

28/09/2023-09/02/2024

# Rapport de stage

*Caractérisation des communautés  
microbiennes des baies de variétés  
résistantes de vigne et leur impact sur la  
qualité des vins dans un contexte de réduction  
des intrants*

**Etudiante** Marion Delevoye

**Encadré par** Cecile Neuvéglise (Directrice de recherche SPO Montpellier)  
Evelyne Aguera (Ingénieure d'étude UE Pech Rouge)



## REMERCIEMENT

Je tiens tout d'abord à remercier **Cécile Neuvéglise et Evelyne Aguéra**, mes deux tutrices de stage, pour m'avoir permis de faire partie de ce projet. Merci beaucoup pour votre gentillesse, votre bienveillance et votre accueil à l'UE de Pech Rouge puis à l'UMR SPO. Vous avez toujours pris le temps de m'apprendre, de me conseiller et de répondre à mes interrogations et j'ai énormément appris à vos côtés ! Merci de m'avoir permis de faire partie intégrante de l'équipe et de m'avoir si bien aiguillée pendant ce stage.

Je souhaite également remercier l'**UE de Pech Rouge** pour leur accueil pendant les premières semaines de stage. Merci à tous les chercheurs et techniciens de laboratoires pour leur aide et leur bonne humeur! Je souhaite particulièrement remercier **Marion** pour son aide précieuse, sa joie de vivre et ces moments de partage pendant tout mon séjour à Pech Rouge.

Je souhaite remercier maintenant l'**UMR SPO** et l'**équipe ADEL** qui m'ont accueilli pour la seconde partie de mon stage. Un grand merci à **Martine Pradal** pour ta gentillesse, ta patience et ton aide autant à Pech Rouge qu'à Montpellier. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'apprendre et de m'accompagner dans toutes mes expérimentations.

Enfin, je souhaite remercier les non permanents et les stagiaires présents avec moi tout au long de mon stage pour ces moments de joie et de partage ! Un grand merci à **Gabriela** pour son aide, ses conseils et surtout pour tous ces bons moments qu'on a pu partager.

## SOMMAIRE

REMERCIEMENT.....	1
SOMMAIRE.....	2
<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>4</b>
RÉSUMÉ TECHNIQUE.....	5
INTRODUCTION.....	1
<b>I/ PRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL.....</b>	<b>2</b>
1. INRAE.....	2
2. L'unité de Pech Rouge.....	2
3. L'UMR SPO.....	3
4. Rôle occupé dans le service.....	5
<b>II/ CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>6</b>
1. Etat de l'art.....	6
1.1. Les variétés résistantes et classiques.....	6
1.2. L'élaboration du vin.....	7
1.2.1. Les différentes phases et paramètres de la fermentation alcoolique.....	7
1.2.2. Les différents types de fermentation.....	9
1.3. L'importance du microbiote des baies de raisin.....	9
1.3.1. La diversité.....	9
1.3.2. Les facteurs influençant le microbiote.....	10
1.3.3. Dynamique du microbiote.....	11
1.3.4. Effet sur la qualité du vin final.....	12
1.4. méthodologie pour caractériser le microbiote.....	13
2. Problématique.....	14
3. Organisation et objectifs de stage.....	15
<b>IV/ MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>16</b>
1. Dispositif viticole.....	16
1.1. Les différents cépages et variétés.....	16
1.2. Le traitement général des raisins.....	17
1.2.1. La récolte.....	17
1.2.2. La découpe au pédicel.....	17
1.2.3. Egrappage-Fouillage.....	18
1.2.4. Fermentation.....	18
1.2.5. Fin de fermentation.....	18
2. Les différentes expérimentations.....	19

2.1. Expérimentation 1 : la diversité des microbiotes.....	19
2.2. Expérimentation 2 : impact de l'ajout de <i>S. cerevisiae</i> .....	19
2.3. Expérimentation 3.....	20
3. Les analyses.....	23
3.1. Étalement sur boîte de Pétri et dénombrement.....	23
3.1.1. Milieux de culture.....	23
3.1.2. Ensemencement et dénombrement.....	24
3.2. PCR sur colonies pour identification des clones.....	24
3.3. Les analyses physico-chimiques.....	25
3.3.1. HPLC.....	26
3.3.2. GC-MS.....	26
3.4. Metabarcoding.....	27
3.4.1. Extraction d'ADN.....	27
3.4.2. Quantification de l'ADN.....	28
3.4.3. Amplification par PCR.....	28
3.4.4. Vérification de l'amplification par électrophorèse.....	29
3.4.5. Séquençage haut débit.....	29
3.4.6. Traitement informatique (Analyse de l'alpha et bêta diversité).....	29
3.5. Analyses statistiques.....	29
<b>VI/ RESULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>30</b>
1. Cinétique fermentaire.....	30
1.1. Impact de <i>S. cerevisiae</i> sur la cinétique.....	30
1.1.1. Répétabilité.....	30
1.1.2. Comparaison des cinétiques.....	31
1.2. Impact du microbiote sur la cinétique.....	31
1.2.1. Reproductibilité et Répétabilité.....	31
1.2.2. Comparaison des cinétiques pour chaque variété.....	33
1.3. L'évolution du taux de sucre et d'éthanol pendant la FA : HPLC.....	35
1.3.1. Comparaison des taux de sucre et éthanol entre les modalités.....	36
1.3.2. Comparaison des taux de sucre et éthanol entre les variétés.....	38
2. Diversité du microbiote : PCR sur colonie.....	39
3. Qualité du vin final : GC-MS.....	40
3.1. Impact de <i>S. cerevisiae</i> sur la qualité des vins.....	40
3.2. Impact du microbiote sur la qualité.....	42
4. Discussion.....	44
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>46</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>48</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>51</b>

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Equation bilan de la fermentation alcoolique [24].....	7
Figure 2 : Cinétique des fermentations alcooliques standard en fonction de la concentration cellulaire (x), du débit (V) et du cumul de CO <sub>2</sub> (CO <sub>2</sub> ), et de l'azote assimilable (Nas), 1= phase de latence, 2= phase de croissance et 3= phase stationnaire. [23].....	8
Figure 3 : Schéma de la dynamique du microbiote [37].....	12
Figure 4 : Structure du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes [41].....	14
Figure 5 : Schéma récapitulatif du traitement du raisin de la récolte à la fin de fermentation.....	17
Figure 6 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation 3 partie 1.....	21
Figure 7 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation 3 partie 2.....	22
Figure 8 : Schéma récapitulatif des analyses pour les différentes expérimentations.....	23
Figure 9 : Schéma des étapes du protocole du métabarcoding.....	27
Figure 10 : Graphiques du cumul du CO <sub>2</sub> en fonction du temps pour l'expérimentation 2 (modalité 38).....	30
Figure 11 : Superposition des cinétiques fermentaires des triplicatas de pieds de cuve d'artaban.....	32
Figure 12 : Graphique du cumul et du débit de CO <sub>2</sub> des <i>S. cerevisiae</i> 39.9 à 11.....	32
Figure 13 : Graphique du cumul et du débit de CO <sub>2</sub> pour le rinçage de baies d'artaban et les <i>S. cerevisiae</i> 39.4, 5 et 9.....	33
Figure 14: Graphique des cinétiques fermentaires de Carignan.....	34
Figure 15: Graphique des cinétiques fermentaires d'Artaban.....	34
Figure 16 : Comparaison des cinétiques fermentaires d'artaban et de carignan.....	35
Figure 17: Répétabilité des résultats d'HPLC de l'expérimentation 3.....	36
Figure 18: Comparaison du rinçage de baie et du pied de cuve d'artaban.....	36
Figure 19: Comparaison du rinçage de baie et du pied de cuve de carignan.....	37
Figure 20 : Comparaison des résultats d'HPLC des pieds de cuve d'artaban et de carignan et de <i>S. cerevisiae</i> .....	38
Figure 21 : Comparaison des résultats d'HPLC des rinçages de baies d'artaban et de carignan et de <i>S. cerevisiae</i> .....	38
Figure 22 : ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les 38 sur l'ensemble des familles organoleptiques.....	40
Figure 23 : ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les 38 sur les esters d'acétate.....	41
Figure 24 : Graphique des concentration d'ester d'acétates pour l'expérimentation 3.....	41
Figure 25 : ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les modalités de l'expérimentation 3 (39 et 40) sur l'ensemble des familles organoleptiques.....	42
Figure 26 : ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les modalités de l'expérimentation 3 (39 et 40) sur les esters d'éthyle.....	43
Figure 27 : Graphique des concentrations des différents esters d'éthyle dans les modalités de l'expérimentation 3.....	43

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatifs des lieux et des années de récoltes pour nos 4 variétés.....	6
Tableau 2 : Paramètres de cinétique fermentaire pour le cépage Carignan.....	33
Tableau 3 : Paramètres de cinétique fermentaire pour la variété artaban.....	33
Tableau 4 : Tableau du nombre de colonies identifiées pour les fermenteurs de pieds de cuve.....	39

## RÉSUMÉ TECHNIQUE

Le réchauffement climatique et l'évolution de la demande sociétale pour réduire les intrants en vitiviniculture ont permis le développement de nouvelles variétés résistantes aux maladies de la vigne, notamment mildiou et oïdium. Si de nombreuses données existent sur le microbiote des baies de raisin et sur son intérêt en oenologie notamment sur la qualité finale du vin (arômes), peu de données existent sur le microbiote des variétés résistantes. Trois objectifs ont été fixés dans cette étude et réalisés à l'aide d'approches de métagénomique et de culturomique. La qualité des vins finis a été mesurée par GC-MS. Le premier objectif porte sur la diversité du microbiote des variétés résistantes avant et au cours de la fermentation pour deux variétés résistantes (artaban et G14) en comparaison avec deux cépages emblématiques de la région Languedoc-Roussillon (syrah et carignan). Les résultats de ce premier objectif n'ont pas pu être intégrés à ce rapport à cause de la durée d'obtention des résultats de metabarcoding. Le deuxième objectif a été d'observer l'impact de l'ajout de *Saccharomyces cerevisiae* sur la cinétique fermentaire et sur la qualité finale du vin. Des fermenteurs contenant du moût naturel d'artaban ont été ensemencés avec *S. cerevisiae* au début ou au cours de la fermentation (à 10 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé) ou ont été maintenus en fermentation spontanée complète (sans ajout de *S. cerevisiae*). Les fermenteurs inoculés avec *S. cerevisiae* au cours de la fermentation ont eu une cinétique fermentaire rapide et ont produit des arômes fermentaires en plus forte proportion que les deux autres modalités. Le troisième objectif a permis de mesurer l'impact du microbiote sur la cinétique fermentaire et sur les composés aromatiques des vins. Un moût flash pasteurisé a été ensemencé avec différents microbiotes (issus de pieds de cuve, de rinçage des baies de raisins et avec *S. cerevisiae*) puis a été mis à fermenter. L'expérimentation a été réalisée avec la variété artaban et le cépage carignan. L'ensemencement après rinçage de baies a été utilisé pour la première fois dans cette étude et s'est révélé probant, c'est donc une preuve de concept. Les fermenteurs ont donné des résultats différents en termes de cinétique (les fermenteurs réalisés avec les pieds de cuve et *S. cerevisiae* ont eu des cinétiques fermentaires plus rapides que ceux effectués avec le rinçage de baies) et également en termes de qualité finale du vin (chaque vin ne dégageant pas les mêmes arômes dans les mêmes proportions). Ainsi, nous avons montré que le microbiote a un impact sur ces deux aspects. Le pied de cuve semble être une bonne solution pour maîtriser la fermentation en conservant et amplifiant certains arômes.

## INTRODUCTION

La viticulture représente une part importante du patrimoine français. La France est le premier exportateur et le 2ème pays producteur mondial de vin. Ce dernier a une importance capitale dans l'économie française. En 2020, il représente 17% de la production agricole soit 12 milliards d'euros et 59 000 exploitations viticoles sont présentes sur le territoire français. Les cépages français se démarquent par leur diversité. Une cinquantaine de cépages sont présents en France, nous retrouvons notamment dans les raisins noirs le merlot, le grenache, ou la syrah. Ces cépages se différencient par le goût, la couleur et la grosseur de leurs raisins [1].

La culture du vin est présente sur l'ensemble du territoire. L'Occitanie est l'une des régions les plus importantes dans ce domaine puisqu'elle est le plus grand vignoble français en surface avec plus de 262 000 ha. En outre, cette région représente 30% de la production française et se différencie des autres régions par la mixité de son vignoble avec une superposition des aires AOP (appellation d'origine protégée) et IGP (Indication géographique protégée) [2].

Au vu des changements climatiques et de l'importance de la sécurité alimentaire chez le consommateur, de plus en plus de méthodes alternatives aux intrants sont recherchées par les producteurs. Les variétés résistantes aux maladies fongiques telles que le mildiou et l'oïdium, seraient une des solutions trouvées tout en permettant d'apporter d'autres arômes fermentaires.

La réussite des fermentations spontanées (sans levurage maîtrisé) est en partie dépendante de la composition du microbiote à la surface des baies de raisin à maturité, et notamment de la présence d'espèces fermentaires. Cependant, si des données existent sur les communautés indigènes à la vigne et en oenologie, aucune étude exhaustive n'a été publiée sur les communautés microbiennes des variétés résistantes.

C'est dans ce contexte que INRAE de Montpellier souhaite acquérir des données sur la composition des communautés microbiennes des variétés résistantes en comparaison aux cépages traditionnels par la méthode du metabarcoding. Quatre domaines expérimentaux différents et quatre variétés de raisins ont été choisis dans cette étude pour évaluer les facteurs structurant la variabilité du microbiote (variété, localisation, environnement agro-écologique...). Dans le but de suggérer des améliorations dans la production de vins élaborés à partir de ces nouvelles variétés, nous analyserons l'impact du microbiote provenant des baies de raisins sur le processus de fermentation et la qualité du vin pour chaque modalité.

J'ai effectué mon stage d'assistant ingénieur au cœur de ce projet. J'ai été impliquée dans toutes ces phases : de la récolte à la vinification des différentes variétés de raisins à l'Unité expérimentale de Pech Rouge, à l'analyse et au traitement des données des échantillons récoltés à l'UMR (Unité Mixte de Recherche) SPO (Sciences pour l'Oenologie) de Montpellier.

# I/ PRÉSENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL

## 1. INRAE

INRAE, Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement, est un établissement public à caractère scientifique et technologique, ou EPST. Il a été fondé le 1er janvier 2020 et il est né de la fusion entre l'INRA (Institut national de la recherche agronomique) et l'IRSTEA (Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture). Au cœur des problématiques actuelles environnementales et de sécurité alimentaire et nutritionnelle, l'institut a pour vocation d'apporter des solutions pour la vie, les humains et la terre. Par la recherche, INRAE mobilise son savoir "au service de l'innovation, de l'expertise et de l'appui aux politiques publiques" dans les domaines de "l'agriculture, de l'alimentation, de la forêt, de l'environnement, de l'eau, de la biodiversité, de la bioéconomie, de l'économie circulaire, de la gestion durable des territoires et des risques dans les champs de compétence précités"[3].

INRAE occupe une place importante dans la recherche en France et dans le monde avec un budget de 1 milliard d'euros, 18 centres implantés sur l'ensemble du territoire français et plus de 8 200 agents titulaires. Il est également en lien direct avec l'international puisque 58% de ses publications sont en collaboration avec un autre pays et nombre de ces scientifiques sont reconnus mondialement.

L'un des objectifs d'INRAE est de répondre aux enjeux de la transition agro-écologique (réduction des produits phytosanitaires...). Il occupe de ce fait une place particulière dans la recherche viticole. L'institut a déjà permis d'apporter de nombreuses solutions concrètes, transférables au vignoble et en cave en collaborant avec l'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) et s'engage à continuer d'innover dans ce secteur dans les années à venir [4][5].

## 2. L'unité de Pech Rouge

L'unité Expérimentale de Pech Rouge (UE PR) est située dans la ville de Gruissan près de Narbonne en Occitanie. C'est la seule structure d'expérimentation à vocation recherche intégrée viticulture-oenologie d'INRAE. Cette structure permet une approche transversale : du raisin dans la parcelle de vigne au vin fini et conditionné en passant par la fermentation. L'unité est en collaboration avec de nombreuses équipes de recherche notamment l'UMR SPO mais également avec l'IFV et accueille une de leurs antennes sur leur site. L'unité emploie une vingtaine de chercheurs, d'ingénieurs et de techniciens. Elle répond également à des demandes d'entreprises du secteur viticole leur apportant une expertise et des outils à l'échelle pilote et pré-industrielle.

L'UE PR doit répondre à trois missions : "concevoir et organiser les expérimentations émanant

de la filière vitivinicole et plus spécifiquement de l'UMR SPO en créant les synergies avec cette recherche en amont", "structurer et mener des expérimentations ou recherches en liaison avec la profession" et "assurer le transfert et la valorisation des expérimentations les plus innovantes et pertinentes en favorisant l'échange d'information avec les acteurs de développement et en participant à la formation des élèves oenologues de l'Agro de Montpellier et des étudiants de l'Institut des Hautes Etudes de la vigne et du vin (IHEV) " [6].

L'UE PR comprend 170 ha de terrain dont 38 ha de vignes plantées dans trois zones différentes : les Colombiers, la Clape et la zone littorale. Ces 3 zones permettent d'avoir un panel de conditions d'exploitation différentes. Le sol des Colombiers contient de la marne (roche sédimentaire avec un mélange de calcaire et d'argile) permettant un taux d'humidité et une rétention de la chaleur solaire favorable à la vigne. Ce domaine est certifié bio. La Clape a un col calcaire dur concassé. La zone littorale quant à elle a un sol sableux. Ces hectares de vignes permettent d'accueillir de nombreuses variétés présentes dans diverses conditions d'exploitation. Certaines parcelles comprennent plusieurs variétés différentes sur chaque rangée permettant ainsi d'avoir des conditions d'exploitation similaires et de pouvoir comparer ces variétés entre elles sans le biais de l'environnement.

L'UE PR est composée de plusieurs sous-unités appelées Halles permettant l'exploitation et l'analyse des composés à différentes échelles. Une Halle est dédiée à l'extraction, à la transformation et à l'œnologie expérimentale. Elle permet de vinifier à des échelles allant de 100 kg à 5 tonnes. Une Halle de fermentations différées contrôle des fermentations allant de 100 L à 10 L reliées à des logiciels d'acquisition des cinétiques fermentaires. L'Unité de Pech Rouge dispose également d'une Halle de microbiologie avec des fermenteurs de 1 L. Elle dispose également d'un laboratoire d'analyses avec une GC-MS et tout autre appareil permettant l'analyse des échantillons prélevés.

L'UEPR a une place importante dans le domaine viticole. Elle est au cœur d'un projet d'envergure. Elle doit recevoir le transfert de la collection de vignes de Vassal, une collection unique au monde. Elle regroupe plus de 8 500 accessions provenant de plus de 50 pays. C'est un patrimoine génétique, culturel et historique unique. Une partie des variétés de cette collection n'est plus cultivée et reste présente uniquement dans cette collection. Ce patrimoine est d'autant plus essentiel au vu des changements climatiques et de la transition agroécologique [7].

### 3. L'UMR SPO

L'UMR SPO, l'Unité Mixte de Recherches Sciences Pour l'Œnologie, est sous la tutelle d'INRAE, de l'Université de Montpellier et de l'institut Agro Montpellier. Elle rassemble 75 chercheurs, enseignants-chercheurs et ITA ainsi qu'une cinquantaine d'agents non permanents. Il s'agit de l'un des plus grands pôles internationaux de recherche pour la filière œnologique et a pour but de mieux comprendre et d'appréhender les mécanismes impliqués dans l'élaboration du vin [8].

L'unité se différencie par ses trois objectifs : “adapter les pratiques œnologiques aux changements sociétaux et environnementaux”, “comprendre l'évolution des écosystèmes levuriens en œnologie, en boulangerie et au-delà”, “caractériser les modifications de composition des vins au cours de leur élaboration”[9]. Pour répondre à ces objectifs, l'unité aborde les domaines de la biologie végétale, la microbiologie, la biologie moléculaire, la biochimie, la chimie et la physico-chimie. Elle recentre ses recherches sur deux thématiques principales relatives à “la physiologie intégrative des levures œnologiques et la maîtrise de la fermentation alcoolique” ainsi qu'aux “composés phénoliques (biosynthèse, réactivité, interactions physico-chimiques, propriétés, valorisation)”[10].

L'UMR SPO innove et propose des approches et solutions technologiques à ses collaborateurs qui peuvent être des entreprises de la filière viticole ou d'autres partenaires nationaux ou internationaux. Elle collabore avec d'autres unités comme celle de Pech Rouge pour lui permettre d'élargir ses recherches à l'ensemble des étapes de l'élaboration du vin, de la vigne au produit fini et commercialisé, mais aussi de travailler à différentes échelles : pilote à pré-industrielle.

Son expertise ne se limite pas qu'à la filière viticole puisque l'UMR s'intéresse également aux autres produits fermentés tels que le pain ou la bière pour répondre à leurs enjeux de qualité, d'environnement ou d'autres problématiques semblables à celles du vin.

L'UMR SPO est composée de trois équipes. L'équipe ADEL (Adaptation, Diversité, Ecologie des levures) centre ses recherches sur les levures. Elle s'intéresse à l'écologie et à l'évolution de ces dernières ainsi qu'à la génétique des caractères impliqués dans la fermentation et dans l'adaptation des levures aux différents milieux. Sa recherche s'articule autour de quatre thèmes : la “base génétique des propriétés des souches et impact de la composition du milieu sur la dynamique fermentaire”, “l'histoire évolutive des levures domestiquées”, la “dynamique et évolution des communautés microbiennes”, les “propriétés émergentes des interactions microbiennes”[11]. C'est dans cette équipe que j'ai effectué mon stage assistant ingénieur. L'équipe FLAM (Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme) s'intéresse aux procédés de fermentation œnologique pour les maîtriser afin de pouvoir contrôler le profil aromatique et la qualité des vins [12]. Enfin, l'équipe BIO (Biomolécules d'Intérêt en Œnologie) cherche à identifier “les relations existant entre la composition et la qualité ou la typicité des vins” et l'impact qu'ont la matière première et les procédés œnologiques sur ces relations afin de mieux les maîtriser [13].

L'unité comprend également des structures collectives telles que la plateforme d'analyse polyphénols et les plateaux techniques. Le plateau d'analyse des composés volatils avec un ensemble d'équipements de pointe permet l'identification et l'extraction d'un grand nombre de composés volatils aromatiques présents dans le vin, les huiles essentielles, les matrices alimentaires [14]. Le plateau d'analyse sensorielle a pour mission de “mesurer et de contrôler les caractéristiques organoleptiques des vins et des jus de raisin par un jury expert sélectionné et entraîné” avec une méthode d'analyse conforme aux normes ISO. Le plateau de fermentation permet de suivre en ligne et de contrôler la fermentation alcoolique dans un contexte

oenologique à l'aide d'outils innovants [15]. Enfin, le CIRM-Levures ou Centre de Ressources Biologiques microbien est dédié aux levures et doit collecter, conserver, caractériser et distribuer les levures rencontrées dans les produits alimentaires [16].

L'organigramme de l'unité est disponible en [annexe 1](#).

#### 4. Rôle occupé dans le service

J'ai effectué un stage d'assistant ingénieur dans ces deux unités dans le cadre du projet OenoVard'Occ. Lors des 6 premières semaines, j'ai pu travailler au côté d'Évelyne Aguera, ingénieure d'étude à l'unité expérimentale de Pech Rouge dans la Halle de Microbiologie. Mon rôle a alors été d'aider à la récolte des différents cépages nécessaires à notre étude sur le domaine de Pech Rouge et dans certains domaines voisins tels que celui de Vassal. Une fois les échantillons de ces variétés prélevés, j'ai participé à la préparation des échantillons analysés par la suite au sein de l'UMR SPO. J'ai donc eu un rôle d'assistante d'ingénieur en recherche. En plus de la préparation des échantillons, mon rôle a été de communiquer avec les différents services présents dans l'unité afin de permettre l'analyse des échantillons récoltés ainsi que d'organiser et de transcrire l'ensemble des résultats obtenus sur un drive accessible à l'ensemble des collaborateurs du projet. J'ai également pu réaliser un travail bibliographique lors de cette étape de mon stage.

Les quatre mois suivants de mon stage se sont déroulés à l'UMR SPO de Montpellier. Au sein de cette unité, mon rôle a été d'assister Cécile Neuvéglise, directrice de recherche dans l'équipe ADEL. J'ai alors pu aider à l'analyse des échantillons récoltés lors de la première phase de mon stage à Pech Rouge. J'ai alors réalisé diverses analyses telles que du dénombrement sur boîte, des suivis de cinétique fermentaire, des PCR sur colonies, des extractions d'ADN et quantifications, des amplifications par PCR, des analyses par GC-MS et HPLC. J'ai également participé au traitement informatique et statistique des données récupérées et à l'organisation et interprétation des résultats. J'ai été membre de l'équipe ADEL en participant aux diverses réunions m'impliquant dans la vie de l'unité. J'ai eu également pour rôle de retranscrire l'ensemble de mes manipulations et des résultats obtenus pour les rendre pérennes pour la suite du projet.

## II/ CONTEXTE SCIENTIFIQUE

### 1. Etat de l'art

#### 1.1. Les variétés résistantes et classiques

Plus de 10 000 variétés de vigne sont reconnues dans le monde. Parmi ces variétés, les variétés classiques sont les variétés les plus présentes en France, elles sont issues de l'espèce *Vitis vinifera* et représentent 6000 variétés cultivées à travers le monde. Elles répondent aux cahiers des charges de l'AOP (appellation d'origine protégée) régie par l'INAO (institut national de l'origine et de la qualité). Ces variétés présentent une grande diversité génétique : en effet, selon les sols, les environnements et les climats, les plantes peuvent différer par leur forme, leur taille ou encore leur couleur. Les variétés de rouges les plus cultivées sur le bassin méditerranéen sont le merlot, le carignan, le grenache, la syrah et le mourvèdre [17].

Depuis des années, la vigne est impactée par de nombreuses maladies et parasites d'origine américaine comme le mildiou (*Plasmopara viticola*), l'oïdium (*Erysiphe necator*) et le black rot (*Guignardia bidwellii*) qui sont des maladies cryptogamiques ou encore le Phylloxéra (*Daktulosphaira vitifoliae*) qui est un insecte parasite. Cependant, la viticulture dépend fortement de l'application de fongicides pour lutter contre les maladies de la vigne. Ces méthodes peu coûteuses sont cependant néfastes pour l'environnement et pour la santé humaine. Au vu du réchauffement climatique et de l'évolution des mentalités, de nouvelles variétés résistantes aux maladies mais également à la sécheresse ont été créées pour permettre la réduction des intrants et de l'eau [18].

Ces variétés résistantes sont des hybrides interspécifiques complexes obtenus par plusieurs croisements avec des parents sauvages de *Vitis* (principalement *V. amurensis*, *V. rupestris* et *V. berlandieri*) d'origine nord-américaine possédant des gènes de défense par coévolution avec des agents pathogènes aujourd'hui pandémique et des *Vitis vinifera* qui, au contraire, ne possède pas de résistance génétique [18, 19]. En France, Alain Bouquet en 1974 a introduit les variétés dites "Bouquet" issu du croisement entre les espèces européennes et *Vitis rotundifolia* leur conférant un gène de résistance au mildiou (Rpv1) et à l'oïdium (Run1). Certaines variétés créées par l'INRA à partir des variétés "Bouquet" avec des gènes de résistance durable dans le cadre du programme ResDur auraient également un fort potentiel aromatique, une faible teneur en sucre et en degrés d'alcool (un autre enjeu du réchauffement climatique), et un rapport sucre/acide adapté. Parmi ces variétés, la variété artaban résiste au mildiou et à l'oïdium mais est sensible au black rot et permettrait de réduire de 80% l'utilisation de fongicides selon les recherches d'INRAE en 2011 [20].

Au niveau national Français, les plans Ecophyto spécifiques veulent protéger les vignobles en réduisant les traitements phytosanitaires de 25% en 2020 et de 50% en 2025. Dans cet

objectif, la culture de ces variétés résistantes a récemment été autorisée en France, permettant ainsi l'utilisation de nouveaux systèmes innovants [21].

Cependant, bien que la résistance de ces espèces aux maladies fongiques ait fait l'objet de nombreuses études sur le terrain et *in vitro*, les caractéristiques productives de ces espèces et la composition de leurs fruits, et notamment du microbiote, sont encore peu exploitées et laissent une porte ouverte à de nombreuses études [19].

## 1.2. L'élaboration du vin

Les préparations d'un vin rouge et d'un vin blanc sont différentes, seules les étapes de préparation d'un vin rouge seront détaillées ici.

Le raisin est récolté lors des périodes de vendanges. Il est ensuite égrappé et foulé mécaniquement grâce à un égrappoir-fouloir permettant à la fois de séparer la rafle et les baies et de fouler (d'écraser) les baies de raisin afin d'en extraire le moût. Les raisins et leurs jus sont ensuite mis en cuve afin d'effectuer la fermentation alcoolique. Des levures (si ce n'est pas de la fermentation spontanée) sont ajoutées par la suite. Une macération donnant au vin ses tanins, ses arômes et sa couleur est effectuée par contact du moût avec les pellicules des baies au cours de la fermentation. Le moût est alors pressé et filtré afin d'extraire le jus de fermentation. Une seconde fermentation appelée la fermentation malolactique permettant la transformation de l'acide malique en acide lactique peut avoir lieu avant la mise en bouteilles. Certains vins sont assemblés (constitués avec plusieurs cépages) et clarifiés (élimination des dépôts encore présents dans le vin rouge par filtration, collage ou encore par sédimentation) [22]. Dans la suite de ce rapport, nous allons détailler les étapes de la fermentation alcoolique.

### 1.2.1. Les différentes phases et paramètres de la fermentation alcoolique

En oenologie, la fermentation alcoolique (FA) est le processus par lequel les levures fermentaires transforment les sucres (glucose, fructose...) en dioxyde de carbone et en éthanol selon l'équation de la figure 1 [23].

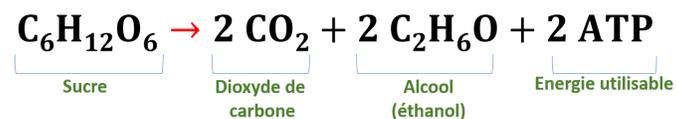
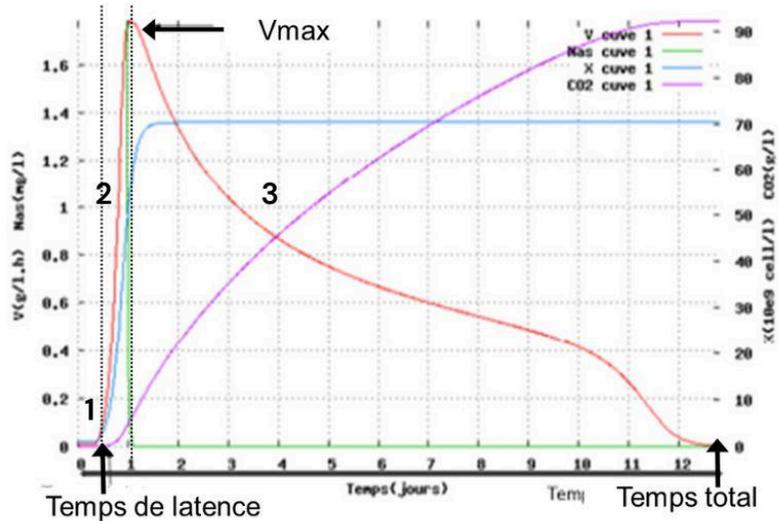


Figure 1 : Equation bilan de la fermentation alcoolique [24]

D'un point de vue métabolique, cette réaction permet d'apporter une source d'énergie aux levures pour se développer et maintenir l'activité cellulaire grâce aux deux molécules d'ATP libérées lors de la glycolyse.

D'un point de vue cellulaire, la population de cellules se développe lors de la FA, cette réaction n'est pas linéaire et sa vitesse dépend des espèces présentes dans cette population ainsi que de l'activité métabolique spécifique des levures.



*Figure 2 : Cinétique des fermentations alcooliques standard en fonction de la concentration cellulaire (x), du débit (V) et du cumul de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>), et de l'azote assimilable (Nas), 1= phase de latence, 2= phase de croissance et 3= phase stationnaire. [23]*

Dans les conditions standards, à une température constante avec ensemencement de levures commerciales, la fermentation se déroule en théorie comme la figure 2 selon trois phases.

La première phase est la phase de latence (1 sur la figure 2) qui se déroule dans les premières heures voire les premiers jours de la fermentation. Elle correspond à la durée observée entre l'inoculation des levures et le moment à partir duquel le dégagement de CO<sub>2</sub> est mesurable (dans ce rapport cela correspond à 1 g/ L de cumul de CO<sub>2</sub> dégagé). Lors de cette phase, il n'y a aucun dégagement visible de CO<sub>2</sub> du fait d'une activité fermentaire trop faible des levures indigènes qui s'accompagne d'une saturation du milieu en gaz carbonique, et d'une période d'acclimatation des levures au nouveau milieu qui ne vont pas ou peu se diviser. Ce dernier cas est particulièrement observé avec les levures sèches actives (LSA) passant d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme fermentaire. Cette phase dépend de facteurs tels que la température, le taux d'inoculation, la population en micro-organismes et la présence d'inhibiteurs comme le SO<sub>2</sub>. [23]

La seconde phase est la phase de croissance (2 sur la figure 2) correspondant à la croissance optimale des levures jusqu'à atteindre une population maximale comprise entre 5.10<sup>7</sup> et 2,5.10<sup>8</sup> cellules /ml. A la fin de cette phase le débit de CO<sub>2</sub> va atteindre son maximum, ce point correspond à la vitesse maximale de fermentation (Vmax) qui est caractérisée par sa valeur en débit de CO<sub>2</sub> et par le temps mis pour l'atteindre. Cette phase est limitée par la disponibilité de l'azote assimilable (acides aminés et azote ammoniacal) et la régulation de la température [23].

La dernière phase est la phase stationnaire (3 sur la figure 2). Lors de cette phase, l'essentiel des sucres est fermenté et les levures arrêtent de se multiplier. L'activité fermentaire diminue dû principalement à l'augmentation de la concentration en éthanol qui altère l'intégrité de la membrane plasmique des levures et par conséquent le transport cellulaire comme celui du

glucose. Les micro-organismes ont un comportement variable durant cette phase lié aux phénomènes de résistances diverses et interdépendantes comme la résistance à la température, à l'éthanol ou à l'affinité de transport des sucres [23]. À la fin de cette phase, l'entière des sucres a été fermentée. Plusieurs jours après leur mort cellulaire, les levures peuvent s'autolyser : elles subissent une auto-dégradation enzymatique et libèrent dans le vin des acides aminés, des composés aromatiques ou encore des protéines. Les amines de l'autolyse peuvent être utilisées comme source d'azote et de carbone par des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et mener à un taux d'alcool supérieur en fin de FA [25].

Les paramètres mesurés pour analyser une fermentation sont la  $V_{max}$ , le temps nécessaire pour atteindre la  $V_{max}$ , le temps de latence et le temps total de fermentation (figure 2). Ils sont analysés sur les graphiques de cumul et de débit du  $CO_2$  en fonction du temps.

### 1.2.2. Les différents types de fermentation

La fermentation peut être réalisée grâce à l'inoculation d'une levure commerciale, levure sèche active (LSA), ou de façon spontanée, utilisant les levures indigènes sans ajout de préparation commerciale. Ces dernières années, avec le développement de l'agriculture biologique, les viticulteurs s'orientent de plus en plus vers la fermentation spontanée (ou indigène) laissant se développer les levures et bactéries indigènes considérées parfois comme partie intégrante du terroir et de la typicité des vins. Cependant, ces fermentations sont difficiles à maîtriser et sont parfois source de difficultés dans la fermentation ou d'altération des arômes contrairement aux levures commerciales considérées comme plus fiables et reproductibles. Des solutions pour maîtriser ces fermentations indigènes ont été trouvées telles que la sélection des souches issues des exploitations ou la réalisation d'un pied de cuve de microorganismes indigènes [26]. Le pied de cuve est un levain préparé par le viticulteur qui provient d'un moût de raisins sélectionnés. Il permet de multiplier les levures indigènes pour l'étape de vinification.

Une étude a été réalisée sur la différence entre les trois méthodes de fermentation (spontanée, par pied de cuve ou par ensemencement de LSA) au niveau métabolique, chimique et sensoriel dans le chardonnay et le pinot Noir. L'analyse des composés aromatiques volatils a révélé une augmentation de certains groupes de composés spécifiques dans chaque fermentation : le chardonnay par exemple a montré une intensité aromatique plus élevée avec les levures commerciales et la fermentation spontanée qu'avec le pied de cuve [27].

De plus, l'échelle de fermentation (la taille du fermenteur) choisie a un impact sur la cinétique fermentaire [28]. Les fermentations de 100 L ont montré une fermentation plus lente que les fermenteurs de 1 L et des différences significatives ont été observées dans la préservation de certains composés volatils tels que l'acétate d'isobutyle, l'isobutanol et le 3-mercaptophexanol bien que l'ajout de particules solides issues de moût de raisin diminue cet écart.

## 1.3. L'importance du microbiote des baies de raisin

### 1.3.1. La diversité

De nombreuses espèces de micro-organismes sont présentes dans le moût tout au long du

processus de fermentation tels que des champignons filamenteux, des bactéries et des levures. Les levures de fermentation peuvent être divisées en deux groupes : les levures *Saccharomyces* et les levures non-*Saccharomyces*. *S. cerevisiae* est une levure très importante dans le secteur viticole permettant notamment de finir la fermentation avec une cinétique fermentaire rapide ( $V_{max}$  aux alentours de 1 g/L/h, temps de latence faible). Elle est utilisée comme modèle de la FA.

Ces microorganismes peuvent être amenés par différentes sources dans le moût. Les souches autochtones de *S. cerevisiae* (présentes naturellement sur les baies de raisins) sont peu présentes dans le vignoble. Cependant, certaines souches sont amenées par l'environnement de la cave, *S. cerevisiae* pouvant persister dans l'écosystème de la cave jusqu'à un an. Les levures non-*Saccharomyces* sont apportées dans le moût par le vignoble car elles sont présentes à la surface des raisins, mais également par la cave (le sol, l'équipement, l'air et les murs). Elles peuvent alors introduire des espèces d'intérêt (*Hanseniaspora* et *Starmerella*) ou indésirables (*Dekkera* et *Zygosaccharomyces*) [29],[30].

Trois groupes de levures non-*Saccharomyces* peuvent être retrouvés dans les premières étapes de la fermentation : les levures aérobies (par exemple les genres *Pichia*, *Rhodotorula* et *Cryptococcus*), les levures à faible capacité de fermentation (*Kloeckera*) et les levures à métabolisme fermentatif typique (*Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulasporea*). Au total, plus de 293 espèces de levures non-*Saccharomyces* sont signalées sur plus de 33 pays englobant quatre continents et plus particulièrement en Europe où le plus grand nombre d'espèces ont été isolées. [30]

Les levures non-*Saccharomyces* ont longtemps été considérées comme sources de contamination dans la production et la conservation du vin, principalement en raison des niveaux élevés d'acidité volatile obtenus. Cependant, ces levures sont aujourd'hui considérées comme très importantes dans la fermentation notamment pour leur impact sur la composition chimique et les propriétés sensorielles du vin. [30]

### 1.3.2. Les facteurs influençant le microbiote

La diversité du microbiote est influencée par divers facteurs biotiques (interactions du vivant sur le vivant dans un écosystème) et abiotiques (acteurs non-vivants issus du milieu de nature physique ou chimique).

Parmi ces facteurs on retrouve l'influence de l'environnement. En particulier, la région géographique du raisin et son climat impactent le microbiote : les climats frais ou humide comme ceux de l'Europe centrale favorisent le développement de micro-organismes permettant à certaines levures d'être surreprésentées [30]. De plus, les changements climatiques ont un impact sur la diversité. En effet, de nombreuses études ont montré cet impact, notamment une étude publiée dans *Science et Technology* [31] qui a montré que les communautés fongiques et bactériennes varient d'un millésime à l'autre et sont impactées par les précipitations et la température de la journée.

Le facteur variété est également important car il peut influencer le profil organoleptique des vins. D'autre part, l'état de la baie, si elle est endommagée ou non, va impacter la diversité du microbiote. Les grappes contenant quelques baies décomposées vont apporter un plus grand nombre d'espèces que les grappes saines, certaines espèces de levures étant associées aux raisins aigres pourris, telles que *Pichia occidentalis*, *Zygoascus hellenicus* et *Zygosaccharomyces bailii* [30].

L'utilisation des intrants a un impact sur la diversité microbienne. Cet effet fait débat dans la communauté scientifique : une étude [32] a montré une moindre diversité de levures dans les vignobles conduits en agriculture biologique (utilisation de cuivre/soufre) par rapport aux vignobles conventionnels (fongicides) où les espèces telles que *Metschnikowia pulcherrima* et *S. cerevisiae* ont été davantage identifiées tandis qu'une autre étude [33] a montré une réduction de la diversité des levures par les traitements conventionnels, entraînant une influence négative sur les levures en fermentation au profit des levures oxydatives telles que *Aureobasidium pullulans*.

Les pratiques œnologiques impactent le microbiote, certaines espèces étant sensibles au degré de clarification (*Starmerella bacillaris* [*Candida zemplinina*]), à l'ajout de sulfite (*Saccharomyces spp.* autres que *S. cerevisiae*), à l'inoculation de levures au démarrage de la FA (*Hanseniaspora spp.*) ou à la température préfermentaire (*Torulaspora delbrueckii*). Il existe des effets d'interaction significatifs entre ces pratiques, certains facteurs pouvant atténuer l'effet des autres. De manière plus générale, les stress de la fermentation (la pression osmotique, le pH, la température, la disponibilité des nutriments ou le SO<sub>2</sub>) induisent une réponse individuelle de chaque espèce, réponse qui est également influencée par les interactions entre les espèces au sein de l'écosystème [34 et 35].

Déterminer et connaître l'ensemble des facteurs influençant la richesse du microbiote et l'hétérogénéité dans le moût de raisin est essentielle afin de maîtriser la fermentation qui est impactée par la succession et la dynamique des levures tout au long de la FA [36].

Un schéma récapitulatif des facteurs influençant le microbiote est présenté en [annexe 2](#).

### 1.3.3. Dynamique du microbiote

La fermentation spontanée du vin est caractérisée par l'évolution de la population de levures. Elle est modulée par des interactions physiques et métaboliques complexes entre différentes espèces [34].

La levure *S. cerevisiae* est présente dans de faibles proportions sur les baies de raisin et dans le moût frais en début de fermentation. Les espèces non-*Saccharomyces*, et en particulier les genres *Hanseniaspora* et *Candida*, sont prédominantes sur les raisins et en début de fermentation. Elles commencent à transformer le sucre en alcool et en CO<sub>2</sub>. Ces espèces sont très diversifiées dans la fermentation. Cependant, à mesure que la fermentation progresse, la population de *S. cerevisiae* augmente considérablement et finit par être l'espèce prédominante de la FA causant la mort de certaines espèces non-*Saccharomyces* par sa forte production

d'éthanol et de chaleur. La population des non-*Saccharomyces* diminue donc au cours de la fermentation due à leur faible résistance à l'éthanol, au manque d'azote et à l'anaérobiose. De plus, *S. cerevisiae* est également compétitive par la sécrétion de composés toxiques tels que l'acétaldéhyde, par l'utilisation plus rapide et plus efficace de l'azote ainsi que par les interactions de contact cellulaires [35].

Ainsi, les espèces de levures faiblement fermentatives (*Pichia terricola*, *M. pulcherrima* et *Hanseniaspora uvarum*) sont présentes dans le moût de départ et vont être remplacées au cours de la fermentation par des espèces plus fortement fermentatives (*Lachancea thermotolerans* et *T. delbrueckii*). Enfin, *S. cerevisiae* achèvera généralement la FA lorsque le taux d'alcool est élevé et que l'oxygène est épuisé (Figure 3) [34].

La consommation des sucres (glucose et fructose sont les principaux sucres fermentescibles du moût) peut évoluer au cours de la FA suivant la population de levures. Il existe des espèces fructophiles, consommatrices de fructose, d'autres glucophiles qui préfèrent le glucose au fructose. *S. cerevisiae* par exemple est une levure glucophile. Cela peut causer des déséquilibres dans la FA, les levures ont parfois du mal à consommer les sucres qu'elles apprécient moins, principalement dans des conditions difficiles de FA [38].

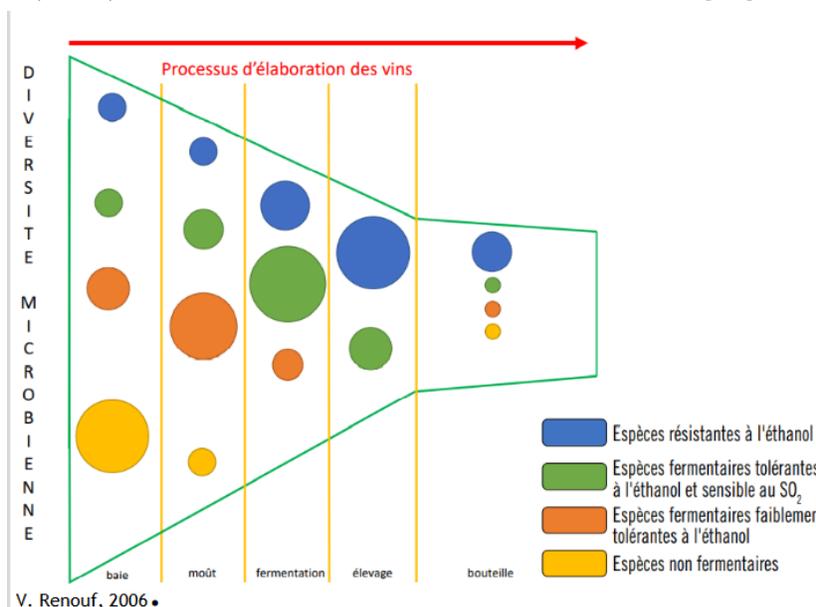


Figure 3 : Schéma de la dynamique du microbiote [37]

#### 1.3.4. Effet sur la qualité du vin final

La dominance des non-*Saccharomyces* dans les premières étapes de la FA spontanée a un intérêt particulier en œnologie. Elles impactent la composition du vin notamment des arômes organoleptiques et le goût en produisant des métabolites secondaires tels que des esters, des alcools supérieurs, des acides, des thiols volatils ou des enzymes extracellulaires telles que les  $\beta$ -glucosidases, des estérases, des lipases et des protéases [35]. Leur contribution au caractère final du vin dépend de l'espèce et de sa persistance pendant la FA [34].

Les levures non-*Saccharomyces* contribuent à plusieurs autres caractéristiques organoleptiques positives dans le vin. Elles permettent notamment d'augmenter les composés spécifiques tels que la teneur en glycérol et l'acidité totale. Elles réduisent la teneur en acide acétique et contrôlent la microflore d'altération. Ainsi, elles améliorent de manière globale la qualité du vin et sa complexité aromatique [30].

Cependant, cette contribution n'est pas toujours positive. Certaines levures peuvent altérer la qualité du vin : des espèces de levures comme *Hanseniaspora spp.* peuvent apporter certaines caractéristiques indésirables telles qu'une production accentuée d'acide acétique. D'autres levures d'altération telles que *Brettanomyces intermedia* et *Pichia membranifaciens* peuvent apparaître après la fermentation et causer des défauts graves dans le vin final [39]. De plus, si le temps de latence est trop long et le démarrage de la fermentation trop lent, nous pouvons observer des "piqûres acétiques" dû au développement en trop forte proportion de bactéries acétiques qui vont produire des acides donnant au vin avec un goût vinaigré.

Le réchauffement climatique favorise la maturation du raisin et augmente fortement le taux de sucre. Cela entraîne une élévation de la teneur en alcool du vin qui a atteint des degrés supérieurs à ceux habituels (le vin languedocien a augmenté de 1° tous les dix ans depuis les années 80) [18]. Certaines levures non-*Saccharomyces* ayant un rendement en alcool inférieur à celui de *S. cerevisiae* seraient une réponse pour diminuer le degré d'alcool. De plus, les variétés Bouquet (variétés hybrides telles que le G14) produisent moins de sucre et entraînent un degré d'alcool inférieur.

#### 1.4. méthodologie pour caractériser le microbiote

Pour analyser les communautés microbiennes, diverses méthodes sont utilisées. Les techniques les plus classiques sont la culture des micro-organismes, l'observation microscopique et les tests biochimiques. L'utilisation des milieux de culture fait cependant débat dans la communauté scientifique car ces méthodes donnent des résultats peu représentatifs des communautés. L'étude du microbiote peut également se faire d'un point de vue métabolique en étudiant la réponse d'une communauté face à des facteurs biotiques ou abiotiques. Cette méthode consiste à observer le comportement catabolique d'un individu vis à vis de plusieurs substrats à l'aide d'un système de microplaques contenant différents substrats carbonés (Galeries API®) [40].

La biologie moléculaire a permis l'émergence de nouvelles méthodes permettant l'analyse génétique d'espèces cultivées ou de l'ADN total extrait des échantillons environnementaux. L'ADN total est étudié soit par des approches de type méta-génomique à partir du séquençage de l'ADN directement extrait d'un échantillon sans les étapes de clonage ou d'amplification, soit en ciblant des gènes avec un intérêt en analyse taxonomique comme l'ARN ribosomique (16S, 26S) ou les gènes fonctionnels avec des fonctions écologiques spécifiques (*rpoB*, *nifH*) [40]. Dans ce type de méthode, plusieurs marqueurs sont envisageables pour permettre l'identification et l'analyse de l'ADN des levures de manière sélective, les marqueurs ITS1 et

ITS2. Ces marqueurs sont des Espaces Internes Transcrits de l'ADN ribosomique. Ils sont relativement bien conservés et utilisés pour établir l'identification taxonomique des levures [41] (Figure 4).

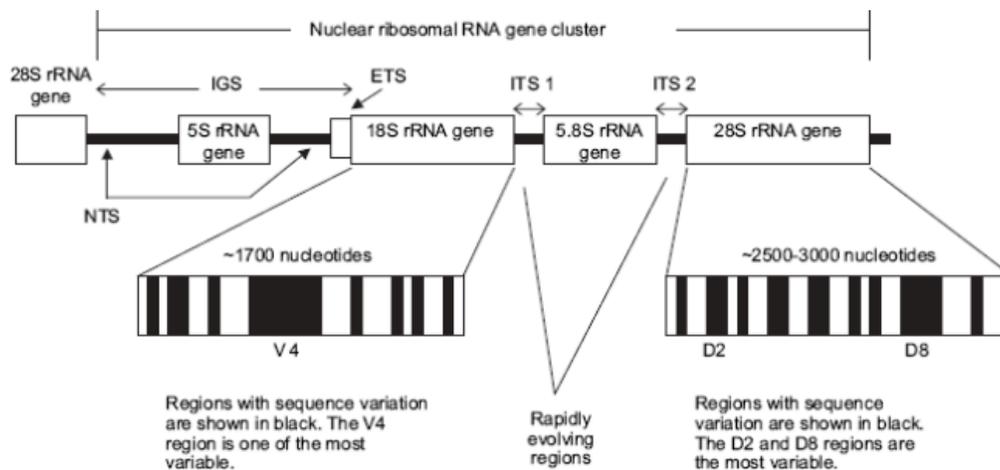


Figure 4 : Structure du gène d'ARNr ribosomique des eucaryotes [41]

## 2. Problématique

La fermentation spontanée est de plus en plus valorisée par les vignerons pour créer des vins uniques et plus complexes. La réussite de ces fermentations et la qualité du vin final sont en partie dépendantes de la composition du microbiote à la surface des baies de raisin à maturité, et notamment de la présence d'espèces fermentaires. Favoriser et contrôler les levures permet d'augmenter et de contrôler la qualité finale d'un vin. Si de nombreuses données existent sur ces communautés indigènes à la vigne et en oenologie, il n'y a pas à ce jour d'étude exhaustive sur les communautés microbiennes des variétés résistantes qui sont pourtant en plein essor ces quinze dernières années au vu des enjeux climatiques actuels.

Une étude approfondie des espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces* du microbiote des variétés résistantes est donc nécessaire. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet OenoVard'Occ débuté en avril 2023. Le projet a pour but d'acquérir des données sur la composition des communautés microbiennes des variétés résistantes par comparaison aux cépages traditionnels et d'évaluer les facteurs structurant leur variabilité (variété, localisation, millésime, environnement agro-écologique...). Il fait suite au projet MicroVarioR, financé par le métaprogramme METABIO d'INRAE abordant cette thématique sur les vins bio issus de variétés résistantes.

Dans ce cadre, au cours de mon stage, je vais m'intéresser à deux problématiques principales :

- Quelle est la composition des microbiotes présents sur la baie et au cours de la fermentation ? Quelles sont les différences de diversité du microbiote observées entre et chez les espèces traditionnelles et résistantes ?
- Quel est l'impact du microbiote sur la qualité des vins?

### 3. Organisation et objectifs de stage

Mon stage s'inscrit dans le cadre du projet OenoVard'Occ qui a pour objectifs de caractériser la diversité des microbiotes des baies de raisin, de hiérarchiser les facteurs structurant cette diversité et d'évaluer l'impact du microbiote sur la cinétique fermentaire et la qualité des vins.

Pour répondre aux objectifs du projet OenoVard'Occ, trois expérimentations avec trois objectifs distincts ont été mises en place dans le cadre de mon stage :

- La première a porté sur l'étude de la diversité des microbiotes de baies de raisin et de la fermentation spontanée. Elle consistait en la comparaison des microbiotes de 4 variétés prélevées dans 4 domaines et de leurs cinétiques fermentaires.
- La deuxième avait pour objectif de mesurer l'impact de l'ajout de *S. cerevisiae* sur la cinétique et sur les composés aromatiques en fin de fermentation (la qualité du vin).
- La troisième et dernière expérimentation a permis de mesurer l'impact du microbiote sur la cinétique et sur les composés aromatiques des vins. Elle a consisté en la mise en fermentation d'un moût flash pasteuriséensemencé avec différents microbiotes : un microbiote issu de pieds de cuve, un avec le rinçage des baies de raisins et un dernier avec *S. cerevisiae*. L'ensemencement à l'aide d'un rinçage de baies est une preuve de concept utilisé pour la première fois dans cette étude.

Ces trois expérimentations réalisées pendant mon stage ont permis de contribuer à l'avancement du projet OenoVard'Occ. Elles s'inscrivent dans la thèse de Gabriela Pinto Miguel, une doctorante travaillant sur le projet. En outre, j'ai également participé à la collecte, l'analyse et le traitement des 37 autres modalités associées au projet. J'ai pu donc être impliquée activement dans l'ensemble des aspects du projet.

Afin de participer à l'ensemble des phases du projet OenoVard'Occ, de la récolte des raisins à la vinification et l'analyse des échantillons produits, mon stage a été divisé en deux parties. La première s'est déroulée à l'UE de Pech Rouge pendant la période des vendanges 2023. Cette partie sur le terrain a eu deux objectifs :

- Effectuer les prélèvements de baies sur trois dispositifs expérimentaux viticoles pour récupérer et dénombrer les microorganismes présents à leur surface.
- Réaliser des microvinifications (en 1 kg) en flore indigène, suivre leur déroulement, assurer les prélèvements pour des analyses microbiologiques ultérieures et des analyses physico-chimiques (HPLC et GC-MS).

La deuxième partie du stage s'est déroulée à l'UMR SPO post vendanges. Cette partie a consisté au traitement en laboratoire de tous les échantillons prélevés lors de la campagne d'essais sur le terrain. Les objectifs ont été de :

- Caractériser la composition des communautés microbiennes (levures, champignons) des échantillons de baies et des fermentations par métabarcoding. Des extractions d'ADN et des amplifications par PCR ont été réalisées et suivies d'un séquençage avant de faire un traitement informatique et statistique des données.
- Réaliser des analyses physico-chimiques telles que l'HPLC et la GC-MS afin d'évaluer la qualité du vin produit par nos différentes modalités.
- Mettre en lien les cinétiques fermentaires et l'analyse de la diversité du microbiote.

## IV/ MATERIEL ET METHODES

### 1. Dispositif viticole

#### 1.1. Les différents cépages et variétés

Dans l'ensemble du projet Oenovard'Occ, une sélection de 25 variétés de raisins rouges a été récoltée sur quatre lieux différents. Des cépages résistants, traditionnels et méditerranéens sont présents dans cette étude ([Annexes 3 et 4](#)).

Ces variétés ont été prélevées sur 4 vignobles en Occitanie : au domaine du Chapitre à Villeneuve-lès-Maguelone à 10 km au sud de Montpellier, au domaine expérimental de Vassal à Marseillan-plage à 30 km à l'est de Béziers, à l'UE de Pech Rouge à Gruissan et au domaine de Cazes de la chambre d'agriculture de l'Aude à 30 km à l'ouest de Carcassonne. Le domaine de Vassal a un intérêt particulier, les variétés recherchées sont présentes sur une unité de surface réduite ce qui permet de diminuer certains biais liés à l'hétérogénéité de parcelles.

Nous pouvons rajouter à ces variétés celles étudiées dans le projet précédent MicroVarioR dans lequel 8 variétés et cépages ont été étudiés : 4 cépages classiques (syrah, muscat, grenache blanc, carignan et merlot) et 4 variétés résistantes (floréal, artaban, G5 et G14). Elles ont été prélevées à Pech Rouge à Gruissan, au domaine de Vassal, au domaine de Coupe Roses dans le minervois (Aude) ainsi que dans les parcelles du programme INRAE ResIntBio de Bordeaux.

Dans le cadre de ce rapport, nous ne considérerons que quatre variétés, deux variétés résistantes (artaban et G14) et deux traditionnelles (syrah et carignan) en incluant celles collectées en 2021 et 2022 (Tableau 1 et [carte Annexe 4](#)).

*Tableau 1: Tableau récapitulatif des lieux et des années de récolte pour les 4 variétés étudiées*

Variété / Lieux de récolte	Pech Rouge	Cazes	Vassal	Chapitre	Bordeaux	Coupe Roses
Artaban	2 parcelles (2023), 1 (2022), 1 (2021)	1 parcelle (2023)	1 parcelle (2023), 1 (2022)	3 parcelles (2023)	1 parcelle (2021)	x
G14	2 parcelles (2023), 1 (2022), 1 (2021)	1 parcelle (2023)	1 parcelle (2023), 1 (2022)	x	x	1 parcelle (2021)
Syrah	1 parcelle(2023), 1 (2022), 1 (2021)	1 parcelle (2023)	1 parcelle (2023)	1 parcelle (2023)	x	x
Carignan	1 parcelle (2023), 1 (2022), 1 (2021)	x	x	x	x	x

## 1.2. Le traitement général des raisins

Le traitement du raisin a été le même pour toutes les modalités récoltées. Des triplicatas ont été réalisés pour chaque modalité. Les récoltes et prélèvements ont été réalisés dans des conditions de stérilité. Tous les outils (sérateurs et seaux pour récolter le raisin) ont été stérilisés à l'éthanol. Le port de gants permet de ne pas contaminer les baies. Les différentes étapes de ce traitement sont représentées sur la Figure 5 puis détaillées ci-dessous.

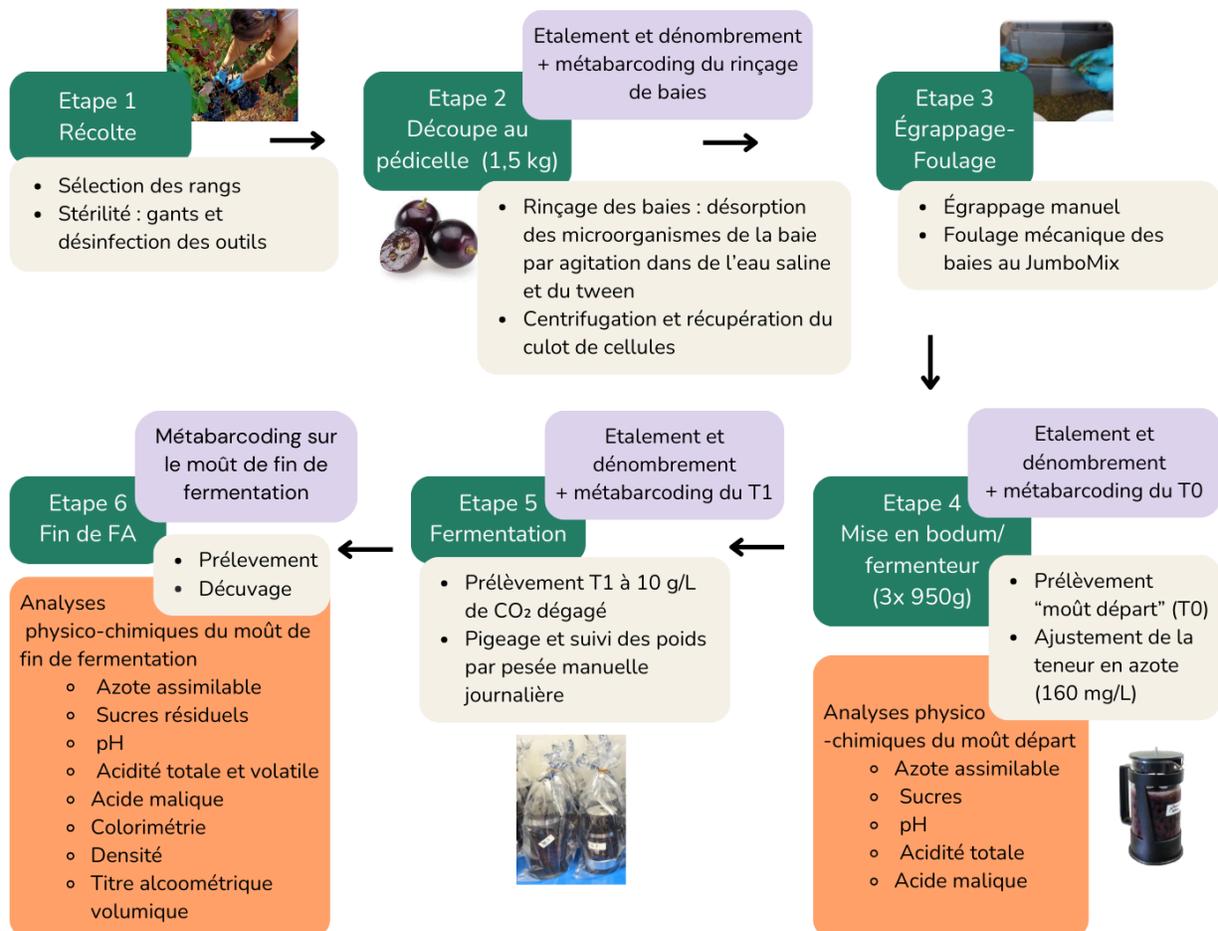


Figure 5: Schéma récapitulatif du traitement du raisin de la récolte à la fin de fermentation

### 1.2.1. La récolte

Pour chaque cépage, nous avons cueilli environ 10 kg de baies de raisin sur des rangs sélectionnés. Afin d'être le plus représentatif possible de la parcelle, les grappes ont été prélevées tout le long de la rangée et à différents endroits des ceps (en haut, en bas, aux versants à l'ombre et au soleil).

### 1.2.2. La découpe au pédicel

Les grappes sont ensuite comptées et pesées afin d'obtenir le poids moyen d'une grappe. Les baies, prélevées sur l'ensemble de la grappe, sont coupées au niveau du pédicel puis mélangées et séparées en 3 lots de 500 g. Chaque lot est incubé dans 400 g de tampon NaCl

0,9% et Tween, et mis à agiter pendant 1h30 à 125 rpm afin de désorber l'ensemble des micro-organismes présents à la surface des baies. Le tampon contenant les micro-organismes des baies sera appelé le rinçage de baies dans le reste du rapport. Un prélèvement de 1 mL est effectué sur l'eau de rinçage des baies afin de réaliser un étalement sur boîte de Petri. Le reste du tampon est centrifugé dans un tube de 400 mL pendant 15 minutes à 9600 rpm puis dans un tube de 40 mL à 9000 rpm pendant 10 minutes. Le culot de centrifugation est conservé à -20°C.

### 1.2.3. Egrappage-Foulage

Le reste des baies n'ayant pas été coupées au pédicel est ensuite égrappé à la main avec des gants stériles. Les baies sont ensuite mélangées et séparées en trois lots de 950 g. Chaque lot est foulé mécaniquement pendant 1 minute 30 au Jumbo Mix. A cette étape, l'échantillon est appelé moût départ ou T0. Une analyse physico-chimique est réalisée (azote assimilable, sucres, pH, acidité totale, acide malique) ainsi qu'un prélèvement de 1 mL pour un étalement sur boîte de Petri.

### 1.2.4. Fermentation

Chaque lot de baies foulées est ensuite mis dans des cafetières à piston (bodums) stériles. Pour éviter une contamination par le chai, les bodums sont placés dans des sacs à autoclave fermés par un élastique. Ils sont ensuite placés dans une pièce thermostatée à 24°C. Les moûts carencés en azote assimilable ont été complétés avec du DAP (Phosphate Diammonique) afin d'atteindre un taux d'azote de 160 mg/L. Ce taux d'azote est essentiel au bon déroulement de la FA.

La fermentation des bodums est suivie quotidiennement par une prise de poids manuelle. Afin d'éviter des piqûres acétiques (développement de bactéries acétiques) et favoriser la macération, un pigeage a lieu avant chaque pesée en enfonçant les matières solides en surface du bodum grâce à son piston. Pour les modalités 39 et 40 (expérimentation 3) qui ont été réalisées au plateau de fermentation à l'UMR SPO, le suivi des poids est réalisé de façon automatique toutes les 20 minutes.

La perte de masse des bodums correspond au CO<sub>2</sub> produit et dégagé lors de la FA. Nous pouvons ainsi suivre la fermentation et déterminer la cinétique fermentaire représentée par le cumul de la masse de CO<sub>2</sub> dégagé ou du débit de CO<sub>2</sub> en fonction du temps. Les paramètres observés sont le temps de latence (temps nécessaire pour que le cumul de CO<sub>2</sub> atteigne 1 g pour 1 L de moût), la Vmax (vitesse maximale de débit de CO<sub>2</sub>) et le temps associé (TVmax), ainsi que le temps de FA (temps au bout duquel la FA est terminée).

Un prélèvement à T1 correspondant à 10 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé est réalisé au cours de la FA puis centrifugé dans un tube de 40 mL à 9000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est conservé à -20°C pour le métabarcoding. Un prélèvement de 1 mL est également réalisé pour un étalement sur boîte de Petri.

Les manipulations sont réalisées sous PSM afin d'éviter de contaminer les moûts.

### 1.2.5. Fin de fermentation

Lorsque nous n'observons plus de perte de masse et que le cumul de CO<sub>2</sub> correspond au cumul théorique attendu en fin de FA, nous pouvons considérer que la fermentation est terminée et

nous pouvons découvrir l'échantillon.

Lors du décuvage, après pigeage, diverses données sont récupérées : le volume final de la phase liquide et sa densité. Ensuite, un prélèvement est effectué et centrifugé. Ce prélèvement sera appelé fin de FA dans le reste du rapport. Le culot de centrifugation contenant les micro-organismes est conservé à -20°C pour le métabarcoding. Le surnageant est divisé en 2 fioles de 10 mL qui vont permettre de réaliser la GC-MS, et 125 mL servira à réaliser des analyses physico-chimiques (azote assimilable, sucres résiduels, pH, acidité totale et volatile...).

## 2. Les différentes expérimentations

### 2.1. Expérimentation 1 : la diversité des microbiotes

L'expérimentation 1 porte sur l'analyse de la diversité des microbiotes sur baies et au cours de la fermentation dans les variétés résistantes en comparaison des cépages traditionnels. Elle englobe l'étude des variétés résistantes artaban et G14 et les cépages traditionnels syrah et carignan dans les 4 domaines du projet. Au total, cette expérimentation regroupe 16 modalités en 2023 (voir partie IV paragraphe 1-a ). Les données de 2021 et 2022 seront intégrées aux analyses uniquement pour le métabarcoding.

Chaque modalité de 2023 a été traitée comme présenté dans la partie IV paragraphe 1-2. Des triplicatas de 500 g de raisins ont été rincés pour récolter le microbiote des baies afin d'évaluer la quantité de cellules de levures et bactéries et de réaliser une analyse de métabarcoding.

Les 16 modalités ont été mises à fermenter dans des bodums. Des triplicatas ont été réalisés pour une analyse statistique fiable. Le suivi de cinétique fermentaire a été effectué par pesée quotidienne des bodums. Des prélèvements ont été effectués à T0 et T1 pour estimer la quantité de cellules de levures et bactéries, et déterminer la composition physico-chimique des moûts et la composition du microbiote. Des colonies isolées de levures ont également été repiquées à partir des boîtes de milieu gélosé afin de les identifier taxonomiquement (partie IV paragraphe 4.2). Cela a permis d'avoir une première idée de l'ensemble des levures présentes dans chaque modalité.

### 2.2. Expérimentation 2 : impact de l'ajout de *S. cerevisiae*

L'expérimentation 2 a pour objectif de mesurer l'impact de l'ajout de *S. cerevisiae* sur la cinétique et sur les composés aromatiques (la qualité du vin).

Nous avons récolté 15 kg d'artaban dans une parcelle des Colombiers, coupé les baies au pedicel, effectué le rinçage des baies et l'égrappage foulage de la même façon que précédemment (voir partie IV paragraphe 1-2). Les fermentations ont eu lieu à l'UE de Pech Rouge.

Les baies égrappées ont été mélangées et séparées en 9 lots de 950 g. Chaque lot a été foulé mécaniquement puis inséré dans un bodum. Trois bodums ont été mis en fermentation spontanée complète, trois autres ont démarré en fermentation spontanée puis ont été inoculés avec la souche K1 de *S. cerevisiae* après une étape d'environ 10 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé. Les 3 derniers bodums ont été inoculés avec *S. cerevisiae* à T0. La fermentation a été suivie par

pesée quotidienne des bodums (voir partie IV/ paragraphe 1-2). Les bodums de cette expérimentation ont été placés dans une pièce séparée à Pech Rouge, *S. cerevisiae* pouvant contaminer la pièce avec les autres fermentations.

Le codage de ces modalités est :

- 2023-OC38-1 à 3 : Artaban en fermentation spontanée complète
- 2023-OC38-4 à 6 : Artaban démarré en fermentation spontanée puis inoculé avec *S. cerevisiae* à 10 g de CO<sub>2</sub> dégagé
- 2023-OC38-7 à 9 : Artaban inoculé avec *S. cerevisiae* à T0

Diverses analyses ont été effectuées sur l'expérimentation 2 (Figure 8).

Comme pour l'expérimentation 1, pour chaque bodum, un prélèvement de 1 mL issu du rinçage de baies et à T0 a servi aux étalements sur boîtes de milieu gélosé. Les levures et bactéries présentes sur chaque boîte ont été dénombrées. Le microbiote des baies de raisins, à T0, T1 (10 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé) et en fin de FA a été analysé par métabarcoding.

Une analyse des composés volatiles en fin de FA a été réalisée par GC-MS et a permis de mesurer les différents arômes fermentaires présents dans nos échantillons. Une analyse a également été réalisée afin de connaître les caractéristiques du moût en fin de FA. Ces deux analyses vont permettre de mesurer l'impact sur la qualité finale du vin en fonction de l'ajout ou non de *S. cerevisiae*.

### 2.3. Expérimentation 3

L'expérimentation 3 a pour but de mesurer l'impact du microbiote total sur la cinétique fermentaire et sur les composés aromatiques du vin. Les fermentations ont été réalisées au plateau de fermentation de l'UMR SPO.

L'ensemble des expérimentations a été réalisé à partir d'un moût rouge flash détente pasteurisé de merlot. Les caractéristiques de ce moût sont les suivantes :

- Taux de sucre : 259,1 g/L (alcool probable : 15,4%)
- pH : 3,44
- Azote assimilable : 41 mg/L, ce taux d'azote est faible et signifie que le moût est carencé en azote. Ce taux sera ajusté à 160 mg/L avec du DAP (Phosphate Diammonique) afin de travailler dans des conditions optimales de fermentation.

Ce moût stérile a étéensemencé avec différents microbiotes obtenus soit par pied de cuve, soit par rinçage des baies de raisins.

Deux variétés différentes ont été utilisées : artaban (modalité 39) et carignan (modalité 40). Les variétés ont été récoltées et traitées de la façon indiquée précédemment (voir partie IV paragraphe 1-2).

Au total, 9 fermenteurs de 1L par variété ont été incubés en deux temps, qui correspondent

pour le premier au jour de collecte du raisin et du rinçage des baies, et pour le second au moment où la fermentation du pied de cuve a suffisamment avancé pour collecter le microbiote à ensemençer.

Le codage des modalités pour le premier temps :

- 2023-OC39-3/ 2023-OC40-2 : 1 fermenteur inoculé avec les microbiotes par rinçage de baies
- 2023-OC39-4 et 5 / 2023-OC40-3 et 4 : 2 fermenteurs inoculés avec *S. cerevisiae* en même temps que le rinçage de baies.

Pour le second temps :

- 2023-OC39-6 à 8/ 2023-OC40-5 à 7 : 3 fermenteurs inoculés avec le pied de cuve
- 2023-OC39-9 à 11/ 2023-OC40-8 à 10 : 3 fermenteurs inoculés avec *S. cerevisiae*.

Premièrement, le rinçage de baies a été effectué sur 3 kg de baies qui ont été coupés aux pédicelle et rincés (voir partie IV paragraphe 2-2). Le microbiote du rinçage de baies a été récupéré par centrifugation et a permis d'ensemencer immédiatement 1 L de moût pasteurisé dans un fermenteur à l'UMR SPO. En même temps, 2 fermenteurs ont été ensemençés avec la souche K1 de *S. cerevisiae* à  $2 \times 10^6$  cellules/ mL (figure 6).

Le jour du rinçage de baies, le pied de cuve a été réalisé de la façon suivante. Dans une dame-Jeanne en verre de 5 L, 3-4 kg de raisins de la variété ont été ajoutés après égrappage et foulage (voir partie IV paragraphe 2-2). La cinétique fermentaire du pied de cuve a été suivie comme précédemment par pesée journalière. A 30 g de CO<sub>2</sub> dégagé dans le pied de cuve de 3 L (soit 10 g/L de CO<sub>2</sub>), le moût de fermentation du pied de cuve a été récupéré, sa concentration en levure a été estimée à l'aide d'un coulter et son microbiote a été récupéré par centrifugation. Le culot de centrifugation a ensuite été remis en suspension dans un volume équivalent de moût stérile pour ensemençer trois fermenteurs à des concentrations de  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL. En parallèle, trois fermenteurs de *S. cerevisiae* ont été ensemençés à  $2 \cdot 10^6$  cellules/ mL. Les fermentations ont été suivies au plateau de fermentation de SPO (figure 7).

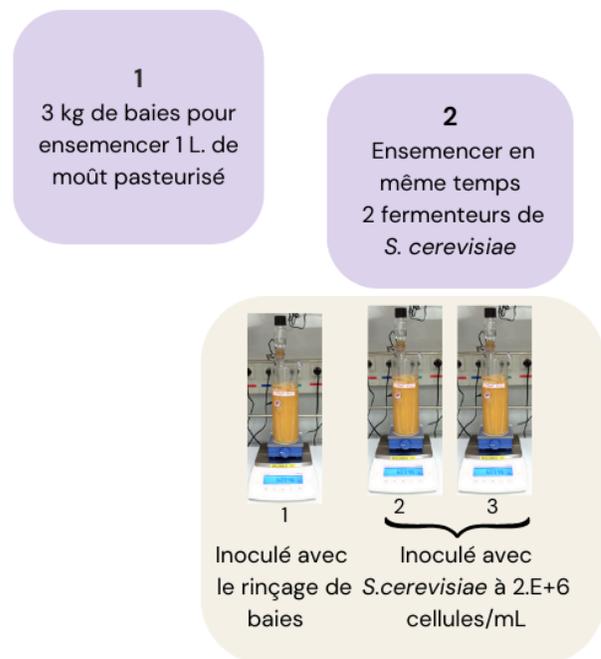
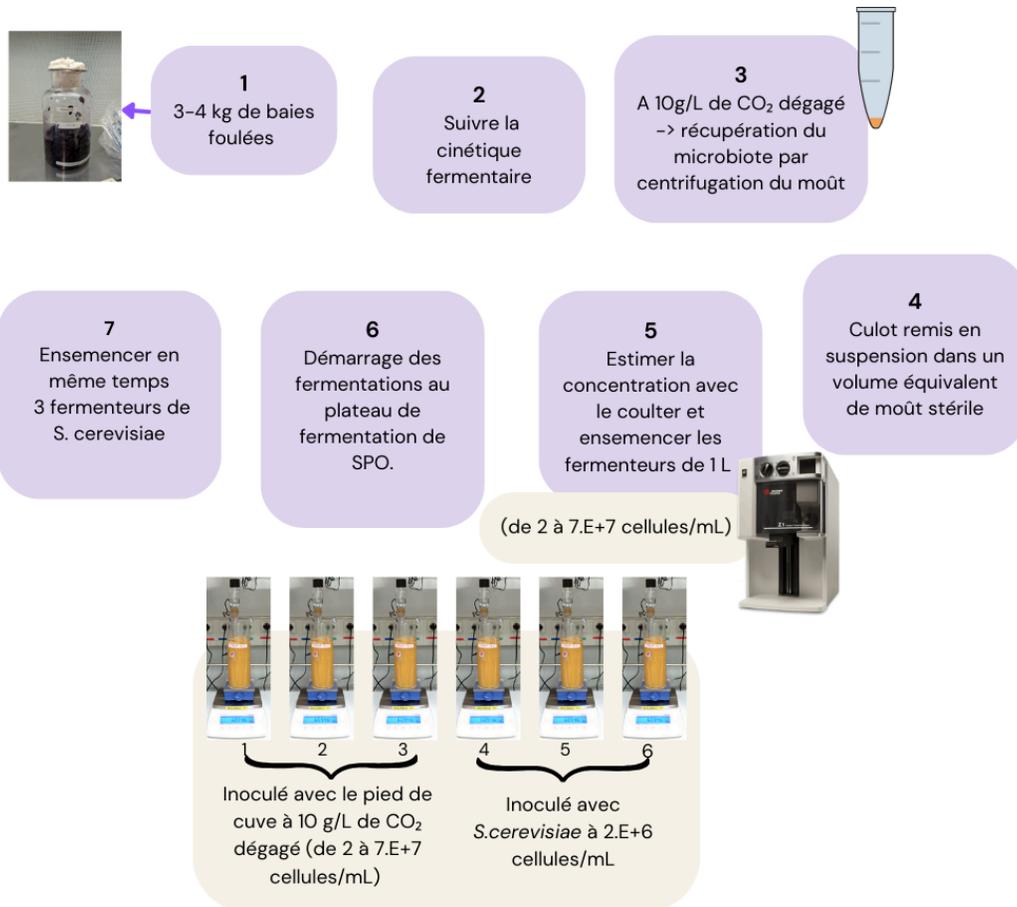


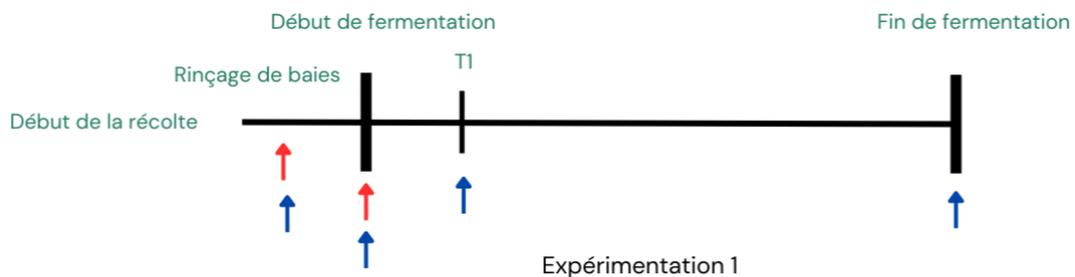
Figure 6 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation 3 partie 1

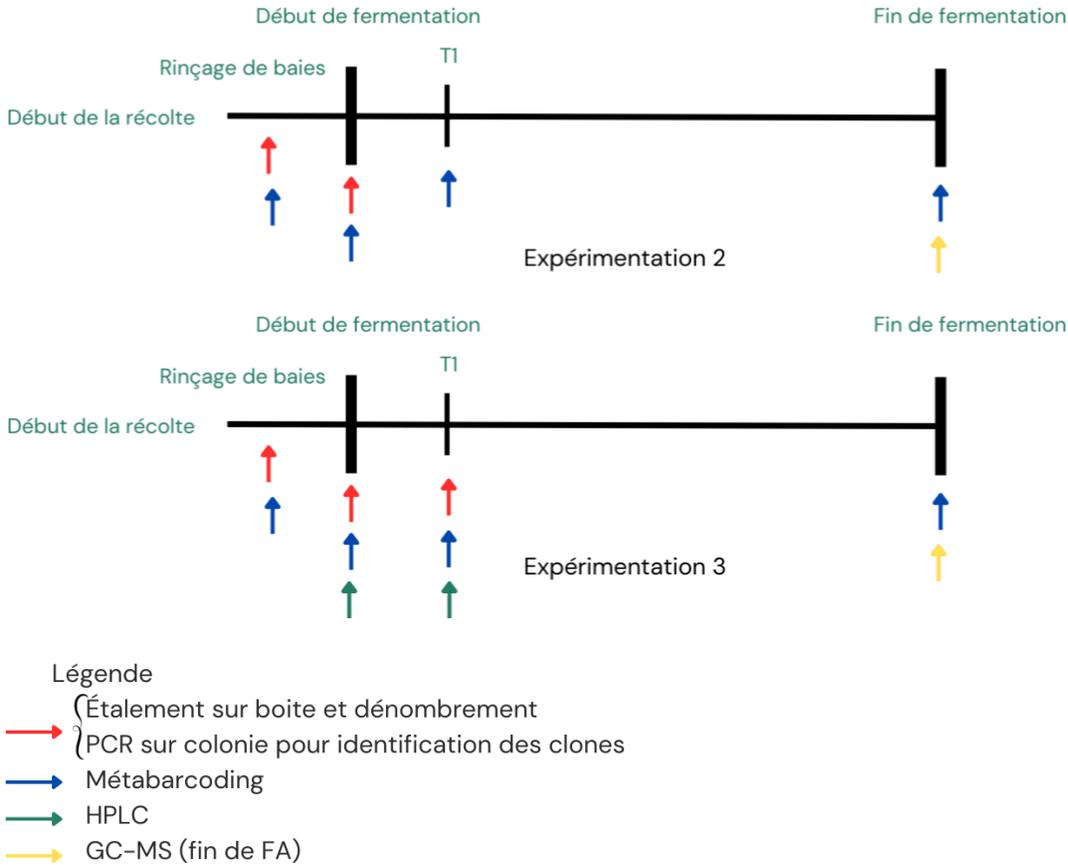


**Figure 7: Schéma récapitulatif de l'expérimentation 3 partie 2**

Les analyses de l'expérimentation 3 sont les mêmes que celles de l'expérimentation 2. En plus de ces analyses, des PCR sur colonies ont été réalisés sur les levures issues des étalements à T0, à T1 et sur les rinçages de baies. L'HPLC a été effectuée sur l'ensemble des prélèvements réalisés lors de la fermentation (T0, T1 et fin de FA).

Un résumé des différentes analyses est représenté sur la Figure 8 .





*Figure 8: Schéma récapitulatif des analyses pour les différentes expérimentations*

### 3. Les analyses

#### 3.1. Étalement sur boîte de Pétri et dénombrement

L'étalement sur boîte permet une analyse microbiologique des raisins et du moût par un ensemencement sur gélose afin de rechercher la présence de deux types de micro-organismes : les levures et les bactéries.

Des étalements sur boîte ont été réalisés avec des échantillons de 1 mL prélevés sur le rinçage de baies, sur le moût de raisin à T0 (début de fermentation) et également à T1 (au cours de la fermentation à 10 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé) pour chaque triplicata de chaque modalité.

Les prélèvements ont été dilués dans de l'eau stérile contenant 0,9% de NaCl, à des dilutions entre 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-6</sup> en fonction de la concentration en levures attendues. Sur chaque dilution, entre 1 et 3 boîtes ont été étalées et comptées par milieu.

##### 3.1.1. Milieux de culture

Les étalements ont été réalisés sur trois milieux différents. Afin de rechercher des levures, les milieux YPD et YNB ont été utilisés. Le milieu YNB (Yeast Nitrogen Base) est composé de : 1,7 g/L de poudre prête à l'emploi de YNB avec acides aminés et ammonium, 20 g/L de glucose et

20 g/L d'agar. Le milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose) contient 20 g/L de glucose, 20 g/L d'agar, 20 g/L de peptone, et 10 g/L d'extrait de levure. Afin de rechercher les bactéries acétiques, le milieu Carr contenant 1 mL de vert de Bromocrésol à 2,2%, 30 g/L d'extrait de levure et 20 g/L d'agar a été utilisé.

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120°C. Lorsque la température redescend à 50°C, des agents sélectifs et inhibiteurs sont ajoutés. Des antibiotiques tels que le chloramphénicol à 100 mg/L ont été ajoutés dans les milieux YNB et YPD pour réduire la croissance des bactéries ainsi que du biphényle à 150 mg/L, un fongicide utilisé pour inhiber la croissance des champignons très présents lors des vendanges 2023. Dans le milieu Carr, la nystatine a été ajoutée à 50 mg/L pour inhiber les levures.

### 3.1.2. Ensemencement et dénombrement

Chaque boîte a étéensemencée en surface avec 100 µL d'échantillon à l'aide de billes de verre. Les étalements ont été réalisés dans des conditions stériles, sous PSM ou hotte à flux laminaire. Les boîtes, une fois étalées et sèches, ont été placées à l'étuve à 30°C pendant 2 à 3 jours pour les milieux YNB et YPD et jusqu'à 5 jours pour les milieux Carr.

Les boîtes ont ensuite été comptées manuellement. Les levures sont reconnaissables par leur aspect circulaire et convexe voire parfois rugueux, leur texture crémeuse facilement identifiable par une pointe de cône de pipette et leur couleur blanche ou beige voire parfois rosée. Sur le milieu Carr, les bactéries sont de tailles variables. Leur colonies sont sèches, dur au prélèvement et s'insinuent dans la gélose. Elles prennent une couleur bleu avec un halo jaune dû à la présence de bromocrésol dans le milieu. Cet indicateur donne une couleur jaune au pH des acides produits par les bactéries acétiques.

### 3.2. PCR sur colonies pour identification des clones

Une PCR (polymerase chain reaction) sur colonies a été réalisée pour les colonies de levures présentant des caractéristiques (forme, couleur, taille) différentes des autres levures déjà identifiées et de *S. cerevisiae* (forme circulaire et convexe avec des bords réguliers, opaques et de couleur blanche, taille petite à moyenne). La PCR sur colonies va nous permettre d'identifier chaque colonie de levures et d'avoir ainsi une première idée des levures présentes dans chaque modalité aux différents temps de fermentation.

Les différentes colonies isolées de levures sont repiquées sur des boîtes de Petri avec du milieu YPD à l'aide d'un cône stérile. Les boîtes sont ensuite placées à l'étuve à 28°C pendant une nuit. Les différentes colonies de levures sont ensuite prélevées à l'aide d'un cône stérile et sont placées dans un puits d'une plaque PCR 96 puits contenant 100 µL de NaOH dilué à 0,02N dans l'eau stérile. La plaque est placée à 95°C pendant 10 min afin d'effectuer la lyse des cellules.

Une amplification par PCR est ensuite réalisée. La PCR, amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou réaction de polymérisation en chaîne, nous permet d'obtenir rapidement in vitro un

grand nombre de segments d'ADN identiques à partir d'une séquence initiale. Chaque puit contient alors 4  $\mu\text{L}$  de Tampon 10X, 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTP, 3  $\mu\text{L}$  d'amorce ITS1 à 5 pmol/ $\mu\text{L}$ , 3 $\mu\text{L}$  d'amorce NL4 à 5 pmol/ $\mu\text{L}$ , 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq sigma et 26,8  $\mu\text{L}$  d'eau ainsi que 2  $\mu\text{L}$  de cellules précédemment lysées. Les amorces ont été choisies pour amplifier les espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 variables chez les levures ainsi que la région D1/D2. Les dNTPs sont les 4 nucléotides de base (dATP, dCTP, dGTP, et dTTP) nécessaires à la construction de nouveaux brins d'ADN. La Taq polymérase permet la réaction de PCR. La plaque PCR est ensuite placée dans le thermocycleur sur le programme MLST ([Annexe 5](#)).

Le produit de PCR subit ensuite une restriction ou une digestion enzymatique. Dans une plaque PCR, le mélange réactionnel contient 1,5  $\mu\text{L}$  de Tampon 10X (cutsmart), 1  $\mu\text{L}$  d'enzyme HinfI, 2,5  $\mu\text{L}$  d'eau et 10  $\mu\text{L}$  de produit PCR. La plaque est ensuite incubée pendant 1h à 37°C. Cette restriction nous permet de couper notre ADN au niveau de sites spécifiques formant des fragments de différentes tailles spécifiques à l'espèce de levure étudiée.

Le produit de restriction est ensuite mis à migrer sur un gel d'agarose contenant 3% de Bromure d'éthidium (BET) et du tampon TAE 1X après avoir ajouté au préalable à nos produits 3  $\mu\text{L}$  de bleu de charge 6X. Les fragments d'ADN vont ainsi migrer sur le gel en fonction de leur taille vers le pôle positif, plus le fragment est petit, plus il migre rapidement et donc plus loin sur le gel. Le gel est ensuite visualisé sous UVs. Nous pouvons ainsi distinguer différents profils. Nous supposons que si deux profils sont identiques alors il s'agit de la même espèce de levure. Par la suite, nous envoyons à séquencer un produit de PCR par profil à la société Eurofins afin de faire l'identification taxonomique.

Les données de séquençage sont ensuite traitées avec le logiciel Chromas afin de supprimer les bases de mauvaise qualité. Un Blast des séquences nettoyées est ensuite effectué au NCBI ou sur le site YeastIP. Une espèce levurienne est attribuée à chaque séquence en fonction du pourcentage d'identité et de la couverture du match.

### 3.3. Les analyses physico-chimiques

Un ensemble d'analyses physico-chimiques ont été réalisées sur les moûts en début (T0) et en fin de fermentation (fin de FA). Elles ont été réalisées à Pech Rouge au sein du laboratoire d'analyses de l'unité. Ces analyses sont les suivantes :

- ❖ Analyse des moûts départ (T0) :
  - Dosage des sucres par déduction du degré Brix lu sur un réfractomètre
  - Dosage de l'acidité totale par électrotitrimétrie
  - Mesure du pH par pHmétrie
  - Dosage de l'acide malique par analyseur séquentiel (Thermo Scientific)
  - Dosage de la concentration en azote assimilable (azote aminé, azote ammoniacal, azote total) par méthode enzymatique.

- ❖ Analyse en fin de FA (pour les modalités vinifiées à Pech Rouge)
  - Dosage des sucres résiduels au séquentiel (enzymatique)
  - Détermination du Titre Alcoométrique Volumique (TAV) par analyseur en infrarouge proche
  - Dosage de l'acidité volatile au séquentiel (enzymatique)
  - Dosage de l'acide malique et lactique au séquentiel (enzymatique)
  - Détermination de l'acidité totale par titrimétrie (Crison)
  - Mesure de pH par pHmétrie
  - Analyses colorimétriques : Indice de polyphénols totaux, différentes mesures d'absorbance (DO420-520-620 nm) et dosage des anthocyanes par spectrophométrie

D'autres analyses telles que des HPLC et des GC-MS ont été réalisées au sein de l'UMR SPO.

### 3.3.1. HPLC

Des analyses HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) ont été réalisées sur les modalités 39 et 40, soit l'expérimentation 3, aux différents temps de fermentation (T0, T1, fin de FA). Les HPLC ont été réalisées sur le surnageant des moûts après centrifugation. Cette technique nous a permis de séparer, identifier et quantifier les composés semi-volatils et non-volatils présents dans nos échantillons. Nous avons ainsi pu détecter et quantifier des composés carbonés tels que des acides organiques détectés en UV ( $\alpha$  céto-glutarate, citrate, pyruvate, malate, succinate, acétate), des sucres (glucose, fructose) et alcools (glycérol et éthanol) détectés en RID.

La HPLC consiste en l'écoulement sous pression d'une phase mobile (dans laquelle l'échantillon est dilué) à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire. En fonction de leur degré d'interaction avec la phase stationnaire, les composés ou analytes se séparent. Après élution de la colonne, les analytes sont détectés et le système de données chromatographiques (CDS) traduit alors le signal généré sous forme d'un chromatogramme, l'axe des x représentant le temps et l'axe des y représentant le signal spécifique, l'aire de chaque pic étant proportionnel à la concentration de composés [43].

Dans notre étude, la phase stationnaire est une colonne Phenomenex Rezex ROA constituée d'une résine styrène-divinylbenzène portant des groupements fonctionnels H<sup>+</sup>. La phase mobile utilisée est une solution d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0.005 N. Le principe utilisé est l'exclusion ionique. Les échantillons sont amenés à pH bas par dilution dans la phase mobile H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 0.005 N utilisé pour la séparation HPLC.

### 3.3.2. GC-MS

La GC-MS, une chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à un spectromètre de masse, a été utilisée pour analyser les composés volatils aromatiques présents dans nos échantillons afin d'évaluer la qualité finale des vins.

La CPG fonctionne en utilisant une colonne capillaire en silice et de l'hélium qui est le gaz vecteur. Grâce à ce gaz vecteur, les échantillons chauffés entre 150°C et 250°C migrent le long de la colonne à différentes vitesses. Cette vitesse est caractéristique d'un composé qui va être

déecté par un spectromètre de masse. Un rapport masse/charge va permettre l'identification du composé par comparaison avec une bibliothèque de spectres de masse. La CPG va permettre une analyse quantitative et qualitative des arômes présents dans l'échantillon [44].

Ces analyses ont été effectuées sur des échantillons de surnageants prélevés en fin de fermentation. Après élimination des cellules par centrifugation de nos échantillons, une extraction liquide-liquide des composés volatils est réalisée avec du dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Les phases organiques récupérées sont ensuite séchées et concentrées sous flux d'azote avant d'être injectées en mode liquide et analysées par GC/MS.

La GC-MS nous a permis d'extraire 33 composés volatils au total regroupés en 4 familles que sont les alcools supérieurs, les acides, les esters d'acétate et les esters éthyliques. Ces 33 composés et leurs arômes associés sont disponibles en [annexe 6](#).

### 3.4. Metabarcoding

Une analyse par metabarcoding a été réalisée pour l'ensemble des culots d'échantillons extraits du rinçage de baies et des différentes étapes de fermentation (au début T0, à 10 g de  $\text{CO}_2$  dégagé T1, en fin de fermentation). Le metabarcoding permet l'identification de toutes les espèces présentes dans un échantillon par séquençage haut débit (Figure 9).

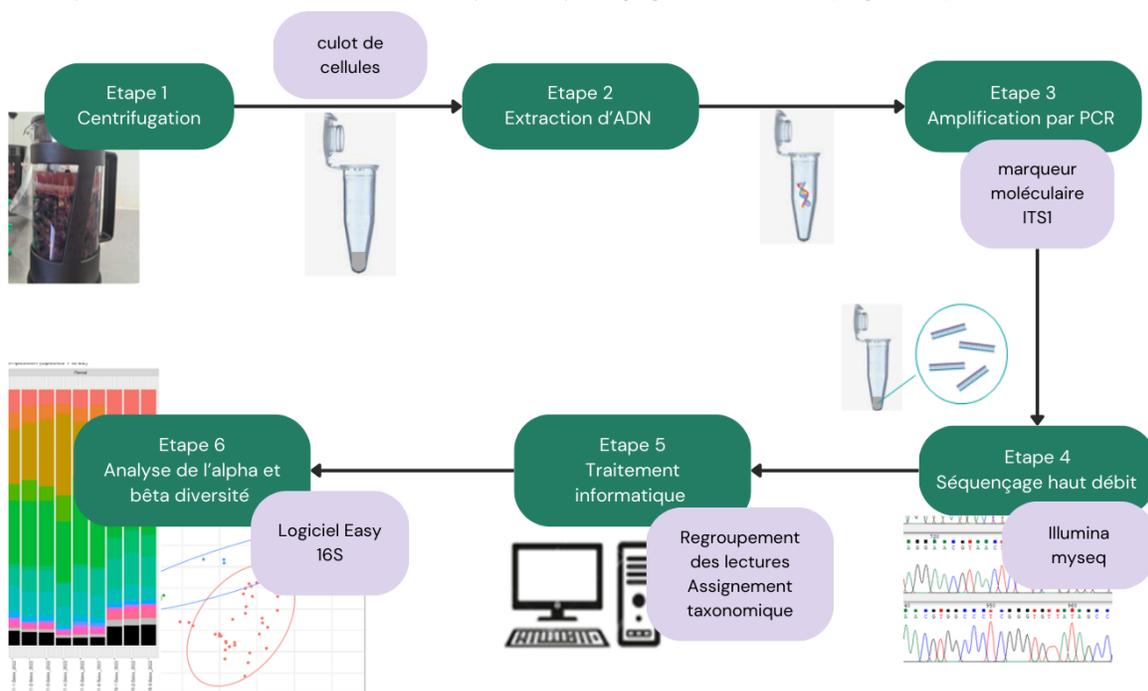


Figure 9 : Schéma des étapes du protocole du metabarcoding

#### 3.4.1. Extraction d'ADN

Le microbiote de l'échantillon à analyser est récupéré par centrifugation du moût ou de l'eau de rinçage de baies. Le microbiote se trouve alors dans le culot de cellules.

L'ADN des micro-organismes présents dans ce culot est extrait à l'aide du kit "Dneasy

PowerSoil Pro kit” de Qiagen. Selon des essais préliminaires, ce kit présente une contamination chimique liée au solvant. Afin de réduire cette contamination, un volume de 700 µL au lieu de 500 µL de solutions EA et CD5 a été utilisé.

La première étape de l'extraction consiste en une lyse cellulaire chimique à l'aide d'une solution CD1 et d'une lyse mécanique par l'action de billes de zirconium et d'un broyeur-homogénéisateur (Precellys). L'ADN va ainsi être libéré dans le milieu extracellulaire après la rupture des membranes plasmiques et nucléaires. La seconde étape consiste en une purification chimique du surnageant afin de conserver uniquement l'ADN, les molécules différentes de l'ADN vont être précipitées après centrifugation. Le surnageant est ensuite ajouté à une solution fortement concentrée en sels avant d'être passé dans une colonne en silice. Seul l'ADN va être lié à cette colonne qui va ensuite subir deux lavages successifs à base d'éthanol et d'agents chaotropiques. L'ADN est ainsi purifié et les protéines ou autres contaminants chimiques retenus par liaison faible sur la colonne ont pu être éliminés. La dernière étape consiste en une élution de la colonne à l'aide d'une solution pauvre en sels.

#### 3.4.2. Quantification de l'ADN

L'ADN extrait est quantifié par nanodrop à 260 nm. Cet appareil est un spectrophotomètre UV-Visible permettant l'analyse de micro-volumes d'acides nucléiques (ADN, ARN) et de protéines. Il permet de connaître la quantité d'ADN présent dans notre échantillon mais également ses éventuelles contaminations grâce aux différents rapports

- 260/280 : contamination par les protéines.
- 260/230 : présence de contaminants comme le phénol, l'EDTA, guanidine HCL, etc.

L'ADN est également quantifié à l'aide du fluorimètre Quantus™ (Promega) permettant la quantification des acides nucléiques à l'aide d'un fluorochrome intercalant dans l'ADN.

#### 3.4.3. Amplification par PCR

La PCR (polymerase chain reaction) est une réaction enzymatique permettant l'amplification en chaîne d'une région spécifique de l'ADN. Elle permet à partir d'une faible quantité initiale d'ADN de répliquer *in vitro* un fragment spécifique de l'ADN en grande quantité.

Un marqueur taxonomique de l'ADN est amplifié par PCR avant d'être envoyé à séquencer en haut débit. Dans ce projet, nous avons choisi d'utiliser le marqueur ITS1.

Pour l'amplification par PCR des ITS, la Taq MTP de Sigma a été utilisée, qui est une DNA polymérase avec une activité 5' vers 3' et une activité exonucléase 3' vers 5'.

Le protocole de la PCR d'amplification est disponible en [annexe 7](#). Son mix contient du tampon 10x, des dNTPs, un mélange d'amorces forward (Illu4, 6, 8, ITS1F) et reverse (Illu4, 5, 6 ITS2), l'enzyme Taq DNA polymérase et de l'eau milliQ. Ce mix PCR est ajouté dans les puits d'une plaque PCR 96 puits (40 µL/puits), un mélange d'ADN dilué par de l'eau milliQ a été ajouté dans ce mix (10 µL/puits). L'ADN est dilué selon sa concentration donnée par le Quantus afin d'avoir 10 ng d'ADN par puits, quantité optimale pour l'amplification. Ce mélange est réalisé à l'aide du robot de pipetage ASSIST+ d'INTEGRA. L'amplification est réalisée dans le thermocycleur SimplyAmp de Thermo Fisher, selon le programme détaillé en [annexe 7](#). La

première phase est une phase de dénaturation de l'ADN par chauffage à 94°C. S'ensuit une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence cible à une température dépendant de la longueur et de la séquence des amorces soit du  $T_m$  (Melting Temperature); ici, le  $T_m$  est de 58°C). Enfin, une élongation par l'ADN polymérase a lieu à 72°C, la température optimale pour la Taq. L'ensemble de ce cycle est répété 30 fois afin d'obtenir plus d'un milliard de copies de la séquence ciblée (amplicon) (2<sup>30</sup>). Une dernière étape d'extension de 1 minute permet à la Taq de synthétiser la fin des derniers brins.

#### 3.4.4. Vérification de l'amplification par électrophorèse

A la fin de la PCR, une électrophorèse est réalisée afin de s'assurer que l'amplification par PCR a bien eu lieu. Cette électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose 1,5% contenant 0,5% de Bromure d'Ethidium (BET) et du tampon Tris Acétate EDTA (TAE) 1X. Un mélange contenant 3 µL d'échantillon et 3 µL de tampon de charge 2X est réalisé. Ce tampon contient 2 colorants : du bleu de bromophénol et du FF cyanol de xylène permettant de visualiser le résultat de la migration par électrophorèse, et du glycérol permettant d'augmenter la densité de l'échantillon. Le mélange est ensuite mis à migrer dans une cuve d'électrophorèse contenant du TAE 1X. L'ADN chargé négativement migre sous l'effet d'un champ électrique à des vitesses différentes selon la masse de la molécule.

Les fragments d'ADN du gel sont ensuite visualisés sous UV grâce au BET, un agent intercalant fluorescent. La quantité d'ADN est proportionnelle à la fluorescence.

#### 3.4.5. Séquençage haut débit

Une fois les produits d'amplification réalisés, ils sont envoyés à l'UMR AGAP (Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales) situé au sud de Montpellier pour être séquencés en haut débit par la technologie Illumina avec le système MySeq.

#### 3.4.6. Traitement informatique (Analyse de l'alpha et bêta diversité)

Le traitement informatique des séquences a été réalisé au sein de l'unité INRAE Maïage de Jouy-en-Josas. Les résultats ont été analysés à l'UMR SPO grâce au logiciel « Easy16S », une interface Shiny développée au sein de l'unité Maïage.

### 3.5. Analyses statistiques

Diverses analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R studio. Pour analyser les données de GC-MS, des ACP (analyses en composantes principales) ont été réalisées après normalisation des données pour les expérimentations 2 et 3 (38, 39 et 40) par famille de composés ( alcools supérieurs, acides, esters d'acétate et esters éthyliques) ainsi qu'une ACP générale pour chaque expérimentation regroupant toutes les données.

L'ensemble des écarts types et des moyennes ont été réalisés à l'aide d'excel ainsi que les différents graphiques présents dans ce rapport.

## V/ RESULTATS & DISCUSSION

Dans cette partie, les fermenteursensemencés avec *S. cerevisiae* seront appelés les *S. cerevisiae*, de la même façon, ceuxensemencés avec le pied de cuve seront appelés pied de cuve et ceuxensemencés avec le rinçage de baies seront appelé rinçage de baies pour faciliter la lecture du rapport.

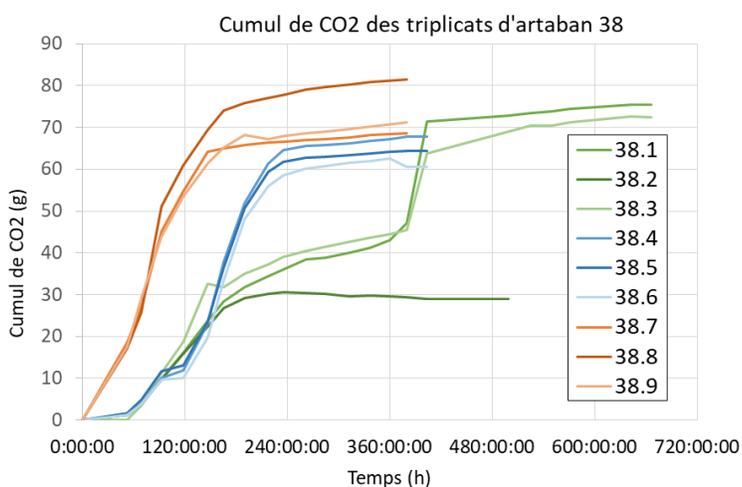
Trois expérimentations ont été réalisées dans le cadre de ce stage. La première portait sur la diversité du microbiote de différents cépages et n'ont pas pu être montré dans ce rapport car nous n'avons pas encore reçu les résultats de metabarcoding à ce jour. Les résultats de la deuxième et troisième expérimentation ont pu être intégrés à ce rapport et ont porté sur l'impact de *S. cerevisiae* et du microbiote sur la cinétique fermentaire et la qualité finale du vin.

### 1. Cinétique fermentaire

Dans cette partie, je présente les résultats des fermentations des expérimentations 2 (fermentations 38.1 à 38.9) et 3 (fermentations 39.3 à 39.11 et 40.2 à 40.10), à savoir, les données de cinétique et le lien avec les différents types de microbiote.

#### 1.1. Impact de *S. cerevisiae* sur la cinétique

Dans l'expérience 2, les 9 bodums (trois modalités avec des triplicatas) ont été pesés une seule fois par jour pour réaliser le suivi de la fermentation. Nous n'avons donc pas assez de données pour tracer le débit de CO<sub>2</sub> qui serait trop imprécis. Seul le cumul de CO<sub>2</sub> en fonction du temps est donc représenté sur la figure 10.



**Figure 10:** Graphiques du cumul du CO<sub>2</sub> en fonction du temps pour l'expérimentation 2 (modalité 38)

#### 1.1.1. Répétabilité

Nous avons dans un premier temps vérifié la reproductibilité et la répétabilité de nos expériences en observant la superposition des courbes. Nous avons observé des différences de répétabilité en fonction des modalités : les courbes des fermentations spontanées puis inoculées avec *S. cerevisiae* sont superposables, deux des courbes de *S. cerevisiae* (38.7 et 38.9) sont superposables tandis que la courbe 38.8 a une cinétique plus rapide à partir de 100 heures. La différence de cinétique entre les triplicatas peut-être expliquée par l'hétérogénéité des

bodums de 950 g qui peuvent avoir une quantité de jus de raisin parfois différente, des baies pouvant peser le même poids mais contenir une proportion de jus différent. Par ailleurs, le cumul de CO<sub>2</sub> d'une des fermentations spontanées (38.2) stagne après 200 heures contrairement aux deux autres courbes de fermentation spontanée (38.1 et 38.3) qui croissent et sont relativement superposables jusqu'à la fin de leur fermentation. La fermentation s'est rapidement arrêtée pour le fermenteur 38.2 qui ne devait pas avoir les levures nécessaires à une fermentation complète : la levure *S. cerevisiae* nécessaire pour finir la fermentation [35] ne devait pas être présente dans le fermenteur. Cela souligne la difficulté de maîtriser les fermentations spontanées sans ajout de levures. La différence entre ces trois triplicatas peut être expliquée par le fait d'effectuer des fermentations en 1 L dans un milieu stérile non contaminé par le chai. Les levures étant présentes dans de faible quantité sur les raisins et étant principalement amenées par les outils agricoles et le chai [29 et 30], il est peu probable d'avoir des triplicatas homogènes présentant exactement les mêmes levures dans les mêmes quantités. Une même expérience aurait pu être répétée sur des plus gros volumes (80 L) afin d'avoir une probabilité plus élevée de la présence de *S. cerevisiae* et de triplicatas homogènes. Le triplicata 38.2 a donc été exclu lors de l'analyse de nos résultats et dans le reste de ce rapport car n'étant pas comparable aux autres triplicatas dont la fermentation est finie.

### 1.1.2. Comparaison des cinétiques

Il est observé que les trois modalités n'ont pas les mêmes cinétiques fermentaires : les fermentations démarrées en spontané finissent plus lentement qu'avec *S. cerevisiae* (400 h pour celles inoculées au cours de la FA avec *S. cerevisiae*, 800 h pour les fermentations spontanées complètes, 380 h pour celles inoculées à T0 avec *S. cerevisiae*) et ont un temps de latence plus élevé (entre 50 et 62 h) qu'avec *S. cerevisiae* (environ 3 h). Les fermentations spontanées ont donc une cinétique fermentaire plus lente mais ajouter *S. cerevisiae* à 10 g/L de CO<sub>2</sub> dégagé (108 h ici) accélère la fermentation qui dure 400 h de moins qu'en spontané complet. *S. cerevisiae* a donc un impact sur la cinétique fermentaire en réduisant le temps de latence et le temps total de FA. De plus, nous remarquons que la cinétique des fermentations en spontanée complète est ralentie à environ 150 h avant d'accélérer à 360 h. Ce changement de vitesse de fermentation peut être attribué à *S. cerevisiae* qui devient majoritaire dans le milieu après la mort et l'autolyse des levures non-*Saccharomyces* [34] qui libèrent des sources d'azote (protéines, acides aminés) permettant à *S. cerevisiae* de se multiplier [25].

## 1.2. Impact du microbiote sur la cinétique

### 1.2.1. Reproductibilité et Répétabilité

Les courbes des triplicatas se superposent et sont répétables pour les *S. cerevisiae* des modalités 40, pieds de cuve de carignan et d'artaban (exemple figure 11). Le bruit présent sur certains graphiques est lié aux oscillations de la balance. Cependant, le profil de ces courbes reste semblable aux autres triplicatas. Pour le reste du rapport, une seule des trois courbes sera choisie pour représenter chaque modalité. Quelques expérimentations n'ont cependant pas été aussi répétables que souhaité, c'est le cas des deux expérimentations suivantes : ensemencement de *S. cerevisiae* sur l'expérimentation carignan, fermentations 39.9 à 39.11 et fermentations 39.4 et 39.5.

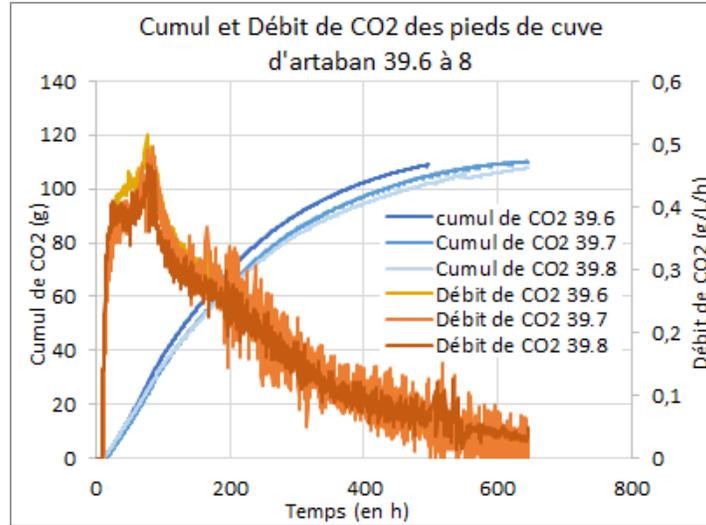


Figure 11 : Superposition des cinétiques fermentaires des triplicatas de pieds de cuve d'artaban

Sur le graphique montrant les cinétiques fermentaires des *S. cerevisiae* 39.9 à 39.11 (figure 12), une des courbes de *S. cerevisiae* (39.11) est différente des autres courbes. A partir de 90 heures la fermentation a considérablement ralenti avant de reprendre à 300 heures. Cette différence est liée à une chute de la température du fermenteur à 15°C (température de la pièce) causée par une panne de la lampe permettant le maintien de la température du fermenteur à 20°C. Après changement de la lampe à 300 heures, la fermentation est repartie. Cela souligne l'importance de la température dans le bon déroulement de la fermentation et son impact sur la cinétique fermentaire [23].

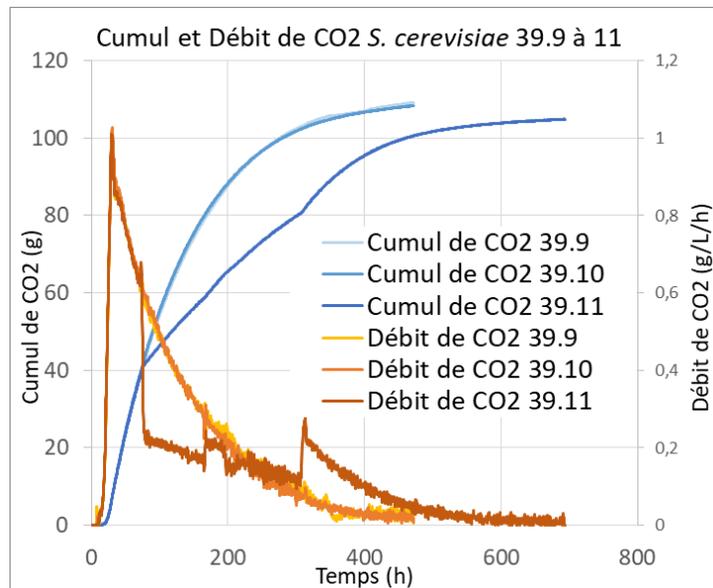


Figure 12 : Graphique du cumul et du débit de CO<sub>2</sub> des *S. cerevisiae* 39.9 à 11

Lors des premières expérimentations sur la variété artaban (fermentations 39.3 à 39.5), une étape n'avait pas été prise en compte : la complémentation en azote en début de fermentation. Le milieu était donc carencé en azote (41 mg/L), ce qui a ralenti la fermentation par *S. cerevisiae* des modalités 39.4 et 39.5 par rapport aux cinétiques fermentairesensemencées plus tard avec *S. cerevisiae* (figure 13). Leurs fermentations ont repris une cinétique standard après l'ajout du DAP à 100 heures. Cette différence dans les cinétiques fermentaires est liée à

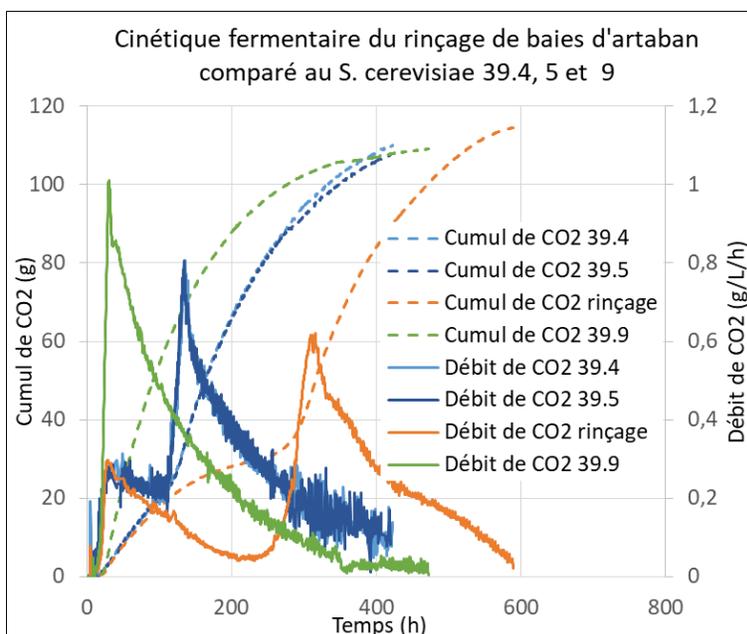


Figure 13: Graphique du cumul et du débit de CO<sub>2</sub> pour le rinçage de baies d'artaban et les *S. cerevisiae* 39.4, 5 et 9

l'importance de l'azote dans la fermentation de *S. cerevisiae* [34 et 35]. L'ajout du DAP n'a cependant pas impacté le rinçage de baies indiquant qu'il ne devait pas ou peu y avoir d'espèces levuriennes nécessitant une grande quantité d'azote pour leur FA et donc probablement peu de *S. cerevisiae* à cette étape de la FA.

### 1.2.2. Comparaison des cinétiques pour chaque variété

Tableau 2: Tableau des paramètres de cinétique fermentaire pour le cépage carignan

Echantillon	Temps de latence (en h)	Temps max (en h)	Débit max (en g/L/h)	Temps total (en h)
Rinçage de baies de carignan	31,08	47,75	0,45	758,75
<i>S. cerevisiae</i>	23,29 ± 1,61	30,37 ± 0,85	1,01 ± 0,01	504,29 ± 37,92
Pied de cuve de carignan	13,39 ± 2,69	70,06 ± 0,38	0,70 ± 0,06	562,89 ± 68,61

Tableau 3: Tableau des paramètres de cinétique fermentaire pour la variété artaban

Echantillon	Temps de latence (en h)	Temps max (en h)	Débit max (en g/L/h)	Temps total (en h)
Rinçage de baies d'artaban	23,8	315,4	0,6	589,7
<i>S. cerevisiae</i>	21,87 ± 0,00	30,42 ± 0,01	1,02 ± 0,01	472,42 ± 0,01
Pied de cuve d'artaban	14,71 ± 1,95	78,6 ± 4,52	0,49 ± 0,02	596,71 ± 85,3438

Les graphiques des figures 14 et 15 représentent le suivi de la fermentation des fermenteurs ensemencés avec le pied de cuve (en foncé), avec le rinçage des baies (en couleur intermédiaire) de carignan ou avec *S. cerevisiae* (en clair et pointillé) en cumul (en bleu) et débit de CO<sub>2</sub> (en orange) en fonction du temps. Les résultats montrent des cinétiques fermentaires différentes selon le type de microbiote utilisé pour

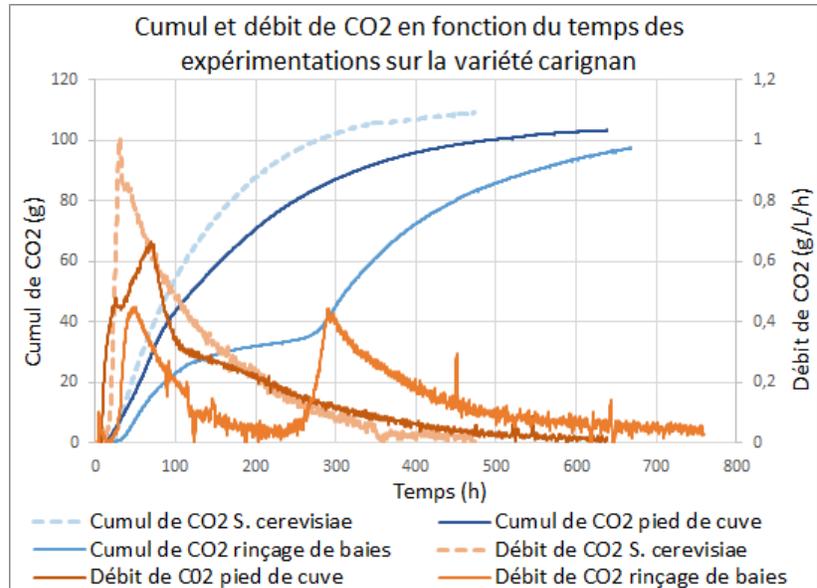


Figure 14 : Graphique des cinétiques fermentaires de carignan

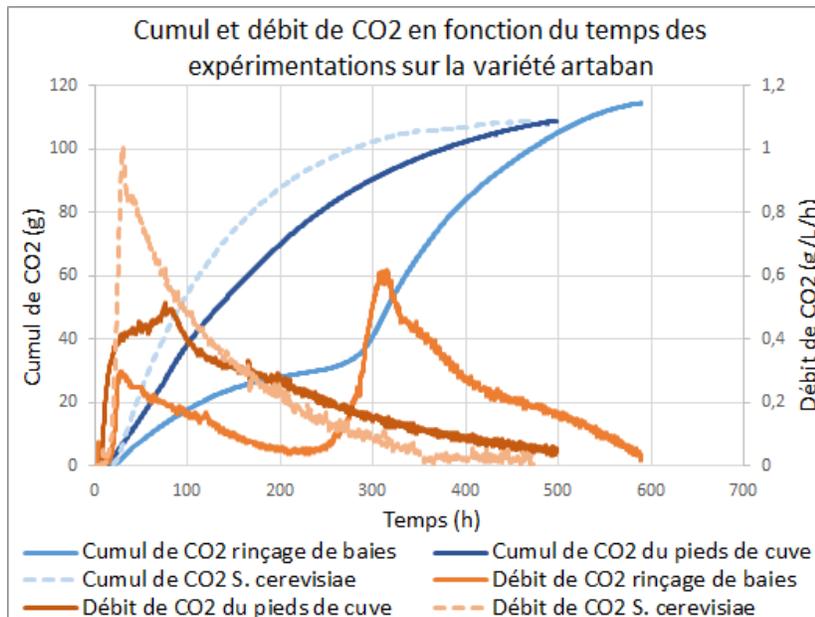


Figure 15 : Graphique des cinétiques fermentaires d'artaban

l'ensemencement (Tableaux 2 et 3). *S. cerevisiae* a un temps de latence intermédiaire entre le pied de cuve (plus court) et le rinçage de baies (plus long). Cette différence est liée à la préparation du pied de cuve dont la fermentation a déjà démarré avant l'ensemencement, les levures sont directement prêtes à effectuer la fermentation contrairement aux levures du rinçage de baies, supposé majoritairement non-*Saccharomyces*, qui ne vont pas ou peu avoir d'activité fermentaire en début de FA.

*S. cerevisiae* finit sa fermentation avant le pied de cuve et le rinçage de baie et a une V<sub>max</sub> supérieure et un temps associé inférieur. Ce résultat est cohérent avec les études précédentes, *S. cerevisiae* étant l'espèce levurienne utilisée pour finir la fermentation avec une cinétique

fermentaire rapide et une  $V_{max}$  aux alentours de 1 atteinte dès le début de la fermentation. Nous pouvons supposer que le pied de cuve et le rinçage de baies ont une  $V_{max}$  inférieure car les espèces majoritaires au début de leur fermentation sont des non-*Saccharomyces*. Ces espèces meurent et s'autolysent au cours de la fermentation, notamment les genres sensibles à l'alcool tels que *Metschnikowia* ou *Hanseniaspora* [34]. Ces genres vont libérer des nutriments (des protéines et des acides aminés) qui sont des sources d'azote permettant à *S. cerevisiae* de croître et de devenir l'espèce majoritaire à son tour [25]. Le 2ème pic de  $V_{max}$  dans la cinétique du rinçage de baies devrait correspondre à la reprise de la fermentation par *S. cerevisiae*. Ce phénomène a été démontré dans le projet MicroVarioR.

Les différences entre les cinétiques peuvent donc s'expliquer par la différence de microbiote entre les modalités. Ce microbiote est supposément différent en quantité et en espèces : le microbiote du pied de cuve ayant subi une fermentation avant ensemencement, il ne peut pas être le même que celui du rinçage de baies, le microbiote évoluant au fur et à mesure de la fermentation [35]. Pour conclure, le microbiote ayant permis l'ensemencement des fermenteurs étant le seul facteur changeant entre ces fermentations, ces résultats montrent que le microbiote a un impact sur les cinétiques fermentaires.

### 1.2.3. Comparaison des cinétiques entre les variétés

La figure 16 montre les courbes des cinétiques fermentaires en débit de  $CO_2$  en fonction du temps pour les pieds de cuve et rinçages de baies des variétés carignan et artaban en comparaison avec *S. cerevisiae* (en vert).

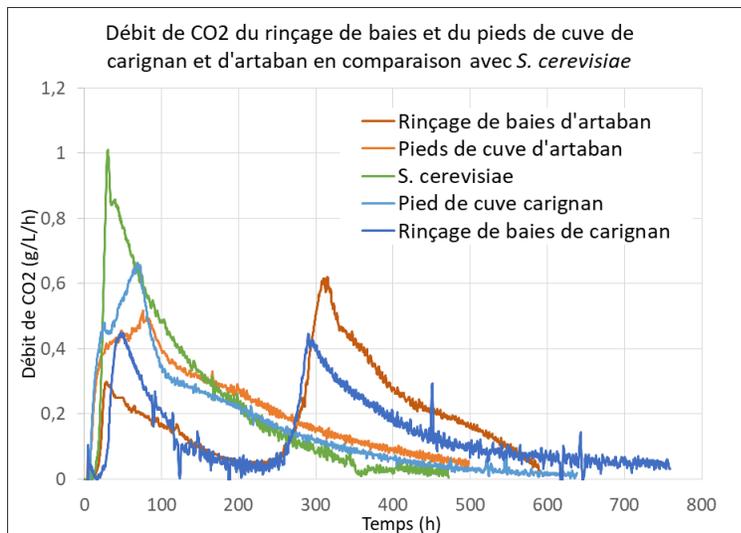


Figure 16 : Comparaison des cinétiques fermentaires d'artaban et de carignan

Les cinétiques fermentaires ne sont pas les mêmes en fonction des variétés utilisées : les carignans (en bleu) ont une  $V_{max}$  et un temps total de FA supérieur aux artabans (en orange) à l'exception de la deuxième  $V_{max}$  des rinçages de baies, le temps de latence des rinçages de baies est également supérieur pour la variété carignan. Le microbiote des deux variétés étant supposé différent[30], ces résultats montrent que le microbiote de variétés différentes impacte différemment la cinétique fermentaire.

### 1.3. L'évolution du taux de sucre et d'éthanol pendant la FA : HPLC

Seule l'expérience 3 a été analysée en HPLC afin de connaître l'évolution de certains paramètres tels que les sucres et l'éthanol. D'autres composés tels que le lactate, le malate ou

le succinate ont été mesurés mais n'ont pas présenté de différence significative entre les échantillons et les modalités, et ne seront donc pas présentés ici. La répétabilité des résultats d'HPLC pour les triplicatas d'une même modalité a été vérifiée par superposition des courbes de suivi de l'éthanol, du glucose et du fructose au cours de la FA selon l'exemple de la figure 17. La courbe d'un triplicata a été choisie pour représenter chaque modalité dans la suite de mon rapport.

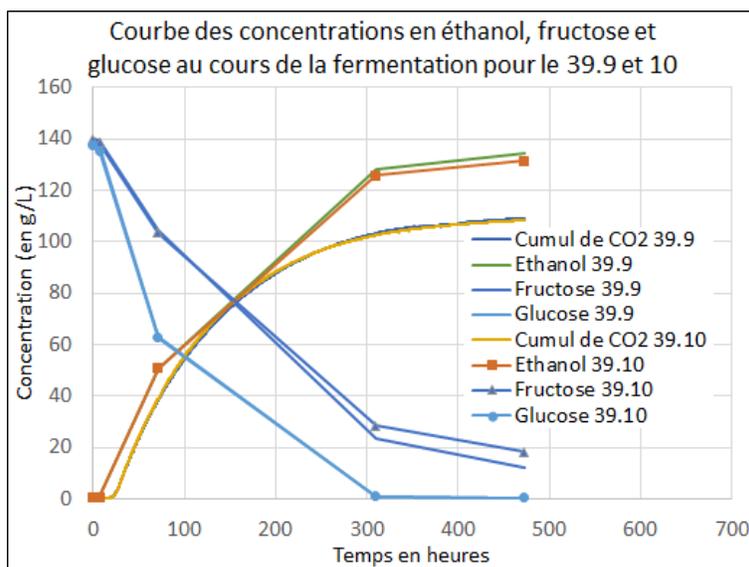


Figure 17: Répétabilité des résultats d'HPLC de l'expérimentation 3

### 1.3.1. Comparaison des taux de sucre et éthanol entre les modalités

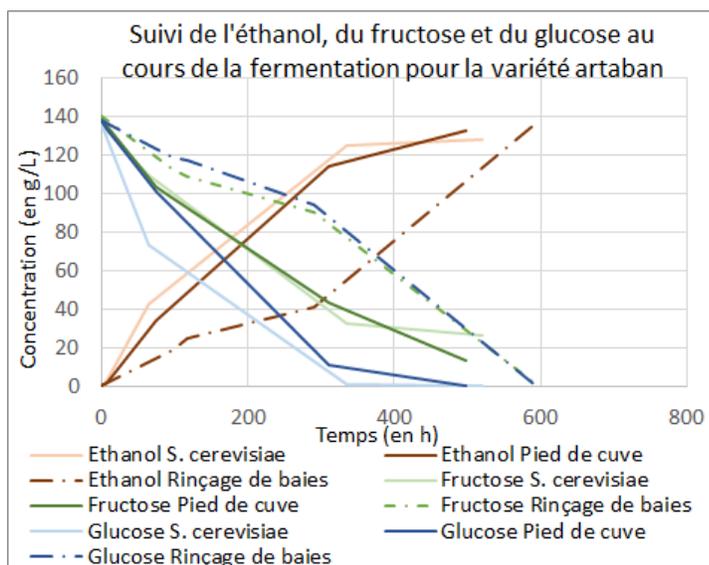


Figure 18: Comparaison du rinçage de baie et du pied de cuve d'artaban

La figure 18 montre l'évolution de l'éthanol (en orange), du glucose (en bleu) et du fructose (en vert) au cours de la FA pour les pieds de cuve (en couleur foncée) et le rinçage de baies (en pointillé) d'artaban et *S. cerevisiae* (en couleur claire). La figure 19 montre cette évolution pour la variété carignan. Pour toutes les courbes, l'éthanol, avec des quantités initiales proches de 0, est produit au cours de la fermentation et suit l'évolution du cumul de CO<sub>2</sub> tandis que le glucose et le fructose, à environ 140 g/L initialement, sont consommés différemment l'un de l'autre au cours de la FA. Le fructose n'a pas été entièrement consommé pour toutes les fermentations, qui

donc n'étaient pas achevées à l'arrêt des fermenteurs. Le taux de sucre réel était différent de celui estimé par les analyses physico-chimiques du moût de départ.

La consommation des sucres et la production d'éthanol se font plus rapidement chez *S. cerevisiae* et les pieds de cuve que pour le rinçage de baies ce qui est cohérent avec la cinétique fermentaire plus rapide pour ces deux modalités dans les deux espèces. *S. cerevisiae*, présent en couleur claire sur les 2 graphiques, consomme en priorité le glucose que le fructose au cours de la fermentation. Ce résultat est cohérent avec les études antérieures, *S. cerevisiae* étant une espèce consommatrice de ces deux sucres mais favorisant le glucose pour sa fermentation [38].

Pour le rinçage de baies des deux variétés, le fructose est consommé plus rapidement que le glucose en début de FA (jusqu'à environ 300 heures) indiquant la présence d'espèces fructophiles dans la fermentation. Puis, pour le carignan, c'est le glucose qui est consommé en priorité jusqu'à la fin de la FA. Ce résultat renforce l'hypothèse émise à partir des cinétiques fermentaires selon laquelle *S. cerevisiae* serait l'espèce majoritaire à 300 heures de FA pour le carignan et l'artaban. Pour les pieds de cuve, le glucose et le fructose sont consommés à la même vitesse en début de fermentation puis, à partir de 80 heures pour carignan et de 100 heures pour artaban, c'est le glucose qui est consommé plus rapidement, de la même façon que les fermenteurs de *S. cerevisiae*. Ce résultat pourrait être expliqué par la présence abondante de *S. cerevisiae* à partir de 80 ou 100 heures de fermentation comme supposé dans les cinétiques fermentaires.

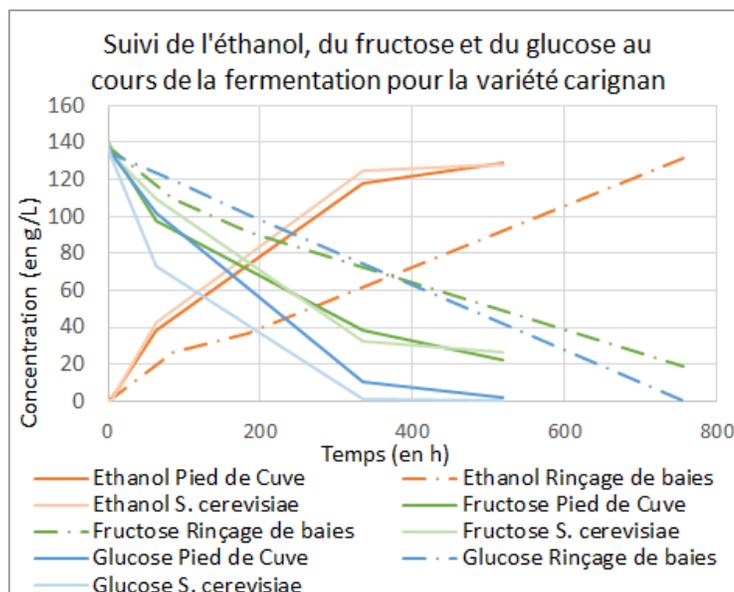


Figure 19 : Comparaison du rinçage de baie et du pied de cuve de carignan

Ainsi, le microbiote issu d'un rinçage de baies, d'un pied de cuve ou de *S. cerevisiae* a un impact différent sur la consommation des sucres et sur la production d'éthanol au cours de la fermentation.

### 1.3.2. Comparaison des taux de sucre et éthanol entre les variétés

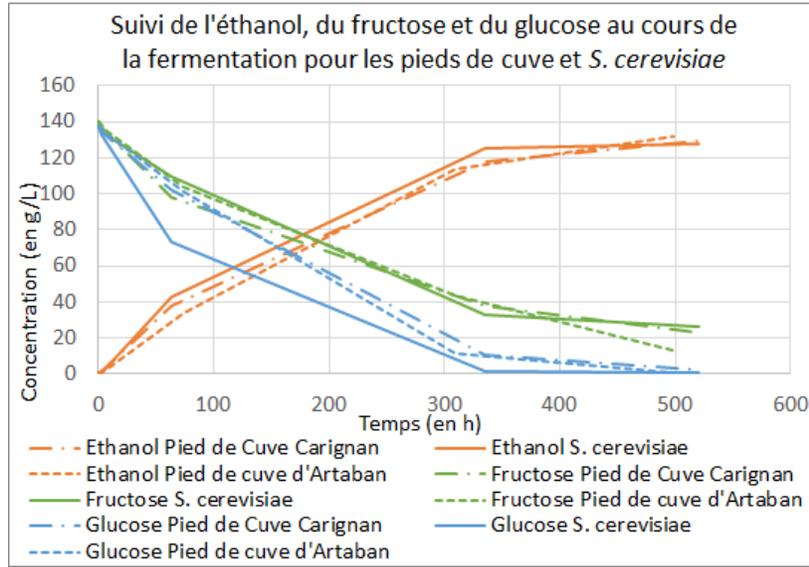


Figure 20: Comparaison des résultats d'HPLC des pieds de cuve d'artaban et de carignan et de *S. cerevisiae*

La figure 20 montre l'évolution de l'éthanol, du glucose et du fructose au cours de la FA pour les pieds de cuve d'artaban et de carignan en comparaison avec *S. cerevisiae*. La figure 21 nous montre cette évolution pour les rinçages de baies d'artaban et de carignan en comparaison avec *S. cerevisiae*.

Les pieds de cuve ont une production d'éthanol et une consommation de fructose proche de celle de *S. cerevisiae*. Cependant, le glucose est consommé plus rapidement par *S. cerevisiae* que par les pieds de cuve surtout en début de fermentation. La variété ne semble pas impacter la consommation des sucres et de l'éthanol chez les pieds de cuve qui suivent la même évolution dans les deux variétés.

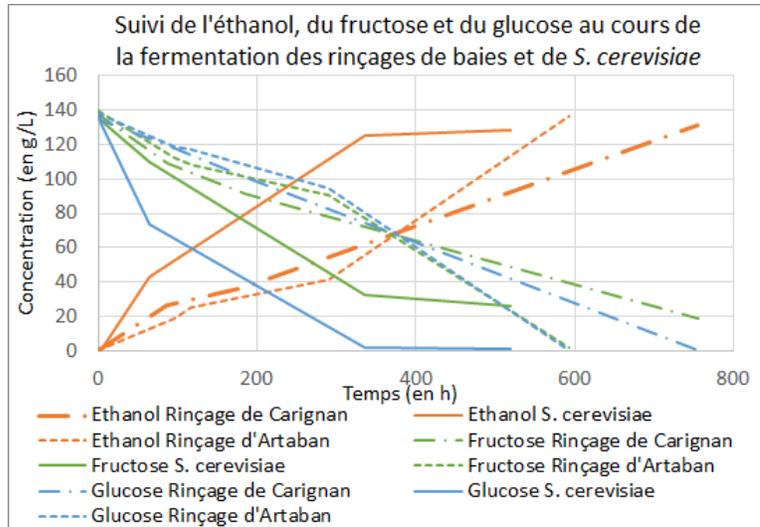


Figure 21: Comparaison des résultats d'HPLC des rinçages de baies d'artaban et de carignan et de *S. cerevisiae*

La différence observée entre les pieds de cuve et *S. cerevisiae* sur ce graphique est principalement liée à la consommation des sucres liée aux levures présentes [38].

Les rinçages de baies ont une consommation des sucres et une production d'éthanol différentes entre eux et comparé à celles de *S. cerevisiae*. Après 380 heures, le rinçage de

baies d'artaban consomme les sucres et produit de l'éthanol plus rapidement que le rinçage de baies de carignan (en 600 heures tous les sucres sont consommés chez l'artaban contrairement au carignan qui requiert plus de 720 heures). La variété semble donc avoir un impact sur la consommation des sucres et de l'éthanol pour les rinçages de baies. Cet impact peut être lié à la présence de *S. cerevisiae* en plus grande quantité dans le rinçage de baies d'artaban qui va consommer les sucres et produire de fortes quantités d'éthanol [35].

## 2. Diversité du microbiote : PCR sur colonie

Des colonies issues des étalements des fermenteurs ensemencés avec les pieds de cuve de l'expérimentation 3 ont été identifiées taxonomiquement.

Les données de PCR sur colonies ont été traitées et résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Tableau 4: Tableau du nombre de colonies identifiées pour les fermenteurs de pieds de cuve

Espèce levurienne/ Nombre de clones identifiés	Fermenteurs de pieds de cuve de carignan			Fermenteurs de pieds de cuve d'artaban	
	T0	T1	Fin FA	T0	fin FA
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	6	1	0	2	0
<i>Lachancea thermotolerans</i>	9	1	0	0	0
<i>Metschnikowia sp.</i>	1	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	7	19	7	2

Une évolution de la population du microbiote au cours de la FA est observée pour les deux fermenteurs de pieds de cuve. Pour la variété carignan, les espèces non-*saccharomyces* (*Hanseniaspora*, *Lachancea* et *Metschnikowia*) sont majoritaires à T0 (en début de FA) et meurent au cours de la fermentation, elles sont devenues minoritaires à T1 et sont absentes en fin de FA. En même temps, l'espèce *S. cerevisiae*, peu présente au début de la FA, se multiplie au cours de la FA et semble devenir l'unique espèce présente en fin de FA. Il en est de même pour la variété artaban qui semble cependant être moins riche en espèces non-*saccharomyces* au début de sa fermentation, malgré le peu d'isolats analysés. Cette évolution de la population de levures est cohérente avec les dynamiques trouvées dans les études précédentes [35].

Ces données confirment nos hypothèses formulées pour expliquer les différences de fermentation entre les pieds de cuve et *S. cerevisiae*. Les levures du pied de cuve étant majoritairement non-*Saccharomyces* en début de FA, il est cohérent d'obtenir une différence de  $V_{max}$  et de temps de latence, les phases correspondantes étant dépendantes de la population en micro-organismes [23].

Pour connaître de manière précise la composition du microbiote, les données de métabarcoding sont nécessaires. Malheureusement, ces données n'ont pas pu être intégrées à ce rapport à cause d'un retard de séquençage.

### 3. Qualité du vin final : GC-MS

L'ensemble des échantillons collectés à l'arrêt des FA a été analysé en GC-MS. La concentration de 35 composés volatils répartis en quatre familles (alcools supérieurs, esters d'acétate, esters d'éthyle, acides) a pu être comparée entre les modalités des expérimentations 2 et 3.

#### 3.1. Impact de *S. cerevisiae* sur la qualité des vins

L'ACP (Analyse en Composantes Principales) réalisée montre le degré de similarité entre les modalités et triplicatas 38 en prenant en compte les quatre familles des composés volatils afin de montrer l'impact de *S. cerevisiae* sur la qualité finale du vin (figure 22). Les dimensions du graphique supérieures à 50% (73.3%) montrent que l'ACP obtenue est significative. Les trois triplicatas des modalités *S. cerevisiae* inoculés à T0 (38.7 à 38.9) et des fermentations spontanées puis inoculées avec *S. cerevisiae* (38.4 à 38.6) sont regroupés par modalité sur l'ACP et semblent donc répétables. Cependant, les fermentations spontanées complètes présentent peu de similitudes. Cela souligne de nouveau la difficulté de maîtriser les fermentations spontanées et d'obtenir des triplicatas répétables. Cette différence est probablement liée aux différentes espèces levuriennes présentes dans les deux triplicatas (une confirmation par metabarcoding est nécessaire). Les trois modalités sont distinctes sur les axes de l'ACP, l'ajout de *S. cerevisiae* au début ou au cours de la fermentation semble donc avoir un impact sur la qualité organoleptique des vins finaux. Pour illustrer cet impact, l'exemple de la famille des esters d'acétate est présenté plus bas (Figures 23 et 24) ; les autres familles ont été traitées mais ne seront pas présentées ici.

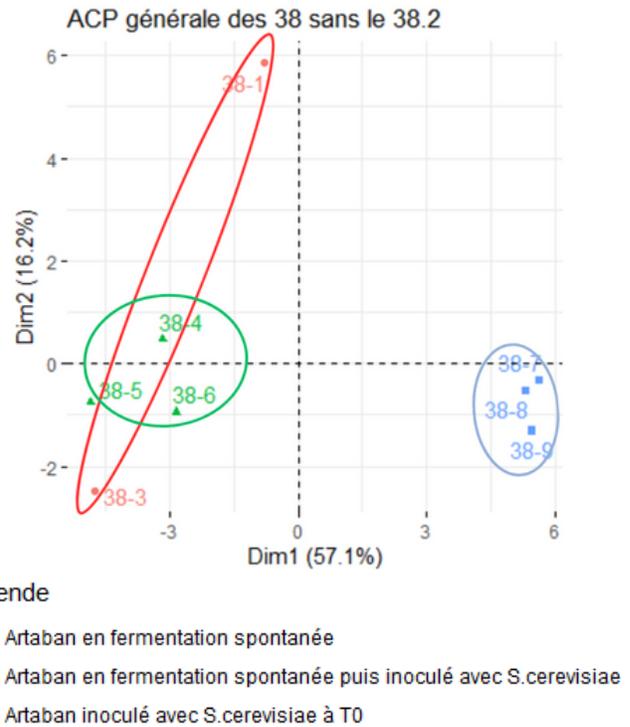


Figure 22 : ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les 38 sur l'ensemble des familles organoleptiques

Une nouvelle ACP a été réalisée sur les modalités 38 en ne prenant en compte que la famille des esters d'acétate (Propyl acetate, 2-methyl propyl acetate...) (figure 23). Les dimensions du graphique sont largement supérieures à 50% (97.6%), l'ACP obtenue est donc très significative. Trois groupes distincts se dégagent de l'ACP correspondant aux 3 modalités de l'expérimentation. Les triplicatas des modalités *S. cerevisiae* et des fermentations spontanées puis inoculées avec *S. cerevisiae* sont bien regroupés par modalité tandis que les deux fermentation complète (38.1 et 38.3) sont éloignées dans l'ACP témoignant d'une similarité peu élevée. Les fermentations spontanées complètes sont intermédiaires par rapport à celles de *S. cerevisiae* et aux fermentations spontanées puis inoculées avec *S. cerevisiae*, ce qui est contraire aux résultats attendus qui auraient placé les fermentations inoculées avec *S. cerevisiae* au cours de la fermentation comme intermédiaires.

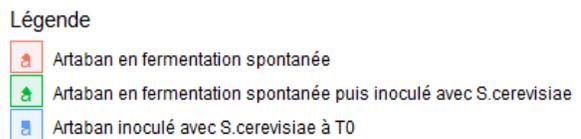
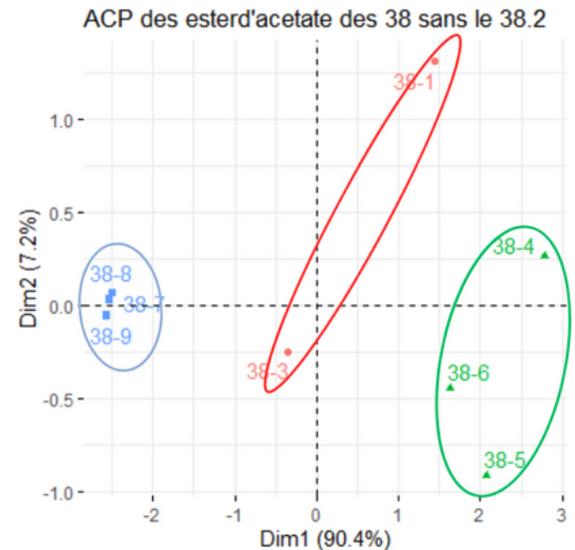


Figure 23 : ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les 38 sur les esters d'acétate

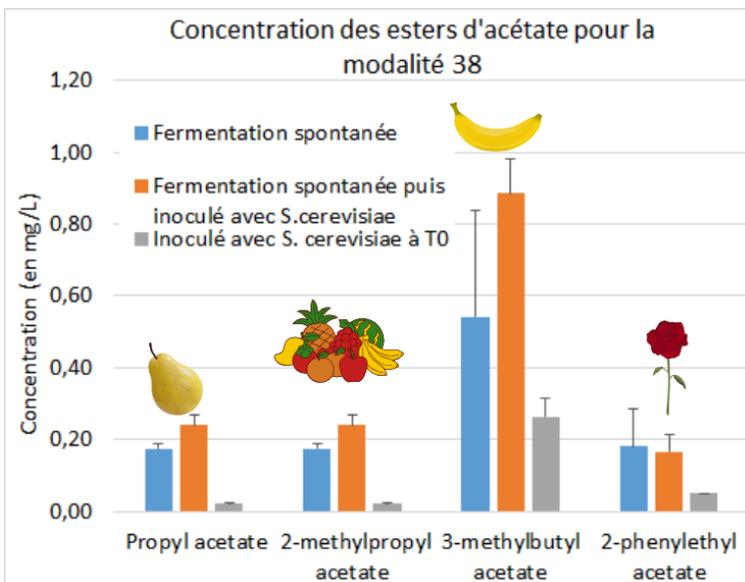


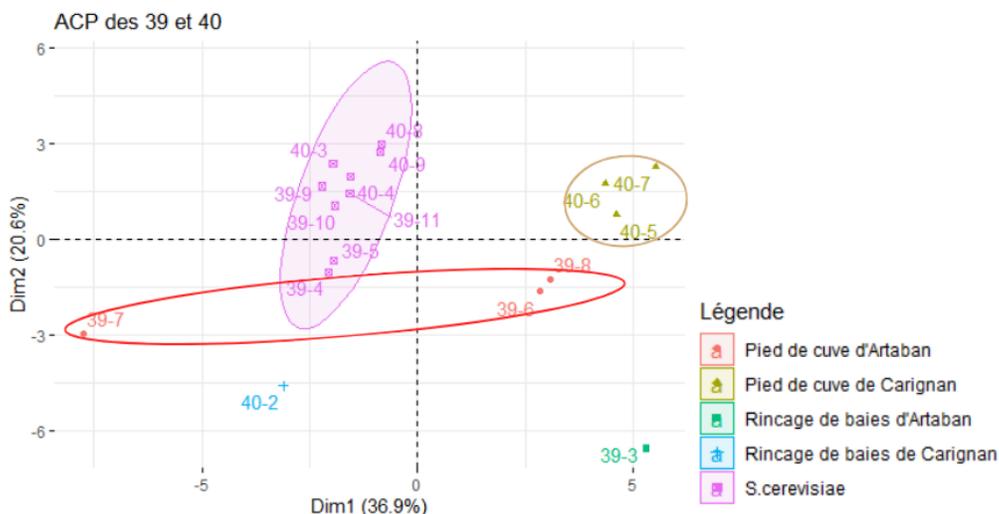
Figure 24 : Graphique des concentration d'ester d'acétates pour l'expérimentation 3

Sur le graphique 24, nous observons que cette différence est principalement liée aux esters d'acétate suivants : propyl acetate, 2-methyl propyl acetate (isobutyl acetate), 3-methylbutyl acetate (isoamyl acetate), 2 phenylethyl acetate. Les propyl acetate, 2-methyl propyl acetate et 3-methylbutyl acetate sont présents en plus grande quantité dans les fermentations spontanées puis inoculées avec *S. cerevisiae*, en moins grande quantité dans les fermentations spontanées et en très faible quantité chez celles avec *S. cerevisiae*. Ces composés dégagent respectivement des arômes de poire, de fruits et de banane. Le 2 phenylethyl acetate

dégage un arôme de rose. Il est présent en plus grande quantité chez les fermentations spontanées et chez les spontanées puis inoculées avec *S. cerevisiae* et en faible quantité chez celles avec *S. cerevisiae*. Démarrer la fermentation en spontané semble donc avoir un impact positif sur la qualité organoleptique des vins en apportant des arômes différents au vin comme il a été confirmé dans les études précédentes [26 et 35]. De plus, ajouter *S. cerevisiae* au cours de la fermentation semble décupler certains arômes déjà présents dans les fermentations spontanées alors qu'inoculer *S. cerevisiae* en début de FA semble limiter la production de certains arômes. Démarrer les fermentations en spontané puis les inoculer avec *S. cerevisiae* au cours de la fermentation semble donc être une piste intéressante pour conserver et décupler certains arômes organoleptiques positifs tout en s'assurant de finir la fermentation (IV partie 1).

### 3.2. Impact du microbiote sur la qualité

Afin de montrer l'impact du microbiote sur la qualité finale du vin, une ACP a été réalisée pour toutes les modalités de l'expérimentation 3. Elle montre le degré de similarité entre les modalités et triplicatas en prenant en compte les 4 familles des composés volatils (figure 25). Les dimensions du graphique supérieures à 50% (57,5%) montrent que l'ACP obtenue est significative. Les 10 fermentations avec *S. cerevisiae* sont regroupées ainsi que les pieds de cuve de carignan montrant la reproductibilité de ces expérimentations. Cependant, un des pieds de cuve d'artaban (39.7)



*Figure 25: ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les modalités de l'expérimentation 3 (39 et 40) sur l'ensemble des familles organoleptiques*

est séparé des deux autres triplicatas (39.6 et 39.7) qui sont regroupés et proches des pieds de cuve de carignan. Cette différence entre les triplicatas n'étant pas expliquée par les cinétiques fermentaires qui sont semblables, pourrait être expliquée par le metabarcoding.

Les différentes modalités sont distinctes sur l'ACP. Chaque modalité est distincte des *S. cerevisiae* suggérant la présence d'autres levures fermentaires dans les fermentations. De plus, les pieds de cuve et les rinçages de baies ont des positions différentes sur l'ACP pour chaque

variété montrant qu'une différence dans le type de microbioteensemencé semble générer des composés volatils et donc des arômes fermentaires différents.

Nous remarquons également que la variété semble avoir un effet sur la production de composés volatiles, particulièrement pour les rinçages de baies bien distincts sur le graphique et également dans une moindre mesure pour les pieds de cuve distincts mais relativement proches sur l'ACP. Le microbiote semble donc avoir un impact sur la qualité du vin comme attendu et publié dans les études antérieures [27] montrant une intensité aromatique différente entre la fermentation spontanée, les levures commerciales et le pied de cuve pour un moût de merlot. Pour décrire l'impact du microbiote sur les arômes fermentaires, l'exemple des esters d'éthyle a été choisi et détaillé ci-dessous.

Une nouvelle ACP a été réalisée en ne prenant en compte que la famille des esters d'éthyle pour les modalités de l'expérience 3 (figure 26). Les dimensions du graphique

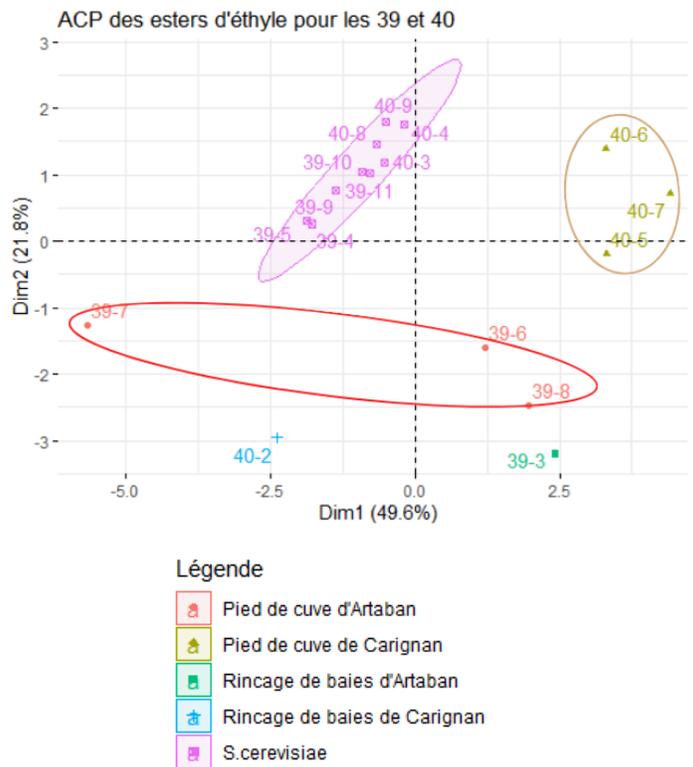


Figure 26 : ACP des résultats de la GC MS réalisée sur les modalités de l'expérience 3 (39 et 40) sur les esters d'éthyle

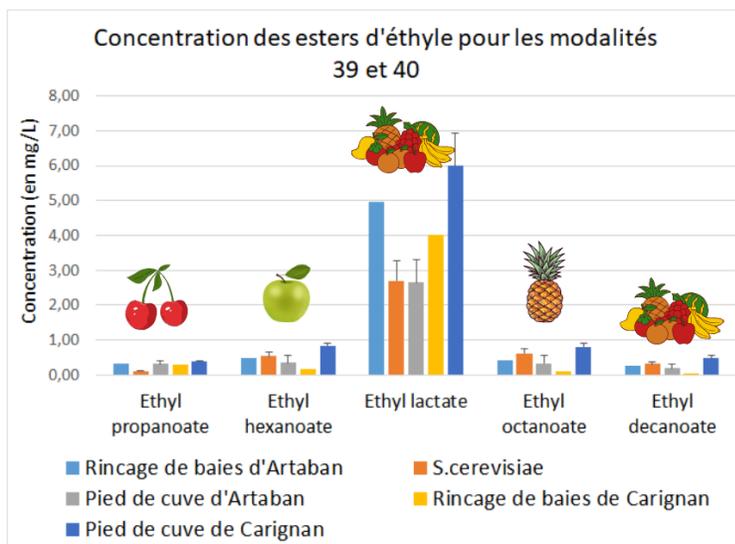


Figure 27 : Graphique des concentrations des différents esters d'éthyle dans les modalités de l'expérience 3

supérieures à 50% (71,4%) montrent que l'ACP obtenue est significative.

Nous observons que les *S. cerevisiae*, les pieds de cuve de carignan et les deux rinçages de baies sont regroupés dans des groupes distincts sur le graphique montrant la répétabilité de l'expérience et confirment l'hypothèse d'un impact du microbiote sur la qualité organoleptique. Le pied de cuve d'artaban 39.7 est séparé de la même façon que précédemment (figure 25) des deux autres pieds de cuve 39.6 et 39.8 montrant le manque de

répétabilité pour cette modalité. Les pieds de cuves d'artaban sont séparés des autres modalités mais contrairement à précédemment les pieds de cuves sont moins similaires et les pieds de cuve d'artaban semblent présenter davantage de similarité avec les rinçages de baies d'artaban. Le microbiote agirait donc différemment sur chaque famille de composés volatils. Le graphique 27 montrant la concentration de différents esters d'éthyles dans chaque modalité montre que ces composés volatils sont exprimés dans des proportions différentes dans chaque modalité. L'éthyle lactate associé à un arôme de fruit est présent dans des concentrations largement supérieures aux autres composés, principalement dans le pied de cuve de carignan et dans le rinçage de baies d'artaban. Les éthyles hexanoate, octanoate et decanoate sont présents dans des plus grandes quantités dans le pied de cuve de carignan, puis chez *S. cerevisiae*, dans le rinçage de baies d'artaban et le pied de cuve d'artaban et dans de très faibles quantités dans le rinçage de baies de carignan. Ces composés dégagent respectivement des arômes de pomme et d'ananas ainsi que des arômes de fruits. L'éthyle propanoate donnant un arôme de cerise est présent dans les mêmes quantités chez toutes les modalités à l'exception de celles de *S. cerevisiae*.

Les différents microbiotes utilisés pour l'ensemencement expriment donc des composés différents dans des concentrations différentes, cela implique des arômes fermentaires variables et impacte donc la qualité organoleptique. Le microbiote selon sa variété, selon s'il est issu d'un pied de cuve (déjà fermenté) ou d'un rinçage de baies et selon la diversité de ses levures semble donc impacter de manière différente la qualité finale du vin. De manière générale, le microbiote issu des pieds de cuve ou du rinçage de baies de carignan donne des arômes plus forts dans le vin. Ces résultats s'opposent à ceux d'une étude sur le chardonnay [27] montrant que les fermentations utilisant des levures commerciales et les spontanées avaient une intensité aromatique plus élevée qu'avec les pieds de cuve. L'intensité aromatique semble donc varier d'une variété à l'autre.

#### 4. Discussion

Un des objectifs de ce stage était d'étudier la diversité des microbiotes de baies de raisin et de la fermentation spontanée sur quatre variétés et quatre domaines. Cet objectif n'a pas pu être détaillé dans ce rapport, les résultats de metabarcoding nous permettant d'analyser cette diversité étant toujours en attente d'être reçu. Une diversité de levures non-*Saccharomyces* au début de la FA sur les pieds de cuve d'artaban et de carignan a cependant été observée mais ces résultats ne suffisent pas pour apporter de véritables conclusions à notre étude.

Le deuxième objectif était de mesurer l'impact de l'ajout de *S. cerevisiae* sur la cinétique et sur les composés aromatiques en fin de FA. Il a été observé que l'ajout de *S. cerevisiae* impactait la cinétique fermentaire de la variété résistante et cet impact est différent selon le moment de l'ajout : au début ou au cours de la FA. *S. cerevisiae* permet d'accélérer la FA et de réduire le temps de latence si elle est ajoutée au début de la fermentation. Ce changement impacte la qualité finale du vin : inoculer avec *S. cerevisiae* au cours d'une fermentation spontanée semble être une piste intéressante pour conserver et décupler certains arômes organoleptiques positifs. L'ensemble de ces résultats doit cependant être vérifié par une analyse statistique des

données. De plus, un manque de reproductibilité lié à l'échelle 1 L des fermenteurs a été observé principalement sur les fermentations spontanées où le microbiote impacte davantage la FA. En effet, la faible proportion des micro-organismes présents à la surface des raisins rend difficile l'homogénéité des triplicatas. Faire cette expérience sur une échelle plus grande comme 80 L (échelle pratiquée à l'unité de Pech Rouge) permettrait de réduire ce biais en amenant une plus grande diversité de micro-organismes dans nos fermenteurs. Cela permettrait également d'augmenter la probabilité d'avoir des *S. cerevisiae* naturellement présentes sur les baies de raisin qui pourraient assurer la fin de la FA. D'autre part, travailler dans des conditions stériles et non dans des conditions réelles de manipulation introduit également un biais dans nos conclusions. La majorité des levures étant introduite dans la fermentation par la cave, l'homme ou le chai [29],[30], travailler en condition réelle pourrait donner des résultats différents, plus proches de la réalité des fermentations.

Le troisième objectif a été de mesurer l'impact du microbiote sur la cinétique et sur les composés aromatiques des vins. Il a été observé que le microbiote impacte les cinétiques fermentaires de manières différentes selon la variété dont il provient et s'il est issu d'un rinçage de baies, de pieds de cuve ou de levures commerciales. Les cinétiques des levures commerciales *S. cerevisiae* et des pieds de cuve sont plus rapides, avec une  $V_{max}$  supérieure et un temps de latence inférieur au rinçage de baies. Les rinçages de baies ont une cinétique en deux temps avec deux pics de  $V_{max}$ . Chaque microbiote ne consomme pas les sucres et ne produit pas de l'éthanol à la même vitesse, et les levures n'ont pas les mêmes taux de conversion du glucose ou du fructose en éthanol. Cette différence est une piste intéressante pour la réduction des taux d'éthanol dans les vins. Ces différences semblent avoir un impact sur la qualité du vin, chaque microbiote ayant exprimé différemment certains arômes pour la plupart positif. Changer de microbiote permettrait donc de moduler les arômes fermentaires dans le vin final, notamment l'utilisation des pieds de cuve semble amplifier les arômes dans les deux variétés tout en gardant une cinétique fermentaire rapide. Le pied de cuve semble donc être une piste prometteuse pour répondre aux problématiques actuelles, des études statistiques complémentaires étant cependant nécessaires. Néanmoins, certains points pourraient être améliorés dans cette expérimentation. Seulement trois ou quatre points ont été utilisés en HPLC pour permettre le suivi des sucres et de l'éthanol, ce nombre est peu représentatif de toutes les étapes de la FA et plus de prélèvements auraient dû être réalisés. De plus, les fermentations n'ont pas été finalisées, une quantité élevée de fructose étant encore présente dans la fermentation, la fin de la fermentation aurait pu impacter nos résultats de GC-MS et jouer sur la qualité finale de nos vins. D'autre part, les fermenteurs de pieds de cuve et de *S. cerevisiae* n'ont pas été ensemencés avec les mêmes concentrations en levures ( $10^7$  pour les pieds de cuve et  $2 \cdot 10^6$  cellules/ mL pour *S. cerevisiae*) à cause de la difficulté de mesurer la concentration en levures sur des moûts naturels rarement homogènes. Cette différence introduit également un biais dans nos résultats puisque la quantité et la proportion de levures dans les fermenteurs impactent notamment les cinétiques. D'autre part, les résultats de métabarcoding sont nécessaires pour justifier et expliquer les différences dans la fermentation et la qualité. Les identifications des colonies grâce aux étalements sur boîte ont permis d'observer une certaine évolution des levures dans les pieds de cuve et d'avoir une

première idée du microbiote. En effet, la culturomique et l'identification de clones sont des méthodes permettant d'obtenir des résultats beaucoup plus rapidement que le metabarcoding, cependant elles ne permettent pas d'observer l'intégralité de la diversité du microbiote du raisin.

Le rinçage de baies réalisé dans l'expérimentation 3 a été une preuve de concept valable, qui a donné des résultats corrects et analysables. Cette expérience pourra être utilisée dans la suite de l'étude sur plusieurs autres cépages et avec des triplicatas.

Cependant, l'impact des bactéries et des autres micro-organismes sur les levures sur l'expérimentation 3 n'a pas été mesuré alors que de nombreuses bactéries comme les bactéries acétiques peuvent impacter la cinétique ou la qualité du vin. Une expérimentation supplémentaire a été imaginée afin d'observer cet aspect : le même moût flash pasteurisé va être ensemencé avec un consortium contenant des concentrations de levures en lien avec les résultats de metabarcoding. Les cinétiques et la qualité du vin (arômes) vont alors être observés pour voir si les résultats obtenus dans l'expérimentation 3 peuvent être reproduit en ensemencement uniquement avec des levures et sans présence de bactéries.

## CONCLUSION

Ce stage s'inscrit dans le projet OenoVard'occ qui fait suite au projet MicroVarioR. Les études précédentes ont permis de montrer la diversité et les impacts du microbiote sur différents facteurs mais peu d'études se sont intéressées au microbiote des variétés résistantes. Dans ce cadre, ce stage avait deux problématiques principales.

La première a été d'observer la diversité du microbiote de la baie et au cours de la fermentation chez des cépages classiques (syrah, muscat, grenache blanc, carignan et merlot) en comparaison avec des variétés résistantes (floréal, artaban, G5 et G14). L'effet de la variété, du domaine et du millésime ont été observés en prélevant nos variétés sur différents domaines de la région Occitanie (Pech Rouge, Vassal, Chapitre et Cazes) et en prenant en compte les résultats des années précédentes. Afin d'observer cette diversité, des approches culturomiques et métagénétiques ont été appliquées. Cependant, les données et résultats de cette expérimentation n'ont pas pu être analysées et intégrées à ce rapport en raison de la durée des traitements des données.

Le deuxième objectif de ce stage a été de mesurer l'impact du microbiote sur les cinétiques fermentaires et sur la qualité des vins (sur les arômes). Deux expérimentations ont été réalisées pour répondre à cette problématique, la première portant sur l'impact de l'inoculation de *S. cerevisiae* (LSA) à différents temps de fermentation et la seconde sur l'impact de l'inoculation du microbiote indigène issu des baies de raisin (rinçage) ou des pieds de cuve.

Les analyses statistiques ont permis de mettre en évidence les paramètres influençant cet impact : les espèces levuriennes composant le microbiote, leurs états fermentaires (rinçage de baies ou pied de cuve), la variété et le temps de fermentation auquel l'inoculation du microbiote a eu lieu. Inoculer *S. cerevisiae* au cours d'une fermentation spontanée ou inoculer avec un

microbiote naturel issu d'un pied de cuve semblent être des pistes prometteuses pour maîtriser la fermentation tout en préservant et en amplifiant les arômes spécifiques du vin. Ces données doivent cependant être confirmées par d'autres tests statistiques. Les fermenteurs inoculés avec les rinçages de baies doivent être réalisés en triplicata et sur un plus grand nombre de variétés pour confirmer les résultats obtenus. L'expérimentation doit également être réalisée à des échelles de fermentations en plus grand volume (80 L) afin d'éviter le biais expérimental lié à l'homogénéité des fermenteurs mis en évidence dans cette étude. En effet, la présence de *S. cerevisiae* a un caractère aléatoire dans les fermentations à l'échelle de vinification utilisée (1L) dû à la faible abondance naturelle de *S. cerevisiae* sur les baies.

Notre étude a principalement porté sur les levures, l'impact des bactéries doit donc être étudié afin de déterminer si les résultats obtenus peuvent être reproduits avec seulement un consortium de levures.

D'un point de vue personnel, ce stage a été un premier pas dans le monde de la recherche en agronomie. Il m'a permis d'acquérir des connaissances théoriques et pratiques en microbiologie, en biologie moléculaire, en bio-informatique et sur certaines techniques analytiques telles que l'HPLC et la GC-MS. J'ai pu participer et m'impliquer dans l'ensemble des phases d'un projet complexe, de la récolte du raisin au traitement des données finales et à l'interprétation des résultats. J'ai ainsi pu acquérir des compétences organisationnelles, en gestion de projet mais également de travail en équipe.

Ce stage m'a permis de découvrir le monde de la recherche, secteur que j'ai apprécié. Je me suis plus particulièrement intéressé à l'informatique appliquée à la biologie et à la gestion de projet. C'est dans cette voie que je souhaite poursuivre mon parcours à l'UTC.

## RÉFÉRENCES

1. Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire. (2022). *Infographie - La viticulture française*. agriculture.gouv [Internet]. Disponible sur : <https://agriculture.gouv.fr/infographie-la-viticulture-francaise>
2. Institut Français de la vigne et du vin. *Vignoble d'Occitanie*. vignevin-occitanie.com [Internet]. Disponible sur : <https://www.vignevin-occitanie.com/qui-sommes-nous/vignobles-doccitanie/>
3. *Nous connaître*. inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www.inrae.fr/nous-connaître#carte>
4. (2022). *INRAE, l'Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement*. inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://agriculture.gouv.fr/inrae-linstitut-national-de-recherche-pour-lagriculture-lalimentation-et-lenvironnement>
5. (2021). *Nouveau partenariat INRAE - IFV : la recherche et l'innovation pour préparer la viticulture de demain*. inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www.inrae.fr/actualites/nouveau-partenariat-inrae-ifv-recherche-linnovation-preparer-viticulture-demain>
6. *Unité Expérimentale de Pech Rouge*. agrisource.org [Internet]. Disponible sur : [https://www.agrisource.org/fr/7\\_108/5c332f3307c805cd14cf562a/INRA%20Pech%20Rouge%20Experimental%20unit.html](https://www.agrisource.org/fr/7_108/5c332f3307c805cd14cf562a/INRA%20Pech%20Rouge%20Experimental%20unit.html)
7. *Transfert de la collection de vignes de Vassal : lancement des opérations*. inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www.inrae.fr/actualites/transfert-collection-vignes-vassal-lancement-operatio>
8. *UMR SPO - Sciences Pour l'Oenologie*. agrisource.org [Internet]. Disponible sur : [https://www.agrisource.org/fr/7\\_108/5c332f3907c805cd14cf5717/UMR%20SPO%20-%20Sciences%20Pour%20l%27Oenologie.html](https://www.agrisource.org/fr/7_108/5c332f3907c805cd14cf5717/UMR%20SPO%20-%20Sciences%20Pour%20l%27Oenologie.html)
9. *UMR Sciences pour l'œnologie*. spo.montpellier.hub.inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www6.montpellier.inrae.fr/spo/>
10. *Sciences pour l'œnologie (SPO)*. umontpellier.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www.umontpellier.fr/recherche/unites-de-recherche/pole-aeb-presentation/sciences-pour-loenologie-spo>
11. *Adaptation, Diversité, Ecologie des Levures (ADEL)*. spo.montpellier.hub.inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www6.montpellier.inrae.fr/spo/Equipes/ADEL>
12. *Fermentation alcoolique : Levures, Arômes, Métabolisme*. spo.montpellier.hub.inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www6.montpellier.inrae.fr/spo/Equipes/FLAM>  
<https://www6.montpellier.inrae.fr/spo/Equipes/BIO>
13. *Plateau Analyses des Composés Volatils (PTV)*. spo.montpellier.hub.inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www6.montpellier.inrae.fr/spo/Structures-collectives/Plateau-Analyses-des-Composes-Volatils-PTV>
14. *Plateau Analyse sensorielle*. spo.montpellier.hub.inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www6.montpellier.inrae.fr/spo/Structures-collectives/Plateau-Analyse-sensorielle>
15. *Structures collectives*. spo.montpellier.hub.inrae.fr [Internet]. Disponible sur : <https://www6.montpellier.inrae.fr/spo/Structures-collectives>
16. *Vin et climat : Le taux d'alcool augmente*. lefigaro.fr [Internet]. Disponible sur : <https://avis-vin.lefigaro.fr/magazine-vin/o28431-vin-et-climat-le-taux-d-alcool-augmente>
17. *Généalogie de la vigne : du genre au cépage*. inrap.f. [Internet]. Disponible sur :

<https://www.inrap.fr/dossiers/Archeologie-du-Vin/Qu-est-ce-que-le-vin-/Genealogie-de-la-vigne-du-genre-au-cepape>

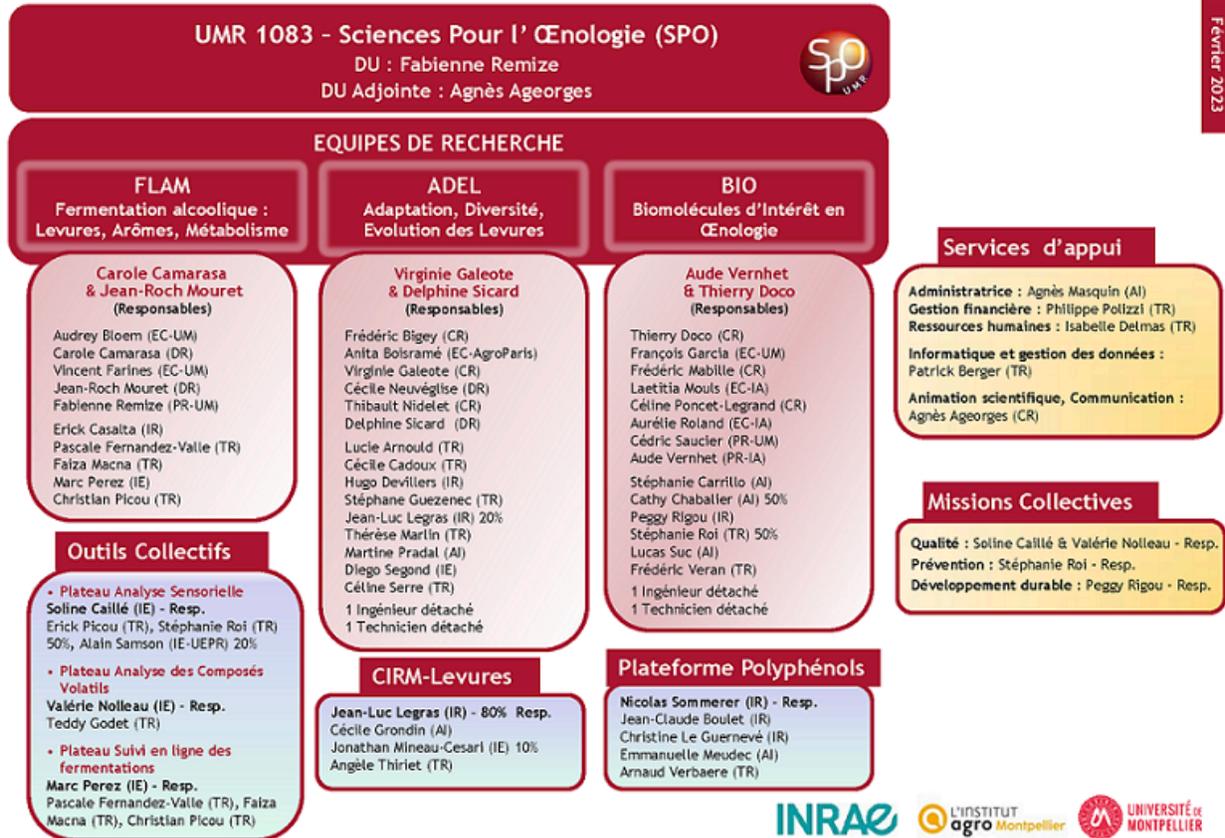
18. Bhattarai G, Fennell A, P. Londo J, Coleman C, G. Kovacs G. (2021). A Novel Grape Downy Mildew Resistance Locus from *Vitis rupestris*. *Am J Enol Vitic*
19. Frioni T, Squeri C, Del Zozzo F, Guadagna P, Gatti M, Vercesi A, Poni S. (2021). Investigating Evolution and Balance of Grape Sugars and Organic Acids in Some New Pathogen-Resistant White Grapevine Varieties. *Horticulturae*.
20. J.M. Salmon, H. Ojeda, J.L. Escudier. (2018). Disease resistant grapevine varieties and quality: the case of Bouquet varieties. *Oeno one, volume 52*.
21. Calonnec A, Jolivet J, Ramarosan M, Dufour M, Corio-Costet M. (2021). Defence responses of grapevine cultivars to powdery mildew: Ontogenic resistance versus genetic resistance. *Wiley*.
22. *Vinification : Comment est fait le vin ?*. [laplateformedesvignerons.com](https://www.laplateformedesvignerons.com). [Internet]. Disponible sur : <https://www.laplateformedesvignerons.com/vinification-comment-est-fait-le-vin/>
23. Zimmer A. (2013). *Etude du déterminisme génétique de la phase de latence chez Saccharomyces cerevisiae en conditions œnologiques. Impact des mécanismes de résistance au SO<sub>2</sub>*. Thèse Oenologie. Bordeaux : Université Bordeaux 2. <https://www.theses.fr/2013BOR22131>
24. *Le métabolisme des cellules*. [biologie101.fr](https://www.biologie101.fr). [Internet]. Disponible sur : <https://www.biologie101.fr/seconde/organisation-du-vivant/metabolisme-des-cellules>
25. Cristiana M, Vizireanu C, Dima F. (2013). Recovery of overripe bananas for bioethanol production. *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering*.
26. Lucas P, Masneuf I, Legras J, Bely M, Miot-Sertier C, El Khoury M, Campbell-Sills H, Borlin M, Maupen J, Vallet-Courbin A, et al. (2018). Des outils pour fiabiliser les fermentations des vins et cidres biologiques en utilisant des levures et des bactéries indigènes. *HAL archives-ouvertes*.
27. Alvarez-Barragan J, Mallard J, Ballester J, David V, Vichi S, Tourdot-Maréchal R, Alexandre H, Roullier-Gall C. (2023). Influence of spontaneous, “pied de cuve” and commercial dry yeast fermentation strategies on wine molecular composition and sensory properties. *Food Research International*.
28. Casalta E, Aguera E, Picou C, Rodriguez-Bencomo J, Salmon J, Sablayrolles J. (2010). A comparison of laboratory and pilot-scale fermentations in winemaking conditions. *BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING*
29. Abdo H, Rita Catacchio C, Ventura M, D'Addabbo P, Alexandre H, Guilloux-Bénatier M, Rousseaux S. (2020). The establishment of a fungal consortium in a new winery. *Scientific reports*.
30. Drumonde-Neves J, Fernandes T, Lima T, Pais C, Franco-Duarte R. (2021). Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalog of non-Saccharomyces yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Research*, 21.
31. Xua W, Liua B, Wanga C, Kongc X. (2021). Organic cultivation of grapes affects yeast succession and wine sensory quality during spontaneous fermentation. *LWT- Food Science and Technology*, volume 120. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819312368?via%3Dihub>
32. Milanović V, Comitini F, Ciani M. (2013). Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 161, pp 240-246.
33. Agarbati A, Canonico L, Mancabelli L, Milani C, Ventura M, Ciani M, Comitini F. (2019). The Influence of Fungicide Treatments on Mycobiota of Grapes and Its Evolution During Fermentation Evaluated by Metagenomic and Culture-Dependent Methods. *Microorganisms*.
34. Bagheri B, Franz Bauer F, Cardinali G, Evodia Setati M. (2020). Ecological interactions are a primary driver of population dynamics in wine yeast microbiota during fermentation. *Scientific*

reports.

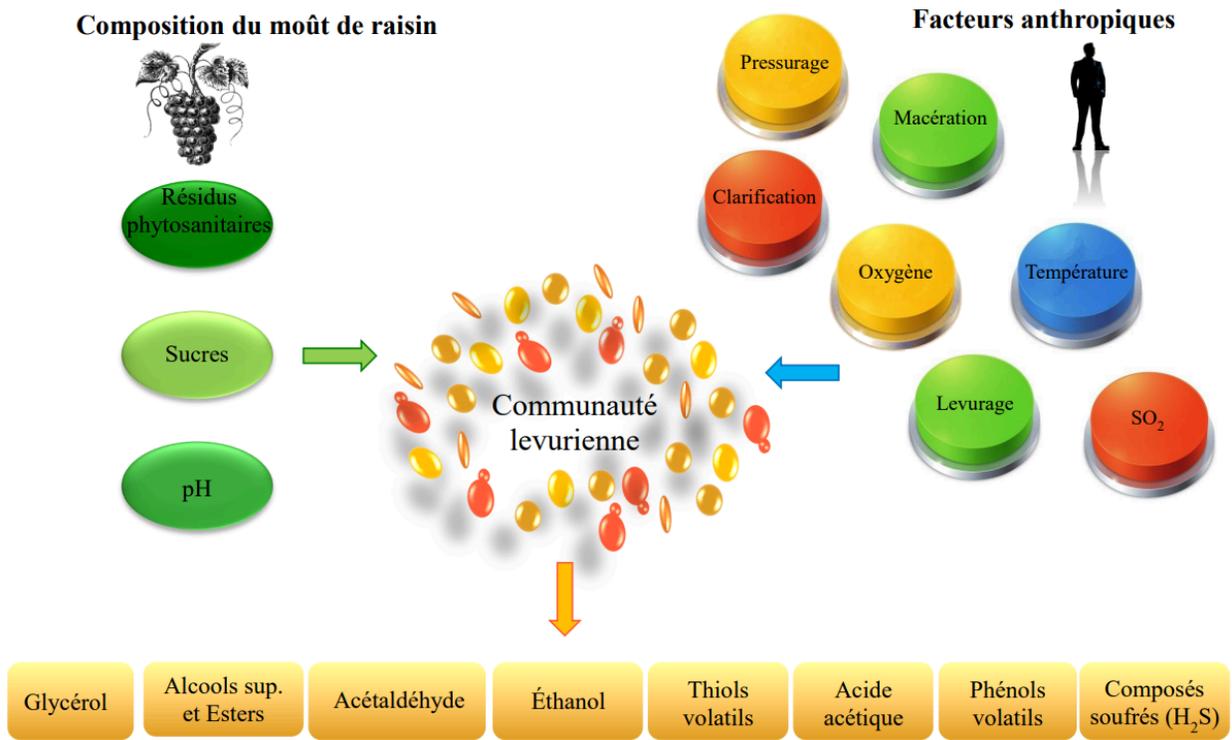
35. Albertin W, Miot-Sertier C, Bely M, Marullo P, Coulon J, Moine V, Colonna-Ceccaldi B, Masneuf-Pomarede I. (2014). Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 178, pp. 87-97.
36. Belessi C, Chalvanti I, Marmaras I, Nisiotou A. (2022). The effect of vine variety and vintage on wine yeast community structure of grapes and ferments. *Journal of Applied Microbiology*.
37. <http://www.oenolyse.fr/images/images/pdf/Levures.pdf>
38. Zinnai A, Venturi F, Sanmartin C, Quartacci M, Andrich G. (2013). Kinetics of d-glucose and d-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 115, pp. 43-49. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172312003519>
39. Kauê Mattos Rocha R, Andrioli J, Joel Scariot F, Vivian Schwarz J, Longaray Delamare A, Echeverrigaray S. (2022). Yeast diversity in Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes grown in the highlands of Southern Brazil. *Oeno one vine and wine open access journal*.
40. MARTINS G. (2012). *Les communautés microbiennes de la baie de raisin. Thèse Oenologie. Bordeaux : Université Bordeaux 2. (Guilherme-Martins\_These2012)*
41. Suobg, M. (2011). *Caractérisation moléculaire des ITS des champignons dégradant les bois de Guyane*. agritrop.cirad.fr [Internet]. Disponible sur : [https://agritrop.cirad.fr/562416/1/document\\_562416.pdf](https://agritrop.cirad.fr/562416/1/document_562416.pdf)
42. PCR (Polymerase Chain Reaction). ephytia.inra.fr [Internet]. Disponible sur : <http://ephytia.inra.fr/fr/C/23575/Veg-Di-g-PCR>
43. *Principes fondamentaux de la HPLC*. thermofisher.com [Internet]. Disponible sur : <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information>
44. Georg, G. (2017). *La chromatographie en phase gazeuse: principe*. culturesciences.chimie.ens.fr. [Internet]. Disponible sur : <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/chromatographie/la-chromatographie-en-phase-gazeuse-principe>
45. *Analyse par séquençage à haut débit*. chuv.ch [Internet]. Disponible sur : <https://www.chuv.ch/fr/log/accueil/prestations/analyse-par-sequencage-a-haut-debit-ngs>
46. <https://theses.hal.science/tel-01537740/document>

# ANNEXES

## Annexe 1 : Organigramme de l'UMR SPO au 1er février 2023



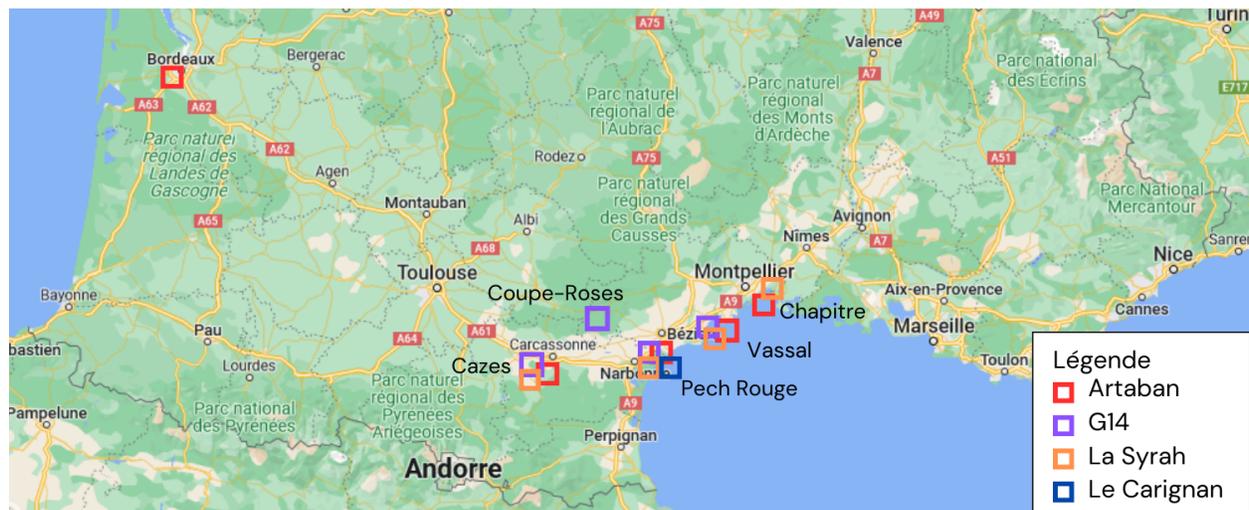
**Annexe 2 : Principaux facteurs influençant la communauté levurienne dans le moût et au cours de la FA et influence sur la composition du vin**



Annexe 3 : Tableau de codage des différents cépages avec leur provenance et leur catégorie

	lieu d'appro	Résistants	Microbiote (5kg)	Vinification	codage variété	codage sourcing	millesime	agroécologie	triplicata	codage complet	codage simplifié pour microbiote
artaban site 1 PR	PR-colombiers	1	1	1	AR	PR103	2023	NT	1	AR_PR103_2023_NT_1	2023-OC01
artaban site 1 PR	PR-P58	1	1	1	AR	PR58	2023	NT	1	AR_PR58_2023_NT_1	2023-OC02
artaban site 2 Chapitre	Chapitre	1	1		AR	CH	2023	AViti	1	AR_CH_2023_AViti_1	2023-OC29
artaban site 2 Chapitre	Chapitre	1	1		AR	CH	2023	DViti	1	AR_CH_2023_DViti_1	2023-OC30
artaban site 2 Chapitre	Chapitre	1	1	1	AR	CH	2023	TViti	1	AR_CH_2023_TViti_1	2023-OC31
artaban site 3 Cazes	Cazes	1	1	1	AR	CA	2023	NT	1	AR_CA_2023_NT_1	2023-OC16
artaban site 5 Vassal	Vassal	1	1	1	AR	VA	2023	NT	1	AR_VA_2023_NT_1	2023-OC32
syrah	PR		1	1	SY	PR102	2023	Bio	1	SY_PR102_2023_Bio_1	2023-OC03
syrah	Chapitre		1	1	SY	CH	2023	Bio	1	SY_CH_2023_Bio_1	2023-OC32
syrah	Vassal		1	1	SY	VA	2023	Bio	1	SY_VA_2023_Bio_1	2023-OC34
syrah	Cazes		1	1	SY	CA	2023	conv	1	SY_CA_2023_conv_1	2023-OC17
G14 Vassal	Vassal	1	1	1	G14	VA	2023	NT	1	G14_VA_2023_NT_1	2023-OC35
G14 PR	PR-P99	1	1	1	G14	PR99	2023	NT	1	G14_PR99_2023_NT_1	2023-OC04
G14 PR	PR-P85	1	1	1	G15	PR85	2023	NT	1	G15_PR85_2023_NT_1	2023-OC05
G14 cazes	Cazes	1	1	1	G14	CA	2023	NT	1	G14_CA_2023_NT_1	2023-OC18
Grenache rouge	PR		1		GR	PR	2023	Bio	1	GR_PR_2023_Bio_1	2023-OC06
Carignan	PR		1	1	CA	PR	2023	Bio	1	CA_PR_2023_Bio_1	2023-OC07
Cabernet Sauvignon	PR		1		CS	PR	2023	Bio	1	CS_PR_2023_Bio_1	2023-OC08
Cabernet franc	PR		1		CF	PR	2023	Bio	1	CF_PR_2023_Bio_1	2023-OC09
Mourvedre	PR		1		MV	PR	2023	Bio	1	MV_PR_2023_Bio_1	2023-OC10
Marselan	PR		1		MR	PR	2023	Bio	1	MR_PR_2023_Bio_1	2023-OC11
Petit Verdot	Cazes		1		PV	CA	2023	conv	1	PV_CA_2023_conv_1	2023-OC19
Fer Servadou	Cazes		1		FS	CA	2023	conv	1	FS_CA_2023_conv_1	2023-OC20
3176N	PR	1	1	1	3176	PR	2023	NT	1	3176_PR_2023_NT_1	2023-OC12
Prior	PR	1	1	1	PR	PR	2023	NT	1	PR_PR_2023_NT_1	2023-OC13
3328-168N	PR	1	1	1	3328	PR	2023	NT	1	3328_PR_2023_NT_1	2023-OC14
<del>3322-226N</del>	PR				<del>3322</del>	<del>PR</del>	<del>2023</del>	<del>NT</del>	<del>1</del>	<del>3322_PR_2023_NT_1</del>	<del>2023-OC</del>
3160 27 4 N	PR	1	1	1	3160	PR	2023	NT	1	3160_PR_2023_NT_1	2023-OC15
Touriga National	Cazes		1		TN	CA	2023	conv	1	TN_CA_2023_conv_1	2023-OC21
Niellucio	Cazes		1		NI	CA	2023	conv	1	NI_CA_2023_conv_1	2023-OC22
Pinotage	Cazes		1		PG	CA	2023	conv	1	PG_CA_2023_conv_1	2023-OC23
Vidoc	Cazes	1	1		VI	CA	2023	conv	1	VI_CA_2023_conv_1	2023-OC24
Monarch	Cazes	1	1		MO	CA	2023	conv	1	MO_CA_2023_conv_1	2023-OC25
Cabernet Cantor	Cazes	1	1	1	CC	CA	2023	conv	1	CC_CA_2023_conv_1	2023-OC26
Merlot Khorus	Cazes	1	1	1	MK	CA	2023	conv	1	MK_CA_2023_conv_1	2023-OC27
Pinotin	Cazes	1	1	1	P1	CA	2023	conv	1	P1_CA_2023_conv_1	2023-OC28
Noah	Vassal	1	1		NO	VA	2023	NT	1	NO_VA_2023_NT_1	2023-OC36
Isabelle	Vassal	1	1		IS	VA	2023	NT	1	IS_VA_2023_NT_1	2023-OC37
Artaban	PR	1	1	3	AR	PR	2023	NT	1	AR_PR_2023_NT_1	2023-OC38
Artaban	PR	1	1	1	AR	PR	2023	NT	1	AR_PR_2023_NT_1	2023-OC39
Carignan	PR		1	1	CA	PR	2023	NT	1	CA_PR_2023_NT_1	2023-OC40
	Total	24	40	26							

#### Annexe 4 : Carte des différentes sites où ont été prélevées les différentes variétés



## Annexe 5 : Protocole des identifications de colonies

### PCR

#### Composition du mix de PCR

- ❖ Tampon 10X : 4  $\mu$ L
  - ❖ dNTP : 0,8  $\mu$ L
  - ❖ Amorces ITS1 : 3  $\mu$ L
  - ❖ Amorces NL4 : 3  $\mu$ L
  - ❖ Taq Polymérase : 0,5  $\mu$ L
  - ❖ Eau Sigma : 27,8  $\mu$ L
- } 39  $\mu$ L par puits + 1  $\mu$ L de lysat

#### Programme thermocycleur

##### Programme pré-enregistré MLST :

- 2 minutes à 94°C
  - 30 secondes à 94°C
  - 30 secondes à 55°C
  - 1 minute à 72°C
  - 2 minutes à 72°C
- } 35 cycles

### Restriction

#### Digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction HinFI :



#### Composition du mix de restriction :

- ❖ Tampon 10X : 1,5  $\mu$ L
  - ❖ HinFI : 0,5  $\mu$ L
  - ❖ Eau Sigma : 3  $\mu$ L
- } 5  $\mu$ L par puits + 10  $\mu$ L de produit PCR

Incubation 1h à 37°C

**Annexe 6 : Les composés et leur arômes positifs fermentaires analysés en GC-MS**

Alcools supérieurs	Acides	Esters d'acétate	Esters éthyliques
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propanol</li> <li>• Isobutanol</li> <li>• Alcool amylique</li> <li>• Alcool isoamylique</li> <li>• Phényléthanol</li> <li>• Hexanol</li> <li>• Méthionol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide propanoïque</li> <li>• Acide butyrique </li> <li>• Acide valérique</li> <li>• Acide hexanoïque</li> <li>• Acide octanoïque</li> <li>• Acide décanoïque </li> <li>• Acide dodécanoïque </li> <li>• Acide 2-méthylbutyrique</li> <li>• Acide 3-méthylbutyrique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acétate de propyle </li> <li>• Acétate d'éthyle</li> <li>• Acétate d'isobutyle </li> <li>• Acétate d'amyle</li> <li>• Acétate d'isoamyle </li> <li>• Acétate d'hexyle </li> <li>• Acétate de phényle-éthyle </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propanoate d'éthyle </li> <li>• Isobutyrate d'éthyle</li> <li>• Butanoate d'éthyle </li> <li>• Valérate d'éthyle</li> <li>• Isovalérate d'éthyle </li> <li>• 2-méthylbutyrate d'éthyle </li> <li>• Hexanoate d'éthyle </li> <li>• Octanoate d'éthyle </li> <li>• Décanoate d'éthyle </li> <li>• Dodécanoate d'éthyle </li> <li>• Lactate d'éthyle </li> <li>• Succinate d'éthyle </li> </ul>

## Annexe 7 : Protocole d'amplification par PCR de la région ITS1

### Champignons et levures : PCR1 région ITS1

PCR Primers :

Illu4_ITS1F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
Illu6_ITS1F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNDVCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
Illu8_ITS1F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNRMCCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
Illu4_ITS2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNGCTGCGTTCTTCATCGATGC
Illu5_ITS2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNHGTGCGTTCTTCATCGATGC
Illu6_ITS2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNWGCTGCGTTCTTCATCGATGC

Incluant les queues illumina + les Frameshifts

Pour l'amorce ITS1F : TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG

Pour l'amorce ITS2 : GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

Et les parties spécifiques du locus ITS1

ITS1F : CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

ITS2 : GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Programme «Metabarcoding-ITS1» :

Température	Temps
94°C	2 min
30 cycles :	
94°C	30 s
55°C	45 s
72°C	60 s
72°C	4 min
15°C	infini

Faire un mix avec :

Réactifs pour Takara Ex-Taq	44 µL par tube
Tampon 10X	5 µL
dNTP	4 µL
ITS1F (5 pmol/µL)	5 µL
ITS2 (5 pmol/µL)	5 µL
Taq Takara Ex Taq	0,3 µL
H2O	24,7 µL

Puis ajouter 6 µL d'ADN (environ 20 ng) + eau

Faire un mix avec :

Réactifs pour MTP Sigma	Par tube (µL)
Tampon 10X	5
dNTP (10 mM)	1
ITS1-F (5 pmol/µL)	5
ITS2 (5 pmol/µL)	5
Taq MTP Sigma	0.5
H2O	27,5

Puis ajouter 6 µL d'ADN (environ 20 ng) + eau