.E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F., 2013. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. Food Chem. 141, 2513–2521.
Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina, M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. Food Microbiol. 24, 403–412.
Milanović, V., Comitini, F., Ciani, M., 2013. Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. Int. J. Food Microbiol. 161, 240–246.
Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4884–4893.
Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. Food Control 22, 662–667.
Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. Res. Microbiol. 150, 199–204.
Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351, 81–82.
Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., 2010. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. Food Microbiol. 27, 1023–1027.
Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., Sanz, S., 2011. Factors of influence in the distribution of mold in the air in a wine cellar. J. Food Sci. 76, M169–M174.
Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2013. Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination. Food Control 34, 261–267.
Pérez-Martín, F., Seseña, S., Fernández-González, M., Arévalo, M., Palop, M.L., 2014. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. Int. J. Food Microbiol. 190, 44–53.
Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol. 108, 336–345.
Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Res. 4, 865–877.
Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16, 675–729.
Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Smole Mozina, S., Cadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. Int. J. Food Microbiol. 109, 97–102.
Rebuffo-Scheer, C.A., Kirschner, C., Staemmler, M., Naumann, D., 2007. Rapid species and strain differentiation of non-tubercoulous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. J. Microbiol. Methods 68, 282–290.
Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. Int. J. Food Microbiol. 86, 169–180.
Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiol. Res. 157, 267–274.
Sandt, C., Madoulet, C., Kohler, A., Allouch, P., De Champs, C., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2006. FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. J. Appl. Microbiol. 101, 785–797.
Sannino, C., Francesca, N., Corona, O., Settanni, L., Cruciata, M., Moschetti, G., 2013. Effect of the natural winemaking process applied at industrial level on the microbiological and chemical characteristics of wine. J. Biosci. Bioeng. 116, 347–356.
Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., Gutiérrez, A.R., 2005. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. Int. J. Food Microbiol. 103, 49–56.
Schmalreck, A.F., Tränkle, P., Vanca, E., Blaschke-Hellmessen, R., 1998. Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) and algae pathogenic for animals (*Prototheca* spp.) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional method. Mycoses 41 (Suppl. 1), 71–77.
Smole Mozina, S., Čadež, N., Raspor, P., 1998. rDNA RFLPs and AP-PCR fingerprinting of type strains and grape-must isolates of *Hanseniaspora (Kloeckera)* yeasts. Food Technol. Biotechnol. 36 (1), 37–43.
Timmins, E.M., Quain, D.E., Goodacre, R., 1998. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. Yeast 14, 885–893.
Tindall, B.J., Brambilla, E., Steffen, M., Neumann, R., Pukall, R., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 2000. Cultivatable microbial biodiversity: gnawing at the Gordian knot. Environ. Microbiol. 2, 310–318.
Toubas, D., Essendoubi, M., Adt, I., Pinon, J.-M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2007. FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. Anal. Bioanal. Chem. 387, 1729–1737.
Udelhoven, T., Naumann, D., Schmitt, J., 2000. Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. Appl. Spectrosc. 54, 1471–1479.
Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., Dequin, S., 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. FEMS Yeast Res. 7, 317–329.
Vezinhet, F., Hallet, J.-N., Valade, M., Poulard, A., 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. Am. J. Enol. Vitic. 43, 83–86.
Wenning, M., Seiler, H., Scherer, S., 2002. Fourier-Transform Infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. Appl. Environ. 68, 4717–4721.
Wenning, M., Scherer, S., 2013. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 7111–7120.
Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U., Scherer, S., 2014. Identification and differentiation of food-related bacteria: a comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. J. Microbiol. Methods 103, 44–52.
Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. Int. J. Food Microbiol. 125, 197–203.

3.2 La cuverie : Véritable niche écologique ou habitat transitoire pour les levures non-*Saccharomyces* ?

Version soumise à FEMS Microbiology Ecology (Octobre 2015) : FEMSEC-15-10-0551.

The cellar, a real ecological niche or a transient habitat for non-*Saccharomyces* yeasts?

Cédric Grangeteau[1], Daniel Gerhards[2], Christian von Wallbrunn[2], Hervé Alexandre[1], Sandrine Rousseaux[1] and Michèle Guilloux-Benatier[1 *]

[1]UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, IUVV, rue Claude Ladrey, BP 27877, 21000 Dijon, France

[2]Institut für Mikrobiologie und Biochemie Zentrum Analytische Chemie und Mikrobiologie – Hochschule Geisenheim University, Geisenheim, Germany
[*]Corresponding author: michele.guilloux-benatier@u-bourgogne.fr; phone +33380.39.61.92

Running title

Persistence of non-*Saccharomyces* strains in cellar

Keywords

Hanseniaspora, Candida, persistence, cellar, wine grapes

Abstract

The community of yeasts found in grape-berries, musts and wines is large and diverse. Same species and/or genera can be found in these different environments. Nevertheless, the community of non-*Saccharomyces* yeasts present in the cellar is still given little attention. Thus it is not known if the cellar is a real ecological niche for these yeasts or if it is merely a transient habitat for populations brought in by grape-berries during the winemaking period. This study focused on three species of non-*Saccharomyces* yeasts commonly encountered during vinification: *Candida zemplinina* (reclassified *Starmerella bacillaris*), *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum*. More than 1200 isolates were identified at the strain level (207 different strains) by FT-IR spectroscopy. Only a small proportion of non-*Saccharomyces* yeasts present in musts came directly from grape-berries for the three species studied. Some strains were found in the must in two consecutive years and some of them were also found in the cellar environment before the arrival of the harvest of second vintage. This study demonstrates for the first time the persistence of non-*Saccharomyces* yeast strains from year to year in the cellar. Sulfur dioxide can affect yeast populations in the must and therefore their persistence in the cellar environment.

Introduction

Fresh grape berries harbor a wide diversity of non-*Saccharomyces* yeasts (NS). The main genera or species isolated and identified have been (by decreasing order and in relative proportion of the genera/species detected): *Hanseniaspora uvarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia* and *Pichia* (Barata *et al.* 2012). The population density and diversity of these indigenous yeasts on grape berries are strongly linked to numerous factors such as geographic location, climatic condition, viticultural practices (vineyard management and fungicide treatment), vineyard age, grape variety, sanitary state and berry maturity (Hierro *et al.* 2006; Xufre *et al.* 2006; Nisiotou *et al.* 2007; Barata *et al.* 2008, 2012; Cadez *et al.* 2010; Cordero-Bueso *et al.* 2011a,b; Milanovic *et al.* 2013). An even greater diversity of species has been detected in musts (Jolly *et al.* 2003) and non-*Saccharomyces* yeast levels can reach 10^6-10^7 CFU mL^{-1} (Fleet 2003). The main genera usually found in the first stages of spontaneous fermentation are *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia* and, occasionally, *Brettanomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* and *Zygosaccharomyces* (Clemente-Jiménez *et al.* 2004; David *et al.* 2014; Fleet *et al.* 1984; Heard and Fleet 1986; Perez-Martin *et al.* 2014; Zott *et al.* 2008).

It is now accepted that the yeasts involved in fermentation processes have two possible origins: grapes and the winery/cellar environment (Fleet and Heard 1993; Mortimer and Polsinelli 1999). However the diversity of non-*Saccharomyces* yeast in the cellar has been given little attention. The few studies found in the literature report that the diversity, distribution and percentage of identified species vary depending on the cellar and also depending on the area of the cellar scanned (Sabate *et al.* 2002; Garijo *et al.* 2008; Ocon *et al.* 2010, 2013; Bokulich *et al.* 2013; Perez-Martin *et al.* 2014). Most studies show a higher proportion of NS yeasts in the environment of the cellar compared to the population of *Saccharomyces*. But these percentages vary according to the cellar (Ocón *et al.* 2010), the different periods of the year (Bokulich *et al.* 2013; Ocón *et al.* 2013) and different parts of the cellar (Bokulich *et al.* 2013). Proportions of NS yeasts reported in the cellar air are variable (Perez-Martin *et al.* 2014; Ocon *et al.* 2013) and high increases in the number and percentage of *Saccharomyces* were observed during the vinification period (Garijo *et al.* 2008). The main genera in the cellar environment (equipment, soil, air) are *Aureobasidium*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora* and *Williopsis* (Sabate *et al.* 2002; Sangorrin *et al.* 2007; Ocon *et al.* 2010, 2013; Bokulich *et al.* 2013; Perez-Martin *et al.* 2014).

However, the exact role of the cellar environment on the microbiota involved in the fermentation, the transfer of yeast communities from the grape berry to the must and the persistence of these yeasts, are poorly understood. The same genus or the same species can be isolated on grape berries, in the must during alcoholic fermentation and in the cellar environment. But at present, it is still difficult to prove the transfer of yeast strains between the vine, the wine and the cellar (soil, air equipment) and their potential persistence over time. To answer this question, it is first necessary to identify the NS yeasts isolated at the strain level and, secondly, to monitor the strains between the different compartments (vine, wine, cellar), as has already been done for *Saccharomyces cerevisiae* strains (Ciani *et al.* 2004; Le Jeune *et al.* 2006). Indeed, the existence of a cellar *Saccharomyces* flora has already been demonstrated. Sabate *et al.* (1998) isolated a large number of *Saccharomyces cerevisiae* strains common to two years during alcoholic fermentation. Moreover, the persistence of a commercial *S. cerevisiae* strain in the cellar and its participation in alcoholic fermentation two years after its last use as a starter were highlighted by Santamaria *et al.* (2005). Thus some strains seem to persist in the cellar from one year to another and could reimplant in grape must during the next vintage. To our knowledge, no monitoring of non-*Saccharomyces* yeast strains has been conducted so far. This study had two objectives: (i) to determine the origin of non-*Saccharomyces* strains isolated in grape must: grape berries and/or cellar, and (ii) to demonstrate their persistence or not in the cellar in two consecutive vintages. We selected two yeast genera often found in grape must and implicated in the fermentation process: *Candida* and *Hanseniaspora* for which discrimination at the strain level was possible by FT-IR spectroscopy.

Materials and methods

Grape berry sampling

Samples of grape berries were taken from a plot of Chardonnay planted in 1986 and located in Burgundy, France (46°18'32.2"N, 4°44'17.9"E, 258 m altitude). 18 kg were harvested in 2012 (bunch) and 1 kg was collected in 2013 (berries). The climatic conditions of the 2013 vintage and state of health of the harvest did not allow us to obtain the same amount of harvest compared to 2012. Grapes were collected and pressed manually in sterile plastic bags and one sample of must was collected aseptically immediately afterwards (noted Tberries). For the 2012 vintage, alcoholic fermentation (AF) in aseptic conditions was carried out to enable the development of

fermentative genera present but in minority on the bunch. Samples corresponding to this enrichment step were noted Tenrich.

Grape must sampling

The harvest was collected manually and placed in 20 kg crates. The 2012 harvest provided 468 kg and the 2013 harvest 100 kg. The must obtained after pressing was left for one night at 10 °C, and then distributed into 6 tanks for 2012 and 4 tanks for 2013. For each tank, a sample of 50 mL of must was then taken and noted T0. Immediately after sampling, 30 $mg.L^{-1}$ of SO_2 was added in 3 of the 6 tanks for the 2012 vintage and in 2 of the 4 tanks for the 2013 vintage.

Alcoholic fermentation was monitored by enzymatic dosing of the ethanol produced (Bio-SenTec, France). Samples were taken during fermentation: 3 days after settling (T3), 6 days after settling (T6), 9 days after settling (T9) and at the end of fermentation, (Tf).

Cellar environment sampling

For the 2013 vintage, samples were taken from the air, floor and the surface of the cellar equipment before the arrival of the harvest. Samples of air (flow rate 100 L min^{-1}) were taken using a microbial air sampler, MAS-100 Eco (MBV, Stäfa, Switzerland) placed 1.50 m above the floor. For each sample, a dish with YPD medium (0.5% [w/v] yeast extract, 1% [w/v] peptone, 2% [w/v] glucose and 2% [w/v] agar supplemented with chloramphenicol at 0.02% [w/v] to inhibit the development of bacteria) was placed in the air sampler to isolate the yeasts. The volume of air analyzed for each agar gel was 500 L, with three repetitions per sample. A total of 12 samples were taken from the floor and surface of the cellar equipment using swabs. After having rubbed the different surfaces by streaking, each swab was placed in a tube containing 1 mL of water supplemented with NaCl (at 0.9% [w/v]) then vortexed for 5 min before analysis.

Yeast isolation

Serial dilutions were performed from grape berries and must and 3 x 100 µL of each dilution was spread on the YPD medium described previously and incubated at 28 °C. For the samples taken from the cellar floor and the surfaces of the cellar equipment, 3 x 100 µL of the NaCl solution in which the swab was placed were spread on the YPD medium described previously and incubated at 28 °C. For the air samples, the Petri dishes exposed were incubated at 28 °C. For all the samples, according to the colonies present, 50 colonies per replicate were selected

randomly, purified in YPD medium, then cultivated in liquid YPD medium and finally stored at -80 °C in YPD medium supplemented with glycerol (20% [v/v] final concentration).

Yeast identification by FT-IR

Identification of yeast isolates was performed by Fourier-Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy using a Tensor^{TM} 27 spectrometer coupled with an HTS-XT unit (Bruker, Ettlingen, Germany). After standardized cell culture on YGC-Agar (0.5% [w/v], yeast extract, 2% [w/v] glucose, 0.02% [w/v] chloramphenicol and 2% [w/v] agar) for 24 h ± 0.5 h at 28 °C (Kümmerle, Scherer and Seiler 1998), the cells were harvested by carefully scraping the agar plate with a 10 µL plastic loop and suspended in 100 µL of sterile demineralized water. An aliquot of 25 µL of the suspension was transferred to a 96-well zinc selenide (ZnSe) optical plate and dried in a desiccator at 42 °C ± 2 °C for 1 h to form a thin transparent film suitable for FT-IR measurements. The mid-infrared range of 4000-500 wave-length cm^{-2} (25 000 – 2500 nm) was used to excite atoms in molecular bonds, causing them to vibrate. A spectrum was measured and calculated by light absorption. This specific absorption was attributed to several cell components (polysaccharides, fatty acids, proteins, mixed region, *fingerprint*-region) (Lee and Chapman 1986) used for identification (Kümmerle *et al.* 1998). A spectrum of an unknown yeast species was compared to a collection of reference spectra and the distance measured between the spectra was calculated based on the Pearson product moment correlation coefficient. This made it possible to obtain a list of the most similar spectra of the database (Helm *et al.* 1991), leading to identification at the species level. This database consists of about 3000 strains belonging to 215 species representing all wine relevant species.

Strain typing

Typing of strains belonging to the genera *Hanseniaspora* and *Candida* was performed by a hierarchical cluster analysis of the spectra obtained by FT-IR. The dendrogram was calculated using the Average Linkage algorithm and correlation with normalization to reproducibility level. The algorithm is part of the OPUS software package and implemented under the "Cluster analysis" option. The second derivatives of the spectra were used. The frequency ranges were 3032 cm^{-1} to 2829 cm^{-1}, 1351 cm^{-1} to 1200 cm^{-1}, and 901 cm^{-1} to 699 cm^{-1}. Classification into sub-clusters was done by defining a spectral distance as a value for separation on the strain level. According to Kümmerle *et al.* (1998) and applied in a previous work on strains of the genus *Hanseniaspora* (Grangeteau *et al.* 2015), all the branches above a spectral distance of 0.3 were sub-clusters, i.e. different strains.

DNA sequencing and sequence analysis

For the *Candida* genus, all isolates were identified by FT-IR as *Starmelarria bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*). For each different strain of *S. bacillaris* identified, sequencing of the ITS region was performed to validate the results obtained by FT-IR. Genomic DNA was prepared from YPD agar yeast cultures after 2 days incubation, using the InstaGene Matrix kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 25 µL of yeast suspensions in 25 µL of InstaGene matrix were incubated at 56 °C for 30 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. 2 µL of supernatant were added to the PCR mix. Sequencing was performed on 5.8-ITS DNA fragments generated by PCR. The primers ITS1/ITS4 were used (White *et al.* 1990). Beckman Coulter Genomics (England) sequenced the PCR products in both orientations. Nucleotide sequences were deposited in the NCBI GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/: KT877363 to KT877395). Nucleotide alignments were generated for the partial ITS sequence with Clustal x software (Thompson *et al.* 1997). Several sequences obtained from GenBank were included in the phylogeny. Molecular phylogenies were reconstructed with Mega software version 6.0, with the K2P distance model (Kimura 1980) and the Neighbor joining method (Saitou and Masatoshi 1987).

Results and Discussion

During this study, 4049 yeasts were isolated from grape berries, the cellar environment and musts for the 2012 and 2013 vintages. Among these isolates, 214 yeasts belonged to the genus *Candida* and they were all identified as belonging to the species *Candida zemplinina*, reclassified as *Starmerella bacillaris* by Duarte *et al.* (2012). 1078 isolates belonged to the genus *Hanseniaspora* of which 313 for the species *Hanseniaspora guilliermondii* and 765 for the species *Hanseniaspora uvarum*. In spite of the high number of isolates obtained for these two genera, only two species were identified for the genus *Hanseniaspora* and only one for the genus *Candida*. On the contrary, 100 different strains in the 765 isolates belonging to the species *H. uvarum* were identified by FT-IR and for the 313 isolates of the species *H. guilliermondii*, 74 different strains were identified by hierarchical cluster analysis of the spectra obtained by FT-IR (Grangeteau *et al.* 2015). Using this method on FT-IR spectra of 214 isolates of the *S. bacillaris* species, 33 different profiles corresponding to 33 different strains were obtained. According to Kümmerle et al. (1998), for the same species, all the branches above a spectral distance of 0.3 were sub-clusters, i.e. different strains. The ITS sequence of a

representative strain of each profile was obtained and a phylogenetic tree was calculated (Fig. S1) to confirm that they all belonged to the *Starmerella bacillaris* species.

This high intraspecific diversity has recently been highlighted for the same species using the microsatellite method (Masneuf-Pomarede *et al.* 2015).

Distribution of the species *Starmerella bacillaris*, *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during the 2012 vintage

The distribution of three species isolated on berries, must and during AF is shown in Fig. 1. In 2012, the species *S. bacillaris* was not isolated on berries (Fig. 1A), while the species *H. guilliermondii* was isolated only once (Fig. 1B) and the species *H. uvarum* represented only 11.5% of total isolates (Fig. 1C). In spite of the enrichment step, *S. bacillaris* remained proportionally very low (2%) (Fig 1A). However, this step allowed isolating a higher number of yeasts belonging to two species of the genus *Hanseniaspora* (11% and 44% for *H. guilliermondii* and *H. uvarum*, respectively). The low presence in particular of *S. bacillaris* and *H. guilliermondii* was also observed by Li *et al.* (2010) for different grape varieties including Chardonnay. Compared to populations isolated on berries, the proportion of these three species isolated in must (T0), obtained after pressing and clarification, was higher: from 0% (berries) to 19% of isolates (must) for *S. bacillaris*, from 0.4% to 14% for *H. guilliermondii* and from 11.5% to 20% for *H. uvarum*. Their presence in must has already been shown in different studies (Xufre *et al.* 2006; Zott *et al.* 2008). Several hypotheses may explain the increase in the proportion of these species in must: the selection and modification of the distribution of species linked to changes in environmental conditions such as the modification of osmotic pressure (high concentration of sugars in grape must), pH or available oxygen (Sannino *et al.* 2013), or enrichment by exogenous yeasts present in the cellar environment (Ocón *et al.* 2010; Tello *et al.* 2012). In the absence of SO_2, during the first days of AF, the proportion of *S. bacillaris* fell considerably compared to T0, while remaining at a low percentage until T9 (1%, 1% and 3% at T3, T6 and T9, respectively) (Fig 1A). This species did not appear able to implant itself in the must, which may be explained by

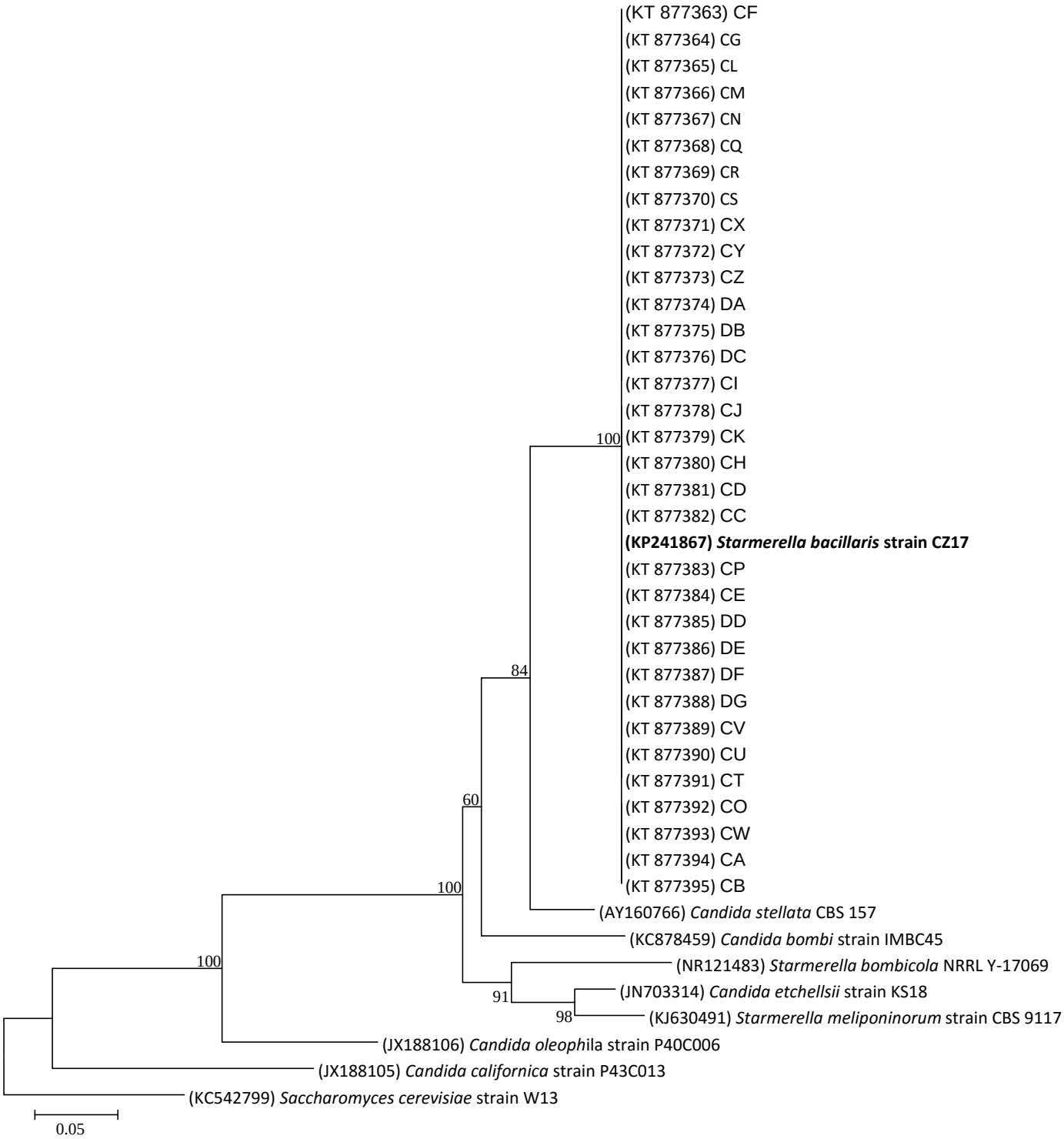


Fig. S1: Phylogenetic tree calculated from neighbor-joining for isolates of *Candida* genus analyzed from ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene. The numbers at the nodes indicate the bootstrap support in percentage based on 1000 replication. Branch lengths are proportional to the scale given in substitutions per nucleotide. *Saccharomyces cerevisiae* was used as outgroups. GenBank accession numbers are shown in parentheses.

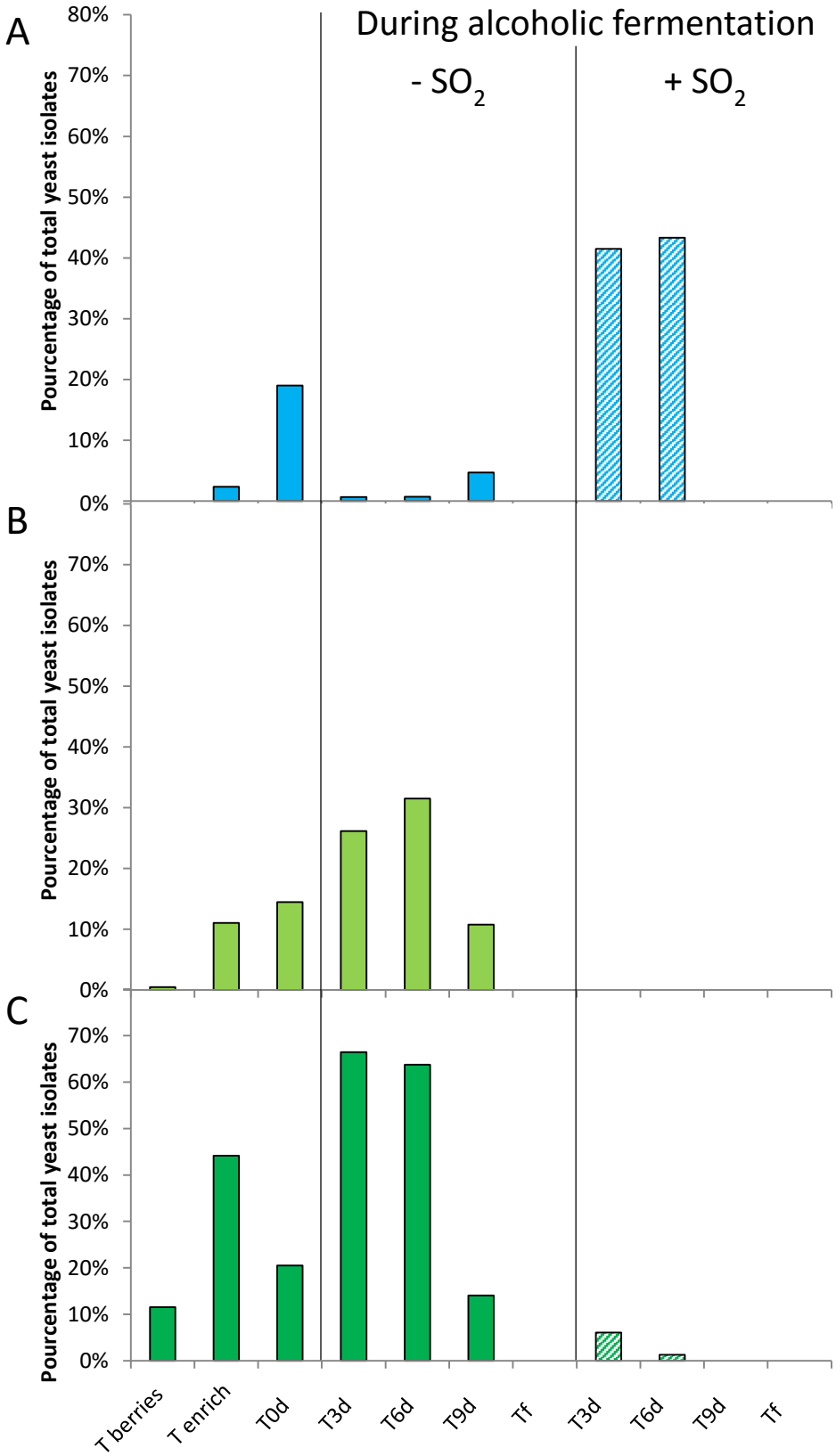


Fig. 1. Percentage of *Starmerella bacillaris* (panel A), *Hanseniaspora guilliermondii* (panel B) and *Hanseniaspora uvarum* (panel C) isolated from berries (T berries, T enrich), grape must (T0d) and during alcoholic fermentation (T3d, T6d, T9d, Tf) with and without SO_2 for 2012 vintage.

the strong presence of the genus *Hanseniaspora* in the same medium during the first days of AF. Indeed, this genus represented more than 90% of the population (Fig. 1B and 1C) at T3 and T6, with the strong presence of the species *H. uvarum* (66% at T3 and 64% at T6) (Fig. 1C). At T9, the proportion of the genus *Hanseniaspora* fell considerably, from 32% to 10% for *H. guilliermondii* and from 64% to 14% for *H. uvarum*. The low presence of *S. bacillaris* when that of the genus *Hanseniaspora* was substantial may result from antagonism between strains, as has already been shown for other yeast strains: between *Brettanomyces* and *Pichia* (Santos *et al.* 2009), between *Metschnikowia* and *Brettanomyces*, *Hanseniaspora* and *Pichia* (Oro *et al.* 2014). None of these three species (*S. bacillaris*, *H. guilliermondii* and *H. uvarum*) was isolated at the end of AF (Tf). They were replaced by the species *Saccharomyces cerevisiae* during AF (data not shown).

In the presence of SO_2, the behavior observed differed greatly according to yeast genus. During the first days of FA, the proportion of the species *S. bacillaris* increased strongly, continuing until T6 (41% and 46% of the population at T3 and T6, respectively). On the contrary, the proportion of the species *H. uvarum* decreased considerably during the first days of AF (6% and 1% of the population at T3 and T6, respectively) (Fig. 1B) and the species *H. guilliermondii* was not isolated in the presence of SO_2 (Fig. 1C). The implantation of the species *S. bacillaris* appeared to be facilitated following the addition of SO_2 given its known resistance to this antiseptic (Albertin *et al.* 2014b). Besides its resistance to SO_2, the rapid and strong development of the species *S. bacillaris* could also have occurred to the detriment of the sparse implantation of the genus *Hanseniaspora*, inhibited by the presence of the antiseptic (Albertin *et al.* 2014b), thereby freeing an ecological niche. Nonetheless, for the three species, the presence of SO_2 resulted in a more rapid decrease in their proportion since they were not found after T9 (Fig. 1). As for the total disappearance of the species *S. bacillaris* at T9, this may have been directly linked to its sensitivity to ethanol, as shown by Magyar and Tóth (2011). At T9, the content of ethanol in the medium was about 9%v/v whereas it was only 5%v/v at T6. Furthermore, as described by Henick-Kling *et al.* (1998), the presence of SO_2 favored the implantation of strains of *Saccharomyces cerevisiae*, thus leading to faster production of ethanol in the medium. In our study, this implantation of *S. cerevisiae* was observed from T3 and reached 100% of the population at T9 (data not shown), possibly explaining the total disappearance the species *S. bacillaris* at T9.

The results obtained highlight an increase of the population of the three species studied in must compared to that isolated on berry. This increase may be linked either to the implantation of

exogenous yeasts or to the preferential development of these species. To verify these hypotheses, the intraspecific biodiversity of the yeasts from grape berries, the grape must and the cellar environment was characterized by FT-IR spectroscopy for the three species studied. This study also allowed highlighting possible differences in resistance to SO_2 as a function of strain for the three species concerned.

Intraspecific study of populations of *Starmerella bacillaris* in 2012 and 2013

The results of the intra-specific study of *S. bacillaris* in 2012 are shown in Fig. 2. The number of strains detected in berries, even following enrichment, was very low (only three different strains: CF, CG and CP). However, high intraspecific diversity was observed in the must (T0, Fig. 2A and Fig. 2B), since 19 different strains were identified. No strain was seen to be predominant. These results strengthen the hypothesis of implantation in the must of strains present in the cellar environment. Only one strain isolated in berries after enrichment (Tenrich) was found in the must at T0, i.e. strain CP. In the absence of SO_2 (Fig. 2A), no strain isolated at T0 was isolated again during AF except strain CO isolated at T9. During AF, four new strains (CL, CS, DC and CQ) were detected but at only one time. These results confirm the low implantation of certain strains of the species *S. bacillaris* during AF. In the presence of SO_2 (Fig. 2B), the three different strains isolated on berries after enrichment did not implant during AF, except for strain CP isolated at Tenrich, T0 and T3. The proportion of strain CP was 4% at T0, before reaching 9% at T3. However, it was no longer isolated afterwards (Fig. 2B). None of the five strains (CO, CL, CS, DC and CQ) isolated during AF without SO_2 was found in the must fermented with SO_2. This could be due to the high sensitivity of these strains to SO_2. On the other hand, in the must fermented with SO_2, 8 new strains were isolated: CX, CY, CZ, DA and DB at T3 and CR, CM and CN at T6. Certain of these strains were present in high percentages of the total yeast population (26% for strain CX, 28% for strain CR and 16% for strain CM). These results highlight for the first time the implantation of strains of *S. bacillaris* stemming from the cellar environment (strains from the air, floor, wine-making equipment and other grape musts fermenting in the cellar). The implantation of these eight strains was perhaps aided by the presence of SO_2 against which their resistance could be higher than the other strains. This implantation could also be due to the disappearance of other strains of *S. bacillaris* and to the disappearance of other yeast species or genera such as *Hanseniaspora* (as mentioned in the results above). As observed already for *S. cerevisiae* (Vezhinet and Hallet 1992), the dynamics of the species *S. bacillaris* during AF corresponds to a succession of different strains. Indeed, the five strains isolated at

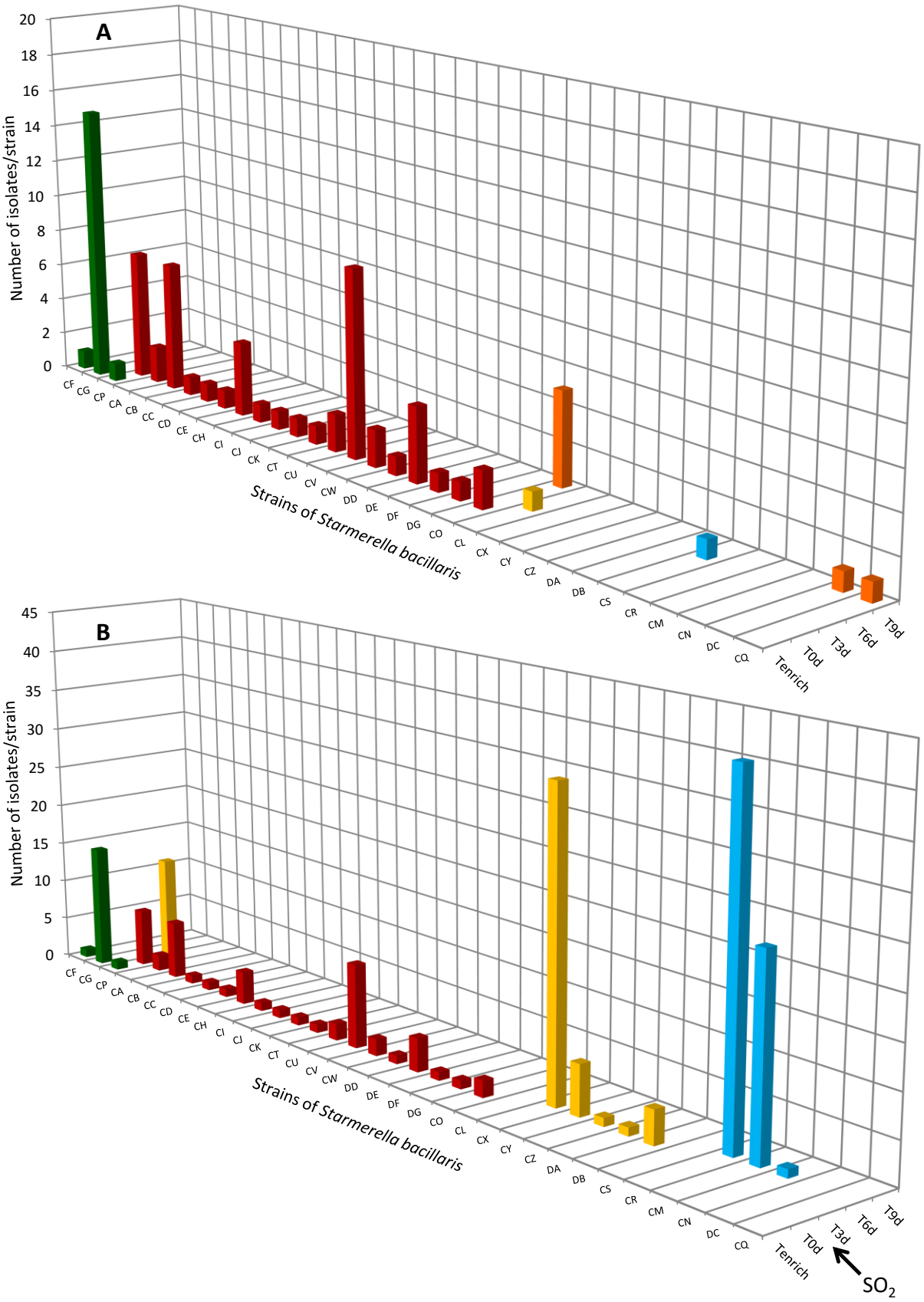


Fig. 2. Distribution of *Starmerella bacillaris* strains during 2012 vintage isolated on berries (T enrich), in grape must (T0d) and during alcoholic fermentation (T3d, T6d, T9d, Tf) without SO_2 (panel A) and with SO_2 (panel B).

T3 disappeared and then three other strains were isolated at T6 before disappearing too, probably due to the ethanol content of the medium at that time (4-5%v/v) and competition between the yeasts during alcoholic fermentation.

The strains found in the must during alcoholic fermentation with and without SO_2 likely originated from the cellar since only one of these strains (CP) was found on the grape berry. In addition, despite the inability of *S. bacillaris* to persist in wine, we wanted to know whether certain strains isolated in 2012 could persist in the cellar environment for one year. Thus isolates were obtained before the arrival of the 2013 harvest in the cellar environment (air, floor, equipment). No yeast of this species was isolated. However, *S. bacillaris* had already been found in the cellar environment but in very low proportion and mainly on the type of equipment not used for the fermentations performed in this study (CO_2 suction line) (Bokulich *et al.* 2013). This was also the case for the genus *Candida* which was not isolated on the grapes harvested in 2013, in the must or during the AF of this vintage. The results therefore appear to indicate the low capacity of *S. bacillaris* strains to persist in the cellar environment from one vintage to the next. However, it is possible that certain strains persisted but that the conditions of the 2013 vintage did not prove propitious for their development and they therefore remained at levels below detection limits.

Intraspecific study of populations of the genus *Hanseniaspora* in 2012 and 2013

The results of the intraspecific study for *H. guilliermondii* and *H. uvarum* are presented in Fig. 3 and Fig. 4, respectively. In 2012, very considerable diversity was observed for the population of *Hanseniaspora* present on berries following the enrichment step. Thus 24 different strains were isolated for *H. guilliermondii* and 30 for *H. uvarum*. For these two species, the enrichment step proved very useful as it allowed significantly increasing the number of isolates and thus strains isolated (1 strain on berries and 24 after enrichment for *H. guilliermondii*, 6 strains on berries and 30 after enrichment for *H. uvarum*). On the contrary, it is noteworthy that 4 strains of *H. uvarum* isolated on berries were not found after the enrichment step. Regarding this vintage, and contrary to what was observed for the species *S. bacillaris* (three strains at Tenrich and 19 strains at T0), the number of different strains was lower in the must at T0: 18 strains for *H. guilliermondii* and 20 strains for *H. uvarum* compared to the number of strains identified after enrichment: 24 and 30 strains for *H. guilliermondii* and *H. uvarum*, respectively. Of the 24 different strains of *H. guilliermondii* and the 34 different strains of *H. uvarum* from berries (Tberries and/or Tenrich), only 5 strains

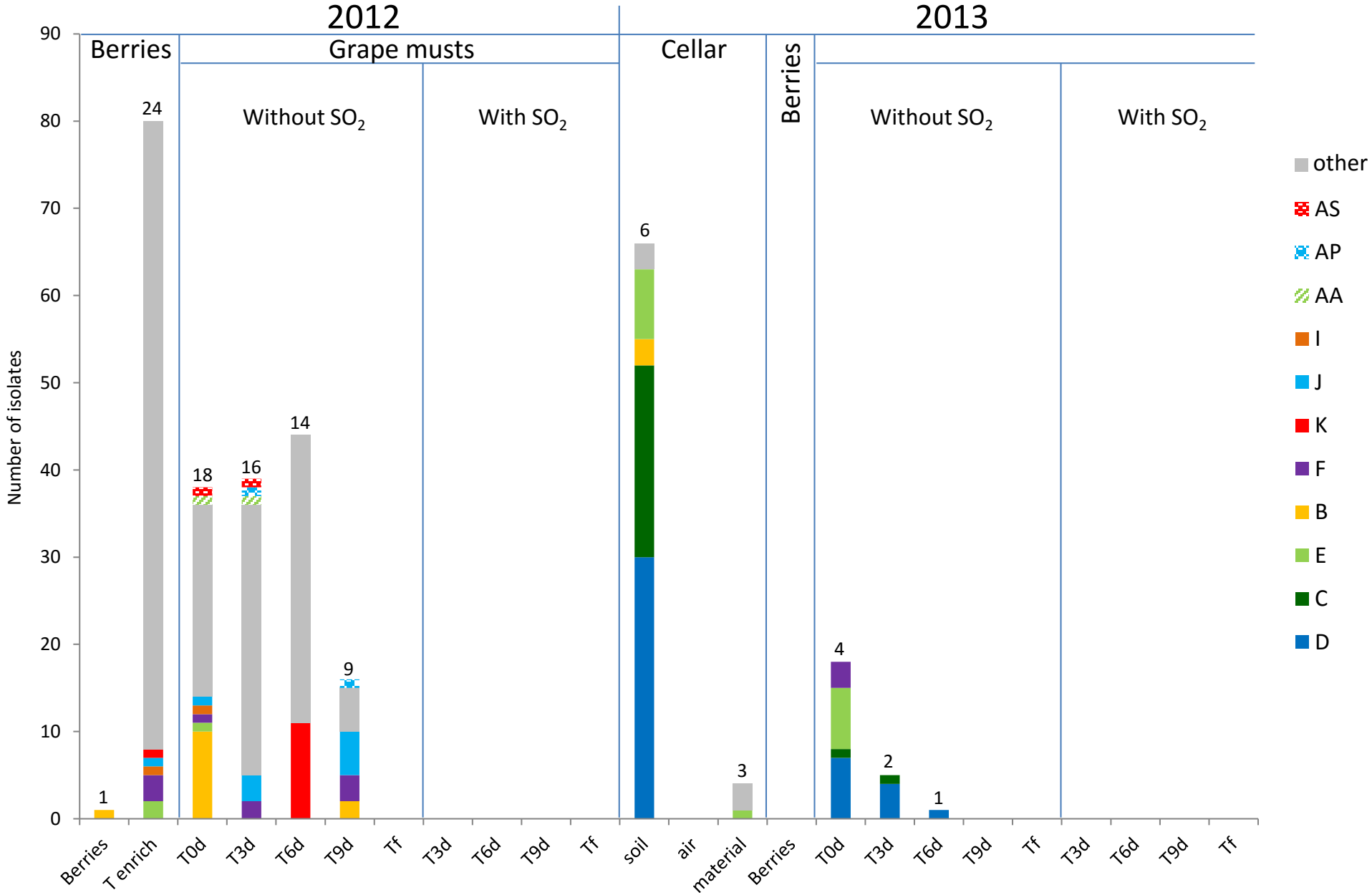


Fig. 3. Repartition of *Hanseniaspora guilliermondii* strains isolated on berries, in grape must, during alcoholic fermentation (T3d, T6d, T9d, Tf) with and without SO_2 for 2012 and 2013 vintages and in cellar environment in 2013 before the arrival of harvest.

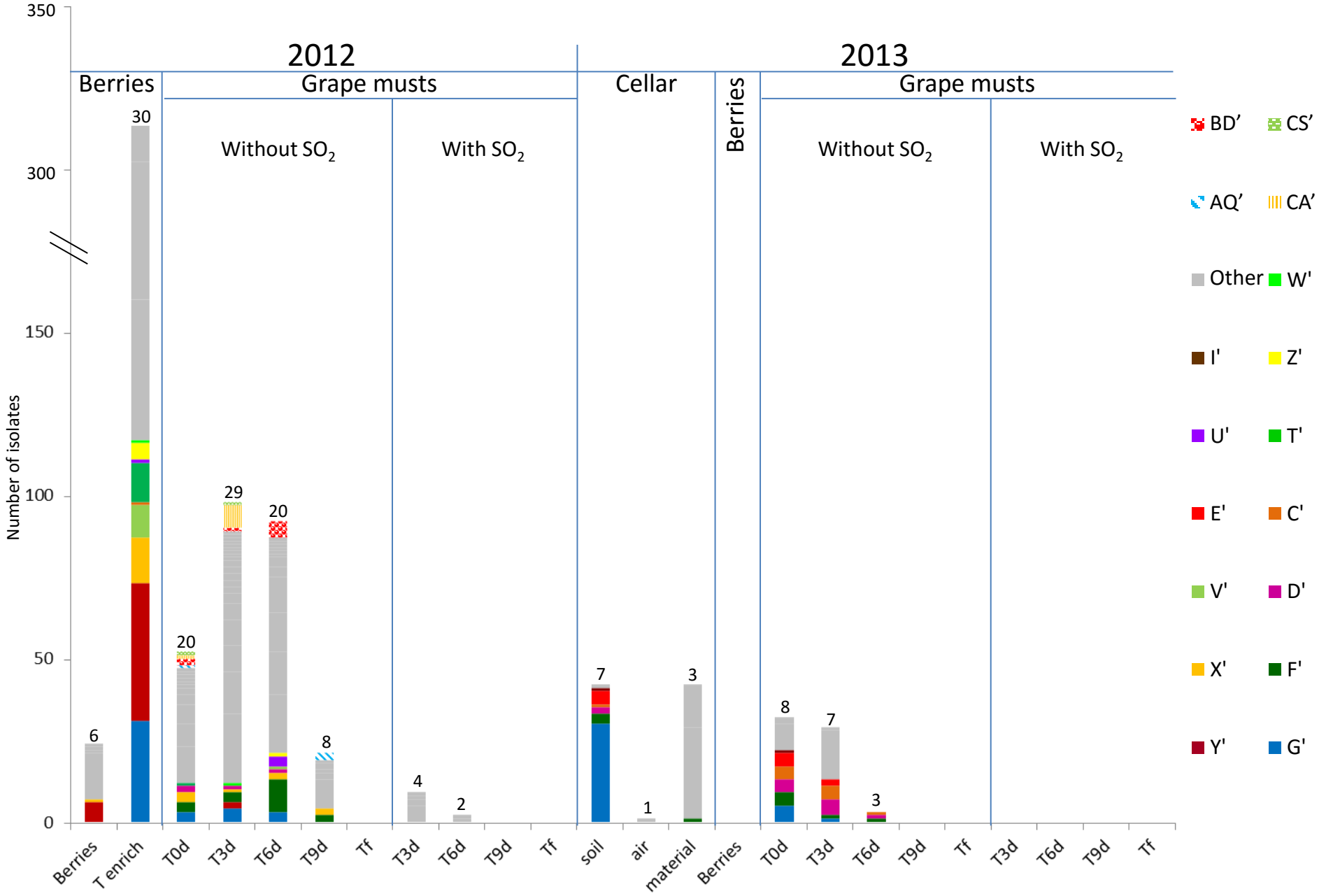


Fig.4. Repartition of *Hanseniaspora uvarum* strains isolated on berries, in grape must, during alcoholic fermentation (T3d, T6d, T9d, Tf) with and without SO_2 for 2012 and 2013 vintages and in cellar environment in 2013 before the arrival of the harvest.

(B, E, F, I and J) for *H. guilliermondii* and 3 strains (G', T' and X') for *H. uvarum* were found in the grape must at T0. Several other strains present on berries were also detected, not at T0 but during AF. These strains were strain K (T6) for *H. guilliermondii* and strains Y' and W' present at T3 and strains U', V' and Z' present at T6 for *H. uvarum*. This confirmed that part of the non-*Saccharomyces* yeasts present in the grape must have come from the vineyard. However, the major part of the strains identified at T0 (13 strains for *H. guilliermondii* and 17 strains for *H. uvarum*) and during AF (30 strains for *H. guilliermondii* and 41 strains for *H. uvarum*) were not found on the berries and therefore likely came from the cellar environment. The strains found at T0 implanted in the must during the pre-fermentation steps. We can therefore assume that the pressing and clarification steps lead to a selection of strains while favoring the implantation of strains better adapted to grape must conditions. The strains found in the must during fermentation were also certainly better adapted to the medium. In the absence of SO_2, the number of strains of the species *H. guilliermondii* (Fig. 3) decreased progressively during AF (18, 16, 14, 9 and 0 strains at T0, T3, T6, T9 and Tf, respectively). Despite this decrease, it is noteworthy that the great majority of strains identified at T3 (12 strains) and all the strains isolated at T6 (14 strains) were not present at T0. Only two strains, AS and AA, were isolated at T0 and at T3 and strain K was isolated at Tenrich and T6. Thus most of the strains found during alcoholic fermentation appeared to have originated from the cellar environment. At T9, except for the strains found in very low proportions (5 strains), all the strains present (B, F and J) had been isolated previously during AF. Thus it appears that from T6, the selection of strains was more related to the increased concentration of ethanol rather than to new implantations of strains. We can observe different cases for these results: strains present on the grape berries (Tberries and/or Tenrich) that persisted during AF (strains B, F, J, K), strains present on berries and that were found only in the grape must and which did not implant during AF (strains E, I), strains present on berries and that were never found again (19 strains) and, finally, the large majority of strains (29 strains) probably stemming from the cellar environment and which were isolated once or possibly several times (AA, AP and AS) during fermentation. Regarding the species *H. uvarum* (Fig. 4), in 2012 and in the absence of SO_2, the number of strains increased slightly at the beginning of AF (20 strains at T0 and 29 strains at T3). As from T6, the number of strains decreased (20, 8, and 0 strains at T6, T9 and Tf, respectively). Of the strains isolated throughout fermentation, only strains AQ', BD', CA', CS', D', F', G' and X' were also isolated in the must (T0). This leads to the assumption of strains from outside. Indeed, certain strains not isolated in the grape must at T3 or at T6 were found at T9 (3 strains). Thus there was a succession of strains during AF though much less obvious than that observed for *S.*

bacillaris. In the same way as for *H. guilliermondii*, we observed different behaviors of strains of *H. uvarum*: strains present on grape berries (Tberries and/or Tenrich) that persisted during AF (G', U', V', X', Y', W' and Z'), strains present on berries that were only found in grape must and which were not implanted during fermentation (strain T'), strains present on berries but which were never found again (26 strains), strains probably stemming from the cellar environment isolated in the must (T0) and which persisted during FA (strains D', F', AQ', BD', CA', CS') or for the great majority of strains (44 strains) that were only isolated once or twice during fermentation.

SO_2 had a very strong effect on *H. guilliermondii* as this species was no longer detected in the medium after adding this antiseptic (Fig. 3). These results confirm this species' low tolerance for SO_2. Regarding *H. uvarum*, a small number of strains resisted the presence of SO_2; thus 4 strains were isolated at T3 and other strains at T6 (Fig. 4). As with *S. bacillaris*, the strains present during fermentation with SO_2 were not those that had been isolated at T0. Thus it is likely that the cellar environment contained strains particularly adapted to these fermentation conditions and which implanted and developed following the elimination of less well adapted strains. Resistance to SO_2 for the species *S. bacillaris* and *H. uvarum* could be strain dependent, as with *Saccharomyces cerevisiae* (Divol *et al.* 2006). As observed for *S. bacillaris*, no strain belonging to the genus *Hanseniaspora* (Fig. 3 and Fig. 4) was present at the end of alcoholic fermentation whether with or without SO_2. In 2013, and contrary to *S. bacillaris*, different strains of *H. guilliermondii* (six on the floor and three on the equipment) (Fig. 3) and *H. uvarum* (seven on the floor, three on the equipment and one in the air) (Fig. 4) were isolated in the cellar before the arrival of the harvest. These results clearly confirm the presence of these species of non-*Saccharomyces* among others in the cellar environment already observed by different authors (Bokulich *et al.* 2013; Ocón *et al.* 2010). On the other hand, these results show the presence of different strains of the same species in the cellar environment for the first time. Of these strains in the cellar environment, strains B and E for *H. guilliermondii* and strains C', D', F' and G' for *H. uvarum* had already been isolated in 2012. Furthermore, strains B and E (*H. guilliermondii*) and strains C' and G' (*H. uvarum*) came from the vineyard. Also demonstrated for the first time was the capacity of certain strains of *H. guilliermondii* and *H. uvarum* to persist from one vintage to another in the cellar environment. The species *Saccharomyces cerevisiae* (Sabate *et al.* 1998; Santamaría *et al.* 2005) is also known to persist in the same environment, which raises the question whether yeasts of the genus *Hanseniaspora* can implant in musts after

staying in the cellar environment for a year in the same way as strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

The most probable source of the *Hanseniaspora* yeasts isolated in the must for this vintage was the cellar environment since no other yeast belonging to the genus *Hanseniaspora* was isolated on berries in 2013. Three strains of *H. guilliermondii* (strains C, D and E) (Fig. 3) and 6 strains of *H. uvarum* (strains C', D', E', F', G', I') (Fig. 4), isolated in musts in 2013 at T0 were found again in the environment before the arrival of the harvest. Among these strains, strains B and E of the species *H. guilliermondii* and strains D', F' and G' of the species *H. uvarum* had already been isolated in the musts of 2012. They therefore survived for a year in the cellar environment before reimplanting in the musts of the following year. Among the strains that had remained in the cellar environment between 2012 and 2013 only strain B (Fig. 3) was not isolated in the musts of 2013. These results show the considerable capacity for implantation of these strains after one year in the cellar environment. What is more, strain C' (Fig. 4) isolated in the vineyard in 2012 but not found again in the musts of 2012 was isolated in the cellar environment before the arrival of the harvest and in the musts in 2013 and at several times (T0, T3 and T6). This strain could have been introduced in the cellar in 2012 with our harvest without having developed sufficiently to be detected. This strain could also have been introduced by the harvests and the later AF performed in the same cellar. Lastly, this strain could have been present in the cellar environment during several vintages but not implanted and developed sufficiently to be detected in 2012. This case had already been observed for *Saccharomyces* by Santamaria *et al.* (2005) who isolated certain strains in one vintage, but not in several succeeding ones, and then found the same strain again. In addition, our results highlighted two strains D' and F', not isolated on berries in 2012 but present at every stage of AF (from T0 to T9 for F' and up to T6 for D'), that persisted in the cellar environment (floor and/or equipment) and which were isolated in the must (T0) and during AF (T3 and T6) in 2013. These strains appeared to be particularly well-adapted to the wine-making environment and the conditions imposed by the wine medium (except for the addition of SO_2).

Much lower intraspecific diversity was observed for the two species of *Hanseniaspora* in the musts in 2013 (four and height strains for *H. guilliermondii* and *H. uvarum*, respectively) in comparison to 2012 (18 and 20 strains for *H. guilliermondii* and *H. uvarum*, respectively). This low diversity could be due to the absence of strains stemming from grape and to a lower volume of musts linked to a less abundant harvest in 2013. In the absence of SO_2, the number of strains of *H. guilliermondii* fell as from the first days of FA. 4 strains were isolated at T0, 2 at T3, 1 at

T6 and none from T9. Strain F isolated at T0 was the only strain not to have been isolated in the cellar environment but which was present in the musts (T0, T3 and T9) and on the berries (Tenrich) in 2012. Regarding the species *H. uvarum*, all the strains except strain I', isolated at T0 were still present at T3. At T6, three strains were still isolated and none were from T9 onwards. Thus the best adapted strains had undergone selection since the 3 strains C', D' and F' were present from the start until T6.

In the presence of SO_2, no strain belonging to the genus *Hanseniaspora* was isolated in the must during fermentation in 2013 whereas strains of the species *H. uvarum* were isolated at T3 and T6 in 2012. Nonetheless, none of the strains that had resisted SO_2 in 2012 appeared to have subsisted in the cellar environment between 2012 and 2013. Furthermore, several studies have shown that the yeasts of the genus *Hanseniaspora* are quite sensitive to the presence of SO_2 (Albertin *et al.* 2014; Cocolin *et al.* 2003). The capacity to resist this antiseptic is undoubtedly a rare characteristic among the strains of the genus *Hanseniaspora*. This was also confirmed in this study by the small number of strains persisting in the presence of SO_2 in 2012 (only six strains). Lastly, during the 2013 vintage, the species *Saccharomyces cerevisiae* was present as from T0 whereas it was only detected from T3 in 2012 (data not shown). This initial presence coupled with that of SO_2 which favors an increase in the proportion of *Saccharomyces* (Henick-Kling *et al.* 1998) could be detrimental to strains of *Hanseniaspora* in comparison to those of *Saccharomyces cerevisiae* and explain their disappearance from the beginning of AF (Nissen *et al.* 2003; Pérez-Nevado *et al.* 2006).

This is the first time populations of non-*Saccharomyces* yeasts have been studied at the intraspecific level in the vineyard, the cellar environment and grape musts during alcoholic fermentation for two consecutive vintages. In spite of the low interspecific diversity for the two genera studied here (a single species for the genus *Candida* and 2 for the genus *Hanseniaspora*), high intraspecific diversity was demonstrated for the 3 species identified: (74 strains for *Hanseniaspora guilliermondii*,100 strains for *Hanseniaspora uvarum* and 33 strains for *Candida zemplinina* recently reclassified as *Starmerella bacillaris*). Monitoring these strains in musts during alcoholic fermentation showed that, whatever the species considered, there was no really predominant species but rather a succession of different strains, as was observed for the species *Saccharomyces cerevisiae*.

Furthermore, this study confirmed that using sulfur dioxide eliminates the species of the genus *Hanseniaspora* and thus permits the development of the species *Starmeralla bacillaris* which is more resistant to this antiseptic. Intraspecific differences regarding resistance to SO_2 lead, at

species level, to the elimination of the most sensitive strains, thereby permitting the development and/or implantation of more resistant strains from the cellar environment.
Lastly, this study showed for the first time the persistence in the cellar environment of strains of non-*Saccharomyces* yeasts capable of reimplantation during the following vintage. Thus, the cellar is not only a transient habitat. However, this capacity is not shared between every yeast species since only two species of the genus *Hanseniaspora* were isolated in the cellar environment during the second vintage. This concerns a limited number of strains: 5 strains (1 for *H. guilliermondii* and 4 for *H.uvarum*). As described for *Saccharomyces cerevisiae*, we highlighted for the first time that the non-*Saccharomyce*s flora of the cellar appeared to predominate in comparison to the grape flora. The capacity of species and strains to persist in the cellar therefore influences yeast biodiversity in musts.

Funding

This work was supported by the Regional Council of Burgundy and the Interprofessional Office of Burgundy wines.

Acknowledgements

We thank the Institute of Microbiology and Biochemistry of the Hochschule Geisenheim University for its cooperation and providing access to the FTIR spectroscopy unit.

References

Albertin W, Miot-Sertier C, Bely M *et al.* Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *Int J Food Microbiol* 2014;**178**: 87–97. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.009

Barata A, Seborro F, Belloch C *et al.* Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *J Appl Microbiol* 2008;**104**: 1182–1191. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025

Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. The microbial ecology of wine grape berries. *Int J Food Microbiol* 2012;**153**: 243–259. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03631.x

Bokulich AN, Ohta M, Richardson PM *et al.* Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PLoS ONE* 2013;**8**: e66437. DOI:10.1371/journal.pone.0066437

Čadež N, Zupan J, Raspor P. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res* 2010;**10**: 619-630. DOI:10.1111/j.1567-1364.2010.00635.x

Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004;**85**: 159–164.

Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S *et al.* Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol* 2004;**21**: 149–155. DOI:10.1016/S0740-0020(03)00063-7

Cocolin L, Mills DA. Wine yeast inhibition by sulfur dioxide : a comparison of culture-dependent and independent methods. *Am J Enol Vitic* 2003;**2**: 125–130.

Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int J Food Microbiol* 2011a;**145**: 132–139. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040

Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A *et al.* Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiol Ecol* 2011b;**77**: 429–437. DOI:10.1111/j.1574-6941.2011.01124.x

David V, Terrat S, Herzine K *et al.* High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2014;**41**: 811-821. DOI:10.1007/s10295-014-1427-2

Divol B, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for "refermentation" in *Botrytis*-affected wines. *J Appl Microbiol* 2006:**100**: 516–526. DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02818.x

Duarte FL, Pimentel NH, Teixeira A *et al. Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012;**102**: 653–658. DOI:10.1007/s10482-012-9762-7

Fleet G. Yeasts in fruit and fruit products. In: Boekhout T, Robert V (Eds.), *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*, CRC Press Publishers, 2003. 13–54.

Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, Ribereau-Gayon P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl Environ Microbiol* 1984;**48**: 1034–1038.

Fleet GH, Heard G. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. CRC Press, London, 1993,27–54.

Garijo P, Santamaría P, López R *et al.* The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int J Food Microbiol* 2008,**125**: 141–145. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.014

Grangeteau C, Gerhards D, Rousseaux S *et al.* Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiol* 2015;**50**: 70–77. DOI:10.1016/j.fm.2015.03.009

Heard GM, Fleet GH. Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. *J Appl Microbiol* 1986;**60**: 477–481. DOI:10.1111/j.1365-2672.1986.tb01086.x

Helm D, Labischinski H, Naumann D. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-Transform IR spectral libraries: A stepwise correlation approach. *J Microbiol Methods* 1991;**14**: 127–142. DOI:10.1016/0167-7012(91)90042-O

Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P *et al.* Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J Appl Microbiol* 1998;**84**: 865–876. DOI:10.1046/j.1365-2672.1998.00423.x

Hierro N, González A, Mas A *et al.* Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Res* 2006;**6**: 102–111. DOI:10.1111/j.1567-1364.2005.00014.x

Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South African J Enol Vitic* 2003;**24**: 63–69.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;**16**: 111–120.

Kümmerle M, Scherer S, Seiler H. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 1998;**64**: 2207–2214.

Le Jeune C, Erny C, Demuyter C *et al.* Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol* 2006;**23**: 709–716. DOI:10.1016/j.fm.2006.02.007

Lee DC, Chapman D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. *Biosci Rep* 1986;**6**: 235–256.

Li SS, Cheng C, Li Z *et al.* Yeast species associated with wine grapes in China. *Int J Food Microbiol* 2010;**138**: 85–90. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.009

Magyar I, Tóth T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 2011;**28**: 94–100. DOI:10.1016/j.fm.2010.08.011

Masneuf-Pomarede I, Juquin E, Miot-Sertier C *et al.* The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Res* 2015;**15**: 1-11. DOI:10.1093/femsyr/fov045

Milanović V, Comitini F, Ciani M. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *Int J Food Microbiol* 2013;**161**: 240–246. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019

Mortimer R, Polsinelli M. On the origins of wine yeast. *Res Microbiol* 1999;**150**: 199–204.

Nisiotou A, Spiropoulos AE, Nychas GJ. Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. *Appl Environ Microbiol* 2007:**73**: 6705–13. DOI:10.1128/AEM.01279-07

Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 2003;**20**: 331–341. DOI:10.1002/yea.965

Ocón E, Gutiérrez AR, Garijo P *et al.* Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiol* 2010;**27**: 1023–1027. DOI:10.1016/j.fm.2010.06.012

Ocón E, Garijo P., Sanz S *et al.* Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control* 2013;**30**: 585–589. DOI:10.1016/j.foodcont.2012.07.051

Oro L, Ciani M, Comitini F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 2014;**116**: 1209–1217. DOI:10.1111/jam.12446

Pérez-Martín F, Seseña S, Fernández-González M *et al.* Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int J Food Microbiol* 2014;**190**: 44–53. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.020

Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T *et al.* Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 2006;**108**: 336–45. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012

Sabate J, Cano J, Querol A *et al.* Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett Appl Microbiol* 1998;**26**: 452–455.

Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B *et al.* Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbial Res* 2002;**157**: 267–274.

Saitou N, Masatoshi N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;**4**: 406–425.

Sangorrín MP, Lopes CA, Belloch C *et al. Candida patagonica* sp. nov., a new species of yeast from cellar surfaces. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007;**92**: 77–81. DOI:10.1007/s10482-006-9137-z

Sannino C, Francesca N, Corona O *et al.* Effect of the natural winemaking process applied at industrial level on the microbiological and chemical characteristics of wine. *J Biosci Bioeng* 2013;**116**: 347-356. DOI:10.1016/j.jbiosc.2013.03.005

Santamaría P, Garijo P, López R *et al.* Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int J Food Microbiol* 2005;**103**: 49–56. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.024

Santos A, San Mauro M, Bravo E *et al.* PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 2009;**155**: 624–634. DOI:10.1099/mic.0.023663-0

Tello J, Cordero-Bueso G, Aporta I *et al.* Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 2012;**112**: 302–315. DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;**25**: 4876–4882.

Vezinhet F, Hallet J. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am J Enol Vitic* 1992;**43**: 83–86.

White T, Bruns T, Lee S *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Inns MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, Inc., New York, 1990, 315-322.

Xufre A, Albergaria H, Inácio J *et al.* Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int J Food Microbiol* 2006;**108**: 376–384. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.025

Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O *et al.* Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int J Food Microbiol* 2008;**125**: 197–203. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001

Chapitre V – Les facteurs anthropiques : modulation des populations fongiques du raisin au vin et répercussions sur les caractéristiques du vin.

Au cours des dernières décennies, les pratiques au vignoble et en cave ont considérablement évoluées. Les 20 dernières années ont notamment vu l'émergence d'une agriculture raisonnée et le développement de la viticulture biologique. En cuverie les pratiques ont également changé avec l'adoption en 2012 par la Commission Européenne d'une charte de vinification en agriculture biologique et l'orientation de certains vinificateurs vers une vinification avec zéro intrant dont notamment le dioxyde de soufre. Des études récentes ont évalué d'une part l'effet des pratiques viticoles sur les populations levuriennes présentes sur baies et d'autre part sur les pratiques œnologiques présentes au cours de la vinification. Cependant peu de connaissances sont disponibles sur les effets cumulés des pratiques réalisées au vignoble et en cave sur le processus de fermentation alcoolique et leurs répercussions sur les caractéristiques des vins produits. Le but de cette étude est dans un premier temps d'évaluer l'effet de 3 modes de protection phytosanitaire sur les populations des baies de raisin afin de voir si par la suite ces effets sont gommés ou amplifiés par les différentes pratiques œnologiques. Cette étude est la première réalisée sur 3 millésimes à l'aide d'une méthode d'étude globale de la diversité permettant d'avoir accès à l'ensemble des genres fongiques (levures et moisissures) présentes sur les baies de raisin. Les populations ont ensuite pour le millésime 2013 été identifiées en moût de raisin après les étapes de pressurage et de clarification puis tout au long de la fermentation alcoolique en présence ou en absence de SO_2. Par ailleurs, la composition chimique des moûts et des vins a été analysée par une FT-ICR-MS afin d'évaluer les répercussions des pratiques viticoles et œnologiques. Cette étude est la première à notre connaissance à utiliser des technique d'analyses globales en microbiologie et en chimie afin de caractériser le plus largement possible les effets du mode de protection du vignoble sur les vins produits. Une publication (présenté ci-dessous) est en cours de finalisation sur ces résultats en collaboration avec Chloé Roullier-Gall et Philippe Schmitt-Kopplin (du laboratoire de Biogéochimie Analytique du Helmholtz Zentrum de Munich), Régis Gougeon (de l'équipe PAPC de l'UMR PAM à Dijon), Hervé Alexandre, Sandrine Rousseaux et Michèle Guilloux-Bénatier (de l'équipe VAlMiS de l'UMR PAM à Dijon). Par ailleurs, une analyse sensorielle présentée en Annexe 3 a été réalisée sur ces vins afin d'évaluer l'effet du mode de protection phytosanitaire sur les caractéristiques organoleptique des vins produits.

Anthropogenic factors in modulations of fungal populations from grapes to wines and their repercussions on wine characteristics

Cédric Grangeteau[a], Chloé Roullier-Gall[b,C], Sandrine Rousseaux[a], Regis Gougeon[b], Philippe Schmitt-Kopplin[c] , Hervé Alexandre[a] and Michèle Guilloux-Benatier[a]

[a]*UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, IUVV, rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078 Dijon Cedex, France – Phone*
[b]*UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe PAPC (Procédés Alimentaires et Physico-Chimie), AgroSup Dijon - Université de Bourgogne, IUVV, Dijon, France.*
[c]*German Research Center for environmental Health, Departement of BioGeoChemistry and Analytics, Helmholtz Zentrum Munchen, Germany*

Introduction

For over 7500 years, humans have sought to control vine development, grape berry maturation and alcoholic fermentation to produce wine (McGovern et al., 1996). In the vineyard, the application of phytosanitary products now makes it possible to obtain quality harvests regardless of the vintage and the pressure of various pests and diseases. Under high pressure from diseases and / or disastrous vintages, humans can complete phytosanitary protection by using sorting tables to ensure harvest quality.

Over the last twenty years, the emergence of various vineyard management methods has been observed, particularly with the increasing number of vineyards in organic viticulture (Zafrilla et al., 2003). This diversity and especially the use of chemical or organic phytosanitary products could affect the biodiversity of grape microorganisms. Various studies have been conducted to compare the effects of these different systems and more particularly the non-target effects of phytosanitary treatments on fungal populations present on berries. Guerra et al. (1999) observed that the species *Saccharomyces cerevisiae* was not isolated in the conventional modality compared to the organic modality. Cordero-Bueso et al. (2011) and Martins et al. (2014) observed a wider diversity of yeasts for organic plots compared to conventional plots. At genus or species level, fermentative yeast genera such as *Hanseniaspora* and *Metschnikowia* have been isolated mainly in control (untreated) and organic plots whereas *Aureobasidium pullulans* was the majority species isolated in grape berries from conventional plots (Comitini and Ciani, 2008). But in another study, the species *Aureobasidium pullulans* was described as the majority species isolated in grape berries from organic plots (Martins et al., 2014). Regarding the study by Milanovic et al. (2013), the lowest diversity of isolated yeasts was observed for the organic modality, and unlike the work of Comitini and Ciani (2008), the species *Metschnikowia pulcherrima* was isolated more in samples obtained from the conventional modality (Milanovic et al., 2013). Although all these studies show an effect of

plant protection on the diversity of yeasts present in grape berries, the results cannot be generalized and are very often contradictory. This significant variability between studies is probably due to differences in grape varieties, the geographical location of the vineyard, and the sampling methodology and identification techniques used. Moreover most of these studies were performed only for one year and did not include the vintage effect.

Moreover, such works do not consider whether the differences of yeast biodiversity observed as a function of plant protection are maintained in the musts and during alcoholic fermentation. Do the pre-fermentation operations carried out to ensure the quality of the final product reduce or amplify the differences observed for yeast biodiversity in the vineyard? Cold settling reduces the total yeast population and particularly affects the growth of some species, such as *Hansenula anomala*, *Issatchenkia terricola* and *Saccharomyces cerevisiae*, while others like *Candida zemplinina* and *Hanseniaspora uvarum* are not very sensitive to cold settling and become or remain the majority species after settling (Mora and Mulet, 1991). Sturm et al. (2006) observed that non-*Saccharomyce*s yeasts persist longer during fermentation if pressing is preceded by crushing or maceration. The temperature during pre-fermentation maceration also seems to play a role in the evolution of yeast populations (Maturano et al., 2015). Thus maceration carried out at 14°C resulted in the development of yeast populations with a high proportion of *Hanseniaspora uvarum*. For maceration performed at 2.5°C or 8°C, the yeast populations did not increase but the proportions of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* increased at 8°C and 2.5°C, respectively. These results show the strong preference of the species *Hanseniaspora uvarum* for temperatures around 15°C and confirm the psychrotolerant characteristic of the species *Candida zemplina* (Sipiczki et al., 2003). The addition of SO_2 in red and white wine promotes the establishment of *Saccharomyces cerevisiae*, often to the detriment of non-*Saccharomyces* yeasts (*Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora* and *Zygosaccharomyces*) more sensitive to SO_2, but also less tolerant to ethanol (Romano and Suzzi, 1993; Constantí et al., 1998; Henick-Kling et al., 1998; Albertin et al., 2014; Takahashi et al., 2014). Bokulich et al. (2015) studied the effect of different concentrations of SO_2 (between 0 mg/L and 150 mg/L) on bacterial and fungal populations during the alcoholic fermentation of Chardonnay grape musts. Fermentations were slower and extended with low SO_2 concentrations (< 25 mg/L) due to the growth of bacteria or fungi competing with yeasts, but the development of bacterial and fungal species was greatly reduced with the addition of 25 mg/L SO_2. However, higher concentrations up to 100 mg/L had no additional effect on populations or on the progress of fermentation. Beyond this concentration, fermentation was

slower than those conducted with concentrations between 25 mg/L and 100 mg/L. The effects of four pre-fermentation oenological practices (clarification degree to 90 NTU or 250 NTU), temperature during pre-fermentation maceration (10°C or 15°C), the use of SO_2 (0 mg/l or 25 mg/l) and starter yeast addition on yeast dynamics (*Candida zemplinina*, *Hanseniaspora* spp., *Saccharomyces* spp. and *Torulaspora delbrueckii*) was evaluated in a Chardonnay grape must (Albertin et al., 2014). The population dynamics of the four species were impacted differently by oenological practices. For example, the use of SO_2 seemed to favor the genus *Saccharomyces* independently of other practices. Significant interaction effects between practices were revealed. Thus a low degree of clarification seemed to favor the development of *Candida zemplinina* mainly at a pre-fermentation temperature of 10°C. The inhibition of the genus *Hanseniaspora* was observed at a pre-fermentation temperature of 10°C in the presence of SO_2.

Although the dynamics of yeast populations in the composition and organoleptic qualities of wine is an important parameter (Lambrechts and Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005), must composition is also a parameter that cannot be neglected. Does the composition of musts and wines differ according to the phytosanitary protection used? To our knowledge, few studies have been performed on this subject. Existing studies have focused their analyses on compounds related to natural plant defenses as they are considered as the compounds directly affected by plant protection (Adrian et al., 1997; Jeandet et al., 2000). Thus the concentrations of polyphenols and anti-oxidant activity were higher for berries sampled from an organic plot 30 days before harvesting. However, these differences disappeared at harvest (Mulero et al., 2010). However, Bunea et al. (2010) found a small difference in total polyphenol contents between berry skins for 9 different grape varieties from conventional and organic vineyards (respectively 148-1231 mg/kg and 163-1341 mg/kg as gallic acid equivalents). Dani et al. (2007) also showed that the concentration of total polyphenols, particularly resveratrol, is higher for musts elaborated with grape varieties from *Vitis labrusca* (Bordo and Niagara) from organic viticulture.

Levite et al. (2000) compared the concentration of resveratrol for conventional and organic wines made from 5 grape varieties and from 6 geographical localisations. In most cases, the resveratrol concentration was higher for organic wines. Similarly, Vrček et al. (2011) observed a higher concentration of polyphenols for wines from organic viticulture compared to those from conventional viticulture.

In brief, the effects of plant protection applied to vineyards on the composition and organoleptic properties of wine have still not been clearly defined. In addition, most of these studies have

not taken into account the practices used during winemaking, which can reduce or increase differences due to the protection applied to the vineyard. Finally, to our knowledge no study has determined how the modifications of microbial populations due to plant protection may influence wine composition.

The purpose of this work was to study the combined impacts of 3 different phytosanitary protections: organic, conventional and Ecophyto protections (corresponding to dose reduction compared to conventional treatment); and of oenological practices (pressing-settling and sulfiting) on the biodiversity of fungal populations and on the chemical composition of musts and wines. For the first time, the effects of phytosanitary protection on microbiological and chemical characteristics were evaluated from grape berries to wine in a single study. The use of non-target methods for microbiological (pyrosequencing) and chemical (FT-ICR MS) analyses allowed examining the global effects of 3 different phytosanitary protections.

Materials and methods

The vineyard studied

All the grapes were sampled from a plot of Chardonnay planted in 1986 and located in Burgundy, France (46°18'32.2"N, 4°44'17.9"E, 258 m altitude). Since 2007, the plot has been divided into 3 blocks of 8 rows each: one block was managed using phytosanitary products according to conventional viticulture and noted C. The second block, Ecophyto (E), was managed with the same products used for the conventional block, but with dose reduction and / or with a reduced number of treatments. Block O was managed according to organic viticulture practices for which only pyrethrins, copper and sulfur are allowed. Details on the management procedures can be found in Table S1 corresponding to Annexe 1.

Sampling

The sampling of grape berries, bunches of grapes and total harvest were carried out in the central rows (3 and 5) of each block in order to overcome the edge effects related to treatment. For each modality, 6 kg of ripe bunches of grapes were collected aseptically from 20 different vine plants distributed along the rows (one cluster per vine plant) for the 2012 vintage. Ten berries from each vine plant of the two rows (3 and 5) were collected for the 2013 and 2014 vintages (respectively 860 berries, 950 berries and 980 berries for modalities O, C and E).
Moreover for the 2013 vintage, the total harvest of the two rows (3 and 5) of each modality was collected manually and placed in 20 kg crates. The harvests (102 kg, 117 kg and 78 kg for

modalities O, C and E, respectively) were then transported to the experimental winery (Beaune, France). The harvests were pressed directly on arrival at the winery using a vertical FASER-PLAST AG press (Rickenbach, Switzerland). The grape must thus obtained was placed overnight at 10°C for lees sedimentation (settling) and then separated into 4 replicates for each modality in four 20 L stainless steel vats. 50 ml of must was sampled (T0) for each vat. The addition of sulfur dioxide (30 mg/l) was carried out in 2 of 4 vats for each modality. During alcoholic fermentation, 50 ml samples were collected from each vat at various times: after 3 days (T3), 6 days (T6), 9 days (T9) and at the end of alcoholic fermentation (when density no longer decreases) (Tf). The wine was then bottled without sulfiting to be used for non-targeted chemical analysis.

Enumeration of yeast

For each sample, serial dilutions were performed and 3 x 100 µL of each dilution were spread on the YPD medium (0.5% w/v yeast extract, 1% w/v peptone, 2% w/v glucose and 2% w/v agar supplemented with chloramphenicol at 200 ppm to inhibit the development of bacteria) and incubated at 28°C. The yeast populations were then estimated by counting the colonies developed and the result was obtained by averaging the three repetitions.

DNA extraction

For each sample, 5 mL of must or wine was collected and centrifuged for 5 min at 4°C at 3000g. The pellet was suspended in 5mL milliQ water and filtered through glass wool to separate cells from must debris. The filtered suspension was centrifuged again (5 min at 4°C, at 3000g). The pellet was resuspended in 200 µL of lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.1 mM EDTA pH 8), and the cells were homogenized in a bead beater instrument (Precellys 24, France) with 0.3 g of glass beads (0.5 mm in diameter) in the presence of 200 µL phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:48:2). The mixture was vortexed for 1 min and placed on ice for 1 min. This step was repeated three times. Then 200 µL TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8) was added and the bead/cell mixture was centrifuged for 10 min at 16000g at 4°C, after which the aqueous phase was collected. The DNA was precipitated from this aqueous phase with 2.5 volumes of 100% ethanol and centrifuged at 16000g at 4°C for 10 min. Then pellet was washed with 70% ethanol, dried and suspended in 50 µL of DEPC-treated water (Thermo Fisher Scientific, Inc.Waltham, MA, USA). The DNA concentrations of the samples were then standardized (50 ng/µL) by measuring optical density at 260 nm, and adding DEPC-treated water as appropriate before storage at - 20°C.

Pyrosequencing of 18S rRNA gene sequences

Fungal diversity was determined for each sample by using 454 pyrosequencing of ribosomal genes. A 18S rRNA gene fragment with sequence variability and appropriate size (about 350 bases) for 454 pyrosequencing was amplified using the primers FR1 (5'-ANCCATTCAATCGGTANT-3') and FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') (Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2011). For each sample, 5 ng of DNA was used for a 25 µL PCR conducted under the following conditions: 94°C for 3 min, 35 cycles of 1 min at 94°C, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 5 min at 72°C. A second PCR of 9 cycles was then conducted under similar PCR conditions with purified PCR products and ten base pair multiplex identifiers were added to the primers at position 5' to specifically identify each sample and avoid PCR bias. Finally, the PCR products were purified using a MinElute gel extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen staining Kit (Molecular Probes, Paris, France). Pyrosequencing was carried out on a GS Junior apparatus (Roche 454 Sequencing System) by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France, http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/) or on GS FLX Titanium (Roche 454 Sequencing System) by Genoscreen (Lille, France, http://www.genoscreen.com/).

Analysis of pyrosequencing data

Bioinformatics analyses of reads obtained by pyrosequencing were performed using the GnS-PIPE pipeline developed by the GenoSol platform (INRA, Dijon, France) (Terrat et al., 2012), or using the Qiime pipeline developed by scikit-bio (Caporaso et al., 2010). The parameters chosen for each step were the same for the two pipelines and can be found in supplementary material. First, all the 18S raw reads were sorted according to the multiplex identifier sequences. The raw reads were then filtered and deleted based on: (a) their length, (b) their number of ambiguities (Ns), and (c) their primer(s) sequence(s). A PERL program was then applied for rigorous dereplication (i.e. clustering of strictly identical sequences). The dereplicated reads were then aligned using Infernal alignment (Cole et al., 2009), and clustered into operational taxonomic units (OTU) using a PERL program that groups rare reads with abundant ones without counting differences in homopolymer lengths. A filtering step was then carried out to check all single-singletons (reads detected only once and not clustered, which might be artifacts such as PCR chimeras) based on the quality of their taxonomic assignments.

The high-quality reads retained were then taxonomically assigned using similarity approaches against dedicated reference databases from *SILVA* (Quast et al., 2013) (see supplementary

material). The raw data sets are available on the EBI database system under a project accession number (awaiting attribution).

Linear discriminant analysis effect size was used to determine significant taxonomic differences between the grape must sample of each phytosanitary protection (Segata et al. 2011). This method employs the factorial Kruskal–Wallis sum-rank test ($\alpha = 0.05$) to identify taxa with significant differential abundances between modalities (using one-against-all comparisons), followed by LDA to estimate the effect size of each differentially abundant feature. Significant taxa were used to generate taxonomic cladograms illustrating differences between phytosanitary protection modalities.

Oenological analysis

The dosage of reducing sugars, available nitrogenous compounds (ammonium and amino acid except proline), L-malic acid, ethanol, and acetic acid was determined by FT-IR spectroscopy (FOSS France). The pH was measured by using a pH meter.

Non-targeted chemical analyses

Grape must after settling and wine of the 2013 vintage were analyzed by Fourier Transformed Ion Cyclotron Resonance Mass spectrometry (FT-ICR-MS). The sample preparation consisted of a dilution of the wine in ultra-pure methanol in proportions of 50 µL/950µL. Grape musts were pre-filtered using BEH C18 cartridges (SPE columns, Backerbond) to remove sugars, then acidified with dilute formic acid (2% v/v) to pH 2. C18 cartridges were then conditioned by successive passages of 1 mL methanol and 1 mL of formic acid diluted with ultrapure water (2%). 1 mL of acidified must was then passed through the C18 cartridge, followed by 1 mL of dilute formic acid and finally 500 µL of methanol collected and stored in amber vials at -20°C for analysis.

Mass spectra were obtained with an FT-ICR Solarix (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a 12 Tesla superconducting magnet (Magnex, UK). The instrument was equipped with an electrospray ionization source Apolo II with the ionization capacity in negative or positive mode. The samples were injected directly into a micro electrospray source at a rate of 120 µL/h. An external calibration was obtained using a 5 ppm solution of arginine (0.2 ppm tolerance). Spectra were recorded in negative ionization mode and for values between m/z 100 and 1000. For each sample, 300 accumulations of a 4 MW (megaword) signal were recorded.

Spectra were then calibrated internally using compounds of known accurate masses, which are ubiquitous in wines.

Partial least square discriminative analysis (PLS–DA) models were used to provide enhanced representations of the sample category discriminations and extract the most discriminative metabolites, which were also checked manually within the spectra. Discriminative masses with a variable importance in projection (VIP) value >2 and p values <0.05 were considered as relevant. PLS-DA was performed with the SIMCA 9 software (http://www.umetrics.com/). Two dimensional van Krevelen diagrams of discriminative metabolites were obtained using compositional networks (based on elemental compositions) and functional networks, which are based on selected functional group equivalents that enable improved assignment options of elemental compositions and better classification of organic complexities with tunable validation windows (Tziotis et al., 2010).

Results and discussion

Effect of the vineyard protection mode on fungal populations present on grape berries for the 2012, 2013 and 2014 vintages:

The fungal populations present on mature Chardonnay berries for the 3 blocks treated with different phytosanitary protections and for the 3 vintages are presented in Figure 1. Molds and yeasts were identified by pyrosequencing. As observed by Nisiotou et al. (2007) with a culture-dependent method for identifying fungal populations, the highest fungal diversity was observed when molds were present in quantity. This was also confirmed by the Shannon biodiversity index which was higher in 2012 compared to the other two vintages, regardless of protection mode. The proportion of molds seemed primarily related to vintage: between 42% and 70% of the population for the 2012 vintage, between 18% and 19% for the 2013 vintage and less than 2% for the 2014 vintage. Some mold genera appeared to be specific to one vintage. For example, *Botryotinia*, *Cladosporium* and *Phoma* genera were present only for the 2012 vintage (for the 3 protection modes) while the genus *Monilinia* (for the 3 types of protection) was present only for the 2013 vintage. The yeast genera *Aureobasidium,*

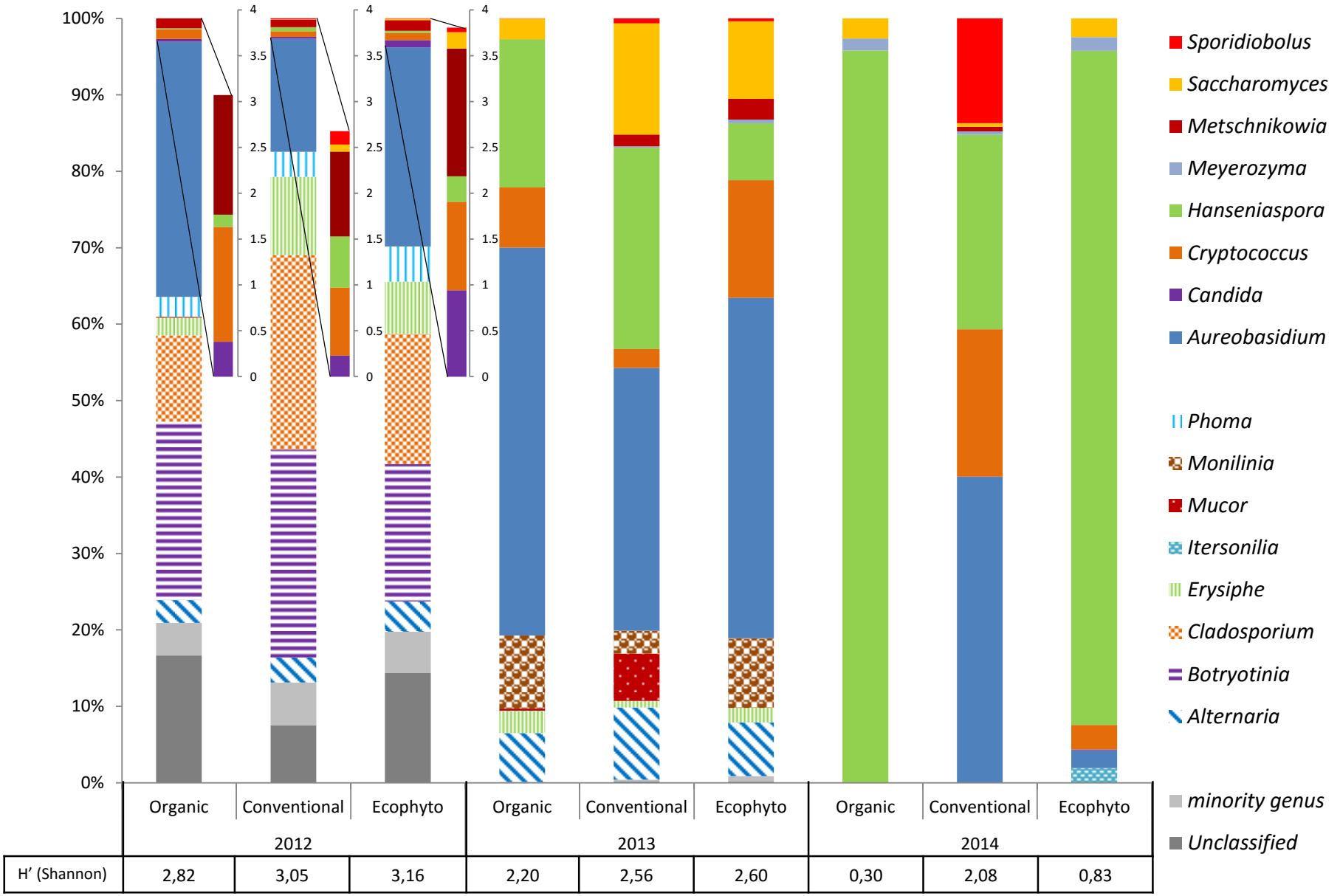


Figure 1 : Repartition of fungal genera on grape berries for vineyard with organic, conventional and Ecophyto phytosanitary protection. Populations are identified by pyrosequencing for 2012, 2013 and 2014 vintages.H' index are calculated on overall population. Genera representing less than 0.2% of the total population are collectively called "minority genera".

Cryptococcus and *Hanseniaspora* often predominated in the samples studied, in line with what has been reported by several authors (Fleet and Heard, 1993; Barata et al., 2012). Nevertheless, the presence of these genera on the berries varies greatly as a function of the studies considered and also for certain studies as a function of vintage (De La Torre et al., 1999; Sabate et al., 2002; Prakitchaiwattana et al., 2004). The results of this work are in agreement with these studies. For example, almost absent on berries in 2012 (0.1% to 0.6% of total fungal population), the genus *Hanseniaspora* was clearly present for the 2014 vintage and predominated for 2 of the 3 modalities (between 88.1% and 95.7% of the total fungal population). The genus *Saccharomyces* was marginally present on berries in 2012 for the 3 modalities (less than 0.2% of the total fungal population); however, this genus was systematically detected in 2013 (between 2.7% and 14.6% of the total fungal population).

The Shannon index highlighted a plant protection effect: the Organic modality had a lower biodiversity index than the other two modalities regardless of the vintage. For the 2014 vintage, the Shannon index was 0.30 for the Organic modality and 0.80 and 2.08 for the Ecophyto and Conventional modalities, respectively. Milanović et al (2013) also observed that Organic protection could lead to lower biodiversity on berries compared to Conventional protection. However, this study covered only yeast species.

The fungal populations present on berries appeared to result from both the protection mode and vintage. It is noteworthy that the amount of phytosanitary products varied each year (Table S1) regardless of the type of protection. This quantity depended on disease pressure and the risk of leaching related to annual climatic conditions. It therefore seems more logical to compare the protection modes for each vintage rather than all 3 vintages. For the 2012 vintage, the highest proportion of molds including *Botryotinia* (27.2%), *Cladosporium* (25.4%) and *Erysiphe* (10.3%) genera was observed for the Conventional modality. The percentage of non-fermenting yeast or yeast-like genera *Aureobasidium* (33.4%) and *Cryptococcus* (1.3%) was higher for the Organic modality than for the Conventional (14.8% and 0.7%, respectively) and Ecophyto modalities (26% and 1%, respectively). The percentage of fermentative yeasts including *Candida, Metschnikowia* and *Saccharomyces* genera was higher for the Ecophyto modality (2.5%) than for the Organic (1.7%) and Conventional (1.2%) modalities. Regarding the genus *Saccharomyces*, it has long been known that it is difficult to isolate from grapes (Combina et al., 2005; Raspor et al., 2006). Our results show that this genus may be present in amounts too small to be detected by standard methods (0.2% and less than 0.1% for the Ecophyto and Conventional modalities, respectively) or even completely absent (0% in the Organic modality).

For the 2013 vintage, the percentage of molds was similar regardless of the protection mode. However, differences could be noted regarding the percentage of certain genera of molds. The highest proportion of *Alternaria* (9.5%) and *Mucor* (6.2%) was observed for the Conventional modality. However, the lowest proportions of *Erysiphe* (0.9%) and *Monilinia* (3.0%) were found on berries for this modality. The percentage of non-fermenting yeast or yeast-like genera *Aureobasidium* (34.4%) and *Cryptococcus* (2.5%) was lower in the Conventional modality than in the Organic (50.8% and 7.9%, respectively) and Ecophyto (44.6% and 15.4%, respectively) modalities. The highest percentage of fermentative yeasts including *Hanseniaspora, Metschnikowia* and *Saccharomyces* genera was observed in the Conventional modality (42.5%). In the Organic modality, the genus *Metschnikowia* was not detected and the *Saccharomyces* genus had the lowest proportion (2.7%) (versus 14.6% and 10.2% for the Conventional and Ecophyto modalities, respectively).

For the 2014 vintage, the complete absence of molds on berries was observed for the Organic and Conventional modalities. For the Ecophyto modality, only the genus *Itersonilia* was found in low proportion (1.9% of the total fungal population). The percentage of non-fermenting yeasts and yeast-like genera *Aureobasidium* (40%), *Cryptococcus* (19.2%) and *Sporidiobolus* (13.7%) was much higher in the Conventional modality than in the Ecophyto (2.3%, 3.2% and 0%, respectively) and Organic (0% for these 3 genera) modalities. The Conventional modality had the lowest percentage of fermentative yeasts (26.5%), including the genera *Saccharomyces, Metschnikowia* (detected only in Conventional modality at 0.6%) and *Hanseniaspora*. It is interesting to note that the genus *Sporidiobolus*, representing 13.7% of the population on berries for the Conventional modality, was not detected for the other two modalities. This can be explained partly by the high resistance of this genus to synthetic fungicides (Slavíková and Vadkertiová, 2003) and its sensitivity to copper (Vadkertiová and Slavíková, 2006).

Impact of anthropic factors on grape musts for the 2013 vintage

Fungal populations

Fungal populations present after pressing-settling (T1) were compared to those present on berries (T0). The results are shown in Table 1. The population of molds decreased significantly in the grape must after the pressing-settling step. Thus the genus *Alternaria*, which represented 6.4%, 7% and 9.4% of total fungi population on the berries of the Organic,

Ecophyto and Conventional modalities, respectively, was not found in the musts. The same decrease was observed for the genera *Monilinia* and *Erysiphe*. The genus *Monilia* was found in proportions of 9.6%, 9.1% and 3% on berries for the Organic, Ecophyto and Conventional modalities, respectively, but represented less than 0.05%, 0.7% in grape must in the Organic and Ecophyto modalities, respectively, and was not identified in the Conventional modalities. The proportions of the genus *Erysiphe* represented 2.9%, 1.9% and 0.85% on berries in the Organic, Ecophyto and Conventional modalities, respectively, but less than 0.01% in grape must regardless of modality. However, the genus *Penicillium*, which was not identified on berries, represented 2.36% of the total fungi population for the Ecophyto modality and 0.08% for the Organic modality. Its detection in the musts of these 2 modalities was probably due to the implantation of strains present in the cellar environment. Ocon et al. (2011) had already highlighted that this genus was mostly in the cellar environment. This preferential implantation and / or development could be due to the composition of the Ecophyto musts more than to a direct effect of the protection mode on mold populations. The Conventional modality differed from the other 2 modalities by the total absence of mold.

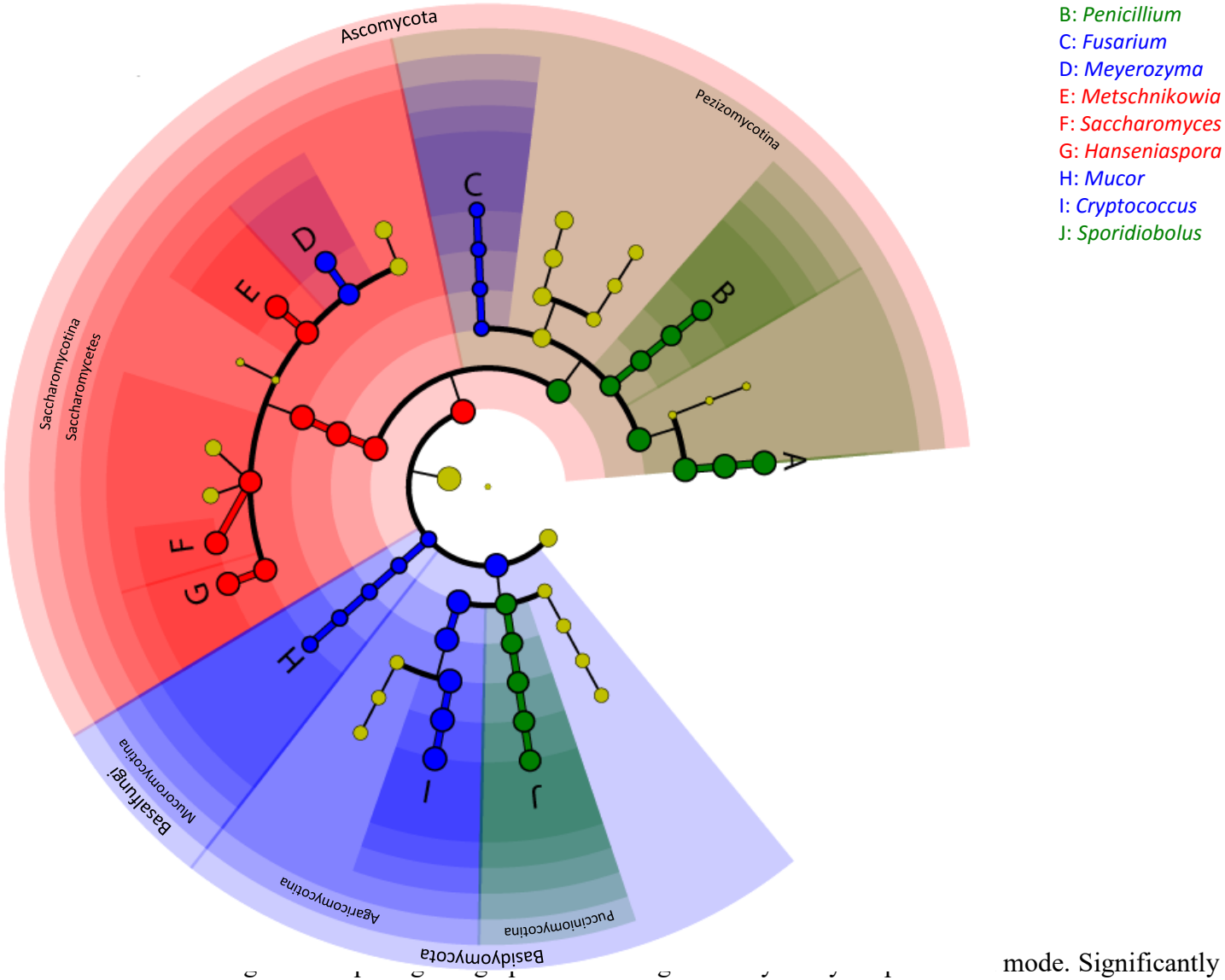
Table 5. Repartition of fungal genera on berries (T0) and after pressing-settling (T1) for 2013vintage.

		O		**C**		**E**
		T0	T1	T0	T1	T0	T1
Mold	*Alternaria*	6.37	-	9.45	-	7.01	-
	Erysiphe	2.90	0.02	0.85	-	1.91	0.04
	Fusarium	0.10	0.03	0.24	-	0.74	-
	Itersonilia	0.04	0.02	0.02	-	-	-
	Monilinia	9.56	0.05	3.00	-	9.11	0.68
	Mucor	0.27	0.06	6.15	-	-	-
	Penicillium	-	0.08	-	-	-	2.36
Yeast	yeast log UFC/ml (standard deviation)		**after pressing** 5.49 (3.92) **after settling** 4.93 (3.68)		**after pressing** 5.27 (3.48) **after settling** 5.17 (4.33)		**after pressing** 5.59 (3.30) **after settling** 5.10 (4.06)
	Aureobasidium	50.77	18.59	34.39	5.59	44.56	54.91
	Candida	-	0.10	-	0.32	-	0.02
	Cryptococcus	7.86	48.10	2.47	11.19	15.37	20.89
	Debaryomyces	-	0.03	-	0.11	-	0.02
	Hanseniaspora	19.39	17.96	26.36	27.02	7.46	2.73
	Kazachstania	-	0.03	-	0.08	-	0.04
	Malassezia	-	0.02	-	-	-	-
	Metschnikowia	-	0.02	1.54	24.97	2.69	3.49
	Meyerozyma	-	5.26	0.17	5.03	0.49	1.08
	Saccharomyces	2.71	9.64	14.57	25.71	10.17	6.70
	Sporidiobolus	0.02	-	0.63	-	0.39	6.54
	unclassified	-	-	0.15	-	0.12	0.47

The decrease of yeast populations was observed during the pressing-settling step for all the musts whatever the type of protection applied to the vineyard (Table 1). However, this decrease was substantially lower for the Conventional modality, with a decrease of only 0.1 log versus 0.5 log for the Organic and Ecophyto modalities. This reduction of yeast populations confirmed the results of Mora and Mullet (1991), who reported a decrease in cell number for several yeast genera during this step. For these authors, contrariwise, the *Kloeckera* genus (reclassified *Hanseniaspora*) was not affected by the pressing-settling step, as observed in our study: 19.39% on berries and 17.96% in must for the Organic modality and 26.36% on berries and 27.02% in must for the Conventional modality. Thus the proportion of some yeast genera differs after pressing-settling, compared to the proportion on berries. Some genera present in musts (*Candida, Debaryomyces, Kazachstania* and *Malassezia*) were not present on berries. This could be due to the implantation of the resident flora from the cellar during the pressing-settling steps (Grangeteau et al. 2015). Nevertheless, the genus *Candida* represented less than 0.3% of the population while the genera *Debaryomyces, Kazachstania* and *Malassezia* represented less than 0.1%. The implantation of resident flora from the cellar in the must could also explain the increase in the proportions of the genera *Cryptococcus, Metschnikowia, Meyerozyma* and *Saccharomyces* between berries and grape musts. Otherwise, some genera were affected differently by this step as a function of the protection modality applied in the vineyard. For example, the genus *Aureobasidium* which represented 50.8%, 34.4% and 44.6% of the population on berries for the Organic, Conventional and Ecophyto modalities, respectively, was found in musts at 18.6%, 5.66% and 54.9% for the Organic, Conventional and Ecophyto modalities, respectively.

A Least Discriminant Analysis effect size (LDA) taxonomic cladogram comparing all the grape musts categorized by the different vineyard protection modes was performed (Figure 2). Basidiomycota (especially *Cryptococcus* (48.1%)) were mainly associated with the Organic protection mode while Ascomycota, including *Saccharomycotina* (especially *Saccharomyces* (25.7%), *Metschnikowia* (25%) and *Hanseniaspora* (27%)) were mainly associated with the Conventional protection mode. Of the Ascomycota *Pezizomycotina* (especially *Aureobasidium* (54.9%)) were associated with the Ecophyto protection mode. *Fusarium* and *Mucor*, which represented only 0.03% and 0.06%, respectively, were associated with the Organic protection because they were not detected in the other modalities. *Penicillium* was associated with the Ecophyto protection even though the source of its presence was probably

Conventional
Ecophyto
Organic



A: *Aureobasiduim*
B: *Penicillium*
C: *Fusarium*
D: *Meyerozyma*
E: *Metschnikowia*
F: *Saccharomyces*
G: *Hanseniaspora*
H: *Mucor*
I: *Cryptococcus*
J: *Sporidiobolus*

Figure mode. Significantly discriminant taxon nodes are colored and branch areas are shaded according to the highest-ranked variety for that taxon. For each taxon detected, the corresponding node in the taxonomic cladogram is colored according to the highest-ranked group for that taxon. If the taxon is not significantly differentially represented between sample groups, the corresponding node is colored yellow.

the cellar. Note that *Hanseniaspora* and *Saccharomyces* represented a larger proportion of the population on berries for the Conventional modality (26.4% for *Hanseniaspora* and 14.6% for *Saccharomyces*) compared to other modalities (*Hanseniaspora* represented 19.4% and 7.5% for the Organic and Ecophyto modalities, respectively, and *Saccharomyces* represented 2.7% and 10.2% for the Organic and Ecophyto modalities, respectively). The genera *Cryptococcus* and *Aureobasidium* represented a lower proportion of the population on berries for the Conventional modality (34.4% for *Aureobasidium* and 2.5% for *Cryptococcus*) compared to the other modalities (*Aureobasidium* represented 50.8% and 44.6% for the Organic and Ecophyto modalities, respectively, and *Cryptococcus* represented 7.9% and 15.4% for the Organic and Ecophyto modalities, respectively).

The populations were therefore considerably modified by the pressing and settling steps, but some trends observed on berries were confirmed and even strengthened in musts. Thus the effects of type of protection in the vineyard on populations were still visible in the must.

Chemical composition

Differences were observed between fungal populations on berries and in grape musts depending on the type of protection. Therefore the chemical compositions of the 3 different musts were analyzed (Table 2). No significant difference between the musts concerning sugar concentration or acidity level (pH or total acidity) was observed. However, the available nitrogenous compound content appeared lower in the must from the Conventional modality (195 mg N/L) than for the 2 other modalities (254 mg N/L for the Organic modality and 236 mg N/L for the Ecophyto modality). Nevertheless, the available nitrogenous compound concentration was higher than 140 mg N/L for all the musts, so there was a priori no deficiency that could prevent the progress of alcoholic fermentation (Agenbach, 1977). Taking the study still further, the grape musts were analyzed by FT-ICR-MS. The elemental composition was extremely close for all the musts (Fig. 3B, 3C and 3D), explained by the fact that the grape berries of each must had the same origin. From these results, we can conclude that the direct influence of protection mode on the composition of the musts was quite low. Nevertheless, PLS-DA (Fig. 3A) allowed partial discrimination of the musts as a function of protection mode. The grape musts of the Organic modality were separated from the musts of the other two modalities. Associated with the differences between the populations already shown, they could lead to differences in the dynamic fermentation and chemical composition of wines depending on the type of protection applied in the vineyard.

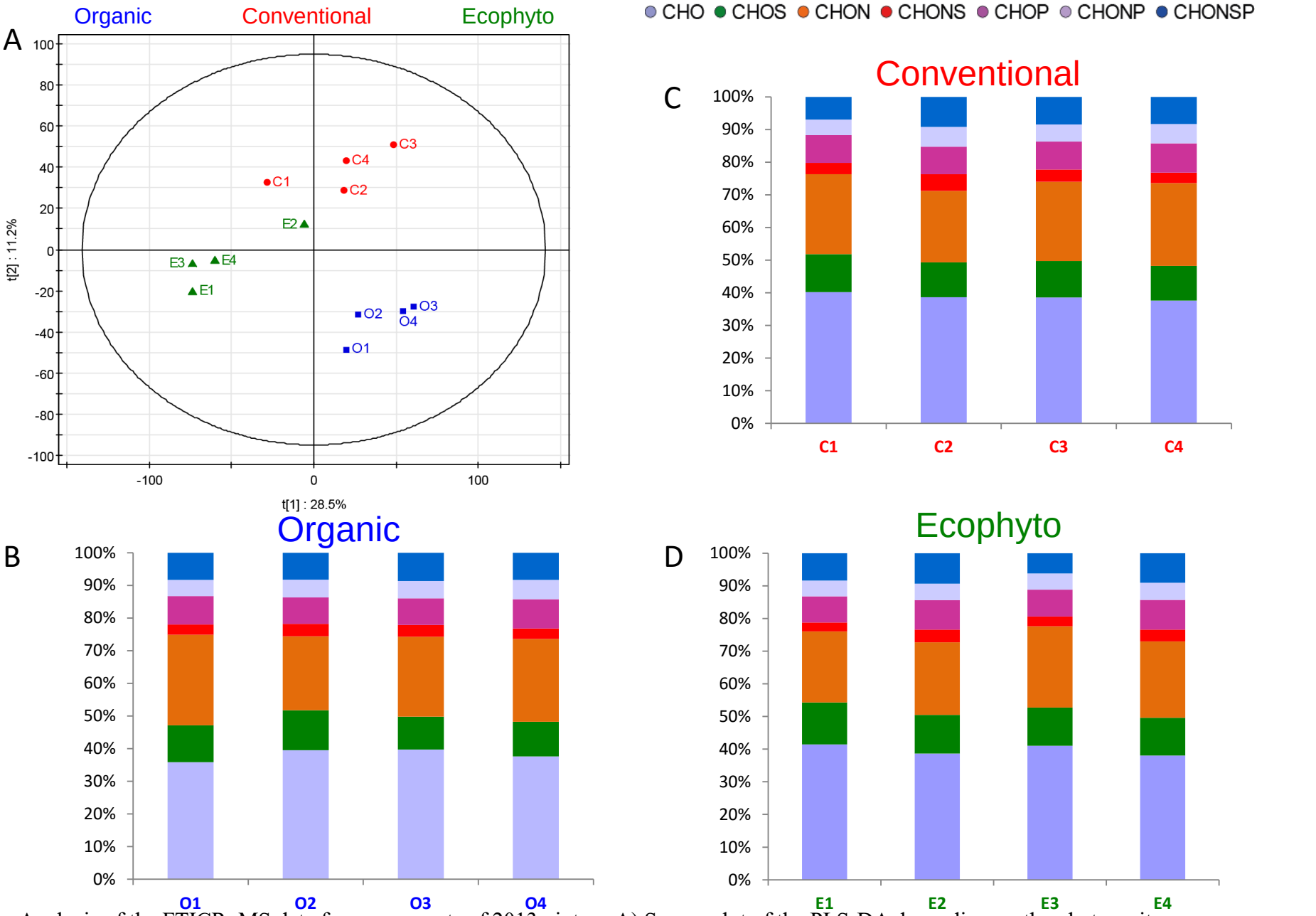


Figure 3 : Analysis of the FTICR–MS data for grape musts of 2013 vintage A) Scores plot of the PLS-DA depending on the phytosanitary protection mode, the first two components retained 39,7% of the variation. Histograms of elementary composition of Organic (B), (C) Conventional and (D) Ecophyto grape musts

Table 2. Analytical characteristics of musts elabored from groupe berries harvested in three phytosanitary vineyard protections.

	Organic	Conventional	Ecophyto
glucose+fructose g/l	209	212	211
Tartaric acid g/l	7.1	6.4	6.5
pH	3.11	3.10	3.13
total acidity g tartaric acid/l	9.2	8.3	8.3
L-malic acid g/l	5.2	4.9	5.0
Available nitrogenous compounds mgN/l	254	195	236

Impact of anthropic factors during alcoholic fermentation and on wine.

Fungal populations

The evolution of the number and proportion of yeast populations during AF are presented for the Organic, Conventional and Ecophyto modalities in Figures 4, 5 and 6, respectively. The maximal population was reached after 7 days for the Conventional modality, with the same kinetics in the presence and absence of SO_2. For the Organic modality the maximal population was also reached after 7 days, but the kinetics and the maximum population level differed as a function of the presence or absence of sulfites. Indeed, in the absence of SO_2, the population increased more quickly but the maximum population was lower: 3. 10^8 CFU/mL without SO_2 versus 8.10^8 CFU/mL with SO_2. For the Ecophyto modality, the maximal population level was observed after 7 days in the presence of SO_2, with a slower increase of the population compared to the modality with SO_2. In this case, the maximal population level was observed after 11 days.

These differences in behavior may be related to the difference in composition of the yeast population present in the must and may explain slow fermentations for the Organic and Conventional modalities in the absence of SO_2. For the Ecophyto modality, no difference was observed concerning fermentation in the absence of SO_2. The end of alcoholic fermentations occurred simultaneously for the 4 wines from this modality.

The proportion of *Saccharomyces* increased rapidly in the presence of SO_2 and for the 3 modalities. It accounted for 80-98% of the population after 3 days of alcoholic fermentation. Thus the differences in the population dynamics were limited in the presence of SO_2. However differences in the initial population, even in the cases where they disappear quickly,

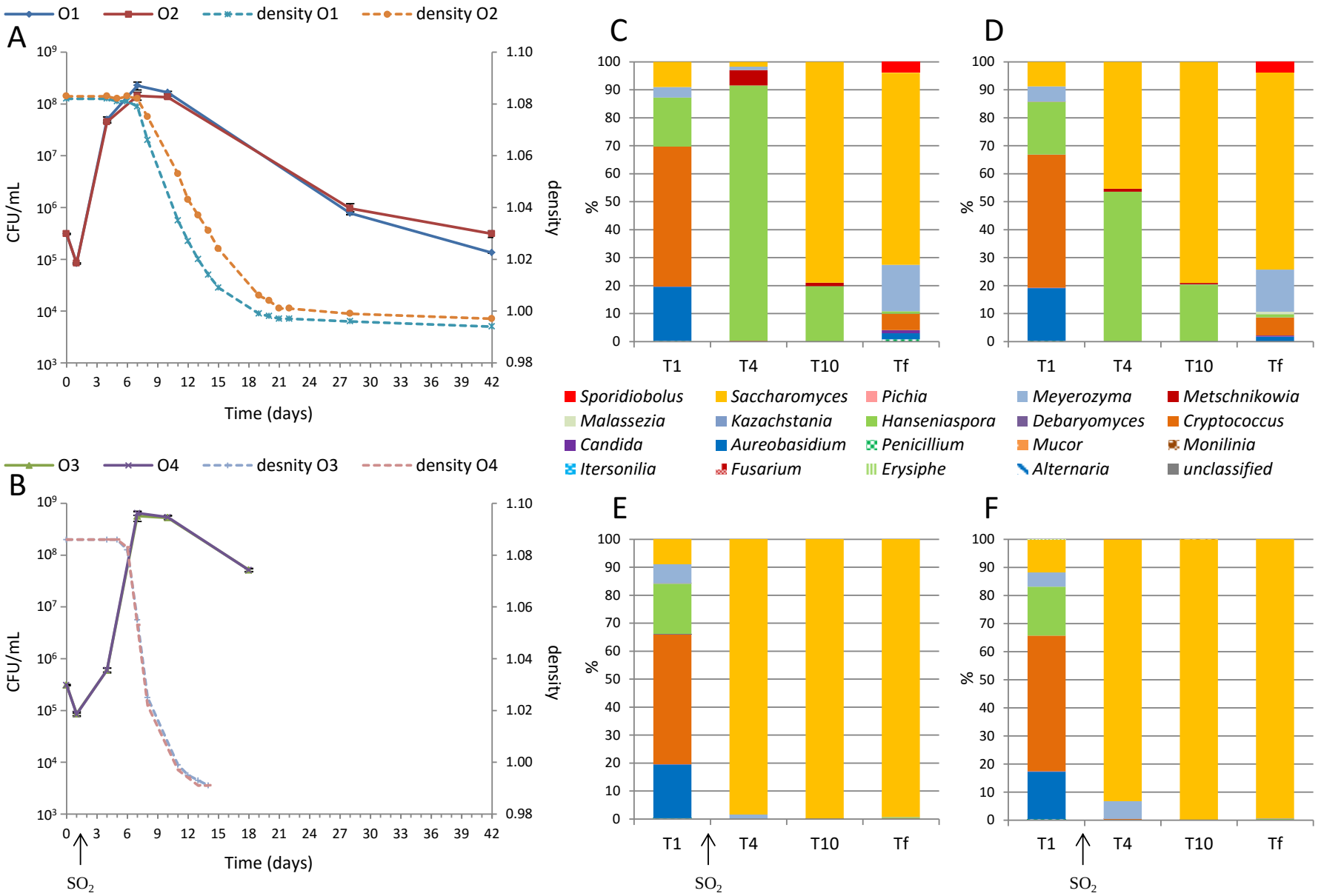


Figure 4 : Monitoring of grape must fermentation of Organic modality. Monitoring of yeast population size (CFU/ml) and fermentation progress (density) without SO_2 (A) and with SO_2 (B). Repartition of fungal genera during alcoholic fermentations without SO_2 for must O1 (C) and must O2 (D) and with SO_2 for must O3 (E) and must O4 (F). Populations are identified by pyrosequencing 1 day (T1), 4 days (T4), 10 days (T10) and at end of AF

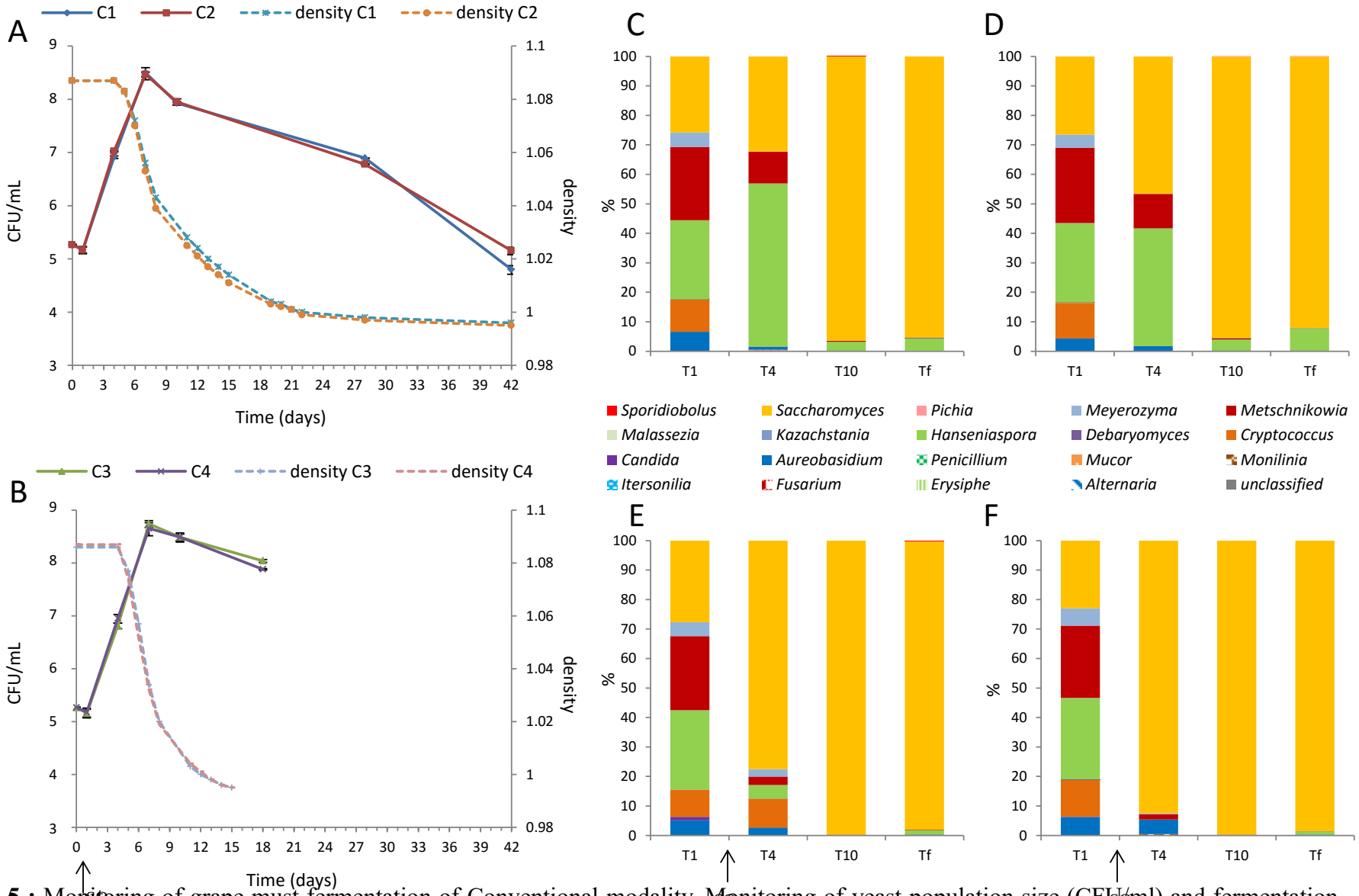


Figure 5 : Monitoring of grape must fermentation of Conventional modality. Monitoring of yeast population size (CFU/ml) and fermentation progress (density) without SO_2 (A) and with SO_2 (B). Repartition of fungal genera during alcoholic fermentations without SO_2 for must C1 (C) and must C2 (D) and with SO_2 for C3 (E) and C4 (F) musts. Populations are identified by pyrosequencing at1 day (T1), 4 days (T4), 10 days (T10) and at the end of AF (Tf).

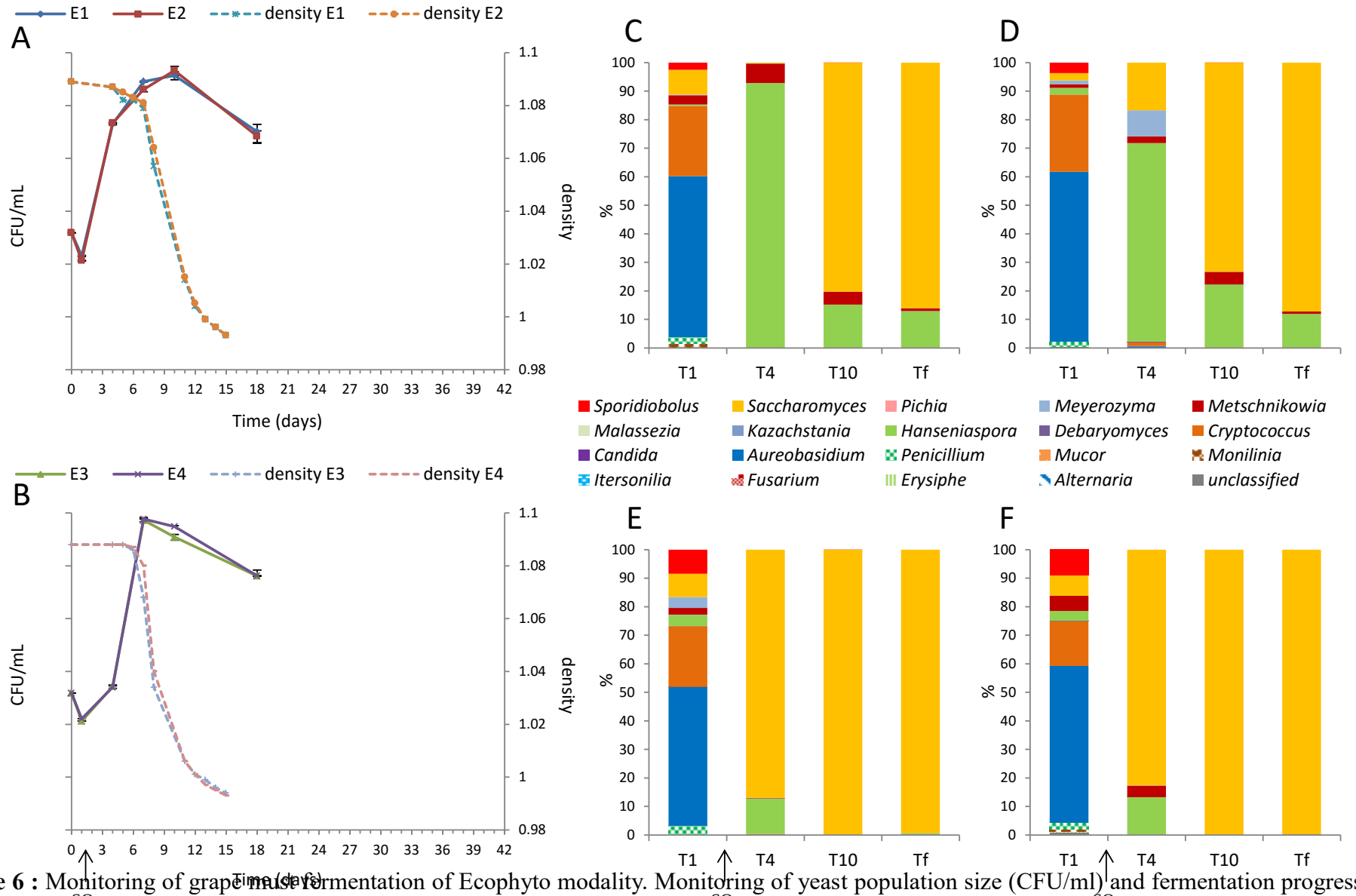


Figure 6 : Monitoring of grape must fermentation of Ecophyto modality. Monitoring of yeast population size (CFU/ml) and fermentation progress (density) without SO_2 (A) and with SO_2 (B). Repartition of fungal genera during alcoholic fermentations without SO_2 for must E1 (C) and must E2 (D) and with SO_2 for must E3 (E) and must E4 (F). Populations are identified by pyrosequencing 1 day (T1), 4 days (T4), 10 days (T10) and at end of AF (Tf).

can influence the finished wine (Romano et al., 2003). The genus *Saccharomyces* prevailed in all the wines at the end of AF. Without SO_2, the implantation of *Saccharomyces* was delayed, so differences of populations could persist longer. Additionally, the population of non-*Saccharomyces* remained high at the end of AF for the Organic (30%) and Ecophyto (15%) modalities. For the Conventional modality, *Saccharomyces* represented more than 95% of the total population after 9 days. Nevertheless, alcoholic fermentation was languid for the Organic modality while it was complete and rapid for the Ecophyto modality, with 15% of non-*Saccharomyces* at the end of AF. Differences in the strains of *Saccharomyces* present during AF could explain differences in alcoholic fermentation dynamics. Furthermore, population size is an important factor for AF dynamics (Albertin et al., 2011). For the Organic and Ecophyto fermentations, a higher percentage and longer persistence of the genus *Hanseniaspora* could explain the difficulties of the development of the genus *Saccharomyces* (Medina, 2012). It never represented more than 85% of the total population in these modalities. It is interesting to note the presence of non-*Saccharomyces* genera at the end of AF for both the Organic wines without SO_2. In particular, the genera *Aureobasidium, Cryptococcus, Meyerozyma* and *Sporidiobolus* were usually not identified at the end of AF. Furthermore, these genera were not identified during AF, suggesting they were implanted or developed during these sluggish fermentations. However, while conditions were the same for Conventional musts these genera were not detected, perhaps showing an effect of vineyard protection mode on the development of microorganisms even at the end of AF.

Chemical composition

The question is whether these differences in population dynamics (in both number and composition) had an impact on the chemical composition of wine products, knowing that the composition of the musts was very similar. Wine composition is reported in table 3. The higher concentrations of ethanol found in the Ecophyto modality can be explained by the complete fermentation observed for the 4 batches. For the Organic modality, the difference between batches with and without SO_2 can also be explained by the presence or absence of residual sugars. However, differences can be noted between the wines of the three modalities and so depending on the protection of the vineyard. The sugar concentrations of all the musts were very close, leading to the assumption that the presence of fermenting sugars at the end of AF was linked to the lower fermentative capacity of some populations related to differences between the strains of *Saccharomyces cerevisiae* present or to the presence of non-

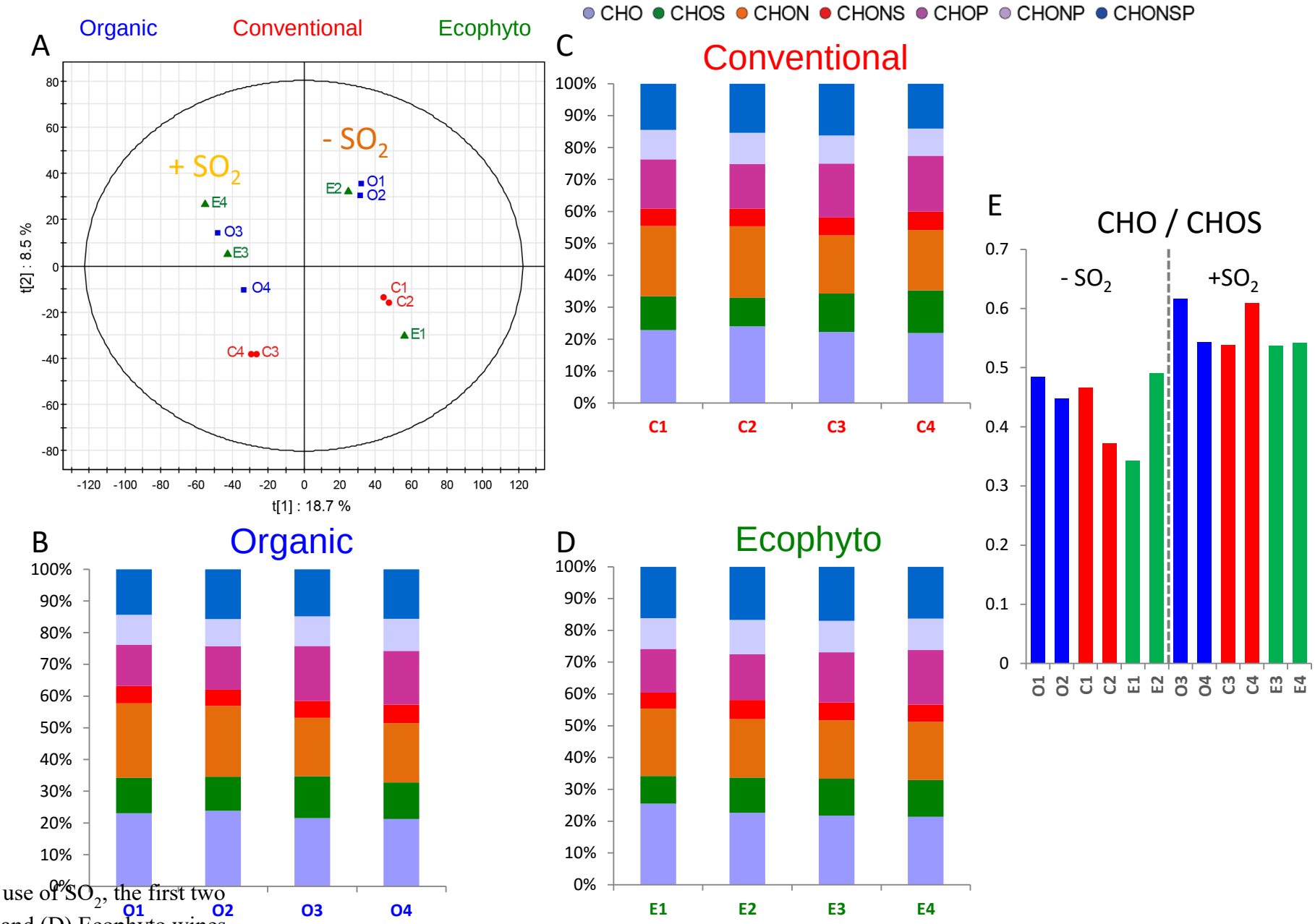
Saccharomyces yeast, particularly for wine fermented without SO_2 (Charoenchai et al., 1998; Bisson et al., 1999; Zohre et al., 2002; Fereira et al., 2006).

For all the modalities volatile acidity was higher for the non-sulfited wines than for the sulfited wines: + 0.16-0.18 g acetic acid/L for Organic modality, + 0.35-0.36 g acetic acid/L for the Conventional modality and + 0.12-0.16 g/L for the Ecophyto modality. The highest values were obtained for the sluggish fermentations, probably due to prolonged exposure to oxygen (Du Toit et al., 2006). This was thus mainly an indirect effect of population dynamics on the final composition of wines.

Table 3. Analytical characteristics of the wines elaborated from grape berries harvested in three phytosanitary vineyard protections and fermented with or without SO_2

	Wines	Alcoholic degree % v/v	Residual sugars g/l	L-Malic acid g/l	Volatile acidity g acetic acid/l	Total SO_2 mg/l
- SO_2	O1	12.55	2.1	2.5	0.68	4
	O2	12.45	2.0	2.3	0.68	5
+ SO_2	O3	12.80	<1	2.6	0.50	10
	O4	12.75	<1	2.6	0.52	10
- SO_2	C1	12.80	3.2	2.2	0.78	3
	C2	12.70	4.0	2.3	0.77	5
+ SO_2	C3	12.90	3.0	1.9	0.42	9
	C4	12.90	3.3	2.6	0.42	11
- SO_2	E1	13.00	<1	2.1	0.36	5
	E2	13.1	<1	2.1	0.34	3
+ SO_2	E3	13.15	<1	2.1	0.22	10
	E4	13.15	<1	2.1	0.20	9

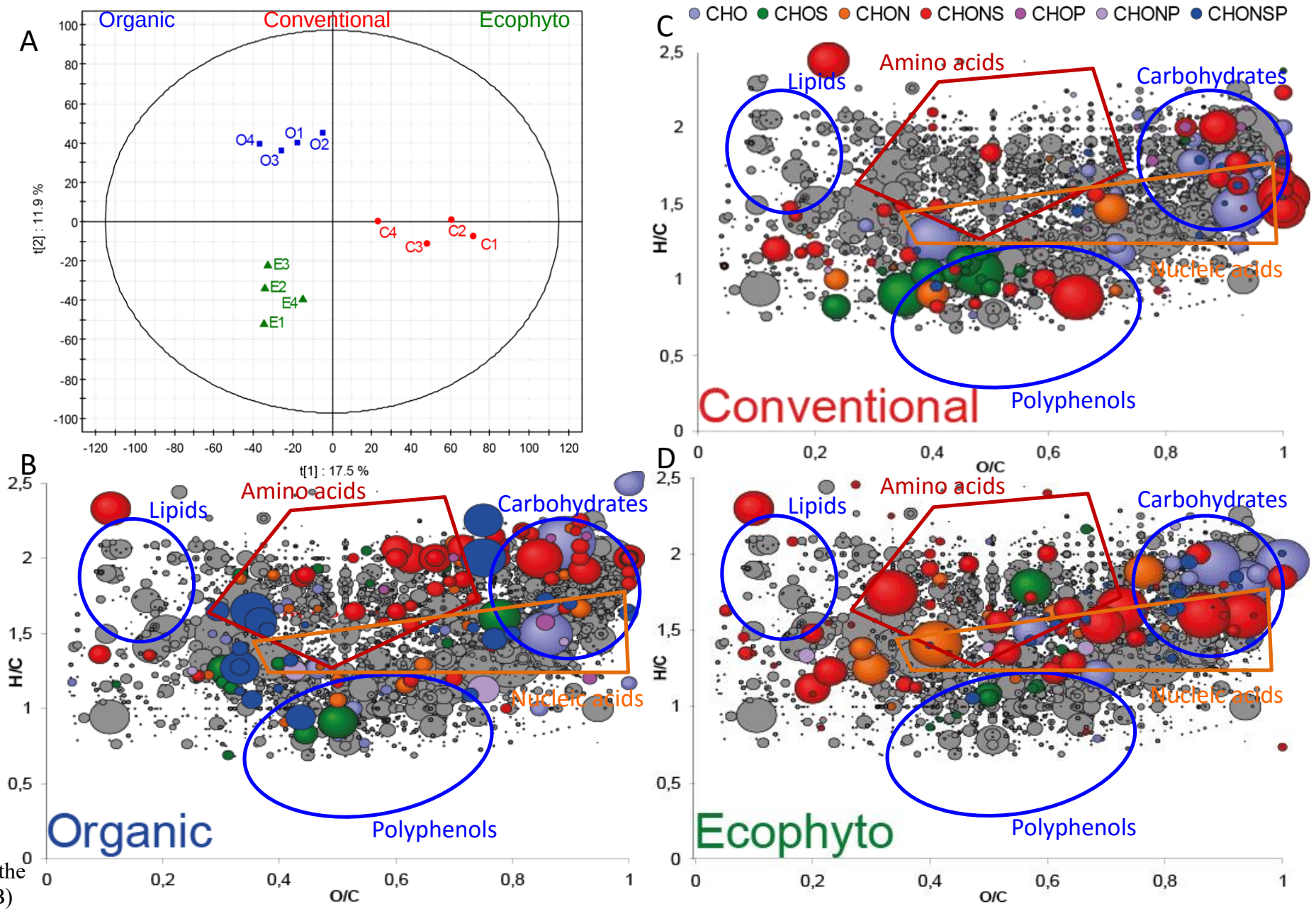
12 wines were analyzed by FT-ICR-MS. PLS-DA was used to group the wines depending on the use of SO_2 (Fig. 7A). Wines with SO_2 could be separated from wines without SO_2 along the first component. Use of SO_2 indeed had a particular impact with a slight increase in sulfurous compounds for the wines elaborated with sulfites, with an increase of the CHOS/CHO ratio of the mass numbers (Fig. 7E). Our results show that the effects of adding sulfur dioxide to must were still detectable in wines at the end of vinification. Nevertheless, the overall elemental composition remained close between the different wines (Fig. 7B, 7C and 7D).



ending on the use of SO_2, the first two
Conventional and (D) Ecophyto wines.

However, wines can also be separated by PLS-DA (Fig. 8A) according to plant protection. Differences linked to plant protection mode are not totally masked by the use of SO_2. Moreover, these differences are more visible after AF and can partly result from microbiological processes. Projecting the masses as filtered from the PLS–DA analysis on van Krevelen diagrams (Fig. 8B, 8C and 8D) reveals specific chemical fingerprints for the Organic, Conventional and Ecophyto wines. It is noteworthy that almost no CHOP- and CHONP-containing compounds are specific for a protection mode and that some CHONP-containing compounds are specific only for Organic wines (Fig. 8B). The organic wines appear to be characterized by CHONS-, CHONSP- and CHO-containing compounds located in particular in areas of amino acids and carbohydrates (Fig. 8B). The conventional wines appear to be specifically richer in sulfurous CHO-containing compounds with some located in the carbohydrate area and by CHONS- and CHOS-containing compounds (Fig. 8C). The Ecophyto wines appear to be characterized by CHONS-, CHON- and CHO-containing compounds (Fig. 8D). These results show a significant influence of enological practices such as the use of sulfur dioxide on wine global chemical composition. However the effect of plant protection in the vineyard remains visible.

Thus, the existence in wines of chemical and microbiological signatures associated with vineyard protection mode is highlighted.



otection mode, the
masses from (B)

References

Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Tesson, L., Bessis, R., 2000. Stilbene content of mature Vitis vinifera berries in response to UV-C elicitation. J. Agric. Food Chem. 48, 6103–6105.

Agenbach, W.A., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity, in: Beukman, E.F. (Ed.), Proceedings of the South African Society for Enology and Viticulture. Stellenbosch, South Africa, pp. 66–88.

Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., Sicard, D., 2011. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2772–2784.

Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., Colonna-Ceccaldi, B., Masneuf-Pomarede, I., 2014. Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. Int. J. Food Microbiol. 178, 87–97.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012. The microbial ecology of wine grape berries. Int. J. Food Microbiol. 153, 243–259.

Bisson, L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 50, 107–119.

Bokulich, N.A., Swadener, M., Sakamoto, K., Mills, D.A., Bisson, L.F., 2015. Sulfur dioxide treatment alters wine microbial diversity and fermentation progression in a dose-dependent fashion. Am. J. Enol. Vitic. 66, 73–79.

Bunea, C.-I., Pop, N., Babeş, A., Matea, C., Dulf, F. V, Bunea, A., 2012. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. Chem. Cent. J. 6, 66-77.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, K.J., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig J. E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., Mcdonald, D., Muegge, B.D., Pirrung M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat. Methods 7, 335–336.

Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P. a., 1998. Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 49, 283–288.

Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L., 2011. Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. PLoS One 6, e24166. doi:10.1371/journal.pone.0024166

Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 37, 141–145.

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., Eli, A., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. Int. J. Food Microbiol. 99, 237–43.

Comitini, F., Ciani, M., 2008. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. Ann. Microbiol. 58, 489–493.

Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J.M., 1998. Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. Int. J. Food Microbiol. 41, 169–175.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D., Valero, E., 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. Int. J. Food Microbiol. 145, 132–139.

Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., Henriques, J.A.P., 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. Food Chem. Toxicol. 45, 2574–2580.

De La Torre, M.J., Millan, M.C., Perez-Juan, P., Morales, J., Ortega, J.M., 1999. Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. Microbios 100, 27–40.

Du Toit, W.J., Marais, J., Pretorius, I.S., Du Toit, M., 2006. Oxygen in must and wine: A review. South African J. Enol. Vitic. 27, 76–94.

Ferreira, J., Du Toit, M., du Toit, W.J., 2006. The effects of copper and high sugar concentrations on growth , fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. Aust. J. Grape Wine Res. 12, 50–56.

Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A.L., Heard, G., Ciani, M., 2002. The yeast ecology of wine grapes., in: Ciani, M. (Ed.), Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts. Research Signpost, pp. 1–17.

Gougeon, R.D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Feuillat, F., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., 2009. The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 9174–9179.

Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2015. Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? Food Microbiol. 50, 70–77.

Guerra, E., Sordi, G., Mannazzu, I., Clementi, F., Fatichenti, F., 1999. Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. Ital. J. Food Sci. 11, 221–230.

Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. J. Appl. Microbiol. 84, 865–876.

Jeandet, P., Adrian, M., Breuil, A., Sbaghi, M., Debord, S., Bessis, R., Weston, L.A., Harmon, R., 2000. Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: application to the control of grey mould in the vineyard. Acta Hortic. 528, 591–596.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review. South African J. Enol. Vitic. 21, 97-129.

Levite, D., Adrian, M., Tamm, L., 2000. Preliminary Results on Contents of Resveratrol in Wine of Organic and Conventional Vineyards. World Grows Org. 6 th Int. Congr. Org. Vitic. 256–257.

Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., Masneuf-Pomarède, I., 2014. Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. Int. J. Food Microbiol. 177, 21–28.

Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Esteve-Zarzoso, B., Nally, M.C., Lerena, M.C., Toro, M.E., Vazquez, F., Combina, M., 2015. Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines. Int. J. Food Microbiol. 199, 23–32.

McGovern, P.E., Glusker, D.L., Exner, L.J., Voigt, M.M., 1996. Neolithic resinated wine. Nature 381, 480-481.

Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation. Int. J. Food Microbiol. 157, 245–250.

Milanović, V., Comitini, F., Ciani, M., 2013. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. Int. J. Food Microbiol. 161, 240–246.

Mora, J., Mulet, A., 1991. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. Am. J. Enol. Vitic. 42, 133–136.

Mulero, J., Pardo, F., Zafrilla, P., 2010. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. J. Food Compos. Anal. 23, 569–574.

Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.-J.E., 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6705–6713.

Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., Sanz, S., 2011. Factors of influence in the distribution of mold in the air in a wine cellar. J. Food Sci. 76, 169–174.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Res. 4, 865–877.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41, 590–596.

Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S., Cadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. Int. J. Food Microbiol. 109, 97–102.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. Int. J. Food Microbiol. 86, 169–180.

Romano, P., Suzzi, G., 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms, in: Fleet, G.H. (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. CRC Press, pp. 373-394.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiol. Res. 157, 267–74.

Sawaya, A.C.F.H., Catharino, R.R., Facco, E.M.P., Fogaça, A., Godoy, H.T., Daudt, C.E., Eberlin, M.N., 2011. Monitoring of wine aging process by electrospray ionization mass spectrometry. Ciência e Tecnol. Aliment. 31, 730–734.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 12, R60.

Sipiczki, M., 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 2079–2083.

Sláviková, E., Vadkertiová, R., 2003. Effects of pesticides on yeasts isolated from agricultural soil. Z. Naturforsch. C. 58, 855–859.

Sturm, J., Grossmann, M., Schnell, S., 2006. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. J. Appl. Microbiol. 101, 1241–1248.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 139–173.

Takahashi, M., Ohta, T., Masaki, K., Mizuno, A., Goto-Yamamoto, N., 2014. Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free wine by culture-dependent and -independent methods. J. Biosci. Bioeng. 117, 569–575.

Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., Plassart, P., Wincker, P., Jolivet, C., Bispo, A., Lemanceau, P., Maron, P.-A., Mougel, C., Ranjard, L., 2012. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. Microb. Biotechnol. 5, 135–141.

Tziotis, D., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., 2011. Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng). 17, 415–421.

Vadkertiová, R., Sláviková, E., 2006. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. J. Basic Microbiol. 46, 145–152. doi:10.1002/jobm.200510609

Vrček, I.V., Bojić, M., Žuntar, I., Mendaš, G., Medić-Šarić, M., 2011. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. Food Chem. 124, 354–361.

Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F., López Nicolás, J.M., 2003. Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 51, 4694–4700.

Zohre, D.E., Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. Process Biochem. 38, 319–324.

Conclusions et perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portaient sur l'impact de l'activité anthropique (au vignoble et en cuverie) sur les populations fongiques de la baie de raisin jusqu'à la fin de la fermentation alcoolique. Afin d'obtenir une vision à la fois complète et précise de ces effets, il était important de posséder des outils analytiques permettant, non seulement d'identifier l'ensemble des populations fongiques présentes (levures, moisissures), mais également de caractériser ces populations avec une résolution taxonomique fine. En effet, la plupart des méthodes disponibles notamment celles permettant d'identifier l'ensemble des populations fongiques, ne permettent une identification qu'au niveau du genre voire de l'espèce. La caractérisation des populations au niveau de la souche en revanche n'est possible actuellement que par très peu de méthodes et seulement pour un nombre très limité d'espèces.

Dans un premier temps, au cours de ces travaux, la spectroscopie IR-TF a été évaluée pour ses capacités à réaliser des études de biodiversité et à caractériser au niveau de la souche les isolats présents dans un échantillon. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par pyroséquençage, technique utilisée comme méthode de référence. Ainsi la spectroscopie IR-TF apparait comme une méthode précise et fiable pour identifier les genres majoritaires présents dans un échantillon (moût de raisin, vin). Mais les deux plus grands avantages de la spectroscopie IR-TF sont la capacité à étudier la biodiversité intraspécifique de levures non-*Saccharomyces* pour lesquelles peu de méthodes sont encore disponibles et la possibilité de gérer un grand nombre de souches. Compte tenu de la variabilité physiologique qui peut exister au sein d'une espèce, accéder à la biodiversité des souches permettra un criblage et une sélection plus efficaces de nouvelles souches d'intérêt œnologique. La spectroscopie IR-TF permettra également de suivre l'implantation de ferments industriels non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation alcoolique.

Néanmoins cette méthode n'est pour le moment pas opérationnelle pour l'ensemble des genres levuriens. En effet, pour le genre *Metschnikowia*, plusieurs espèces et notamment les deux « espèces sœur » *M. fructicola* et *M. pulcherrima* ne peuvent être distinguées. Afin de résoudre ce problème plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

- l'augmentation du nombre de spectres de référence pour les différentes espèces du genre *Metschnikowia*,
- l'utilisation d'un autre milieu de culture, car celui utilisé à l'heure actuelle (milieu riche) semble problématique pour ce genre *Metschnikowia* (Shapaval et al., 2013). Ce changement de milieu permettrait d'améliorer la reproductibilité des mesures par spectroscopie IR-TF,

- le développement d'un Artificial Neural Network (ANN) à plusieurs niveaux permettant par comparaison de zones spécifiques des spectres obtenus par IR-TF de discriminer en plusieurs étapes ces espèces très proches comme cela a été décrit pour des espèces des genres *Issatchenkia* et *Pichia* (Büchl et al., 2008).

Etant donné qu'au cours de ce travail, la capacité de la spectroscopie IR-TF à discriminer au niveau de la souche a été démontrée, nous avons, dans un second temps, appliqué la spectroscopie IR-TF à l'étude de la diversité inter et intraspécifique de souches des genres *Candida* et *Hanseniaspora* présentes sur les baies de raisin, dans les moûts de raisin et au cours de la fermentation alcoolique afin de déterminer leur origine. De plus, la persistance de ces deux genres pendant un an dans l'environnement de la cuverie et leur capacité à se réimplanter dans de nouveaux moûts ont également été examinées.

Pour cette étude, 4341 isolats ont été identifiés principalement au niveau de l'espèce (excepté le genre *Metschnikowia*). Parmi ces isolats, 1365 appartenant respectivement aux espèces *Candida zemplinina* (214), *Hanseniaspora guilliermondii* (341) et *Hanseniaspora uvarum* (810) ont été discriminés au niveau de la souche. Les résultats obtenus ont permis de démontrer, pour la première fois, que la baie de raisin constitue une source limitée pour l'ensemble des levures non-*Saccharomyces* présentes dans le moût et au cours de la fermentation alcoolique étant donné qu'une faible proportion de souches pour ces 2 genres provient directement des baies de raisin. En effet, pour le millésime 2012, 3% (*Candida zemplinina*), 12% (*Hanseniaspora guilliermondii*) et 13% (*Hanseniaspora uvarum*) des souches isolées dans le moût ou au cours de la fermentation alcoolique proviennent des baies de raisin. En revanche, l'environnement de la cuverie et particulièrement le matériel vinaire et le sol semblent constituer une source importante de levures susceptibles de s'implanter dans les moûts. Ainsi, pour le millésime 2013, 75% (*Hanseniaspora guilliermondii*) et 75% (*Hanseniaspora uvarum*) des souches isolées dans le moût de raisin ou au cours de la fermentation alcoolique ont été isolées avant l'arrivée de la vendange dans l'environnement de la cuverie. De plus, toutes les souches (pour l'espèce *H. guilliermondii*) ou la majorité (pour l'espèce *H. uvarum*) isolées dans le moût au cours de la fermentation alcoolique ont été retrouvées dans l'air de la cuverie pendant la période de vinification. Nous démontrons ainsi que l'air de la cuverie est un vecteur important de dissémination de ces populations de l'environnement de la cuverie jusqu'aux cuves de vinification ou d'élevage. Cependant les autres sources potentielles de levures et vecteurs de dissémination à l'intérieur de la cuverie telles que les insectes ou l'homme reste à approfondir. L'ensemble des résultats obtenus permettent de valider les hypothèses avancées sur les origines

des levures non-*Saccharomyces* présentes dans le moût et au cours de la fermentation alcoolique. Comme pour l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* l'environnement de la cuverie est le réservoir majoritaire des levures non-*Saccharomyces*. Nous démontrons également, comme pour *S. cerevisiae*, une importante biodiversité intraspécifique et la succession de souches différentes non-*Saccharomyces* au cours de la fermentation.

Pour la première fois, également, la persistance de levures non-*Saccharomyces* d'un millésime à l'autre et la réimplantation dans de nouveaux moûts a été démontrée pour des levures non-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora guilliermondii* et *Hanseniaspora uvarum*). Ces résultats démontrent l'existence d'une véritable flore de cuverie persistante et se constituant peu à peu avec les levures apportées par le raisin provenant de différentes parcelles et / ou par d'autres sources (dont certaines ont déjà été évoquées précédemment). Les levures de raisin qui contribuent à l'établissement de cette flore de cuverie peuvent varier d'un millésime à l'autre, en fonction du cépage mais également en fonction des pratiques réalisées au vignoble. Il pourrait donc être intéressant d'étudier et de comparer les flores levuriennes établies dans des cuveries servant uniquement à la vinification de raisins issus de la viticulture biologique et des cuveries servant à la vinification de raisin issus de la viticulture conventionnelle afin de déterminer si une flore spécifique de cuverie s'installe en fonction du système de conduite appliqué.

Un des objectifs de ce travail de thèse était d'étudier les effets de différentes protections phytosanitaires sur les populations fongiques des baies de raisin. Dans un troisième temps, l'ensemble des populations fongiques présentes sur les baies issus d'une même parcelle pour laquelle trois différentes protections phytosanitaires ont été appliquées (Conventionnel, Ecophyto et Biologique), ont été identifiées par pyroséquençage. Cette comparaison a été effectuée pour 3 millésimes (2012, 2013 et 2014), caractérisés par une climatologie et des pressions cryptogamiques différentes. Si l'effet millésime sur la diversité des populations fongiques présentes sur baies de raisin a été confirmé, cette étude sur 3 années consécutives a permis également de mettre en évidence un effet de la protection phytosanitaire. Pour les 3 millésimes, une biodiversité plus faible a systématiquement été observée pour les raisins issus de la modalité biologique. De plus, les proportions des différentes populations varient fortement en fonction de la protection. En revanche, aucune espèce ne semble être particulièrement inhibée ou favorisée par une protection indépendamment du millésime. Cette étude est la première réalisée sur 3 millésimes à l'aide d'une méthode d'étude globale de la diversité

permettant d'avoir accès à l'ensemble des genres fongiques (levures et moisissures) présentes sur les baies de raisin.

Par contre cette étude, comme la majorité des études déjà réalisées, analyse la diversité fongique de baies mûres au moment de la vendange. Or il existe un délai entre le dernier traitement phytosanitaire et la récolte. Pendant ce laps de temps sans traitement, est-ce que les populations fongiques sont remaniées ? Est-ce que les populations fongiques à la récolte sont identiques à celles présentes suite au traitement ? Les différences observées dans notre étude sont-elles le reflet réel de l'application des produits ? Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de suivre et comparer l'évolution des populations fongiques présentes sur baies pour les différentes protections phytosanitaires depuis le dernier traitement jusqu'à la récolte. De plus, nous avons vu dans le chapitre 1 que les populations fongiques ne sont pas présentes au vignoble uniquement durant le cycle végétatif au cours duquel les traitements phytosanitaires sont appliqués. Cette présence en dehors du cycle végétatif amène plusieurs questions : i) les populations fongiques présentes au tout début du cycle végétatif avant même la première application des traitements phytosanitaires sont-elles les mêmes sur l'ensemble de la parcelle d'étude ou existe-t-il déjà une variabilité malgré l'homogénéité potentielle de la parcelle (cépage, clone, porte-greffes identiques, sol….) ? ii) Les parties ligneuses pérennes et le sol sont-ils des réservoirs en dehors du cycle végétatif ? iii) Quelle est l'influence des pratiques viticoles réalisées en dehors du cycle végétatif telles que la taille, le travail du sol, … sur les populations de ces réservoirs potentiels.

La discrimination au niveau de la souche pour plusieurs espèces levuriennes permettrait ainsi une meilleure compréhension de la survie des populations levuriennes en dehors du cycle végétatif et l'impact de ces différents facteurs sur la population finale sur baie.

Après avoir mis en évidence un effet de la protection phytosanitaire sur la biodiversité fongique présentes sur baies de raisin, nous nous sommes intéressés au devenir de ces populations suite à différentes activités anthropiques réalisées depuis l'arrivée de la vendange à la cuverie jusqu'à la fin de la fermentation alcoolique. Les résultats obtenus montrent une diminution très importante de la proportion des moisissures lors des étapes de pressurage du raisin et de clarification du moût de raisin. Une diminution de la proportion de certains genres levuriens au profit d'autres ainsi que la totale disparition ou l'apparition de nouveaux genres par rapport aux populations identifiées sur baies ont été également observées ; démontrant l'effet du pressurage et de la clarification et confirmant également l'influence de la flore de cuverie. Mais, malgré

ces différents remaniements, les effets des protections phytosanitaires observés sur baies ne sont pas totalement gommer par ces deux étapes pré-fermentaires.

Quant à l'utilisation du dioxyde de soufre, cette autre pratique a également un impact sur les populations, en ralentissant la croissance de la population levurienne lors des premiers jours après le débourbage. Cependant la population maximale atteinte au cours de la fermentation est supérieure pour les fermentations avec SO_2. De plus, les dynamiques de populations et de fermentation en présence de SO_2 sont similaires pour tous les vins, en raison de l'implantation et la domination de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, levure adaptée à la présence de sulfites et aux conditions de vinification (présence éthanol). Ainsi *S. cerevisiae* représente plus de 98% de la population en fin de fermentation alcoolique. Par contre en absence de SO_2, les dynamiques de populations et de fermentation sont différentes entre les vins issus de la modalité Ecophyto et ceux des modalités Conventionnel et Biologique, pour lesquelles des fermentations languissantes sont observées. Pour ces fermentations sans SO_2, des populations de levures non-*Saccharomyces* sont présentes pour toutes les modalités représentant près de 30% de la population dont 7 genres différents pour la modalité biologique. L'ajout de SO_2 semble donc gommer les différences de populations liées aux différentes protections phytosanitaires. Néanmoins, des différences importantes sont encore visibles 3 jours après le débourbage. Ces différences de populations qui perdurent pendant plusieurs jours peuvent suffire pour influencer la composition des vins finis. En effet, les résultats obtenus par les analyses non-ciblées des vins montrent que les vins peuvent être distingués en fonction de la protection phytosanitaire, que les fermentations aient eu lieu en présence ou en absence de SO_2.

Chaque pratique humaine impacte donc les communautés fongiques d'une manière spécifique et le vin produit semble garder en mémoire chacun des effets produits par l'activité humaine. D'autres pratiques pourraient entrainer des remaniements de flore comme par exemple la régulation de la température, les macérations, le levurage. Il pourrait être envisagé de réaliser ces mêmes travaux sur d'autres vins et notamment des vins rouges pour lesquels les itinéraires de vinification sont totalement différents. De plus, aucune étude n'a étudié l'impact du type de pressoir utilisé sur les populations retrouvées en moût de raisin comme démontré par Valles et al. (2007) pour la production de cidre. Enfin, il a été montré que le vieillissement pouvait accentuer la spécificité de vins issus de différents terroirs révélant des différences non détectables en fin de vinification (Roullier-Gall et al., 2014). Il serait donc intéressant d'analyser à nouveau les vins produits au cours de cette étude après quelques années, afin de vérifier si les effets de certaines pratiques ne sont pas d'avantage visibles après vieillissement.

Références bibliographiques

Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., Venancio, A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Lett. Appl. Microbiol. 32, 240–242.

Adamo, G.M., Brocca, S., Passolunghi, S., Salvato, B., Lotti, M., 2012. Laboratory evolution of copper tolerant yeast strains. Microb. Cell Fact. 11, 1-11.

Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Tesson, L., Bessis, R., 2000. Stilbene content of mature Vitis vinifera berries in response to UV-C elicitation. J. Agric. Food Chem. 48, 6103–6105.

Adrian, M., Trouvelot, S., Gamm, M., Poinssot, B., Héloir, M-C., Daire, X., 2011. Activation of grapevine defense mechanisms: Theoretical and applied approaches. In : Mérillon, J. M., Ramawat, K. G. (Eds.), Plant Defense: Biological Control, Springer, pp. 313–331.

Adt I., Kohler A., Gognies S., 2010. FTIR spectroscopic discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* strains. Can. J. Microbiol. 801,793–801.

Agenbach, W.A., 1977. A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity, in: Beukman, E.F. (Ed.), Proceedings of the South African Society for Enology and Viticulture. Stellenbosch, South Africa, pp. 66–88.

Aggarwal, R., Tripathi, A., Yadav, A., 2010. Pathogenic and genetic variability in *Tilletia indica* monosporidial culture lines using universal rice primer-PCR. Eur. J. Plant Pathol. 128, 333–342.

Agrios George N., 2005. Plant pathology, Academic Press, 5th Edition, p.952

Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., Gírio, F., 2010. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 965–972.

Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., Sicard, D., 2011. Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2772–2784.

Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M., 2014a. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. PLoS One 9: e94246.

Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., Colonna-Ceccaldi, B., Masneuf-Pomarede, I., 2014b. Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. Int. J. Food Microbiol. 178, 87–97.

Albertin, W., Panfili, A., Miot-Sertier, C., Goulielmakis, A., Delcamp, A., Salin, F., Lonvaud-Funel, A., Curtin, C., Masneuf-Pomarede, I., 2014c. Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. Food Microbiol. 42, 188–195.

Alper, I., Frenette, M., Labrie, S., 2013. Genetic diversity of dairy *Geotrichum candidum* strains revealed by multilocus sequence typing. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 5907–5920.

Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B., 2010a. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. Eur. Food Res. Technol. 231, 215–224.

Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., Mas, A., 2010b. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. Int. J. Food Microbiol. 144, 257–262.

Andrade, M.J., Rodriguez, M., Sánchez, B., Rodríguez, M., Sánchez, B., Aranda, E., Córdoba, J.J., 2006. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. Int. J. Food Microbiol. 107, 48–58.

Andrews, J.H., Spear, R.N., Nordheim, E. V, 2002. Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces. Can. J. Microbiol. 48, 500–513.

Austin, C.N., Wilcox, W.F., 2011. Effects of fruit-zone leaf removal, training systems, and irrigation on the development of grapevine powdery mildew. Am. J. Enol. Vitic. 62, 193–198.

Avery, S. V, Howlett, N.G., Radice, S., 1996. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. Appl. Environ. Microbiol. 62, 3960–3966.

Avis, P.G., Dickie, I. a., Mueller, G.M., 2006. A “dirty” business: Testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. Mol. Ecol. 15, 873–882.

Ayoub, M.-J., Legras, J.-L., Saliba, R., Gaillardin, C., 2006. Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. J. Appl. Microbiol. 100, 699–711.

Azenha, M., Vasconcelos, M.T., Moradas-Ferreira, P., 2000. The influence of Cu concentration on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biosci. Bioeng. 90, 163–167.

Barata, A., Seborro, F., Belloch, C., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2008. Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. J. Appl. Microbiol. 104, 1182–1191.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012a. The microbial ecology of wine grape berries. Int. J. Food Microbiol. 153, 243–259.

Barata, A., Santos, S.S.C., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2012b. New insights into the ecological interaction between grape berry microorganisms and *Drosophila* flies during the development of sour rot. Microb. Ecol. 64, 416–430.

Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., Barnett, L., 2000. Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press, 3rd Edition, p.1150

Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S., Cabañes, F.J., 2005. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. Int. J. Food Microbiol. 98, 125–130.

Belin, J., 1979. Contribution a l'étude des levures des chais - taxonomie, répartition des levures. Mycopathologia 67, 67–81.

Belin, J.M., 1981. Biologie des levures liées à la vigne et au vin: écologie, systématique et physiologie, interactions levures-acides aminés et levures-tanins condensés. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

Belin, J.M., Henry, P., 1973. Repartition des levures a la surface de la tige de vigne. Comptes rendus Hebd. des seances. Ser. D. Sci. Nat. 277, 1885–1887.

Bellí, N., Bau, M., Marín, S., Abarca, M.L., Ramos, A. J., Bragulat, M.R., 2006. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. Int. J. Food Microbiol. 111, 40–45.

Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. Syst. Appl. Microbiol. 25, 287–293.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. Int. J. Food Microbiol. 122, 312–20.

Benda, I., 1982. Wine and Brandy. In : Reed, G. (Ed.) Prescott and Dunn's industrial Microbiology. AVI Publishing Compagny, Westport, Connecticut, 4th Edition, pp. 293–402.

Benedictis, M. De, Bleve, G., Grieco, F., Tristezza, M., 2011. An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. Antonie von Leeuwenhoek 89, 189–200.

Benito, Á.G., 2005. Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria 1–128.

Bennett, S., 2004. Solexa Ltd. Pharmacogenomics. 5, 433–438.

Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F., 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 22, 1–7.

Bisson, L.F., Kunkee, R.E., 1991. Microbial interactions during wine production. In: Mc Graw-Hill (Ed.), Mixed Cultures in Biotechnology. p. 438.

Bisson, L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 50, 107–119.

Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., Torriani, S., 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. Appl. Environ. Microbiol. 69, 4116–4122.

Boekhout, T., Renting, M., Alexander Scheffers, W., Bosboom, R., 1993. The use of karyotyping in the systematics of yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek 63, 157–163.

Bokulich, N.A., Hwang, C.-F., Liu, S., Boundy-Mills, K.L., Mills, D.A., 2011. Profiling the Yeast Communities of Wine Fermentations Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Am. J. Enol. Vitic. 63, 185–194.

Bokulich, N.A., Joseph, C.M., Allen G. Benson, A.K., Mills, D.A., 2012. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. PLoS One 7: e36357.

Bokulich N.A., Mills D.A., 2012. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. BMB Rep. 45, 377–389.

Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D. A., 2013. Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. PLoS One 8: e66437.

Bokulich N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111, 139–148.

Bokulich, N.A., Swadener, M., Sakamoto, K., Mills, D.A., Bisson, L.F., 2015. Sulfur dioxide treatment alters wine microbial diversity and fermentation progression in a dose-dependent fashion. Am. J. Enol. Vitic. 66, 73–79.

Bornet, B., Muller, C., Paulus, F., Branchard, M., 2002. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var . *botrytis L.*). Genome 45, 890–896.

Bougnoux, M.E., Morand, S., d'Enfert, C., 2002. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 40, 1290–1297.

Bougnoux, M.-E., Aanensen, D.M., Morand, S., Théraud, M., Spratt, B.G., d'Enfert, C., 2004. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. Infect. Genet. Evol. 4, 243–52.

Brilli, L., Buscioni, G., Moriondo, M., Bindi, M., Vincenzini, M., 2014. Influence of interannual meteorological variability on yeast content and composition in Sangiovese grapes. Am. J. Enol. Vitic. 65, 375–380.

Broome, J.C., English, J.T., Marois, J.J., Latorre, B.A., Aviles, J.C., 1995. Development of an infection model for *botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature. Phytopathology 85, 97-102.

Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P., 2014. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. PLoS One 9: e95928.

Bruns, A., Cypionka, H., Overmann, J., 2002. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic sea. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3978–3987.

Bunea, C.-I., Pop, N., Babeş, A., Matea, C., Dulf, F. V, Bunea, A., 2012. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. Chem. Cent. J. 6, 66-77.

Button, D.K., Schut, F., Quang, P., Martin, R., Robertson, B.R., 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: Theory, procedures, and initial results. Appl. Environ. Microbiol. 59, 881–891.

Butzke, C.E., Seung, K.P., 2011. Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. J. Microbiol. Biotechnol. 21, 519–524.

Buzzini, P., Martini, A, 2000. Utilisation of differential killer toxin sensitivity patterns for fingerprinting and clustering yeast strains belonging to different genera. Syst. Appl. Microbiol. 23, 450–457.

Buzzini, P., Martini, A., 2001a. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. J. Clin. Microbiol. 39, 3362–3364.

Buzzini, P., Martini, A., 2001b. Large-scale screening of selected *Candida maltosa, Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. Med. Mycol. 39, 479–482.

Buzzini, P., Turchetti, B., Martini, A., 2004. Assessment of discriminatory power of three different fingerprinting methods based on killer toxin sensitivity for the differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains. J. Appl. Microbiol. 96, 1194–1201.

Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Melis, M., Pirisi, F.M., Minelli, E. V, Cabitza, F., Cubeddu, M., 1997. Fate of some new fungicides (Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil, and Tebuconazole) from vine to wine. J. Agric. Food Chem. 45, 2708–2710.

Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Pirisi, F.M., Espinoza, J., Mendoza, J., Cabitza, F., Pala, M., Brandolini, V., 1998. Fate of Azoxystrobin, Fluazinam, Kresoxim-methyl, Mepanipyrim, and Tetraconazole from vine to wine. J. Agric. Food Chem. 46, 3249–3251.

Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Pirisi, F.M., Farris, G. A., Madau, G., Emonti, G., 1999. Pesticides in fermentative processes of wine. J. Agric. Food Chem. 47, 3854–3857.

Cabras, P., Angioni, A., 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. J. Agric. Food Chem. 48, 967–973.

Čadež, N., Poot, G.A., Raspor, P., Smith, M.T., 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 1671–1680.

Čadež, N., Zupan, J., Raspor, P., 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. FEMS Yeast Res. 10, 619–630.

Calhelha, R.C., Andrade, J.V., Ferreira, I.C., Estevinho, L.M., 2006. Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. Food Microbiol. 23, 393–398.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, K.J., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig J. E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., Mcdonald, D., Muegge, B.D., Pirrung M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat. Methods 7, 335–336.

Caridi, A., Ramondino, D., 1999. Biodiversita fenotipica in ceppi di *Hanseniaspora* di origine enologica. Enotecnico 45, 71–74.

Carle, G.F., Olson, M.V., 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 12, 5647–5664.

Carle, G.F., Olson, M.V., 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3756–3760.

Casey, G.D., Dobson, A.D., 2003. Molecular detection of *Candida krusei* contamination in fruit juice using the citrate synthase gene cs1 and a potential role for this gene in the adaptive response to acetic acid. J. Appl. Microbiol. 95, 13–22.

Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., 1998. Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 49, 283–288.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. J. Sci. Food Agric. 60, 165–178.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.-N., 1995. The Influence of *Brettanomyces/ Dekkera* sp . yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. Am. J. Enol. Vitic. 46, 463–468.

Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D.P., Shouche, Y., Deshpande, M. V., 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. Food Microbiol. 26, 801–808.

Chemidlin Prévost-Bouré, N., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L., 2011. Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. PLoS One 6:e24166.

Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M., Chulze, S.N., 2009. *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. Int. J. Food Microbiol. 136, 137–141.

Cho, J.C., Giovannoni, S.J., 2004. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine gammaproteobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70, 432–440.

Ciani, M., Picciotti, G., 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. Biotechnol. Lett. 17, 1247–1250.

Ciani, M., Maccarelli, F., 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World J. Microbiol. Biotechnol. 14, 199–203.

Ciani, M., Fatichenti, F., 2001. Killer toxin of *Kluiveromyces phaffi* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. Society 67, 3058–3063.

Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek 85, 159–164.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P., 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Res. 10, 123–133.

Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vázquez, F.J.L., Rodríguez-Vico, F., 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiol. 21, 149–155.

Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiol. Lett. 189, 81–87.

Cocolin, L., Mills, D.A., 2003. Wine yeast inhibition by sulfur dioxide : a comparison of culture-dependent and independent methods. Am. J. Enol. Vitic. 2, 125–130.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., Comi, G., 2004. Molecular detection and identification *of Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1347–1355.

Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 37, 141–145.

Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C., 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. Int. J. Food Microbiol. 99, 237–243.

Comitini, F., Ciani, M., 2008. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. Ann. Microbiol. 58, 489–493.

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M., 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 28, 873–882.

Connell, L., Stender, H., Edwards, C.G., 2002. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. Am. J. Enol. Vitic. 53, 322–324.

Conner, A., 1983. The comparative toxicity of vineyard pesticides to wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. 34, 278–279.

Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., Guillamón, J.M., 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. Am. J. Enol. Vitic. 48, 339–344.

Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J.M., Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J.M., 1998. Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. Int. J. Food Microbiol. 41, 169–175.

Cooper, H.J., Marshall, A.G., 2001. Electrospray ionization Fourier transform mass spectrometric analysis of wine. J. Agric. Food Chem. 49, 5710–5718.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D., Valero, E., 2011a. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. Int. J. Food Microbiol. 145, 132–139.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Valero, E., 2011b. Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. FEMS Microbiol. Ecol. 77, 429–437.

Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Valero, E., 2014. A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. Int. J. Food Microbiol. 189, 189–194.

Corte, L., Lattanzi, M., Buzzini, P., Bolano, A., Fatichenti, F., Cardinali, G., 2005. Use of RAPD and killer toxin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* strain typing. J. Appl. Microbiol. 99, 609–617.

Cortesi, P., Bisiach, M., Ricciolini, M., Gadoury, D.M., 1997. Cleistothecia of *Uncinula necator* - An additional source of inoculum in Italian vineyards. Plant Dis. 81, 922–926.

Coutinho, S.D., Paula, C.R., 1998. Biotyping of *Malassezia pachydermatis* strains using the killer system. Rev. Iberoam. Micol. 15, 85–7.

Csoma, H., Sipiczki, M., 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. FEMS Yeast Res. 8, 328–336.

Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P., Sipiczki, M., 2010. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. Int. J. Food Microbiol. 140, 239–248.

Cus, F., Raspor, P., 2008. The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts. Lett. Appl. Microbiol. 47, 54–59.

Da Rocha Rosa, C. A., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M.E., De Oliveira Reikson, A., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M., 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. Food Addit. Contam. 19, 408–414.

Dalle, F., Franco, N., Lopez, J., Vagner, O., Caillot, D., Chavanet, P., Cuisenier, B., Aho, S., Lizard, S., Bonnin, A., 2000. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J. Clin. Microbiol. 38, 4554–4559.

Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., Henriques, J.A.P., 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally-produced grapes. Food Chem. Toxicol. 45, 2574–2580.

Daniel, H.M., Sorrel, T.C., Meyer, W., 2001. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1593–1606.

Daniel, H.M., Meyer, W., 2003. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. Int. J. Food Microbiol. 86, 61–78.

David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Masneuf-Pomarede, I., Ranjard, L., Alexandre, H., 2014. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 41, 811-821

Davis, K.E.R., Joseph, S.J., Janssen, P.H., 2005. Effects of growth medium , inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 71, 826–834.

de Andrade, E.R., 1993. Ocorrência de espécies do gênero Fusarium em solo cultivado com videira (*Vitis* spp.) em Santa Catarina. [Occurrence of *Fusarium* species in grapevine (*Vitis* spp.) in Santa Catarina.]. *Fitopatologia Brasileira*, 18: 502–505.

de Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P.A., Langridge, P., 1999. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 915–924.

de la Torre, M.J., Millan, M.C., Perez-Juan, P., Morales, J., Ortega, J.M., 1999. Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. Microbios. 100, 27–40.

de Llanos Frutos, R., Fernández-Espinar, M.T., Querol, A., 2004. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Antonie Van Leeuwenhoek 85, 175–85.

Deak, T., Chen, J., Beuchat, L.R., 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4340-4344.

Deak, T., 2007. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, 2nd Edition, p. 352.

Delaherche, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and "ropy" *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. J. Appl. Microbiol. 97, 910–915.

Devarumath, R.M., Rani, V., Marimuthu, S., Muraleedharan, N., Raina, S.N., Nandy, S., Rani, V., Marimuthu, S., Muraleedharan, N., Raina, S.N., 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). Plant Cell Rep. 21, 166–173.

Dhieb, C., Normand, A.C., L'Ollivier, C., Gautier, M., Vranckx, K., El Euch, D., Chaker, E., Hendrickx, M., Dalle, F., Sadfi, N., Piarroux, R., Ranque, S., 2015. Comparison of MALDI-TOF mass spectra with microsatellite length polymorphisms in *Candida albicans*. J. Mass Spectrom. 50, 371–377.

Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. Food Microbiol. 20, 567–574.

Diguta, C.F., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., Rousseaux, S., 2011. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. Food Microbiol. 28, 1145–1154.

Dimakopoulou, M., Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Pietri, A., Battilani, P., Avramidis, N., Markakis, E.A., Tjamos, E.C., 2008. Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. Biol. Control 46, 158–165.

Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in *botrytis*-affected wine. J. Appl. Microbiol. 99, 85–93.

Divol, B., Miot-Sertier, C., Lonvaud-Funel, A., 2006. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for "refermentation" in *botrytis*-affected wines. J. Appl. Microbiol. 100, 516–526.

Doaré-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guérin, L., Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M., 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - Potentialities and limits of the method. J. Appl. Microbiol. 101, 1340–1350.

Dodgson, A.R., Pujol, C., Denning, D.W., Soll, D.R., Fox, A.J., 2003. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. J. Clin. Microbiol. 41, 5709–5717.

du Toit, W.J., Pretorius, I.S., Lonvaud-Funel, A., 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. J. Appl. Microbiol. 98, 862–871.

du Toit, W.J., Marais, J., Pretorius, I.S., Du Toit, M., 2006. Oxygen in must and wine: A review. South African J. Enol. Vitic. 27, 76–94.

Duarte, F.L., Pimentel, N.H., Teixeira, A., Fonseca, A., 2012. *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: Reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. Antonie Van Leeuwenhoek 102, 653–658.

Dubos, B., 2002. Maladies cryptogamiques de la vigne. Féret, 2nd Edition, p. 207.

Dubourdieu, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot, C., Murat, M.L., 2006. The role of yeasts in grape flavor development during fermentation : The example of Sauvignon blanc. Am. J. Enol. Vitic. 57, 81–88.

Dubreuil, C., 2008. Mode d'action de l'acide ß-aminobutirique chez la vigne : un inducteur de résistance aux pathogènes et étude des mécanismes impliqués dans la sensibilité aux pathogènes du mutant PAD2 d'*Arabidopsis* déficient en glutathion. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. J. Appl. Microbiol. 85, 779–789.

El-Assal, S.S.E., Abd-Alla, Seada, M.N.A., 2011. Molecular and biochemical studies of some yeast strains. African J. Biotechnol. 10, 1309–1319.

EL-Fiky, Z., Hassan, G., Emam, A., 2012. Quality parameters and RAPD-PCR differentiation of commercial baker's yeast and hybrid strains. J. Food Sci. 77, 312–317.

Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F. Rolle, L., Gerbi, V., Cocolin, L., 2015. Exploitation of the non-*Saccharomyces* yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) in wine fermentation : Physiological and molecular characterizations. Int. J. Food Microbiol. 199, 33–40.

Erukhimovitch, V., Tsror Lahkim, L., Hazanovsky, M., Talyshinsky, M., Souprun, Y., Huleihel, M., 2007. Early and rapid detection of potato's fungal infection by Fourier transform infrared microscopy. Appl. Spectrosc. 61, 1052–1056.

Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J.-M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2005. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. Biochim. Biophys. Acta 1724, 239–247.

Essendoubi, M., Toubas, D., Lepouse, C., Leon, A., Bourgeade, F., Pinon, J.-M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2007. Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. J. Microbiol. Methods 71, 325–331.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 329–337.

Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M.J., Ramón, D., Quero, A., 2001. Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. Antonie Van Leeuwenhoek 80, 85–92.

Falk, S.P., Pearson, R.C., Gadoury, D.M., Seem, R.C., Sztejnberg, A., 1996. *Fusarium proliferatum* as a biological agent against grape downey mildew. Phytopathology 86, 1010-1017

Feller, W., 1968. An introduction to probability theory and its applications. John Wiley & Sons, 3rd Edition, p. 509.

Feng, X., Yao, Z., Ren, D., Liao, W., Wu, J., 2008. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. FEMS Yeast Res. 8, 930–938.

Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E., 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek 78, 87–97.

Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. Int. J. Food Microbiol. 70, 1–10.

Ferreira, J., du Toit, M., du Toit, W.J., 2006. The effects of copper and high sugar concentrations on growth , fermentation efficiency and volatile acidity production of different commercial wine yeast strains. Aust. J. Grape Wine Res. 12, 50–56.

Fischer, M., 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycol. Prog. 1, 315–324.

Fischer, M., Kassemeyer, H.H.H., 2003. Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. Vitis 42, 109–116.

Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W., 2006. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. J. Microbiol. Methods 64, 63–77.

Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P., 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl. Environ. Microbiol. 48, 1034–1038.

Fleet, G.H., 1993. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.), Wine microbiology and biotechnology. CRC Press, pp. 27–54.

Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A.L., Heard, G., Ciani, M., 2002. The yeast ecology of wine grapes. In: Ciani, M., (Ed.) Biodiversity and biotechnology of wine yeasts. Research Signpost, pp. 1–17.

Fleet, G., 2003. Yeasts in fruit and fruit products. In: Boekhout, T., Robert,V. (Eds.), Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects. CRC Press, pp. 13–54.

Fleet, G.H., 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res. 8, 979–995.

Francesca, N., Chiurazzi, M., Romano, R., Aponte, M., Settanni, L., Moschetti, G., 2009. Indigenous yeast communities in the environment of "Rovello bianco" grape variety and their use in commercial white wine fermentation. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 337–351.

Francesca, N., Canale, D.E., Settanni, L., Moschetti, G., 2012. Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. Environ. Microbiol. Rep. 4, 105–112.

Fritz, R., Lanen, C., Chapeland-Leclerc, F., Leroux, P., 2003. Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine beta-lyase of *Botrytis cinerea*. Pestic. Biochem. Physiol. 77, 54–65.

Gadd, G.M., 1992. Metals and microorganisms: a problem of definition. FEMS Microbiol. Lett. 79, 197–203.

Ganley, A.R.D., Kobayashi T., 2007. Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats : Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. Genome Res. 17, 184–191.

Gao, C., Fleet, G.H., 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. J. Appl. Microbiol. 65, 405–409.

Gao, C., Fleet, G.H., 1995. Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts. Food Microbiol. 12, 65–71.

Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. Int. J. Food Microbiol. 125, 141–145.

Gerbaux, V., Jeudy, S., Monamy, C., 2000. Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. Bull. OIV 73, 581–599.

Gerhards, D., Büchl, N., Wenning, M., Scherer, S., Wallbrunn, C. Von, 2015. Terroir of yeasts? – Application of FTIR spectroscopy and molecular methods for strain typing of yeasts. BIO Web Conf. 5, 02001.

Goddard, M.R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R.C., Jun, C., 2010. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. Environ. Microbiol. 12, 63–73.

Goerges, S., Mounier, J., Rea, M.C., Gelsomino, R., Heise, V., Beduhn, R., Cogan, T.M., Vancanneyt, M., Scherer, S., 2008. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South german red smear cheese. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2210–2217.

Gómez, C., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Mínguez, S., Cabañes, F.J., 2006. Ochratoxin A-producing fungi from grapes intended for liqueur wine production. Food Microbiol. 23, 541–545.

Gougeon, R.D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Feuillat, F., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., 2009. The chemodiversity of wines can reveal a metabologeography expression of cooperage oak wood. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 9174–9179.

Gougeon, R.D., Lucio, M., Boutegrabet, L., Peyron, D., Feuillat, F., Chassagne, D., Alexandre, H., Voilley, A., Cayot, P., Gebefügi, I., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., 2011. Authentication approach of the chemodiversity of grape and wine by FTICR-MS. In: Ebeler, S.E., Takeoka, G.R., Winterhalter, P. (Eds.), Progress in Authentication of Food and Wine, ACS Symposium Series. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 69–88.

Granchi, L., Bosco, M., Messini, a, Vincenzini, M., 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J. Appl. Microbiol. 87, 949–956.

Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., 2015. Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? Food Microbiol. 50, 70–77.

Grove, G.G., 1987. Perennation of *Uncinula necator* in Vineyards of Eastern Washington. Plant Dis. 88, 242–247.

Grube, M., Schmid, F., Berg, G., 2011. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. Fungal Biol. 115, 978–86.

Guerra, E., Sordi, G., Mannazzu, I., Clementi, F., Fatichenti, F., 1999. Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. Ital. J. Food Sci. 11, 221–230.

Guillamón, J., Sabaté, J., Barrio, E., 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol. 169, 387–392.

Haag, H., Gremlich, H., 1996. Characterization and identification of actinomycetes by FT-IR spectroscopy. J. Microbiol. Methods 27, 157–163.

Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B., 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. 1, 55–63.

Halleen, F., Schroers, H.-J., Groenewald, J.Z., Rego, C., Oliveira, H., Crous, P.W., 2006. *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. Stud. Mycol. 55, 227–234.

Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microb. Ecol. 35, 1–21.

Heard, G.M., Fleet, G.H., 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Appl. Environ. Microbiol. 50, 727–728.

Heard, G.M., Fleet, G.H., 1986. Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. J. Appl. Microbiol. 60, 477–481.

Heard, G., Fleet, G., 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. J. Appl. Microbiol. 65, 23–28.

Helm, D., Labischinski, H., Naumann, D., 1991. Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier-transform IR spectral libraries: a stepwise correlation approach. J. Microbial Methods 14, 127-142

Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. J. Appl. Microbiol. 84, 865–876.

Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G., Nguyen, H. V, Gaillardin, C., Dujon, B., 2001. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. J. Clin. Microbiol. 39, 551–559.

Hernán-Gómez, S., Espinosa, J.C., Ubeda, J.F., 2000. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). FEMS Microbiol. Lett. 193, 45–50.

Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. New PCR-based methods for yeast identification. J. Appl. Microbiol. 97, 792–801.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006a. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7148–7155.

Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J.M., 2006b. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration. FEMS Yeast Res. 6, 102–111.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Guillamón, J.M., 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. FEMS Yeast Res. 7, 1340–1349.

Holm Hansen, E., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N., 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with Saccharomyces cerevisiae. J. Appl. Microbiol. 91, 541–547.

Hood, et al, 1991 I.A. Hood, D.B. Redfern, G.A. Kile, *Armillaria* in planted hosts,in: C.G. Shaw, G.A. Kile (Eds.), Armillaria Root Disease, United States Department of Agriculture Forest Service Agriculture handbook, 691, Forest Service, U.S.D.A., Washington, D.C. (1991), pp. 122–149

Horton, T.R., 2002. Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: Variation in ITS at a local scale. Plant Soil 244, 29–39.

Howell, K.S., Swiegers, J.H., Elsey, G.M., Siebert, T.E., Bartowsky, E.J., Fleet, G.H., Pretorius, I.S., De Barros Lopes, M.A., 2004. Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. FEMS Microbiol. Lett. 240, 125–129.

Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., Sharp, P.M., L, L., 1991. ERIC sequences : a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol. Microbiol. 5, 825–834.

Ivey, M.L., Phister, T.G., 2011. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38, 1619–34.

Ivey, M.L., Massel, M., Phister, T.G., 2013. Microbial interactions in food fermentations. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 4, 141–62.

Jadhav, D., Gawai, D., 2012. Effect of pH and temperature on growth of phylloplane yeast *Aureobasidium pullulans* (De Bary) G. Arnaud. Plant Sci. Feed 2, 159–162.

James, S.A., Collins, M.D., Roberts, I.N., 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 189–194.

James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D., 1997. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 453–460.

Jana, T.K., Singh, N.K., Koundal, K.R., Sharma, T.R., 2005. Genetic differentiation of charcoal rot pathogen , *Macrophomina phaseolina*, into specific groups using URP-PCR 164, 159–164.

Jarvis, B., Seiler, D. A., Ould, A. J., Williams, A.P., 1983. Observations on the enumeration of moulds in food and feedingstuffs. J. Appl. Bacteriol. 55, 325–336.

Jeandet, P., Adrian, M., Breuil, A., Sbaghi, M., Debord, S., Bessis, R., Weston, L.A., Harmon, R., 2000. Chemical induction of phytoalexin synthesis in grapevines: application to the control of grey mould in the vineyard. Acta Hortic. 528, 591–596.

Jeandet, P., Heinzmann, S.S., Roullier-Gall, C., Cilindre, C., Aron, A., Deville, M.A., Moritz, F., Karbowiak, T., Demarville, D., Brun, C., Moreau, F., Michalke, B., Liger-Belair, G., Witting, M., Lucio, M., Steyer, D., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2015. Chemical messages in 170-year-old champagne bottles from the Baltic Sea: Revealing tastes from the past. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 5893–5898.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S., 2003. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. South African J. Enol. Vitic. 24, 63–69.

Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Res. 14, 215–237.

Josepa, S., Guillamon, J.M., Cano, J., 2000. PCR differentiation of *Saccharomyces* cerevisiae from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. FEMS Microbiol. Lett. 193, 255–259.

Julien, A., Roustan, J.L., Dulau, L., Sablayrolles, J.M., 2000. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. Am. J. Enol. Vitic. 51, 215–222.

Kaeberlein, T., Lewis, K., Epstein, S.S., 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. Science 296, 1127–1129.

Kang, H.-W., Park, D., Go, S., Eun, M.-Y., 2002. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. Mol. Cells 13, 281–287.

Kántor, A., Kačániová, M., 2015. Diversity of bacteria and yeasts on the surface of table grapes. Anim. Sci. Biotech. 48, 149–155.

Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., Wormald, P.J., 2006. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. J. Microbiol. Methods 65, 38–48.

Kennelly, M.M., Gadoury, D.M., Wilcox, W.F., Magarey, P. A., Seem, R.C., 2007. Primary infection, lesion productivity, and survival of sporangia in the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola*. Phytopathology 97, 512–522.

Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16, 111–120.

Kosse, D., Seiler, H., Amann, R., Ludwig, W., Scherer, S., 1997. Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. Syst. Appl. Microbiol. 20, 468–480.

Kreader, C. A., 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1102–1106.

Kuczynski, J., Lauber, C.L., Walters, W.A., Parfrey, L.W., Clemente, J.C., Gevers, D., Knight, R., 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. Nat. Rev. Genet. 13, 47–58.

Kümmerle, M., Scherer, S., Seiler, H., 1998. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2207–2214.

Kurtzman, C.P., Droby, S., 2001. *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. Syst. Appl. Microbiol. 24, 395–399.

Kurtzman, C.P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces, Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea, Nakaseomyces, Naumovia, Vanderwaltozyma and Zygotorulaspora*. FEMS Yeast Res. 4, 233–245.

Kurtzman, C., Robnett, C., 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the "*Saccharomyces* complex" determined from multigene sequence analyses. FEMS Yeast Res. 3, 417–432.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. The Yeasts : A taxonomic study. Elsevier Science, 5th Edition, p. 2354.

La Guerche, S., Garcia, C., Darriet, P., Dubourdieu, D., Labarère, J., 2004. Characterization of *Penicillium* species isolated from grape berries by their internal transcribed spacer (ITS1) sequences and by gas chromatography-mass spectrometry analysis of geosmin production. Curr. Microbiol. 48, 405–411.

Lafon-Lafourcade, S., 1983. Wine and Brandy, in: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.), Biotechnology, Food and Feed Production with Microorganisms, Volume 5. Wiley-Blackwell, p. 631.

Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J.J., Monnet, C., Dupont, J., Bouix, M., 2009. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. J. Appl. Microbiol. 107, 1208–1218.

Lage, P., Barbosa, C., Mateus, B., Vasconcelos, I., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A., 2014. *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration. Int. J. Food Microbiol. 172, 62–69.

Lalancette, N., Ellis, M.A., Madden, L.V, 1988. Development of an infection efficiency model for *Plasmopara viticola* on american grape based on temperature and duration of leaf wetness. Phytopathology 78, 794-800

Lam, S.S., Howell, K.S., 2015. *Drosophila*-associated yeast species in vineyard ecosystems. FEMS Microbiol. Lett. 362, 1-7.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Yeast and its importance to wine aroma - a review. South African J. Enol. Vitic. 21, 97–129.

Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., Bertsch, C., 2009. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. C. R. Biol. 332, 765–783.

Lasram, S., Bellí, N., Chebil, S., Nahla, Z., Ahmed, M., Sanchis, V., Ghorbel, A., 2007. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. Int. J. Food Microbiol. 114, 376–379.

Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., Lollier, M., 2006. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. Food Microbiol. 23, 709–716.

Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V. Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait, M., Toubas, D., Sockalingum, G. D., 2014. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. Int J Food Microbiol 168-169, 32–41.

Lee, D.C., Chapman, D., 1986. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. Biosci. Rep. 6, 235–256.

Léger, B., 2008. Recueil et Formalisation de procédés experts pour conduire une protection intégrée du vignoble. Thèse de doctorat, Montpellier Supagro.

Legras, J.-L., Karst, F., 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiol. Lett. 221, 249–255.

Legras, J.-L., Ruh, O., Merdinoglu, D., Karst, F., 2005. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int. J. Food Microbiol. 102, 73–83.

Legras, J.-L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.-M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. Mol. Ecol. 16, 2091–2102.

Leroux, P., 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes. C. R. Biol. 326, 9–21.

Levite, D., Adrian, M., Tamm, L., 2000. Preliminary results on contents of resveratrol in wine of organic and conventional vineyards. World Grows Org. 6th Int. Congr. Org. Vitic. 256–257.

Li, S.S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J.Y., Yan, B., Han, B.Z., Reeves, M., 2010. Yeast species associated with wine grapes in China. Int. J. Food Microbiol. 138, 85–90.

Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., 2015. Wine microbiome, a dynamic world of microbial interactions. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. In Press.

Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J.P., Godon, J.J., 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. Environ. Microbiol. 8, 720–731.

Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D., Villa, T.G., 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. Am. J. Enol. Vitic. 42, 141–144.

Lopes, B., Soden, A., Henschke, P.A., Langridge, P., de Barros Lopes, M., 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4514–4520.

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.

Loureiro, V., Ferreira, M.M., Monteiro, S., Ferreira, R.B., 2012. The microbial community of grape berry, In: Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S., The biochemistry of the grape berry. Bentham Science Publishers, pp. 241–268.

Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac : a new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 71, 8228–8235.

Lyu C, Chen C, Ge F Liu, D., Zhao, S., Chen, D., 2013. A preliminary metagenomic study of puer tea during pile fermentation. J Sci Food Agric 93, 3165-3174.

Madrigal, C., Melgarejo, P., 1995. Morphological effects of *Epiccocum nigrum* and its antibiotic flavipin on *Monilinia laxa*. Can. J. Bot. 73, 425–431.

Madrigal, C., Tadeo, J.L., Melgarejo, P., 1991. Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. Mycol. Res. 95, 1375–1381.

Magyar, I., Tóth, T., 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 28, 94–100.

Magyar, D., Shoemaker, R.A., Bobvos, J., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., 2011. *Pyrigemmula*, a novel hyphomycete genus on grapevine and tree bark. Mycol. Prog. 10, 307–314.

Mandl, K., Schieck, J., Silhavy-Richter, K., Prange, A., Schneider, V., Schmidt, H.-P., 2015. Through the vine to the stem and skins of grapes. Ithaka J. 85, 349–355.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S.B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X. V, Godwin, B.C., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna,

M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437, 376–380.

Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Muller, E., Horre, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A., Sahl, H.-G., 2009. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J. Clin. Microbiol. 47, 2912–2917.

Marples, M.J., 1965. The ecology of the human skin. Thomas, p. 970.

Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2013. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. PLoS One 8: e69371.

Martinez, C., Loison, M., 2006. Stifenia ®, A concrete example of grapevine natural defence potentiation. Phytoma-La Défense des végétaux 1, 42–45.

Martini, A., Ciani, M., Scorzetti, G., 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. Am. J. Enol. Vitic. 47, 435–440.

Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., Masneuf-Pomarède, I., 2014. Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. Int. J. Food Microbiol. 177, 21–28.

Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernandez-Espinar, M.T., Loureiro, V., Querol, A., 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. Int. J. Food Microbiol. 106, 79–84. Patricia Martorell

Mashayekhi, F., Ronaghi, M., 2007. Analysis of read length limiting factors in pyrosequencing chemistry. Anal. Biochem. 363, 275–287.

Masih, E.I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E.A., Vernet, G., Charpentier, C., Adholeya, A., Paul, B., 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. FEMS Microbiol. Lett. 202, 227–232.

Masneuf-Pomarède, I., Le Jeune, C., Durrens, P., Lollier, M., Aigle, M., Dubourdieu, D., 2007. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. Syst. Appl. Microbiol. 30, 75–82.

Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., Alexandre, H., Capozzi, V., Cocolin, L., Colonna-Ceccaldi, B., Englezos, V., Girard, P., Gonzalez, B., Lucas, P., Mas, A., Nisiotou, A., Sipiczki, M., Spano, G., Tassou, C., Bely, M., Albertin, W., 2015. The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. FEMS Yeast Res. 15, 1-11.

Mateo, J.J., Jimenez, M., Huerta, T., Pastor, A., 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. Int. J. Food Microbiol. 14, 153–160.

Mateo-Vivaracho, L., Ferreira, V., Cacho, J., 2006. Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptohexyl acetate at ng L(-1) level by headspace solid-phase microextracion with on-fibre derivatisation and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric determination. J. Chromatogr. A 1121, 1–9.

Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J.F., Ferreira, V., 2007. Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography-negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. J. Chromatogr. A 1146, 242–250.

Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Esteve-Zarzoso, B., Nally, M.C., Lerena, M.C., Toro, M.E., Vazquez, F., Combina, M., 2015. Yeast population dynamics during prefermentative cold soak of Cabernet Sauvignon and Malbec wines. Int. J. Food Microbiol. 199, 23–32.

Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Alegría, A., Leite, A.M.O., Peixoto, R.S., Delgado, S., 2014. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. Curr. Genomics 15, 293–309.

McGovern, P.E., Glusker, D.L., Exner, L.J., Voigt, M.M., 1996. Neolithic resinated wine. Nature 381, 480-481.

McManus, B.A., Coleman, D.C., Moran, G., Pinjon, E., Diogo, D., Bougnoux, M.-E., Borecká-Melkusova, S., Bujdákova, H., Murphy, P., D'Enfert, C., Sullivan, D.J., 2008. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 46, 652–664.

Meaden, B.P., 1990. DNA fingerprinting of brewers' yeast: current perspectives. J. Inst. Brew. 96, 195–200.

Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Int. J. Food Microbiol. 157, 245–250.

Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M.E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F., 2013. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. Food Chem. 141, 2513–2521.

Melki Ben Fredj, S., Chebil, S., Lebrihi, A., Lasram, S., Ghorbel, A., Mliki, A., 2007. Occurrence of pathogenic fungal species in Tunisian vineyards. Int. J. Food Microbiol. 113, 245–250.

Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina, M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. Food Microbiol. 24, 403–412.

Merz, W.G., 1990. *Candida albicans* strain delineation. Clin. Microbiol. Rev. 3, 321–334.

Meyer, W., Aanensen, D.M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M.R., Esposto, M.C., Fisher, M., Gilgado, F., Hagen, F., Kaocharoen, S., Litvintseva, A.P., Mitchell, T.G., Simwami, S.P., Trilles, L., Viviani, M.A., Kwon-Chung, J., 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med. Mycol. 47, 561–570.

Milanović, V., Comitini, F., Ciani, M., 2013. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. Int. J. Food Microbiol. 161, 240–246.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426–428.

Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. Lett. Appl. Microbiol. 30, 136–141.

Mills, D.A., Johannsen, E.A., Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4884-4893.

Miot-Sertier, C., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. J. Appl. Microbiol. 102, 555–562.

Molnár, O., Prillinger, H., 2005. Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. Syst Appl Microbiol 28, 717–726.

Mora, J., Mulet, A., 1991. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. Am. J. Enol. Vitic. 42, 133–136.

Morace, G., Archibusacci, C., Sestito, M., Polonelli, L., Strain differentiation o f pathogenic yeasts by the killer system. Mycopathologia 84, 81–85.

Moreira, N., Mendes, F., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. Int. J. Food Microbiol. 103, 285–94.

Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. Food Control 22, 662–667.

Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. Res. Microbiol. 150, 199–204.

Mortimer, R.K., 2000. *Kloeckera apiculata* concentrations control the rates of natural fermentations [winemaking]. Riv. di Vitic. e di Enol. 53, 17-26.

Mozina, S.S., Čadež, N., Raspor, P., 1998. rDNA RFLPs and AP-PCR fingerprinting of type strains and grape-must isolates of *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) yeasts. Food Technol. Biotechnol., 36, 37-43.

Mulero, J., Pardo, F., Zafrilla, P., 2010. Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. J. Food Compos. Anal. 23, 569–574.

Munkvold, G.P., 1993. Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of Eutypa Dieback. Phytopathology 83, 624-629.

Muñoz, R., Gómez, A., Robles, V., Rodríguez, P., Cebollero, E., Tabera, L., Carrascosa, A. V, Gonzalez, R., 2009. Multilocus sequence typing of oenological *Saccharomyces cerevisiae* strains. Food Microbiol. 26, 841–846.

Murat, M.-L., Masneuf, I., Darriet, P., Lavigne, V., Tominaga, T., Dubourdieu, D., 2001. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wine. Am. J. Enol. Vitic. 52, 136–139.

Musetti, R., Vecchione, A., Stringher, L., Borselli, S., Zulini, L., Marzani, C., Ambrosio, M.D., Toppi, L.S., Pertot, I., Applicata, B., Udine, U., D'Ambrosio, M., di Toppi, L.S., Pertot, I., 2006. Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. Phytopathology 96, 689–698.

Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Curr. Opin. Microbiol. 2, 317–322.

Myers, R., Fischer, S., Lerman, L., Maniatis, T., 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res. 13, 3131–3145.

Nagaoka, T., Ogihara, Y., 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. TAG Theor. Appl. Genet. 94, 597–602.

Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature 351, 81–82.

Naumov, G.I., Tokareva, N.G., Naumova, E.S., Bab, I.P., 2000. Discrimination between the soil yeast species *Williopsis saturnus* and *Williopsis suaveolens* by the polymerase chain reaction with the universal primer N21. Microbiology 69, 229–233.

Ness, F., Lavallée, F., 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. J. Sci. Food Agric. 62, 89-94.

Nguyen, N.H., Suh S.-O., Erbil, C.K., Blackwell, M., 2006. *Metschnikowia noctiluminum* sp. nov., *Metschnikowia corniflorae* sp. nov., and *Candida chrysomelidarum* sp. nov., isolated from green lacewings and beetles. Mycol Res 110, 346–356.

Nisiotou, A.A., Nychas, G.-J.E., 2007. Yeast populations residing on healthy or *botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2765–2768.

Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.-J.E., 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and *botrytis*-affected grape must fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6705–6713.

Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. Yeast 20, 331–341.

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K., 2007. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5111–5117.

Nocker, A., Richter-Heitmann, T., Montijn, R., Schuren, F., Kort, R., 2010. Discrimination between live and dead cells in bacterial communities from environmental water samples analyzed by 454 pyrosequencing. Int. Microbiol. 13, 59–65.

Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., López, R., Santamaría, P., 2010. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. Food Microbiol. 27, 1023–1027.

Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., Sanz, S., 2011. Factors of influence in the distribution of mold in the air in a wine cellar. J. Food Sci. 76, 169–174.

Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A. R., 2013a. Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination. Food Control 34, 261–267.

Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2013b. Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. Food Control 30, 585–589.

Odds, F.C., 1991. Quantitative microculture system with standardized inocula for strain typing, susceptibility testing, and other physiologic measurements with *Candida albicans* and other yeasts. J. Clin. Microbiol. 29, 2735–2740.

Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., du Toit, M., 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. Food Microbiol. 26, 377–385.

Oelofse, A., Malherbe, S., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2010. Preliminary evaluation of infrared spectroscopy for the differentiation of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines. Int. J. Food Microbiol. 143, 136–142.

Olstorpe, M., Lyberg, K., Lindberg, J.E., Schnürer, J., Passoth, V., 2008. Population diversity of yeasts and lactic acid bacteria in pig feed fermented with whey, wet wheat distillers' grains, or water at different temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1696–1703.

Oro, L., Ciani, M., Comitini, F., 2014. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 116, 1209–1217.

Owuama, C.I., Saunders, J.R., 1990. Physiological variants of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* from palm wine and cashew juice. J. Appl. Bacteriol. 68, 491–494.

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M.O., Yousaf, S., Pertot, I., Campisano, A., 2012. Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera L.*) Respond to crop management. Appl. Environ. Microbiol. 78, 4308–4317.

Pardo, I., García, M.J., Zúñiga, M., Uruburu, F., 1989. Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. Appl. Environ. Microbiol. 55, 539–541.

Parish, M., Carroll, D., 1985. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. Am. J. Enol. Vitic. 36, 165–169.

Pathania, N., Kanwar, S.S., Jhang, T., Koundal, K.R., Sharma, T.R., 2010. Application of different molecular techniques for deciphering genetic diversity among yeast isolates of traditional fermented food products of Western Himalayas. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 1539–1547.

Pearson, K., 1895. Contributions to the mathematical theory of evolution. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 186, 343–414.

Pedersen, M.B., 1986a. DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces* III. Restriction endonuclease fragment patterns of chromosomal regions in brewing and other yeast strains. Carlsberg Res. Commun. 51, 163–183.

Pedersen, M.B., 1986b. DNA sequence polymorphisms in the genus Saccharomyces IV. Homoeologous chromosomes III of *Saccharomyces bayanus, S. carlsbergensis,* and *S. uvarum.* Carlsberg Res. Commun. 51, 185–202.

Perazzolli, M., Antonielli, L., Storari, M., Puopolo, G., Pancher, M., Giovannini, O., Pindo, M., Pertot, I., 2014. Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. Appl. Environ. Microbiol. 80, 3585–3596.

Pereira De Bem, B., Bogo, A., Everhart, S., Casa, R.T., Gonçalves, M.J., Filho, J.L.M., Da Cunha, I.C., 2015. Effect of Y-trellis and vertical shoot positioning training systems on downy mildew and *botrytis* bunch rot of grape in highlands of southern Brazil. Sci. Hortic. (Amsterdam). 185, 162–166.

Pérez, M. A., Gallego, F.J., Hidalgo, P., 2001. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. FEMS Microbiol. Lett. 205, 375–378.

Pérez-Martín, F., Seseña, S., Fernández-González, M., Arévalo, M., Palop, M.L., 2014. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. Int. J. Food Microbiol. 190, 44–53.

Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Food Microbiol. 108, 336–345.

Perry-O'Keefe, H., Stender, H., Broomer, A., Oliveira, K., Coull, J., 2001. Filter-based PNA in situ hybridization for rapid detection, identification and enumeration of specific micro-organisms. J. Appl. Microbiol. 90, 180–189.

Pertot, I., Gobbin, D., De Luca, F., Prodorutti, D., 2008. Methods of assessing the incidence of *Armillaria* root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy. Crop Prot. 27, 1061–1070.

Peterson, S.W., Kurtzman, C.P., 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. Syst. Appl. Microbiol. 14, 124–129.

Phillips, A.J.L., 2000. Excoriose, cane blight and related diseases of grapevines: A taxonomic review of the pathogens. Phytopathol. Mediterr. 39, 341–356.

Phister, T.G., Mills, D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. Appl Env. Microbiol 69, 7430–7434.

Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2014. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. PLoS One 9: e85622.

Polz, M.F., Cavanaugh, C.M., 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3724–3730.

Porebski, S., Bailey, L.G., Baum, B.R., 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Mol. Biol. Report. 15, 8–15.

Poulard, A., Simon, L., Cuinier, C., 1981. Caractères de la microflore levurienne du vignoble nantais [France]. Influence de quelques facteurs sur sa composition [facteurs technologiques, facteurs naturels]. Vignes Vins 300, 14–18.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Res. 4, 865–877.

Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16, 675–729.

Pucheu-Planté, B., Seguin, G., 1981. Influence des facteurs naturels sur la maturation et la surmaturation du raisin dans le Sauternais, en 1978 et 1979. Conn. Vigne Vin 15, 143-160.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41, 590–596.

Querol, A., Jiménez, M., Huerta, T., 1990. Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape- harvests in the region of Alicante (Spain). J. Food Sci. 55, 1603–1606.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D., 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2948–2953.

Rantsiou, K., Dolci, P., Giacosa, S., Torchio, F., Tofalo, R., Torriani, S., Suzzi, G., Rolle, L., Cocolin, L. 2002. *Candida zemplinina* can reduce acetic acid produced by *Saccharomyces cerevisiae* in sweet wine fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 78, 1987–1994.

Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Giovannoni, S.J., 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. Nature 418, 630–633.

Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S., Cadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. Int. J. Food Microbiol. 109, 97–102.

Rebuffo-Scheer, C.A., Kirschner, C., Staemmler, M., Naumann, D., 2007. Rapid species and strain differentiation of non-tubercoulous mycobacteria by Fourier-Transform Infrared microspectroscopy. J. Microbiol. Methods 68, 282–290.

Rementeria, A., 2003. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). Int. J. Food Microbiol. 86, 201–207.

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 134, 201–210.

Renault, P.E., Albertin, W., Bely, M., 2013. An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 4105–19.

Renouf, V., 2006. Description et caracterisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres - Relation avec la qualité du vin. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 149–64.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2004. Traité d'œnologie, Tome 1, Dunod, Paris, 5th Edition, p.704

Röder, C., König, H., Fröhlich, J., 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. FEMS Yeast Res. 7, 1013–1026.

Rodríguez, M.E., Lopes, C.A., Barbagelata, R.J., Barda, N.B., Caballero, A.C., 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. Int. J. Food Microbiol. 138, 19–25.

Rojas, V., Gil, J. V, Piñaga, F., Manzanares, P., 2001. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. Int. J. Food Microbiol. 70, 283–289.

Rojas, V., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. Int. J. Food Microbiol. 86, 181–188.

Romano, P., Suzzi, G., 1993. Sulphur dioxide and wine microorganisms, in: Fleet, G.H. (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. CRC Press, pp. 373-394.

Romano, A., Casaregola, S., Torre, P., Gaillardin, C., 1996. Use of RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. Syst. Appl. Microbiol. 19, 255–264.

Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., Maifreni, M., 1997. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 82, 615–618.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. Int. J. Food Microbiol. 86, 169–180.

Romano, P., Capece, A., Jespersen, L., 2006. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In A. Querol, & G. Fleet (Eds.) Yeasts in Food and Beverages, 13–53.

Rooney, S., Eskalen, A., Gubler, W.D., 2001. Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. Phytopathol. Mediterr. 40, 351–356.

Rosini, G., Federici, F., Martini, A., 1982. Yeast flora of grape berries during ripening. Microb. Ecol. 8, 83-89

Rothberg, J.M., Leamon, J.H., 2008. The development and impact of 454 sequencing. Nat. Biotechnol. 26, 1117–1124.

Roullier-Gall, C., Boutegrabet, L., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., 2014. A grape and wine chemodiversity comparison of different appellations in Burgundy: Vintage vs terroir effects. Food Chem. 152, 100–107.

Rousseaux, S., Diguta, C.F., Radoï-Matei, F., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., 2014. Non-*Botrytis* grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. Food Microbiol. 38, 104–121.

Rouzet, J., Jacquin, D., 2003. Development of overwintering oospores of *Plasmopara viticola* and severity of primary foci in relation to climate. EPPO Bull. 33, 437–442.

Sabate, J., Cano, J., Querol, a., Guillamón, J.M., 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: Analysis for two consecutive years. Lett. Appl. Microbiol. 26, 452–455.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. Microbiol. Res. 157, 267–274.

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. Food Microbiol. 32, 243–253.

Sadoudi, M., 2014. Intérêt biotechnologique des levures indigènes non- *Saccharomyce*s. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

Sage, L., Krivobok, S., Delbos, É., Seigle-Murandi, F., Creppy, E.E., 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. J. Agric. Food Chem. 50, 1306–1311.

Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, P.H., 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. Environ. Microbiol. 4, 654–666.

Saitou, N., Masatoshi, N., 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.

Sall, M.A., 1980. Epidemiology of Grape Powdery Mildew: A Model. Ecol. Epidemology 70, 338-342.

Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., Alexandre, H., 2013. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae.* PLoS One 8: e77600.

Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., Guillamón, J.M., 2011. Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol. 28, 1155–1161.

Sancho, T., Giménez-Jurado, G., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2000. Zymological indicators: a new concept applied to the detection of potential spoilage yeast species associated with fruit pulps and concentrates. Food Microbiol. 17, 613–624.

Sandt, C., Sockalingum, G.D., Aubert, D., Lepan, H., Lepouse, C., Jaussaud, M., Leon, A., Pinon, J.M., Manfait, M., Toubas, D., 2003. Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. J. Clin. Microbiol. 41, 954–959.

Sandt, C., Madoulet, C., Kohler, A., Allouch, P., de Champs, C., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2006. FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. J. Appl. Microbiol. 101, 785–797.

Sangorrín, M.P., Lopes, C.A., Belloch, C., Querol, A., Caballero, A.C., 2007. *Candida patagonica* sp. nov., a new species of yeast from cellar surfaces. Antonie Van Leeuwenhoek 92, 77–81.

Sannino, C., Francesca, N., Corona, O., Settanni, L., Cruciata, M., Moschetti, G., 2013. Effect of the natural winemaking process applied at industrial level on the microbiological and chemical characteristics of wine. J. Biosci. Bioeng. 116, 347-356.

Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., Rosa Gutiérrez, A., 2005. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. Int. J. Food Microbiol. 103, 49–56.

Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., Marquina, D., 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. Microbiology 155, 624–634.

Sawaya, A.C.F.H., Catharino, R.R., Facco, E.M.P., Fogaça, A., Godoy, H.T., Daudt, C.E., Eberlin, M.N., 2011. Monitoring of wine aging process by electrospray ionization mass spectrometry. Ciência Tecnol. Alime. 31, 730–734.

Schena, L., Ippolito, A., Zahavi, T., Cohen, L., Nigro, F., Droby, S., 1999. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. Postharvest Biol. Technol. 17, 189–199.

Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., Ippolito, A., 2003. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biol. Tech. 30, 209–220.

Schmalreck, A.F., Tränkle, P., Vanca, E., Blaschke-Hellmessen, R., 1998. Differentiation and characterization of yeasts pathogenic for humans (*Candida albicans*, *Exophiala dermatitidis*) and algae pathogenic for animals (*Prototheca spp.*) using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in comparison with conventional method. Mycoses. 41, Suppl 1, 71–77.

Schmid, F., Moser, G., Müller, H., Berg, G., 2011. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. Appl. Environ. Microbiol. 77, 2188–2191.

Schuller, D., Pereira, L., Alves, H., Cambon, B., Dequin, S., Casal, M., 2007. Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. Yeast 24, 625–636.

Schütz, M., Gafner, J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. J. Appl. Bacteriol. 75, 551–558.

Schwieger, F., Tebbe, C., 1998. A new approach to utilize PCR-single strand-conformation-polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 4870–4876.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. Genome Biol. 12, R60.

Serpaggi, V., Remize, F., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2010. Specific identification and quantification of the spoilage microorganism brettanomyces in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. Cytom. Part A 77, 497–499.

Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. Food Microbiol. 30, 438–447.

Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U.-C., Bauer, F., 2012. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. PLoS One 7: e52609.

Shapaval, V., Schmitt, J., Møretrø, T., Suso, H.P., Skaar, I., Asli, A.W., Lillehaug, D., Kohler, A., Wold Åsli, A., 2012. Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. J. Appl. Microbiol. 114, 788–796.

Sharma, M., Gupta, S.K., Sharma, T.R., 2005. Characterization of variability in *Rhizoctonia solani* by using morphological and molecular markers. J. Phytopath. 153, 449–456.

Sharples, G.J., Lloyd, R.G., Sharpies, G.J., Lloyd, R.G., 1990. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. Nucleic Acids Res. 18, 6503–6508.

Simon, U.K., Weiss, M., 2008. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. Mol. Biol. Evol. 25, 2251–2254.

Sipiczki, M., 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 2079–2083.

Sipiczki, M., 2004. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. J. Basic Microbiol. 44, 471–479.

Sipiczki, M., 2006. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6716–6724.

Sláviková, E., Vadkertiová, R., 2003. Effects of pesticides on yeasts isolated from agricultural soil. Z. Naturforsch. C. 58, 855–859.

Smirnou, D., Hrubošová, D., Kulhánek, J., Švík, K., Bobková, L., Moravcová, V., Krčmář, M., Franke, L., Velebný, V., 2014. *Cryptococcus laurentii* extracellular biopolymer production for application in wound management. Appl. Biochem. Biotechnol. 174, 1344-1353.

Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., Henschke, P.A., 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Aust. J. Grape Wine Res. 6, 21–30.

Solieri, L., Landi, S., De Vero, L., Giudici, P., 2006. Molecular assessment of indigenous yeast population from traditional balsamic vinegar. J. Appl. Microbiol. 101, 63–71.

Sow, D., Fall, B., Ndiaye, M., Ba, B.S., Sylla, K., Tine, R., Lô, A.C., Abiola, A., Wade, B., Dieng, T., Dieng, Y., Ndiaye, J.L., Hennequin, C., Gaye, O., Faye, B., 2015. Usefulness of MALDI-TOF mass spectrometry for routine identification of *Candida* species in a resource-poor setting. Mycopathologia 180, 173-179.

Spear, R.N., Li, S., Nordheim, E. V., Andrews, J.H., 1999. Quantitative imaging and statistical analysis of fluorescence in situ hybridization (FISH) of *Aureobasidium pullulans*. J. Microbiol. Meth. 35, 101–110.

Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annu. Rev. Microbiol. 39, 321–346.

Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J., Calabretta, A., Di Paola, M., De Fillipo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D., 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 109,13398-13403.

Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-nielsen, J.J., Sorensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J., Sørensen, D., Keefe, H.P., 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. Appl. Environ. Microbiol. 67, 938–941.

Sternad Lemut, M., Sivilotti, P., Butinar, L., Vrhovšek, U., 2011. Controlling microbial infection by managing grapevine canopy. Proc. 46th Croat. 6th Int. Symp. Agric. 1, 984–987.

Sternad Lemut, M., Sivilotti, P., Butinar, L., Laganis, J., Vrhovsek, U., 2015. Pre-flowering leaf removal alters grape microbial population and offers good potential for a more sustainable and cost-effective management of a Pinot Noir vineyard. Aust. J. Grape Wine Res. 21, 439-450.

Stevenson, B.S., Eichorst, S.A., Wertz, J.T., Schmidt, T.M., Breznak, J. A., 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4748–4755.

Stevenson, L.G., Drake, S.K., Shea, Y.R., Zelazny, A.M., Murray, P.R., 2010. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for identification of clinically important yeast species. J. Clin. Microbiol. 48, 3482–3486.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., Rensburg, P. Van, 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 91, 182–190.

Sturm, J., Grossmann, M., Schnell, S., 2006. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. J. Appl. Microbiol. 101, 1241–1248.

Subden, R.E., Husnik, J.I., van Twest, R., van der Merwe, G., van Vuuren, H.J.J., 2003. Autochthonous microbial population in a Niagara Peninsula icewine must. Food Res. Int. 36, 747–751.

Suh, S.-O., Gibson, C.M., Blackwell, M., 2004. *Metschnikowia chrysoperlae* sp. nov., *Candida picachoensis* sp. nov. and *Candida pimensis* sp. nov., isolated from the green lacewings *Chrysoperla comanche* and *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 1883–1890.

Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62, 625–630.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Aust. J. Grape Wine Res. 11, 139–173.

Taillandier, P., Lai, Q.P., Julien-Ortiz, A., Brandam, C., 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. World J. Microbiol. Biotechnol. 30, 1959–1967.

Takahashi, M., Ohta, T., Masaki, K., Mizuno, A., Goto-Yamamoto, N., 2014. Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free wine by culture-dependent and -independent methods. J. Biosci. Bioeng. 117, 569–575.

Tavanti, A., Davidson, A.D., Elizabeth, M., Maiden, M.C.J., Shaw, D.J., Neil, A.R., Odds, F.C., Johnson, E.M., Gow, N.A.R., 2005. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. J. Clin. Microbiol. 43, 5593–5600.

Taylor, J.W., Fisher, M.C., 2003. Fungal multilocus sequence typing - It's not just for bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 6, 351–356.

Taylor, M.W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H.A., Goddard, M.R., 2014. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. Environ. Microbiol. 16, 2848–2858.

Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J.M., Arroyo, T., 2012. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 112, 302–315.

Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelièvre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., Plassart, P., Wincker, P., Jolivet, C., Bispo, A., Lemanceau, P., Maron, P.-A., Mougel, C., Ranjard, L., 2012. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. Microb. Biotechnol. 5, 135–41.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25, 4876–4882.

Thornhill, D.J., Lajeunesse, T.C., Santos, S.R., 2007. Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. Mol. Ecol. 16, 5326–5340.

Timmins, E.M., Howell, S.A., Alsberg, B.K., Noble, W.C., Goodacre, R., 1998a. Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. J. Clin. Microbiol. 36, 367–374.

Timmins, E.M., Quain, D.E., Goodacre, R., 1998b. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. Yeast 14, 885–893.

Tindall, B.J., Brambilla, E., Steffen, M., Neumann, R., Pukall, R., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., 2000. Cultivatable microbial biodiversity: gnawing at the Gordian knot. Environ. Microbiol. 2, 310–318.

Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G.E., Torriani, S., Paparella, A., Suzzi, G., 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. Int. J. Food Microbiol. 130, 179–187.

Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., Suzzi, G., 2012. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. Food Microbiol. 29, 18–26.

Tohoyama, H., Inouhe, M., Joho, M., Murayama, T., 1995. Production of metallothionein in copper- and cadmium-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ind. Microbiol. 14, 126–131.

Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D., 2000. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. Am. J. Enol. Vitic. 51, 178–181.

Torriani, S., Zapparoli, G., Malacrinò, P., Suzzi, G., Dellaglio, F., 2004. Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. Lett. Appl. Microbiol. 38, 239–244.

Toubas, D., Essendoubi, M., Adt, I., Pinon, J.-M., Manfait, M., Sockalingum, G.D., 2007. FTIR spectroscopy in medical mycology: applications to the differentiation and typing of *Candida*. Anal. Bioanal. Chem. 387, 1729–1737.

Tziotis, D., Hertkorn, N., Schmitt-Kopplin, P., 2011. Kendrick-analogous network visualisation of ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectra: improved options for the assignment of elemental compositions and the classification of organic molecular complexity. Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng). 17, 415–421.

Udelhoven, T., Naumann, D., Schmitt, J., 2000. Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. Appl. Spectrosc. 54, 1471–1479.

Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., Cocolin, L., 2008. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. FEMS Yeast Res. 8, 1053–1062.

Usbeck, J.C., Wilde, C., Bertrand, D., Behr, J., Vogel, R.F., 2014. Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 3737–3752.

Vadkertiová, R., Sláviková, E., 2006. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. J. Basic Microbiol. 46, 145–152.

Valente, P., Ramos, J.P., Leoncini, O., 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. Can. J. Microbiol. 45, 949–958.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M., Dequin, S., 2007. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. FEMS Yeast Res. 7, 317–329.

Valles, B.S., Bedriñana, R.P., Tascón, N.F., Simón, A.Q., Madrera, R.R., 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. Food Microbiol. 24, 25–31.

van Keulen, H., Lindmark, D.G., Zeman, K.E., Gerlosky, W., 2003. Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. Antonie van Leeuwenhoek 83, 149–154.

Vaughan-Martini, A., Rosini, G., Martini, A., 1988. Killer sensitivity patterns as a tool for the fingerprinting of strains within the yeast species *Kluyveromyces lactis* and *K. marxianus.* Biotechnol. Techniques 2, 293–296.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19, 6823–6831.

Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L., Hallet, J.N., 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3521–3529.

Vezinhet, F., Hallet, J., Valade, M., Poulard, A., 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. Am. J. Enol. Vitic. 43, 83–86.

Viana, F., Gil, J. V, Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P., 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiol. 25, 778–785.

Villagra, E., Santos, L.S., Vaz, B.G., Eberlin, M.N., Laurie, V.F., 2012. Varietal discrimination of Chilean wines by direct injection mass spectrometry analysis combined with multivariate statistics. Food Chem. 131, 692–697.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23, 4407–4414.

Vrček, I.V., Bojić, M., Žuntar, I., Mendaš, G., Medić-Šarić, M., 2011. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. Food Chem. 124, 354–361.

Wang, C., Liu, Y., 2013. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. Food Microbiol. 33, 172–177.

Watanabe, M., Tsutsumi, F., Lee, K.I., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S., Takatori, K., Hara-Kudo, Y., Konuma, H., 2010. Enumeration of fungi in fruits by the most probable number method. J. Food Sci. 75, 564–567.

Wenning, M., Seiler, H., Scherer, S., 2002. Fourier-Transform Infrared microspectroscopy , a novel and rapid tool for identification of yeasts. Appl. Environ. 68, 4717–4721.

Wenning, M., Scherer, S., 2013. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 7111–7120.

Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U., Scherer, S., 2014. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. J. Microbiol. Meth. 103, 44–52.

White T, Bruns T, Lee S Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Inns MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.

Wintzingerode, F. V., Göbel, U.B., Stackebrandt, E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: Pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiol. Rev. 21, 213–229.

Wu, Y., Stulp, R.P., Elfferich, P., Osinga, J., Buys, C.H., Hofstra, R.M., 1999. Improved mutation detection in GC-rich DNA fragments by combined DGGE and CDGE. Nucleic Acids Res. 27, e9: i-iii.

Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-martins, I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. Int. J. Food Microbiol. 108, 376–384.

Yanagida, F., Ichinose, F., Shinohara, T., Goto, S., 1992. Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at central Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 38, 501–504.

Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martínez-Cachá, A., Pardo, F., López Nicolás, J.M., 2003. Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 51, 4694–4700.

Zanol, G.C., Baleiras-Couto, M.M., Duarte, F.L., 2010. Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. Ciência Téc. Vitiv. 25, 75–85.

Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., Lodovica, M., 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. Biol. Control 54, 172–180.

Zhang, H., Richards, K.D., Wilson, S., Lee, S.A., Sheehan, H., Roncoroni, M., Gardner, R.C., 2015. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces uvarum* from New Zealand wineries. Food Microbiol. 46, 92–99.

Zironi, R., Romano, P., Suzzi, G., Battistutta, F., Comi, G., 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnol. Lett. 15, 235–238.

Zoecklein, B.W., Wolf, T.K., Riesling, M.W., Duncan, N.W., Words, K.E.Y., Judge, J.M., Cook, M.K., 1992. Effect of fruit zone leaf removal on yield, fruit composition, and fruit rot incidence of Chardonnay and white Riesling (*Vitis vinifera L.*) Grapes. Am. J. Enol. Vitic. 43, 139–148.

Zohre, D.E., Erten, H., 2002. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. Process Biochem. 38, 319–324.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. Int. J. Food Microbiol. 125, 197–203.

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 Microbiol. 27, 559–567.

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., Masneuf-Pomarede, I., 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. Int. J. Food Microbiol. 151, 210–215.

Annexes

Annexe 1a. Calendrier de traitement du millésime 2012 pour les trois modes de protection phytosanitaire.

Date	Stade de la végétation	O		C		E	
		Dose d'application par hectare	IFT	Dose d'application par hectare	IFT	Dose d'application par hectare	IFT
07/05/2012	5-7 feuilles	BB RSR 1,5 kg	0,1	Remiltine S pépite 3 kg	1		
16/05/2012	7-8 feuilles	BB RSR 1,5 kg Microthiol 6,25 kg	0,6	Sillage 4 kg Corail 0,14 L	1,4		
25/05/2012	9-10 feuilles	BB RSR 2 kg Microthiol 10 kg	1			Arco DTI 1,05 kg Vivando 0,14 L	1,4
30/05/2012	10-12 feuilles			Arco DTI 1,5 kg Vivando 0,2 L	2		
06/06/2012	Début floraison	BB RSR 2,5 kg Microthiol 10 kg	1				
08/06/2012	Pleine floraison					Mildicut 4,5 L Flint 0,125 kg	1
11/06/2012	Fin floraison			Mildicut 4,5 L Flint 0,125 kg	2		
13/06/2012		BB RSR 2,5 kg thiovit 10 kg	1				
22/06/2012	Grains de plomb					valiant flash 2,1 kg	0,7
25/06/2012	Baies 3-4 mm	BB RSR 2,5 kg Microthiol 10 kg	1	Valiant Flash 3 kg Greman 0,25 L	2		
04/07/2012	Début FG*	BB RSR 2 kg Microthiol 10 kg	1			Sarman F 2,1 L Prosper 0,42 L	1,4
09/07/2012				Sarman F 3 L Prosper 0,6 L	2		
16/07/2012	FG	BB RSR 2 kg Microthiol 10 kg	1			Champflo Ampli 1,1 L Karathane3D 0,42 L	1,3
20/07/2012	FG + 10 j			Champflo Ampli 1,4 L Karathane 3D 0,6 L	1,7		
27/07/2012	FG + 15 j					Aviso cup 1,75 kg Prosper 0,42 L	1,4
01/08/2012	Début véraison	BB RSR 2 kg Microthiol 10 kg	1	Champflo Ampli 1,4 L Prosper 0,6 L	1,7		
10/08/2012		BB RSR 2 kg Microthiol 10 kg	1	Champflo Ampli 1,4 L Microthiol 10 kg	1,5	Champflo Ampli 1,1 L	0,6
IFT total			**8,75**		**15,28**		**7,7**

* Fermeture de la grappe

Annexe 1b. Calendrier de traitement du millésime 2013 pour les trois modes de protection phytosanitaire.

Date	Stade de la végétation	O		C		E	
		Dose d'application par hectare	IFT	Dose d'application par hectare	IFT	Dose d'application par hectare	IFT
07/05/2013	3-4 feuilles	Kocide Opti 0,335 kg	0,13	Electis Pro 1 kg	0,5		
17/05/2013	5-6 feuilles	Kocide Opti 0,67 kg Microthiol 8 kg	0,9	Rémiltine pépite 3 kg Prosper 0,6 kg	2		
23/05/2013	6-7 feuilles	Kocide Opti 1 kg Microthiol 8 kg	1				
27/05/2013	7-8 feuilles			Sillage 4 kg Corail 0,4 L	2		
31/05/2013	7-8 feuilles					Prosper 0,42 L	0,7
03/06/2013	7-8 feuilles	Kocide Opti 1 kg Microthiol 8 kg	1				
10/06/2013	9-10 feuilles			Pergado MZ 2,5 kg Vivando 0,2 L	2		
13/06/2013	11-12 feuilles	BB RSR 1,5 kg Microthiol 8 kg	1				
19/06/2013	Début floraison					Corail 0,28 L Mildicut 3,15 L	1,4
21/06/2013		BB RSR 2,5 kg Microthiol 10 kg Pyrevert 1,5 L	2,5				
25/06/2013	Fin floraison			Enervin 2,5 kg Flint 0,125 kg Karaté Xpress 0,25 kg	3	Karaté Xpress 0,25 kg	1
27/06/2013		Pyrevert 1,5 L	1				
02/07/2013	Nouaison	BB RSR 2,5 kg Microthiol 10 kg Pyrevert 1,5 L	2,4				
03/07/2013	Nouaison					Enervin 1,75 kg Collis 0,28 L	1,4
08/07/2013	Baies 2-3 mm			Sarmant F 3 L Corail 0,4 L Reldan 1,5 L	3	Reldan 1,5 L	1
12/07/2013	Grains de plomb	Kocide Opti 1,33 kg Microthiol 10 kg	1,3				
17/07/2013	Petits pois					Sarmant F 2,1 L	0,7
22/07/2013	Début FG	Kocide Opti 1,33 kg Microthiol 10 kg	1,3	Sillage 4 kg Vivando 0,2 L	2		
31/07/2013	FG	Kocide Opti 1,33 kg Microthiol 8 kg	1,2			Karaté Xpress 0,25 kg Champflo 1,1 L Corail 0,28 L	2,3
02/08/2013	FG + 2 j			Champflo 1,4 L Karathane 0,6 L Karaté Xpress 0,25 kg	2,7		
08/08/2013	FG + 8 j	Kocide Opti 1,33 kg	0,5				
21/08/2013	Début véraison	Kocide Opti 1,33 kg	0,5	Champflo 1,4 L	0,7	Champflo 1,1 L	0,6
IFT total			**14,91**		**17,9**		**9**

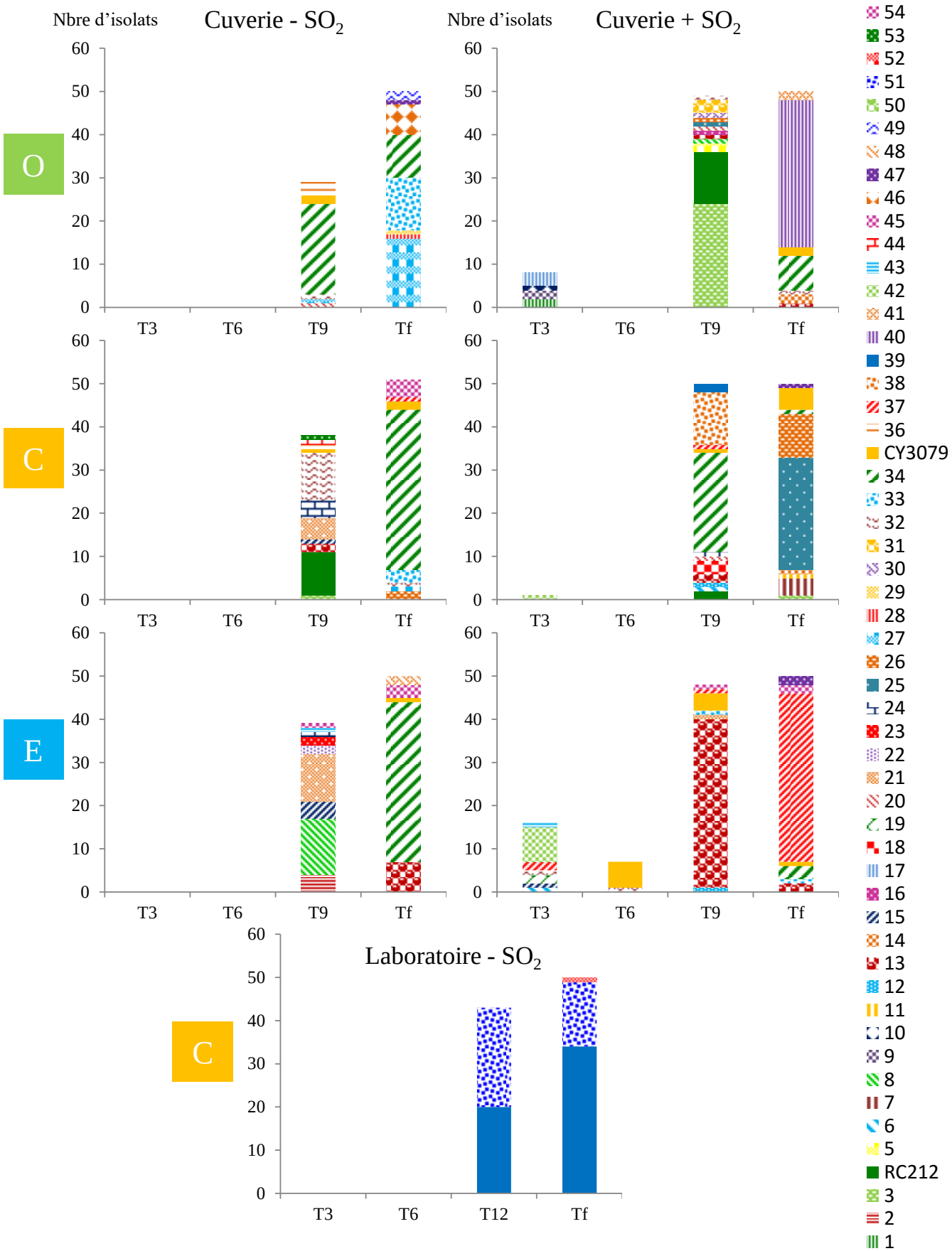
Annexe 1c. Calendrier de traitement du millésime 2014 pour les trois modes de protection phytosanitaire.

Date	Stade de la végétation	O		C		E	
		Dose d'application par hectare	IFT	Dose d'application par hectare	IFT	Dose d'application par hectare	IFT
06/05/2014	7-8 feuilles	BB RSR 1 kg Microthiol SPD 5 kg	0,7	Electis Pro 1 kg Microthiol SPD 5 kg	0,9		
14/05/2014	9-10 feuilles					Prosper 0,42 L	0,7
15/05/2014	9-10 feuilles	BB RSR 1,5 kg Microthiol 8 kg	1	Forum top 2,5 kg Corail 0,4 L	2		
23/05/2014		BB RSR 1,5 kg Microthiol 8 kg Pyrevert 1,55 L	2				
27/05/2014				Enervin 2,5 kg Collis 0,4 L Reldan 1,5 L	3	Enervin 1,75 kg Collis 0,28 L Reldan 1,5 L	2,4
02/06/2014		BB RSR 1,5 kg Microthiol 8 kg Pyrevert 1,55 L	2				
11/06/2014	Grains de plomb	BB RSR 1,5 kg Microthiol SPD 10 kg	1,2	Profiler 3 kg Vivando 0,2 L Magéos 0,07 kg	3	Magéos 0,07 kg	1
20/06/2014		Microthiol SPD 10 kg	0,8				
25/06/2014	Début nouaison			Luna sensation 0,15 L	1		
27/06/2014		BB RSR 2 kg Microthiol 8 kg Héliosol 0,2 %	2,2				
04/07/2014	Baies 2-3 mm			Amaline Flow 2 L Coragen 0,125 L	1,7	Coragen 0,125 L	1
08/07/2014	FG	BB RSR 2 kg Microthiol 8 kg Héliosol 0,2 %	2,2				
18/07/2014	FG + 10 j	BB RSR 1,5 kg Microthiol SPD 6 kg Héliosol 0,2 %	1,9	Champflo Ampli 1,5 L Prosper 0,6 L	1,8		
05/08/2014	Début véraison	BB RSR 2 kg	0,5	BB RSR 3 kg	0,8	BB RSR 3 kg	0,8
IFT total			**14,5**		**14,1**		**5,9**

Annexe 1d. Composition des différentes spécialités commerciales utilisées.

Spécialité commerciale	Composition (concentration des différentes matières actives)
Amaline	266,6 g/L de sulfate de cuivre tribasique et 40 g/Lde zoxamide
Arco DTI	350 g/kg de dithianon et 150 g/kg de diméthomorphe
Aviso cup	241 g/kg d'oxychlorure de cuivre, 184 g/kg de métirame et 48 g/kg de cymoxanil
BB RSR	200 g/kg d'hydroxyde de cuivre
Champflo	360 g/L d'oxyde de cuivre
Collis	200 g/L de boscalid et 100 g/L de krésoxim-méthyl
Coragen	200 g/L de chlorantraniliprole
Corail	250 g/L de tébuconazole
Electis pro	689 g/kg de mancozèbe et 61,5 g/kg de zoxamide
Enervin	440 g/kg de métirame et 120 g/kg d'amétoctradine
Flint	500 g/kg de trifloxystrobine
Forum top	440 g/kg de métirame et 90 g/kg de diméthomorphe
Greman	100 g/L de tétraconazole
Heliosol	665 g/L d' alcools terpéniques (utilisé comme adjuvant)
Karaté Xpress	50 g/kg de lambda-cyhalothrine
Karathane	350 g/L de meptyldinocap
Kocide	300 g/kg d'hydroxyde de cuivre
Luna	250 g/L de fluopyram et 250 g/L de trifloxystrobine
Mageos	150 g/kg d'alpha-cyperméthrine
Microthiol	810 g/kg de soufre
Mildicut	250 g/L de disodium phosphonate et 25 g/L de cyazofamide
Pergado MZ	600 g/kg de mancozèbe et 50 g/kg de mandipropamide
Profiler	666,7 g/kg de fosétyl aluminium et 44,4 g/kg de fluopicolide
Prosper	500 g/kg de spiroxamine
Pyrevert	18,61 g/L de pyréthrines
Reldan	225 g/L de chlorpyriphos-méthyl
Rémiltine pépite	133 g/kg de mancozèbe, 240 g/kg d'oxychlorure de cuivre, 60 g/kg de sulfate de cuivre et 40 g/kg de cymoxanil
Sarmant F	334 g/L de folpel et 40 g/l de cymoxanil
Sillage	471 g/kg de fosétyl aluminium et 289 g/kg de métirane
Thiovit	800 g/kg de soufre
Valiant flash	500 g/kg de fosétyl aluminium, 250 g/kg de folpel et 40 g/kg de cymoxanil
Vivando	423,7 g/L de métrafenone

Suivi des souches de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la fermentation alcoolique pour le millésime 2012.



La protection phytosanitaire, une affaire de goût ?

Introduction

Au cours de ces dernières années, les consommateurs apparaissent de plus en plus préoccupés par les effets des pratiques de production agricole à la fois sur la santé humaine et sur l'environnement. Ainsi, dans les pays développés, la production obtenue à partir de méthodes de l'agriculture biologique, dont la production de raisins de cuve, connait une rapide croissance. Paradoxalement, très peu d'études scientifiques ont comparé les propriétés sensorielles de vins issus de raisins biologiques et de raisins traités en conventionnel. Moyano et al. (2009) a examiné le profil aromatique de vins de Xérès qui avaient été cultivés conventionnellement et organiquement et a constaté que les vins biologiques avaient un profil sensoriel similaire à ceux des conventionnels, mais avec une odeur plus faible en intensité. Les mêmes résultats ont été rapportés par Dupin et al. (2000), qui ont réalisé des analyses sensorielles sur des vins blancs allemands (Riesling, Silvaner et Pinot blanc) biologiques et conventionnels. Ces auteurs ont montrés que des arômes décrits comme « herbacé » et « haricot verts » était significativement moins développés pour les vins produits avec le raisin issu de l'agriculture biologique. Pour ces auteurs, les vins conventionnels ont tendance à être plus aromatiques avec des profils similaires mais des intensités plus élevées. Pagliarini et al. (2013) rapportent que les différences sensorielles entre des vins rouges italiens (Sangiovese) biologiques et conventionnels sont liées principalement au goût des sensations acides et amères et à la sensation astringente ; les odeurs joueraient un rôle mineur. Pour toutes ces études, les vins comparés sont issus de la même zone de production.

Il nous a donc semblé intéressant de comparer l'effet de 3 modes de protection phytosanitaire (Biologique, Conventionnel et Ecophyto correspondant à une réduction de dose par rapport au mode Conventionnel) sur les propriétés organoleptiques de vins blancs élaborés à partir du cépage Chardonnay. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude compare les profils sensoriels pour des vins produits à partir de raisins récoltés sur une même parcelle où trois modes de protection ont été appliqués.

Matériel et méthodes

Dans cette étude, la totalité du raisin ayant servi pour la production de vin provient d'une parcelle plantée en 1986, située en Bourgogne à Davayé en Saône-et-Loire (46°18'32.2"N, 4°44'17.9"E, 258 m d'altitude). Le cépage est le Chardonnay (clone 76) greffé sur Fercal. La

parcelle est constituée 3 blocs de 8 rangs chacun. Sur le premier bloc, le mode de protection appliqué correspond aux pratiques locales en matière de protection phytosanitaire basée sur la récolte de données à partir d'un réseau de domaines viticoles. On le note C pour conventionnel. Sur le second bloc, il s'agit d'un mode de protection biologique appliqué selon le cahier des charges de la viticulture biologique ; il est noté O. Sur le troisième bloc, il s'agit d'un mode de protection dit Ecophyto correspondant à une diminution des intrants de 30% par rapport au mode conventionnel, il est noté E. La récolte sur les rangs 3 et 5 de chaque bloc de manière à être le plus représentatif de la protection phytosanitaire employée et éviter les effets des rangs de bordure.

La récolte est ensuite pressée (pressoir pneumatique) et le moût laissé une nuit à 10°C pour clarification. Le moût clarifié est ensuite séparé en quatre cuves pour chaque modalité (Biologique : O1, O2, O3, O4 ; Conventionnel : C1, C2, C3, C4 et Ecophyto : E1, E2, E3, E4). 30 mg/L de dioxyde de soufre sont ensuite ajoutés dans 2 des quatre cuves de chaque modalité (O3, O4 ; C3, C4 et E3, E4).

L'analyse sensorielle a été réalisée dans la salle de dégustation de l'IUVV avec les étudiants de 2ème année du diplôme national d'œnologue. Elle se déroule en plusieurs étapes : i) un tri libre (avec 22 dégustateurs), ii) un entrainement et une sélection des dégustateurs et iii) la réalisation des profils sensoriels (avec 12 dégustateurs sélectionnés). Pour l'étape du tri libre, les 12 vins ont été présentés à chaque dégustateur. Ceux-ci devaient tout d'abord les regrouper selon leurs ressemblances et leurs différences, puis ensuite qualifier par quelques mots le ou les groupes de vins ainsi formés. L'ordre de présentation des vins aux différents dégustateurs a été défini selon un carré latin. Le but est ainsi de déterminer quels sont les vins proches ou distincts d'un point de vue sensoriel. De plus, l'association du vocabulaire aux groupes formés permettra par la suite d'avoir des descripteurs pertinents pour la réalisation des profils sensoriels de chaque vin. Le vocabulaire explicatif des groupes formés a été traité par l'analyse factorielle des correspondances (AFC) à partir d'une matrice de fréquence de citation. Parmi les 22 panelistes ayant participé au tri libre, 12 ont été sélectionnés pour la réalisation des profils sensoriels. La sélection est effectuée selon la concordance des résultats du paneliste par rapport à la moyenne de tous les panélistes sur l'épreuve de tri libre et selon les résultats obtenus sur une épreuve de sélection olfactive et gustative dont les paramètres sont rassemblés dans le tableau 1. Les profils sensoriels ont été réalisés sur les 12 vins présentés dans un ordre défini par un carré latin. Les 12 dégustateurs sélectionnés devaient noter les vins sur 14 descripteurs (Floral, Fruits Blancs, Exotique, Agrume, Beurré/lacté, Noix/curry, Pomme, Oxydation, Réduction, Acidité, Gras,

Sucrosité, Perlant, Equilibre) et leur donner une note globale sur une échelle de 0 à 9. Les résultats des profils ont été analysés par une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs sans répétition pour connaitre les descripteurs significativement différents au seuil de 5%.

Tableau 6. Liste des arômes et sensations gustatives testées

	Nom	**% de la note globale**
ARÔME *Trouver le nom de l'arôme présenté, ou au moins sa famille.*	Pomme	60 %
	Poire	
	Pamplemousse rose	
	Noix	
	Curry	
	Pêche - abricot	
	Citron	
	Beurre	
SENSATION GUSTATIVE *Classer dans l'ordre d'intensité croissante les goûts présentés.*	Sucré : 0 ; 3 ; 6 (g/L)	20 %
	Acide : 0,5 ; 1 ; 1,5 (g/L)	20 %

Figure 18. Fiche distribuée aux dégustateurs pour la réalisation des profils sensoriels.

Bonjour,

Vous avez devant vous une série de **12 vins blancs** servis en verres noirs, afin d'éviter toutes influences éventuelles dues au visuel.

Dégustez les vins, nez et bouche, dans **l'ordre de présentation** (de gauche à droite) une première fois, puis vous pouvez y revenir autant de fois que vous le désirez.

La description des vins se fait sur **14 descripteurs** et une note globale.

Veuillez noter pour chaque vin (pages suivantes), sur une échelle de 0 à 9, l'intensité que vous ressentez pour chaque descripteur : 0 représente l'absence de sensations et 9 correspond à la sensation maximale.

Vous avez à disposition de l'eau pour vous rincer la bouche quand vous l'estimez nécessaire.

N° vin :

AU NEZ

Absence	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	*Très intense*
Floral	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Fruits blancs	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Exotique	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Agrume	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Beurré/Lacté	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Noix/Curry	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Pomme	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Oxydation	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Réduction	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

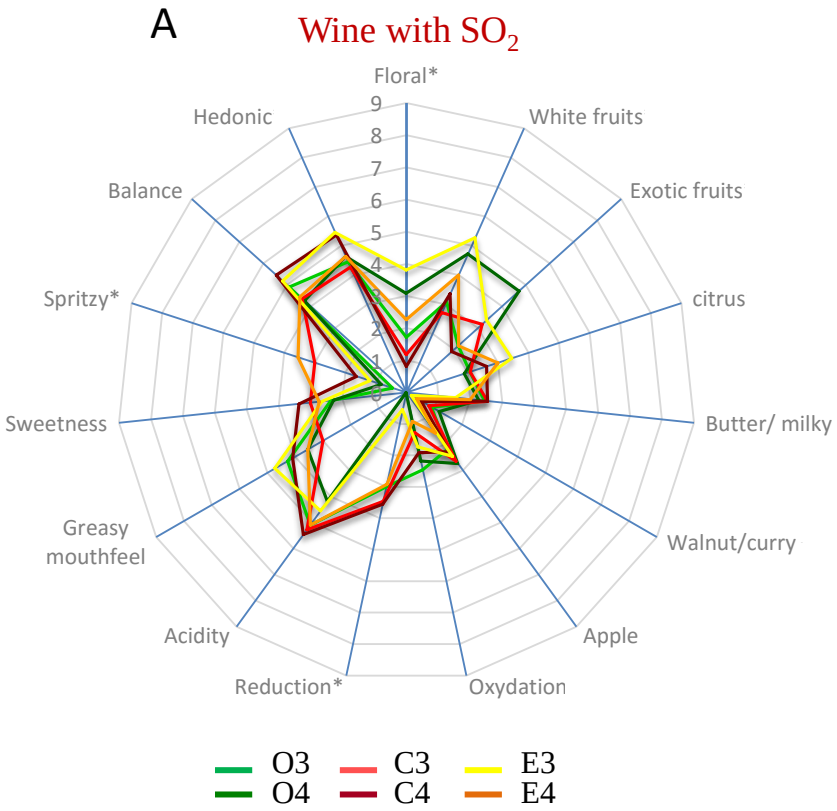
EN BOUCHE

Absence	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	*Très intense*
Acidité	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Gras	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Sucrosité	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Perlant	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Equilibre	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
Note globale	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

Résultats et discussion

Les profils sensoriels des vins sont rassemblés sur la figure 2. D'importantes différences existent entre les trois types de protection pour les vins élaborés sans SO_2 mais elles apparaissent fortement liées au degré d'oxydation. Néanmoins, d'autres différences sont notées. Les arômes floraux sont nettement plus élevés pour le vin Ecophyto et les arômes de fruits blancs et de fruits exotiques sont nettement inférieurs pour les vins conventionnels par rapport aux deux autres modalités, en particulier Ecophyto. Pour les vins élaborés avec le SO_2, les différences ne sont pas significatives pour la plupart des descripteurs.

L'effet du SO_2 apparait différent en fonction du mode de conduite. Pour le vin Ecophyto, l'effet est très peu marqué puisque les 4 vins de cette modalité sont très similaires. En revanche, sur les vins conventionnels, on note une note de réduction pour les vins élaborés avec SO_2 et au contraire une oxydation importante sur les vins élaborés sans SO_2. Ceci pourrait être dû à un niveau de potentiel redox supérieur en lien peut-être avec une plus faible concentration en polyphénols comme observé par Vrček et al. (2011) sur des vins conventionnels. Cette différence dans la teneur en polyphénols est due à la production de composés phénoliques par les plantes pour se défendre contre les agents pathogènes (Soleas et al., 1997). Ceci pourrait donc expliquer en partie la plus grande résistance à l'oxydation des vins issus de la modalité Ecophyto qui, compte tenu de la réduction des doses appliquées et du nombre de traitements, est sans doute la modalité pour laquelle les défenses naturelles de la plante sont le plus sollicitées.



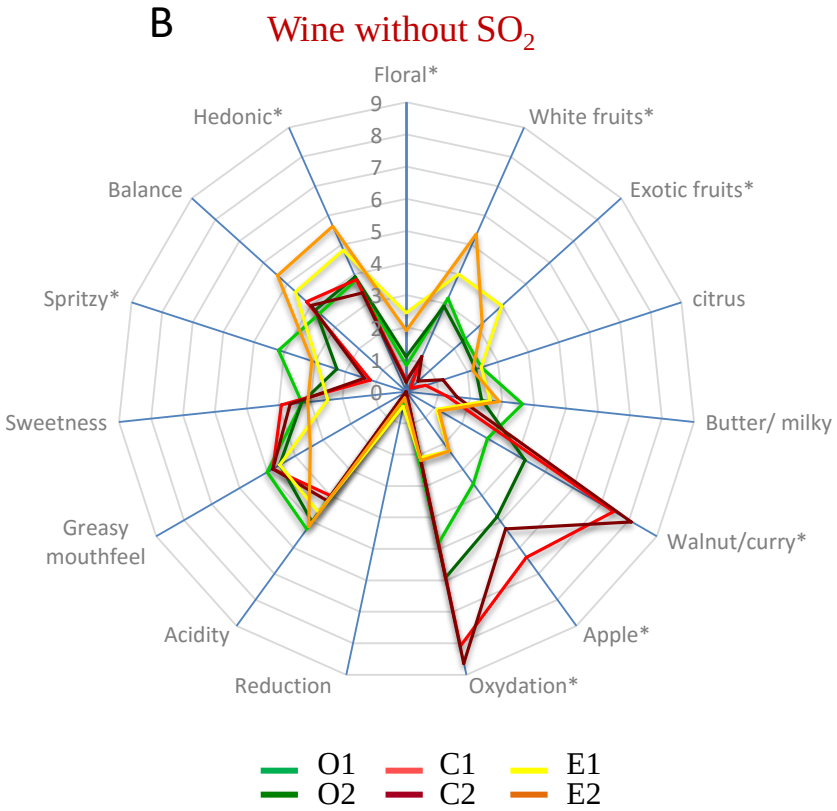


Figure 19. Profils sensoriels réalisés par les 12 panelistes sélectionnés pour les vins des modalités Biologique, Conventionelle et Ecophyto avec (A) et sans SO_2 (B). * descripteurs statisitquement différents au seuil de 5%.

Références

Dupin, I., Schlich, P., Fischer, U., Willer, H., Meier, U., 2000. Differentiation of wines produced by organic or conventional viticulture according to their sensory profiles and aroma composition., in: IFOAM 2000 - the World Grows Organic. Proceedings, 6th International Congress of Organic Viticulture, Basel, Switzerland, 25-26 August 2000, pp. 245–251.

Moyano, L., Zea, L., Villafuerte, L., Medina, M., 2009. Comparison of Odor-Active Compounds in Sherry Wines Processed from Ecologically and Conventionally Grown Pedro Ximenez Grapes. J. Agric. Food Chem. 57, 968–973.

Pagliarini, E., Laureati, M., Gaeta, D., 2013. Sensory descriptors, hedonic perception and consumer's attitudes to Sangiovese red wine deriving from organically and conventionally grown grapes. Front. Psychol. 4, 896, 1-7.

Soleas, G.J., Tomlinson, G., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Relative Contributions of Polyphenolic Constituents to the Antioxidant Status of Wines : Development of a Predictive Model. J. Agric. Food Chem. 45, 3995–4003.

Vrček, I.V., Bojić, M., Žuntar, I., Mendaš, G., Medić-Šarić, M., 2011. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. Food Chem. 124, 354–361.

Copper and sulfur *in vitro* tolerance of wine relevant strains: a focus on the genera *Candida* and *Metschnikowia*

C. GRANGETEAU, C. VOELCKER, T. BOIRON, H. ALEXANDRE, M. GUILLOUX-BENATIER, S. ROUSSEAUX

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon-Université de Bourgogne, Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot, BP 27877 21078 Dijon Cedex France.

Keywords: non-*Saccharomyces* yeasts, copper, sulfur

Introduction

The most common products used for vine protection are copper and sulfur whatever the type of protection (conventional, organic ...). The effectiveness of these two non-specific products has been widely studied on their respective targets but the effects on other organisms such as yeasts present on grapes remain poorly documented. Impacts of chemical fungicides and biological treatments (based on copper and/or sulfur) were compared and reported by Milanovic et al. (2013)[1]. The diversity of yeast species isolated in the organic vineyard seems weak compared to the diversity of yeasts isolated in conventional vineyard: for example, the species *Metschnikowia pulcherrima*, widely found in conventional samples, has been found occasionally in biological samples.

Few studies have focused on the resistance to copper or sulfur of yeasts isolated from the environment. Vadkertiová et al. (2006)[2] studied the resistance to copper of yeast strains belonging to 15 species isolated from water, soil and tree leaves and show a very high intraspecific and interspecific variation regarding the resistance to copper. No strain is able to grow at a concentration greater than 10 mM, but this concentration is tolerated by *M. pulcherrima*, *Pichia americana* and *Cryptococcus laurentii*. Amiranashvili et al. (2011)[3] studied the ability of more than 170 yeast strains isolated on vine from flowering to maturity to degrade 2 pesticides containing copper oxychloride (Cihom Blue and Neoram). These authors showed that the impact on the yeast growth is different depending on the concentration of copper oxychloride. Only 22% of strains tested were grown in the presence of Cihom Blue (5 g/L) and 44% in the presence of Neoram (4 g/L). Cordero-Bueso et al. (2014)[4] evaluate the sulfur resistance of yeast strains belonging to 9 species isolated from grape must and spontaneous fermentations. *Torulaspora delbrueckii, Rhodotorula mucilaginosa* and *Hanseniaspora guilliermondii* species are able to resist to 10 mg/L of sulfur. In contrast, the species *Candida apicola* and *M. pulcherrima* are inhibited by a sulfur concentration of 2.5 mg/L and 10 mg/L, respectively.

The objective of this work was to study i) the tolerance to copper and sulfur of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from grape must and ii) the intraspecific variability of the tolerance to copper and sulfur of strains tested.

Materials and Methods

The yeast isolates studied are from the IUVV collection, and have been isolated from a plot of Chardonnay, in Burgundy vineyard (Mâcon, 71, France). A total of 37 isolates of the *Candida* and 76 isolates of the genus *Metschnikowia* were studied.

Initially, a growth curve was performed for all isolates in order to normalize the experiment to study the resistance to copper and sulfur. After a preculture of 24 to 72 hours at 30°C in YPD medium, a defined volume of each preculture was deposited in liquid YPD medium to a final volume of 2 mL and an absorbance at 600 nm of 0.05 and incubated at 30°C. The growth of each isolates was carried out by spectrophotometry readings at 660 nm (A_{660nm}), after a linear agitation for 30 seconds, every four hours for 32 hours. This growth monitoring was performed in microtiter plates with 24 wells.

For the experimentation in presence of copper, after a preculture of 24 to 72 hours, a defined volume of each preculture was deposited in liquid YPD medium to a final volume of 2 mL and an A_{660nm} of 0.05 and incubated at 30°C. Copper was added to YPD liquid medium as $CuSO_4$ (0 to 10 mM Cu), and the yeast growth was measured by monitoring the absorbance during 30 hours (standard inoculation: $A_{660nm} = 0.05$) at 30°C.

For effect of sulfur, yeasts were cultivated on YPD solid medium containing increasing amounts (0 to 500 mM S) of Thiovit (Syngenta, France). Combined effect between the sulfur and the copper was also tested

for strains able to grow with 250 mM sulfur. The experiment was conducted in YPD solid medium in the presence of 250 mM sulfur and increasing concentrations of copper (0 to 5 mM).

Results and Discussion

Copper and sulfur tolerance of oenological interest non-*Saccharomyces* yeasts belonging to the genera *Candida* and *Metschnikowia* was evaluated. The figure 1 shows the percentage of isolates inhibited in function of different copper concentrations tested. All tested strains are resistant to more than 2 mM, demonstrating a high resistance to copper compared to other yeasts isolated from different environments. Indeed, Vadkertiova et al. (2006)[2] have shown that depending on the environment studied, between 60% and 90% of yeasts are not tolerant to a copper concentration of 2 mM.

Yeast resistance to copper is variable depending on the genus. More than 20% of the *Candida* isolates are resistant to 6.5 mM and 40% at 5 mM, while no isolates of genus *Metschnikowia* is able to grow at 6.5 mM and only 25% at 5 mM. Moreover a high variability exists between isolates of the same genus. For the genus *Metschnikowia*, differentiation could not be performed between the 2 species *M. fructicola* and *M. pulcherrima.* For the genus *Candida* all isolates belong to the species *Candida zemplinina* renamed now *Starmerella bacillaris*. The use of FT-IR spectroscopy allowed to discriminate isolates at strain level, and demonstrated a tolerance to copper strain-dependent (data not shown).

The sulfur resistance of the tested yeasts also varies depending on the genus (Figure 2). The genus *Metschnikowia* is less affected by sulfur than the genus *Candida*. Indeed, more than 95% of the *Metschnikowia* isolates are able to grow with 500 mM sulfur and all isolates with 250 mM sulfur, while only 10% and 57% of isolates of genus *Candida* are able to grow with 500 mM and 250 mM sulfur respectively. These results confirm those obtained by Cordero-Bueso et al. (2014)[4] which reported a greater resistance to sulfur for the species *Metschnikowia pulcherrima* compared to different species of genus *Candida*. In our work, resistance to sulfur is very high for all isolates of the genus *Metschnikowia* whereas for the species *Starmerella bacillaris* it is strain-dependent like for the copper (data not shown).

Concerning the combined effect of sulfur and copper, the presence of sulfur does not change the copper resistance of most yeasts. However 4% of the isolates tested, all belonging to genus *Metschnikowia*, are not able to grow in the presence of the two products simultaneously.

These results show that the application of these fungicides in the vineyard could change the diversity of the genera, species or strains of yeasts present on grapes and/or found in musts. This impact could notably explained the differences of the yeast diversity reported by several authors [1,5] between organic vineyards and conventional vineyards. The use of these fungicides seems to select more resistant yeast strains compared to isolates of other environments[2].

Conclusion

The effect of the two main fungicides used in viticulture (copper and sulfur) on yeast of oenological interest belonging to the genus *Candida* and *Metschnikowia* was demonstrated. The genus *Candida* seems to be more resistant to copper than the genus *Metschnikowia,* although it may be noted that the resistance is strain dependent. Conversely, all isolates belonging to the genus *Metschnikowia* are very resistant to sulfur. For the genus *Candida*, this sulfur resistance seems very strain-dependent, and a low percentage of strains are highly resistant to sulfur. Further works are needed to study the resistance mechanisms of these non-*Saccharomyces* yeasts, mechanisms currently little studied and described. Moreover, the study of the resistance of other yeast genera could help to better understand the effects of the use of copper and sulfur fungicides on the yeast communities on berries or in grape musts.

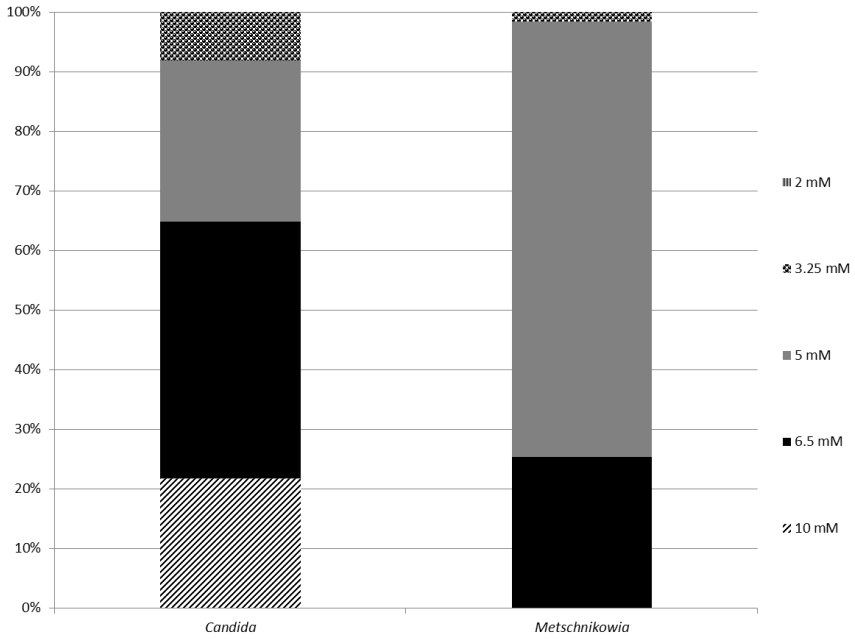


Figure 20: Percentage of isolates of the genera *Candida* and *Metschnikowia* whose growth is inhibited by various copper concentrations.

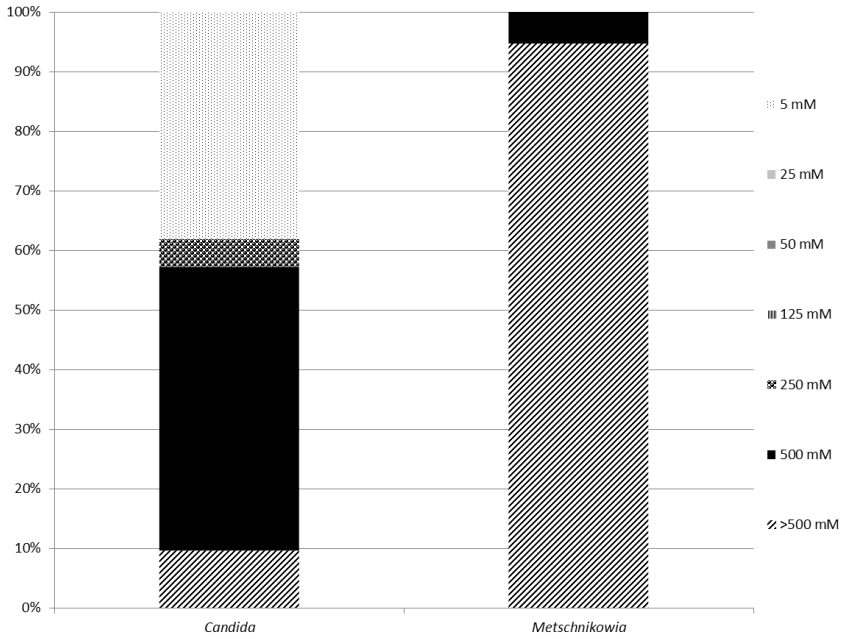


Figure 21: Percentage of isolates of the genera *Candida* and *Metschnikowia* whose growth is inhibited by various sulphur concentrations.

Acknowledgements

This work was funded by the Regional Council of Burgundy and the Interprofessional Office of Burgundy wines.

References

1. Milanović, V., Comitini, F. & Ciani, M. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *Int. J. Food Microbiol.* **161,** 240–6 (2013).
2. Vadkertiová, R. & Sláviková, E. Metal tolerance of yeasts isolated from water, soil and plant environments. *J. Basic Microbiol.* **46,** 145–52 (2006).
3. Amiranashvili L. L. Gagelidze N., Varsimashvili K., et al. Screening of yeasts from Georgia to degrade copper oxychloride containing pesticides. *34th World Congress of Vine and Wine* (2011).
4. Cordero-Bueso, G., Arroyo, T. & Valero, E. A long term field study of the effect of fungicides penconazole and sulfur on yeasts in the vineyard. *Int. J. Food Microbiol.* **189,** 189–194 (2014).
5. Martins, G. *et al.* Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* **177,** 21–8 (2014).

Résumé

Les effets de différentes activités anthropiques (vignoble, cuverie) sur les populations fongiques du raisin au vin ont été étudiés. Afin de caractériser ces effets, il était nécessaire d'avoir accès à la diversité globale des populations (pyroséquençage et IR-TF) mais également à la diversité intraspécifique (IR-TF). La spectroscopie a ainsi été validée pour sa capacité à caractériser la population globale et à discriminer les souches pour trois espèces de levures non-*Saccharomyces* (NS). Pour la première fois, il est démontré que la baie de raisin constitue une source limitée pour les levures NS alors que la cuverie semble constituer une source importante; l'air étant un vecteur important de dissémination de ces levures. De plus, la persistance et la réimplantation des levures NS dans le moût l'année suivante ont été démontrées. Les activités anthropiques étudiées modifient la diversité fongique. Une biodiversité plus faible pour les raisins de la modalité biologique a été mesurée pour les 3 millésimes considérés. Les populations fongiques sont ensuite fortement remaniées par l'étape de pressurage/clarification et l'influence de la flore de cuverie est confirmée. L'ajout de SO_2 modifie les dynamiques des populations et favorise la domination de l'espèce *S. cerevisiae.* L'analyse chimique non-ciblée des vins montre pour la première fois que ces derniers peuvent être discriminés à la fin de la fermentation alcoolique en fonction de la protection phytosanitaire, que ces fermentations aient eu lieu en présence ou non de SO_2. Ainsi, l'existence dans les vins de signatures de diversité chimique et microbiologique liées au mode de protection au vignoble est mise en évidence.

Abstract

The effects of different anthropogenic activities (vineyard, winery) on fungal populations from grape to wine were studied. To characterize these effects, it was necessary to access to the overall diversity of populations (pyrosequencing and spectroscopy FT-IR) but also to intra-specific diversity (FT-IR). Spectroscopy FT-IR has been validated for their ability to characterize the global population and to discriminate the strains for three species of non-*Saccharomyces* yeasts (NS). For the first time, it is shown that the grape berry is a limited source for NS yeasts while the winery seems to be a significant source; the air is an important vector for dissemination of these yeasts. In addition, persistence of NS yeast strains from year to year in the winery has been demonstrated. The studied anthropogenic activities modify the fungal diversity. Thus, lower biodiversity of grapes from organic modality was measured for the three vintages considered. The pressing / clarification step revises strongly fungal populations and the influence of the winery flora is confirmed. The addition of SO_2 changes the population dynamics and favors the dominance of the species *S. cerevisiae*. The non-targeted chemical analysis shows, for the first time, that these wines can be distinguished at the end of the alcoholic fermentation (with or without SO_2) depending on plant protection. Thus, the existence in wines of chemical and microbiological signatures associated with vineyard protection mode is highlighted.