



16^e Journée Scientifique Vigne-Vin

22 Mai 2025>>

L'Institut Agro Montpellier

Les communautés microbiennes en œnologie, de la parcelle à la cave.

Les actes

La 16^e édition de la **Journée Scientifique Vigne & Vin** se déroulera jeudi 22 mai 2025 sur le campus de la Gaillarde à l'Institut Agro Montpellier. Cette manifestation est organisée dans la dynamique de la communauté scientifique de **Montpellier Vine & Wine Sciences**, par l'Institut Agro Montpellier, INRAE, l'Université de Montpellier et la **chaire d'entreprises vigne et vin**.

Les Journées Scientifiques Vigne & Vin sont destinées aux professionnels de la filière vitivinicole attentifs aux avancées de la recherche et aux innovations auxquelles elles peuvent conduire. Elles ont pour objectif de permettre une veille technologique sur un large éventail de problématiques viticoles, œnologiques et économiques.

Cette année, la thématique proposée est « **Les communautés microbiennes en œnologie, de la parcelle à la cave** », et propose une **approche pluridisciplinaire** de ces questions avec des présentations de démarches développées en viticulture ainsi qu'en œnologie. Les connaissances présentées permettent de mieux comprendre les mécanismes régissant les interactions entre le microbiote et son environnement, que ce soit dans le sol, sur les feuilles de vigne, sur les baies de raisin ou pendant la vinification. Elles nourrissent la réflexion autour de pratiques comme la bioprotection ou l'utilisation de levures indigènes. Il s'agit de **tirer le meilleur potentiel de la biodiversité microbienne** tout au long de la chaîne d'élaboration du vin.

Comité Scientifique

- Agnès Ageorges, INRAE, UMR SPO
- Hervé Hannin, Institut Agro, UMR MOISA
- Cécile Leborgne, INRAE, UE Pech Rouge
- Raphaël Métral, Institut Agro, UMR ABSYS
- Fabienne Remize, INRAE, UMR SPO
- Thierry Simonneau, INRAE, UMR LEPSE
- Patrice This, INRAE, UMR AGAP Institut
- Laurent Torregrosa, Institut Agro, Pôle Vigne et Vin, UMR LEPSE

Comité d'organisation

- Agnès Ageorges, INRAE, UMR SPO
- Camille Breyse, Chaire d'entreprise Vigne et Vin
- Jana Kandler, Institut Agro Montpellier, Pôle Vigne et Vin
- Chantal Lefebvre, Institut Agro Montpellier, Pôle Vigne et Vin
- Sabine Ragusi, Institut Agro Montpellier, Pôle Vigne et Vin

Sommaire

Place du microbiote dans l'holobionte vigne : de l'obtention de descripteurs fonctionnels à son management en production viti-vinicole	p. 5
Sophie TROUVELOT INRAE, UMR Agroécologie, Dijon	
Exploration des données du microbiote pour identifier les antagonistes du mildiou de la vigne	p. 11
Paola FOURNIER INRAE, UMR SAVE, UMR AGAP Institut	
Traitements phytosanitaires et microbiote des baies de raisin	p. 17
Cécile NEUVÉGLISE & Evelyne AGUERA INRAE, UMR SPO & UE Pech Rouge	
Des racines aux bouteilles : la magie des microbes	p. 23
Anne HUMBERT & Laurence GUÉRIN Moët Hennessy	
Une exploration des dynamiques microbiennes du paysage viticole au chai	p. 27
Paul HÜBNER INRAE, UMR SPO & UMR CBGP	
Qualité des vins et microbiote : les premiers résultats du projet Holovini	p. 33
Jean-Luc LEGRAS INRAE, UMR SPO	
Biodiversité et flore microbienne du moût et du vin : de la caractérisation à la sélection	p. 38
Jessica NOBLE Lallemand Œnology	
Consortium mycobiotique dans la fermentation du vin	p. 44
Gabriela PINTO MIGUEL Univ Montpellier, UMR SPO	
Avancées scientifiques récentes sur les levures <i>Metschnikowia</i> : applications en œnologie	p. 45
Audrey BLOEM Univ Montpellier, UMR SPO	
Communautés microbiennes comme outil de pilotage de la transition agroécologique à la parcelle : de la théorie aux limites terrain	p. 50
Louise NICOURT AdVini	
Le microbiote des kéfirs de fruit : origine et évolution	p. 54
Pierre RENAULT INRAE, Micalis Institut	

Place du microbiote dans l'holobionte vigne : de l'obtention de descripteurs fonctionnels à son management en production viti-vinicole

Sophie TROUVELOT¹ et Pierre-Emmanuel COURTY¹

¹ Agroécologie, Institut Agro Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne, F-21000 Dijon, France

Contact : sophie.trouvelot@ube.fr

Microbiote et fonctions clés : de l'humain au végétal.

Le microbiote (i.e. ensemble des microbes associés à un organisme hôte) humain représente l'ensemble des microorganismes qui vit sur et dans le corps humain. L'organisme humain héberge toute une communauté de microorganismes : bactéries, archées, champignons et virus. Nous hébergeons des microorganismes au niveau de la peau (microbiote cutané), dans la bouche (microbiote bucco-dentaire), dans les organes génitaux (microbiote vaginal) et dans l'intestin (microbiote intestinal). Ce dernier type de microbiote a d'ailleurs rapidement excité la curiosité des scientifiques, dès la fin du XIX^{ème} siècle. Ainsi, Louis Pasteur et ses élèves/disciples, au même titre que d'autres microbiologistes (notamment allemands tel que Robert Koch) se sont interrogés sur la nature des microbes qui ne semblaient pas être pathogènes. Pasteur est allé jusqu'à se demander si la vie était possible sans microbe. C'est entre 1960 et 1970 que les grandes règles écologiques qui règnent dans l'intestin commencent à être décrites et qu'une vision plus dynamique s'instaure en découvrant notamment comment le microbiote s'installe et évolue de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Le microbiote intestinal est le plus important du corps humain (**Figure 1**), avec plus de 100 000 milliards de microorganismes qui contribuent très largement au bon fonctionnement de notre organisme et, par conséquent, de notre santé. Notre microbiote intestinal pèse à lui-seul près de 1,5 kg chez un adulte. Le microbiote intestinal colonise les parois de l'estomac, des intestins ainsi que des zones très profondes comme le côlon, où l'on dénombre environ 10¹¹ bactéries par gramme de contenu intestinal. Dans le tractus digestif, les levures représentent moins de 0,5% du microbiote, tandis que les bactéries en représentent plus de 90%. Le microbiote intestinal regroupe 800 à 1000 espèces de bactéries. Ces dernières trouvent dans le tube digestif des éléments nutritifs qui y transitent et une protection (niche). En retour, elles facilitent la digestion et produisent des molécules qui ont des effets bénéfiques sur le système immunitaire de l'hôte, ce qui va lui permettre de mieux résister à d'autres microorganismes comme des agents pathogènes. En ce sens, notre microbiote est en capacité (selon sa structuration), d'assurer une protection contre certaines pathologies, avec par exemple des propriétés anti-inflammatoires (Postler and Ghosh, 2005). Aussi, avec l'arrivée des techniques moléculaires (séquençage des ARNr 16S puis analyses métagénomiques), il a été possible de relier l'appauvrissement du microbiote (en espèces bactériennes et donc en diversité gènes) avec le développement de diverses maladies telles que l'obésité, le diabète, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le cancer du côlon et certaines formes d'autisme. Ainsi, le développement de certaines maladies est intimement lié à la structure et la composition en microorganismes du microbiote. L'analyse de microbiote devient un indicateur de santé humaine.

Il est désormais acquis que le microbiote humain se met en place dès la naissance et évolue tout au long de la vie. L'accouchement par voie basse, l'allaitement au sein, sont des sources d'ensemencement microbienne dès la naissance. Progressivement, l'exposition à des environnements riches en microbes (enfants élevés à la campagne versus enfants élevés en ville), l'alimentation, la composition en fibres des aliments vont également contribuer à l'ensemencement microbienne. Mais la nature même de notre alimentation peut également influencer considérablement la structuration de notre microbiote intestinal. A titre illustratif, une alimentation trop riche en graisses pourrait entraîner une altération des processus de régénération de certaines

cellules intestinales, par l'intermédiaire d'un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose). Le microbiote a donc une incidence directe sur notre santé. Plus il est diversifié et riche en bactéries, plus il y a d'interactions et de compétitions entre elles et plus les éventuels microorganismes pathogènes auront du mal à se développer et à créer une dysbiose. Il convient toutefois de rappeler que chaque individu développe son propre microbiote en fonction de ce qu'il a vécu et de ses habitudes alimentaires.

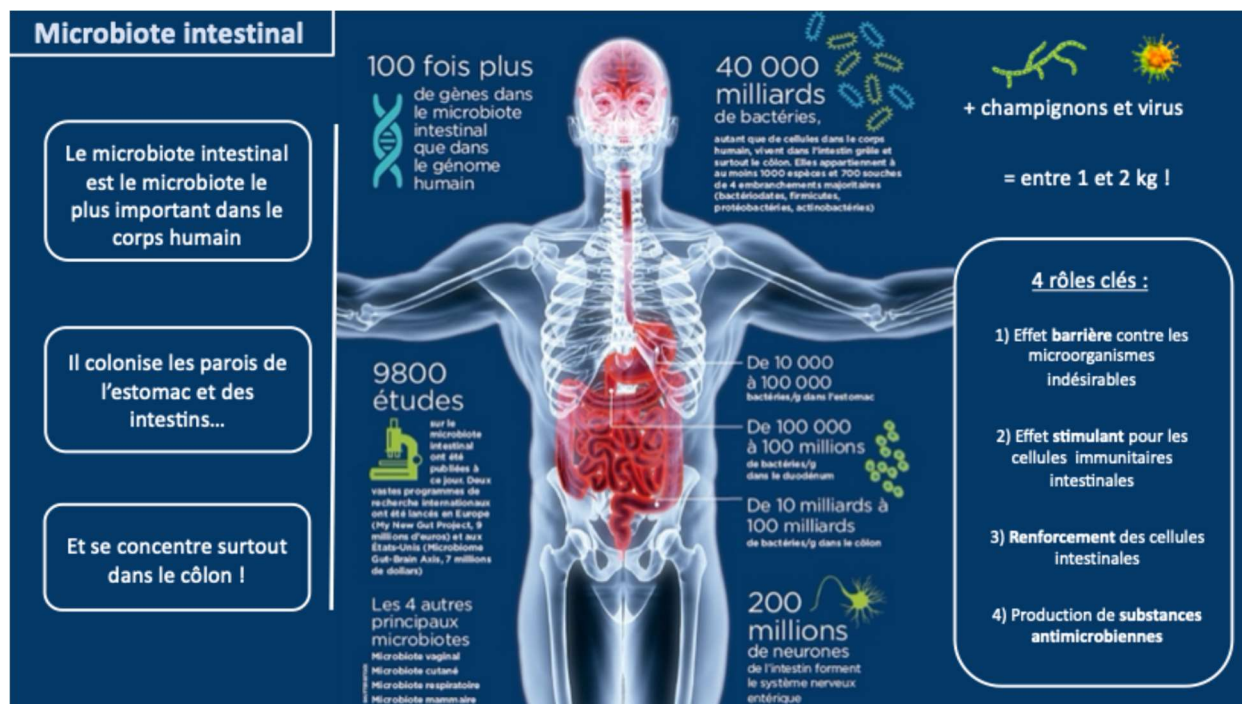


Figure 1. Présentation schématique du microbiote intestinal et de ses rôles clés (adapté de <https://naturolistique.fr>).

Le microbiote intestinal humain contient environ cent mille milliards de microorganismes, et un gramme de sol peut en contenir plus d'un milliard. La diversité des microorganismes du sol est en effet conséquente (1 gramme de sol contient jusqu'à 1 milliard de cellules bactériennes, appartenant à des dizaines de milliers de taxons, et jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques) et les interactions biologiques y sont complexes (Compant *et al.*, 2019). Le sol est ainsi considéré comme le réservoir primaire de microorganismes pour les plantes (Zarraonaindia *et al.*, 2015). Il est en effet communément admis que la colonisation des plantes par les microorganismes se fait du sol vers l'endosphère racinaire ou, de façon moindre, par la voie aérienne (phyllosphère). Comparativement aux microbes du sol, les microorganismes colonisant l'endosphère racinaire sont considérés moins nombreux et moins diversifiés (10^5 à 10^7 cellules par gramme de racine) mais en revanche plus spécialisés (Compant *et al.*, 2021). Les microorganismes qui colonisent l'endosphère racinaire peuvent donc être considérés comme la fraction la plus intime du microbiote associé aux plantes. Au niveau de la racine, la plante est capable de sécréter des métabolites carbonés complexes (exsudats racinaires) modulant les assemblages microbiens. Aussi, la comparaison entre le microbiote intestinal (qui s'enrichit avec notre alimentation) et le microbiote racinaire (qui se structure à partir du sol rhizosphérique, dans les zones d'alimentation hydrominérale du végétal) est aisée et compréhensible.

L'intérêt croissant pour l'étude du microbiote des végétaux vient également des perspectives adaptatives qu'il offre dans la régulation des fonctions de la plante. En effet, puisque les microorganismes sont capables de répondre plus rapidement que l'hôte à des changements de l'environnement (notamment par des transferts horizontaux de gènes), ils offrent donc à ce dernier un panel de nouvelles possibilités et de fonctions pour faciliter son adaptation aux fortes variabilités environnementales (Tierney *et al.*, 2019). Aussi, dans un contexte agronomique soumis à des enjeux clés (réduction des intrants de synthèse et changement climatique en particulier), la compréhension

de la structuration du microbiote végétal et de ses régulations pourrait faciliter la transition agroécologique et une meilleure résilience des plantes à différentes contraintes (biotiques comme abiotiques).

Du microbiote à l'holobionte ou de l'organisme au méta-organisme.

A l'image de ce qui se passe chez l'être humain, la santé du végétal *in natura* dépend des interactions entre la plante et une communauté de macro- et micro-organismes complexe et dynamique (Sasse *et al.*, 2018). Cette vision holistique de l'être vivant (animal comme végétal) a conduit au concept d'« holobionte » (du grec *holo*, "tout", et *bios*, "vie") qui se réfère à l'ensemble constitué de l'organisme hôte et de son microbiote associé (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2015). Ainsi, un être humain, un animal ou une plante ne sont plus vus comme de simples macro-organismes mais comme des méta-organismes, considérant l'hôte et l'ensemble des microorganismes qui leur sont associés, avec lesquels ils interagissent (**Figure 2** ; Theis *et al.*, 2016) et dont les fonctions sont spécifiques de cette association/interaction.

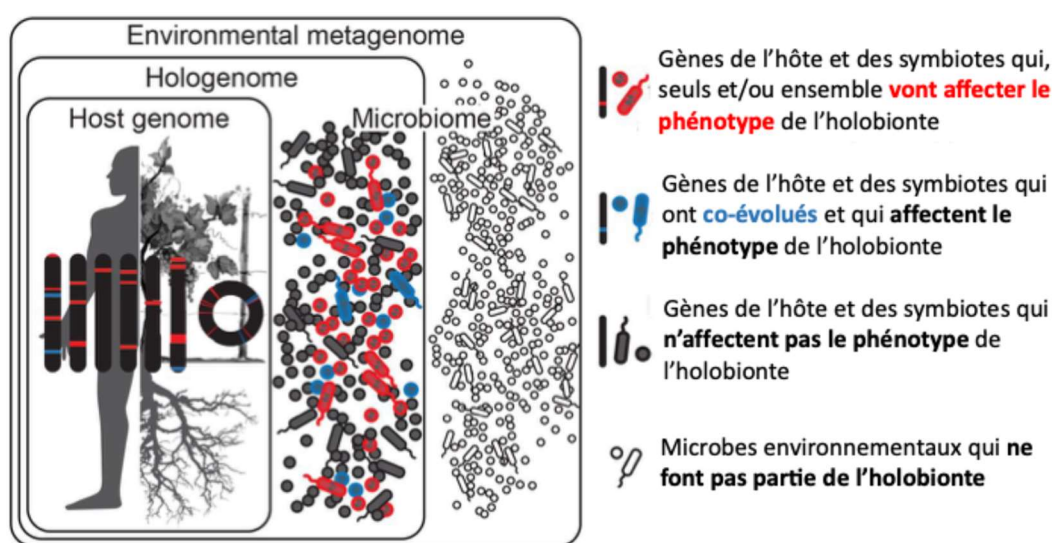


Figure 2 : Illustration schématique de l'holobionte (d'après Theis *et al.*, 2016).

Parmi les symbiotes (i.e. microorganismes partageant une vie commune plus ou moins longue avec le végétal et ayant un effet positif ou négatif sur le végétal), certains modifient le phénotype de l'holobionte et ont coévolué avec l'hôte (symbiotes représentés en bleu sur la **Figure 2**), d'autres modifient le phénotype de l'holobionte sans coévoluer avec l'hôte (symbiotes rouges, **Figure 2**) et enfin, une autre fraction ne modifie pas le phénotype de l'hôte (symbiotes gris, **Figure 2**). De plus, les différents symbiotes constitutifs de l'holobionte peuvent être transmis verticalement (ex. des racines vers les parties aériennes ou inversement), horizontalement (ex. des plants mères vers les plants filles) ou peuvent être recrutés à partir de l'environnement (notamment via les exsudats racinaires). Le phénotype de l'holobionte est par conséquent dynamique dans le temps (Theis *et al.*, 2016) et l'espace puisque les microorganismes peuvent se maintenir ou non dans l'hôte, de façon stochastique (aléatoire) ou déterministe. Notons enfin que les microorganismes de l'environnement (en blanc sur la **Figure 2**) ne font pas partie de l'unité holobionte mais peuvent être spécifiquement recrutés par l'hôte ou coloniser ce dernier. Leurs rôles restent toutefois d'importance dans un système agronomique puisqu'ils vont remplir des fonctions clés, notamment dans le sol (minéralisation de la matière organique, ...). Aussi, comprendre la structuration, l'évolution (spatiale comme temporelle) et le fonctionnement d'un holobionte devient crucial pour envisager ensuite le modifier, l'améliorer (et ainsi palier à des problématiques de dysbiose), voire le piloter au sein de l'agroécosystème.

Microbiote et holobionte vigne : facteurs d'influence et fonctions recherchées.

La composante microbienne de l'holobionte vigne et des sols viticoles est constituée d'une myriade de microorganismes procaryotes (archées et bactéries) et eucaryotes (champignons, chromistes et protozoaires). Les racines de la vigne correspondent au point d'entrée des microbes pour établir des relations endophytiques au sein de la plante hôte et contribuer à des traits de résistance / résilience à des stress biotiques comme abiotiques (**Figure 3** ; Villanueva-Llanes *et al.*, 2025 pour revue).

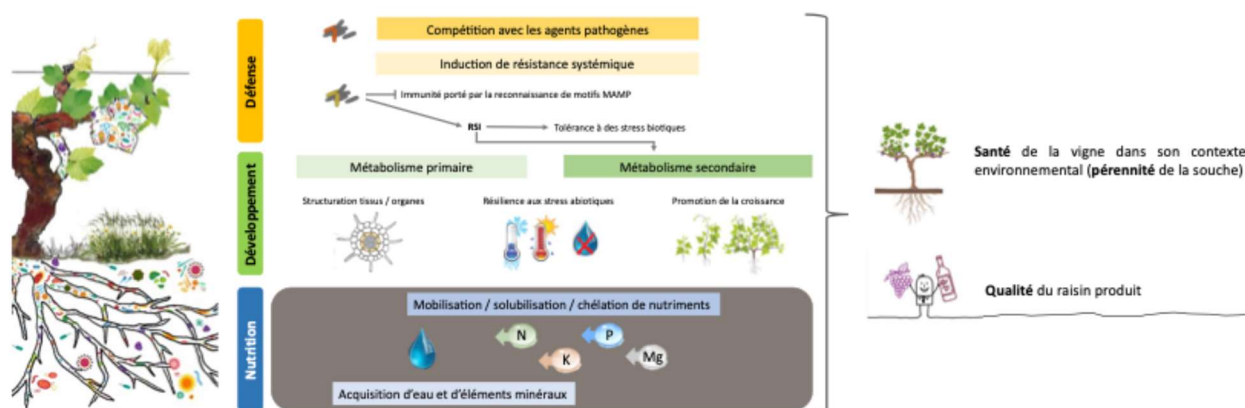


Figure 3 : Schéma illustrant l'importance du microbiote dans le fonctionnement du cep.

Le microbiote rhizosphérique contribue le plus à la caractéristique (typicité) régionale du vin, aussi décrite comme « effet terroir » (Gobbi *et al.*, 2022). Il a ainsi été observé que les données de microbiome (i.e. ensemble des gènes que possèdent ces microbes) discriminent avec succès les vignobles d'un continent spécifique et, au sein d'un continent, les vignobles d'une région de production de vin (Liu *et al.*, 2019). Mais la composition du microbiote varie en fonction de nombreux facteurs (Bettenfeld - Cadena *et al.*, 2022). Ces variations ne sont pas seulement présentes entre régions géographiques, parcelles ou même individus, mais également entre compartiments d'un même individu. Ainsi, on observe une structure microbienne différente dans le sol, les racines, le vieux bois, les rameaux, les feuilles, les fleurs, les raisins ou encore les pépins. Chez la vigne, la richesse et la diversité des espèces du microbiote suivent un gradient décroissant sol - racines – parties aériennes. Cela serait vraisemblablement causé par l'environnement extrêmement variable et hostile que constituent les parties aériennes : exposition aux UV, changements brutaux, importants et rapides des températures et de l'humidité. Mais si certains microorganismes sont exclusifs de certains organes (niches spécifiques), d'autres sont en revanche partagés par plusieurs compartiments distincts. Cela reflète le concept de « core microbiome » (ou « microbiome commun »), correspondant aux taxons communs entre plusieurs communautés microbiennes entre différents organes, différentes parcelles, différents cépages ou différentes régions (Zaura *et al.*, 2009).

Nombreuses sont les études qui ont décrit la composition taxonomique des communautés microbiennes de la vigne dans des compartiments isolés (ex. sol, rhizosphère, lignosphère, caulosphère, phyllosphère, anthosphère, carposphère et spermosphère) et dans des contextes différents (ex. zones géographiques, altitudes différentes, types d'agriculture). En revanche, beaucoup moins de travaux portent sur les caractéristiques fonctionnelles du microbiote, abordées par des approches de transcriptomique ou de métabolomique ou en comparant les microbiotes de plantes saines et dépérissantes. Souvent il apparaît que, comparativement aux parties aériennes, le microbiome du compartiment racinaire exprime plus de gènes associés à la transduction de signaux, la signalisation, le transport membranaire, la motilité cellulaire, le métabolisme (ex. des acides aminés, des composés aromatiques), la dormance et la sporulation, la chimiotaxie et la biodégradation des xénobiotiques. *A contrario*, au niveau des parties aériennes, il a été observé que dans les raisins et, en

second lieu, les feuilles il y avait la plus forte abondance relative de gènes microbiens impliqués dans la biodégradation de xénobiotiques et liés au métabolisme global. Cependant, outre la seule composante microbienne, il reste essentiel de considérer l'unité « microorganismes-végétal » et de s'intéresser plus à même aux fonctions et régulations modifiées au sein de la plante. Cela a souvent été initié pour des microorganismes bénéfiques (bactéries de types PGPR - Plant Growth Promoting Bacteria – et champignons mycorhiziens à arbuscules), pour lesquels des fonctions de biostimulation (amélioration de la croissance, de la production de biomasse et de la résistance à certaines contraintes abiotiques), voire de biocontrôle (amélioration de la résistance à certaines contraintes biotiques) ont été observées (Rolli *et al.*, 2017 ; Trouvelot *et al.*, 2015 pour revues). Pour autant avoir une vision plus générique et intégrative semble à présent nécessaire. C'est notamment l'approche que nous avons conduite dans le cadre du projet Holoviti (<https://www.plan-deperissement-vigne.fr/travaux-de-recherche/programmes-de-recherche/holoviti.>), pour lequel l'objectif était de déterminer des bioindicateurs (végétaux et/ou microbiens) (i) de l'holobionte « vigne » le long du continuum sol-racines-parties aériennes et (ii) en capacité de discriminer (voire d'être prédictif) d'états sanitaires contrastés. Nous avons adopté une approche transversale et pluridisciplinaire, en faisant appel à des méthodologies nous permettant de cibler des fonctions (via la génomique, la transcriptomique, la métabolomique et l'histologie) tant microbiennes que végétales clés. Nous avons pu identifier certains biomarqueurs d'un dépérissement dans des ceps de vigne, mais ces derniers semblent cependant dépérissement-dépendants. Un travail similaire est en cours dans le projet GetUp (<https://www.agro-bordeaux.fr/actu/recherche-projet-getup-parsada-gerer-le-microbiote-pour-protger-la-vigne-contre-le-mildiou/>), pour lequel des isolats et indicateurs (notamment microbiens) liés à la résistance/résilience contre le mildiou sont recherchés. Enfin, puisque le microbiome d'un vignoble est modifié par le climat (température, humidité, altitude) et le sol (pH, composition en minéraux), il pourrait être envisagé que les microbes associés à des plantes adaptées aux conditions arides pourraient avoir le potentiel de conférer une tolérance à des vignes provenant de région tempérée (Borghi *et al.*, 2024) et correspondre à un levier d'adaptation non négligeable. Il reste cependant à mieux appréhender les étapes clés de structuration et fonctionnement de l'holobionte vigne en conditions de production variées, et caractériser les pratiques agroécosystémiques les plus vertueuses pour maintenir voire privilégier des holobiontes les plus résilients possibles aux contraintes biotiques comme abiotiques.

Les microorganismes : des holobiontes eux-même !

Si le végétal apparaît tel un holobionte, les avancées technologiques ont également permis de mettre en lumière une complexité supplémentaire, liée au fait que certains microorganismes peuvent être eux-mêmes des holobiontes. A titre d'exemple, les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) hébergent des endobactéries appelées organismes apparentés à des bactéries (BLO = bacterium-like organisms). Ainsi, un isolat de CMA recrute sur ses spores un microbiote différent. On retrouve parmi les bactéries associées aux CMA des espèces appartenant aux Actinomycetales, Bacillales, Pseudomonadales, Burkholderiales, Rhizobiales et des endobactéries apparentées aux Mollicutes. Ainsi, les bactéries auxiliaires des CMA, constituent une communauté bactérienne dense et active, étroitement associée aux CMA et impliquée dans le développement et le fonctionnement de ces derniers (Verhage *et al.*, 2021). Bien que les spores des CMA soient connues pour héberger plusieurs bactéries dans leurs parois et leur cytoplasme, leur rôle dans la promotion de la santé écologique et l'établissement de la symbiose mycorhizienne en influençant la germination des spores, la croissance mycélienne, la colonisation des racines, la diversité métabolique et le contrôle biologique des maladies transmises par le sol reste en cours d'étude. Par ailleurs, outre les endobactéries, les CMA hébergent également des mycovirus. Ces virus infectent des champignons présents dans différents taxons et sont en capacité de moduler les fonctions de leur hôte. A cette heure, il apparaît que plus d'une quinzaine

de mycovirus (proposés et putatifs) pourraient infecter les CMA (Guinto *et al.*, 2023). Il est d'ailleurs suggéré que ces mycovirus contribuent à induire, au sein de la même espèce fongique, des différences dans l'absorption de phosphate et d'azote par les CMA et pourraient également modifier l'activité sporogène et /ou de promotion de croissance des plantes des CMA. C'est pourquoi plus qu'un recensement d'espèces au sein du microbiote, il semble pertinent de s'adresser plus à même aux isolats, pour lesquels les méthodes moléculaires restent malheureusement encore limitantes quant à leur détermination/discrimination. Ainsi, l'approche fonctionnelle représente une approche clé pour aborder ces questions et appréhender du mieux possible notre vision des interactions plantes-microorganismes.

Bibliographie

- Bettenfeld P., Cadena I Canals J., Jacquens L., Fernandez O., Fontaine F. van Schaik E., Courty P.-E., and S. Trouvelot (2022) The microbiota of the grapevine holobiont: A key component of plant health. *J Adv Res* 40: 1-15. Doi: 10.1016/j.jare.2021.12.008
- Borghi M., Pacifico D., Crucitti D. *et al.* (2024). Smart selection of soil microbes for resilient and sustainable viticulture. *Plant J.*, 118 (5): 1258-1267. Doi: 10.1111/tpj.16674. Epub 2024 Feb 8. PMID: 38329213.
- Compant S., Samad A., Faist H. *et al.* (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J Adv Res*, 19: 29–37.
- Compant S., Cambon M.C., Vacher C. *et al.* (2021). The plant endosphere world - bacterial life within plants. *Environ Microbiol.*, 23(4):1812-1829. Doi: 10.1111/1462-2920.15240. Epub 2020 Oct 4. PMID: 32955144.
- Gobbi A., Acedo A., Imam N. *et al.* (2022) A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural *terroirs*. *Commun Biol*, 5, 241. Doi: 10.1038/s42003-022-03202-5.
- Guinto T. and Balendres M.A. (2023) Current knowledge on mycoviruses associated with mycorrhizal fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 56 (10): 761-786. Doi: 10.1080/03235408.2023.2222439.
- Liu D., Zhang P., Chen D. and Howell K. (2019) From the Vineyard to the Winery: How Microbial Ecology Drives Regional Distinctiveness of Wine. *Front. Microbiol.* 10:2679. Doi: 10.3389/fmicb.2019.02679
- Postler T. and Ghosh S. (2005) Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. *Cell Metab.* 26 (1): 110–130. Doi:10.1016/j.cmet.2017.05.008.
- Rolli E., Marasco R., Saderi S. *et al.* (2017) Root-associated bacteria promote grapevine growth: from the laboratory to the field. *Plant Soil*, 410, 369–382. Doi: 10.1007/s11104-016-3019-6
- Sasse J., Martinoia E. and Northen T. (2018) Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome? *Trends in Plant Science*, 23 (1): 25 – 41.
- Theis K.R., Dheilly N.M., Klassen J.L. *et al.* (2016) Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. Gilbert J.A. (ed.). *mSystems*, 1, DOI: 10.1128/mSystems.00028-16.
- Tierney B.T., Yang Z., Luber J.M. *et al.* (2019) The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome. *Cell Host Microbe*, 26: 283-295. e8
- Trouvelot S., Bonneau L., Redecker R. van Tuinen, D., Adrian M. and Wipf D. (2015) Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35: 1449 – 1467.
- Vandenkoornhuysen P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A. and Dufresne A. (2015) The importance of the microbiome of the plant holobionte. *New Phytologist*, 206: 1196 – 1206.
- Verhage L. (2021) It takes three to tango: an endobacterium plays a role in mycorrhizal symbiosis. *The Plant Journal*, 108 (6): 1545-1546. Doi: 10.1111/tpj.15622.
- Villanueva-Llanes M.P., Carbù M., Cantoral J.M. and Cordeao-Bueso G. (2025) Exploring the microbiota of grapevines: tools and perspectives for sustainable agriculture. *Journal of Agriculture and Food Research*, 20, 101795. Doi: 10.1016/j.jafr.2025.101795.
- Zarraonaindia I., Owens S., Weisenhorn P., West K., Hampton-Marcell J., Lax S., Bokulich N., Mills D., Martin G., Taghavi S., Lelie D. and Jack G. (2015) The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *mBio*, 6 (2), Art. e02527-14.
- Zaura E., Keijser B.J.F., Huse S.M. and Crielaard W. (2009) Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, 9, Art. 259.

Exploration des données du microbiote pour identifier les antagonistes du mildiou de la vigne

Paola FOURNIER ¹, Lucile PELLAN ¹, Aarti JASWA ¹, Marine C. CAMBON ², Alexandre CHATAIGNER ¹, Olivier BONNARD ³, Marc RAYNAL ⁴, Christian DEBORD ⁴, Charlotte POEYDEBAT ¹, Simon LABARTHE ³, François DELMOTTE ¹, Patrice THIS ⁵, Corinne VACHER ¹

¹ UMR SAVE, INRAE, Bordeaux Sciences Agro, ISVV, Villenave-d'Ornon, France

² School of Biosciences, Birmingham Institute of Forest Research, Institute of Microbiology and Infection, University of Birmingham, United Kingdom

³ UMR BIOGECO, Univ. Bordeaux, INRAE, Cestas, France

⁴ IFV, Blanquefort, France

⁵ UMR AGAP Institut, Univ. Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

Contact : paola.fournier@inrae.fr

Contexte

L'oomycète *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni est un parasite biotrophe obligatoire responsable du mildiou, une maladie majeure de la vigne cultivée (*Vitis vinifera* L.), signalée dans la plupart des régions viticoles du monde [1–3]. Cet agent pathogène polycyclique provoque des cycles d'infections primaires et secondaires via la libération de spores sexuées et asexuées, respectivement [4]. Les spores sexuées (oospores) se forment à l'automne dans les tissus infectés, puis hivernent dans le sol et la litière [5]. Le stade épidémique consiste en une succession de générations asexuées sur les tissus verts et jeunes pendant la période végétative de la vigne. En raison de la forte sensibilité de *Vitis vinifera* à *P. viticola*, les fongicides chimiques constituent à ce jour le principal moyen de lutte [3]. La recherche de moyens de lutte alternatifs, incluant la gestion du microbiote, est une priorité en raison des conséquences avérées des fongicides sur la santé humaine et l'environnement [6].

Les vignes hébergent un microbiote diversifié, incluant des épiphytes foliaires vivant à la surface des feuilles (dans la phyllosphère) [7] et des endophytes foliaires colonisant les tissus internes des feuilles (l'endosphère foliaire) [8]. De nombreux micro-organismes issus de ces habitats ont été testés, individuellement ou en combinaison, pour leur activité antagoniste contre *P. viticola* [3, 9]. Certains se sont révélés prometteurs pour inhiber le stade asexué de l'agent pathogène, en agissant à différents niveaux : inhibition de la motilité, de l'adhésion et de la pénétration des zoospores par antibiose [10, 11], réduction de la sporulation et de la reproduction sexuée via interactions directes avec le mycélium (hyperparasitisme, antibiose) [12–14], blocage de la formation des sporangiophores et de leur germination [14–16]. Malgré ces avancées, une seule souche bactérienne — *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24 — est à ce jour homologuée en France pour le biocontrôle du mildiou.

À ce jour, peu d'études ont exploré la relation entre le microbiote du sol et les oospores du mildiou. Une étude en laboratoire a démontré l'activité antagoniste d'*Acremonium byssoides* contre les oospores de *P. viticola* par hyperparasitisme et antibiose [17]. De même, des bactéries, champignons et levures collectés dans des vignobles abandonnés ont efficacement inhibé la germination des

Glossaire

Épiphyte : micro-organisme vivant à la surface des tissus végétaux, en contact direct avec l'environnement extérieur.

Endophyte : micro-organisme résidant à l'intérieur des tissus végétaux.

Phyllosphère : Habitat microbien situé à la surface des feuilles. Les micro-organismes qui y résident sont les épiphytes foliaires.

Endosphère foliaire : Habitat microbien situé à l'intérieur des tissus foliaires. Les micro-organismes qui y résident sont les endophytes foliaires.

ASV (Amplicon Sequence Variant) : séquence unique d'ADN obtenue par séquençage haut débit d'un gène marqueur.

oospores hivernant dans des conditions naturelles [18]. Ces travaux suggèrent que le microbiote du sol pourrait être impliqué dans la régulation des oospores hivernants, offrant de nouvelles pistes pour le biocontrôle.

L'objectif de cette étude est d'identifier des micro-organismes ayant le potentiel de protéger les vignobles contre *P. viticola* et, en fin de compte, de réduire la dépendance à l'égard des fongicides chimiques. Nous avons exploré les hypothèses suivantes : (i) les parcelles où l'intensité et la fréquence des symptômes de mildiou sont faibles hébergent une plus grande abondance de micro-organismes susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de l'agent pathogène ; (ii) il est possible de prédire l'intensité et la fréquence du mildiou à partir des données de composition du microbiote.

Méthode

Pour explorer ces hypothèses, une étude de terrain a été conduite sur des paires de parcelles sur deux années consécutives dans la région Nouvelle-Aquitaine. Pour constituer une paire, deux parcelles devaient répondre aux critères suivants : présenter des fréquences et intensités de symptômes de mildiou sur feuilles et baies, contrastées sur plusieurs années (d'après les évaluations visuelles hebdomadaires fournies par l'IFV), être plantées avec le même cépage, suivre un mode de conduite identique (biologique, conventionnel ou biodynamique), être situées à moins de 10 km l'une de l'autre.

Les prélèvements ont été réalisés aux printemps 2022 et 2023, au stade phénologique 2–3 feuilles étalées et avant l'application des premiers traitements fongicides. Des échantillons de jeunes feuilles et de sol superficiel (0–5 cm de profondeur) ont été prélevés dans différentes zones de chaque parcelle : centre, bordure et témoins non traités de l'IFV. Pour chaque zone de prélèvement, quatre ceps représentatifs de l'âge et de l'état général de la parcelle ont été sélectionnés.

Les microorganismes épiphytes et endophytes ont été collectés séparément à partir des feuilles. Pour isoler les épiphytes, les feuilles ont d'abord été incubées dans une solution de lavage, afin de détacher les microorganismes présents à la surface foliaire et de les récupérer dans la solution. Les feuilles ont ensuite été soumises à une désinfection de surface afin d'éliminer les éventuels épiphytes résiduels. Cette étape permet de ne conserver que les microorganismes endophytes, c'est-à-dire ceux présents à l'intérieur des tissus foliaires. Les sols ont été tamisés et homogénéisés avant analyse.

Les communautés microbiennes — bactéries et champignons — ont ensuite été caractérisées par des analyses de biologie moléculaire : extraction d'ADN, PCR, et séquençage. Toutes les étapes, de la collecte au séquençage, ont été réalisées selon des protocoles rigoureux de stérilisation des outils afin d'éviter toute contamination entre échantillons.

Afin d'identifier les micro-organismes associés à une faible intensité et fréquence de mildiou, nous avons combiné quatre méthodes d'analyse d'abondance différentielle (ANCOM-BC2, Maaslin2, LinDA, ZicoSeq) ainsi qu'un modèle d'apprentissage automatique de type *Random Forest*. Nous avons également évalué le pouvoir prédictif du microbiote sur le niveau de la maladie à l'aide d'un algorithme *Random Forest*.

Résultats - Discussion

Sept paires de parcelles viticoles, toutes situées en région Nouvelle-Aquitaine (France) (**Figure 1**), ont été sélectionnées pour cette étude sur la base des registres épidémiologiques. Elles proviennent de quatre bassins viticoles distincts et ont été nommées selon leur zone d'origine : trois dans le Médoc (ME1, ME2, ME3), une dans le Libournais (LIB), une dans l'Entre-deux-Mers (E2M) et deux dans les Côtes de Buzet (CDB1, CDB2). Chaque paire était constituée d'une parcelle présentant une faible

intensité et fréquence de mildiou, et d'une autre avec des niveaux plus élevés de symptômes (**Figure 2**).

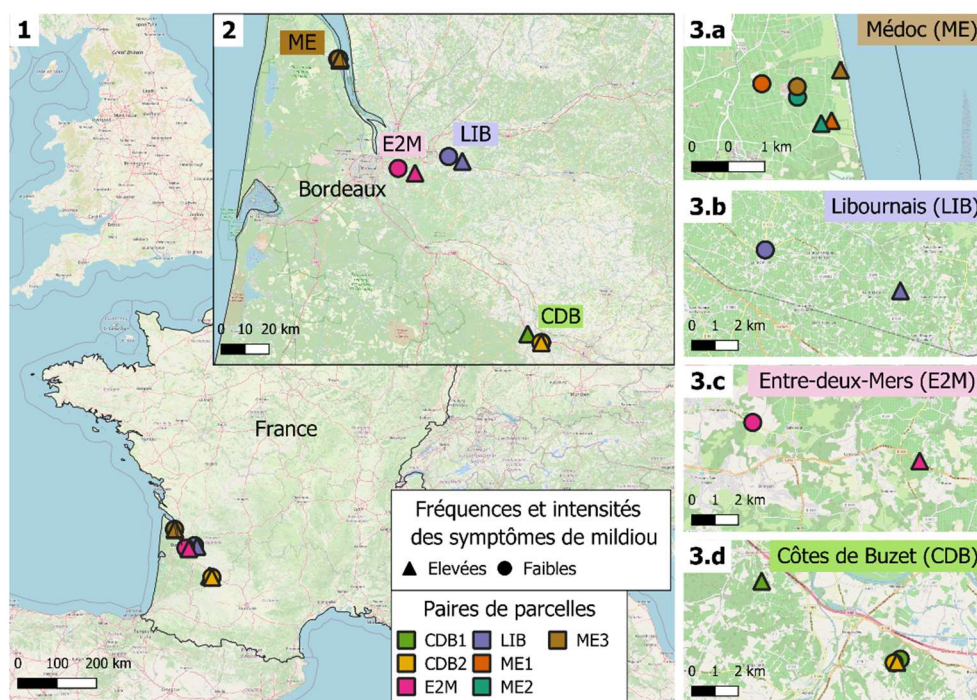


Figure 1. Carte des parcelles étudiées. Sept paires de parcelles, différant par leur intensité et fréquence de symptômes de mildiou, ont été sélectionnées, toutes situées en France dans la région Nouvelle-Aquitaine (cartes 1–2). Elles étaient réparties dans quatre bassins viticoles : Médoc (ME), Libournais (LIB), Entre-deux-Mers (E2M) et Côtes de Buzet (CDB) (cartes 3a–d). Chaque paire de parcelles est représentée par une même couleur ; les symboles distinguent une forte (triangle) ou faible (cercle) intensité et fréquence de mildiou. La distance intra-paire varie de 0 km (CDB2, parcelles adjacentes) à 7,5 km (E2M).

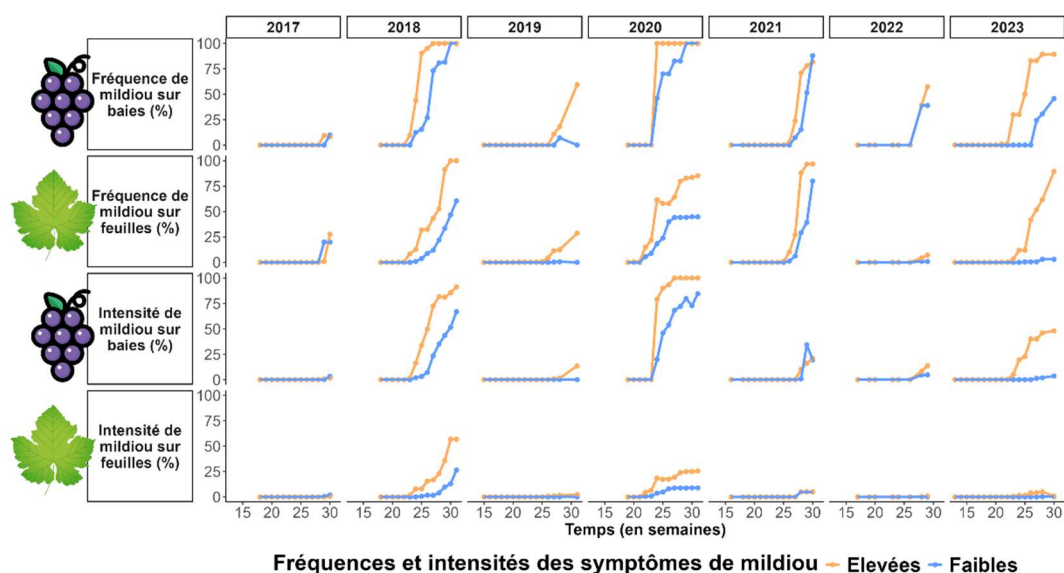


Figure 2. Exemple de courbes de progression du mildiou (couple de parcelles ME2). Évolution des quatre variables épidémiologiques mesurées par l'IFV (fréquence des symptômes sur baies, fréquence des symptômes sur feuilles, intensité des symptômes sur baies, intensité des symptômes sur feuilles) pour le couple de parcelles ME2, sur l'ensemble des années de suivi conjoint. La parcelle historiquement la plus touchée par le mildiou est représentée en orange, celle la moins touchée en bleu.

Conformément à l'hypothèse (i), nos analyses de l'ensemble de données de 2022 ont révélé la présence de 241 ASV fongiques et de 462 ASV bactériens significativement plus abondants dans les parcelles présentant une faible intensité et fréquence de mildiou. Les ASV différenciellement abondants ont été principalement trouvés dans le sol (141 ASV fongiques et 453 ASV bactériens) et dans une moindre mesure, dans la phyllosphère (128 ASV fongiques et 70 ASV bactériens). Seuls 11 ASV différenciellement abondants, tous des champignons, ont été détectés dans l'endosphère foliaire.

Une grande proportion des ASV significativement plus abondants dans la phyllosphère des parcelles avec une faible pression de la maladie étaient des levures basidiomycètes (**Figure 3**). L'activité de lutte biologique des levures basidiomycètes est bien documentée, car plusieurs espèces sont déjà utilisées comme agents de lutte biologique contre les maladies post-récolte [19, 20]. Ces levures régulent les agents pathogènes des plantes par divers mécanismes, notamment la compétition pour les nutriments et l'espace, le parasitisme et des mécanismes indirects, tels que l'induction de résistance [19, 20]. Ces mécanismes pourraient être efficaces pour lutter contre les maladies foliaires, notamment le mildiou.

À l'inverse, certains champignons, comme *Botrytis cinerea*, pathogène bien connu de la vigne, étaient plus abondants dans les parcelles à forte incidence de mildiou, à la fois dans le sol et dans la phyllosphère.

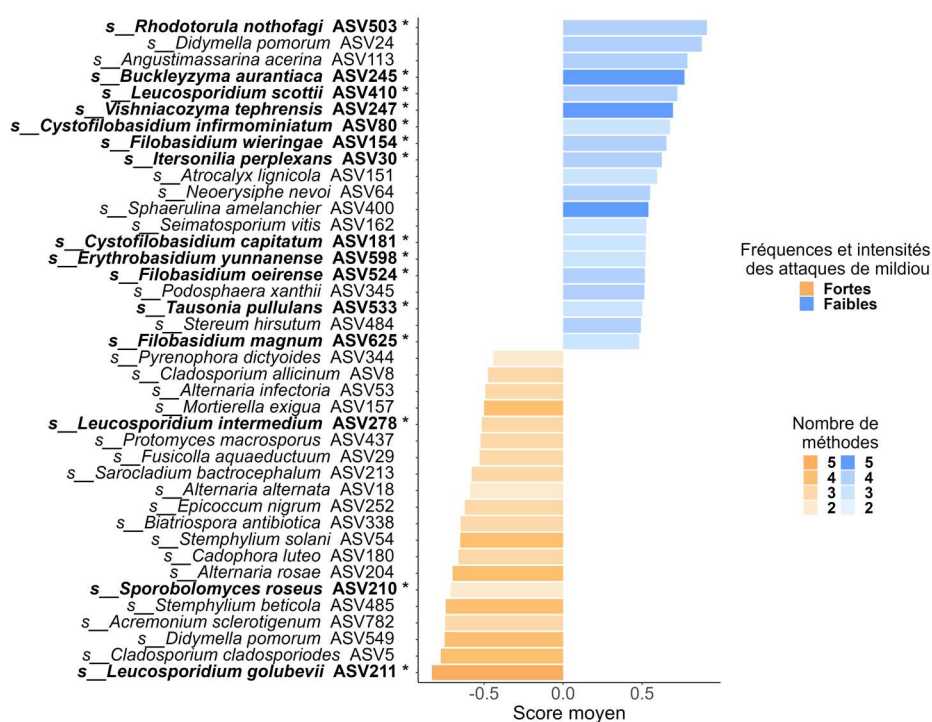


Figure 3. ASV fongiques de la phyllosphère dont l'abondance varie selon l'intensité et la fréquence de mildiou. Les 20 ASV fongiques les plus fortement associés à chacune des deux conditions (faible vs. forte intensité et fréquence de mildiou) sont présentés. Les champignons listés en haut de la figure (en bleu) sont plus abondants dans la phyllosphère des parcelles où l'intensité et la fréquence des symptômes de mildiou sont faibles. Ceux listés en bas (en orange) sont plus abondants dans la phyllosphère des parcelles où l'intensité et la fréquence des symptômes de mildiou sont élevées. La saturation de la couleur reflète le nombre de méthodes ayant identifié l'ASV comme significativement plus abondant dans une condition donnée. Les ASV fongiques appartenant aux levures Basidiomycètes sont indiqués en gras et suivis d'un astérisque (*). Les résultats sont basés sur des données collectées en 2022.

Afin d'identifier les communautés microbiennes les plus pertinentes pour prédire la pression de la maladie, nous avons testé diverses combinaisons de données microbiennes (champignons, bactéries ou les deux), ainsi que plusieurs niveaux d'agrégation taxonomique (de l'ASV à la classe) comme

variables prédictives (**Figure 4**). Les meilleures prédictions de la pression de la maladie (forte vs. faible), ont été obtenues à partir des champignons abondants du sol, analysés au niveau taxonomique de l'espèce (**Figure 4**). Le modèle atteignait un taux d'erreur moyen de seulement 15 % $\pm$ 10 (**Figure 4**). À l'inverse, les communautés microbiennes foliaires (phyllosphère et endosphère) se sont révélées de moins bons prédicteurs, avec des taux d'erreur supérieurs à 30 %. Ces résultats suggèrent que le microbiote du sol est un meilleur indicateur de la pression de maladie que celui des feuilles, et renforcent l'hypothèse selon laquelle les communautés microbiennes du sol pourraient influencer une maladie pourtant aérienne.

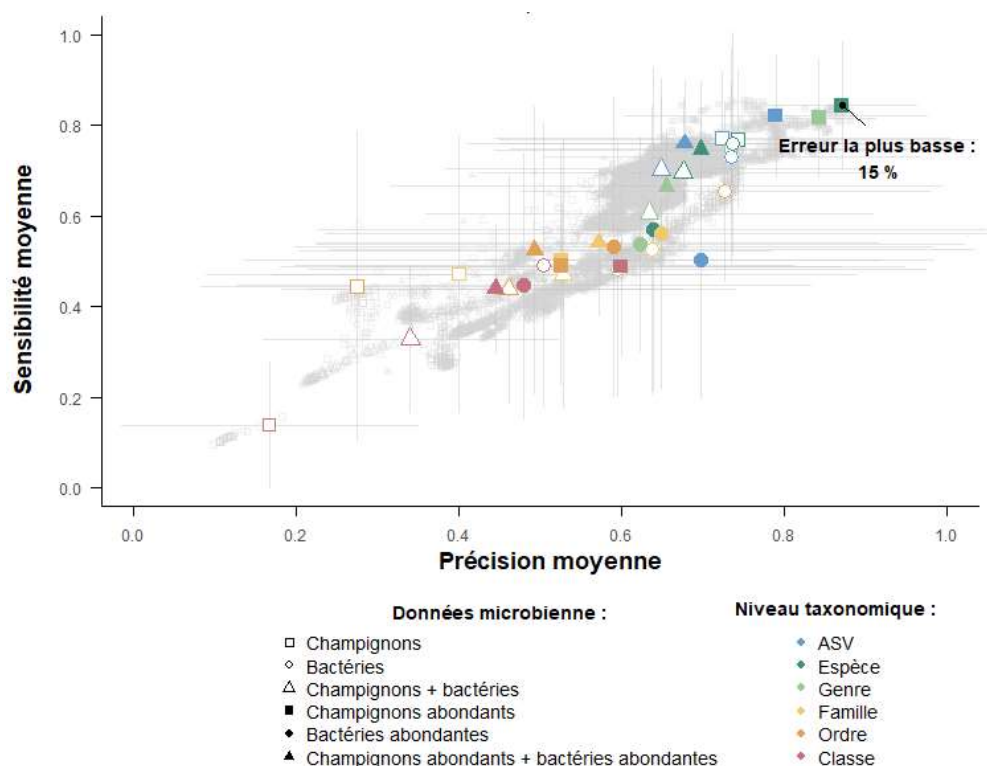


Figure 4. Performance de l'algorithme Random Forest pour prédire la pression de la maladie à partir des données du microbiote du sol. Chaque point du graphique représente les performances moyennes (sensibilité et précision) obtenues en testant différentes combinaisons de données microbiennes (champignons, bactéries ou les deux) et niveaux d'agrégation taxonomique (de l'ASV jusqu'à la classe). Les performances affichées sont basées sur des données échantillonnées en 2022.

Perspectives

Cette étude met en évidence un ensemble de micro-organismes — bactéries et champignons — plus abondants dans les feuilles et les sols des parcelles où l'intensité et la fréquence des symptômes de mildiou sont faibles depuis plusieurs années. Ces espèces, actuellement testées en laboratoire individuellement ou en combinaison, pourraient constituer de bons candidats pour le développement de solutions de biocontrôle microbien efficaces contre le mildiou. Par ailleurs, le microbiote du sol s'est révélé être un meilleur indicateur de la pression de la maladie que celui des feuilles, ce qui ouvre la voie à l'intégration des données microbiennes du sol dans des outils de surveillance et de prédiction des maladies en viticulture.

Source : Fournier, P., Pellan, L., Jaswa, A., Cambon, M. C., Chataigner, A., Bonnard, O., Raynal, M., Debord, C., Poeydebat, C., Labarthe, S., Delmotte, F., This, P., & Vacher, C. (2025). *Revealing microbial consortia that interfere with grapevine downy mildew through microbiome epidemiology. Environmental Microbiome*, 20(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40793-025-00691-9>

Bibliographie

1. Bois B, Zito S, Calonnec A. Climate vs grapevine pests and diseases worldwide: the first results of a global survey. *OENO One*. 2017;51:133–9.
2. Fontaine MC, Labbé F, Dussert Y, Delière L, Richart-Cervera S, Giraud T, et al. Europe as a bridgehead in the worldwide invasion history of grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*. *Current Biology*. 2021;31:2155-2166.e4.
3. Koledenkova K, Esmaeel Q, Jacquard C, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. *Plasmopara viticola* the Causal Agent of Downy Mildew of Grapevine: From Its Taxonomy to Disease Management. *Front Microbiol*. 2022;13:889472.
4. Gessler C, Pertot I, Perazzolli M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011;50:3–44.
5. Rossi V, Giosuè S, Caffi T. Modelling the Dynamics of Infections Caused by Sexual and Asexual Spores During *Plasmopara Viticola* Epidemics. *Journal of Plant Pathology*. 2009;91:615–27.
6. Jacquet F, Jeuffroy M-H, Jouan J, Le Cadre E, Litrico I, Malausa T, et al. Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. *Agron Sustain Dev*. 2022;42:8.
7. Perazzolli M, Antonielli L, Storari M, Puopolo G, Pancher M, Giovannini O, et al. Resilience of the Natural Phyllosphere Microbiota of the Grapevine to Chemical and Biological Pesticides. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:3585–96.
8. Pacifico D, Squartini A, Crucitti D, Barizza E, Lo Schiavo F, Muresu R, et al. The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers. *Front Plant Sci*. 2019;10:1256.
9. Nadalini S, Puopolo G. Biological control of *Plasmopara viticola*: where are we now? In: Kumar A, Santoyo G, Singh J, editors. *Biocontrol Agents for Improved Agriculture*. Academic Press; 2024. p. 67–100.
10. Tilcher R, Wolf GAI fuer P und P, Brendel G. Effects of microbial antagonists on leaf infestation, sporangia germination and zoospore behaviour of *Plasmopara viticola* (Berk. and Curtis) Berl. and de Toni. *Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent (Belgium)*. 1994;59.
11. Li Y, Héloir M-C, Zhang X, Geissler M, Trouvelot S, Jacquens L, et al. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. *Molecular Plant Pathology*. 2019;20:1037–50.
12. Kortekamp A. *Epicoccum nigrum* Link: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk et Curt.) Berl. et De Toni? *Vitis*. 1997;36:215–6.
13. Ghule MR, Sawant IS, Sawant SD, Sharma R, Shouche YS. Identification of *Fusarium* species as putative mycoparasites of *Plasmopara viticola* causing downy mildew in grapevines. *Australasian Plant Dis Notes*. 2018;13:16.
14. Zang C, Lin Q, Xie J, Lin Y, Zhao K, Liang C. The biological control of the grapevine downy mildew disease using *Ochrobactrum* sp. *Plant Protection Science*. 2020;56:52–61.
15. Falk S. *Fusarium proliferatum* as a Biocontrol Agent Against Grape Downy Mildew. *Phytopathology*. 1996;86:1010.
16. Shen H, Shi X, Ran L. Hyperparasitism on *Plasmopara viticola* by *Simplicillium lanosoniveum*. *PhytoFrontiers™*. 2022;2:101–4.
17. Conigliaro G, Ferraro V, Martorana A, Burruano S. In vivo antagonism of *Acremonium byssoides* endophyte in *Vitis vinifera*, towards *Plasmopara viticola*. 2008.
18. Dagostin S, Vecchione A, Zulini L, Ferrari A, Gobbin D, Pertot I. Potential use of biocontrol agents to prevent *Plasmopara viticola* oospore germination. 2006.
19. Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Droby S, Liu Y. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;167:153–60.
20. Freimoser FM, Rueda-Mejia MP, Tilocca B, Migheli Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol*. 2019;35:154.

Traitements phytosanitaires et microbiote des baies de raisin

Evelyne AGUERA ¹ & Cécile NEUVÉGLISE ²

¹ UE Pech Rouge, INRAE, 11300 Gruissan, France

² UMR SPO, Univ. Montpellier, INRAE, Institut Agro, 34060 Montpellier, France

Contacts : evelyne.aguera@inrae.fr et cecile.neueglise@inrae.fr

Le microbiote présent à la surface des baies de raisin est une variable importante pour la conduite du procédé de vinification et la qualité aromatique du vin final, notamment lorsque la fermentation alcoolique est opérée par les microorganismes indigènes. Cette pratique de fermentation dite « spontanée » connaît un regain d'intérêt dans le contexte de la vinification de raisins cultivés en bio ou biodynamie. Le développement de certains microorganismes durant le processus de transformation peut conduire à des défauts organoleptiques ou au contraire à une plus grande complexité aromatique. Il est donc important d'accroître les connaissances sur les facteurs impactant ce microbiote, l'évolution des communautés microbiennes pendant la fermentation et leur incidence sur la qualité du vin à l'issue de la fermentation alcoolique.

Les facteurs impactant la diversité du microbiote à la surface des baies de raisin sont nombreux et difficiles à évaluer de façon indépendante. On distingue les facteurs abiotiques tels que le climat, le microclimat de la grappe, la région, le millésime ou les pratiques culturales, et les facteurs biotiques tels que la maturité, l'état sanitaire des baies ou la variété de vigne [1-5].

Parmi les pratiques pouvant avoir une incidence directe sur le microbiote des baies, l'application des traitements phytosanitaires à la parcelle a été relativement moins étudiée. L'utilisation de fongicides sur les variétés non tolérantes aux maladies fongiques est fondamentale pour éviter le développement de champignons indésirables mettant en péril la récolte. Quelques études ont fait état de résultats parfois contradictoires. Si certains auteurs [1, 6-8] suggèrent que la présence et la diversité des levures fermentaires présentes à la surface des baies seraient favorisées par les traitements bio plutôt que conventionnels, Milanović *et al.* [3] montrent l'inverse, et Castrillo *et al.* [5] ne constatent aucun effet des traitements sur les populations de levures.

Devant ce manque de consensus, nous nous sommes intéressés à l'impact des traitements sur le microbiote des baies. L'originalité de notre étude réside dans l'utilisation de variétés de vignes résistantes à l'oïdium et au mildiou permettant de comparer l'incidence d'un traitement bio sur le microbiote des baies en comparaison d'une modalité non traitée. La faible pression sanitaire caractérisant le secteur géographique du dispositif expérimental permet de réaliser une telle étude.

Matériel et méthodes

1. Site de prélèvement et échantillonnage

Les expérimentations ont eu lieu en 2021 et 2022. Les parcelles prélevées sont situées à l'unité expérimentale de Pech Rouge (Gruissan, France) dans une zone située au cœur du massif de la Clape éloignée de 2 km de la cave expérimentale. Quatre parcelles de variétés résistantes aux maladies (G5, Floréal, Artaban, G14) constituent le cœur du dispositif expérimental (**Figure 1**). Dans ces parcelles habituellement non traitées deux rangs constituant la zone de prélèvement de la modalité traitée ont subi 6 traitements entre le 19 avril et le 23 juillet 2021 (IFT 17,68) et 7 entre le 19 avril et le 26 juillet 2022 (IFT 15,54). Les produits phytosanitaires utilisés, à base de cuivre et de soufre ainsi qu'un stimulateur de défense naturelle, sont compatibles avec la réglementation bio. La zone de prélèvement de la modalité non traitée se situe sur deux rangs séparés de la zone traitée par un rang tampon. Trois traitements contre la cicadelle de la flavescence dorée (traitements obligatoires) ont été

appliqués sur l'ensemble des parcelles. Pour chacune des 8 modalités, environ 12 kg de raisins sont récoltés aseptiquement sur les rangs sélectionnés de façon à être le plus représentatif possible de la zone de prélèvement.



Figure 1. Localisation des 4 parcelles de variétés résistantes aux maladies dans le cadre d'un projet plus large incluant des parcelles de cépages traditionnels. Les zones traitées sont indiquées par une bordure rouge. Les rangs considérés pour les modalités traitées et non traitées sont indiqués par des rectangle respectivement violets et verts.

2. Traitement des échantillons et fermentations

Environ 2 kilos de baies sont coupés au pédicelle. Les baies sont réparties en 3 lots de 500 g et rincées dans 400 mL d'une solution de NaCl et Tween-80. Après 1h30 d'agitation à 125 rpm l'eau de rinçage est centrifugée et le culot contenant les microorganismes est stocké à -20°C. Afin de vérifier l'application effective des traitements à base de cuivre dans les zones dédiées aux modalités traitées et la non application sur les zones des modalités non traitées, le cuivre a été dosé dans les eaux de rinçage des baies par une méthode colorimétrique (analyseur séquentiel Thermo Fisher Scientific).



Figure 2. Cafetières à piston (Bodum) ensachées utilisées pour la fermentation des moûts de raisins rouges à l'UE Pech Rouge.



Figure 3. Fermenteurs d'1 L utilisés pour la fermentation des moûts de raisins blancs sur la plateforme PhenoFerm de SPO.

Le reste des raisins rouges (G14 et Artaban) est égrappé à la main, 3 lots homogènes de 950 g sont constitués, foulés mécaniquement (Jumbo Mix, Interscience) puis introduits dans des cafetières à piston (bodums) ensachées (**Figure 2**). Les fermentations sont conduites à 20°C en 2021 et 24°C en 2022. L'avancée de la fermentation alcoolique est suivie par la perte de poids de la cafetière à piston. De même pour les raisins blancs (Floréal et G5), après l'égrappage, les baies sont foulées, puis la vendange est pressée après une étape de macération pelliculaire de 2 heures à froid. S'ensuit un débourbage d'une nuit avec ajout de pectinase (Rapidase Clear, Oenobrand). En fin de débourbage, le moût est soutiré, la turbidité est ajustée à environ 150 NTU. Trois fermenteurs d'1 L sont incubés à 20°C (**Figure 3**). Le suivi de la fermentation alcoolique est réalisé par une mesure automatique de la masse du fermenteur (1 mesure toutes les 20 minutes).

Quelques soient les fermentations, la teneur en azote est ajustée à 160 mg/L par ajout de DAP et une analyse physico-chimique des caractéristiques principales du moût est réalisée à T0, au moment de la mise en bodum ou fermenteur.

3. Analyse des communautés microbiennes

Les communautés fongiques des baies de raisin et des moûts à T0 et après dégagement de 10 g/L de CO₂ (T1) ont été analysées par métabarcoding, en utilisant l'ITS1 de l'ADN ribosomique comme marqueur taxonomique. Pour cela, l'ADN total des micro-organismes a été préparé à l'aide du kit DNeasy PowerSoil (Qiagen) puis a servi à amplifier l'ITS1. Les amplifions ont été séquencés avec le système MiSeq utilisant la technologie Illumina. L'analyse des variants de séquence d'amplicon (ASV) a été réalisée à l'aide du pipeline FROGS v.5.0.0. Les lectures contenant des bases indéterminées (N) ont été éliminées. La séquence des amorces a été retirée à l'aide de Cutadapt. Ensuite, les lectures ont été débruitées à l'aide de l'algorithme DADA2 et les séquences des lectures R1 et R2 ont été alignées à l'aide de PEAR. Les chimères ont été retirées avec vsearch et les ASV peu abondants ont été éliminés. Les ASV restants ont été affiliés taxonomiquement à l'aide de UNITE v9.0 complété par des séquences expertisées manuellement. Les analyses de diversité (taxa majoritaires, alpha diversité, ordination basée sur les indices de beta-diversité) ont ensuite été réalisées à l'aide de Easy16S. Pour l'étude de la β -diversité, une ANOVA multivariée permutational (PERMANOVA) avec 999 permutations a été utilisée comme test statistique. La significativité a été considérée pour $p < 0,05$.

En parallèle, des isoléments de levures sur boîte ont été effectués et identifiés taxonomiquement par amplification et séquençage des domaines D1/D2 et ITS de l'ADN ribosomique.

Résultats et discussion

Le dosage du cuivre dans les eaux de rinçage des baies a permis de vérifier l'application effective des traitements dans les zones des modalités traitées et la quasi absence de cuivre dans les modalités non traitées (**Figure 4**). La zone tampon entre les deux modalités s'est donc révélée suffisante et les conditions d'expérimentation validées.

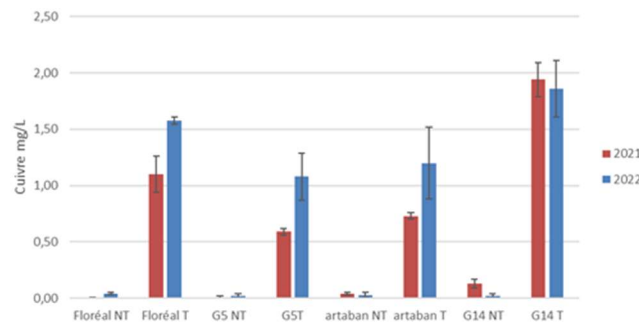


Figure 4. Analyse du cuivre dans les eaux de rinçage des baies. Les analyses des millésimes 2021 et 2022 sont représentées respectivement en rouge et bleu. T : traité, NT : non traité.

Une analyse de métabarcoding a été réalisée sur le microbiote des baies. Les champignons filamenteux des genres tels que *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* sont majoritaires, représentant dans certains échantillons plus de 95%. Les levures fermentaires sont minoritaires sur baies. L'analyse statistique des données de métabarcoding des 4 variétés montre que le mode de traitement a un effet significatif sur le microbiote fongique des baies de raisins pour certaines modalités seulement (Artaban en 2021 et G14 en 2022 ; **Figure 5**). Cependant, l'effet traitement n'explique que peu la diversité des microbiotes (environ 10%), par comparaison à l'effet variété (34% en 2021 et 53% en 2022).

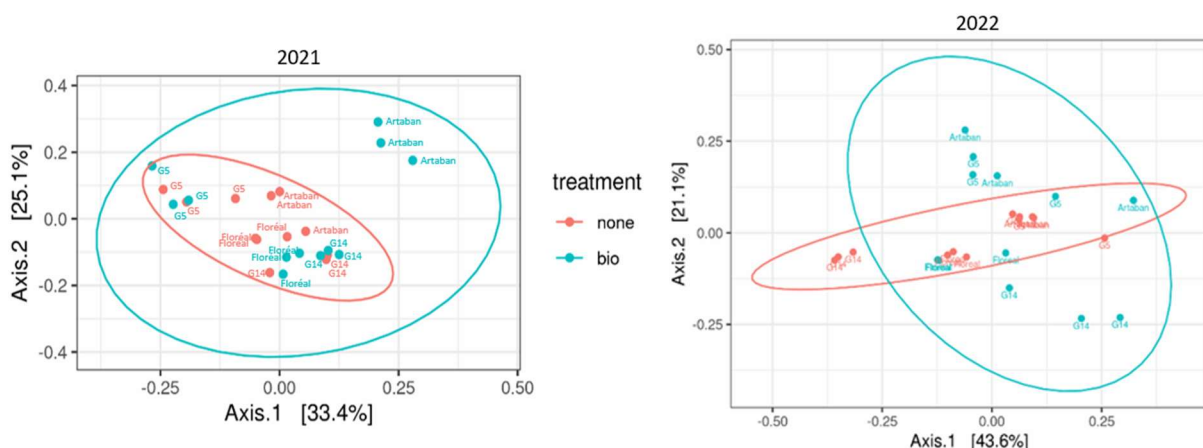


Figure 5. Représentation de l'analyse PCoA (Principal Component Analysis) des données de microbiote des baies de raisin des 4 variétés traitées bio (bleu) ou non traitées (rouge), en 2021 et 2022.

Les raisins des 8 modalités (4 variétés traitées ou non traitées) ont été mis en fermentation en 2021 et 2022. Les fermentations étaient très reproductibles jusqu'à environ 300 h puis variables en fonction de l'occurrence de *S. cerevisiae* dans les fermenteurs. L'exemple de la cinétique fermentaire du Floréal en 2022 est donné en Figure 6 avec une caractérisation de la composition fongique au cours du temps. A T0 le microbiote est proche en diversité de celui présent sur les baies, avec une proportion plus importante de levures fermentaires, qui peut s'expliquer par une extraction plus complète lors du rinçage des baies, permettant d'extraire plus de champignons. Les microbiotes après 3 à 4 jours de fermentation (T1) ont beaucoup évolué et sont majoritairement composés des levures fermentaires qui ont démarré la fermentation (genres *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Lachancea*, *Starmerella*, mais pas *Saccharomyces*). La différence de cinétique entre modalité traitée et non traitée en début de fermentation peut s'expliquer par la différence de composition du microbiote. La **Figure 6** à T1 montre

une abondance plus importante de *Metschnikowia* sur la modalité traitée et plus d'*Hanseniaspora* sur la modalité non traitée.

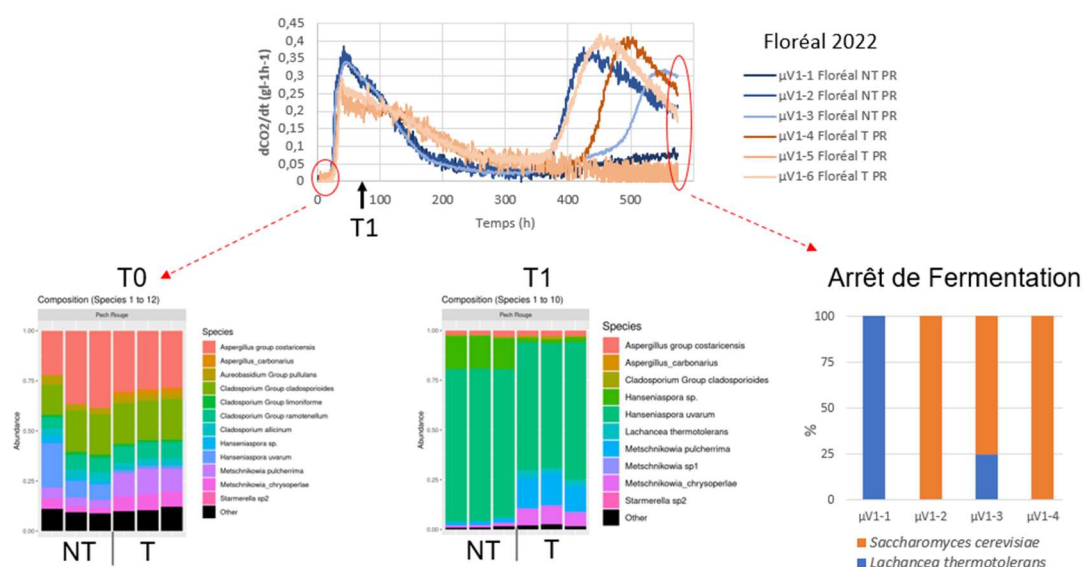


Figure 6. Effet du traitement sur le microbiote des raisins de Floréal et des conséquences sur la cinétique fermentaire conduite avec les levures indigènes.

En conclusion, le traitement antifongique appliquée sur les parcelles ne semble pas avoir d'impact majeur et systématique sur la composition du microbiote des baies des variétés utilisées, ce qui pourrait être dû à leur résistance aux maladies cryptogamiques. En revanche, la composition en levures fermentaires semble plus impactée, ce qui a des conséquences sur la cinétique fermentaire. Pour confirmer ces données, nous envisageons de tester la résistance des différentes espèces de levure au cuivre et au soufre.

Remerciements

Nous voudrions remercier le métaprogramme INRAE MétaBio pour le financement du projet exploratoire MicroVarioR (2020-2022) et l'ensemble des participants du projet.

Références bibliographiques

1. Cordero-Bueso G., Arroyo T., Serrano A., Tello J., Aporta I., Dolores Vélez M., Valero E. 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 145:132–139, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040.
2. Martins G., Miot-Sertier C., Lauga B., Claisse O., Lonvaud-Funel A., Soulas G., Masneuf-Pomarède I. 2012. Grape berry bacterial microbiota: impact of the ripening process and the farming system. *Int J Food Microbiol.* 17;158(2):93-100. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.013.
3. Milanović V., Comitini F., Ciani M. 2013. Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology* 161:240–246, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019.
4. Bokulich N.A., Thorngate J.H., Richardson P.M., Mills D.A. 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *PNAS* 111(1):E139-48. doi: 10.1073/pnas.1317377110.

5. Castrillo D., Blanco P. 2022. Influence of vintage, geographical location and agricultural management on yeast populations in Galician grape musts (NW Spain). *OENO One* 56(4), doi: 10.20870/oeno-one.2022.56.4.4898.
6. 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* 7(5):114. doi: 10.3390/microorganisms7050114.
7. Xu W., Liu B., Wang C., Kong X. 2020. Organic cultivation of grape affects yeast succession and wine sensory quality during spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology* 120:108894, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108894.
8. Perpetuini G., Rossetti A.P., Battistelli N., Zulli C., Cichelli A., Arfelli G., Tofalo R. 2022. Impact of vineyard management on grape fungal community and Montepulciano d'Abruzzo wine quality. *Food Research International* 158:111577, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111577.

Des racines aux bouteilles : la magie des microbes

Laurence GUÉRIN ¹, Anne HUMBERT ¹

¹ Moët Hennessy - Centre de Recherche Robert-Jean de Vogué, Rue des Gouttes d'or, 51530 Oiry, FRANCE

Contact : ahumbert-goffard@moethennessy.com

Les Maisons de vin de Moët Hennessy, véritables marques de luxe, se distinguent par une signature stylistique unique, reflet d'une histoire, de terroirs spécifiques, de savoir-faire ancestraux. Cependant, la pérennité de cette identité est aujourd'hui confrontée à des enjeux majeurs, qu'il s'agisse de changement climatique, de contraintes environnementales, d'évolution des pratiques ou de la nécessité d'optimiser les processus de production. Face à ces défis, la microbiologie apparaît comme une discipline incontournable, offrant des solutions innovantes pour préserver et sublimer la qualité et l'authenticité des vins de prestige.

Cette présentation propose un panorama des projets de recherche menés au sein du centre de recherche Robert Jean de Vogue, dans lesquels la microbiologie joue un rôle central dans la résolution de problématiques viticoles et œnologiques contemporaines. Nous explorerons différentes thématiques, allant de l'étude des communautés microbiennes du sol et de leur impact sur la santé de la vigne au développement de solutions de biocontrôle pour lutter contre les maladies de la vigne ou protéger le moût en passant par le développement de méthodes de détection de la flore fongique du raisin. Nous nous pencherons également sur la sélection et la caractérisation de levures pour la fermentation alcoolique, la maîtrise de biotechnologies au service de la correction de la matière première et sur le pilotage de la fermentation alcoolique afin d'optimiser le profil aromatique des vins et de garantir le style recherché par les maisons. Enfin, nous évoquerons des sujets plus exploratoires tels que la désalcoolisation microbiologique ou les levures désocténisantes.

PANORAMA DES PROJETS

1. Communautés microbiennes du sol

Longtemps perçu comme un substrat, le sol est aujourd'hui reconnu comme un écosystème vivant d'une biodiversité remarquable. Parmi eux, les bactéries et archées jouent un rôle clé : nutrition minérale, structuration des sols, résistance biotique et abiotique, détoxification. Il s'agit d'une nouvelle prise de conscience sur ce qui est appelé à ce jour, la vie des sols.

Le centre de recherche est impliqué dans plusieurs projets, permettant de mieux connaître **les microorganismes présents**, leur **fonctionnalité** et les **outils** de mesure associés dont les résultats pourront être intégrés à un ou des **outils de diagnostic de la santé de sols** et permettre ainsi d'appréhender l'impact des pratiques viticoles.

2. Lutte contre les maladies de la vigne

L'étude de la microflore présente sur les baies de raisins, depuis ces dernières décennies a permis d'avancer sur la connaissance des différents types de populations présents sur grappes et de mettre

en évidence les **antagonismes possibles** contre les maladies fongiques : *Botrytis cinerea*, oïdium, mildiou. Certaines initiatives ont également porté sur l'intérêt de la **prémunition** (injection du grapevine fanleaf virus (GFLV)) en tant que méthode de **biocontrôle** du court noué.

Dans l'objectif de pouvoir mieux maîtriser la qualité des raisins, et d'optimiser les programmes de traitements, l'accent a été mis sur la **détection** de ces maladies fongiques par des techniques moléculaires (QPCR) et/ou immunologiques (bandelettes). Le concept a pu être élargi à d'autres populations fongiques telles que celles recherchées dans le cadre des déviations ACF (arômes de champignon frais), notamment des *Penicilliums*.

3. Protection de la matière première

Souvent confondue avec le biocontrôle, la **bioprotection** permettrait de réduire les doses de sulfites à ajouter sur moûts, voir même de réduire l'activité des flores indésirables. Les levures non-saccharomyces de type *Metschnikowia* ou *Torulaspora*, principalement développées pour cet usage, trouvent leur place dans une utilisation moindre voire nulle de sulfites sur moût, mais nécessitent une évolution des pratiques pas toujours opérables.

4. Correction de la matière première

La gestion microbiologique de l'acidité, voire de l'équilibre **sucres/acides** est essentielle à ce jour.

La **correction de l'acidité** est pratiquée depuis longtemps en utilisant des méthodes chimiques (acides tels que l'acide tartrique...), physiques (résines échangeuses d'ions, traitements électro membranaires) et depuis quelques années, à l'aide de levures fermentaires : *Saccharomyces cerevisiae* (production d'acide malique) et non fermentaires : plus particulièrement *Lachancea Thermotolerans* (production d'acide lactique). Ces outils biologiques permettent d'augmenter l'acidité totale et de diminuer le pH.

La **diminution de la quantité de sucre initiale**, est une option envisageable à date, même si elle demande encore de l'optimisation, par l'utilisation de non-saccharomyces métabolisant le sucre pour produire de composés issus de leur métabolisme aérobie.

5. Gestion des profils de vins

L'objet principal d'un producteur est de pouvoir garantir la qualité des vins produits, voir dans certains cas assurer une constance de ses profils de vins finis chaque année. Les fermentations (alcoolique et malolactique) jouent un rôle essentiel pour y parvenir. Les fermentations sont conditionnées à la fois par la composition des mouts (initiale et/ou corrigée), les **microorganismes utilisés** (notions d'individus particuliers), et les **conditions nécessaires à leur croissance** : température, oxygène.

Concernant les microorganismes utilisés (Levures et bactéries), plusieurs choix peuvent être opérés, l'utilisation de microorganismes sélectionnés, et disponibles sur le marché, ou issus de **sélections parcellaires propres**. Dans le second cas, les micro-organismes sont plus particulièrement adaptés à la matrice et sans doute plus en adéquation avec le produit fini. Dans le cadre du processus de sélection des microorganismes et/ou pour mieux connaître les caractéristiques propres des souches utilisées, il est important de procéder à la **caractérisation**, c'est-à-dire à l'**évaluation des grandes caractéristiques recherchées ou non**, comme : pouvoir fermentaire, peu ou pas de production d'H₂S, de même pour l'éthanal, diacétyl... pour les levures. Pour les bactéries lactiques, leur capacité à produire de l'acide lactique, et leur tolérance à l'alcool et/ou aux sulfites... sont des critères à déterminer.

Afin d'exprimer au mieux les caractéristiques, performances des souches utilisées (levures), la mise en place des conditions nécessaires à leur croissance permet de piloter au mieux le déroulé des fermentations, et de pouvoir parler de **pilotage in-fine**. Ce dernier peut consister en l'élaboration de stratégies de vinification par l'ajustement en temps réel des températures, et/ou des nutriments, plus particulièrement l'azote, les stérols, l'oxygène pour orienter le métabolisme des levures en vue de l'obtention de profil aromatique recherché.

De plus, le changement climatique entraîne des évolutions des propriétés physico-chimiques et de la composition des moûts qui peuvent affecter les caractéristiques aromatiques des vins et, par conséquent, menacer la signature stylistique si précieusement construite, y compris la contribution spécifique des arômes fermentaires. Ainsi, dans un contexte de préoccupations environnementales croissantes, il est crucial de diminuer l'impact énergétique des opérations de vinification, notamment en optimisant le pilotage de la fermentation alcoolique pour obtenir le profil aromatique final souhaité avec une consommation d'énergie réduite.

6. Désalcoolisation

Afin d'obtenir un vin effervescent totalement désalcoolisé (<0.5% vol.) conservant des qualités organoleptiques comparables aux références alcoolisées, une approche innovante combinant séparation membranaire et microbiologie a été développée, contournant les limitations des procédés existants. La méthode développée s'appuie sur la capacité des levures (*Saccharomyces cerevisiae* ou autres) à respirer l'éthanol en conditions aérobies une fois que le glucose du milieu est épuisé. Cette transition d'un métabolisme fermentaire vers un métabolisme respiratoire est appelée « shift diauxique ». Les enjeux principaux du développement et d'optimisation du procédé de désalcoolisation, pouvant être conduit en batch, fed-batch ou continu, ont porté sur la préculture fermentaire des levures (composition du milieu, réhydratation), l'activation de leur métabolisme respiratoire en phase aérobie (agitation, débit d'oxygène, méthode de récolte des levures) et la désalcoolisation proprement dite (teneur en éthanol, agitation, oxygénation, source carbonée, température, séparation des levures). Les tests ont confirmé une tolérance maximale des levures à 6% d'éthanol, mais l'amélioration du pH et l'enrichissement du perméat en vitamines et oligo-éléments ont permis d'accélérer le processus de désalcoolisation.

CONCLUSION

Le panorama des initiatives menées au sein du centre de recherche RJDV illustre le rôle central de la microbiologie dans nos stratégies d'amélioration des pratiques viticoles et œnologiques. L'approche intégrée que nous privilégions, combinant expertise scientifique et collaboration avec les acteurs de terrain, nous permet de développer des solutions concrètes et adaptées aux besoins spécifiques des maisons MH. De la conception de nouveaux outils de diagnostic à la mise au point de solutions de biocontrôle innovantes, en passant par la sélection de levures aux propriétés inédites, la microbiologie offre un potentiel immense pour transformer et améliorer les pratiques viticoles et œnologiques, assurant ainsi la pérennité et l'excellence des vins. Cette transformation contribue à une viticulture et une œnologie plus durables, respectueuses de l'environnement et garantes de la qualité et de l'expression des terroirs.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier toute l'équipe du centre de recherche RJDV ainsi que les partenaires contribuant à la réalisation de ces travaux.

Une exploration des dynamiques microbiennes du paysage viticole au chai

Paul HÜBNER ^{1,2}, Simon FELLOUS ², Jean-Luc LEGRAS ¹

¹ UMR SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

² UMR CBGP, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, IRD, Montpellier, France

Contact : paul.hubner@inrae.fr

Introduction

Une fois à maturité, les raisins qui sont vendangés, triés et emmenés au chai pour y être vinifiés, apportent avec eux les communautés microbiennes acquises pendant le développement des fruits. Ces communautés microbiennes naturellement présentes à la surface du raisin, appelées microbiotes, se retrouvent par la suite dans les moûts. Elles y rencontrent une fraction microbienne secondaire qui provient de la cave (matériel et air) et participe également à la vinification (Sabate *et al.*, 2002). Ensemble cela forme un microbiote indigène responsable des fermentations spontanées, le mode de conduite historique des vinifications. Dans ce microbiote indigène, on trouve *Saccharomyces cerevisiae*, la principale levure responsable de la fermentation alcoolique. On y retrouve également diverses levures non-*Saccharomyces*, aujourd'hui reconnues pour leur contribution à la complexité aromatique des vins. Toutefois, la présence de microorganismes d'altération au sein de ce microbiote indigène peut entraîner un risque microbiologique (Carpena *et al.*, 2020; Padilla *et al.*, 2016).

À l'inverse, l'inoculation des moûts avec des cultures sélectionnées de *S. cerevisiae* permet de guider la fermentation. Ces souches, issues d'isollements et de sélections par les acteurs de la filière, entrent en compétition avec le microbiote indigène et limitent la croissance des levures non-*Saccharomyces*, assurant ainsi un meilleur contrôle microbiologique. Ce procédé tend toutefois à uniformiser les profils des vins (Carpena *et al.*, 2020). Ces deux types de fermentation, spontanée et guidée, reposent soit directement sur les communautés microbiennes indigènes des baies, soit indirectement via leurs interactions avec les cultures inoculées (Fleet, 2003).

Au-delà des propriétés œnologiques des différents micro-organismes présents sur la baie de raisin, une partie des recherches s'est attachée à identifier les facteurs façonnant et structurant la composition de ce microbiote. Parmi eux, des éléments abiotiques (climat, topographie), agronomiques (usage de pesticides) et intrinsèques au raisin (notamment la variété) ont permis d'explorer la biogéographie de ces communautés microbiennes (Bokulich *et al.*, 2014; S. Knight *et al.*, 2015). En influençant la structuration spatiale du microbiote, ces facteurs participent à la typicité régionale des vins, suggérant l'existence d'un « terroir microbien ». Ces résultats soulignent ainsi l'importance de l'environnement dans la composition microbienne des baies, avec des conséquences sur la qualité et l'identité des vins. Toutefois, la nature éphémère du raisin soulève la question du retour saisonnier des micro-organismes sur les grappes, une problématique encore peu élucidée, notamment pour les espèces à intérêt œnologique.

Une façon d'apporter des éléments de réponses sur l'origine et la construction du microbiote des baies est de décentrer notre regard du système raisin-microorganismes, notre système hôte-microorganismes d'intérêt. Par exemple, la compréhension du paludisme n'a réellement progressé qu'en intégrant l'agent pathogène dans un processus biologique et écologique plus complexe, où l'humain n'est qu'un hôte intermédiaire de son cycle et le moustique femelle *Anopheles spp.* l'hôte définitif (Argy & Houzé, 2018). Il est alors devenu indispensable de **comprendre la biologie et l'écologie**

du moustique vecteur — notamment ses habitats de reproduction et ses prédateurs — **pour comprendre la maladie et en améliorer sa gestion.**

Se replacer dans des relations et des interdépendances plus larges permet alors de mieux comprendre notre objet d'étude. Dans notre cas, les levures ou les bactéries n'ont pas pour but de participer à la production de vin de qualité ni à la détérioration des fruits. Comme tout organisme, elles doivent survivre et se reproduire pour assurer leur maintien dans l'écosystème. Par conséquent, décentrer notre regard du fruit pour se concentrer sur l'écologie des micro-organismes d'intérêt, leurs habitats possibles et les hôtes utilisables lors de leurs différentes étapes de leurs cycles de vie apparaît dès lors être un angle pertinent pour mieux comprendre la formation du microbiote des fruits.

Une écologie microbienne étroitement liée aux insectes

Bien qu'au cœur de nombreuses recherches fondamentales, industrielles et cliniques, les levures demeurent des micro-organismes dont l'écologie et la biologie en conditions naturelles restent mal connues. Toutefois, les collections croissantes d'isolats provenant de milieux naturels ouvrent de nouvelles perspectives pour explorer et mieux comprendre leur écologie. (Lachance & Starmer, 1998; Spurley *et al.*, 2022). Comme tout organisme vivant, les levures sont soumises à des impératifs écologiques fondamentaux : elles doivent se disperser pour accéder des ressources, survivre dans des conditions environnementales défavorables (*e.g.* faible température ou absence de ressources), et assurer leur reproduction (*i.e.* augmentation de la population). De plus en plus de travaux suggèrent que les insectes jouent un rôle clé dans les dynamiques écologiques des levures (*c.f.* Malassigné *et al.*, 2021 et Stefanini, 2018 pour des synthèses approfondies sur les interactions levures-insectes).

Le microbiote levurien des baies : composition et sources potentielles

Les levures d'intérêt œnologique fréquemment associées aux baies matures et aux moûts de raisin appartiennent principalement aux genres *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Lachancea*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Cryptococcus*, *Pichia* et *Starmerella* (Ayogu *et al.*, 2024; Drumonde-Neves *et al.*, 2021). Il a été décrit que le sol, les feuilles et les parties boisées de la vigne peuvent héberger une partie de ces espèces levuriennes (Griggs *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2017), tout comme les habitats naturels et semi-naturels (*e.g.* arbres, fruits, sol de forêts) que l'on peut retrouver en périphérie des parcelles (Camilo *et al.*, 2022; Griggs *et al.*, 2021; Spurley *et al.*, 2022). Au sein du paysage viticole, ces réservoirs microbiens variés peuvent donc être perçus comme des sources microbienne pour une colonisation des baies de raisin, mais si des échanges entre ces compartiments existent, il reste encore à identifier les vecteurs, leurs contributions relatives et leurs interactions avec les levures.

Des flux microbiens médiés par les insectes

Bien que souvent considérées comme non transportées par l'air, sauf en cave, certaines levures œnologiques ont été détectées dans l'air des vignes, avant et pendant les vendanges. Toutefois, ces détections restent rares et à de très faibles concentrations (Garijo *et al.*, 2011; Magyar *et al.*, 2009). Parmi les autres vecteurs candidats couramment évoqués (ruissellements de pluie, activité humaine), seuls les insectes interagissent à la fois avec le raisin, la vigne, les habitats semi-naturels périphériques des parcelles, et les levures œnologiques présentes au sein des différents éléments du paysage. Les guêpes sociales présentes dans les vignes portent un microbiote fongique influencé par la proximité de zones boisées. Celles capturées à proximité de ces milieux présentent une plus grande abondance de levures, une biodiversité fongique plus élevée, ainsi que des communautés distinctes incluant notamment *S. cerevisiae* (Valentini *et al.*, 2022). D'autres insectes peuvent participer au déplacement des levures, comme les drosophiles, groupe connu pour leurs interactions avec les levures (Chandler *et al.*, 2012; Hoang *et al.*, 2015) et dont le microbiote présente des similarités avec celui des raisins et des moûts (Quan & Eisen, 2018). Le rôle des drosophiles dans le transport et la modulation des communautés microbiennes a déjà été démontré dans le contexte de la pourriture acide, où elles véhiculent des bactéries responsables de la maladie, et où l'activité des larves qui se développent dans

les baies a un rôle essentiel de dans le développement des microorganismes (Barata *et al.*, 2012; Rombaut *et al.*, 2017). Delbac et ses collaborateurs (2018) ont par ailleurs montré que la quantité d'habitats semi-naturels autour des parcelles influençait positivement les populations de *Drosophila suzukii* au vignoble. Ces résultats suggèrent que la structure paysagère, en particulier la présence d'habitats semi-naturels tels que les boisements, pourrait jouer un rôle clé dans la dispersion des levures œnologiques par les insectes, en influençant à la fois les populations d'insectes hébergés au vignoble et les communautés de levures qu'ils acquièrent et transportent. Il nous faut donc comprendre comment les insectes permettent aux levures de se disperser, de persister et de s'amplifier.

Disperser — Des travaux récents ont mis en évidence le rôle central de la dispersion des levures par les insectes dans l'écologie des communautés microbiennes et la structuration saisonnière des microbiotes des fruits. Deux grandes hypothèses ont été formulées pour expliquer ce phénomène. Une première hypothèse, dite *dispersion-encounter hypothesis* de Madden *et al.* en 2018, suggère que les levures tirent avantage de leur association avec les insectes en accédant à des sources de sucres lors des visites de ces derniers motivées par des comportements de nutrition, de reproduction ou d'exploration. En retour, les insectes utilisent les composés volatils produits par les levures comme signaux chimiques leur permettant de localiser ces ressources (Buser *et al.*, 2014; Quan & Eisen, 2018).

La seconde, spécifique à la vigne, connue sous le nom de *fruit-forest reservoir hypothesis* (Knight & Goddard, 2016) présente l'existence d'une population réservoir de *S. cerevisiae* dans divers habitats forestiers et semi-naturels (sols, écorces, etc.), principalement sous forme sporulée. Une fraction de ces spores serait transportée vers les fruits, potentiellement par des insectes vecteurs. Dans cette niche riche en sucres, les spores germent, se reproduisent, puis les levures se multiplient rapidement jusqu'à constituer la population microbienne que l'on retrouve au moment des vendanges. À la fin de la saison, une partie de cette population amplifiée retournerait vers les habitats forestiers, alimentant ainsi un cycle écologique entre réservoir forestier et fruits. Cette hypothèse peut également être étendue à l'ensemble des espèces de levures retrouvées sur les baies, en considérant qu'elles peuvent transiter entre les différents réservoirs microbiens précédemment évoqués. Toutefois, ces dynamiques de persistance et de dispersion peuvent présenter des caractéristiques propres à chaque espèce de levure, en fonction de leurs traits écologiques, de leur capacité à sporuler ou à interagir avec des habitats et vecteurs spécifiques.

Persister — Les insectes ne sont pas seulement des vecteurs, ils peuvent également constituer des habitats temporaires pour les levures, permettant une persistance en dehors de la saison des fruits ou lors de processus de dispersion plus long. En effet, certaines espèces de guêpes sociales, comme *Vespula* et *Polistes*, peuvent abriter *S. cerevisiae* dans leur intestin tout au long de l'hiver (Stefanini *et al.*, 2012). Ces insectes peuvent ainsi être considérés comme des "réservoirs hivernaux" permettant aux levures de survivre lorsque les ressources sont rares, voire absentes. Plus récemment, il a été montré que les levures peuvent être transmises verticalement entre générations d'insectes, comme dans le cas des guêpes (Stefanini *et al.*, 2012) ou des drosophiles (Guilhot *et al.*, 2023), permettant une persistance plus longue à travers le temps et l'espace. C'est en particulier le cas des reines de guêpes, qui hivernent sous forme adulte, conservent les levures intestinales et peuvent les transmettre à leur progéniture au printemps suivant (Stefanini *et al.*, 2012), assurant ainsi une persistance interannuelle des lignées levuriennes.

Amplifier une population — L'augmentation locale de la biomasse microbienne s'observe de manière marquée dans les fruits mûrs endommagés, car ceux-ci constituent des niches riches en sucres où les levures peuvent croître rapidement. Mortimer & Polsinelli en 1999 ont montré que *S. cerevisiae* est extrêmement rare sur les raisins intacts, et n'est détectée à la surface que d'une baie sur 1 000 environ. En revanche, approximativement une baie sur quatre endommagée s'avère positive pour *S. cerevisiae*, avec des densités pouvant atteindre 10^5 à 10^6 cellules par baie. Par ailleurs, les souches présentes sur

une même baie semblent issues d'un clonage local à partir d'un inoculum initial. Ils attribuent cet inoculum de départ à une interaction avec des insectes, tels qu'une blessure causée par les guêpes ou les pontes de drosophiles qui favorisent l'entrée des levures dans la pulpe (*une hypothèse ancienne dans la littérature, mais encore jamais éclaircie expérimentalement*). En outre, tous les autres micro-organismes associés à la fermentation vinicole y sont également présents, avec des abondances totales atteignant 10^6 à 10^7 cellules par baie.

Plus qu'un simple vecteur déposant un inoculum levurien dans des environnements favorables à leur croissance, les insectes — et en particulier les drosophiles — participent activement à la structuration des communautés microbiennes. Après la ponte, les larves issues des œufs déposés dans les tissus du fruit interagissent intensivement avec leur environnement microbien. Stamps *et al.* (2012) ont décrit un phénomène de *farming* larvaire, par lequel l'activité des larves modifie les conditions locales au sein du fruit, influençant positivement la densité de cellule et en modifiant la composition des communautés levuriennes. Ces interactions peuvent être si étroites que les levures sont devenues essentielles au bon déroulement du cycle de vie des drosophiles en agissant sur l'attraction, l'oviposition et le développement des larves (Becher *et al.*, 2012; Jiménez-Padilla *et al.*, 2024).

Vers le microbiote des baies et les vinifications — Ces baies endommagées, véritables hotspots microbiens, bien que peut fréquentes, présentent une forte charge microbienne résultant d'interactions complexes entre les levures, les fruits et les insectes. Par la suite, ces baies peuvent influencer à leur tour le microbiote des autres baies de la parcelle ainsi que celui des moûts lors de la vinification. D'une part, ces hotspots peuvent agir comme des relais microbiens au sein de la parcelle : à partir d'un fruit avec une forte charge microbienne, les levures peuvent être redistribuées secondairement vers d'autres baies saines par les insectes, contribuant ainsi à la diffusion de la charge microbienne basale de la parcelle à vendanger. D'autre part, ce hotspot, même s'il est rare et isolé, peut jouer un rôle disproportionné dans le processus de vinification : cette baie récoltée lors de la vendange peut servir de point d'inoculation majeur pour les moûts, en y introduisant des populations levuriennes préalablement amplifiées (Mortimer & Polsinelli, 1999). Dans ce scénario, des baies rares mais très chargées en levures pourraient exercer un effet déterminant sur la dynamique fermentaire de la cuve.

Notre démarche et dispositif

Pour mieux comprendre comment les interactions entre insectes et levures des paysages viticoles influencent la composition et l'assemblage du microbiote du raisin, nous avons combiné deux approches complémentaires. D'une part, des observations sur le terrain ; d'autre part, des expérimentations en laboratoire, en conditions contrôlées.

En 2024, nous avons conduit un suivi de terrain dans huit domaines viticoles de l'AOC Pic Saint-Loup ainsi que sur le domaine expérimental de Pech Rouge. Neuf parcelles, sélectionnées pour la diversité de leurs habitats semi-naturels environnants, ont fait l'objet d'un suivi approfondi à l'approche des vendanges. Des échantillons ont été prélevés dans différents compartiments du paysage viticole (sols, troncs, baies, insectes et habitats périphériques) pour identifier par métabarcoding les communautés fongiques et bactériennes présentes dans chaque réservoir.

Ce dispositif permet (i) une description des microorganismes associés aux principaux réservoirs microbiens de la vigne et des habitats périphériques (sols, végétation, fruits), (ii) une identification des microorganismes hébergés par les insectes, potentiellement vecteurs microbiens, et (iii) une caractérisation du microbiote des baies de raisin, mise en relation avec les réservoirs et les structures paysagères environnantes. En parallèle, des grappes ont été ensachées à l'aide de filets afin de comparer les microbiotes des baies exposées ou non aux visites d'insectes, et ainsi d'évaluer leur contribution directe à la construction du microbiote des baies.

En 2025, des expériences en laboratoire sont mises en place afin d'approfondir les mécanismes d'interaction entre fruits, levures et insectes. L'objectif est de mieux comprendre comment les insectes, et en particulier les drosophiles, influencent la dynamique des populations levuriennes dans les baies de raisins. Ce travail expérimental repose sur des systèmes simplifiés associant des baies de raisin, des levures isolées de la vigne et du vin, et des drosophiles (*Drosophila suzukii*). Ces dispositifs permettront d'étudier plus finement les processus d'amplification levurienne au sein du fruit. En particulier l'effet différentiel des stades larvaire et adulte sur l'inoculation et la croissance des levures, ainsi que de tester si différentes espèces de levures ont des stratégies distinctes d'exploitation des différents hôtes (insectes, plantes) et compartiments à travers l'espace et le temps.

Références

- Argy, N., & Houzé, S. (2018). Épidémiologie et cycle parasitaire d'un fléau mondial, le paludisme. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(574), 18-20. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2018.01.004>
- Ayogu, P., Martins, V., & Gerós, H. (2024). Grape berry native yeast microbiota : Advancing trends in the development of sustainable vineyard pathogen biocontrol strategies. *OENO One*, 58(1). <https://doi.org/10.20870/oenone.2024.58.1.7678>
- Barata, A., Santos, S. C., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). New Insights into the Ecological Interaction Between Grape Berry Microorganisms and Drosophila Flies During the Development of Sour Rot. *Microbial Ecology*, 64(2), 416-430. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0041-y>
- Becher, P. G., Flick, G., Rozpędowska, E., Schmidt, A., Hagman, A., Lebreton, S., Larsson, M. C., Hansson, B. S., Piškur, J., Witzgall, P., & Bengtsson, M. (2012). Yeast, not fruit volatiles mediate Drosophila melanogaster attraction, oviposition and development. *Functional Ecology*, 26(4), 822-828. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02006.x>
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E139-E148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110>
- Buser, C. C., Newcomb, R. D., Gaskett, A. C., & Goddard, M. R. (2014). Niche construction initiates the evolution of mutualistic interactions. *Ecology Letters*, 17(10), 1257-1264. <https://doi.org/10.1111/ele.12331>
- Camilo, S., Chandra, M., Branco, P., & Malfeito-Ferreira, M. (2022). Wine Microbial Consortium : Seasonal Sources and Vectors Linking Vineyard and Winery Environments. *Fermentation*, 8(7), 324. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070324>
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R. A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Secondary Aroma : Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods*, 10(1), 51. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>
- Chandler, J. A., Eisen, J. A., & Kopp, A. (2012). Yeast Communities of Diverse Drosophila Species : Comparison of Two Symbiont Groups in the Same Hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7327-7336. <https://doi.org/10.1128/AEM.01741-12>
- Delbac, L. (2018). *Role of host plant distribution at the landscape level on Drosophila suzukii (Matsumura) (Diptera : Drosophilidae) colonization in vineyards*. Abstract Booklet Talks Posters Sfecologie.
- Drumonde-Neves, J., Fernandes, T., Lima, T., Pais, C., & Franco-Duarte, R. (2021). Learning from 80 years of studies : A comprehensive catalogue of non-Saccharomyces yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Research*, 21(3), foab017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017>
- Fleet, G. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Garijo, P., Lopez, R., Santamaria, P., Ocon, E., Olarte, C., Sanz, S., & Gutierrez, A. R. (2011). *Presence of enological microorganisms in the grapes and the air of a vineyard during the ripening period*.
- Griggs, R. G., Steenwerth, K. L., Mills, D. A., Cantu, D., & Bokulich, N. A. (2021). Sources and Assembly of Microbial Communities in Vineyards as a Functional Component of Winegrowing. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.673810>
- Guilhot, R., Xuéreb, A., Lagmairi, A., Olazcuaga, L., & Fellous, S. (2023). Microbiota acquisition and transmission in Drosophila flies. *iScience*, 26(9), 107656. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107656>
- Hoang, D., Kopp, A., & Chandler, J. A. (2015). Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts—Is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly-yeast relationship? *PeerJ*, 3, e1116. <https://doi.org/10.7717/peerj.1116>

- Jiménez-Padilla, Y., Adewusi, B., Lachance, M.-A., & Sinclair, B. J. (2024). Live yeasts accelerate *Drosophila melanogaster* larval development. *The Journal of Experimental Biology*, 227(19), jeb247932. <https://doi.org/10.1242/jeb.247932>
- Knight, S. J., & Goddard, M. R. (2016). Sporulation in soil as an overwinter survival strategy in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 16(1), fov102. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov102>
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes : Evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, 5(1), 14233. <https://doi.org/10.1038/srep14233>
- Lachance, M.-A., & Starmer, W. T. (1998). Chapter 4—Ecology and yeasts. In C. P. Kurtzman & J. W. Fell (Éds.), *The Yeasts (Fourth Edition)* (p. 21-30). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044481312-1/50007-1>
- Madden, A. A., Epps, M. J., Fukami, T., Irwin, R. E., Sheppard, J., Sorger, D. M., & Dunn, R. R. (2018). The ecology of insect–yeast relationships and its relevance to human industry. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1875), 20172733. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2733>
- Magyar, D., Frenguelli, G., Bricchi, E., Tedeschini, E., Csontos, P., Li, D.-W., & Bobvos, J. (2009). The biodiversity of air spora in an Italian vineyard. *Aerobiologia*, 25(2), 99-109. <https://doi.org/10.1007/s10453-009-9115-9>
- Malassigné, S., Minard, G., Vallon, L., Martin, E., Valiente Moro, C., & Luis, P. (2021). Diversity and Functions of Yeast Communities Associated with Insects. *Microorganisms*, 9(8), 1552. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081552>
- Mortimer, R., & Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150(3), 199-204. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9)
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts : From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Quan, A. S., & Eisen, M. B. (2018). The ecology of the *Drosophila*-yeast mutualism in wineries. *PLOS ONE*, 13(5), e0196440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196440>
- Rombaut, A., Guilhot, R., Xuéreb, A., Benoît, L., Chapuis, M. P., Gibert, P., & Fellous, S. (2017). Invasive *Drosophila suzukii* facilitates *Drosophila melanogaster* infestation and sour rot outbreaks in the vineyards. *Royal Society Open Science*, 4(3), 170117. <https://doi.org/10.1098/rsos.170117>
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157(4), 267-274. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00163>
- Spurley, W. J., Fisher, K. J., Langdon, Q. K., Buh, K. V., Jarzyna, M., Haase, M. A. B., Sylvester, K., Moriarty, R. V., Rodriguez, D., Sheddan, A., Wright, S., Sorlie, L., Hulfachor, A. B., Opulente, D. A., & Hittinger, C. T. (2022). Substrate, temperature, and geographical patterns among nearly 2,000 natural yeast isolates. *Yeast (Chichester, England)*, 39(1-2), 55-68. <https://doi.org/10.1002/yea.3679>
- Stamps, J. A., Yang, L. H., Morales, V. M., & Boundy-Mills, K. L. (2012). *Drosophila* Regulate Yeast Density and Increase Yeast Community Similarity in a Natural Substrate. *PLOS ONE*, 7(7), e42238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042238>
- Stefanini, I. (2018). Yeast-insect associations : It takes guts. *Yeast (Chichester, England)*, 35(4), 315-330. <https://doi.org/10.1002/yea.3309>
- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., & Cavalieri, D. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33), 13398-13403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>
- Valentini, B., Barbero, F., Casacci, L. P., Lukanini, A., & Stefanini, I. (2022). Forests influence yeast populations vectored by insects into vineyards. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1039939>
- Zhang, S., Chen, X., Zhong, Q., Huang, Z., & Bai, Z. (2017). Relations among epiphytic microbial communities from soil, leaves and grapes of the grapevine. *Frontiers in Life Science*, 10(1), 73-83. <https://doi.org/10.1080/21553769.2017.1365776>

Qualité des vins et microbiote : les premiers résultats du projet Holovini

Paul HÜBNER ¹, Lucie THOMSEN ¹, Evelyne AGUERA ², Valérie NOLLEAU ¹, Soline CAILLÉ ¹, Delphine SICARD ¹, Virginie GALEOTE ¹, Jean-Luc LEGRAS ¹

¹ UMR SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier France

² UE Pech Rouge, INRAE, Gruissan France

Contact : jean-luc.legras@inrae.fr

1- Introduction

La qualité du vin est aujourd'hui de plus en plus perçue comme le fruit de la richesse de l'environnement, des particularités climatiques d'un terroir, ainsi que d'un savoir-faire en partie séculaire des vignerons. Dans ce processus, la vigne et ses raisins jouent un rôle central. Toutefois, la contribution des micro-organismes, longtemps méconnue, s'avère également essentielle. Pendant longtemps, cette dimension microbienne était perçue comme réduite à l'action d'une unique levure *Saccharomyces cerevisiae* associée au terroir. Pourtant, les travaux les plus anciens tendaient à montrer la très faible proportion, voir l'absence, de *S. cerevisiae* dans la microflore des raisins sains en comparaison des raisins altérés, posant ainsi la question de l'origine des levures assurant la fermentation alcoolique (Davenport, 1974; Mortimer and Polsinelli, 1999; Poulard, 1984; Rosini *et al.*, 1982).

Cependant, les progrès des outils d'analyse microbienne ont permis de dévoiler la complexité de la microflore présente sur les raisins et de son rôle. Une grande diversité des souches de *Saccharomyces cerevisiae* a été détectée au vignoble et dans les vinifications spontanées remettant en question l'idée d'une levure typique d'un terroir (Frezier and Dubourdieu, 1992; Legras *et al.*, 1996, 2007; Viel *et al.*, 2017). Par la suite, les échanges bidirectionnels entre populations de levures *S. cerevisiae* de vignoble et de chai (Börlin *et al.*, 2020) ont été démontrés confirmant l'association étroite entre chai et vignoble. Enfin, les méthodes d'exploration des flores microbiennes évitant les étapes de culture ont révélé le grand nombre d'espèces de levures et de bactéries présentes dans la phyllosphère et qui participent à la constitution de la microflore des raisins. Face à cette complexité des flores microbiennes des raisins, mettant en évidence une complexité insoupçonnée, de nombreuses études ont cherché à décrypter comment cette microflore pouvait modifier les profils chimiques des vins produits (Bokulich *et al.*, 2016, 2014; Grangeteau *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021). Ces études amènent à se poser nécessairement la question de la microflore associée terroir, et de sa contribution au profil aromatique des vins.

Le projet HOLOVINI a pour objectifs de **comprendre comment se construisent les microbiotes des raisins**, au travers des échanges avec le sol, les insectes, l'air, le milieu environnant, ou les chais et comment ceux-ci influent sur la qualité des vins. Nous vous présenterons ici les premiers résultats obtenus sur les caractérisations chimiques et sensorielles des vins.

2- Dispositif expérimental

Le dispositif utilisé repose sur 8 parcelles expérimentales de Syrah mises à disposition par 8 vignerons de l'AOP Pic St Loup et une parcelle située au domaine expérimental INRAE de Pech Rouge situé à Gruissan (Aude) (**figure 1**).

Ces parcelles étaient toutes conduites suivant un itinéraire viticole conforme au cahier des charges de l'agriculture biologique ou biodynamique. Pour caractériser la flore microbienne des parcelles, un échantillonnage a été réalisé sur les raisins, les sols, les ceps de vigne, les insectes présents dans la parcelle, l'air, les haies et les arbres présents aux alentours. De ces parcelles, chaque vinificateur a réalisé 2 cuvées de 2 à 10 hl, l'uneensemencée à l'aide d'un starter (préparation de levure

commerciale, ou levure multipliée à partir d'une souche du chai), et l'autre laissée fermenter de manière spontanée. Des prélèvements ont été réalisés également durant ces fermentations afin de suivre les dynamiques microbiennes.

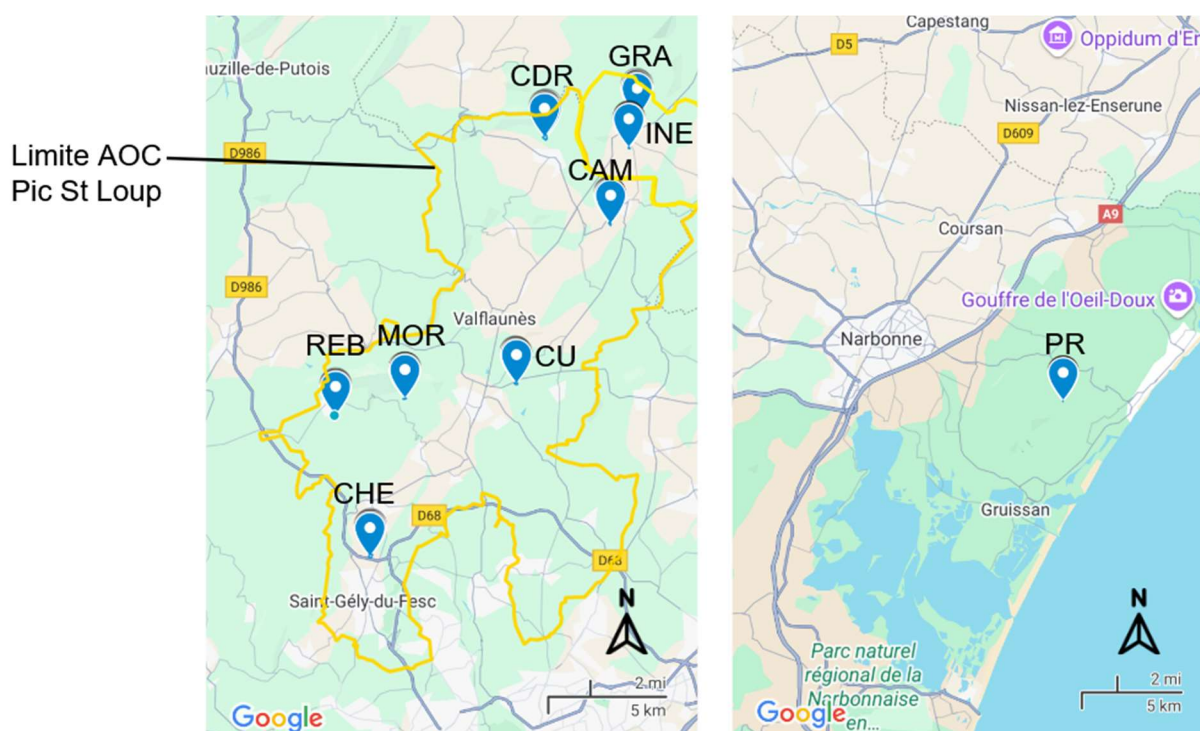


Figure 1. Localisation des différentes parcelles suivies dans le projet

A partir de ces cuves, en fin de fermentation, 10l ont été prélevés, et ont subi une fermentation malo-lactique (FML) après ensemencement avec *Oenococcus oeni* (Lalvin VP41). Cette FML a été suivie régulièrement chaque 4 à 7 jours par la mesure de la teneur en acide malique par HPLC. Dès que la FML a été terminée, les vins ont été sous-tirés sulfités à 30 mg/l de SO₂, clarifiés par centrifugation, puis mis en bouteille. Nous avons ainsi collecté 9 paires de vins par domaine, issus de la même parcelle et vinifiés de la même manière, sauf en ce qui concerne l'ensemencement.

Ces vins achevés ont été analysés par HPLC, dosage enzymatique, pour les analyses classiques œnologiques. En ce qui concerne les composés volatils, ils ont été analysés grâce à la technique d'adsorption sur barreau d'agitation (SBSE). Cette technique utilise un petit barreau magnétique appelé Twister®, recouvert d'une phase non polaire qui capture les molécules aromatiques présentes dans le vin. Lors de l'introduction dans l'injecteur du chromatographe, les composés sont désorbés par la chaleur et analysés de manière classique. Cette méthode est particulièrement adaptée pour isoler les arômes volatils (Nogueira, 2015).

Enfin, les vins ont été dégustés par un jury constitué de membre de l'unité de recherche SPO. Dans un premier temps, les différences au sein de chaque paire de vin ont été évaluées, puis dans une seconde dégustation, les vins ont été comparés entre eux à l'aide de la méthode du CATA (Check All That Apply).

Les prélèvements de communautés microbiennes qui ont été réalisés sont en cours d'analyse et ne seront pas présentés ici. De la même manière, l'analyse fine de composés phénoliques ne sera pas présentée.

3- Premiers résultats

3a- Analyse des composés principaux du métabolisme durant la fermentation

L'analyse des paramètres physiques ainsi que des principaux composés chimiques des vins (tels que l'alcool, les sucres, les acides), des polyphénols totaux et de la couleur a permis une première comparaison entre les vins produits. Une analyse en composantes principales (ACP) de ces données a été réalisée afin de visualiser les différences entre échantillons (**Figure 2**). Les deux premiers axes de l'ACP expliquent environ 50 % de la variabilité observée.

Le positionnement des vins selon leur domaine d'origine (avec l'ajout d'un vin moyen) montre que les deux vins issus d'un même domaine présentent une grande proximité chimique, confirmant ainsi leur origine commune. Les différences observées entre domaines sont très marquées pour la quasi-totalité des paramètres mesurés, ce qui reflète des variations de terroir, de maturité à la récolte ainsi que des choix de vinification.

Cependant, malgré cette similarité intra-domaine, des différences significatives ont également été détectées entre les modalités levurées et non levurées, notamment pour les teneurs en acide succinique et en acide alpha-cétonique, deux composés typiquement produits par les levures au cours de la fermentation.

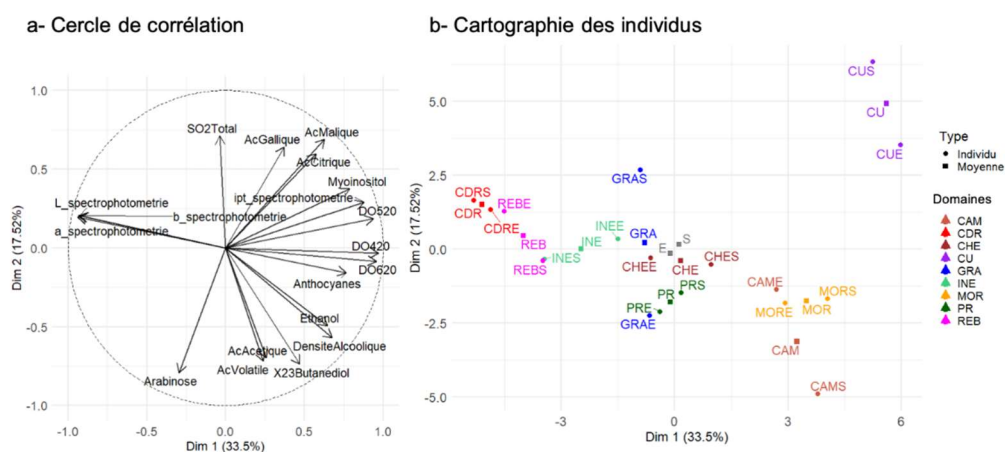


Figure 2. Représentation des vins obtenues à partir des analyses œnologiques classiques. a- Cercle de corrélation des variables analytiques les mieux représentées sur l'axe 1 et 2. b- Représentation des individus sur le plan factoriel des axes 1 et 2.

3b- Profil des composés volatils des vins

Le profil aromatique des vins est en grande partie déterminé par la composition en composés volatils. L'analyse en phase gazeuse de ces composés a permis d'en quantifier 39 dans au moins 14 des 18 vins étudiés. Une analyse en composantes principales (ACP) a ensuite été réalisée afin de synthétiser les différences observées entre les échantillons ; les deux premiers axes de cette ACP expliquent à eux seuls 35 % de la variabilité (**Figure 3**). Comme cela avait déjà été constaté pour les paramètres œnologiques classiques, un regroupement des vins par domaine d'origine a été observé.

Bien que les différences inter-domaines soient significatives pour un grand nombre de composés, certaines distinctions globales entre les modalités levurées et spontanées ont également été mises en évidence. En particulier, des différences ont été observées pour le β -Citronellol, le 2-phényléthanol et l'éthyl-2-méthylbutyrate, des composés reconnus pour leur contribution positive à l'arôme des vins.

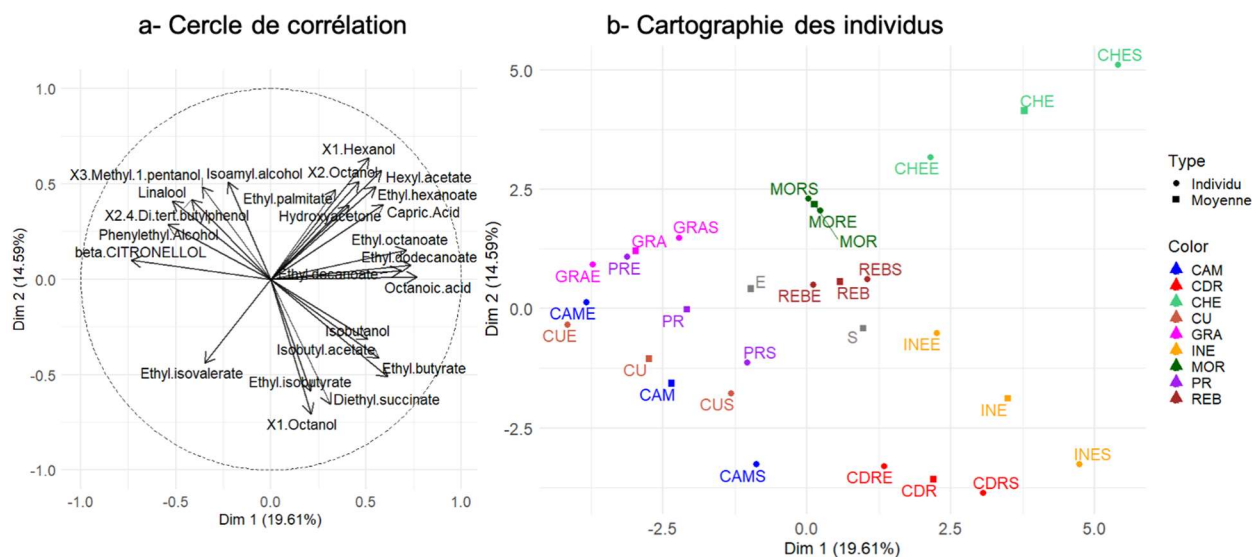


Figure 3. Représentation des vins obtenues à partir des profils de composés volatils.

a- Cercle de corrélation des variables analytiques les mieux représentées sur l'axe 1 et 2.

b- Représentation des individus sur le plan factoriel des axes 1 et 2.

3c- Analyse sensorielle

Afin d'évaluer si les différences de composition chimique entre les vins pouvaient être liées à des variations dans les profils organoleptiques, deux séances de dégustation ont été réalisées. La première avait pour objectif de valider les différences entre les modalités levurées et non levurées sur les vins issus de 8 des 9 parcelles. Pour 6 des 8 paires de vins analysées, des différences significatives ont été mises en évidence entre les deux modalités.

Une seconde dégustation, fondée sur une analyse descriptive de type CATA (Check-All-That-Apply) menée sur l'ensemble des 18 vins, a permis de mettre clairement en lumière les différences entre les vins provenant de domaines distincts. En revanche, aucune différence globale n'a été observée entre les modalités levurées et non levurées. Toutefois, des différences significatives ont été notées pour certains descripteurs sensoriels, suggérant que les effets de l'ensemencement pourraient varier de manière plus spécifique selon les domaines.

4- Conclusions

Les premiers résultats indiquent que les vins issus de vinifications avec ou sans ensemencement présentent des profils globalement proches, mais révèlent néanmoins des différences significatives pour un certain nombre de composés. Ces écarts se reflètent également dans les profils organoleptiques, bien que ceux-ci semblent varier de manière plus spécifique selon les vins. Il faut noter que nous n'avons pas noté de production d'acide acétique en moyenne plus élevée dans les modalités non ensemençées.

Ces premiers constats seront prochainement complétés par une analyse plus détaillée des profils de composés phénoliques, qui pourra être mise en relation avec les caractéristiques sensorielles observées. Par ailleurs, l'étude des dynamiques microbiennes, ainsi que des particularités des flores des parcelles et des chais, pourrait également apporter des éléments d'explication aux différences sensorielles constatées.

5- Remerciements

Ce projet n'aurait pu être mis en place sans la participation active de 8 domaines viticoles de l'AOC Pic St Loup, et de l'Unité expérimentale de Pech Rouge. Nous les remercions donc très chaleureusement pour leur aide et leur disponibilité.

6- Références

- Bokulich, N.A., Collins, T., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S.E., Mills, D.A., 2016. Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional. *mBio* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16>. Editor
- Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110>
- Börlin, M., Claisse, O., Albertin, W., Salin, F., Legras, J.L., Masneuf-Pomarede, I., 2020. Quantifying the effect of human practices on *S. cerevisiae* vineyard metapopulation diversity. *Sci. Rep.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73279-7>
- Davenport, R.R., 1974. Microecology of yeast and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* 123-130.
- Frezier, V., Dubourdieu, D., 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 375 - 380. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 375–380.
- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R.D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., 2017. Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microb. Biotechnol.* 10, 354–370. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428>
- Legras, J.L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.M., Karst, F., 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* 16, 2091–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03266.x>
- Legras, J.-L., Meyer, J.-P., Legname, E., Schaeffer, A., 1996. Legras1996ColloqueTerroirsAngers_terroirs.pdf, 1er Colloque sur les Terroirs Viticoles, Angers.
- Liu, D., Legras, J.-L., Zhang, P., Chen, D., Howell, K., 2021. Diversity and dynamics of fungi during spontaneous fermentations and association with unique aroma profiles in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 338, 108983. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108983>
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9)
- Poulard, A., 1984. POULARD, A., 1984. Influence de quelques facteurs intervenant sur la variabilité de la microflore levurienne des moûts et des vins. *Vignes et Vins*, 326, 18 - 21. *Vignes Vins* 18–21.
- Rosini, G., Federici, F., Martini, A., 1982. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.* 8, 83–89. <https://doi.org/10.1007/BF02011464>
- Viel, A., Legras, J.-L., Nadai, C., Carlot, M., Lombardi, A., Crespan, M., Migliaro, D., Giacomini, A., Corich, V., 2017. The Geographic Distribution of *Saccharomyces cerevisiae* Isolates within three Italian Neighboring Winemaking Regions Reveals Strong Differences in Yeast Abundance, Genetic Diversity and Industrial Strain Dissemination. *Front. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01595>

Biodiversité et flore microbienne du moût et du vin : de la caractérisation à la sélection

Amandine DEROITE ¹, Anne Ortiz-JULIEN ¹, Jessica NOBLE ¹

¹ Lallemand Œnology, 19 rue des Briquetiers, 31702 Blagnac, FRANCE

Contact : jnoble@lallemand.com

Depuis les découvertes fondamentales de Pasteur, qui ont mis en lumière le rôle des microorganismes dans la fermentation du moût de raisin, la recherche en microbiologie du vin n'a cessé de progresser. La présence et l'impact des communautés microbiennes est notamment très étudiée. Les communautés, ou consortiums, sont des ensembles de micro-organismes (bactéries, levures, moisissures) coexistant dans un environnement donné. En œnologie, elles jouent un rôle crucial à chaque étape de la production du vin, de la vigne jusqu'à la bouteille. En effet, la biodiversité des flores microbiennes œnologiques est vaste, incluant des espèces fermentaires, non-fermentaires, plus ou moins tolérantes aux conditions des moûts et des vins et présentant des impacts variés sur la qualité finale des vins. Cette diversité est dynamique et évolue tout au long du processus de vinification, avec une succession de flores adaptées aux facteurs environnementaux changeants du milieu. Grâce aux avancées scientifiques, notamment en termes de développement de méthodes d'identification et de caractérisation fine du métabolisme, nous comprenons mieux le rôle des différentes espèces et les interactions complexes entre elles. Ces connaissances permettent d'évaluer leur impact sur le processus de vinification et la qualité des vins.

De nombreuses études ont montré que sur les baies ou dans les moûts de raisin, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, actrice majeure de la fermentation alcoolique est présente en faible proportion. Les espèces majoritaires sur les raisins sont plutôt des genres *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, ou *Rhodotorula*. Par la suite, dans les moûts, ce sont les genres *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Candida* ou encore *Gluconobacter* et *Pediococcus* qui prennent le dessus. Ces espèces disparaissent progressivement au fur et à mesure de l'évolution des paramètres de leur environnement (diminution de l'oxygène, ajouts de sulfites, augmentation de l'éthanol...) au profit d'espèces fermentaires et plus résistantes à ces conditions stressantes, pour laisser la place aux levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* puis aux bactéries *Oenococcus oeni* (Renouf, 2006).

Depuis de nombreuses années, nous avons étudié cette diversité, exploré et caractérisé les microorganismes présents, qu'ils soient eucaryotes ou procaryotes, en affinant notre étude jusqu'à la sélection de souches isolées, présentant chacune sa propre spécificité (**Figure 1**).

L'étude de cette diversité nous a permis d'identifier des espèces d'intérêt œnologique pouvant répondre aux problématiques rencontrées par la filière. C'est le cas par exemple de l'espèce *Metschnikowia pulcherrima* qui permet de diminuer l'ajout d'intrants chimiques dans les phases pré-fermentaires, notamment de sulfites, grâce à ses caractéristiques phénotypiques particulières.

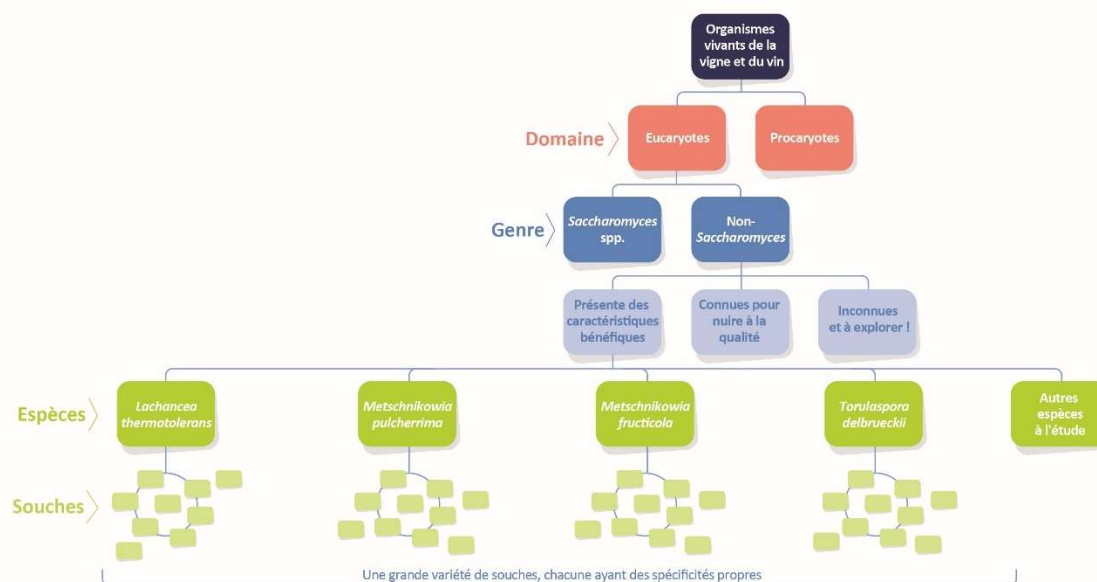


Figure 1. Exploration de la biodiversité microbienne œnologique (exemple des levures non-*Saccharomyces*)

L'étude de cette diversité nous a permis d'identifier des espèces d'intérêt œnologique pouvant répondre aux problématiques rencontrées par la filière. C'est le cas par exemple de l'espèce *Metschnikowia pulcherrima* qui permet de diminuer l'ajout d'intrants chimiques dans les phases pré-fermentaires, notamment de sulfites, grâce à ses caractéristiques phénotypiques particulières. En effet, cette espèce de levure possède des propriétés de bioprotection vis-à-vis de l'oxydation des moûts et de certains contaminants grâce à divers mécanismes tels que la production d'acide pulcherriminique qui prive la flore indigène de fer dans le milieu (Oro, Ciani et Comitini, 2014; Kántor *et al.* 2016). Bien que certains traits soient partagés au sein des espèces, il est important de souligner qu'il existe également une diversité de souches au sein de chaque espèce. Elle a été largement explorée et continue de donner lieu à de nombreux travaux de sélection et d'optimisation chez les levures *Saccharomyces cerevisiae*, mais cette investigation est plus récente au sein des espèces communément dénommées « Non-*Saccharomyces* ». Par exemple, la levure *Lachancea thermotolerans* est capable de produire de l'acide lactique à partir de pyruvate selon une voie métabolique particulière catalysée par les enzymes Lactate Dehydrogenase (LDH). Ce trait phénotypique d'intérêt qui permet de rééquilibrer la perte de fraîcheur des vins (Comitini *et al.* 2011; Morata *et al.* 2019; Vaquero *et al.* 2020) semble plutôt commun à l'espèce, mais il a été démontré que la concentration d'acide lactique produite était souche-dépendante. En effet, dans leurs travaux, Hranilovic *et al.* (2018) ont mesuré la production d'acide lactique de 94 souches de *Lachancea thermotolerans* issues de diverses niches écologiques et ont obtenu des valeurs entre 1,8g/L et 12g/L.

La caractérisation de souches est donc une étape clé lors de la sélection de nouvelles levures. C'est via de telles approches que nous avons sélectionné la première levure non-*Saccharomyces* produite et commercialisée dès 2007, une souche de *Torulaspora delbrueckii*, Level²Biodiva. En effet, un screening

de plusieurs souches de *T. delbrueckii* nous a permis de mettre en avant les traits phénotypiques avantageux de Level²Biodiva, à savoir sa forte résistance à la pression osmotique et sa faible production d'acidité volatile en toutes circonstances.

Au-delà de l'exploration de la biodiversité microbienne, nos études se concentrent à présent sur les interactions entre les microorganismes et notamment entre les levures. Différents mécanismes pourraient intervenir dans ces interactions, tels que la concurrence pour les ressources (Curiel *et al.*, 2017, Tronchoni *et al.*, 2017), la production de composés toxiques (Alexandre *et al.*, 1994, Combina *et al.*, 2005, Alerbgaria *et al.*, 2010, Branco *et al.*, 2014, Mehlomakulu *et al.* 2014 et 2017), le contact cellule-cellule (Renault *et al.*, 2013, Kemsawad *et al.*, 2015, Enlgezos *et al.*, 2019) ou le quorum sensing (Chen *et al.*, 2006). Ces interactions présentent un impact sur les phénotypes, le transcriptome, le métabolisme et les arômes produits (Barbosa *et al.*, 2015, Curiel *et al.*, 2017, Petitgonnet *et al.*, 2019, Rollero *et al.*, 2018, Roullier-Gall *et al.*, 2020, Tronchoni *et al.*, 2017).

Une étude a par exemple été menée en collaboration avec l'INRAE de Montpellier, portant sur des mélanges entre 3 levures, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia fructicola* et *Saccharomyces cerevisiae*, révélant une probable compétition entre les deux espèces Non-*Saccharomyces* avec une population maximale atteinte identique entre les croissances en mélanges à 2 ou à 3 espèces et indiquant l'absence de niche écologique spécifique disponible aux différentes non-*Saccharomyces* testées.

Nous étudions également les mélanges de 3 espèces de levures dans le cadre de projets portant sur la bioprotection. Dans ces cas-là, il est primordial de s'assurer que la souche de bioprotection inhibe la souche contaminante cible sans inhiber les souches fermenteuses. Plusieurs mécanismes sont possibles, comme indiqués précédemment. Récemment, nous nous sommes intéressés aux levures de bioprotection permettant d'inhiber *Brettanomyces bruxellensis* dans le moût. En effet, ce contaminant du vin est bien connu pour sa capacité à produire des phénols volatils associés à des défauts organoleptiques de type cuir, écurie. De récentes études ont démontré la présence de *Brettanomyces bruxellensis* sur les raisins avant même la vinification (Renouf et Lonvaud-Funel., 2007 ; Oro *et al.*, 2019 ; Pigao *et al.*, 2021), ouvrant ainsi la voie à un nouvel angle d'attaque complémentaire contre ce contaminant classiquement inhibé par l'ajout de sulfite ou, plus récemment, de chitosan: la bioprotection en phase pré fermentaire grâce aux levures Non-*Saccharomyces*. Parmi les solutions décrites dans la bibliographie (Kuchen *et al.*, 2019, Mehlomakulu *et al.*, 2014; Oro *et al.*, 2014, Peña and Ganga, 2019), nous nous sommes intéressés à la souche *Suhomyces pyralidae* IWB T Y1140 qui produit le « facteur d'inhibition de *Brettanomyces* » Spkt1, dégradant spécifiquement la paroi cellulaire des *B. bruxellensis* sans inhiber la fermentation alcoolique par *S. cerevisiae* (Mehlomakulu *et al.*, 2014 et 2017). Lorsque nous avons évalué cette souche en moût naturel nous avons pu valider sa capacité à inhiber *B. bruxellensis*, entraînant une baisse de la production de phénols volatils pouvant aller jusqu'à 90% (**Figure 2**). En comparant cette souche avec d'autres levures de bioprotection classique, nous avons mis en avant sa capacité unique de bioprotection contre *B. bruxellensis*. Finalement, cette étude a donné lieu au lancement d'un nouveau produit en 2025, Level²Salva, suite à plusieurs essais concluants à l'échelle pilote et en cave sur différents cépages rouges (merlot, cabernet sauvignon, syrah, tempranillo, etc.) en France, en Espagne, en Italie et aux États-Unis.

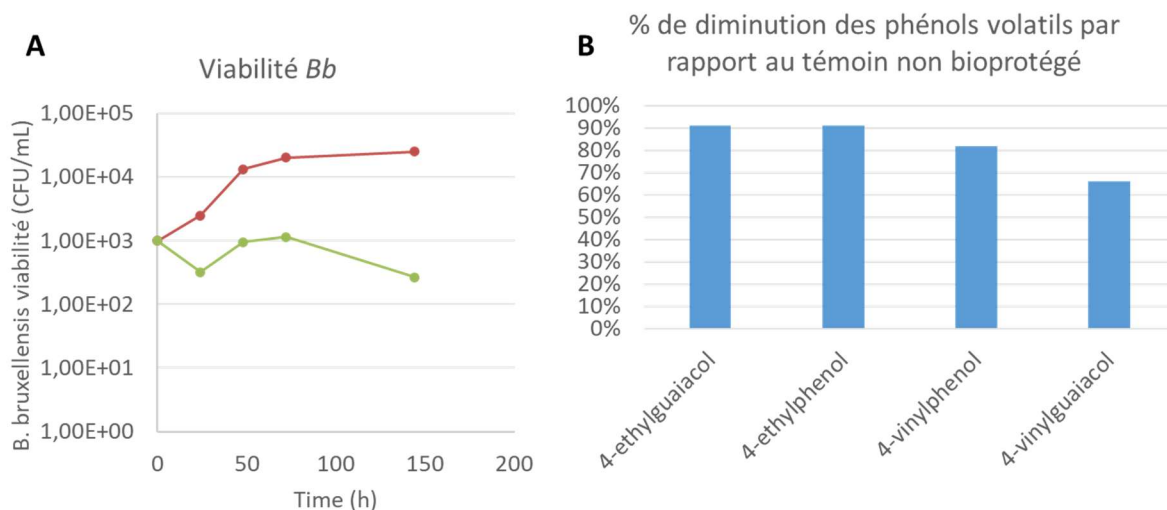


Figure 2. Fermentation alcoolique réalisées en Syrah (240g/L de sucre, YAN 144mg/L, pH 3,34). **A - Viabilité de *Brettanomyces bruxellensis* L0469 (CRBO, UMR 1366 Oeno) sans bioprotection (rouge) et avec *Suhomyces pyralidae* IWB T Y1140 inoculée 48h avant *S. cerevisiae* (vert) ; B – Diminution des phénols volatils en fin de fermentation dans la modalité bioprotégée par rapport au témoin sans bioprotection**

Bien que la bioprotection soit souvent abordée sous l'angle interaction levures/levures, il est important de noter que certaines bactéries peuvent-être intéressantes pour la bioprotection du vin. C'est le cas d'*Oenococcus oeni* dont certaines données du terrain indiquent que la présence permet de protéger les vins vis-à-vis du développement de *B. bruxellensis*. Une thèse CIFRE Lallemand est en cours au sein des laboratoires SPO et ISVV afin de caractériser plus finement les interactions entre *B. bruxellensis* et *O. oeni* dans un contexte œnologique avec pour objectifs l'identification des conditions optimales du biocontrôle et l'étude des mécanismes sous-jacents (Olazabal *et al.*, en cours).

Les interactions peuvent également avoir lieu entre deux levures de la même espèce. Ces interactions ont notamment été étudiées dans le cadre d'un projet en collaboration avec l'IUVV de Dijon. L'impact de co-cultures de *Saccharomyces cerevisiae* sur la composition et le profil organoleptique des vins a été recherché (**Figure 3**). Les populations cellulaires, les sucres, le profil aromatique et métabolique entre une co-culture, des cultures pures ou un mix des vins élaborés par des cultures pures ont été comparés et ont révélé que les co-cultures ne sont pas un simple mix de deux cultures pures mais également que les interactions sont souche-dépendantes. Enfin, il a été montré que les composés volatils et le profil sensoriel sont impactés (Bordet *et al.* 2020, 2021 & 2023).

En conclusion, l'exploration des communautés microbiennes et de leur évolution au cours des différentes étapes de la vinification a permis de mieux comprendre leur diversité, leurs fonctions et leurs interactions. Ces avancées offrent de nouvelles perspectives pour une maîtrise fine des fermentations et une valorisation de la biodiversité microbienne au service de la filière vitivinicole. Ces connaissances ouvrent la voie à une sélection plus ciblée de souches aux propriétés œnologiques intéressantes, notamment parmi les levures non-*Saccharomyces*. Enfin, en maîtrisant les interactions entre les microorganismes qui composent ces consortiums, il devient possible d'optimiser la qualité des vins tout en répondant aux enjeux actuels de durabilité, d'adaptation au changement climatique et de réduction des intrants.

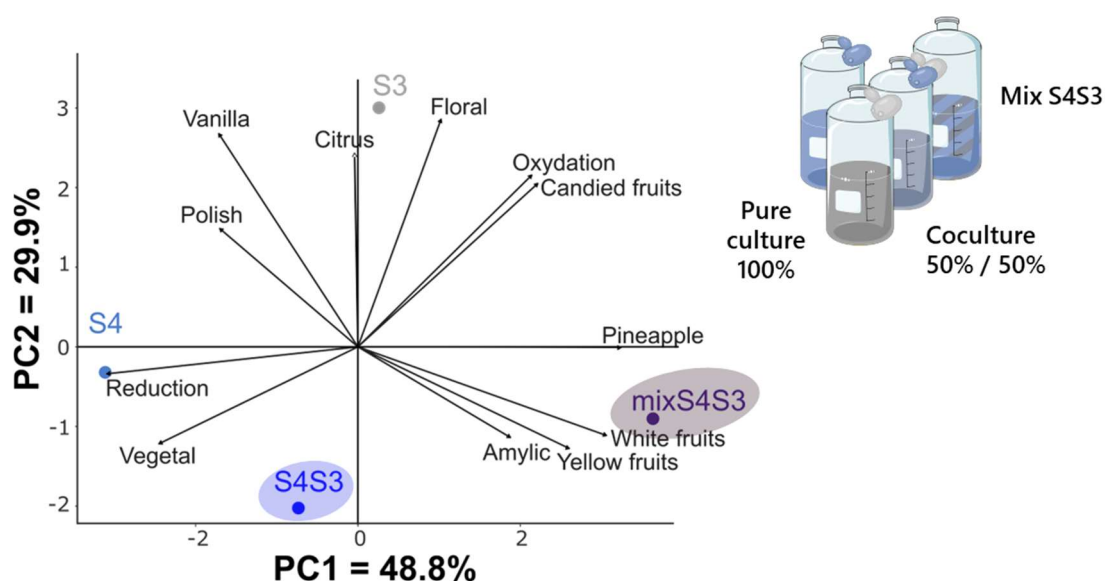


Figure 3. Impact sensoriel de co-cultures de *Saccharomyces cerevisiae* (S4S3) en comparaison de cultures pures (S3 ou S4) ou d'un mix de vins issus de cultures pures (mix S4S3)

Références bibliographiques

- Alexandre, H., Berlot, J. P., & Charpentier, C. (1994). Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. *Biotechnology Techniques*, 8(5), 295-300. <https://doi.org/10.1007/BF02428970>
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., & Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), 965-972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>
- Barbosa, C., Mendes-Faia, A., Lage, P., Mira, N. P., & Mendes-Ferreira, A. (2015). Genomic expression program of *Saccharomyces cerevisiae* along a mixed-culture wine fermentation with *Hanseniaspora guilliermondii*. *Microbial Cell Factories*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0318-1>
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., Alexandre H. (2020) Yeast–Yeast Interactions: Mechanisms, Methodologies and Impact on Composition. *Microorganisms*, 8(4), 600. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040600>
- Bordet, F., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Vichi, S., Quintanilla-Casas, B., Gougeon, R., Julien-Ortiz, A., Schmitt Kopplin, P., Alexandre H. (2021) Different Wines from Different Yeasts? " *Saccharomyces cerevisiae* Intraspecies Differentiation by Metabolomic Signature and Sensory Patterns in Wine". *Microorganisms*, 9(11):2327. doi: 10.3390/microorganisms9112327
- Bordet F, Romanet R, Bahut F, Ballester J, Eicher C, Peña C, Ferreira V, Gougeon R, Julien-Ortiz A, Roullier-Gall C, Alexandre H. (2023) Expanding the diversity of Chardonnay aroma through the metabolic interactions of *Saccharomyces cerevisiae* cocultures. *Front Microbiol.* 9;13:1032842. doi: 10.3389/fmicb.2022.1032842.
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., Caldeira, J., & Albergaria, H. (2014). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 843-853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>
- Chen, H. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*, 20(9), 1150-1161. <https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., & Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017>
- Comitini, Francesca; Gobbi, Mirko; Domizio, Paola; Romani, Cristina; Lencioni, Livio; Mannazzu, Ilaria; Ciani, Maurizio (2011) Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. In : *Food microbiology*, vol. 28, n° 5, p. 873–882. DOI: 10.1016/j.fm.2010.12.001.
- Curiel, J. A., Morales, P., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2017). Different Non-*Saccharomyces* Yeast Species Stimulate Nutrient Consumption in *S. cerevisiae* Mixed Cultures. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02121>

- Englezos, V., Rantsiou, K., Giacosa, S., Río Segade, S., Rolle, L., & Coccolin, L. (2019). Cell-to-cell contact mechanism modulates *Starterella bacillaris* death in mixed culture fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.009>
- Hranilovic, Ana; Gambetta, Joanna M.; Schmidtke, Leigh; Boss, Paul K.; Grbin, Paul R.; Masneuf-Pomarede, Isabelle *et al.* (2018) Oenological traits of *Lachancea thermotolerans* show signs of domestication and allopatric differentiation. In : Scientific reports, vol. 8, n° 1, p. 14812. DOI: 10.1038/s41598-018-33105-7.
- Kántor, Attila; Hutková, Jana; Petrová, Jana; Hleba, Lukáš; Kačániová, Miroslava (2016) Antimicrobial activity of pulcherrimin pigment produced by *Metschnikowia pulcherrima* against various yeast species. In : Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, vol. 05, n° 03, p. 282–285. DOI: 10.15414/jmbfs.2015/16.5.3.282-285.
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M. G., Caldeira, J., Albergaria, H., & Arneborg, N. (2015). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, fnv103. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv103>
- Kuchen B, Maturano YP, Mestre VM, Combina M, Toro M E, Vazquez F (2019) Selection of Native Non-*Saccharomyces* Yeasts with Biocontrol Activity against Spoilage Yeasts in Order to Produce Healthy Regional Wines. In: Fermentation 2019, 5, 60; doi:10.3390/fermentation5030060
- Mehlomakulu, Ngwekazi N.; Setati, Mathabatha E.; Divol, Benoit (2014) Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. In : International journal of food microbiology, vol. 188, p. 83–91. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015.
- Mehlomakulu, N. N., Prior, K. J., Setati, M. E., & Divol, B. (2017). *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 747–758.
- Morata, Antonio; Bañuelos, M^a Antonia; Vaquero, Cristian; Loira, Iris; Cuerda, Rafael; Palomero, Felipe *et al.* (2019) *Lachancea thermotolerans* as a tool to improve pH in red wines from warm regions. In : European Food Research and Technology, vol. 245, n° 4, p. 885–894. DOI: 10.1007/s00217-019-03229-9.
- Oro, L.; Ciani, M.; Comitini, F. (2014) Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. In : Journal of applied microbiology, vol. 116, n° 5, p. 1209–1217. DOI: 10.1111/jam.12446
- Oro, Lucia; Canonico, Laura; Marinelli, Valentina; Ciani, Maurizio; Comitini, Francesca (2019) Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar. In : Frontiers in microbiology, vol. 10, p. 415.
- Peña, Rubén; Ganga, María Angélica (2019) Novel antimicrobial peptides produced by *Candida intermedia* LAMAP1790 active against the wine-spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. In : Antonie van Leeuwenhoek, vol. 112, n° 2, p. 297–304. DOI: 10.1007/s10482-018-1159-9
- Petitgonnet, C., Klein, G. L., Roullier-Gall, C., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Julien-David, D., & Alexandre, H. (2019). Influence of cell-cell contact between *L. thermotolerans* and *S. cerevisiae* on yeast interactions and the exo-metabolome. *Food Microbiology*, 83, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.05.005>
- Pigao, Kevin; O'Donnell, Ryan; Osborne, James; Curtin, Chris (2021) Enrichment of *Brettanomyces* and Other Non-*Saccharomyces* Fermentative Yeasts from Vineyard Samples in Oregon. In : American Journal of Enology and Viticulture, vol. 72, n° 3, p. 257–266.
- Renault, P. E., Albertin, W., & Bely, M. (2013). An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4105–4119. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
- Renouf, V. (2006) Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : interactions et équilibres, relations avec la qualité du vin. Thèse de doctorat.
- Renouf, Vincent; Lonvaud-Funel, Aline (2007) Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. In : Microbiological research, vol. 162, p. 154–167.
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Roullier-Gall, C., David, V., Hemmler, D., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2020). Exploring yeast interactions through metabolic profiling. *Scientific Reports*, 10(1), 6073. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63182-6>
- Tronchoni, J., Curiel, J. A., Morales, P., Torres-Pérez, R., & Gonzalez, R. (2017). Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.017>
- Vaquero, Cristian; Loira, Iris; Bañuelos, María Antonia; Heras, José María; Cuerda, Rafael; Morata, Antonio (2020) Industrial Performance of Several *Lachancea thermotolerans* Strains for pH Control in White Wines from Warm Areas. In : Microorganisms, vol. 8, n° 6. DOI: 10.3390/microorganisms8060830.
- Vaquero, Cristian; Loira, Iris; Heras, José María; Carrau, Francisco; González, Carmen; Morata, Antonio (2021) Biocompatibility in Ternary Fermentations With *Lachancea thermotolerans*, Other Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* to Control pH and Improve the Sensory Profile of Wines From Warm Areas. In : Frontiers in microbiology, vol. 12, p. 656262. DOI: 10.3389/fmicb.2021.656262.

Consortium mycobiologique dans la fermentation du vin

Gabriela PINTO MIGUEL ¹, Evelyne AGUERA ², Cécile NEUVÉGLISE ¹

¹ UMR SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, 34060 Montpellier, France

² UE Pech Rouge, INRAE, 11300 Gruissan, France

Contact : gabriela.pinto-miguel@inrae.fr

Le développement de variétés hybrides interspécifiques résistantes aux maladies telles que le mildiou et l'oïdium permet de réduire significativement l'usage d'intrants phytosanitaires dans les vignobles. Ces VHI répondent ainsi à une demande sociétale croissante visant à limiter l'impact environnemental de la viticulture, ce qui explique leur adoption progressive par la filière. Parallèlement, les vins issus de fermentations spontanées, reposant sur les micro-organismes indigènes présents naturellement, suscitent un intérêt croissant. La majorité de ces micro-organismes proviennent de la surface des baies de raisin.

Choisir la fermentation spontanée, dans une optique de valorisation et de préservation de la biodiversité naturelle, nécessite une connaissance approfondie des communautés microbiennes impliquées, de leur dynamique fermentaire et de leur impact sur la qualité sensorielle des vins. Dans le cas des VHI, leur résistance naturelle aux maladies fongiques modifie l'équilibre microbien à la surface des baies, pouvant favoriser l'installation d'espèces non fermentaires ou même phytopathogènes, susceptibles d'altérer le vin. D'où l'importance de caractériser précisément les communautés microbiennes associées à ces nouvelles variétés.

L'objet de notre étude est la comparaison du microbiote des baies de la variété résistante Artaban et du cépage traditionnel Carignan, de son évolution au cours de la fermentation et de son impact sur la qualité aromatique des vins. Le microbiote de chaque variété a d'abord été caractérisé par métabarcoding, ce qui a permis d'identifier les principales espèces présentes au début de la fermentation. Des micro-fermentations ont été réalisées par ensemencement d'un moût de Merlot flash-pasteurisé avec les microbiotes de Carignan et Artaban issus des rinçages de baies ou des pieds-de-cuve. Les cinétiques fermentaires ont été suivies par des pesées automatiques toutes les 20 minutes, et une caractérisation de la teneur en azote (dosage enzymatique sur analyseur séquentiel) et en composés du cycle du carbone a été réalisée par HPLC. Les arômes fermentaires ont été analysés en fin de fermentation par GC-MS, ce qui permet de caractériser l'impact du microbiote sur la composition aromatique du vin. Pour mieux comprendre l'influence de chaque levure sur la cinétique fermentaire et la composition aromatique du vin, deux consortiums mycobiologiques ont également été constitués. Chaque consortium contenait différentes proportions des levures majoritaires issues des microbiotes indigènes initiaux. La fermentation de chaque consortium a ensuite été caractérisée de la même manière.

Remerciements : Les auteurs voudraient remercier la région Occitanie pour le financement du projet Oenovard'Occ qui s'inscrit dans le Défi Clé Vinid'Occ, ainsi que le métaprogramme INRAE METABIO pour le financement partiel de la thèse de Gabriela Pinto Miguel.

Avancées scientifiques récentes sur les levures *Metschnikowia* : applications en œnologie

Julie ARAGNO ¹, Pascale FERNANDEZ-VALLE ¹, Lucas SUC ¹, Cécile GRONDIN ¹, Jean-Luc LEGRAS ¹, Aurélie ROLAND ¹, Carole CAMARASA ¹, Audrey BLOEM ¹

¹ UMR SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, 34060 Montpellier, France

Contact : audrey.bloem@umontpellier.fr

L'orientation des marchés vers des vins plus sains pour la santé et pour l'environnement, motivée par la demande des consommateurs, conduit à des modifications des pratiques œnologiques, notamment à une diminution des intrants comme le SO₂. Entre la récolte et le démarrage de la fermentation alcoolique, les moûts sont souvent stockés ou soumis à des traitements comme la macération pré-fermentaire, pendant lesquels des flores d'altération peuvent se développer. La préservation de la qualité sanitaire de cette matière première est rendue possible par l'ajout de SO₂ qui, bien que toxique pour l'homme et l'environnement, reste l'agent conservateur le plus communément utilisé en œnologie.

Ces dernières années, la bioprotection pour protéger les moûts de raisin des flores d'altération lors des phases pré-fermentaires est apparue comme une approche innovante et durable pour la gestion des risques microbiologiques. Cette pratique œnologique repose sur l'inoculation sur raisin ou sur moût de levures sélectionnées qui, par leur activité métabolique, inhibent le développement de microorganismes indésirables à l'origine de déviations organoleptiques tout en préservant la flore microbienne positive, responsable de la complexité aromatique des vins. Des souches de levures *Metschnikowia pulcherrima* utilisées comme agent bioprotecteur sont déjà commercialisées mais la généralité de ce caractère chez ces levures a été peu explorée, ainsi que les mécanismes sous-jacents expliquant le caractère bioprotecteur. Dans ce contexte, les récents travaux au sein de notre unité se sont focalisés sur les propriétés bioprotectrices des levures *Metschnikowia* et les mécanismes pouvant expliquer ce caractère, ainsi que les caractéristiques phénotypiques de ces levures en conditions œnologiques.

Diversité du caractère bioprotecteur de *Metschnikowia* spp.

46 levures appartenant au genre *Metschnikowia*, dont 39 souches de l'espèce *Metschnikowia pulcherrima*, ont été évaluées pour leur caractère bioprotecteur vis-à-vis de deux microorganismes d'altération rencontrés en œnologie : les bactéries acétiques *Gluconobacter oxydans* et les levures *Brettanomyces bruxellensis*, responsables respectivement de la piqure acétique et du caractère phénolique des vins. Les levures *Metschnikowia* ont été ensemencées à une population de 10⁶ UFC/ml dans un milieu de type jus de raisin ajusté à pH 3,3, en présence de *Gluconobacter oxydans* ou de *Brettanomyces bruxellensis* à une population de 10³ UFC/ml. Des modalités témoins comprenant *Metschnikowia*, *Brettanomyces* et *Gluconobacter* seuls ont également été mises en place. Différents prélèvements ont été réalisés afin de suivre l'évolution des populations sur milieu sélectif ou par PCR digital après un, deux et sept jours de contact.

Le suivi de la concentration cellulaire de *Gluconobacter oxydans* au cours du temps, en présence de différentes souches de *Metschnikowia*, met en évidence trois profils d'interaction distincts (**Figure 1**). Le **profil 1** correspond à un ralentissement de la croissance bactérienne par rapport à la condition témoin sans levure ; il s'agit du profil majoritaire, observé pour 90 % des souches de *Metschnikowia* testées. Le **profil 2** se caractérise par une inhibition de la croissance de *G. oxydans*, tandis que le **profil 3** n'induit aucun effet notable sur la croissance bactérienne. Ces résultats confirment le caractère

souche-dépendant de la bioprotection assurée par *Metschnikowia*, avec, dans la majorité des cas, un effet de ralentissement de la croissance de *Gluconobacter oxydans*.



Figure 1. Effet bioprotecteur de *Metschnikowia* spp. sur *Gluconobacter oxydans* : mise en évidence de trois profils de croissance différents de *Gluconobacter oxydans* en co-culture avec *Metschnikowia* spp comparés à *Gluconobacter oxydans* en culture pure. Le nombre de souches de *Metschnikowia* testées présentant ces trois profils est représenté sous forme d'histogrammes dans l'encadré en bleu.

La bioprotection vis-à-vis de *Brettanomyces bruxellensis* a été évaluée de manière similaire, en suivant l'évolution de la population de *Brettanomyces* au cours du temps, en présence ou en absence de *Metschnikowia* (Figure 2). Deux profils d'interaction distincts ont été observés : un **profil majoritaire**, correspondant à un retard de croissance de *Brettanomyces*, retrouvé pour 70 % des souches de *Metschnikowia* testées ; et un **profil sans effet**, où aucune influence sur la croissance de *Brettanomyces* n'a été constatée, pour 30 % des souches. Ces résultats confirment là encore le caractère souche-dépendant de la bioprotection assurée par *Metschnikowia*, avec un effet prédominant de ralentissement de la croissance de *Brettanomyces bruxellensis*.

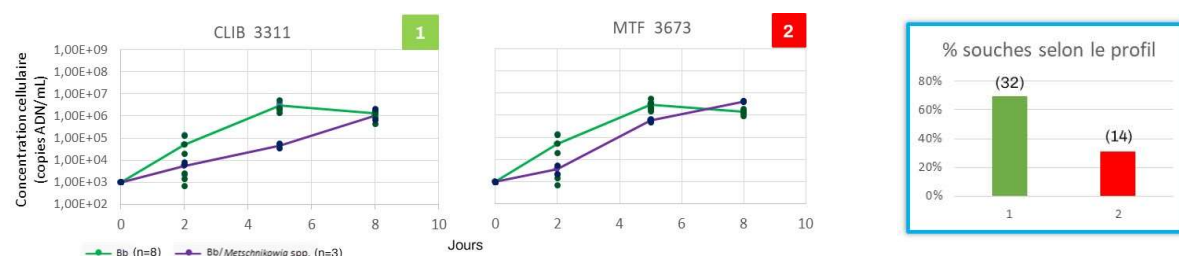


Figure 2. Effet bioprotecteur de *Metschnikowia* spp. sur *Brettanomyces bruxellensis* : mise en évidence de deux profils de croissance différents de *Brettanomyces bruxellensis* en co-culture avec *Metschnikowia* spp comparés à *Brettanomyces bruxellensis* en culture pure. Le nombre de souches de *Metschnikowia* testées présentant ces deux profils est représenté sous forme d'histogrammes dans l'encadré en bleu.

Bioprotection de *Metschnikowia pulcherrima* en moût naturel (Chardonnay)

Afin de valider l'effet bioprotecteur dans des conditions œnologiques, la croissance de *Gluconobacter oxydans* et de *Brettanomyces bruxellensis* a été suivie en phase pré-fermentaire, en présence de deux souches de *Metschnikowia pulcherrima*, dans un moût de Chardonnay. Les ensemencements ont été réalisés à raison de 10^6 UFC/ml pour *Metschnikowia* et 10^3 UFC/ml pour les micro-organismes d'altération. Cette étude a été conduite à deux températures, 16°C et 20°C, afin d'évaluer l'effet combiné de la bioprotection et de la température.

Les résultats confirment un effet bioprotecteur souche-dépendant dans les conditions œnologiques testées, ainsi qu'une influence notable de la température sur l'efficacité de la bioprotection. À 16°C, l'inhibition de la croissance de *Gluconobacter oxydans* est significativement plus marquée qu'à 20°C (**Figure 3A**). En revanche, aucune inhibition de *Brettanomyces bruxellensis* n'a été observée, quelle que soit la température ou la souche de *Metschnikowia* utilisée (**Figure 3B**).

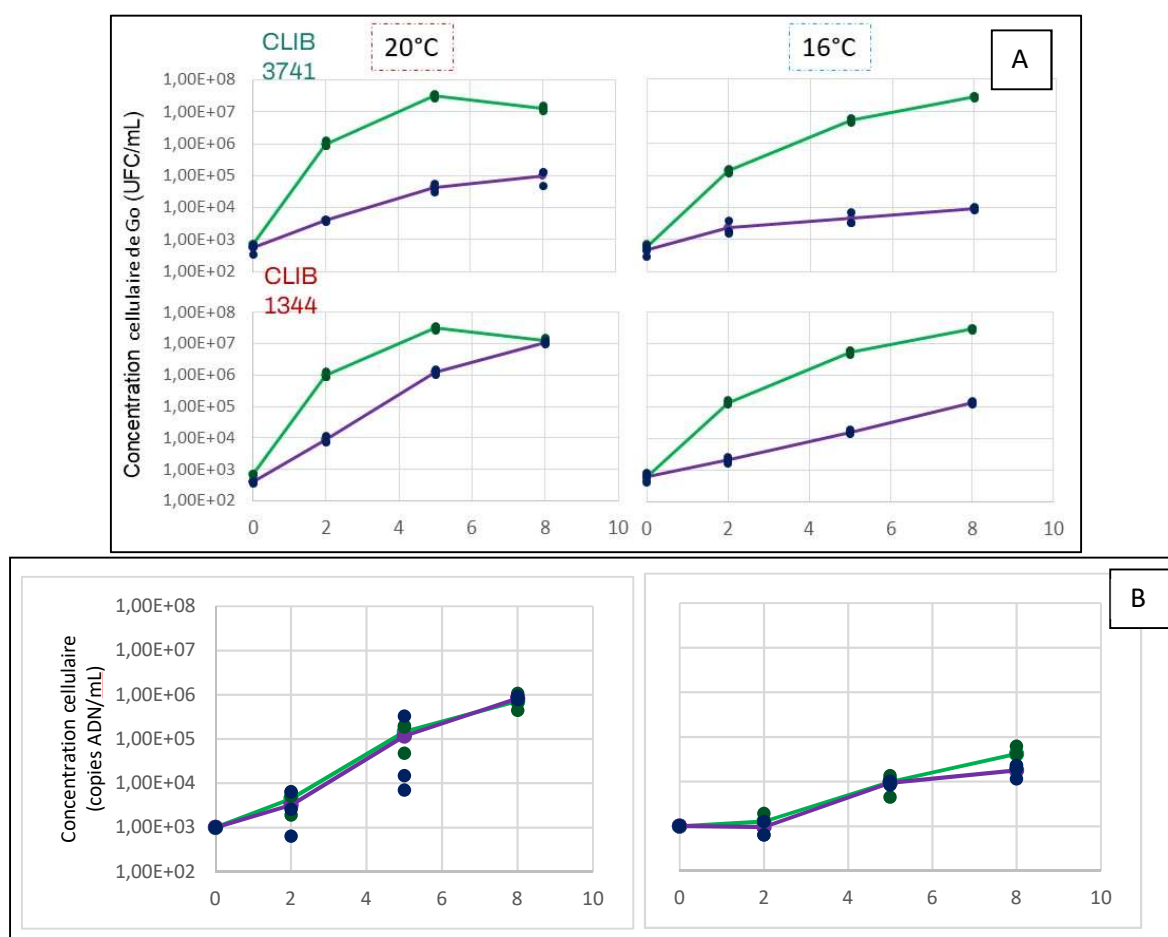


Figure 3. Effet bioprotecteur en moût naturel à 20°C et 16°C. (A) Profil de croissance de *G. oxydans* en culture pure et de *G. oxydans* en co-culture avec *Metschnikowia* spp (CLIB 3741 et CLIB 1344). (B) Profil de croissance de *B. bruxellensis* en culture pure et en co-culture avec *Metschnikowia* spp CLIB 3741.

Exploration du mécanisme sous-jacent à la bioprotection chez *Metschnikowia pulcherrima*

L'un des principaux mécanismes proposés pour expliquer l'action antimicrobienne de *Metschnikowia* repose sur la sécrétion d'acide pulcherriminique. Ce métabolite chélate les ions ferriques de l'environnement, formant un pigment rouge insoluble appelé pulcherrimine, et privant ainsi les micro-organismes concurrents de fer, ce qui inhibe leur croissance (Horváth *et al.*, 2021 ; Oro *et al.*, 2014 ;

Sipiczki, 2006). Traditionnellement, la production d'acide pulcherriminique par les levures est estimée indirectement par la mesure de la largeur des halos rougeâtres autour des colonies ou par celle des zones d'inhibition.

Dans cette étude, la production de cet inhibiteur a été approchée sous l'angle de la bioprotection en quantifiant son précurseur métabolique, la cyclo-L-leucyl-L-leucyl (cyclo-Leu-Leu), par LC-MS/MS. La capacité de 46 souches de *Metschnikowia* à produire ce composé a été évaluée après 48 h de culture en milieu synthétique. Parallèlement à cette quantification, des mesures de la coloration rouge ont été réalisées, reflétant indirectement la formation de pulcherrimine. Afin d'explorer les relations entre ces différents paramètres, les résultats sont présentés sur une même figure : la concentration en cyclo-Leu-Leu (barres bleues), l'intensité de la coloration rouge (points rouges) et le caractère bioprotecteur contre *Gluconobacter oxydans* à 48 h (points verts) (**Figure 4**). Les souches de *Metschnikowia* y sont classées selon la croissance résiduelle de *G. oxydans* en co-culture.

De manière générale, une forte variabilité est observée entre les souches quant à la production de cyclo-Leu-Leu, sans lien clair avec leur capacité bioprotectrice. Par exemple, la souche *M. pulcherrima* CLIB 3741 présente à la fois une forte production de cyclo-Leu-Leu, une intensité colorimétrique élevée et un effet de bioprotection marqué. À l'inverse, la souche CLIB 3732, bien qu'étant la plus productrice de cyclo-Leu-Leu, présente une intensité colorimétrique plus faible et un effet de bioprotection modéré.

Ces observations suggèrent, de façon générale, l'absence de corrélation directe entre la production de cyclo-Leu-Leu, l'intensité de la coloration rouge et l'efficacité bioprotectrice à 48 h.

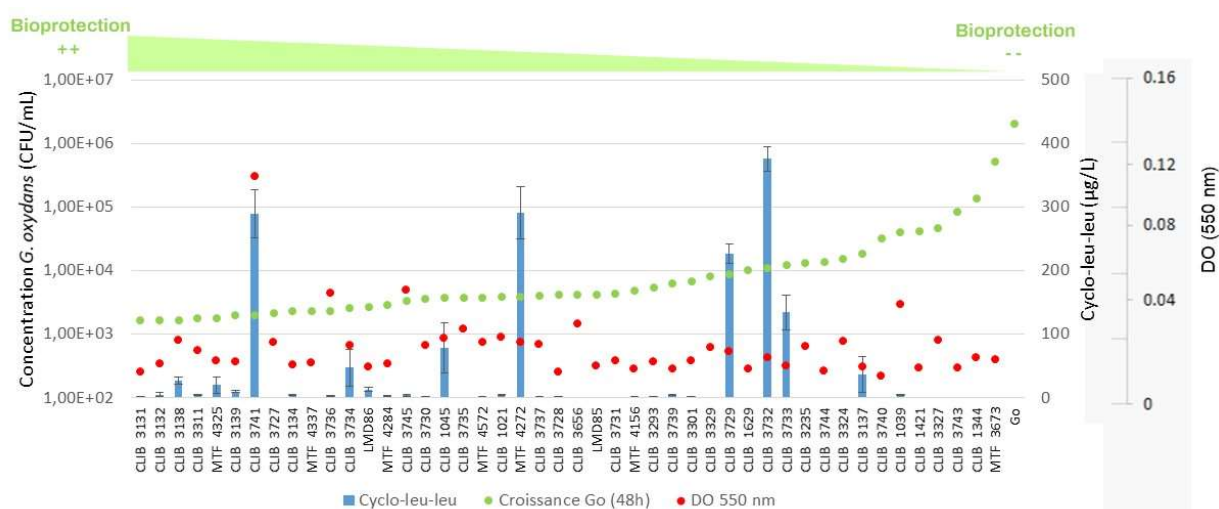


Figure 4. Corrélations entre la production de la cyclo-L-leucyl-L-leucyl produite par *Metschnikowia* spp, la DO 550 nm (couleur rouge) et la capacité de bioprotection de *Metschnikowia* vis-à-vis de *Gluconobacter oxydans* par le suivi des populations en UFC/ml après 48h de bioprotection.

Conséquences de la bioprotection sur le profil aromatique des vins de Chardonnay

L'impact de la bioprotection sur le déroulement de la fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* a été étudié, en particulier sur le profil aromatique des vins, en comparaison avec une fermentation réalisée sans bioprotection préalable des moûts. Après 48h de bioprotection à 20°C par *Metschnikowia*, *S. cerevisiae* est ensemencée à 10^6 UFC/ml afin d'initier la fermentation alcoolique.

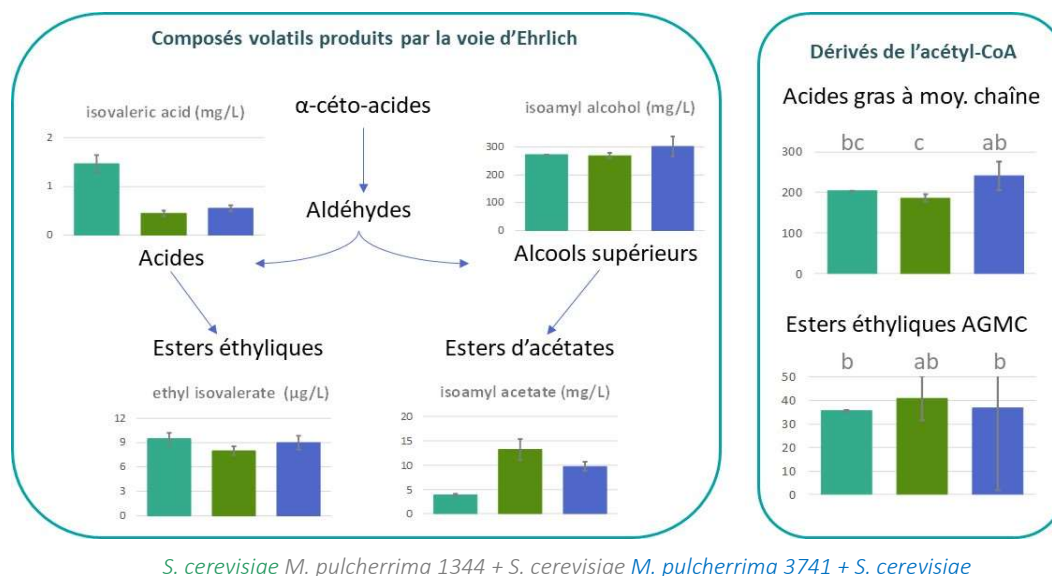


Figure 5. Incidence de la bioprotection sur le profil aromatique des vins de Chardonnay

Des profils aromatiques distincts sont observés entre les fermentations alcooliques réalisées en présence ou en absence de *Metschnikowia pulcherrima* (Figure 5). La présence de *M. pulcherrima* se traduit par une augmentation des esters d'acétate, tandis qu'aucun impact de la bioprotection n'est constaté sur la formation des alcools supérieurs, des acides gras à chaîne moyenne et de leurs esters correspondants.

En conclusion, nous avons constaté que les levures *Metschnikowia* peuvent bioprotéger les moûts de raisin, mais que l'efficacité de la bioprotection dépend de la souche de *Metschnikowia*, du micro-organisme d'altération ciblé et de facteurs environnementaux tels que la température et la composition du milieu (Aragno *et al.*, 2024). Il est essentiel de garder ces facteurs à l'esprit pour concevoir une bioprotection efficace dans des applications réelles.

La variabilité de l'efficacité de la bioprotection souligne l'importance de comprendre les mécanismes sous-jacents. Nos travaux ont révélé que l'effet protecteur de *Metschnikowia* n'était pas lié à la production du précurseur de l'acide pulcherriminique, ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes. En outre, il est essentiel de noter que ces études ont été réalisées avec une souche particulière de *G. oxydans* et peut ne pas s'étendre à d'autres micro-organismes d'altération.

De plus, la bioprotection induit des modifications dans les profils métaboliques du vin, notamment une production accrue d'esters d'acétate. Cela souligne l'intérêt de ce procédé, non seulement pour prévenir la contamination microbiologique, mais aussi pour apporter de la complexité aux vins.

Références bibliographiques

- Aragno J, Fernandez-Valle P, Thiriet A, Grondin C, Legras JL, Camarasa C, Bloem A. Two-Stage Screening of *Metschnikowia* spp. Bioprotective Properties: From Grape Juice to fermented must by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, 2024, 12(8), pp 1659.
- Horváth E, Dályai L, Szabó E, Barna T, Kalmár L, Posta J, Sipiczki M, Csoma H, & Miklós I. The antagonistic *Metschnikowia andauensis* produces extracellular enzymes and pulcherrimin, whose production can be promoted by the culture factors. *Scientific Reports*, 2021 11(1), 10593.
- Oro L, Ciani M, & Comitini F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(5), 1209-1217.
- Sipiczki M. *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10), 6716-6724.

Communautés microbiennes comme outil de pilotage de la transition agroécologique à la parcelle : de la théorie aux limites terrain

Louise NICOURT ¹

¹ AdVini, Chargée Développement Durable, 34725 Saint-Félix-de-Lodez, France

Contact : louise.nicourt@advini.com

Résumé

La vitiforestierie constitue un levier prometteur pour restaurer la biodiversité fonctionnelle des vignobles méditerranéens. Afin d'objectiver ses impacts microbiologiques, nous avons établi en mai 2024 un point zéro sur la parcelle expérimentale « Fournet » (2 ha, Muscat petits grains) du domaine du Mas Neuf (Vignobles Jeanjean- AdVini), juste après l'installation d'un bosquet et d'une haie intra-parcellaire. Au total, 2 130 arbres ont été plantés à l'hiver 2023-2024 sur l'ensemble de la propriété.

Vingt-quatre échantillons de sol (0–20 cm) répartis en trois classes de distance (9–16 m, 18–25 m, 27–34 m) ont été analysés : biomasse microbienne (ADN total), vitalité (ATP-métrie) et structure Bactéries/Champignons/Protistes (cytométrie). Malgré une homogénéité physicochimique, la biomasse initiale présente une forte variabilité ($9,3 \pm 3,4 \mu\text{g ADN g}^{-1} \text{MS}$; CV 37 %) et la vitalité une hétérogénéité marquée ($560 \pm 160 \text{ ng ATP g}^{-1} \text{MS}$; CV 29 %), avec une tendance haie > inclusion (606 vs 448 ng ; $p < 0,05$). La communauté est dominée par les bactéries ($6,5 \times 10^7 \text{ cellules g}^{-1}$), loin devant champignons et protistes (ratio $\approx 150 : 2 : 1$). Ces résultats illustrent la difficulté à transformer la microbiologie du sol en indicateur opérationnel : multiplicité des méthodes, coûts élevés, interprétation incertaine et délais analytiques trop longs.

Mots clés : viticulture, vitiforestierie, microbiote du sol, ATP-métrie, cytométrie, point zéro, proxys rapides

1. Introduction

La transition agroécologique des vignobles nécessite des indicateurs précoces et sensibles. Les communautés microbiennes du sol, souvent qualifiées de « sentinelles » (Terrat *et al.*, 2018), offrent un potentiel important mais demeurent peu appliquées en routine à cause de verrous méthodologiques et économiques. Dans le cadre de la démarche de transition agroécologique impulsée par le groupe AdVini, le domaine du Mas Neuf (Vignobles Jeanjean- Vic-la-Gardiole, Hérault) a lancé en 2023 un projet vitiforestier pilote intégrant haies et bosquets intra-parcellaires. L'objectif de cette étude est d'établir la ligne de base microbiologique (point zéro) avant tout effet mesurable des 2 130 arbres plantés à l'hiver 2023-2024 et de discuter les limites opérationnelles d'un tel suivi.

2. Matériels et méthodes

2.1. Site expérimental

La parcelle Fournet (43°32' N ; 3°46' E) est implantée sur sols sablo-limoneux à 7 % de calcaire actif, climat méditerranéen (800–900 mm an⁻¹). Les arbres forment un bosquet central (45 × 25 m) et une haie intra-parcellaire de 85 m.

2.2. Plan d'échantillonnage

Vingt-quatre prélèvements de sol à 0–20 cm de profondeur ont été réalisés en mai 2024, répartis en trois classes de distance aux infrastructures : Proche (9–16 m), Intermédiaire (18–25 m) et Lointaine (27–34 m). Les échantillons ont été maintenus en chaîne froide et analysés sous 6 h.

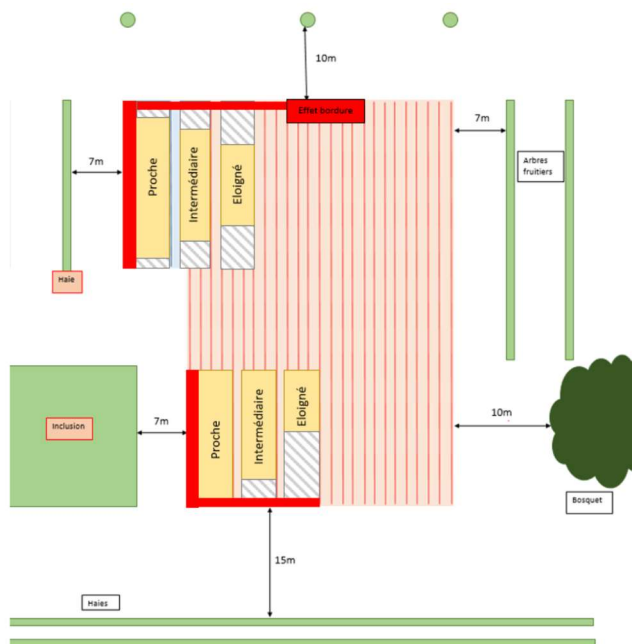


Figure 1. Segmentation de la parcelle Fournet (Section droite visible uniquement) avec localisation d'une zone proche (de 9,25 à 16m), intermédiaire (de 18,25 à 25m), éloignée (de 27,25 à 34m) par rapport à la haie (en haut à gauche), et par rapport à l'inclusion (en bas à gauche). En rouge sont représentés les effets bordures. (Source : DESPALIN, S.-2024)

2.3. Analyses microbiologiques

La biomasse a été mesurée par extraction CTAB et quantification Qubit de l'ADN total. L'activité microbienne a été évaluée par ATP-métrie (kit Excell®). La structure Bactéries/Champignons/Protistes a été déterminée par cytométrie en flux (Floc 800, coloration SYBR Green I/PI).

2.4. Traitements statistiques

La normalité des résidus a été testée par Shapiro-Wilk ; les données normales ont été soumises à une ANOVA, sinon à un Kruskal-Wallis, suivi le cas échéant d'un test post-hoc de Wilcoxon ($\alpha = 0,05$).

3. Résultats et discussion

3.1. Homogénéité physico-chimique

L'examen des paramètres de base du sol – pH, teneur en matière organique (MO) et capacité d'échange cationique (CEC) – n'a révélé aucune différence statistiquement significative entre les trois classes de distance aux infrastructures agroforestières (tests ANOVA ; $p > 0,10$ dans tous les cas). Cette homogénéité confirme que les variations observées dans les indicateurs microbiologiques ne peuvent

pas être attribuées à un gradient physico-chimique latent, ce qui renforce la pertinence du point zéro comme référence commune.

3.2 Variabilité de la biomasse microbienne initiale

La charge microbienne évaluée par extraction d'ADN total s'établit en moyenne à $9,3 \pm 3,4 \mu\text{g ADN g}^{-1}$ de matière sèche, soit un coefficient de variation (CV) de 37 %. Aucune tendance spatiale nette n'est détectée entre zones proche, intermédiaire ou lointaine (Kruskal-Wallis : $p = 0,31$) (**Figure 2**). Autrement dit, la biomasse de départ est fortement hétérogène mais ne suit pas de gradient simple par rapport aux arbres, ce qui complique la détection d'un futur effet vitiforestier.

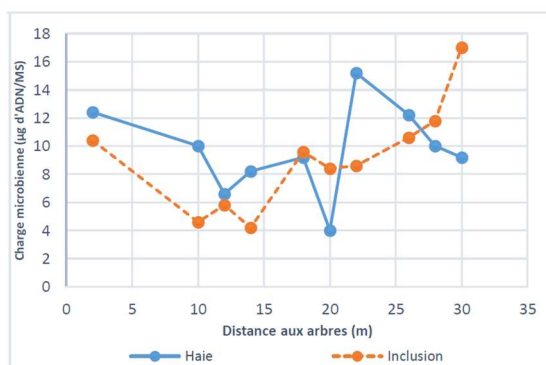


Figure 2. Mesures des charges microbiennes ($\mu\text{g d'ADN/g MS de sol}$) en fonction de la distance aux arbres pour les échantillons récoltés dans l'aire de la haie et de l'inclusion (Source : DESPALIN, S.-2024).

3.3. Vitalité biologique microbienne initiale

L'ATP-métrie indique une vitalité moyenne de $560 \pm 160 \text{ ng ATP g}^{-1} \text{ MS}$ (CV 29 %). Une différence significative apparaît entre les échantillons prélevés à proximité de la haie (606 ng g^{-1}) et ceux situés près de l'inclusion (448 ng g^{-1}) ; le test de Wilcoxon confirme cette tendance ($p < 0,05$) (**Figure 3**). Bien que l'origine de cet écart reste à confirmer, il suggère soit un microclimat plus favorable autour de la haie, soit une hétérogénéité initiale indépendante des plantations.

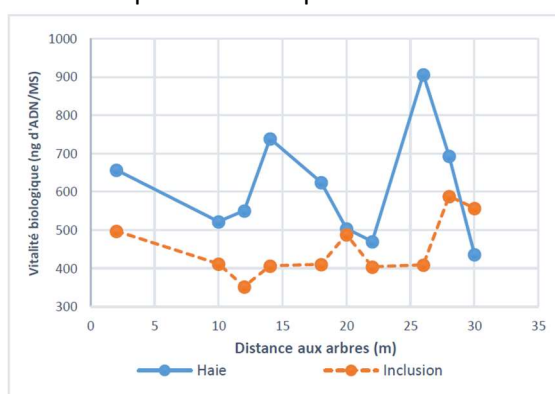


Figure 3. Mesures des vitalités biologiques ($\text{ng d'ATP/g MS de sol}$) en fonction de la distance aux arbres pour les échantillons récoltés dans l'aire de la haie et de l'inclusion (Source : DESPALIN, S.-2024).

3.4. Structure communautaire

La cytométrie en flux montre une communauté dominée de façon écrasante par les bactéries ($6,5 \times 10^7 \text{ cellules g}^{-1}$). Les champignons atteignent $9 \times 10^5 \text{ cellules g}^{-1}$ et les protistes

4×10^5 cellules g^{-1} , soit un ratio d'environ 150 : 2 : 1 (B : F : P). Cette nette prépondérance bactérienne reflète un sol très minéralisé typique des contextes méditerranéens et peut limiter la détection d'effets subtils liés aux arbres sur les guildes fongiques ou protistes.

4. Limites terrain et implications pratiques

Le recours aux indicateurs microbiens se heurte à une double barrière : technique, puis décisionnelle. D'abord, la multiplicité des protocoles – extraction d'ADN pour la biomasse potentielle, ATP-métrie pour l'activité instantanée et cytométrie pour la structure – produit des signaux faiblement corrélés ; le même sol peut afficher un ADN en hausse et un ATP en baisse. Cette divergence brouille la lecture et finit par décourager les équipes terrain qui recherchent un indicateur univoque.

À cela s'ajoutent les contraintes logistiques. Un "pack complet" (ADN + ATP + cytométrie) coûte environ 340 € par échantillon ; avec vingt-quatre points, la facture dépasse 8 k€. Le maintien de la chaîne froide et l'envoi express renchérissent encore le dispositif, tandis que les délais analytiques – quatre jours pour l'ATP mais jusqu'à trois semaines pour l'ADN – sont incompatibles avec des décisions agronomiques qui se jouent souvent en moins d'une semaine.

Enfin, la variabilité spatiale du vignoble (CV 30–40 %) oblitère les signaux faibles : il faudrait qu'un effet "arbre" dépasse 25 % pour émerger statistiquement avec cinq réplicats. Sans plan d'échantillonnage rigoureux (positions GPS fixes, réplicats stratifiés), la probabilité de conclure « pas d'effet » reste élevée, même lorsqu'il existe.

5. Perspectives pour le suivi à long terme

À partir du millésime 2028, nous élargirons le suivi microbiologique aux grappes (épiphyte) puis aux levures fermentaires en cuverie. L'objectif est double : tracer le continuum écologique, du terroir jusqu'au produit fini, et mesurer l'influence indirecte des arbres sur le profil fermentaire et, in fine, sur la typicité sensorielle des vins.

6. Conclusion

Le point zéro 2024 révèle une variabilité microbiologique élevée qui, combinée aux contraintes méthodologiques et économiques, limite l'usage des indicateurs microbiens comme outils de pilotage à l'échelle de la saison. Stabiliser des protocoles légers (ATP, MO, CEC) et intégrer des analyses de haute résolution ponctuelles permettront de concilier besoin opérationnel et robustesse scientifique et d'ouvrir la voie à un suivi intégré, de la parcelle à la cave.

Remerciements

Nos remerciements vont à l'équipe technique du Mas Neuf pour leur implication et persévérance dans le projet, et à Sara Despalin, pour tout son travail effectué à l'occasion de son stage de fin d'étude en 2024.

Références

1. Terrat S., et al. (2018). Microbiologie des sols viticoles français.
2. Despalin S. (2024). Mémoire d'ingénieur : Vie des sols et vitiforesterie. Institut Agro Montpellier.

Le microbiote des kéfirs de fruit : origine et évolution

Nacer MOHELLIBI ¹, Alexandra MARTIN ¹, Saad En NAIMANI ¹, Cécile GRONDIN ², Julien DESCHAMPS ¹, Christophe LAVELLE ³, Jean-Baptiste BOULE ³, Christine LONGIN ⁴, Saulius KULAKAUSKAS ¹, Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER ¹, Jean-Luc LEGRAS ², Romain BRIANDET¹, Pierre RENAULT ¹

¹ Micalis Institute, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Jouy-en-Josas, France

² UMR SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, 34060, Montpellier, France.

³ UMR Structure et Instabilité des Génomes, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

⁴ MIMA2 Imaging Core Facility, Microscopie et Imagerie des Microorganismes, Animaux et Aliments, INRAE, Jouy-en-Josas, France

Contact : pierre.renault.2@inrae.fr

Introduction

Le kéfir de fruits, water kéfir en anglais, est une boisson fermentée réalisée à base d'un ferment contenu dans un grain gélatineux (Lynch *et al.*, 2021). Il ne faut pas confondre cette boisson avec le kéfir traditionnel fait avec du lait et dont l'écosystème est complètement différent mais se développe aussi à partir de grains. Une abondante littérature suggère que, comme son homologue laitier, le kéfir de fruit contiendrait des micro-organismes probiotiques et présenterait différentes propriétés intéressantes pour la santé (de Souza *et al.*, 2024).

Pour réaliser cette boisson, des grains servant d'inoculum sont ajoutés à de l'eau sucrée, avec du saccharose à environ quant à 50 g par litre et d'un fruit, traditionnellement une figue. D'autres fruits ou extrait de plantes peuvent y être également ajoutés comme du citron, des raisins secs... Après leur inoculation, les grains se développent en parallèle d'une consommation du saccharose et d'une production d'acide lactique, d'acide acétique et d'éthanol. On constate également une augmentation de la quantité de fructose dans le milieu due à l'utilisation de la partie glucose du sucre pour la production du polysaccharide formant le grain en dextran. Enfin, il y a une production de gaz carbonique qui fait remonter les grains à la surface du liquide.

Des travaux antérieurs ont montré que ses grains étaient composés de différentes espèces de bactéries lactiques, de levures, et de bactéries acétiques dont certaines étaient communes à un large éventail d'échantillons (Breselge *et al.*, 2025). Ces micro-organismes interagissent en échangeant probablement différents métabolites et forment ainsi un écosystème résilient, permettant aux grains de reprendre une activité après plusieurs mois de stockage dans un état de repos au froid (Lynch *et al.*, 2021). L'origine de cet écosystème n'est pas connue avec certitude. Le kéfir de fruit a été décrit dans le Caucase dès 1875 et aurait été rapporté de là en Europe. Il a été également décrit des kéfirs de fruits au Mexique nommé Tibi. L'analyse macroscopique des grains montre qu'il existe des grains de différentes tailles, couleurs, voire de différentes formes. Dans cette étude, nous allons étudier par différentes techniques cet écosystème à partir de grains de différentes origines et propriétés macroscopiques pour mettre en évidence leur points communs et leurs différences, et ainsi tenter de déterminer s'ils ont tous une origine commune et quels sont leurs facteurs de variabilité.

Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous avons développé une approche de caractérisation de la flore microbienne par métagénomique. De l'ADN a été extrait des grains d'une trentaine de kéfirs de fruit, et séquencé par Illumina. Après un assemblage permettant de reconstituer les séquences des gènes des microorganismes ayant une abondance supérieure à ~1%, la recherche d'un marqueur

phylogénétique codant pour l'ATPase ribosomique YchF a été réalisée. La caractérisation de ce marqueur permet de calculer une composition relative en espèces dont un extrait est présenté au **Tableau 1**. Cette analyse a permis de détecter une centaine d'espèces dans l'ensemble des échantillons, mais dont seule une trentaine se retrouve dans au moins 20 % des échantillons et une dizaine dans au moins 50 %. Parmi les espèces conservées, il y a

- Une dizaine d'espèces de levures, avec une prépondérance marquée de *Saccharomyces cerevisiae* qui est présente dans tous les échantillons.
- Une quinzaine d'espèces de bactéries lactiques, constituant le groupe le plus important ont été détectées, en particulier *Lactocaseilactobacillus paracasei*, *Lentilactobacillus hilgardii*, 5 espèces de *Liquorilactobacillus* et 2 *Oenococcus*.
- Des bactéries acétiques des genres *Gluconobacter* et *Acetobacter*.
- 3 espèces de *Bifidobacterium* (Actinobactérie auxquelles un rôle de probiotique est souvent attribué) ;
- *Zymomonas*, une alpha-protéobactéries productrice d'éthanol que l'on retrouve comme contaminante dans la bière et le cidre, mais également dans de nombreuses autres fermentations alcooliques) complètent ce panorama.

Species		Max cover	Frequencies																									
			Keir01	Keir02	Keir03	Keir04	Keir05	Keir06	Keir07	Keir08	Keir09	Keir10	Keir11	Keir12	Keir13	Keir14	Keir15	Keir16	Keir17	Keir18	Keir19	Keir20	Keir21a	Keir21b	Keir21c	Keir21d	Keir21e	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30.8	25	1.422	7.213	2.66	1.879	0.798	6.597	8.776	2.599	1.808	2.226	2.415	0.227	0.984	1.305	30.72	30.81	23.47	1.256	3.138	0.94	9.566	4.793	7.09	1.603	1.247	
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	27.3	23	3.22	-	0.993	2.443	1.19	19.61	17.37	16.35	8.116	27.26	3.08	0.499	1.234	9.906	14.33	14.02	-	3.308	15.31	4.185	13.49	14.39	13.52	3.771	5.081	
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	60	21	-	0.565	5.437	60.03	-	-	-	18.25	8.969	6.263	8.37	6.074	0.296	2.423	11.28	1.334	2.299	-	0.2	14.15	3.964	2.669	1.196	1.466	3.74	2.226
<i>Liquorilactobacillus ghanensis</i>	70.7	18	51.24	70.67	-	-	-	-	7.416	0.674	0.274	-	0.634	3.135	-	0.609	4.957	-	-	3.023	18.28	5.799	0.541	26.65	21.23	21.08	9.864	10.49
<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	27.4	15	1.054	-	-	-	-	-	-	0.345	7.411	0.489	9.358	-	0.461	-	1.068	-	2.411	17.88	3.614	-	5.522	7.071	5.631	23.56	27.45	
<i>Gluconobacter oxydans</i>	18.6	15	-	4.028	0.111	1.158	0.623	0.622	-	-	0.264	1.007	-	-	0.185	0.184	2.168	0.955	18.62	0.261	1.18	0.191	-	-	-	-	-	
<i>Oenococcus oeni</i>	52.1	14	-	4.06	-	-	-	-	-	-	0.623	13.45	17.17	-	0.266	-	-	-	3.807	24.92	20.89	52.14	19.59	19.52	29.62	38.59	38.53	
<i>Acetobacter fabarum</i>	32.4	13	2.152	2.135	32.41	-	-	2.578	-	-	15.72	2.813	-	-	0.426	4.285	-	1.041	5.441	-	-	3.478	-	-	-	0.262	-	0.158
<i>Schleiferilactobacillus harbinensis</i>	10.4	13	-	-	0.317	-	-	1.122	2	6.371	2.462	9.512	-	-	-	10.45	5.284	4.006	-	-	1.599	-	1.376	0.634	1	-	-	
<i>Sc cerevisiae x Sc uvarum</i>	8.72	12	1.415	-	0.125	-	-	-	-	-	2.326	0.733	-	-	-	0.754	-	-	-	1.228	-	0.335	8.723	4.47	6.666	1.163	1.007	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	24.4	11	17.67	-	11.5	8.925	16.88	24.39	8.611	-	22.27	0.151	1.272	-	8.569	-	-	-	-	-	0.168	-	-	-	-	-	-	
<i>Gluconobacter cerinus</i>	8.98	11	0.258	0.695	8.984	0.837	-	-	-	-	0.868	0.333	-	-	0.207	-	-	2.783	1.173	0.261	-	-	-	-	-	0.363	-	
<i>Pichia membranifaciens</i>	1.06	10	-	0.416	-	0.479	0.456	0.435	-	-	0.551	1.06	-	-	-	-	-	0.541	0.812	-	-	-	-	0.938	0.358	-	-	
<i>Liquorilactobacillus sp. UCMA</i>	30.9	10	0.895	0.767	-	-	0.587	-	-	-	5.009	1.959	-	-	0.374	-	0.846	-	0.958	-	18.75	30.91	-	-	-	-	-	
<i>Oenococcus kitaharae</i>	45.8	10	4.039	-	1.367	-	-	2.818	7.404	45.84	0.421	8.718	-	-	3.682	-	-	9.115	-	-	1.341	-	-	-	-	-	-	
<i>Brettanomyces anomalus</i>	9.27	10	0.63	-	-	0.204	-	4.991	-	0.641	0.375	-	-	-	-	0.665	-	-	0.992	2.729	-	-	-	-	-	9.267	8.89	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7.84	10	2.987	-	6.637	0.455	7.841	-	6.487	0.725	0.157	-	-	-	-	0.249	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.914	0.943	
<i>Lentilactobacillus diolivorans</i>	13.2	9	0.231	-	-	-	-	9.866	7.595	13.23	-	0.426	1.471	-	1.187	-	2.596	-	0.611	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Zymomonas mobilis</i>	93.4	7	7.46	-	-	-	-	-	-	-	0.287	0.313	13.06	93.39	57.33	51.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	4.34	7	-	0.332	0.345	-	-	-	-	-	-	-	0.935	-	0.408	0.265	-	-	0.5	-	4.338	-	-	-	-	-	-	
<i>Zygotulasporea florentina</i>	1.83	7	1.829	-	-	-	-	-	-	-	1.091	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.085	0.978	1.064	1.53	1.253		
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>	40.3	6	0.154	1.141	-	-	-	-	-	-	0.785	40.26	-	-	6.92	-	0.377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Liquorilactobacillus satsumensis</i>	10.3	6	-	-	-	-	-	0.49	-	-	1.83	3.05	2.201	-	10.33	1.206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pichia fermentans</i>	1.06	5	-	-	-	-	-	-	-	-	0.551	1.06	-	-	-	-	-	-	0.812	-	-	-	-	0.938	0.358	-	-	
<i>Liquorilactobacillus hordei</i>	13.3	5	-	-	8.095	-	-	-	13.31	-	-	-	1.408	-	0.674	-	-	-	-	1.033	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bifidobacterium fermentum</i>	2.41	4	-	-	-	-	-	-	-	-	2.409	-	1.545	-	0.719	-	1.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Gluconobacter kondonii</i>	2.41	4	0.211	-	0.473	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.409	-	-	-	-	0.512	-	-	-	
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	1.04	4	-	-	-	-	0.437	-	-	-	-	-	-	0.473	-	-	-	-	0.86	-	1.036	-	-	-	-	-	-	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.9	4	-	-	0.219	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.904	-	0.218	-	-	-	0.755	-	-	-	
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	0.66	4	-	-	-	0.204	-	-	-	0.641	0.375	-	-	-	-	0.665	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	19.5	3	-	-	1.526	19.49	-	-	-	-	-	-	0.449	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Lentilactobacillus sp.</i>	4.05	3	0.184	-	-	-	-	4.051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.039	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	2.94	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.935	-	0.234	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.323	
<i>Acetobacter syzygii</i>	2.36	3	-	-	-	0.317	-	-	-	-	-	-	-	-	0.163	-	2.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Levures

Bactéries lactiques

Bactéries acétiques

Zymomonas

Bifidobacterium

Levures
Bactéries lactiques
Bactéries acétiques
Zymomonas
Bifidobacterium

Tableau 1. Composition de 25 échantillons de kéfir de fruit par métagénomique. Les espèces détectées sont indiquées dans la colonne de gauche et colorées selon leur appartenance au groupe indiqué dans le médaillon à droite (levures, bactéries lactiques, bactéries acétiques, Bifidobacterium et Zymomonas). Le pourcentage de reads correspondant à chaque espèce est indiqué pour chaque échantillon dans les colonnes correspondantes. Une coloration d'intensité variable indique visuellement l'abondance relative correspondante. L'abondance maximale et le nombre d'échantillons où chaque espèce a été détectée sont indiqués dans les colonnes 2 et 3.

En moyenne, chaque kéfir contient environ 13 micro-organismes, dont 8 détectés à plus de 1 %, et 4 à plus de 5 %. Au-delà de cet inventaire, on peut constater que la composition des échantillons est très variable. Un regroupement par une analyse de clustering hiérarchique Ward basée sur les distances Bray-Curtis propose des groupes présentant des tendances de bactéries dominantes. Cependant, aucun groupe ne présente une composition spécifique. En d'autres termes, tous les groupes partagent 5 à 10 espèces minimum, et en particulier les espèces les plus fréquentes telles que *S. cerevisiae*, *L. paracasei*, *L. hilgardii*...

À partir des séquençages métagénomiques, il est possible de reconstituer les génomes et d'en étudier la variabilité nucléotidique. Cette étude a été menée sur les espèces les plus représentées pour déterminer la proximité génétique de leurs souches, et dans quelle mesure celle-ci permettait de supposer une origine proche (monophylogénétique), ou au contraire de montrer qu'elles sont représentatives de variabilité au sein de l'espèce. Les génomes de bactéries que nous avons isolées du kéfir de fruit, ainsi que l'ensemble des MAGs et génomes disponibles au NCBI ont été inclus dans cette analyse. Il en ressort clairement que les MAGs/génomes de certaines espèces de bactéries lactiques présentent une très faible divergence nucléotidique au sein des échantillons de kéfir de fruit comparés à ceux d'autres origines. Par exemple, la plupart des MAGs/génomes de *L. paracasei* des kéfirs de fruits sont monophylogénétiques et se détachent clairement de l'ensemble des autres souches isolées d'autres sources (aliments, végétaux, animaux...) (**Figure 1A**). Cette donnée suggère leur descendance à partir d'une même souche. Par contre, la même étude menée sur *S. cerevisiae* met en évidence une importante diversité génétique entre les levures, en particulier par la présence de trois groupes se rattachant respectivement aux levures isolées du vin, du rhum et de panification (**Figure 1B**). Enfin, y compris à sein de chaque groupe, les souches présentent une forte divergence nucléotidique, certaines étant des hybrides par exemple. Ce type d'analyse étendue aux autres espèces présentes dans les kéfirs de fruit montre que certaines bactéries lactiques telles *L. nagelii*, *L. hilgardii*, *L. satsumensis*, *L. diolivorans* présentent des profils monophylogénétique indiquant une descendance proche d'un ancêtre commun contrairement aux levures et aux bactéries acétiques. Ainsi, certaines souches de bactéries lactiques auraient un rôle particulier dans le métabolisme des grains de kéfir alors que pour les autres espèces, il y aurait moins de spécificité dans leur rôle, et donc moins de contrainte sur leurs origines.

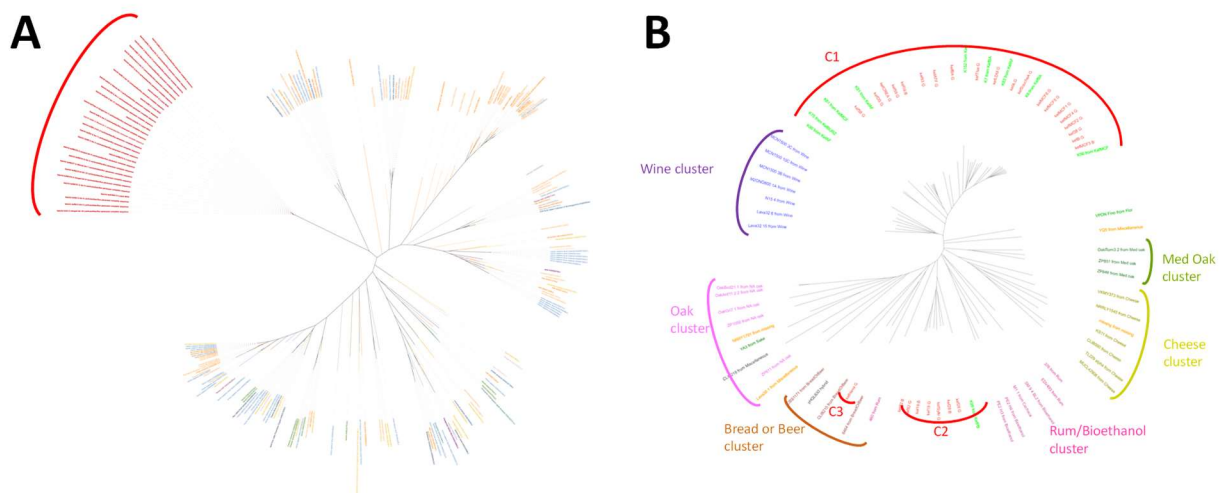


Figure 1. Arbre présentant les divergences de séquence de *L. paracasei* (A) et *S. cerevisiae* (B) dans les kéfirs de fruit et d'autres milieu où elles ont été isolées. Le libellé des souches a été coloré en fonction des biotopes d'origine des souches. *L. paracasei*, rouge kéfir de fruit, autres couleurs produits laitiers, plantes, divers aliments fermentés, homme... ; *S. cerevisiae*, en rouge et vert clair, respectivement, MAGs et génomes de kéfir de fruit, autre couleur, vin, chêne, bière fromage rhum...

Pour mieux comprendre le fonctionnement et l'évolution des grains de kéfir, nous avons réalisé une analyse de son organisation spatiale par microscopie confocale à balayage laser. La **Figure 2** présente une image représentative de la surface d'un grain avec des bactéries colorées en vert et les levures en rouge par des marqueurs fluorescents. La superposition des deux images montre une très forte densité bactérienne au niveau la surface du grain et dans une moindre mesure dans les espaces interstitiels et l'intérieur du grain. Par contre, les levures semblent seulement adhérer à la surface sans être enveloppées par le polysaccharide. Cette étude spatiale montre donc que certaines bactéries sont intimement liées au grain, probablement en produisant le polysaccharide, alors que les levures ne seraient liées au grain que par des interactions plus superficielles. Enfin, cette répartition spatiale permet une structuration de la communauté facilitant des échanges métaboliques grâce à la proximité entre les levures et les bactéries du grain.

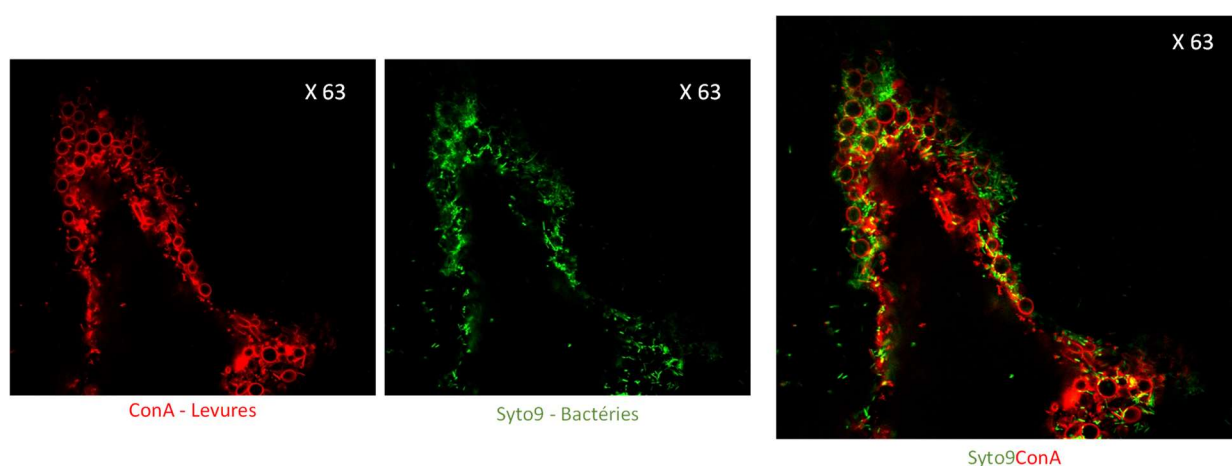


Figure 2. photo prise avec un microscope confocale à balayage laser d'une partie de grain de kéfir. Les levures ont été colorées en rouge avec la cocanavaline A (image de gauche) et les bactéries en vert avec le Syto 9 (image du centre); A droite la superposition des 2 colorations permet de voir la place respective des bactéries dans le grain et des levures à sa surface.

Des bactéries lactiques de kéfir de fruit produisant un polysaccharide à partir du saccharose ont été isolées. Elles appartiennent principalement aux espèces *Li satsumensis*, *Li. sp. UCMA*, *Li hordeij*, *Le hilgardii*, *Le. diolivorans* et *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Cependant, alors que des souches des genre *Liquorilactobacillus* et *Lentilactobacillus* produisent un polysaccharide épais et rigide semblable à celui du grain, les *Leuconostoc* produisent un polysaccharide visqueux et soluble suggérant que ce dernier n'est pas impliqué dans la structure du grain. Le polysaccharide de *Li. satsumensis* FME106 a été caractérisé plus en détail. Des images de microscopie électronique montre la structure que forme ce polysaccharide autour de la cellule bactérienne en présence de saccharose (**Figure 3A et B**). Il apparaît clairement une gangue qui se forme autour de la cellule. Des mutants incapables de produire des grains ont été isolés avec un crible original en gélose molle. De manière surprenante, ces mutants produisent encore des quantités importantes de polysaccharide, mais ces polysaccharides ne permettent pas la formation d'un grain, ni ne forment de gangue autour de la cellule (**Figure 3C**). L'analyse du génome de *Li. satsumensis* révèle la présence de 4 gènes avec des motif GH70, caractéristique des dextranases indiquant que cette bactérie produit au moins 2 dextranases dont une est responsable de la texture des grains de la souche sauvage alors que l'autre de la production d'un polysaccharide soluble (Figure 3). L'analyse des mutants montre qu'ils sont tous mutés au niveau du gène de Gtf1 à différents endroits. La formation d'un grain est donc due à des enzymes de la famille GH70 qui ont des propriétés spécifiques permettant de produire un polysaccharide « granulant ». Les

polysaccharide de FME106 ainsi que ceux produits par les autres espèces de bactéries lactiques granulaires est en cours de caractérisation.

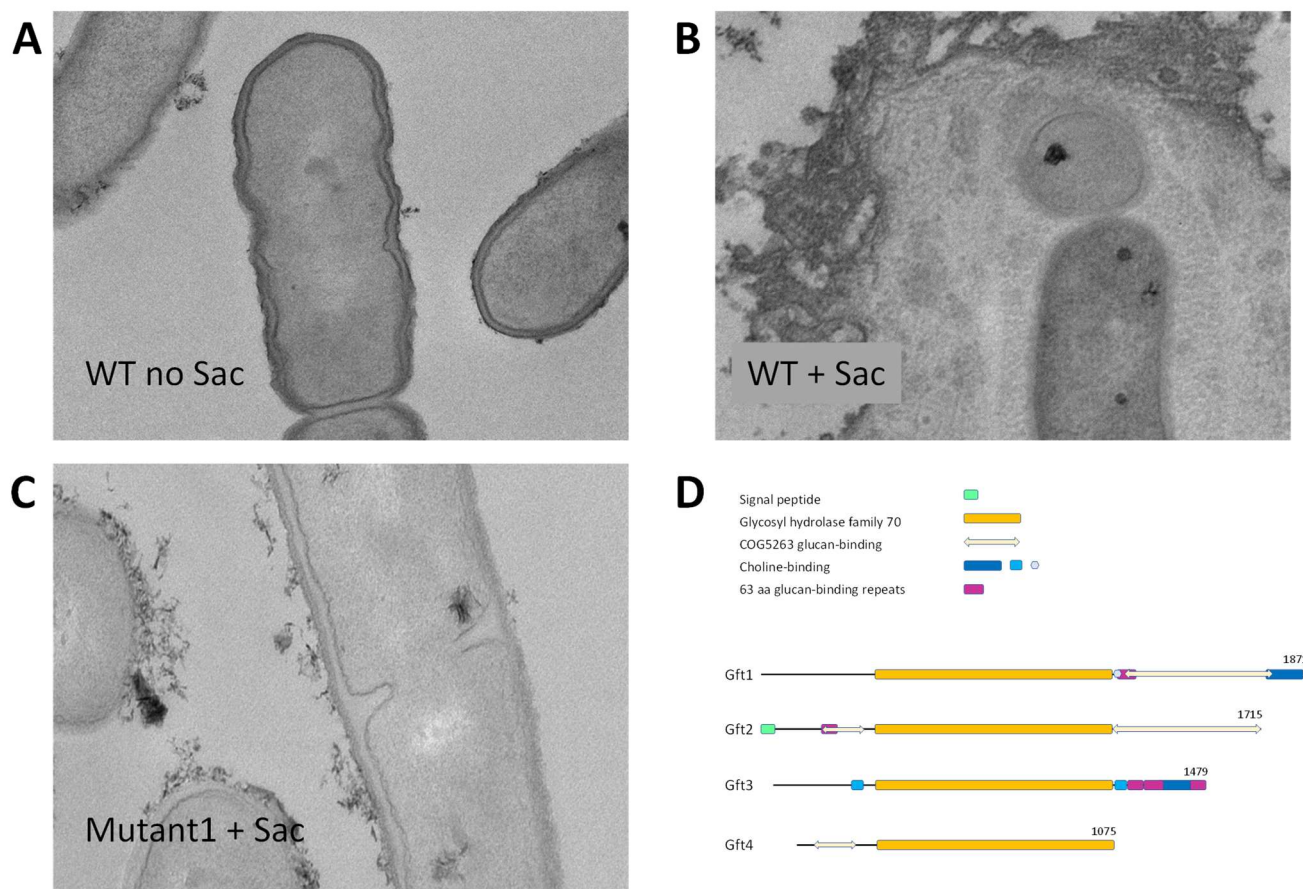


Figure 3. *Li. satsumensis* polysaccharides et glycosyltransférases. Image par microscopie électronique à transmission de cellules de *Li. satsumensis* FME106 productrice de grain en absence (A) et en présence de saccharose (B), et d'un mutant ne formant plus de grain en présence de saccharose (C). Schéma fonctionnel des 4 glycosyltransférases de *Li. satsumensis* montrant les différents domaines de ces protéines (D).

Conclusion

Prises dans leur ensemble, ces données indiquent que les kéfirs de fruit étudiés à ce jour par des études métagénomiques partagent des caractéristiques indiquant leur évolution à partir d'un premier levain « unique ». En effet, tout d'abord, ils contiennent tous des souches de plusieurs espèces de bactéries lactiques dont les génomes présentent des caractéristiques indiquant leur évolution à partir d'ancêtres communs. Ces bactéries formeraient un ensemble structurant avec un polysaccharide autour duquel d'autres micro-organismes vont se développer. Tout d'abord les levures qui semblent avoir une affinité particulière pour adhérer à ces polysaccharides et qui développent probablement des interactions trophiques avec les bactéries lactiques. Cet écosystème contient également des bactéries acétiques dont le rôle reste à déterminer. Levures comme bactéries acétiques ne partagent pas de proximité génétique indiquant une origine unique. L'origine des autres espèces de micro-organismes moins fréquents, dont des bactéries lactiques et les *Bifidobacterium* et *Zymomonas* reste à mieux évaluer. Les propriétés particulières de croissance et de production des différents grains de kéfir

s'expliqueraient donc par, d'un côté les variations de ces espèces périphériques, en particulier des levures, et de l'autre par les variations des proportions de l'ensemble des différentes espèces dans les communautés « grain-boisson ».

Références

- Lynch KM, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Int J Food Microbiol.* 2021;345:109128. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128
- de Souza HF, Monteiro GF, Bogáz LT, *et al.* Bibliometric analysis of water kefir and milk kefir in probiotic foods from 2013 to 2022: A critical review of recent applications and prospects. *Food Res Int.* 2024;175:113716. doi:10.1016/j.foodres.2023.113716
- Breselge S, Skibinska I, Yin X, Brennan L, Kilcawley K, Cotter PD. The core microbiomes and associated metabolic potential of water kefir as revealed by pan multi-omics. *Commun Biol.* 2025;8(1):415. Published 2025 Mar 11. doi:10.1038/s42003-025-07808-3