



**HAL**  
open science

# Diversités moléculaire et phénotypique de souches autochtones oenologiques de *Saccharomyces cerevisiae* isolées au Liban.

Marie-José Ayoub

► **To cite this version:**

Marie-José Ayoub. Diversités moléculaire et phénotypique de souches autochtones oenologiques de *Saccharomyces cerevisiae* isolées au Liban.. Biologie cellulaire. Institut national agronomique paris-grignon - INA P-G, 2006. Français. NNT: . tel-00136103

**HAL Id: tel-00136103**

**<https://theses.hal.science/tel-00136103>**

Submitted on 12 Mar 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON



Ecole Doctorale ABIES

Microbiologie et Génétique Moléculaire

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Microbiologie et Génétique Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Marie-José AYOUB

le 22 Décembre 2006

Diversités moléculaire et phénotypique de souches  
autochtones oenologiques de *Saccharomyces cerevisiae*  
isolées au Liban.

Molecular and phenotypical diversities of autochthonous  
oenological *Saccharomyces cerevisiae* strains from Lebanon.

Directeur de thèse : Prof. Claude GAILLARDIN

Jury

Prof. Michel AIGLE : Rapporteur

Dr. Sylvie DEQUIN : Rapporteur

Dr. Rachad SALIBA : Examineur

Dr. Jean-Luc LEGRAS : Examineur

Prof. Claude GAILLARDIN : Examineur

*A Downia et Michel...*

*... Angèle*

*...et mon pays*

## Remerciements

Dans le noir si propice au voyage, l'autre soir, des souvenirs "grignonais" se sont bousculés dans ma mémoire. Dilués par les soucis de tous les jours, ils ont soudain ressurgi pour me rappeler qu'il y a des endroits qu'on habite et qu'on oublie aussitôt, et qu'il y a des endroits qui vous habitent...

... "Vous vous plairez à Grignon... si vous n'êtes pas allergique à la campagne et aux lapins" ... C'est ce que me disait mon prof avant mon premier séjour pour me préparer à ce qui m'attendait à Grignon !

Je me suis effectivement plu à Grignon et je garde le premier souvenir du premier sourire... dans l'ancien internat, tellement ancien qu'à l'entrée de ma chambre un "vive la promo 1932" m'accueillait... et je garde le souvenir de tous les autres rires qui ont suivi... Je me suis plu à Grignon car il y a eu le bassin des anglais, les ballades dans la forêt (et les quelques rares courses à pied !), la pelouse du château, Mars lisse comme une bille (qu'est ce qu'ils en savent les scientifiques pour dire que Mars est truffé de cratères !?), la cantine, le Kvo, la salle commune et les soirées à thème, les pom-pom girls, la cuisine et les rencontres faites à la cuisine, les fameux mails communs (dont le poids devait sûrement se faire ressentir chez Duong), les soirées tardives au labo, les soirées dans les chambres des amis, mes chambres, mes départs, la R5 de Rana, les escapades à Saint-Germain, la salle de photo, la salle de musique découverte comme un trésor caché, la cave de Noé peuplée de rats imaginaires et même Pizza Pai et Auchan !

Je me suis plu à Grignon car après, il y avait le retour au Liban... et les rencontres extraordinaires que j'ai faites lors de mes prises d'échantillons qui m'ont aussi permis de mieux connaître mon pays, de mieux apprécier sa beauté et la chaleur et l'hospitalité des libanais. Je me rappelle par exemple de Bakhmios, au prénom dont je ne soupçonnais même pas l'existence à l'époque phénicienne, qui habitait en pleine forêt, gardé par deux grands chiens de chasse noirs et excités... ou de "Bouna" ou Père Francis avec sa longue barbe

blanche et son regard malicieux qui prenait un plaisir à me parler de son vin et que je prenais plaisir à écouter.

...et j'en passe, et j'en passe...

Mais il y a principalement les personnes que j'ai rencontrées durant ma thèse à Grignon ou au Liban et sans lesquelles je n'aurais pu accomplir ce travail. Il me tient à cœur de les remercier tout en m'excusant par avance, si j'omettrai quelqu'un par inadvertance.

Je remercie Claude Gaillardin, directeur de ma thèse, avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui a permis, grâce à ses précieux conseils et à son encadrement, de mener à bien cette thèse. Les discussions avec lui ont toujours été une source intarissable d'enrichissement. Mais au-delà de tout ce que j'ai appris à son contact, j'ai été touchée par ses profondes qualités humaines, son comportement toujours déférent et aimable...et son humour subtil qui rendait les rencontres toujours agréables !

Je tiens aussi à remercier Rachad Saliba, avec qui le cheminement a commencé bien avant la thèse et qui est devenu comme un second père pour moi. Son encadrement de la partie effectuée au Liban, son engagement auprès des stagiaires qui y ont contribué, ainsi que son soutien et ses encouragements incessants m'ont permis d'arriver au bout du chemin.

Merci à Jean-Luc Legras qui m'a accueillie dans son laboratoire de Colmar et qui n'a cessé depuis de me prodiguer des conseils, de me fournir de l'aide et des coups de main et sans qui des parties de la thèse n'auraient pu être effectuées.

J'exprime ma gratitude à Sylvie Dequin et à Michel Aigle qui ont accepté d'examiner mon manuscrit de thèse et de faire partie du jury de soutenance.

J'adresse aussi mes remerciements à toutes les personnes du laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaire de Grignon qui d'une manière ou d'une autre ont contribué au bon déroulement de cette thèse et plus particulièrement à la petite équipe qui m'a accueillie (et qui a supporté le travail au son de la (ma) musique !) et à l'équipe du secrétariat ainsi qu'à Françoise Irlinger du LGMPA pour m'avoir initiée à l'utilisation de Bionumerics et m'y avoir facilité l'accès. Je remercie tout particulièrement Vang Huu Nguyen qui m'a initiée

au typage des levures et avec qui j'ai toujours apprécié les discussions professionnelles et personnelles, ainsi que Chantal pour sa joie de vivre et les liens que nous avons tissés en parlant expos et pièces de théâtre, et bien sûr Noé dont je chéris l'amitié et que je voudrais assurer de la place qu'elle a et qu'elle aura toujours dans mon coeur. Merci aussi à Caroline qui a dû supporter les complications de la paperasse de mes voyages et de mes séjours.

Je remercie les directeurs successifs du laboratoire qui ont accepté de couvrir certaines charges financières relatives à ce travail et à mes séjours, Claude Gaillardin, Joseph Deutscher (que je remercie aussi...pour son "apparition" derrière la vitre de son bureau avec son large sourire venant du cœur un jour de grande fatigue !) et Jean-Marie Beckerich.

J'exprime ma reconnaissance à Yola Ghorra à qui je suis redevable, ainsi qu'à Michel Frem et Christo Hilan qui m'ont permis d'effectuer une partie de ce travail au sein du laboratoire de l'IRAL, et je remercie tout le personnel du laboratoire, particulièrement Rima, Dalal, Roula, Lena et Mohammed pour leur amitié ainsi que les stagiaires qui ont contribué à ce travail, Johnny et Rachelle.

Un merci aussi à l'AUF pour l'allocation de recherche octroyée et au CNRSL pour l'allocation accordée à la prise d'échantillons.

Solange la mésange (qui chante faux), Marie-JO (plus jamais !!), Marzé, MJ ou Zé ne pourrait ne pas remercier et embrasser tous les amis qu'elle a rencontrés à Grignon. Même si je me rends compte que je ne pourrai pas citer tous ceux qui m'ont marquée je sais que je ne pourrai pas oublier les bons moments qu'ils m'ont permis de vivre... Mais il y a spécialement Noémie Ze Bee, Samuel (ou PSP !), Carole, Hatym, Kenza, Karine, Chakib, Vincent, Delphine, Haythem, Naziha, Nedzad (et Maylice !), Laurent le Hareng, Zita, Laure, Szusza, Caroline, Athmane, Stéphane, Anne-So, Christelle...

Je n'oublie pas non plus les libanais qui ont envahi Grignon comme le disait Armêl et qui n'ont cessé de comploter mais que Colin arrivait à chaque fois à démasquer (tout en rappelant son intérêt pour les "chou" fleurs). Zazou et Roudy qui attendaient ma sortie tardive du labo pour enfin manger les dîners refroidis mais si bons, je vous remercie pour les kilos...et finalement ma "petite" sœur adoptive avec qui il me manque d'échanger jusque tard dans la nuit de nos choix de vies, de nos attentes, de nos peurs, de nos joies, de nos

chagrins...et avec qui il me manque de rigoler, de râler, de nous engueuler...et de constater que c'est bizarre de trouver des sœurs en âme aux caractères si similaires et si divergents par l'expérience unique de chacune...

Il y aussi les amis qui même de loin pour certains ont contribué à rendre mes séjours agréables, par une présence ou une parole. Fadia, Khouloud, Dany, Chadi, Naji, Dahlia, Grace et bien sûr Graziella qui a fait sien le souci de la thèse et qui m'a toujours assurée de son soutien, même au téléphone de l'autre bout de la planète.

Il y a Pierre, solide comme le roc, qui a toujours réussi à exorciser les démons qui ont accompagné les mauvais moments, malgré ses propres soucis. Merci pour le soutien moral, psychologique, affectif...merci pour tout...

La chanson dit "On ne choisit pas ses parents, on ne choisit pas sa famille"...mais si on le faisait, je n'aurais pu mieux choisir...Que dire à ceux qui m'ont épaulée à tous les niveaux, et sans qui je ne serai pas ici...Ce que j'écrirai ne suffira pas à exprimer ma reconnaissance (formule classique mais ô combien vraie)...Que dis-je ? Ce que j'écrirai ne suffira pas à exprimer mon amour...alors je me limite à un tout petit merci...à Dounia et Michel d'être mes parents, à Nakhlé et Ghazi d'être mes frères, à May aussi et à Angèle qui veille certainement toujours sur moi...

...Parce que j'aime la campagne et les lapins...et pour toutes les raisons que j'ai citées, je me suis plue à Grignon et je me demande comment je pourrai ne plus vivre à Grignon, ne plus sentir Grignon, ne plus haïr Grignon, ne plus aimer Grignon...

...Une part de moi restera à Grignon et avec les grignonais...

## Résumé

Nous avons exploré dans la présente étude la diversité de la flore fermentaire indigène libanaise de *Saccharomyces cerevisiae* en collectant des échantillons de moûts de raisins en cours de fermentations naturelles de diverses localités dispersées sur le territoire libanais. Une grande diversité moléculaire de la flore libanaise a été mise en évidence, que ce soit entre différentes localités géographiques, au sein des caves ou au sein des fermentations naturelles. En dépit de cette diversité, plusieurs cas de dominance et de pérennité de souches ont été observés dans les caves vinicoles où les fermentations semblent être conduites par des lignées de souches apparentées. Une telle parenté a aussi été observée dans des zones géographiques restreintes, mais plus la zone s'élargissait moins apparente était la parenté entre souches. La flore libanaise, en dépit de sa diversité, pourrait être dotée d'une certaine spécificité en comparaison aux autres flores vinicoles. L'influence du milieu de fermentation sur la parenté des isolats semble en outre plus importante que l'effet géographique.

Nous avons aussi évalué les méthodes moléculaires utilisées pour l'exploration de la diversité ; deux méthodes déjà mises au point auparavant (amplifications de séquences entre deux éléments delta et de loci microsattellites) et une nouvelle méthode que nous avons testé, le MLST. Les deux premières méthodes se sont avérées très utiles pour le typage vu la grande variabilité de leurs marqueurs et par conséquent leur grande capacité de discrimination. Par contre le schéma MLST a montré une capacité de discrimination inférieure à celle des deux autres méthodes. Il pourrait néanmoins être amélioré par l'utilisation de loci plus variables. Mais contrairement aux deux autres méthodes, le MLST est apparu plus utile pour l'inférence des relations phylogéniques, particulièrement pour les souches peu apparentées.

La diversité phénotypique accompagnant la diversité moléculaire a été examinée elle aussi en vue d'une potentielle sélection de souches et pour envisager son éventuelle congruence avec la diversité moléculaire. Les souches étudiées de *S. cerevisiae* ont présenté des capacités fermentaires différentes ce qui pourrait être exploité pour pousser la sélection entamée dans cette étude en vue de futures utilisations œnologiques, notamment dans l'industrie vinicole libanaise. La diversité phénotypique qui a accompagné la diversité moléculaire a montré une certaine congruence avec elle. Cette congruence a été particulièrement reliée à la production élevée d'acétaldéhyde de certains profils moléculaires et elle pourrait éventuellement aider à prédire la production d'acétaldéhyde pour certaines souches.

**Mots-clés :** *Saccharomyces cerevisiae*, flore fermentaire, diversité moléculaire, effet de la géographie, effet du milieu, typage, MLST, utilité des méthodes moléculaires, diversité physiologique, sélection de souches, congruence moléculaire/phénotypique.

## Abstract

We explored in this study the biodiversity of the fermenting indigenous Lebanese flora of *Saccharomyces cerevisiae* by collecting samples of natural fermentations of grape musts from various localities dispersed within the Lebanese territory. A great molecular diversity of the Lebanese flora was found in the natural fermentations, as well as in the wineries as a whole and between different geographic localities. However, cases of dominance and perenniality were also recorded in wineries. Besides, fermentations in the same wineries seemed to involve lineages of related strains. Relatedness of strains was also seen in narrow geographical areas while it was lost as the areas enlarged. Despite its diversity, the Lebanese flora could nevertheless be interrelated, which property was observed when this flora was compared to other oenological floras of diverse origins. Finally, it seemed that the effect of the thriving media was greater on the lineages of fermenting floras than the effect of the geographical distance.

We also evaluated the usefulness of the molecular typing methods used for assessing the biodiversity of the *S. cerevisiae* floras. Two of them, interdelta fingerprinting and microsatellites analysis, were previously developed, while we tested a new method, the MLST. The first two methods were very useful for typing due to the great variability of their markers and thus to their great discriminatory power, while MLST showed a lower discriminatory power. But our MLST scheme could probably be improved by using more variable loci. MLST was nonetheless more useful in inferring strains relatedness, especially for poorly related isolates.

We further examined the phenotypic diversity that accompanies the molecular one in order to initiate a selection scheme for some oenological strains and also to verify the correspondence between the molecular and the phenotypic diversity. The studied strains of *S. cerevisiae* presented different fermenting capacities which could be exploited to push further the selection scheme for potential commercial uses, in particular in the Lebanese winemaking industry. On the other hand, a certain congruence between the molecular and the phenotypic diversities was observed and it was mainly due to a correlation between high acetaldehyde productions and particular molecular profiles. If this path is studied further, this congruence might help predict acetaldehyde production for particular strains.

**Keywords :** *Saccharomyces cerevisiae*, fermenting flora, molecular diversity, geography effect, thriving media effect, typing, MLST, usefulness of molecular methods, phenotypic diversity, strains selection, molecular/phenotypic congruence.

# Table des matières

<b>Dédicace</b>	1
<b>Remerciements</b>	2
<b>Résumé</b>	6
<b>Abstract</b>	7
<b>Table des matières</b>	8
<b>Liste des tableaux</b>	13
<b>Liste des figures</b>	15
<b>Liste des annexes</b>	18
<b>Introduction</b>	19
<b>Chapitre I. Synthèse bibliographique</b>	25
I.1 Le Vin au Liban	26
I.1.1 Le vin dans la préhistoire	26
I.1.2 Le vin au Liban depuis l'antiquité	27
I.1.3 Diversité des situations géographiques et conditions favorables à la viticulture	28
I.1.3.1 Le climat	28
I.1.3.2 Le sol	30
I.1.4 La notion de terroir au Liban	31
I.1.5 Le Liban et la viticulture : Etat actuel du domaine en chiffres	31
I.1.5.1 Surface, encépagement et production de raisin	31
I.1.5.2 Production de vin et échange commercial	32
I.1.5.3 Les entreprises vinicoles	33
I.1.6 Transformations classiques et artisanales	34
I.1.7 Domaine vinicole en évolution et grandes possibilités d'exploitation encore offertes	35
I.1.7.1 Diversité du territoire à exploiter	35
I.1.7.2 Vignoble à développer, encépagement à cibler, variétés locales à tester	36
I.1.7.3 Production et consommation du vin en progression	37
I.1.7.4 Raisons de l'investissement dans le domaine vinicole	38
I.1.7.5 Organisation du domaine et protection des appellations et des origines	38

I.2. Les levures et le vin	40
I.2.1 Le vin et la fermentation alcoolique	40
I.2.2 Facteurs qui affectent la production des vins	40
I.2.3 Rôles des levures	41
I.2.4 Ecologie des moûts et contribution des différentes espèces	42
I.2.5 Facteurs influençant la diversité des espèces	44
I.2.6 Intervention des non- <i>Saccharomyces</i> dans les fermentations	44
I.2.7 Sources des levures indigènes	46
I.2.8 Origine de <i>S. cerevisiae</i>	47
I.2.9 Evolution adaptative de <i>S. cerevisiae</i>	47
I.3. Les méthodes d'identification et de typage des levures vinicoles	49
I.3.1 L'identification des levures	49
I.3.2 Le typage des levures	51
I.3.2.1 Polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN mitochondrial	52
I.3.2.2 Analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé	55
I.3.2.3 Amplification par PCR des séquences entre deux LTR delta	57
I.3.2.4 Typage par des marqueurs Microsatellites	59
I.3.2.5 MLST, Multi Locus Sequence Typing	60
I.4. Diversité interspécifique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
I.4.1 Diversité moléculaire	62
I.4.1.1 Diversité au sein d'une même fermentation	62
I.4.1.2 Dominance, minorité dans les fermentations	63
I.4.1.3 Facteurs influençant la diversité des souches dans les fermentations	64
I.4.1.4 Stabilité dans les caves	65
I.4.1.5 Diversité des flores à l'échelle de régions	66
I.4.1.6 Des souches en relation avec des terroirs ?	67
I.4.2 Plasticité transcriptionnelle et diversité des profils d'expression	68
I.4.3 Diversité physiologique des souches de <i>S. cerevisiae</i>	69
I.4.4 Relation entre la diversité phénotypique et la diversité moléculaire	71
I.5. Applications industrielles	73
I.5.1 Sélection de souches	73
I.5.2 Types de levures sélectionnées	74
I.5.3 Schémas de sélection	75

<b>Chapitre II. Première Publication</b>	77
<b>Addressing the question of the Biodiversity of the native oenological Lebanese <i>Saccharomyces cerevisiae</i> flora</b>	
Abstract	78
Introduction	78
Materials and methods	80
Strains and Isolation	80
Inter-Deltas Fingerprinting	81
Microsatellites analysis	81
Results	82
Diversity within the natural Lebanese oenological flora	82
Diversity of the oenological flora in fermenting vats	82
Stability of strains in wineries	83
Winery and geographic vicinity effects on strain relatedness	83
Comparison of Lebanese isolates with floras of diverse origins	84
Discussion	86
Acknowledgements	87
References	87
<b>Chapitre III. Deuxième Publication</b>	92
<b>Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous <i>Saccharomyces cerevisiae</i> wine yeasts from Lebanon</b>	
Abstract	93
Introduction	93
Materials and methods	94
Strains used in the study	94
Choice of loci and primers	94
Amplification conditions and sequencing	94
Sequence and data analysis	96
Interdelta and microsatellite fingerprinting	96
Results	97
Genetic diversity	97
Little variation is observed in the Lebanese strains	97
Clustering reveals a divergence of the Asian strains	98
Contribution of loci to discrimination	98

Congruence with interdelta and microsatellite analysis	98
Discussion	101
Acknowledgements	102
References	102
<b>Chapitre IV. Utilité des trois méthodes moléculaires pour le typage et la construction phylogénique</b>	106
IV.1 Introduction	107
IV.2 Jumelage des trois méthodes moléculaires	107
IV.2.1 Correspondances avec les conclusions obtenues selon les méthodes individuelles	108
IV.2.2 Souches commerciales et flore indigène	108
IV.3 Utilisation des méthodes individuelles pour la construction phylogénique : comparaison entre elles et avec le jumelage	110
IV.3.1 Les souches très apparentées	110
IV.3.2 Les souches modérément apparentées	110
IV.3.3 Les souches peu ou pas apparentées	112
IV.4 Utilisation des méthodes individuelles pour le typage	112
IV.4.1 Interdeltas et Micorsatellites	112
IV.4.2 MLST	113
IV.5 Considérations pratiques de l'utilisation des méthodes moléculaires individuelles	114
IV.5.1 L'amplification interdelta	114
IV.5.2 L'analyse des répétitions microsatellites	115
IV.5.3 MLST ou Multi-Locus Séquence Typing	115
IV.6 Combinaisons binaires des méthodes	116
<b>Chapitre V. Diversité physiologique vs diversité moléculaire</b>	118
V.1 Introduction	119
V.2 Matériel et Méthodes	120
V.2.1 Choix des souches	120
V.2.2 Fermentations	120
V.2.2.1 Milieu de fermentation	120
V.2.2.2 Conduite des fermentations	121
V.2.3 Analyses chimiques des moûts fermentés	121
V.2.3.1 Analyse des sucres	121
V.2.3.2 Analyse de l'éthanol	122
V.2.3.3 Analyse de certains composés aromatiques	122

V.2.3.4 Analyse du glycérol	123
V.2.4 Caractérisation poussée de quelques souches	123
V.2.4.1 Souches concernées	123
V.2.4.2 Tests de résistance à l'éthanol	124
V.2.4.3 Tests de production de H <sub>2</sub> S	124
V.2.5 Analyses des résultats	124
V.3 Résultats	125
V.3.1 Comparaison des 24 souches selon les paramètres fermentaires	125
V.3.2 Distribution des 17 souches selon les paramètres fermentaires, en vue d'une sélection	126
V.3.3 Classifications des 24 souches selon les paramètres moléculaires	129
V.3.4 Classifications des 24 souches selon les paramètres fermentaires	130
V.3.5 Correspondance entre la classification moléculaire et la production d'acétaldéhyde	132
V.3.6 Contributions des marqueurs moléculaires à la classification	133
V.4 Discussion	134
<b>Conclusion</b>	142
<b>Bibliographie</b>	148
<b>Annexes</b>	175

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Résultats des analyses interdeltas pour 10 caves durant plusieurs années
<b>Tableau 2</b>	Isolats non-libanais utilisés dans l'analyse interdelta
<b>Tableau 3a</b>	Isolats libanais inclus dans la comparaison par microsatellites avec les isolats non-libanais
<b>Tableau 3b</b>	Distribution des isolats non-libanais selon le pays d'origine et le site de production
<b>Tableau 4</b>	Isolats identiques selon l'analyse interdelta en provenance des mêmes cuves en fermentation ou de différentes cuves d'une même cave
<b>Tableau 5</b>	Origine des isolats utilisés dans l'analyse MLST
<b>Tableau 6</b>	Amorces et amplifias retenus pour l'étude MLST
<b>Tableau 7</b>	Diversité de séquence
<b>Tableau 8</b>	Résultats obtenus avec le schéma MLST
<b>Tableau 9</b>	Caractéristiques méthodologiques de l'utilisation individuelle des méthodes moléculaires
<b>Tableau 10</b>	Considérations pratiques lors de l'application des méthodes moléculaires
<b>Tableau 11</b>	Caractéristiques méthodologiques des combinaisons binaires des méthodes moléculaires
<b>Tableau 12</b>	Souches utilisées dans l'étude
<b>Tableau 13</b>	Analyse de variance de l'effet de la souche sur les paramètres fermentaires
<b>Tableau 14</b>	Résultats fermentaires pour la totalité des souches
<b>Tableau 14 (suite)</b>	Moyennes des résultats obtenus avec la totalité des souches
<b>Tableau 15</b>	Matrice de corrélation entre les différents paramètres fermentaires selon le coefficient de Pearson

**Tableaux 16** Résultats associés à l'ACP avec rotation varimax effectuée selon les paramètres fermentaires et les 17 souches destinées à la sélection

**Tableau 16a** Contributions des variables (%) après rotation Varimax

**Tableau 16b** Coordonnées des variables après rotation Varimax

**Tableau 16c** Contributions des individus (%) après rotation Varimax

**Tableau 16d** Coordonnées des individus après rotation Varimax

**Tableaux 17** Analyse ACP selon les marqueurs moléculaires

**Tableau 17a** Valeurs propres et participation des axes à la variabilité de l'analyse ACP selon les marqueurs moléculaires

**Tableau 17b** Coordonnées des individus selon les axes F1, F2, F4 et F6

**Tableau 17c** Contributions des individus (%) aux axes F1, F2, F4 et F6

**Tableaux 18** ACP avec les 24 souches selon les paramètres fermentaires

**Tableau 18a** Contributions des variables (%)

**Tableau 18b** Coordonnées des variables (%)

**Tableau 18c** Contributions des individus (%)

**Tableau 18d** Coordonnées des individus (%)

**Tableaux 19** ACP avec rotation varimax pour l'ensemble des souches et selon les paramètres fermentaires

**Tableau 19a** Contributions des variables (%) après rotation Varimax

**Tableau 19b** Coordonnées des variables après rotation Varimax

**Tableau 19c** Contributions des individus (%) après rotation Varimax

**Tableau 19d** Coordonnées des individus après rotation Varimax

**Tableau 20** Positions des différents loci dans lesquels les marqueurs ont été analysés dans le génome de *S. cerevisiae* (S288C)

## Liste des figures

- Figure 1** Distribution actuelle de la vigne eurasienne sauvage *Vitis vinifera sylvestris* dans l'ancien Proche Orient et l'Égypte
- Figure 2** Carte topographique du Liban
- Figure 3** Adéquation du territoire libanais pour la viticulture
- Figure 4** Les variétés locales Merweih (en haut) et Obeidy (en bas) utilisées dans les vinifications traditionnelles et adéquates pour la production de vin blanc
- Figure 5** Croissance de *S. cerevisiae* et des non-*Saccharomyces* durant la fermentation spontanée du moût Garnatxa
- Figure 6** Influence des deux principales espèces non-*Saccharomyces* trouvées en début de vinification sur la composition des vins en comparaison avec *S. cerevisiae*
- Figure 7** Représentation de la translocation réciproque entre les chromosomes VIII et XVI observée chez les souches vinicoles
- Figure 8** Structure de l'ADN ribosomique
- Figure 9** Différence dans la discrimination des deux enzymes *HinfI* et *RsaI* utilisées pour la RFLP de l'ADNmt
- Figure 10** Apparition de traînées dans les profils d'ADNmt qui peuvent compliquer l'analyse et restreindre la zone analysable
- Figure 11** Systèmes d'électrophorèse en champ pulsé pour la séparation des chromosomes
- Figure 12** Mécanismes d'apparition des polymorphismes de longueur des chromosomes
- Figure 13** Organisation des éléments Ty de *S. cerevisiae*
- Figure 14** Apparition de LTRs solos
- Figure 15** Amplifications par PCR des régions entre deux éléments delta
- Figure 16** Altération du nombre de séquences répétées simples par glissement de l'ADN polymérase

- Figure 17** Distribution des souches de *S. cerevisiae* dans plusieurs cuves d'une même cave durant les années 1989 (4 cuves) et 1990 (1 cuve) à trois stades de la fermentation alcoolique : début, milieu et fin
- Figure 18** Distribution géographique des souches de *S. cerevisiae* à plusieurs endroits dans la région vinicole de Charentes et ses sous-localités Grande Champagne, Petite Champagne, Borderies, Fins Bois et Bons Bois
- Figure 19** Structuration de souches vinicoles selon leur origine géographique
- Figure 20** Variabilité de la production de métabolites par 52 souches de *S. cerevisiae* durant la vinification d'un moût d'Aglianico
- Figure 21** Variabilité de la formation de métabolites par 20 souches de *S. cerevisiae* sur sept moûts différents
- Figure 22** Différences sensorielles entre des vins de Riesling (a) et de Chardonnay (b) selon les levures responsables de la fermentation
- Figure 23** Etapes de la sélection d'une souche de levure pour l'élaboration de Beaujolais-Village et des crus du Beaujolais
- Figure 24** Points d'échantillonnage sur le territoire libanais
- Figure 25** Classification interdelta des 232 isolats libanais et des 19 isolats non-libanais
- Figure 26** Diversité de la flore oenologique libanaise dans les caves, accompagnée d'une dominance et d'une pérennité de certains isolats
- Figure 27** Comparaison entre les isolats de la cave A et M et entre les isolats de la cave B et des 3 caves du village WK
- Figure 28** Classification selon les analyses des microsattellites des 88 isolats libanais et des isolats non-libanais
- Figure 29** Classification selon le schéma MLST des différents profils alléliques obtenus (AP) en utilisant la méthode de Neighbor Joining
- Figure 30** Classification selon les interdeltas des 84 souches étudiées selon le Neighbor Joining
- Figure 31** Classification selon les microsattellites des 84 souches étudiées selon le Neighbor Joining
- Figure 32** Classification des souches selon l'ensemble des marqueurs des trois méthodes moléculaires
- Figure 33** Classification des souches selon l'ensemble des paramètres moléculaires en remplaçant le nom des souches par le type de vin d'où elles ont été isolées
- Figure 34** Classification des souches selon l'ensemble des paramètres moléculaires en remplaçant le nom des souches par le code de l'échantillon d'où elles ont été isolées
- Figure 35** Combinaisons binaires des méthodes moléculaires : de gauche à droite : Interdelta / Microsattellites, Interdelta / MLST et Microsattellites / MLST
- Figure 36** Classification jumelée des souches caractérisées par les trois méthodes

moléculaires. Les différentes couleurs correspondent aux clusters décrits dans le texte et définis dans la figure 5

- Figure 37** Exemples de l'estimation de la variation du degré Brix corrigé au cours des fermentations
- Figure 38** Distribution des souches destinées à la sélection, dans l'espace constitué par les paramètres fermentaires, après rotation varimax
- Figure 39** Classification Ascendante Hiérarchique des 24 souches étudiées compte tenu de l'ensemble des marqueurs des trois méthodes moléculaires (méthode d'agrégation de Neighbor-Joining)
- Figure 40** Distribution des souches en ACP tenant compte de l'ensemble des marqueurs des trois méthodes moléculaires
- Figure 41** Classification ascendante hiérarchique des souches selon l'ensemble des paramètres technologiques, agrégation par la méthode du lien moyen
- Figure 42** Distribution des souches en ACP selon l'ensemble des paramètres technologiques
- Figure 43** Distribution des souches selon l'ensemble des paramètres technologiques après ACP avec rotation varimax
- Figure 44** Distribution des souches selon le plan (F1, F2) de l'analyse ACP avec rotation varimax en prenant en compte l'ensemble des marqueurs des trois méthodes moléculaires
- Figure 45** Classification Ascendante Hiérarchique des 24 souches étudiées compte tenu de l'ensemble des marqueurs MLST et Microsatellites (méthode d'agrégation de Neighbor-Joining)
- Figure 46** Voie de la fermentation du glucose chez *S. cerevisiae* : les différents gènes impliqués

## Liste des annexes

- Annexe 1** Résultats des amplifications interdeltas, transformés en données binaires, pour les 82 souches caractérisées par les trois méthodes moléculaires
- Annexe 2** Résultats MLST, transformés en données binaires, pour les 82 souches caractérisées par les trois méthodes moléculaires
- Annexe 3** Résultats microsattellites, transformés en données binaires, pour les 82 souches caractérisées par les trois méthodes moléculaires
- Annexe 4** Corrélations entre les paramètres fermentaires et les marqueurs moléculaires expliquant les axes F1 et F2
- Annexe 5** Résultats des fermentations individuelles

# **Introduction**

Nous proposons dans la présente étude d'explorer la diversité de la flore fermentaire indigène de *Saccharomyces cerevisiae* sur le territoire libanais. Nous exposons dans ce qui suit le projet entamé tout en soulignant quelques points principaux qui seront développés ultérieurement.

La pratique de l'inoculation est encore limitée au Liban puisqu'elle est reliée à l'implantation des industries vinicoles qui se concentrent principalement dans la région de la Bekaa. Malgré le développement actuel de quelques industries dans d'autres régions, le nombre des entreprises reste limité et par conséquent aussi l'utilisation de levures commerciales, ce qui devrait avoir préservé la flore locale d'une possible "contamination" par des souches non indigènes. De plus, la pratique de la vinification, très ancienne au Liban, se perpétue toujours et elle est encore très répandue dans les foyers libanais. Les vinifications faites à cette échelle sont généralement menées par la flore naturelle sans inoculation de souches commerciales pré-sélectionnées. Ces facteurs font du Liban un terrain favorable pour l'étude de la biodiversité naturelle de la flore fermentaire à petite et à grande échelle, et pour la préservation de cette diversité. Cette étude a aussi un intérêt pratique pour les industriels qui pourront profiter de la constitution d'une banque de levains indigènes. Cette banque (constituée de près de 600 isolats) est un réservoir de diversité d'où on pourrait puiser des souches à utiliser dans l'inoculation des fermentations, en parallèle, ou en remplacement des levains actuellement utilisés et qui ont été sélectionnés dans d'autres parties du monde. Il serait d'autant plus intéressant d'avoir recours à l'utilisation de levures indigènes si l'existence de souches de terroirs était mise en évidence et surtout s'il se confirmait que ces souches sont plus adaptées à conduire les fermentations des régions d'où elles ont été sélectionnées ou qu'elles pourraient conférer aux vins produits une certaine particularité comme le proposent Lema *et al* (1996) ou Martini (2003). Une contribution des levures à une typicité des vins libanais ne serait que favorable pour un domaine vinicole en développement et en recherche de plus d'expansion.

Pour mieux cerner le travail que nous avons entrepris et avant de rentrer dans ses détails, nous avons développé dans le Chapitre I quelques thèmes s'y rapportant plus ou moins directement, mais que nous avons jugé utile d'aborder pour donner une vision plus globale du sujet étudié.

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à savoir si les flores au sein des fermentations libanaises sont sujettes à autant de diversité que ce qui est généralement répertorié, et si là aussi des schémas de dominance et de minorité des souches existent. Nous avons pour cela isolé des levures de plusieurs cuves en cours de fermentation naturelle à partir de caves situées dans plusieurs régions libanaises.

Nous avons ensuite exploré la possible existence d'une implantation de souches dans les caves vinicoles comme il a été suggéré dans plusieurs études antérieures (Martini *et al.*, 1996 ; Beltran *et al.*, 2002). Pour ce faire, des échantillons ont été pris dans les mêmes caves sur plus d'une année et les isolats des fermentations naturelles ont été à chaque fois étudiés pour voir s'il existe une flore résidente qui reste d'une année à l'autre et qui intervient dans les nouvelles fermentations.

L'étude a aussi été élargie pour inclure pratiquement toutes les régions libanaises où des fermentations naturelles sont conduites pour voir si la flore indigène est homogène à travers le territoire ou si elle est plutôt diverse selon les différentes régions étudiées. Pour cela un grand nombre de caves a été pris en compte, certaines plutôt proches géographiquement et d'autres beaucoup plus éloignées.

L'échantillonnage de caves plus ou moins éloignées géographiquement et situées dans des zones aux climats différents avait aussi pour but de vérifier si on peut différencier les flores selon leur origine géographique. En d'autres termes, de vérifier si les flores sont plus similaires dans des zones géographiquement restreintes et/ou climatiquement similaires, les résultats des études antérieures étant contradictoires à ce propos (Guillamon *et al.*, 1995 ; Vesavaud *et al.*, 1995). L'existence de souches de terroirs suggérée par certaines études (Vesavaud *et al.*, 1995 ; Schuller *et al.*, 2005) serait aussi examinée de la sorte.

Dans les échantillons prélevés, tous les types de vins produits naturellement au Liban ont été représentés, qu'ils soient secs (blancs, rouges ou rosés) ou doux et concentrés par plusieurs méthodes (évaporation par chauffage, passerillage ou surmaturation), pour voir si le procédé technologique a une incidence quelconque sur les génomes des souches qui auraient subi des pressions sélectives particulières selon le procédé utilisé.

Finalement la flore libanaise a été comparée à plusieurs flores vinicoles en provenance de divers pays pour voir si une différenciation existe selon l'origine géographique. Les résultats de Martinez *et al.* (2004) qui ont étudié les flores de trois pays d'Amérique du Sud suggèrent une telle différenciation. On voulait aussi savoir grâce à cette comparaison si la flore vinicole libanaise se caractérise par une certaine spécificité par rapport aux autres flores vinicoles. Des isolats provenant de produits fermentés non vinicoles ont aussi été testés avec des isolats libanais pour voir si une différenciation existe selon le milieu dans lequel évoluent les souches.

Les résultats concernant les divers aspects d'analyse de la biodiversité ont fait l'objet d'une publication qui a été soumise et qui est présentée dans le Chapitre II.

Trois méthodes de typage ont été adoptées durant notre travail, en excluant les deux méthodes les plus utilisées généralement dans ce genre d'études, l'analyse des caryotypes et la RFLP de l'ADNmt. Des tests préliminaires avec un nombre restreint de souches nous ont permis d'écarter la première méthode pour sa complexité et le temps qu'elle requiert, surtout pour analyser un grand nombre d'isolats, ainsi que la seconde méthode qui nous a semblé moins facile à mettre en œuvre que l'amplification par PCR des régions inter-LTR et qui a généré des profils plus compliqués de nos isolats.

Pour étudier la biodiversité dans les cuves en cours de fermentations naturelles ainsi qu'au niveau du territoire libanais, nous avons choisi d'avoir recours à la PCR interdelta à laquelle ont été soumis tous les isolats retenus pour faire partie de notre étude. Cette méthode relativement simple et facile à mettre en œuvre avait vu sa capacité de discrimination améliorée par Legras et Karst (2003) grâce au choix de nouvelles amorces. Elle semblait donc une bonne candidate pour une différenciation aisée entre les isolats collectés.

La deuxième méthode adoptée a été l'étude des microsatellites dont l'efficacité pour la discrimination des isolats de *S. cerevisiae* a été prouvée (Legras *et al.*, 2005). Cette méthode appliquée à un nombre plus restreint d'isolats libanais a été utilisée principalement pour la comparaison de leurs profils avec ceux d'isolats œnologiques de diverses origines caractérisés par la même méthode par Legras *et al.* (soumis) qui nous ont gracieusement fourni les résultats de leurs caractérisations.

Nous avons finalement choisi de développer une troisième méthode, le MLST, basé sur le séquençage à divers loci du génome de *S. cerevisiae*, à l'instar des méthodes déjà adoptées avec grande efficacité pour la discrimination et les études épidémiologiques d'un nombre important de bactéries et de *Candida albicans*. L'utilisation directe de séquences d'ADN présente l'intérêt de diminuer la variabilité dans le traitement des résultats associée à d'autres méthodes, et de faciliter les comparaisons futures entre différents laboratoires. D'ailleurs durant notre travail, des études similaires entreprises par d'autres équipes ont été publiées (Fay et Benavides, 2005 ; Aa *et al.*, 2006). Nous avons procédé tout d'abord à l'utilisation de gènes de ménage pour ensuite élargir le spectre des loci à l'inclusion de régions intergéniques et d'ORFs non identifiées et la méthode a été testée avec des isolats caractérisés à la fois par l'analyse des microsatellites et des interdelts.

Le travail concernant le développement du schéma MLST a fait l'objet d'une publication (Ayoub *et al.*, 2006) qui est présentée dans le Chapitre III.

L'utilisation de trois méthodes indépendantes pour le typage des mêmes isolats nous a par ailleurs permis d'évaluer l'efficacité de ces méthodes pour le typage de *S. cerevisiae* et pour l'inférence de relations phylogéniques entre des souches libanaises ainsi qu'avec des souches non libanaises et/ou non vinicoles. L'évaluation est présentée dans le Chapitre IV.

La diversité moléculaire observée dans la plupart des études de la flore fermentaire est couplée à l'observation d'une diversité physiologique. Cette dernière a été largement explorée par l'analyse de la contribution de différentes souches de *S. cerevisiae* aux arômes fermentaires, fruits de leur métabolisme. Les résultats préliminaires des analyses moléculaires de la flore libanaise ont montré qu'elle se caractérise elle aussi par une certaine diversité ce qui nous a amené à nous enquérir de la diversité physiologique de ces souches.

Pour cela, nous avons choisi d'inclure dans cette évaluation des souches libanaises identiques, apparentées ou différentes au niveau moléculaire et des souches non libanaises et/ou non vinicoles. En nous inspirant des schémas de sélection de souches vinicoles généralement adoptés, nous avons choisi de tester certains paramètres physiologiques et technologiques.

Des paramètres en relation avec la production de certains métabolites et d'autres ayant une incidence plus technologique ont été choisis. Bon nombre des paramètres retenus avaient été trouvés variables et discriminants entre les souches vinicoles dans des études antérieures (Lurton *et al.*, 1995 ; Lema *et al.*, 1996 ; Romano *et al.*, 2003). En les analysant nous avons voulu examiner d'une part la diversité physiologique de nos souches en essayant de les différencier selon leurs propriétés fermentaires. D'autre part, l'analyse de ces paramètres présente un certain intérêt industriel dans la mesure où elle pourrait contribuer à l'initiation d'une future sélection de souches libanaises pour leur utilisation sous forme de LSA.

Nous avons finalement essayé de voir si des souches apparentées ou identiques au niveau moléculaire suivaient les mêmes schémas de parenté ou d'identité phénotypiques. L'existence d'un parallélisme entre les classifications moléculaire et physiologique pourrait permettre à terme d'assister la sélection, ou certaines étapes de la sélection des souches vinicoles, par l'utilisation de marqueurs moléculaires, plus faciles à mettre en œuvre que les schémas fermentaires compliqués et longs de sélection de souches. Les résultats de cette dernière partie sont exposés dans le Chapitre V.

# **Chapitre I**

## **Synthèse bibliographique**

## I.1 Le Vin au Liban

### I.1.1 Le vin dans la préhistoire

La production délibérée du vin par les hommes est sans doute liée à la domestication de la vigne eurasiennne dont la forme sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*) s'étend de nos jours sur 6000 Km d'Est en Ouest, de l'Asie centrale en Espagne, et sur 1300 Km du Nord au Sud, de la Crimée en Afrique nord ouest. Cette forme sauvage qui est à l'origine des cépages utilisés actuellement pour produire la quasi-totalité des vins mondiaux est encore retrouvée le long du bassin méditerranéen, de l'Espagne jusqu'au Liban, à l'intérieur des terres le long du Danube et du Rhin, autour de la mer noire et de la mer Caspienne, aux sources du Tigre et de l'Euphrate et jusqu'en Asie Centrale (McGovern, 2003 ; **Figure 1**).

Beaucoup de légendes se plaisent à raconter l'apparition du vin mais, aussi séduisantes qu'elles soient, elles n'en sont pas plus véridiques et des hypothèses plus rationnelles ont essayé d'expliquer l'apparition de cette boisson. Une "hypothèse paléolithique" suppose que les hommes ont commencé à mimer à cette époque la transformation fortuite du raisin en vin qu'ils observaient dans la nature, mais elle manque encore à ce jour de preuves tangibles. Un consensus tiré des preuves archéologiques et historiques découvertes jusqu'à présent suppose que le vin est apparu durant la période néolithique (8500–4000 av. J.-C.) dans les parties nordiques du proche orient. De là on croit qu'il s'est graduellement répandu aux régions voisines comme l'Egypte ou la Mésopotamie inférieure (~ 3500–3000 av. J.-C.) pour arriver en Crète (~2200 av. J.-C.) puis Rome et ses colonies et emprunter les cours des grandes rivières pour s'installer en Europe et atteindre à partir de là le "nouveau monde" (McGovern, 2003). C'est probablement l'association de plusieurs facteurs durant la période néolithique qui a permis à des aliments comme le vin, le pain ou la bière, ainsi qu'une gamme de viandes et de céréales d'émerger. En effet cette période se caractérise par la sédentarisation des hommes, la conséquente domestication des plantes et le développement d'une cuisine néolithique, ce qui a rendu possibles la transformation des aliments ainsi que leur stockage (Cavalieri *et al.*, 2003).

L'une des premières preuves d'une production vinicole sophistiquée et maîtrisée remonte à 5400-5000 av. J.-C. : des jarres abritant des résidus organiques ont été trouvées sur le site archéologique de Hajji Firuz Tepe dans les montagnes de Zagros en Iran. L'analyse des résidus tapissant les jarres a mis en évidence la présence d'une combinaison d'acide tartrique, de tartrate de calcium et de résine de thérébinte. Sachant que le thérébinte produisait sa résine

en cette région en même temps que la vigne sauvage produisait ses raisins, que la résine de thérébinte était utilisée pour éviter la détérioration du vin et que l'acide tartrique ne se trouve en grande quantité que dans les grappes, il est clair que les jarres contenaient un produit issu de la vigne, fort probablement du vin. Il semble qu'à cette époque la production de vin était déjà maîtrisée et les six jarres d'une capacité de près de 9 litres trouvées dans ce qui ressemblait à une cuisine, étaient apparemment scellées et recouvertes par des couvercles en argile pour éviter leur transformation en vinaigre (McGovern *et al.*, 1996).

### **I.1.2 Le vin au Liban depuis l'antiquité**

Le Liban qui se trouve dans une région qui a fabriqué du vin depuis la préhistoire, ne semble pas avoir fait exception au développement de l'activité vinicole depuis les anciens temps et il demeure encore aujourd'hui un pays producteur de vin. Bien qu'on ne dispose pas de preuves à l'appui, on croit que le vin était produit au Liban et qu'il en était exporté aussi loin que 3000 av. J.-C. et qu'il pourrait même remonter à près de 7000 ans av. J.-C. Des hypothèses parlent d'une introduction en France par les croisés de variétés de raisin phéniciennes qui ont donné après plusieurs croisements certaines variétés actuellement connues (Karam, 2005). Mais un travail archéologique et historique reste à faire pour démêler le faux du vrai.

Quoi qu'il en soit et que la production vinicole libanaise soit aussi ancienne qu'on le suppose ou pas, il est néanmoins sûr qu'elle était déjà bien établie vers la seconde moitié du 8<sup>ème</sup> siècle av. J.-C. En effet des recherches archéologiques maritimes ont permis de repérer dans la méditerranée au large d'Ashkelon (à l'ouest d'Israël) les plus anciennes épaves de bateaux trouvées en mer. Il s'est avéré que les deux bateaux découverts, baptisés *Tanit* et *Elissa*, étaient phéniciens et qu'ils étaient partis durant la seconde moitié du 8<sup>ème</sup> siècle av. J.-C. du port de la cité de Tyr chargés d'amphores remplies de vin en destination de Carthage ou d'Égypte. Les amphores d'une capacité individuelle de ~18 litres étaient destinées au transport maritime et elles étaient fabriquées, ainsi que d'autres ustensiles trouvés sur les épaves, dans une cité maritime phénicienne, fort probablement Tyr qui abritait le plus grand port du second âge du fer. Ces amphores abritaient des résidus d'acide tartrique indiquant qu'elles étaient initialement remplies de vin, et elles étaient scellées avec de la résine de pin pour prévenir la détérioration du vin et les fuites pouvant survenir durant le transport maritime. La découverte de décanteurs de vin renforce l'idée que les bateaux transportaient cette boisson (Ballard *et al.*, 2002). Les deux bateaux d'une charge individuelle dépassant les

10 tonnes ainsi que des textes anciens comme ceux d'Ezechiel, témoignent d'un riche échange commercial basé à Tyr. Cet échange portait notamment sur des vins importés vers Tyr pour y être décantés puis exportés vers diverses destinations. Ces vins provenaient d'Helbon (actuellement en Syrie) connue pour ses bons vins, ou encore d'Izalla (près de Mardine en Anatolie) (Ezechiel, 27 : 18 ; Ballard *et al.*, 2002). Les vins du Liban étaient eux aussi réputés et on peut y trouver référence dans des textes bibliques comme ceux du prophète Osée datant du 8<sup>ème</sup> siècle av. J.-C. qui promet à Israël de fleurir comme la vigne et d'avoir la renommée du vin du Liban (Osée, 14 : 8) ou encore dans des textes plus anciens de poésie canaanite trouvés à Ugarit (actuelle Ras Shamra en Syrie) et écrits vers 1300-1200 av. J.-C. L'un de ces textes décrit les "Rapiuma" ou "Rephaïm", objets de culte des Cananéens, buvant le vin raffiné, doux et abondant du Liban issu d'un moût nourri par le dieu El (Parker, 1997). Le commerce du vin qui constituait l'une des marchandises les plus exportées des phéniciens leur était avantageux puisqu'il leur assurait un échange de denrées nécessaires à leur vie et dont la culture nécessitait de larges espaces qu'ils n'avaient pas à disposition (Karam, 2005). L'exportation se faisait vers l'Egypte, où le raisin de cuve était difficilement cultivable, Carthage, où la viticulture s'est développée après l'arrivée des colonisateurs phéniciens, ou encore en destination de la Grèce, où les vins sont longtemps restés d'une qualité moindre que celle des vins phéniciens (Ballard *et al.*, 2002; <http://phoenicia.org/>).

De nos jours, et bien que la consommation du vin au Liban ne soit pas très développée, l'activité vinicole se perpétue et le domaine vinicole est en croissance. L'association favorable de facteurs principaux influençant la production du vin, comme le climat, le sol ou la variété de raisin (Galet, 2000) est responsable de la perdurance de l'activité vinicole et favorise la production de vins qui percent de plus en plus sur les marchés mondiaux.

### **I.1.3 Diversité des situations géographiques et conditions favorables à la viticulture**

#### **I.1.3.1 Le climat**

Le territoire libanais s'étend sur environ 210 Km du Nord au Sud, et sur 25 à 85 Km d'Est en Ouest. Son climat est globalement méditerranéen caractérisé par une saison sèche affectant le pays entre la fin du mois d'avril et le début du mois d'octobre et une concentration des pluies durant la saison froide (Galet, 2000 ; ENITA, 2003). Ce climat sied à la culture de la vigne qui y prospère très bien et on trouve d'ailleurs la majorité des vignobles mondiaux dans des pays à climat méditerranéen (Galet, 2000).

Malgré une superficie réduite de 10452 Km<sup>2</sup>, le Liban se caractérise par une topographie contrastée: d'étroites plaines côtières s'étirent en bordure de la Méditerranée et s'élargissent aux extrémités Nord et Sud. L'intérieur du pays est dominé par deux massifs calcaires encadrant la plaine d'effondrement de la Békaa: la chaîne du Mont-Liban au centre et l'Anti-Liban constituant la frontière avec la Syrie à l'Est. Globalement on peut distinguer quatre zones géographiques parallèles à la bordure de la méditerranée mais la diversité topographique dont elles sont dotées induit une diversité dans les situations climatiques rencontrées ce qui fait que ces zones abritent divers microclimats (**Figure 2**):

**Les plaines côtières** sont de quelques Km de largeur et se caractérisent par un niveau de précipitations de l'ordre de 800 mm. La proximité de la mer qui absorbe la chaleur estivale et libère de la chaleur en hiver, et la présence de la chaîne du Mont-Liban qui protège des influences continentales venant de l'Est, font que le climat de ces plaines côtières est humide, son régime thermique modéré et peu contrasté, ses hivers moins froids et ses étés moins chauds que ceux des régions sous influence continentale (Riachy, 1998 ; Galet, 2000 ; ENITA, 2003).

**La montagne du Mont-Liban** d'une largeur variant de 20 à 30 Km, commence au sud par des plateaux de faible altitude de 300 à 940m, et s'étend par des pentes abruptes pour atteindre des sommets plus adoucis qui culminent à 3083 m. L'effet de barrière qu'elle constitue aux influences maritimes ouest qui diminuent plus on va vers l'intérieur et on monte en altitude, est par conséquent moins prononcé au Sud (Riachy, 1998). Alors que les températures diminuent avec l'altitude, le niveau de précipitations augmente et atteint les 1300 mm sur la face occidentale mais il est moins important sur la face orientale. Ces pluies sont des pluies de relief déclenchées ou intensifiées par l'ascendance forcée des vents d'ouest et du sud-ouest sur les pentes du Mont-Liban exposées à la mer (MPT, 1977).

**La plaine intérieure de la Békaa** est d'une largeur de 10 à 15 Km et l'altitude y varie entre 600 et 1100 m. Les étés y sont plus chauds et plus secs, les hivers plus froids et le régime thermique plus contrasté que les dans zones côtières, l'écart annuel entre le mois le plus chaud et le plus froid pouvant atteindre les 20°C (MPT, 1977). On peut subdiviser cette plaine en deux parties :

- La vallée de l'Oronte où le niveau de précipitations est faible et varie entre 200 et 400 mm alors que le vent y est fort et les températures élevées l'été. Le climat y est semi-désertique à tendance continentale.

- Bekaa Centrale et Sud où le niveau de précipitation est plus élevé (500-800 mm) que dans la vallée de l'Oronte et l'air plutôt sec dans cette plaine très fertile.

**La montagne de l'Anti-Liban** culmine à 2800 m. Le niveau de précipitations y est plus faible qu'au Mont-Liban. Le climat y est à tendance continentale.

Malgré la diversité des situations climatiques, celles-ci restent néanmoins favorables à la viticulture sur la quasi-totalité du territoire libanais (Riachy, 1998). En utilisant différents paramètres en relation avec la température pour examiner l'adéquation du territoire libanais à la viticulture, on trouve que le Liban comporte 5 régions appropriées à la plantation de la vigne : une zone fraîche (I), une zone modérément fraîche (II), une zone modérément tiède (III), une zone tiède (IV) et une zone chaude (V). Les seules limitations à la production de vigne sont des restrictions de froid touchant les sommets culminants à plus de 2000 m comme "Sannine", "Qnaitra", et les sommets des "Cèdres" jusqu'à "Qornet el-Sawda" (Riachy, 1998 ; **Figure 3**).

### **I.1.3.2 Le sol**

Il joue sur la qualité des vins par sa structure (déterminée par sa profondeur, la proportion des différents constituants comme la terre fine, les cailloux...etc), par ses propriétés physiques (température, humidité), par sa composition chimique et par son origine géologique qui influence les autres paramètres (Galet, 2000).

La grande majorité des sols libanais est formée sur une roche mère calcaire. Les sols sont sableux dans la plaine côtière, gréseux et argilo-gréseux dans le Liban central, et argilo-calcaires dans la Békaa (ENITA, 2003). La présence de calcaire dans les sols libanais est favorable à la qualité du vin et favorise le développement des arômes (Galet, 2000). À condition qu'il n'y ait pas de carences limitantes, la pauvreté des sols peut aussi favoriser la production de vins de qualité en diminuant la productivité de la vigne (Séguin, 1988). C'est le cas des terres et des coteaux de la Bekaa et du Mont-Liban où des sols moyennement fertiles et à alimentations hydrique et minérale limitées mais régulières permettent une concentration naturelle des baies et donnent des raisins à fort potentiel œnologique (ENITA, 2003).

En plus de l'adéquation et de la diversité du climat et la disponibilité de données pédologiques favorables, on constate l'existence d'une faible pression parasitaire qui rend possible la production de raisin de grande qualité pour la vinification diminuant ainsi le coût des traitements phytosanitaires et favorisant la production de raisin biologique (ENITA, 2003).

### **I.1.4 La notion de terroir au Liban**

La notion de terroir découle d'une association entre des données géologiques et pédologiques, des données climatiques et des techniques de cultures ou de vinification qui influencent des cépages particuliers. Cette notion est à prendre avec précaution au Liban car elle y est difficilement applicable. Par exemple le raisin utilisé pour la vinification ne provient pas toujours de la même zone géographique.

Mais un effort est fait dans le sens de la protection de l'origine géographique qui est définie comme l'aire géographique dans laquelle la matière première est disponible et/ou la transformation réalisée. La loi libanaise est révisée pour y introduire la notion de protection des indications géographiques. Le secteur viticole est pratiquement le seul à être soumis à une législation à ce sujet. En effet, la loi N°216 relative à la production, la fabrication, la vente et l'importation du vin définit à son article 12 l'appellation d'origine comme étant la région géographique de la production...Bénéficie de l'appellation d'origine contrôlée le vin dont les caractéristiques sont liées à l'origine des raisins, au lieu de vinification et à la région géographique reconnue, comprenant les facteurs naturels et les facteurs humains'. Mais c'est la division administrative des "Mouhafazat" (équivalents des départements français) qui est adoptée pour le moment comme base de définition de l'appellation d'origine et aucune appellation d'origine n'a été à ce jour enregistrée (IDEAS, 2005) .

### **I.1.5 Le Liban et la viticulture : Etat actuel du domaine en chiffres**

#### **I.1.5.1 Surface, encépagement et production de raisin**

Sur les quelques 250000 ha de superficie agricole utile (SAU) dont 87000 sont irrigués et plus de 50000 ha en jachère permanente (non exploités depuis plus de 5 ans), le vignoble libanais occupe une surface de ~12000 ha. 2200 ha sont cultivés en raisin de cuve et sont principalement concentrés dans la Bekaa (57% de la surface), particulièrement en Bekaa Ouest, le reste se répartissant entre le nord du Liban (29%), le Mont-Liban (~12%) et le le Sud Liban (~2%) (FAO, 2000). Le raisin de cuve produit est destiné à la fois à la transformation en vin et en arak. La surface cultivée en raisins de cuve transformés en vin est estimée à 1400 ha dont 80% sont constitués de cépages rouges (comme le Cinsault représentant la moitié, le Cabernet Sauvignon, la Syrah, le Carignan...) et 20% de cépages blancs (l'Obeidi local, l'Ugni blanc, le Sauvignon blanc, la Clairette...). On recense une

trentaine de variétés de raisin locales libanaises (Riachy, 1998) et une vingtaine de variétés importées dont la plupart a été plantée ces derniers 15 ans (Karam, 2005). L'Obeidi, un cépage local blanc traditionnellement utilisé pour la consommation comme raisin de table ou la production d'arak, et depuis peu pour l'élaboration de vin blanc occupe la plus grande superficie de raisin plantée, suivi par le Cinsault qui est parfois utilisé pour la production d'arak (ENITA, 2003).

La culture de la vigne (table et cuve) était la 8<sup>ème</sup> activité agricole du pays en 2001. La production de raisin de cuve s'est élevée à ~27000 T dont 6000 (soit 22%) étaient destinés à la production de vin, le reste étant utilisé pour la production d'arak (ENITA, 2003). Près de 330 exploitations agricoles ayant une surface de plus de 1ha et produisant du raisin de cuve ont été recensées en 1999 contre ~12000 produisant du raisin de table. Ces exploitations représentaient à elles seules 79 et 77 % de la surface cultivée en raisin de cuve et de table respectivement alors que le reste de la surface était réparti sur un grand nombre de petites exploitations (FAO, 2000).

#### **I.1.5.2 Production de vin et échange commercial**

La production de vin s'est élevée en 2001 et en 2002 à près de six millions de bouteilles (soit ~45000hl) et à près de 8 millions en 2003 dont ~75% de vins rouges, 15 % de blancs, 10% de rosés et 1% de vins doux. 4,5 millions de bouteilles étaient destinées au marché intérieur en 2001 dont ~1 million sont restées invendues, et le reste (soit 25% de la production) était destiné à l'exportation (ENITA, 2003 ; Karam, 2005). Les exportations de vin représentent ~1% du montant total des exportations libanaises et assurent quelque 5,5 millions d'euros de chiffre d'affaire alors que le marché intérieur ramène 11 millions d'euros. Le prix des vins varie selon leur qualité et leur destination : par exemple les vins exportés vers la Grande Bretagne sont majoritairement haut de gamme (ENITA, 2003) et un cru coûtant 15 euros au Liban, peut être vendu 75 euros à l'hôtel Ritz de Paris (Szuchman, 2005). La balance commerciale entre l'exportation et l'importation de vin s'est élevée à près de 3,5 millions d'euros en 2001 rapportant des devises à un commerce extérieur déficitaire et à un secteur agroalimentaire dont la balance présente un déficit de l'ordre de 1 à 4 (ENITA, 2003 ; IDEAS, 2005). La taxe d'importation s'élève actuellement à 70% mais elle sera amenée à disparaître avec la libéralisation des échanges (ENITA, 2003 ; Karam, 2005).

### **I.1.5.3 Les entreprises vinicoles**

Le secteur de la transformation agroalimentaire compte 2000 entreprises employant plus de 10 salariés. Les industries produisant du vin sont principalement implantées dans la Bekaa et cette implantation est probablement corrélée à la concentration de la culture de raisin de cuve dans cette plaine. Quatre entreprises ont été fondées avant la guerre du Liban en 1975, et deux dans les années 80 mais un boum a lieu depuis la moitié des années 90 avec l'établissement d'au moins 10 nouvelles entreprises. La plus ancienne, Ksara, a été établie en 1857 et a produit et commercialisé le premier vin sec, à une époque où la production traditionnelle et la consommation libanaises ne concernaient que le vin doux. Jusqu'au début des années 70, cette entreprise avec ses 2 km de caves faisait face à un succès inattendu et assurait 85% de la production vinicole qui lui rapportait un profit de 70%. Cette entreprise octroie encore aujourd'hui avec Kefraya plus de 50% de la production locale et à elle seule 35% du marché libanais (en 2003) avec une production de près de 2 millions de bouteilles dont la moitié est exportée, en plus grande partie vers la France (ENITA, 2003 ; Karam, 2005).

Les entreprises vinicoles ont énormément souffert durant la guerre de 1975 qui a duré quinze ans et certaines n'ont pu se redresser qu'après la fin de celle-ci. Durant cette période, le marché local était inaccessible à cause de la concurrence du vin par d'autres alcools et de l'invasion de certains vignobles de la Bekaa. Pourtant la guerre a poussé les vinificateurs à exporter leur production ce qui fait que des entreprises qui exportaient 5% de leur production avant la guerre en exportaient 95% après celle-ci (El Ajam, 2001 ; Karam, 2005). Le fait de se tourner vers l'extérieur a été salvateur et a probablement contribué à sauvegarder les vins libanais et même à améliorer leur qualité. Cette tendance à l'exportation est toujours présente aussi bien chez les anciens que chez les nouveaux producteurs et une bonne partie de la production des établissements est encore exportée. La plupart des entreprises se tournent et tablent sur l'exportation qui leur est plus avantageuse que la vente sur les marchés intérieurs. Château Musar possédant depuis la guerre des bureaux en Angleterre, exporte par exemple actuellement 85% de sa production contre 95% depuis quelques années. Château Belle-View, l'un des derniers-nés de la viticulture libanaise exporte 95% de sa production (Karam, 2005). Plusieurs entreprises ont ainsi pu acquérir des renommées mondiales et tous les ans, les prix remportés par les vins libanais sont fièrement arborés par leurs producteurs.

Mais la culture de la vigne étant une culture traditionnelle au Liban, la majorité des foyers, surtout dans les villages, possède des pieds de vigne. Le raisin de ces vignes

(principalement des cépages locaux) sert souvent à fabriquer du vin ou de l'arak pour la consommation du foyer, même si le raisin est plus consommé comme raisin de table. La vinification se fait généralement d'une façon artisanale et sans levurage avec un équipement rudimentaire et un savoir-faire transmis entre les générations. La fabrication artisanale a longtemps été liée à la fabrication du vin dans les couvents qui ont transmis leur savoir aux populations environnantes. Par exemple, le couvent de Bzemmar des arméniens catholiques continue depuis sa fondation en 1749 à fabriquer du vin utilisant notamment des variétés locales comme le "Obeidy". Avec des productions pouvant varier entre 2000 et 20000 bouteilles, les couvents, tout en modernisant progressivement leurs productions et se tournant vers la commercialisation pour assurer des revenus, restent des foyers de conservation des savoirs artisanaux et de la production naturelle de vin (Karam, 2005).

### **I.1.6 Transformations classiques et artisanales**

La production industrielle de vin se fait selon les règles classiques de production et s'accompagne la plupart du temps de levurage à l'aide de levures importées, souvent françaises. Les équipements des entreprises libanaises ont un niveau moyen supérieur à beaucoup d'entreprises européennes, les vinificateurs ne lésinant pas sur les moyens pour produire des vins de bonne qualité. Ces entreprises emploient des œnologues libanais ou étrangers (ENITA, 2003).

Les schémas d'élaboration artisanale des vins destinés à la consommation des foyers sont généralement assez simples et souvent peu contrôlés. Grossièrement, après le foulage et l'égrappage des raisins, les moûts sont laissés à fermenter naturellement sans leurs peaux si on veut obtenir du vin blanc ou à macérer avec leurs peaux, pour une partie ou durant toute la fermentation, pour obtenir des vins rouges ou plus rarement des rosés. Les vins blancs sont souvent fabriqués à partir de cépages locaux comme le "Obeidy" ou le "Merweih" qui sont les plus utilisées, et les vins rouges à partir de cépages importés.

Bien que les gens fabriquent actuellement plus de vins secs, les vins fabriqués traditionnellement étaient doux. Cette tendance attestait de l'influence des monastères qui produisaient le vin doux pour s'en servir comme vins de messe. Ces vins sont produits généralement à partir de moûts concentrés avant la fermentation pour augmenter la teneur en sucres et aboutir à des fermentations incomplètes avec des sucres résiduels persistant dans le vin. La concentration des moûts se fait par passerillage en séchant les grappes sur souche ou hors souche, ou en chauffant le moût et en l'évaporant généralement aux deux tiers. Dans ce

dernier cas, une inoculation se fait souvent avec du jus frais pour réalimenter la flore levurienne réduite ou éliminée par le chauffage. Les vins doux sont alternativement, mais plus rarement, produits en vinant les moûts à l'alcool en cours de fermentation ce qui provoque l'arrêt de la fermentation avant l'épuisement des sucres.

Une grande partie des vins fermentés en blancs sert à produire de l'arak, la fermentation alcoolique n'étant qu'une étape dans la production d'arak précédant les distillations successives. Le premier distillat est mélangé à de l'anis, et soumis à une deuxième distillation et même parfois à une triple distillation. Dans ce processus, surtout si la fabrication est artisanale, un soin n'est pas toujours donné au choix de raisins de qualité. Les raisins sont même parfois laissés à fermenter en l'état et avec leurs rafles après un léger foulage. On estime à 21200 tonnes la production de raisin destiné à la production d'arak soit 3 800 000 bouteilles. La grande partie de cette production est faite d'une façon artisanale et non commerciale dans les foyers et elle sert à la consommation personnelle.

### **I.1.7 Domaine vinicole en évolution et grandes possibilités d'exploitation encore offertes**

#### **I.1.7.1 Diversité du territoire à exploiter**

La concentration du vignoble libanais dans la Bekaa occulte les diverses possibilités offertes par les autres régions. La zone IV (voir supra I.1.3.1, le climat et l'**Figure 3**) dans laquelle se trouve la plus grande partie du vignoble est tiède et adéquate à la majorité des cépages utilisés au Liban, à part le Cabernet Sauvignon (Riachy, 1998). Mais les autres régions et particulièrement les zones I, II et III sont à exploiter surtout qu'elles se caractérisent par une grande diversité topographique et par conséquent une diversité de microclimats. Ces zones-là sont plus convenables pour le Cabernet Sauvignon et pour d'autres variétés comme le Chardonnay, le Sauvignon Blanc ou le Pinot Noir (Riachy, 1998). Le choix du cépage à planter pourrait même se faire au cas par cas selon l'adéquation des différentes zones microclimatiques disponibles. Une grande gamme de cépages locaux ou importés peut donc être facilement implantée à condition de reposer sur un choix judicieux du cépage en fonction de l'adéquation des zones géographiques ou des divers sites au sein d'une même zone. Des vins variés et typiques peuvent ainsi être produits.

Les vinificateurs plus nombreux depuis quelques années commencent à prendre conscience des nombreuses possibilités disponibles et essaient d'en profiter. Château Musar

par exemple a son vignoble distribué entre Kefraya et Kab Elias dans la Bekaa (près de JD sur la **Figure 2**), la chaîne de l'Anti- Liban et Ghazir à Kesrouan (G sur la **Figure 2**) (El Ajam, 2001 ; Karam, 2005). La moitié des caves nouvellement implantées ont établi leurs vignobles hors de la Bekaa, à Rechmaya, Ras el Harf, Bhamdoun ou Mansourieh au Mont-Liban (près de RC sur la **Figure 2**), à Kfifane dans le Nord du Liban (KF sur la **Figure 2**) ou encore dans le Sud du Liban à Jezzine (près de BK sur la **Figure 2**). Il est vrai que la Bekaa, protégée à l'ouest de l'humidité méditerranéenne par le Mont Liban, et à l'est de la chaleur du désert syrien par l'Anti-Liban, ayant des sous-sols argileux et des sols argilo-calcaires et recevant les eaux des fontes des neiges de l'Anti-Liban, bénéficie d'une situation particulière où une fraîcheur accompagne l'ensoleillement qui peut atteindre les 300 j par an dans certaines zones (El Ajam, 2001 ; Karam, 2005). Mais les autres régions ont d'autres particularités et les nouveaux vinificateurs vantent leurs terroirs par rapport à celui de la Bekaa. Les terres sont par exemple plus caillouteuses et moins riches en eau dans les vignobles du Mont-Liban, permettant aux racines d'aller en profondeur. Bhamdoune reçoit 40 à 50% de pluie de plus que la Bekaa et bénéficie en hiver et en été d'une moyenne de température inférieure de 4 degrés par rapport à celle de la Bekaa ce qui permet une maturation plus longue du raisin et des vendanges plus tardives, permettant un plus grand développement de précurseurs aromatiques. Les sols sont riches en minéraux et pauvres en matière organique et les terrasses permettent un bon drainage. Les vignobles de Jezzine reçoivent plus de soleil direct que la Bekaa ainsi que la brise de la mer, et ont une grande variété de sols composés de craie, de calcaire, d'argile ou de cailloux (Karam, 2005).

#### **I.1.7.2 Vignoble à développer, encépagement à cibler, variétés locales à tester**

Il est vrai que l'urbanisation et le défrichage des terres limitent le développement du vignoble libanais dont la surface est assez limitée. Mais depuis quelques années la culture de raisin de cuve est en expansion et 200 ha ont été plantés entre 1998 et 2003 en raison de la multiplication des vinificateurs et de l'augmentation conséquente de la demande et les possibilités sont ouvertes à l'adoption de nouvelles techniques de conduite des vignes.

Le domaine des Tourelles fondé en 1868 compte par exemple doubler la surface de son vignoble d'ici quelques années. A Kfifane, village du Nord Liban, les 7 ha de vignoble disponibles en 2001 son passés actuellement à 40 ha, l'expérience réussie d'un vinificateur ayant poussé ses voisins à investir (Karam, 2005). La plantation se tourne essentiellement vers des cépages "nobles" comme le Cabernet Sauvignon, le Chardonnay, la Syrah, le

Viognier...au dépens des anciens cépages plantés en grande partie entre 1950 et 1980. Les variétés locales sont principalement utilisées pour la consommation de raisin de table mais des variétés comme le “Mirweih” ou le “Bekaii” sont proposées comme étant adéquates à la vinification (Riachy, 1998). Le potentiel d'utilisation industrielle de certaines variétés locales, utilisées telles quelles ou en mélanges n'est pas à négliger et il commence d'ailleurs à être exploité. Un exemple de réussite a déjà été enregistré avec la société Château Musar qui produit depuis des années du vin blanc à partir des variétés locales “Obeidi” et “Merweih” (**Figure 4**) qui sont encore très utilisées dans les foyers et les monastères. Beaucoup de variétés locales sont de plus résistantes au phylloxera ce qui offre aussi la possibilité de leur utilisation comme porte-greffes. Des études plus amples et des essais de vinification avec des variétés locales devraient être entrepris.

### **I.1.7.3 Production et consommation du vin en progression**

Le libanais est traditionnellement un buveur d'arak, boisson incontournable avec le mezzé libanais, et en 1964 les libanais consommaient 4 millions de litres d'arak sachant que cette boisson se boit diluée (Karam, 2005). Pratiquement toutes les entreprises vinicoles produisent d'ailleurs aussi de l'arak qui offre l'opportunité de transformation des vins bas de gamme. La consommation de vin, encore surpassée par la consommation d'arak et plutôt confinée à la communauté chrétienne, est encore assez faible au Liban. La moyenne annuelle de consommation est de ~2l par an et par individu soit 4 300 000 bouteilles qui seraient consommées par les 2500000 adultes. Mais les choses changent et la consommation d'arak décline face à la montée de la consommation du vin, de la bière et d'autres alcools et la consommation du vin augmente tous les ans depuis quelques années (Karam, 2005). Le vin est plus consommé en hiver (44% de la production de vin dont 70% sont du rouge) alors que la consommation estivale est faible mais en progression elle aussi (ENITA, 2003). Une très nette augmentation de la production est enregistrée depuis 1990 (Szuchman, 2005) ainsi qu'une nette augmentation de l'exportation. Par exemple, château Ksara produit actuellement 1.8 millions de bouteilles contre 1,2 dans les années 90 (Karam, 2005) et l'exportation rapportait en 1996 vers les 2,5 millions d'euros alors qu'elle est estimée à près de 6 millions d'euros ces dernières années.

#### **I.1.7.4 Raisons de l'investissement dans le domaine vinicole**

Comme nous l'avons déjà indiqué et depuis 1996 l'établissement des caves de vinification à caractère commercial est en augmentation. Les raisons qui incitent à investir dans ce domaine sont multiples. Tout d'abord, le domaine vinicole est l'un des rares secteurs gagnants en relation avec l'agriculture qui a du mal à retrouver son dynamisme et les volumes d'importation et d'exportation d'avant-guerre. En effet le secteur agricole, qui assure une part substantielle du revenu de 20 à 30% de la population libanaise, représente moins de 7% du PIB.

Mais au delà du simple profit, certains projets particuliers ou faisant intervenir des coopératives visent à redynamiser des régions déplacées pendant la guerre et à re-occuper des terres délaissées ou à assurer, dans certaines régions de la Bekaa, des cultures de substitution aux cultures illicites qui avaient pris le dessus durant la guerre. Plusieurs structures d'écotourisme se développent en relation avec les vignobles et les domaines vinicoles. Des visites des vignobles et des caves couplées à des dégustations sont organisées dans la plupart des châteaux et récemment une "Route des vins libanais" tracée sur l'itinéraire des différents châteaux suscite un engouement chez les consommateurs libanais et rencontre un franc succès.

Les investisseurs ciblent la production de vin de qualité aux dépens de la quantité produite et les rendements de la production viticole libanaise varient entre 2 et 7 T/ha contre 14T/ha en Israël qui produit 30 millions de bouteilles pour un vignoble de 3000 ha (Karam, 2005). Mais le pari des vinificateurs est gagnant et les établissements, même les plus récemment établis, sont fiers de leur production dont la qualité surpasse celles des pays avoisinants et récolte très souvent des prix et des médailles et se distingue dans les grandes expositions vinicoles et les concours internationaux. Un cru de Château Musar ouvre par exemple le livre "The great wines and vintages" de (Karam ; 2005) et le Wall Street Journal propose une carte de shopping mondiale sur laquelle figurent les vins libanais (Szuchman, 2005).

#### **I.1.7.5 Organisation du domaine et protection des appellations et des origines**

La filière vinicole libanaise a encore un fort potentiel de développement à condition de lui assurer un bon encadrement. Mais elle est déjà beaucoup mieux organisée que d'autres filières agricoles et agroalimentaires. En témoignent la plantation de cépages en

remplacement des anciennes variétés et en vue d'une production de plus grande qualité ainsi que l'orientation actuelle pour le développement de vins haut de gamme à haute valeur ajoutée et reliés à une origine géographique. En effet des vins libanais issus de terroirs reconnus auront une meilleure chance de se vendre à l'étranger. Ces vins ont aussi une chance de générer la préférence du consommateur libanais qui est encore un buveur occasionnel de vin cherchant par conséquent les vins raffinés. De plus ces vins seront capables de rémunérer les coûts de production élevés du Liban (main d'œuvre, dépenses énergétiques, matériel etc... ont des coûts assez élevés), la compétitivité des vins bas de gamme n'étant pas assurée vu le coût de production et la forte concurrence des pays producteurs déjà établis ou ceux du nouveau monde.

Dans ce contexte s'inscrit l'intérêt donné à la création de produits typiques en relation avec des appellations géographiques. Pourtant une construction synthétique de terroirs n'est pas évidente et pas forcément pertinente en l'absence d'une relation claire et exclusive des vins produits avec un lieu géographique. La connaissance de la filière telle qu'elle est établie est par conséquent importante pour définir les aires géographiques impliquées et relier ensuite un produit avec une indication géographique. Dans ce but une loi a été édictée en 2000 régissant la production du vin au Liban et garantissant la qualité de la production. Dans le cadre de cette loi, il est prévu de créer un institut du vin, office paragouvernemental, dont l'un des objectifs serait la création de "l'Appellation d'Origine" ainsi que le contrôle, l'analyse et la dégustation des vins. Entre temps une commission regroupant des responsables de l'administration, des producteurs et des experts œnologiques a été créée en 2002 au sein du ministère de l'Agriculture et elle est chargée d'entamer les travaux de recensement géographique qualitatif et quantitatif des vignobles ainsi que de proposer la création de l'Institut National de la Vigne et du Vin (IDEAS, 2005). C'est en grande partie le dynamisme de l'UVL (Union Vinicole du Liban) qui associe les principaux producteurs de vin du Liban et qui travaille avec les différents acteurs de la filière qui incite à l'évolution du domaine vinicole et qui a notamment permis l'adhérence du Liban à l'OIV (Organisation internationale de la vigne et du vin).

Il est probable que les contraintes à imposer pour créer des qualifications de terroirs ou d'indications géographiques et des appellations comme les AOC limiteraient pour le moment la mutation observée dans le domaine vinicole libanais notamment en terme d'encépagement ou de techniques qui seraient plus adaptées aux conditions libanaises. Mais dans un contexte d'ouverture des marchés, le Liban a tout à gagner sur le long terme de la création de tels

systèmes et la protection des noms géographiques libanais est un enjeu primordial et peut être un catalyseur important du développement rural.

L'apport de la recherche dans l'évolution du domaine vinicole est indéniable que ce soit pour mieux étudier l'adéquation des variétés introduites ou pour sélectionner des variétés de raisin locales qui seraient plus adaptées ou qui contribueraient à la spécificité des vins libanais. Dans cette perspective l'isolement et l'introduction de souches autochtones qui pourraient contribuer à la typicité des vins libanais revêt une importance particulière.

## **I.2. Les levures et le vin**

### **I.2.1 Le vin et la fermentation alcoolique**

Le vin est selon la définition de l'OIV de 1973 "la boisson résultant exclusivement de la fermentation alcoolique complète ou partielle du raisin frais, foulé ou non, ou du moût de raisin" et "son titre alcoométrique ne peut être inférieur à 8,5 % en volume". La fermentation alcoolique, assurée par les levures, désigne la formation d'alcool éthylique et de gaz carbonique à partir des sucres fermentescibles du raisin, essentiellement fructose et glucose, et elle est résumée par l'équation globale :  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CH_2OH + 2 CO_2$ .

Les sucres sont absorbés, phosphorylés et dégradés par fermentation. La glycolyse, première étape de la fermentation, produit à partir d'une molécule de sucre, deux molécules d'acide pyruvique. Ce dernier est décarboxylé par fermentation alcoolique en acétaldéhyde lequel est réduit en éthanol. Une fraction de l'acétaldéhyde est oxydée en acide acétique même en anaérobiose mais l'activité de l'acétaldéhyde déshydrogénase est alors faible. Une fermentation glycéro-pyruvique favorisée notamment par la présence de sulfite qui se combine avec l'acétaldéhyde et diminue la disponibilité de sa réduction en éthanol, intervient principalement en début de fermentation alcoolique et fait intervenir 8% des molécules de sucre et elle conduit à la formation de glycérol, de pyruvate et d'autres produits secondaires (Vasserot 1996 ; Ribereau-Gayon, 1998).

### **I.2.2 Facteurs qui affectent la production des vins**

La qualité et le caractère d'un vin sont intimement liés à sa saveur et celle-ci est la résultante d'un très grand nombre de molécules aromatiques (600 à 800 molécules selon Rapp, 1998) dont la formation et la concentration dépendent de plusieurs facteurs.

L'emplacement géographique du vignoble et son environnement (climat et sol), la variété de raisin et son degré de maturité à la vendange, les conditions de la fermentation (pH, température, oxygénation initiale du moût, écologie microbienne...), et les pratiques liées à la transformation vinicole (traitements, type de clarification, vieillissement...) sont autant de facteurs qui possèdent une incidence sur la composition du vin (Aragon *et al.*, 1998 ; Sabon *et al.*, 2002 ; Valero *et al.*, 2002 ; Fleet, 2003 ; Torija *et al.*, 2003)

Les réactions biochimiques qui aboutissent au produit final commencent donc avec la maturation des raisins et continuent durant sa récolte et au cours de la fermentation alcoolique ainsi que lors de la clarification et du vieillissement. On peut ainsi parler d'une flaveur variétale pour désigner la contribution des produits originaires des grappes et d'une flaveur pré-fermentaire pour désigner les composés formés durant l'extraction et le conditionnement des moûts. La flaveur fermentaire quant à elle, désigne les composés formés durant la fermentation (Romano *et al.*, 2003). Elle dépend de la capacité des levures à transformer les produits présents dans les moûts et elle peut être influencée par divers facteurs. Par exemple le pH favorise, lorsqu'il est élevé, la synthèse d'alcools supérieurs et d'esters, alors que la température à laquelle est conduite la fermentation peut affecter la production de l'acétaldéhyde, des alcools supérieurs, des esters, des acides organiques et de l'acidité volatile (Aragon *et al.*, 1998 ; ITV, 2003). Les températures comprises entre 25 et 30°C permettent l'extraction des composés phénoliques durant la phase de macération des vins rouges et les basses températures, comprises entre 10 et 20°C, permettent un développement aromatique optimal pour les fermentations en blanc et l'achèvement des fermentations en rouge (ITV, 2003 ; Torija *et al.*, 2003). Finalement, la flaveur post-fermentaire désigne les produits qui apparaissent durant le vieillissement des vins (Romano *et al.*, 2003).

### **I.2.3 Rôles des levures**

Alors que les levures permettent principalement la transformation complète et rapide des sucres en éthanol et CO<sub>2</sub>, leur intervention permet aussi de contribuer à la flaveur des vins. Bien que leur action débute avec leur présence sur les grappes et se prolonge durant les stades post-fermentaires, c'est durant la fermentation que sont formés les produits volatiles majeurs, présents aux plus fortes concentrations. L'intervention des levures se fait par l'utilisation des constituants des jus de raisin, la production d'éthanol et d'autres solvants qui aident à l'extraction des composés aromatiques à partir des éléments solides des grappes, la production d'enzymes qui transforment les composés neutres des raisins en composants actifs de flaveur

et la production de centaines de métabolites secondaires aromatiques (Fleet, 2003). Ces métabolites contribuant à la flaveur d'un vin dépassent les 400 composés (Romano *et al.*, 2003) et incluent des alcools supérieurs et leurs esters acétiques, des acides gras et leurs esters éthyliques, des acides organiques, des aldéhydes, des cétones et des composés soufrés volatiles (Stashenko *et al.*, 1992 ; Ribereau-Gayon, 1993 ; Majdak *et al.*, 2002 ; Fleet, 2003). Alors que la contribution aromatique des principaux produits de la fermentation, l'éthanol et le CO<sub>2</sub> est faible, les acides organiques, les alcools supérieurs, les esters et dans une moindre mesure l'acétaldéhyde constituent la majeure partie du bouquet fermentaire (Romano *et al.*, 2003). Les mécanismes d'intervention des levures dans la fermentation, et en particulier la production des métabolites secondaires, varient avec l'espèce et la souche de levure et ces différences seront détaillées par la suite.

*Saccharomyces cerevisiae* est la principale espèce assurant la fermentation alcoolique puisqu'elle tolère les fortes concentrations en alcool (pouvant s'élever à plus de 15%), en sucre (pouvant s'élever à plus de 250g/l), l'anaérobiose, le sulfitage (entre 160 et 400mg/l dans les vins) et qu'elle assure la fermentation dans une gamme assez large de températures et aux faibles valeurs du pH spécifiques aux moûts de raisins et comprises entre 2,8 et 3,5 (Ribereau-Gayon, 1998 ; ITV, 2003). Cette levure adopte trois régimes métaboliques : une voie respiratoire en aérobiose et en présence d'un faible taux de substrat (~1-5g/l), une voie fermentaire en anaérobiose, et une voie respiro-fermentaire en présence d'un taux élevé de substrat et en aérobiose où le catabolisme des hexoses devient plus rapide et la production de biomasse plus restreinte. Les fermentations sont stimulées par des actions de remontage à l'air qui permettent d'apporter aux levures l'oxygène nécessaire à la synthèse d'ergostérol et qui favorisent la mise en suspension des cellules du chapeau.

Mais malgré son rôle principal dans la conduction et l'achèvement de la fermentation alcoolique, *Saccharomyces cerevisiae* n'est pas la seule espèce produisant de l'éthanol à partir des sucres, ni la seule espèce intervenant dans le processus biochimique et écologique complexe qu'est la fermentation. Un nombre important d'espèces microbiennes, principalement des espèces de levures, se succèdent et se substituent dans les moûts de raisin en cours de vinification.

#### **1.2.4 Ecologie des moûts et contribution des différentes espèces**

Les premières étapes des fermentations naturelles sont généralement assurées par des genres non-*Saccharomyces* qui restent majoritaires les premiers jours comme *Hanseniaspora*

(et son anamorphe *Kloeckera*), *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* ou *Debaryomyces* (Guillamon *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Pohve-Jemec *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002 ; Ganga et Martinez, 2004). Parmi les espèces les plus communément rencontrées dans les moûts en début de fermentation figurent l'espèce apiculée à faible pouvoir fermentaire *Hanseniaspora uvarum* et l'espèce *Candida stellata*, les autres espèces étant trouvées en moindre mesure et/ou occasionnellement (Constanti *et al.*, 1997 ; Pohve-Jemec *et al.*, 2001 ; Beltran *et al.*, 2002 ; **Figure 5**).

L'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est généralement absente dans les moûts en début de fermentation (Gutiérrez *et al.*, 1999, Povhe Jemec *et al.*, 2001) même si de rares observations de sa présence occasionnelle à des taux exceptionnellement élevés dès les premiers jours de la fermentation ont été enregistrées (Querol *et al.*, 1990 ; Pramateftaki *et al.*, 2000, Beltran *et al.*, 2002). Ceci pourrait être dû à des conditions particulières rencontrées dans ces cas-là comme des concentrations élevées de SO<sub>2</sub> dans le moût qui inhibent le développement des espèces non-*Saccharomyces* ou de hautes températures de fermentation (Querol *et al.*, 1990). Ce qui est néanmoins sûr c'est qu'au bout de quelques jours et avec l'augmentation de la concentration en éthanol et lorsque celle-ci tourne autour de 5% (v/v) dans les moûts, *Saccharomyces cerevisiae*, plus résistante à cet alcool, commence à dominer les espèces non-*Saccharomyces* qui atteignent des maximums de populations de ~10<sup>7</sup> CFU/ml. Elle peut les remplacer entièrement vers la mi-fermentation lorsque la consommation en sucre approche de la moitié (Shutz and Gafner, 1993; Constanti *et al.*, 1997; Guillamon *et al.*, 1998 ; Granchi *et al.*, 2003). La diminution de la disponibilité de l'oxygène dans les moûts favorise aussi la croissance de *S. cerevisiae* au dépend des non-*Saccharomyces* (Fleet, 2003). Certaines espèces peuvent toutefois persister jusqu'à la fin de la fermentation mais généralement en très faibles proportions et rarement (Gutiérrez *et al.*, 1999 ; Pramateftaki *et al.*, 2000).

On notera finalement que les bactéries lactiques interviennent aussi dans la transformation des moûts en vins mais nous ne développerons pas cet aspect outre mesure. Ces bactéries sont présentes dans les moûts de raisin et dans les vins et leur multiplication à un stade donné dépend des conditions du milieu. Elles assurent la transformation de l'acide malique en acide lactique, ou fermentation malolactique. Quand elles interviennent après la fermentation alcoolique, elles peuvent contribuer à la qualité des vins, principalement rouges, où cette fermentation est plus recherchée que dans les vins blancs (Ribereau-Gayon, 1998).

### **I.2.5 Facteurs influençant la diversité des espèces**

La diversité de la flore au cours de la fermentation dépend de la diversité initiale des moûts et de leur composition chimique, influencés par divers paramètres. Bien que l'effet de certains facteurs ne soit pas toujours confirmée (Beltran *et al.*, 2002), on attribue la variation de la composition des populations levuriennes et des proportions des différentes espèces d'une année à l'autre et d'une région à l'autre, à l'influence de la variété de raisin utilisée et son degré de maturité, à l'endommagement physique des grappes, à l'âge du vignoble et sa localité géographique ainsi qu'aux conditions climatiques prédominantes (Parish et Carroll, 1985 ; Longo *et al.*, 1991; Schutz et Gafner, 1994 ; Pramateftaki *et al.*, 2000). Par exemple les taux de précipitations élevés augmentent l'humidité et favorisent la prolifération des champignons ce qui affecte l'équilibre des levures (Longo *et al.*, 1991). Jouent aussi un rôle, l'existence de résidus de produits phytosanitaires, les conditions de la fermentation (comme la température), les interactions pouvant exister entre les différentes espèces qui peuvent moduler la disponibilité des nutriments et produire divers métabolites inhibiteurs ou au contraire favorables pour les autres espèces, ainsi que la faculté des espèces à supporter les divers stressés, comme le bas pH des moûts, la pression osmotique élevée, le manque d'oxygène ou l'addition de sulfite (Fleet, 2003, Landry *et al.*, 2006).

### **I.2.6 Intervention des non-*Saccharomyces* dans les fermentations**

Les levures non-*Saccharomyces* qui peuvent atteindre des populations de  $10^6$ - $10^7$  cellules/ml dans les fermentations naturelles peuvent contribuer significativement à la qualité finale des vins qui varie donc en fonction des espèces présentes (Lema *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 1997 ; Romano *et al.*, 2003).

Les différentes espèces qui interviennent dans les fermentations se caractérisent par des capacités fermentaires différentes que ce soit en terme de vitesse de fermentation ou de production d'éthanol. *K. apiculata* peut par exemple fermenter jusqu'à 5-6% d'éthanol. Ces espèces peuvent entrer en compétition avec *S. cerevisiae* pour les nutriments et donc elle affectent les cinétiques de croissance et le métabolisme de *S. cerevisiae*. Des effets indésirables des levures apiculées sont ainsi enregistrés comme un effet retardant de *K. apiculata* sur la fermentation conduite par *S. cerevisiae* (Herraiz *et al.*, 1990) et des arrêts de fermentation si les non-*Saccharomyces* persistent dans les fermentations à des taux significatifs (Gutiérrez *et al.*, 1999).

Les espèces non-*Saccharomyces* se caractérisent aussi par rapport à *S. cerevisiae* par une production différente de métabolites. En intervenant dans les fermentations dès leur début, en culture mixte ou séquentielle avec les *S. cerevisiae* et même à des taux plus faibles que *S. cerevisiae* les levures non-*Saccharomyces* affectent ainsi les profils aromatiques des vins (Herraiz *et al.*, 1990 ; Lema *et al.*, 1996 ; Romano *et al.*, 2003). Les vins produits par les souches les plus communément rencontrées dans les premières phases des fermentations, à savoir *H. uvarum* et *C. stellata*, se caractérisent par une forte production d'acétate d'éthyle et d'acétoïne (utilisé par *S. cerevisiae* pour produire du 2,3-butandiol) et une faible production d'alcools supérieurs (Romano *et al.*, 2003 ; **Figure 6**). La présence commune d'*H. uvarum* dans les phases initiales des fermentations pourrait aussi conduire à la formation de grandes quantités d'acide acétique (ITV, 2003 ; Romano *et al.*, 2003). D'autres espèces comme *Torulasporea delbrueckii* produisent un faible taux d'acidité volatile alors que *K. apiculata* et *Metschnikowia* produisent de grandes quantités d'acétate d'éthyle et d'acide acétique et la présence de *Schizosaccharomyces* conduit à une désacidification importante ou à l'apparition de goût de réduit (Herraiz *et al.*, 1990 ; ITV, 2003). Le sulfitage des moûts permet d'inhiber les levures sensibles oxydatives comme *Candida* ou peu alcoogènes comme *Kloeckera*, *Hanseniaspora* et *Metschnikowia* (ITV, 2003).

Pourtant, et même si généralement les non-*Saccharomyces* sont associées à des défauts olfactifs à cause de la forte concentration d'acétate d'éthyle, d'acide acétique, de molécules soufrées ou de la désacidification des moûts (Gutiérrez *et al.*, 1999 ; ITV, 2003), ces espèces ne sont pas toujours des sources de défauts. Par exemple, en initiant des fermentations avec des cultures mixtes de *S. cerevisiae* avec des souches sélectionnées de *Pichia anomala* et de *Hanseniaspora guilliermondii*, on a pu augmenter la production d'esters acétiques dont certains ont un impact positif sur le vin, tout en maintenant une même vitesse de fermentation, une même production de glycérol et d'acide acétique et un même taux global d'alcools supérieurs, et tout en gardant les valeurs d'acétaldéhyde dans la marge des concentrations acceptables. Pourtant une augmentation concomitante d'acétate d'éthyle a été notée (Rojas *et al.*, 2003). Le plus pertinent serait alors de jouer sur la capacité des différentes souches à produire les différents métabolites puisque les souches de non-*Saccharomyces* se caractérisent elles aussi par une diversité physiologique comme on le verra avec les souches de *S. cerevisiae*. Par exemple malgré la tendance globale de *H. uvarum* à produire des taux élevés d'acide acétique, certaines souches sont faiblement productrices (Romano *et al.*, 2003). Des différences de production d'acétoïne sont aussi enregistrées chez *H. guilliermondii* (Romano *et al.*, 1993). Une tendance se développe d'ailleurs actuellement pour l'utilisation de cultures

mixtes de souches choisies de *S. cerevisiae* et de non-*Saccharomyces* pour optimiser les profils aromatiques des vins (Rojas *et al.*, 2003 ; Romano *et al.*, 2003).

### **I.2.7 Sources des levures indigènes**

Il est admis que les levures non-*Saccharomyces* qui initient la fermentation trouvent leur origine sur la surface des grappes. La prédominance de certaines espèces (comme *Hanseniopsis*, *Candida* ou *Metschnikowia*) pourrait être due à des facteurs de compatibilités physiologiques et biochimiques avec la surface des grappes (capacité d'adhésion, disponibilité de métabolites), à une tolérance aux facteurs naturels de stress (comme la température, l'irradiation, la lumière solaire ou la déshydratation), et à des facteurs chimiques d'inhibition (provenant des grappes ou de produits phytosanitaires) ou aussi à des interactions entre espèces de levures, certaines, comme *M. pulcherrima* inhibant d'autres espèces dont *S. cerevisiae* (Fleet, 2003).

Quant à la source de *S. cerevisiae*, elle est encore un sujet de controverse. Cette espèce est pratiquement absente des grappes non endommagées et des vignobles ou alors présente à de très faibles taux qui font que son isolement direct sans enrichissement est difficile. *S. cerevisiae* est toutefois trouvée dans les caves à la surface des équipements et du matériel (Martini, 1993 ; Martini *et al.*, 1996 ; Fleet, 2003).

Ces observations ont donné lieu à plusieurs interprétations. Certains auteurs pensent que les populations de *S. cerevisiae* coloniseraient les caves et y résideraient d'une année à l'autre pour servir de source d'inoculation des nouveaux moûts à fermenter et revenir ensuite coloniser les caves lorsque des fermentations ne sont plus en cours (Martini, 1993 ; Martini *et al.*, 1996). La dominance plus rapide des fermentations par *S. cerevisiae* au fil des années observée dans une cave nouvellement implantée et donc dépourvue d'une flore résidente, pourrait ainsi être due à l'implantation successive de cette espèce dans la cave (Beltran *et al.*, 2002).

Alternativement, la source d'inoculation des fermentations naturelles, au lieu d'être une flore résidente dans les caves, pourrait être le vignoble d'où les levures sont transportées par les grappes ou les insectes vers les cuves de fermentation. Les levures retourneraient ensuite aux vignobles grâce aux insectes (Naumov, 1996).

On a aussi proposé que ce sont plutôt les grappes endommagées qui constituent la principale source d'inoculation des fermentations. *S. cerevisiae* serait apportée sur ces grappes

par les insectes qui s'en alimentent et elle proliférerait sur celles-ci car la pulpe du raisin y est plus accessible que sur les grappes intactes (Mortimer et Polsinelli, 1999).

### **I.2.8 Origine de *S. cerevisiae***

L'origine de *S. cerevisiae* qui a été trouvée en association avec des fermentations très anciennes (Cavalieri *et al.*, 2003), n'est pas plus clarifiée que sa source d'inoculation dans les moûts, mais on a actuellement tendance à penser que cette espèce existe naturellement en tant qu'espèce à part entière et que les souches retrouvées actuellement, auraient été domestiquées à partir de souches sauvages de *S. cerevisiae* (Landry *et al.*, 2006). Initialement, l'association plus fréquente de *S. cerevisiae* avec les activités humaines et son implantation dans les caves vinicoles ont poussé certains auteurs à stipuler que cette espèce est domestiquée et qu'elle est initialement inexistante dans la nature (Martini, 1993 ; Martini *et al.*, 1996). Sa présence occasionnelle dans les vignobles serait donc le fait, comme nous l'avons déjà mentionné, d'une inoculation par les insectes à partir des fermentations (Naumov, 1996).

Pourtant des exceptions ont été observées et *S. cerevisiae*, bien que généralement très rare dans les milieux naturels non associés à des activités humaines, a été retrouvée à des taux exceptionnellement élevés dans des sols de chênes comme l'ont montré Sniegowski *et al.* (2002).

Plus récemment, Fay et Benavides. (2005), en étudiant des isolats de *S. cerevisiae* de diverses sources (clinique, naturelle, fermentation de raisin et de saké) ont proposé que *S. cerevisiae*, présente à l'état sauvage dans la nature, aurait subi au moins deux événements de domestication ou du moins de sélection progressive de souches adéquates pour les fermentations. L'un des événements aurait conduit à l'apparition des souches vinicoles et l'autre à l'apparition d'une lignée de souches utilisées pour la production de saké.

### **I.2.9 Evolution adaptative de *S. cerevisiae***

On constate que la constitution du génome des souches œnologiques de *S. cerevisiae* est différente de celle des souches de laboratoire, les souches œnologiques étant souvent polyploïdes et/ou aneuploïdes, homothalliques, hautement hétérozygotes et se caractérisant par une grande capacité de réorganisations génomiques et par conséquent un niveau élevé de polymorphisme chromosomique (Bakalinsky et Snow 1990; Biddenne *et al.*, 1992; Guijo *et al.*, 1997; Codon *et al.*, 1998 ; Mortimer, 2000). On a même récemment proposé une "signature"

propre aux souches vinicoles industrielles qui se caractérisent par une série spécifique de délétions ou d'amplification de gènes, particulièrement une amplification d'un set de gènes subtélomériques sur le bras droit du chromosome I (Dunn *et al.*, 2005).

On suppose que l'aneuploïdie des souches leur confère des avantages sélectifs en leur permettant de s'adapter à diverses conditions environnementales, en augmentant le nombre de certains gènes utiles et en protégeant la levure de mutations délétères ou létales (Querol *et al.*, 2003). Pourtant les résultats de Dunn *et al.* (2005) n'ont pas confirmé l'aneuploïdie supposée de certaines souches commerciales. Mais cette étude n'a inclus qu'un nombre limité de souches industrielles ou académiques qui pourraient présenter une plus grande stabilité génomique par rapport aux souches sauvages étudiées auparavant, vu leur maintenance dans des conditions de culture plutôt constantes.

Il est probable que les réarrangements chromosomiques, les amplifications ou les délétions de gènes ou de régions génomiques observées chez *S. cerevisiae*, retenus à une fréquence relativement élevée en réponse à de fortes pressions sélectives, ont une valeur adaptative et des réarrangements bénéfiques pourraient être responsables d'une meilleure vigueur de certaines souches (Adams *et al.*, 1992 ; Codon *et al.*, 1998 ; Dunham *et al.*, 2002).

Dans le cas des souches vinicoles on suppose par exemple que l'utilisation de sulfite comme agent antimicrobien aurait exercé une pression sélective favorisant la fixation d'un réarrangement chromosomique. En effet, il a été observé qu'une translocation entre les chromosomes VIII et XVI est trouvée dans différentes souches vinicoles (et uniquement dans celles-ci) provenant de diverses régions géographiques (**Figure 7**). La fixation de ce réarrangement conférerait une meilleure résistance au sulfite en permettant la surexpression du gène SSU1 qui est associé à la résistance au sulfite et qui du fait de la translocation est placé sous le contrôle d'un nouveau promoteur. Ce promoteur du gène ECM34 inclut un nombre variable de répétitions d'une séquence de 76 pb selon les souches (Perez-Ortin *et al.*, 2002). Infante *et al.* (2003) ont obtenu un résultat similaire pour deux souches impliquées dans le vieillissement des vins de Xérès, où des cassures chromosomiques induites par l'exposition à l'éthanol et à l'acétaldéhyde conduisent à l'amplification de segments chromosomiques ce qui augmente le nombre et par conséquent l'expression de certains gènes intéressants trouvés dans ces régions.

Pour expliquer l'évolution des souches vinicoles, Mortimer *et al.* (1994) ont émis une théorie de "renouvellement du génome". Cette théorie suppose que les souches vinicoles naturelles dont la plupart sont homothalliques, accumulent des mutations hétérozygotes récessives spontanées avant de sporuler. Après la germination des spores, un changement de

type sexuel et une conjugaison des cellules ont lieu donnant naissance à des diploïdes homozygotes homothalliques où les mutations, auparavant récessives, peuvent s'exprimer. Ces diploïdes homozygotes rentrent en compétition entre eux et avec les hétérozygotes initialement présents, les mieux adaptés remplaçant éventuellement les autres. Mais il est encore incertain que la méiose soit très fréquente dans la reproduction des souches vinicoles, certains auteurs soulignent au contraire la rareté du phénomène vu le polymorphisme, l'aneuploïdie élevées des souches vinicoles et les faibles taux de viabilité de leurs spores (Puig *et al.*, 2000 ; Perez-Ortin *et al.*, 2002).

*S. cerevisiae* pourrait aussi évoluer en formant des hybrides interspécifiques avec les espèces du complexe sensu stricto. Ces hybrides possédant les caractéristiques des deux espèces parentales peuvent être mieux adaptés aux conditions fluctuantes qu'ils peuvent rencontrer (Querol *et al.*, 2003). La souche S6U, hybride entre *S. cerevisiae* et *S. bayanus*, est un exemple de souche ayant des caractéristiques technologiques intéressantes puisqu'elle produit certains composés aromatiques à des valeurs intermédiaires entre celles des espèces parentales (Masneuf *et al.*, 1998 ; Mortimer, 2000). Des souches commerciales utilisées en vinification sont aussi décrites comme étant des hybrides entre *S. cerevisiae* et d'autres espèces comme *S. kudriavzevii* (Bradbury *et al.*, 2006).

Les mécanismes évolutifs et adaptatifs de *S. cerevisiae* aux conditions de la vinification sont probablement responsables de l'induction d'une grande diversité moléculaire au sein de cette espèce. On observe en effet, outre l'implication de diverses espèces dans les fermentations, une intervention concomitante de plusieurs souches présentant une grande diversité moléculaire. Mais avant de rentrer dans les détails de cette diversité, nous allons exposer les diverses méthodes de typage moléculaire qui ont permis de mettre en évidence la diversité interspécifique de *S. cerevisiae*.

### **I.3. Les méthodes d'identification et de typage des levures vinicoles**

#### **I.3.1 L'identification des levures**

L'identification et la classification des levures en général, et des levures œnologiques en particulier, ont connu une grande évolution depuis la première division des levures par Hansen en sporogènes et asporogènes. Les critères d'identification se basaient sur des observations de la morphologie, de la physiologie et de la biochimie des levures pour assurer

une délimitation de l'espèce. La forme des cellules et leurs dimensions, la sporulation, l'assimilation de composés azotés et de sucres, la fermentation de ces derniers, le besoin en facteurs de croissance ou encore la résistance au cycloheximide étaient pris en compte (Barnett et al., 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Mais le temps requis pour effectuer de tels tests étant assez long, des kits plus rapides d'identification (comme les galeries API) ont été développés et appliqués aux levures œnologiques. Pourtant la classification basée sur de tels critères rencontre des difficultés liées à la variabilité intraspécifique de certains paramètres et d'une variabilité durant la multiplication végétative pour une même souche (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Même si ces méthodes sont encore utilisées aujourd'hui, et même quand elles permettent de différencier les souches types des différentes espèces, ce qui n'est pas toujours le cas (comme par exemple pour le groupe sensu stricto des espèces apparentées du genre *Saccharomyces*), elles ne sont pas toujours fiables pour assigner une nouvelle souche à une espèce. Avec le développement des techniques moléculaires, une identification plus fiable et plus rapide des espèces est devenue possible même si des ambiguïtés de classification peuvent subsister. Les méthodes d'identification "classique" sont encore utilisées pour une identification préliminaire qui aide à cibler le typage subséquent et qui permet de caractériser la variabilité phénotypique au sein de l'espèce.

Les méthodes moléculaires se basant sur l'analyse des unités répétées de l'ADN ribosomique (ADNr) sont le plus largement adoptées pour la délimitation des espèces de levures (**Figure 8**). On a le plus souvent recours à l'amplification et à la restriction de la région variable ITS1-5.8S-ITS2 (ITS pour Internal Transcribed Spacer) grâce à des amorces situées dans des séquences flanquantes conservées dans les unités 18S et 26S (Molina *et al.* 1992; Guillamón *et al.* 1998 ; Pramateftaki *et al.*, 2000 ; Beltran *et al.* 2002 ; Lopes *et al.*, 2002). Un grand nombre d'espèces a aussi été caractérisé grâce à l'amplification et au séquençage de la région variable des domaines D1/D2 de la 26S (Kurtzman et Robnett, 1997 ; Kurtzman et Robnett, 1998). On a proposé récemment l'évaluation de la mobilité des hétéroduplex formés après la dissociation et la ré-association des amplifiats (Ramos *et al.*, 2001). L'amplification et la restriction de la NTS2 à l'aide d'amorces situées dans l'unité 5S et l'ETS (External Transcribed Spacer) (Nguyen et Gaillardin, 1997 ; Nguyen *et al.*, 2000a ; Nguyen *et al.*, 2000b) a notamment été utile pour la différenciation des espèces dans le groupe *Saccharomyces* sensu stricto (Nguyen et Gaillardin, 1997 ; Nguyen *et al.*, 2000). A cet effet on a aussi proposé d'autres amplifications dans l'ADNr (Josepa *et al.*, 2000), une PCR/RFLP du gène MET2 (Masneuf *et al.*, 1996), alors que les méthodes basées sur des hybridations de sondes (Naumov *et al.*, 1992), ou l'estimation du pourcentage de

réassociation d'ADN génomique ont été abandonnées au vu de leur complexité (Vaughan-Martini et Kurtzman, 1985).

### **I.3.2 Le typage des levures**

Le recours aux méthodes moléculaires a aussi ouvert la voie à la différenciation entre différentes souches au sein d'une même espèce alors que l'utilisation des critères physiologiques se limitait à l'identification des espèces (Poulard *et al.*, 1980; Heard et Fleet, 1985; Parish et Carroll, 1985 ; Pardo *et al.*, 1989). La nécessité de différencier les souches œnologiques a particulièrement induit le développement de méthodes très diverses. Ces méthodes ont été appliquées à l'étude de l'écologie des flores levuriennes dans des fermentations spontanées et de la diversité biogéographique, à la détermination de parentés par des études phylogéniques, à la constitution et à l'entretien de collections ou encore au suivi de l'implantation des levures pré-sélectionnées dans les moûts inoculés pour s'assurer de la réussite de la colonisation. De plus la détermination sans ambiguïté de la souche en vue d'une sélection ou de sa vente comme levure sèche est importante, à la fois pour le producteur de levures et le vinificateur, pour s'assurer de la pureté et de l'identité du produit vendu d'autant qu'il arrive que la même souche soit commercialisée sous des noms différents par la même compagnie ou par des compagnies différentes (Fernandez-Espinar *et al.*, 2001).

Beaucoup de méthodes ont été développées pour le typage des *S. cerevisiae*, dont les premières étaient l'analyse des caryotypes et la restriction de l'ADN mitochondrial et ces deux méthodes ont été très adoptées (Querol *et al.*, 1992b ; Vezinhet *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1995, Nadal *et al.*, 1996; Codon *et al.*, 1998; Nadal *et al.* 1999; Comi *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2001). L'amplification des régions entre deux LTR delta de transposons est aussi très largement appliquée (Ness *et al.*, 1993; Legras and Karst, 2003) alors que le typage des *S. cerevisiae* par l'analyse de marqueurs microsatellites est encore moins utilisé (Gallego *et al.*, 1998; Hennequin *et al.*, 2001, Techera *et al.*, 2001 ; Legras *et al.*, 2005). D'autres méthodes basées sur des amplifications par PCR ont aussi été développées comme les amplifications d'introns (de Barros Lopez, 1998 ; Lopez *et al.*, 2003) ou la RAPD qui peut être associée à des analyses de restriction ou au séquençage (Quesada *et al.*, 1995 ; McGrath *et al.*, 1998 ; Perez *et al.*, 2001a). Mais l'application des amplifications d'introns n'a pas été explorée, alors que la discrimination des RAPD dépend énormément des amorces utilisées et des conditions expérimentales (Baleiras-Couto *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 2001a) : les profils générés peuvent être instables à cause d'hybridations non spécifiques des amorces (Gil-Lamaignere *et al.*,

2003) ce qui fait que la reproductibilité n'est pas seulement affectée entre différents laboratoires mais au sein d'un même laboratoire. Plus récemment l'utilisation des puces d'ADN comme outil de typage des souches (Winzeler *et al.*, 1999 ; Dunn *et al.*, 2005) ou d'étude de phylogénies inter et intra-spécifique a été proposée (Edwards-Ingram *et al.*, 2004). Cette technologie, qui permet également l'identification de QTL (Steinmetz *et al.*, 2002), n'est pas encore facilement accessible et coûteuse pour le typage d'un grand nombre d'isolats.

Dans ce qui suit nous allons parler des deux méthodes les plus utilisées jusqu'à présent pour le typage des *S. cerevisiae* à savoir la restriction de l'ADNmt et l'analyse des caryotypes. Ces deux méthodes ayant été au fur et à mesure remplacées par l'amplification des séquences interdelta nous exposerons aussi cette méthode ainsi que l'analyse par les microsatellites, efficace et toujours prometteuse pour la différenciation des souches de *S. cerevisiae*. Nous exposerons enfin la méthode que nous avons choisi de développer pour le typage des *S. cerevisiae*, le MLST ou Multilocus Sequence Typing.

### **I.3.2.1 Polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN mitochondrial**

L'ADN mitochondrial (ADNmt) de *Saccharomyces cerevisiae* constitue ~15% de son contenu en ADN (Williamson, 2002). Plusieurs copies (~50) de cet ADN coexistent dans une même cellule et sont empaquetées dans des structures appelées nucléoides ou chondriolites espacées périodiquement dans les tubules mitochondriaux et variant en nombre et en taille selon les conditions physiologiques (Berger et Yaffe, 2000 ; Williamson, 2002). Cet ADNmt code uniquement une petite partie du protéome mitochondrial alors que la plupart des protéines sont codées par des gènes nucléaires (Gray *et al.*, 2001). Contrairement à ce qui a longtemps été établi, les molécules d'ADNmt qui ont une taille variable entre 75 et 150Kb sont présentes sous une forme principalement linéaire et un petit nombre uniquement de molécules est circulaire (Maleszka et Clark-Walker, 1992 ; Williamson, 2002 ; Foury *et al.*, 2004). L'ADNmt se caractérise par une teneur exceptionnellement élevée en bases A/T (~80%) par rapport à l'ADN nucléaire, une ségrégation frappante entre les régions riches en G/C et celles riches en A/T (Pon et Schatz, 1991), la présence d'introns, une faible densité de gènes (Foury *et al.*, 1998), et un taux élevé de recombinaison homologue intra-mitochondriale (Dujon, 1981 ; Williamson, 2002). La richesse en A/T de l'ADNmt pourrait être liée à une déficience dans l'activité d'ADN-Uracil glycosylase pour la réparation de l'accumulation d'uracile (par désamination spontanée de cytosine) ce qui conduit à des transitions GC/AT

(Chatterjee et Singh, 2001). Cette richesse a été mise à profit pour le séparer de l'ADN nucléaire ou pour digérer plus spécifiquement ce dernier.

La survenue d'additions ou de délétions dans l'ADNmt conduit à l'apparition d'un polymorphisme de taille des molécules. Ces mutations peuvent être de très grande taille mais peu fréquentes dans les introns, de plus petite taille (10-150 bp) mais plus fréquentes dans les régions intergéniques ou alors très petites (de l'ordre de 3bp) ou ponctuelles (de Zamaroczy et Bernardi, 1986). La détection du polymorphisme de l'ADNmt se base sur sa restriction par des endonucléases qui génèrent des fragments d'ADN de longueurs différentes selon la nature et l'emplacement des sites de restriction. Les variations observées dans les profils entre les différentes souches sont le résultat des mutations advenant dans les séquences des sites de restriction, l'acquisition ou la perte de sites de reconnaissance, ou l'apparition d'insertions ou de délétions dans les séquences entre deux sites de restriction.

L'analyse du polymorphisme de l'ADNmt a été utilisée au départ pour la caractérisation des levures de bière (Aigle *et al.*, 1984; Lee et Knudsen, 1985) pour être ensuite appliquée à la caractérisation des levures vinicoles (Dubourdiou *et al.*, 1987). Plusieurs méthodes ont été développées et les premières recouraient à l'isolement de l'ADNmt par sa séparation sur gradient de chlorure de césium (CsCl) en utilisant un agent intercalant ayant une affinité pour les AT (Aigle *et al.*, 1984; Dubourdiou *et al.*, 1987 ; Gargouri, 1989). Ces manipulations nécessitant près de 4 jours de travail ont été simplifiées et accélérées par Querol et Barrio (1990) qui ont séparé les mitochondries des autres constituants cellulaires avant d'en extraire l'ADN, évitant ainsi le recours à la centrifugation avec gradient de CsCl.

Des schémas de restriction développés par la suite en vue d'applications industrielles, beaucoup moins compliqués et plus rapides (Querol *et al.* 1992a, Lopez *et al.*, 2001), ont été très largement adoptés pour le typage des levures vinicoles de l'espèce *S. cerevisiae* (Vezinhet *et al.*, 1990 ; Querol *et al.*, 1992b ; Martinez *et al.*, 1995; Constanti *et al.*, 1997 ; Sabate *et al.*, 1998). Sans recourir à la purification de l'ADNmt, ces schémas se basent plutôt sur l'extraction de l'ADN total. Ce dernier est ensuite digéré par des enzymes de restriction ayant comme cible des séquences comportant les bases G et C et reconnaissant par conséquent un plus grand nombre de sites dans l'ADN nucléaire. Les profils ainsi générés sur gels d'agarose correspondent à des fragments d'ADNmt alors que l'ADN nucléaire est quasiment détruit.

Un polymorphisme marqué des souches œnologiques a pu être mis en évidence par la restriction de l'ADNmt et ce polymorphisme est souvent attribué à l'action de l'éthanol car l'exposition à cet agent induit une augmentation considérable dans le taux d'apparition de souches mutantes respiro-déficientes (Jimenez *et al.*, 1988 ; Castrejón *et al.*, 2002). Ces

souches sont appelées “petites” à cause des petites colonies qu’elles forment sur milieu solide en présence de sucre fermentescible et elles possèdent un ADNmt dégénéré formé de fragments résiduels de l’ADNmt originel ou alors elles manquent complètement d’ADNmt. On a mis en évidence pour les souches de *S. cerevisiae* formant des films à la surface des vins de Xérès et poussant en présence de fortes concentrations d’éthanol et d’acétaldéhyde et dans des conditions de stress oxydatif, que l’induction de l’apparition de mutantes petites est graduelle puisque des lésions dans l’ADNmt précèdent sa perte totale (Castrejón *et al.*, 2002). On sait par ailleurs que des mutations survenant dans de nombreux gènes impliqués par exemple dans la maintenance et la stabilité de l’ADNmt ou sa transmission peuvent induire l’apparition de mutantes petites (Berger et Yaffe, 2000 ; Contamine et Picard, 2000). Parmi ces gènes figurent des gènes prévenant l’accumulation de produits réactifs de l’oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) qui ont un effet délétère sur l’ADNmt (Contamine et Picard, 2000). Durant le vieillissement des vins de Xérès et dans les conditions décrites ci-dessus, on a relié l’effet de l’éthanol (qui pourrait agir via l’acétaldéhyde) à l’induction de la formation de composés ROS (Castrejón *et al.*, 2002) ou à la destruction de la membrane mitochondriale à laquelle l’ADNmt est associé (Ibeas et Jimenez, 1997 ; Jimenez *et al.*, 1988). Mais dans les vins les concentrations en acétaldéhyde et en éthanol sont moindres et le métabolisme n’est pas oxydatif et les lésions conduisant à l’apparition de mutantes petites peuvent être de nature ou d’ampleur différentes que celles des lésions responsables du polymorphisme de l’ADNmt des souches des vins de Xérès.

En dépit de l’efficacité de la RFLP de l’ADNmt pour différencier les souches de *S. cerevisiae*, son pouvoir discriminant dépend énormément de l’enzyme utilisée, certaines étant moins discriminantes que d’autres (Fernandez-Espinar *et al.*, 2001 ; Schuller *et al.*, 2004 ; **Figure 9**). L’association de deux enzymes ou la combinaison de cette méthode avec d’autres techniques sont donc parfois nécessaires pour augmenter son niveau de résolution (Pramateftaki *et al.*, 2000 ; Fernandez-Espinar *et al.*, 2001). Le choix de l’enzyme à utiliser doit se faire avec précaution pour obtenir un nombre optimal de bandes et un niveau maximal de résolution. Les profils générés peuvent comporter des traînées d’ADN digéré qui réduisent la clarté des profils et compliquent les analyses subséquentes (**Figure 10**). Par contre la reproductibilité de cette méthode est souvent supérieure à celles des méthodes basées sur des amplifications par PCR. La comparaison des résultats entre différents laboratoires est donc *a priori* possible à condition d’adopter des conditions bien standardisées.

### I.3.2.2 Analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé

*Saccharomyces cerevisiae* possède 16 chromosomes variant en taille de ~240 kb pour le chromosome I à plus de 2000 kb pour le chromosome XII dont la taille dépend du nombre variable (entre 100 et 200) des répétitions en tandem de l'ADNr (Olson, 1991). La publication d'une carte complète des chromosomes en 1985 (Carle et Olson, 1985) n'a été rendue possible qu'avec l'apparition de l'électrophorèse en champ pulsé ou PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). Cette méthode consiste à alterner l'orientation du courant électrique durant l'électrophorèse et permet la séparation de molécules d'ADN de grandes tailles (Schwartz, 1983 ; Carle et Olson, 1984).

Durant l'électrophorèse classique en champ statique, les molécules de plus de 20kb s'alignent avec le champ électrique et ont par conséquent une même surface transversale (Birren et Lai, 1993), ce qui fait qu'elles migrent avec la même mobilité indépendamment de leur taille et forment une même et large bande dans le gel. Ce n'est qu'en adoptant des conditions spéciales de séparation que des molécules d'ADN d'une taille maximale de ~50 kb peuvent être séparées avec l'électrophorèse classique. La PFGE a permis de séparer de grandes molécules d'ADN en les forçant à changer de direction de migration durant l'électrophorèse sous l'impulsion d'un champ électrique re-orienté. Sous ces conditions, les molécules qui ont les plus petits poids moléculaires et qui sont donc les moins longues changent de conformation et adoptent la nouvelle orientation plus aisément que les grandes et commencent à migrer plus rapidement dans les mailles du gel (Chu, 1991). Les molécules migrent en ligne droite tant que le voltage et les pulsions entre deux changements d'orientation sont constants (Birren et Lai, 1993).

Plusieurs termes sont actuellement utilisés en rapport avec la PFGE pour désigner des systèmes d'électrophorèse utilisant différentes méthodes de réorientation des courants électriques qui sont homogènes ou pas, et diverses géométries des électrodes (**Figure 11**). Mais tous ces designs se basent sur le même principe de séparation des molécules et aboutissent à la même limite de résolution. Les différences générées entre ces systèmes concernent principalement la courbature des profils, la vitesse de séparation, la capacité de résolution dans une marge particulière de tailles et la portion du gel donnant une bonne séparation (Birren et Lai, 1993). Quel que soit le système adopté, des chromosomes entiers et intacts peuvent être séparés en gel d'agarose en les encastrant dans des plugs d'agarose pour les protéger des pressions physiques (Carle et Olson, 1985).

Chez *S. cerevisiae* les 16 chromosomes ne sont généralement pas résolus en 16 bandes. Par exemple les chromosomes de la souche AB972 (isogénique de la souche S288C) sont séparés en 14 bandes dont deux représentent des doublets de chromosomes de même taille (les chromosomes V et VIII et les chromosomes VII et XV). Le chromosome XII, particulièrement polymorphe à cause de la présence des répétitions d'ADNr, peut avoir une faible intensité à cause du piégeage dans le gel de ses molécules d'ADN de grande taille et il peut présenter une migration aberrante à cause d'un phénomène d'inversion de mobilité (Olson, 1991). Ce phénomène consiste en une migration plus rapide des grandes molécules car la migration n'est pas toujours une fonction directe de la taille, ce qui fait que des molécules de tailles différentes peuvent avoir la même mobilité durant les réorientations successives du courant. L'inversion de mobilité ne dépend pas d'une conformation particulière du chromosome ou d'une structure qui lui serait associée (Birren et Lai, 1993).

Une variabilité considérable a été observée dans la constitution des chromosomes des souches œnologiques commerciales et naturelles (Vezinhet *et al.*, 1990 ; Bidenne *et al.*, 1992 ; Guillamon *et al.*, 1995 ; Codón *et al.*, 1998), principalement un polymorphisme de taille des chromosomes mais aussi un niveau de ploïdie variable des souches naturelles (Querol *et al.*, 2003). Le niveau élevé de polymorphisme de longueur des chromosomes chez les souches vinicoles de *S. cerevisiae* est dû à un changement de longueur des séquences répétées en tandem ou à des réarrangements chromosomiques induits par la présence de séquences répétées qui agissent comme sites d'homologies pour des recombinaisons. Les éléments transposables peuvent être impliqués, ou d'autres séquences répétées dispersées ou répétées en tandem comme les séquences répétées subtélomériques Y' (Benitez *et al.*, 1996 ; Casaregola *et al.* 1998 ; Rachidi *et al.* 1999 ; Querol *et al.*, 2003) ou les microsatellites (Ayres Sia *et al.*, 1997b ; Wierdl *et al.*, 1997). Les recombinaisons peuvent conduire à des délétions intrachromosomiques, à des échanges chromosomiques inégaux entre homologues ou à des translocations ectopiques et à des changements de longueur des répétitions subtélomériques (Zolan, 1995 ; **Figure 12**). Ces réarrangements chromosomiques sont probablement liés à un processus sélectif permettant l'adaptation des souches aux conditions environnementales et industrielles (Zolan, 1995 ; Benitez *et al.*, 1996 ; Infante *et al.*, 2003 ; Querol *et al.*, 2003 ; revoir supra I.2.9 et la **Figure 7**).

L'analyse des caryotypes est efficace pour la différenciation des souches vinicoles mais le handicap majeur de cette méthode est sa difficulté de mise en œuvre surtout au niveau industriel. Elle est complexe et laborieuse et elle nécessite un équipement plutôt cher et un temps de manipulation assez long et le nombre d'isolats qu'on peut analyser à la fois est assez

limité. De plus cette méthode distingue uniquement de grandes différences dans la longueur des chromosomes et passe outre les petits changements ou les mutations ponctuelles. Elle peut par contre détecter des différences (par exemple des événements de translocations) qui ne seraient pas visibles en utilisant des méthodes comme la restriction de l'ADNmt ou des méthodes basées sur l'amplification de marqueurs dispersés dans le génome comme par exemple les microsatellites (Schuller *et al.*, 2004). Il est clair qu'une grande probabilité d'homoplasie existe et des bandes de mêmes tailles ne sont pas forcément homologues (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003)

### **I.3.2.3 Amplification par PCR des séquences entre deux LTR delta**

Le génome de *Saccharomyces cerevisiae* contient un grand nombre de séquences répétées dont les rétrotransposons Ty et les séquences qui leur sont relatives. Plus de 300 insertions d'éléments Ty (rétrotransposons complets, LTR ou fragments de LTR) ont été trouvées dans le génome de *S. cerevisiae* dont une cinquantaine de rétrotransposons complets, nombre qui est très élevé par rapport aux autres hemiascomycètes (Neuveglise *et al.*, 2002). La transposition qui se fait à une fréquence de  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  transposition par élément Ty1 et par génération (Roth, 2000) pourrait être plus active chez *S. cerevisiae* que chez des espèces apparentées comme *S. paradoxus* ou *S. bayanus* qui ne contiennent pas de séquences de Ty2 (Naumov *et al.*, 1992). Elle est néanmoins moins active chez les souches vinicoles que chez les souches de laboratoire ou chez les souches de boulangerie qui contiennent un plus grand nombre d'éléments Ty1 ou Ty2. La transposition est réprimée à l'état diploïde, caractéristique des souches sauvages de *S. cerevisiae*, et déréprimée à l'état haploïde, caractéristique des souches de laboratoire (Codon *et al.*, 1998 ; Hauser *et al.*, 2001).

La structure des rétrotransposons ressemble à celle des rétrovirus et leur mode de transposition, via des intermédiaires d'ARN, à la réplication rétrovirale (Boeke, 1989). En effet, les rétrotransposons sont flanqués par des LTR (ou long terminal repeats) et comprennent deux ORF (TyA et TyB) analogues aux gènes rétroviraux *gag* et *pol*. TyA code la principale protéine constituant les VLP (Virus-Like Particules) qui encapsule les éléments nécessaires à la transcription reverse des rétrotransposons durant leur séjour extranucléaire précédant l'intégration dans le génome de l'ADNc nouvellement synthétisé (Roth, 2000). TyB code les enzymes requises pour la transposition: une protéase (PR), une intégrase (IN), une transcriptase reverse (RT) ainsi qu'un domaine RNaseH (RH) (Roth, 2000). Les rétrotransposons sont divisés en deux groupes (Ty1/*copia* et Ty3/*gypsy*) selon l'organisation

des éléments qui constituent le gène *pol* et la conservation des séquences codant la transcriptase reverse (Xiong et Eickbush 1990). Quatre familles d'éléments Ty1/*copia* existent (les Ty1, Ty2, Ty4, et Ty5) et un élément Ty3/*gypsy* (Ty3) (**Figure 13**). Une trentaine de rétrotransposons complets du type Ty1 et une dizaine du type Ty2 ont été trouvés chez *S. cerevisiae* mais très peu de rétrotransposons Ty3 et Ty4 (Kim *et al.*, 1998), alors que les éléments Ty5, très rares, ne comportent pas de rétrotransposons actifs mais des éléments LTR solos ou des éléments dégénérés (Zou *et al.*, 1996).

La transposition se fait par un mécanisme de transcriptase reverse et utilise comme amorce une séquence d'ARNt de l'hôte complémentaire à une séquence appelée PBS en 5' du LTR (Neueglise *et al.*, 2002). Les transposons répliqués s'intègrent généralement préférentiellement dans des séquences cibles plus ou moins spécifiques en y générant une duplication de 5pb (Kim *et al.*, 1998). Les éléments Ty1 à Ty4 sont principalement retrouvés à proximité de gènes transcrits par l'ARN polymérase III comme les gènes d'ARNt alors que les Ty5 s'intègrent dans des régions télomériques et subtélomériques (Zou *et al.* 1996 ; Zou and Voytas 1997 ; Kim *et al.*, 1998). Cette spécificité d'insertion est un mécanisme de survie permettant aux rétrotransposons de se maintenir à long terme dans les génomes alors que la levure a développé des mécanismes de répression de la transposition et d'élimination des transposons pour éviter leur accumulation excessive (Jordan et McDonald 1999).

Mais les transposons qui participent au remodelage des génomes par leur transposition ou par leur intervention dans des réarrangements chromosomiques qui se font par le biais de recombinaisons entre LTR peuvent ainsi induire des changements avantageux pour la levure (Zolan *et al.*, 1995 ; Kim *et al.*, 1998 ; Roth, 2000). Les recombinaisons entre LTR peuvent aussi conduire à des délétions des régions codantes des rétrotransposons laissant la place à des éléments LTR en solo. Ce mécanisme est d'ailleurs une stratégie d'élimination des insertions de rétrotransposons par la levure (Kim *et al.*, 1998 ; Jordan et McDonald 1999 ; **Figure 14**). Les éléments LTR solo sont beaucoup plus abondants que les éléments associés à des rétrotransposons ce qui atteste de l'efficacité de l'élimination des transposons et ils sont plus variables (Boeke, 1989 ; Jordan and McDonald, 1999).

Les LTR les plus abondants sont les éléments delta relatifs aux rétrotransposons Ty1 et Ty2. On en trouve ~250 copies chez *S. cerevisiae* dont une trentaine de rétrotransposons Ty1 entiers et une dizaine de Ty2 (Kim *et al.*, 1998). La variation de ces éléments dans les génomes de différentes souches de *S. cerevisiae* a été mise à profit pour identifier ces souches. Une amplification par PCR des séquences d'ADN génomique comprises entre deux éléments delta permet la génération de profils électrophorétiques différents. En effet selon l'orientation

des éléments delta, la taille de la séquence incluse entre deux éléments, le nombre et la localisation des éléments delta, des fragments polymorphes variant en taille et en nombre sont amplifiés (**Figure 15**).

#### **I.3.2.4 Typage par des marqueurs Microsatellites**

Les microsatellites sont de courtes séquences formées de répétitions en tandem de 1 à une dizaine de nucléotides. Ces séquences sont dispersées dans tout le génome de la levure, à la fois dans les régions codantes et non codantes (Richard et Dujon, 1996 ; Toth *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2004) mais leur taux est moindre dans les régions codantes (Li *et al.*, 2004).

Un biais de distribution des différentes répétitions est observé, les trinucleotides (ou TNR pour trinucleotide repeat) étant essentiellement localisés dans les ORFs (Young *et al.*, 2000) alors que les mono, di et tétra-nucléotides se trouvent principalement dans les régions non-codantes (Richard et Dujon, 1996, Li *et al.*, 2004). La nécessité d'une non perturbation de la phase de lecture de l'ORF est probablement responsable de ce biais d'insertion (Young *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2004). On observe aussi que le polymorphisme des TNR est plus grand dans les ORF que dans les régions intergéniques (Richard et Dujon, 1996) et que selon la protéine impliquée et l'acide aminé codé les insertions de microsatellites peuvent être plus nombreuses et donc certains TNR peuvent être favorisés (Young *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2004). Les TNR codant des acides aminés hydrophobes sont par exemple peu rencontrés (Young *et al.*, 2000). Tout ceci suggère que les microsatellites, et particulièrement les TNR dans les ORF, agissent comme une source de variations et jouent un rôle dans l'évolution du génome de la levure.

L'instabilité des microsatellites peut être expliquée par des phénomènes de recombinaisons inégales induites par l'appariement de répétitions de microsatellites ou par le glissement de la polymérase en cours de réplication (Henderson et Petes 1992 ; Ayres Sia *et al.*, 1997b ; Wierdl *et al.*, 1997). Ce dernier phénomène se caractérise par la succession des événements suivants: l'arrêt et la dissociation de la polymérase, la dissociation du brin nouvellement synthétisé et du brin matrice, la réassociation décalée des deux brins induite par la nature répétitive de la séquence et la reprise de l'activité de la polymérase (Viguera *et al.*, 2001). Suite à la réassociation décalée, une structure en boucle de bases non appariées est créée sur le brin matrice ou sur le brin nouvellement synthétisé et conduit respectivement, si elle n'est pas réparée, à une perte ou à un gain de répétitions (Ayres Sia *et al.*, 1997 ; **Figure 16**). Les mécanismes de réparation des mésalignements semblent beaucoup plus efficaces sur

le brin matrice et les délétions indépendamment de la taille de la boucle formée, alors que pour les additions sur le brin naissant l'efficacité de la réparation diminue avec la taille de la boucle et n'est plus efficace après une certaine limite (Tran *et al.*, 1996 ; Ayres Sia *et al.*, 1997).

Des mutations dans les gènes impliqués dans la polymérisation de l'ADN lors de sa réplication et dans la réparation des mésalignements d'ADN augmentent le taux de mutation des microsatellites (Ayres sia *et al.*, 2001). Ce taux est aussi en relation avec l'augmentation du taux de glissement de la polymérase dont la probabilité de survenue s'accroît avec le nombre de répétitions et la longueur du microsatellite (Toth *et al.*, 2000 ; Sibly *et al.*, 2001). Ce glissement n'a quasiment pas lieu pour les microsatellites d'une taille inférieure à une dizaine de pb étant donné qu'une séquence de cette longueur est probablement requise pour la réassociation des deux brins après leur dissociation (Rose et Falush, 1998 ; Sibly *et al.*, 2001). On pense que le glissement de la polymérase agit en parallèle avec l'action de mutations ponctuelles qui cassent les répétitions en unités plus petites (Kruglyak *et al.* 1998). Cette dégénérescence crée des motifs imparfaits ce qui diminue le taux de glissement de la polymérase (Petes *et al.*, 1997) et on observe que des motifs imparfaits de trinuécléotides sont plus stables que les motifs parfaits (Richard et Dujon, 1996).

#### **I.3.2.5 MLST, Multi Locus Sequence Typing**

Le MLST a été proposé par Maiden *et al.* (1998) pour la caractérisation de microorganismes pathogènes en remplacement d'une méthode qui était largement utilisée à cette fin, la MLEE. Cette dernière se base sur l'évaluation indirecte de la variation génétique de gènes de ménage en suivant le polymorphisme de leurs produits par l'évaluation de leurs mobilités électrophorétiques. En effet la migration d'enzymes cellulaires durant l'électrophorèse est fonction de leur charge électrostatique nette et dépend donc de la séquence d'acides aminés de la protéine. Les variantes électrophorétiques d'une enzyme (ou allozymes) sont sélectivement visualisées après extraction et électrophorèse des protéines. Deux bandes d'une même protéine reflètent la présence de deux allèles de cette protéine (Selander *et al.*, 1986).

Cette méthode capable de détecter 80-90% des substitutions d'acides aminés d'une enzyme (Selander *et al.*, 1986) est très efficace pour la discrimination des souches si un bon choix de marqueurs est fait et elle est aussi utile pour les analyses de génétique de populations. Mais la principale critique de cette méthode, développée à une époque où le

séquençage automatisé à grande échelle n'était pas encore disponible, concerne précisément son évaluation indirecte de la variation génétique (Selander *et al.*, 1986, Enright et Spratt, 1999). Les mutations n'affectant pas la mobilité électrophorétique restent donc indétectables, comme les changements nucléotidiques induits par une mutation synonyme. Par ailleurs, et même si la mutation n'est pas synonyme et que l'acide aminé est modifié, la mobilité électrophorétique de la protéine ne l'est pas forcément et donc des bandes considérées comme étant un même allèle d'une protéine peuvent en vérité ne pas l'être (Selander *et al.*, 1986 ; Taylor *et al.*, 1999). De plus la MLEE requière l'utilisation de plusieurs marqueurs, elle est assez laborieuse et difficilement comparable entre différents laboratoires (Enright et Spratt, 1999).

Pour pallier les défauts de la MLEE et ceux des autres méthodes de typage qui se basent sur la détection de différences génomiques non caractérisées, le MLST a été développé. Cette méthode repose sur le séquençage de fragments nucléotidiques de 400-500 pb d'un nombre limité de gènes de ménage polymorphes pour identifier leurs différents allèles. Le MLST détecte une plus grande variabilité par rapport à la MLEE puisque des mutations restées silencieuses sont mises en évidence (Maiden *et al.*, 1998 ; Enright et Spratt, 1999). Pour chaque locus, les différentes séquences sont assignées comme des allèles différents et pour chaque isolat, la combinaison des allèles à chaque locus définit un profil allélique ou ST (Sequence Type). Les schémas de MLST se basent sur l'étude de gènes de ménage au niveau desquels la variation s'accumule lentement et ils devraient donner des résultats plus fiables pour la déduction des relations phylogéniques.

Le MLST appliqué en premier lieu à *Neisseria meningitidis* a été très largement adopté pour les études d'épidémiologie globale d'autres bactéries pathogènes (Enright et Spratt 1999, Urwin and Maiden 2003, Cooper et Feil 2004). A l'époque du développement des premiers schémas de MLST, on pouvait déterminer avec précision une séquence de 400-500 pb sur les deux brins et à l'aide d'une seule paire d'amorces. Cette longueur, associée à un nombre moyen de 7 loci, a souvent été suffisante pour indexer une grande variabilité entre les isolats bactériens et identifier un grand nombre de génotypes tout en permettant l'analyse des structures des populations. La congruence du MLST avec la MLEE a souvent été démontrée et cette méthode de typage est maintenant adoptée comme la méthode de référence pour un grand nombre d'organismes pathogènes (Enright et Spratt, 1999).

## I.4. Diversité interspécifique de *Saccharomyces cerevisiae*

### I.4.1 Diversité moléculaire

#### I.4.1.1 Diversité au sein d'une même fermentation

Les études de l'écologie des moûts, de la dynamique et de la diversité des flores de levures intervenant dans les fermentations se sont développées avec l'apparition des méthodes de typage moléculaire que nous avons exposées. La plupart des études explorant les flores des fermentations naturelles s'accordent sur l'observation de la contribution de plus d'une souche de *S. cerevisiae* et d'une diversité généralement assez prononcée de celles-ci accompagnée d'une dynamique de substitution des souches, certaines prenant le dessus et d'autres disparaissant (Schutz and Gafner, 1994; Versavaud *et al.*, 1995 ; Sabate *et al.*, 1998 ; Pramateftaki *et al.*, 2000 ; **Figure 17**). Par exemple en associant le typage par RFLP de l'ADNmt (en utilisant les deux enzymes *CfoI* et *HinfI*) au typage interdelta (avec les amorces de Ness *et al.*, 1993) on trouve dans une même cuve en fermentation 65 profils différents pour un total de 103 isolats, 51 pour 59, 74 pour 143 ou 40 pour 75 (Pramateftaki *et al.*, 2000). En associant l'analyse des caryotypes avec la restriction de l'ADNmt (*EcoRV*) pour analyser la flore de fermentations naturelles en Charentes, Versavaud *et al.* (1995) ont mis en évidence sept, neuf et cinq souches différentes pour un total de 41, 48 et 44 isolats analysés. Granchi *et al.* (2004) ont trouvé 12 et 8 profils différents d'ADNmt (*RsaI*) pour 32 et 20 isolats respectivement pris de fermentations naturelles en Italie. Lopes *et al.* (2002) ont trouvé 29 profils pour 58 isolats pris de deux fermentations de raisins du même vignoble argentin en utilisant la RFLP de l'ADNmt avec l'enzyme *HinfI* alors que Sabate *et al.* (1998) ont trouvé 60 et 66 profils différents durant deux ans dans les fermentations d'une cave espagnole pour un nombre total de 200 isolats pris chaque année en utilisant la même méthode et la même enzyme. On notera que les chiffres cités ci-dessus et ceux qui seront cités par la suite le sont uniquement à titre indicatif pour donner une idée de la diversité qui peut être rencontrée. Ils sont à prendre avec précaution surtout pour des fins de comparaison notamment quand les méthodes de typage utilisées et les tailles d'échantillon sont différentes.

Quelques exceptions à la diversité décrite et l'intervention d'une souche unique dans les fermentations naturelles ont parfois été notées. En suivant des fermentations dans une même cave sur une période de 6 ans par les profils de l'ADNmt résultant de la digestion par *EcoRV*, Vezinhet *et al.*, (1992) ont identifié pendant 4 ans (en isolant 10 souches à chaque fois) un

même profil électrophorétique conduisant exclusivement les fermentations, alors que ce profil était majoritaire une autre année mais indétectable les deux années restantes où une diversité de souches a été observée. Au total, 12 profils d'ADNmt différents ont été enregistrés pour 60 isolats. De même, Cappello *et al.* (2004) ont retrouvé dans douze cuves en fermentation la même souche qui conduisait les fermentations à chaque fois. En comparant les 12 profils provenant des 12 fermentations différentes (dont les raisins proviennent du même vignoble) ils ont uniquement trouvé 3 profils différents en associant les profils interdelta (avec les amorces de Ness) et les profils de restriction de l'ADNmt (avec *HaeIII* et *HinfI*).

#### **I.4.1.2 Dominance, minorité dans les fermentations**

Au cours de la fermentation on observe généralement que la plupart des souches impliquées sont retrouvées dans des proportions assez faibles alors qu'un nombre limité de souches domine les fermentations à un moment ou à un autre (Veziñhet *et al.*, 1992; Schutz et Gafner, 1993; Schutz et Gafner, 1994; Sabate *et al.*, 1998; Pramateftaki *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2002 ; **Figure 17**) mais cette tendance n'est pas systématiquement mise en évidence (Gutiérrez *et al.*, 1999). Les souches dominantes dont les nombres reportés sont variables, se retrouvent généralement à des fréquences individuelles approchant les 20 ou 30% (parfois plus), et les quelques profils dominants constituent souvent à eux seuls plus de 50% de la population des isolats ou de la biomasse totale (Sabate *et al.*, 1998, Gutierrez *et al.*, 1999 ; Lopes *et al.*, 2002 ; Granchi *et al.*, 2003) alors que les souches minoritaires sont retrouvées à des fréquences de l'ordre de 5% (Gutiérrez *et al.*, 1999 ; Pramateftaki *et al.*, 2000 ; Granchi *et al.*, 2003). Pour prendre un exemple, l'identification par l'ADNmt (en utilisant *HinfI*) de 116 clones de *S. cerevisiae* isolés de fermentations naturelles de cépages pris d'un vignoble espagnole a mis en évidence 24 profils différents dont trois représentaient à eux seuls 70% des isolats, les 30% restants étant représentés par un à cinq isolats seulement (Nadal *et al.*, 1996).

Les souches dominantes peuvent persister tout le long de la fermentation ou durant la plus grande partie de celle-ci même si leurs taux varient, et ce sont en général les souches qui sont les plus représentées durant la fermentation et ses différentes étapes qui restent jusqu'à sa fin, même si certaines peuvent être uniquement dominantes durant des phases limitées de la fermentation. Les souches minoritaires apparaissant à de faibles proportions ne persistent généralement pas longtemps durant la fermentation (Sabate *et al.*, 1998 ; Pramateftaki *et al.*, 2000 ; Lopes *et al.*, 2002)

Il est à mentionner qu'une variabilité est aussi observée durant les fermentations naturelles parmi les souches d'espèces non-*Saccharomyces* (Povhe Jemec *et al.*, 2001) ainsi que l'existence au sein de ces espèces de souches prédominantes et de souches minoritaires (Pramateftaki *et al.*, 2000) mais nous ne attarderons pas sur ce point notre travail ne concernant que *S. cerevisiae*.

#### **I.4.1.3 Facteurs influençant la diversité des souches dans les fermentations**

Des pratiques œnologiques comme le traitement par clarification du jus et le type de clarification adoptée peuvent influencer la diversité interspécifique de *S. cerevisiae* et changer la fréquence d'apparition des souches dominantes, directement ou indirectement en affectant la macération ou l'oxydation des moûts dans l'un ou l'autre des types de filtres (Epifanio *et al.*, 1999).

Les conditions de la fermentation et la composition du moût pourraient aussi influencer la diversité, ainsi que les interactions entre les différentes souches et certains facteurs intrinsèques aux souches. Gutiérrez *et al.* (1999) ont suggéré que la composition des moûts pourrait affecter la diversité des souches d'une année à l'autre. Granchi *et al.* (2003) ont par contre trouvé que la teneur du moût en azote assimilable ne semble pas avoir d'effets sur la diversité de *S. cerevisiae*. La température a un effet considérable sur le développement des souches fermentaires et leur dynamique, certaines étant plus ou moins performantes selon la température. La tolérance à l'éthanol dont la concentration augmente au fur et à mesure dans les moûts pourrait être un facteur affectant la croissance séquentielle des souches et la prédominance de certaines, les souches résistantes étant plus amenées à dominer vers la fin de la fermentation (Torija *et al.*, 2002). D'autres facteurs en relation avec la composition des moûts pourraient jouer, comme la présence d'acides à chaîne longue ou moyenne, les souches les produisant, les utilisant ou les tolérant différemment, ainsi que la disponibilité des nutriments, ceux-ci étant aussi produits ou consommés différemment selon la souche (Fleet, 2003). Le phénotype killer est généralement recherché durant les sélections de souches. Mais la contribution de ce phénotype à la diversité et à la dominance dans les fermentations n'est pas clarifiée. Même si certains auteurs ont trouvé qu'une majorité de souches dominantes possède le phénotype killer alors que les souches minoritaires sont toutes neutres ou sensibles (Versavaud *et al.*, 1995), cette propriété ne confère pas toujours un avantage concurrentiel ou une garantie d'implantation et des souches dominantes dans les fermentations peuvent présenter un phénotype sensible (Epifanio *et al.*, 1999). En fait l'expression du phénotype

killer et son incidence est affectée par diverses conditions de vinification, par le stade de la fermentation, par le taux initial de souches killer ainsi que par le rapport entre les taux des souches killer et des souches sensibles (Vagnoli *et al.*, 1993 ; Perez *et al.*, 2001b ; Fleet, 2003). La résistance variable des souches aux divers stressés rencontrés contribue aussi à leur survie et à leur dominance. Une relation a ainsi été trouvée entre la prédominance d'une souche à divers stades de vieillissement des vins de Xérès et sa résistance à l'éthanol et à l'acétaldéhyde (Aranda *et al.*, 2002).

#### **I.4.1.4 Stabilité dans les caves**

Outre l'implication concomitante de plusieurs souches, la dominance de certaines, et la dynamique de substitution des souches, on observe que l'équilibre, la succession, la diversité et l'identité des flores fermentaires de *S. cerevisiae* changent d'une année à l'autre, d'une fermentation à l'autre et d'une région à l'autre. Mais certaines souches peuvent néanmoins être rencontrées dans la même cave sur plus d'une année qu'elles soient dominantes (à chaque fois ou occasionnellement) ou minoritaires (Frezier et Dubourdiu, 1992; Vezinhet *et al.*, 1992; Sabate *et al.*, 1998 ; Pramateftaki *et al.*, 2000). Par exemple, 21 profils communs entre deux années (pour un total de 60 et 66 profils différents selon l'année) ont été retrouvés par Sabate *et al.* (1998) par l'analyse de l'ADNmt (enzyme *HinfI*) dans la même cave en fermentation. L'un de ces profils était dominant les deux années et présent à tous les stades de la fermentation. Dans une des régions étudiées par Pramateftaki *et al.* (2000), deux souches communes ont été retrouvées deux années différentes, les deux étant dominantes les deux années. En étudiant la flore fermentaire dans une même cave sur 5 ans par leur ADNmt, Gutiérrez *et al.* (1999) ont retrouvé plusieurs souches communes entre plusieurs années, leurs contributions relatives étant variables d'une année à l'autre et l'une de ces souches a été retrouvée durant les 5 années. Granchi *et al.* (2003) ont retrouvé une souche commune à deux années différentes, dominante une année sur deux. Plusieurs caryotypes ont aussi été retrouvés deux années successives dans la même cave par Frezier et Dubourdiu (1992) dont l'un était dominant les deux années (**Figure 17**). Dans trois caves étudiées par Versavaud *et al.* (1995) quatre souches ont été retrouvées pendant deux ou trois ans, dont deux étaient dominantes toutes les années et comme il a déjà indiqué auparavant, une souche a été retrouvée pendant 4 ans dans une même cave de la vallée de la Loire par Vezinhet *et al.* (1992).

#### I.4.1.5 Diversité des flores à l'échelle de régions

Des études visant à déterminer la microflore de certaines zones et régions viticoles sont conduites depuis longtemps (Poulard *et al.*, 1980). Les études d'écologie de la flore fermentaire de *S. cerevisiae* dans des zones géographiques particulières ont montré une présence réitérée de certaines souches à plus d'un endroit dans ces zones et/ou sur plus d'une année sans que ces souches répandues ou stables ne soient forcément des souches dominantes dans les fermentations où elles interviennent.

En collectant 123 isolats de différentes caves de la région de Champagne sur une période de 6 ans, 49 caryotypes différents ont été trouvés dont 4 étaient dominants (l'une ou l'autre année ou sur plus d'une année) et représentaient de 6 à 24% des souches, les 52% de la population étant constitués de souches différentes. Plusieurs souches ont été retrouvées plus d'une année qu'elles soient dominantes à un moment donné ou pas et l'une de ces souches a été retrouvée sur les 6 années dans plusieurs caves ce qui fait penser à une adaptation de cette souche à la région champenoise. Mais on notera que cette souche est très proche de deux souches utilisées industriellement et isolées de cette même région (Vezinhet *et al.*, 1992).

En analysant la flore de la région de Charentes dans 42 caves situées dans 36 villages, par l'étude des caryotypes et de l'ADNmt (*EcoRV*), Versavaud *et al.* (1995) ont trouvé 70 profils différents (pour 420 isolats collectés) dont 35 étaient majoritaires. Des souches ont été retrouvées à plus d'un endroit dans cette région et l'une d'entre elles était assez répandue et dominante dans tous les échantillons où elle a été retrouvée. Cette souche a été considérée comme représentative du terroir de Charentes (**Figure 18**).

Plus récemment les résultats de Schuller *et al.* (2005) ont eux aussi mis en évidence l'existence d'une souche disséminée à l'échelle de la région portugaise Vinho Verde, en utilisant la restriction de l'ADNmt avec *HinfI*.

En plus de l'association de quelques souches avec des zones géographiques, l'existence d'une certaine structuration des populations de *S. cerevisiae* selon leur origine géographique est parfois notée en effectuant des analyses phylogéniques de souche caractérisées par des méthodes génomiques. Guillamon *et al.* (1995) ont pu trouver une certaine corrélation entre l'origine géographique et la parenté de souches isolées de plusieurs régions vinicoles caractérisées par leur ADNmt. Plus récemment, Martinez *et al.* (2004) ont aussi trouvé pour des souches de *S. cerevisiae* provenant de trois pays d'Amérique du Sud, une certaine structuration selon l'origine en utilisant l'analyse des caryotypes et de l'ADNmt (**Figure 19**). Mais l'observation d'une relation entre l'origine géographique et la parenté des souches ou

leur biodiversité n'est pas systématique. C'est ainsi que l'analyse des relations phylogéniques de l'ADNmt des différents isolats trouvés en Charentes par Versavaud *et al.* (1995) n'a pas pu mettre en évidence une corrélation entre la similarité des souches et leur proximité géographique.

#### **I.4.1.6 Des souches en relation avec des terroirs ?**

On peut supposer que les souches retrouvées spécifiquement en relation avec des caves d'une aire géographique particulière seraient plus adéquates à conduire les fermentations dans les caves de ces régions, leur implantation indiquant une bonne adaptation aux conditions fermentaires locales (Vezinhet *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1995; Sabate *et al.*, 1998). Les résultats de Martini (2003) semblent consolider cette idée. La comparaison de 286 souches isolées de sources non viticoles à 531 souches isolées de caves viticoles a montré une supériorité des souches viticoles par rapport à la vigueur fermentaire (concentration maximale d'éthanol produite), la vitesse de fermentation (taux de production de CO<sub>2</sub>/24h) et la pureté fermentaire (acide acétique en g/l / éthanol en % v/v). Une nette différenciation a aussi été observée selon la production de métabolites (acétaldéhyde, acétate d'éthyle, alcools supérieurs et acétoïne) entre les deux catégories de souches. L'association avec l'activité fermentaire conduirait donc à une sélection de souches plus adéquates à cette fin que les souches isolées de sources non viticoles. Lema *et al.* (1996) ont trouvé que l'inoculation d'un moût avec une souche isolée localement a produit une expression favorable du profil aromatique. Il a par conséquent été suggéré de sélectionner des souches pour la production viticole locale à partir des flores résidentes dans les caves. Le but serait d'augmenter la typicité des productions régionales et de pallier une possible standardisation de la production viticole induite par l'utilisation des mêmes souches industrielles, surtout que les souches autochtones semblent aussi performantes dans leurs capacités technologiques que les souches œnologiques commerciales.

Pourtant si l'existence d'une pression de sélection pour des caractères comme la résistance à l'éthanol, à de fortes concentrations de sucres ou de SO<sub>2</sub> peut être concevable, l'action d'une sélection pour des souches produisant des composés aromatiques spécifiques et typiques du lieu de production l'est beaucoup moins, de telles caractéristiques ne conférant pas *a priori* aux souches qui les possèdent un avantage sélectif (Martini *et al.*, 1996).

#### **I.4.2 Plasticité transcriptionnelle et diversité des profils d'expression**

Dans les milieux complexes que sont les moûts de raisin, plusieurs facteurs de stress agissent sur les levures. On peut en citer le stress osmotique induit par les concentrations élevées en sucres, l'utilisation d'agents antimicrobiens comme le dioxyde de soufre, la production d'éthanol résultant de la fermentation et qui est toxique pour le métabolisme et la croissance des levures, le manque de nutriments ainsi que les hautes températures dans les fermentations incontrôlées ou les basses températures utilisées dans certaines vinifications pour améliorer la production d'arômes (Querol *et al.*, 2003).

Plus la réponse aux conditions changeantes dans les moûts est rapide, meilleure est la capacité d'adaptation de la levure. La réponse adaptative immédiate des cellules de *S. cerevisiae* à des facteurs de stress, comme la limitation en azote, les fortes concentrations en sucres ou le stress éthylique, se fait principalement via la régulation de l'expression des gènes et l'induction ou la répression de certaines voies métaboliques (Alexandre *et al.*, 2001 ; Backus *et al.*, 2001 ; Erasmus *et al.*, 2003). Alexandre *et al.* (2001) ont par exemple observé en réponse au stress éthylique, une induction de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, l'homéostasie ionique, l'adressage des protéines et la réponse au stress. Parmi cette dernière catégorie figurent des gènes codant les protéines Hsp (heat shock proteins) responsables de la thermotolérance des levures mais aussi répondant à d'autres facteurs de stress.

La signification adaptative de cette plasticité est encore à clarifier et il reste à savoir à quel point la différence d'expression est traduite en une expression protéomique et phénotypique. Mais, selon le stress auquel sont soumises certaines souches et les conditions environnantes, une corrélation entre la résistance au stress, le comportement fermentaire et l'expression de certains gènes a parfois été observée. On a par exemple trouvé que la résistance aux fortes concentrations d'acétaldéhyde et d'éthanol chez les levures impliquées dans le vieillissement des vins de Xérès est corrélée avec l'induction de certaines protéines Hsp et que cette résistance pourrait aussi être reliée à la sélection et à la survie des souches durant le vieillissement (Aranda *et al.*, 2002). Une corrélation inverse entre la résistance au stress de souches vinicoles et les arrêts de fermentation a aussi été trouvée par Ivorra *et al.* (1999) ainsi qu'une corrélation entre la résistance au stress et l'induction du gène *HSP12*. Il a donc été suggéré que la résistance au stress, reliée parfois à l'expression de certains gènes, permet aux levures de garder une capacité fermentaire optimale et qu'elle pourrait leur conférer un avantage sélectif.

Une différence d'expression entre différentes souches vinicoles accompagne la variation moléculaire qui les caractérise. L'étude de la résistance à divers stressés et de l'expression de deux gènes (*HSP12* et *HSP104*) chez 15 souches vinicoles et une souche de laboratoire a montré une différence dans la capacité de résistance des souches testées ainsi qu'une différence d'expression des deux gènes étudiés. Mais aucune relation entre la capacité de résistance et l'induction d'un de ces gènes n'a été trouvée (Carrasco *et al.*, 2001). En cultivant 7 isolats vinicoles, 1 isolat de chêne appartenant à l'espèce *Saccharomyces paradoxus* et la souche S288C dans des milieux additionnés ou dépourvus de sulfate de cuivre, Fay *et al.* (2004) ont trouvé des différences d'expression entre toutes les souches prises deux à deux, avec un total de 241 gènes montrant une différence d'expression dans le milieu dépourvu de sulfate de cuivre, 516 dans le milieu contenant du cuivre et 131 gènes différant dans leur expression entre les deux milieux. Parmi ces trois catégories de gènes 79, 36 et 56 respectivement, présentaient des différences significatives. Townsend *et al.* (2003) ont trouvé parmi quatre isolats naturels vinicoles, une différence d'expression des gènes associés au métabolisme des acides aminés, à la dégradation des protéines, à l'assimilation et l'utilisation du soufre, une grande partie de cette différence d'expression étant minime.

#### **I.4.3 Diversité phénotypique des souches de *S. cerevisiae***

On observe aussi parmi les souches vinicoles une variation phénotypique importante incluant des différences de la morphologie des colonies, de croissance à des températures extrêmes, de caractéristiques physiologiques (comme l'utilisation de sucres), de type sexuel, de phénotype killer, et de capacités technologiques comme la cinétique de fermentation, la production de mousse, les besoins en oxygène, la résistance à l'éthanol et à d'autres stressés (Fleet, 2003, ITV, 2003 ; Landry *et al.*, 2006). Les diverses souches retrouvées dans les fermentations alcooliques influencent aussi la composition chimique et les attributs sensoriels d'un vin en produisant différentes quantités de produits secondaires, ce qui fait que la variation de l'équilibre, de la succession et de la diversité de *S. cerevisiae* qui changent d'une année à l'autre et d'une région à l'autre entraînent des variations subséquentes des taux de fermentation et des caractéristiques des vins.

Qu'elles soient des souches commerciales, des souches autochtones isolées de différents cépages ou différentes souches indigènes isolées d'une même région, on a trouvé que différentes souches de *S. cerevisiae* influencent significativement les quantités produites et consommées d'acides organiques, le contenu en alcools supérieurs, en esters d'acides gras et

d'alcools supérieurs, en acétaldéhyde, en acide acétique, en acétoïne, et aussi en terpènes et autres composés volatils et aromatiques (Lurton *et al.*, 1995 ; Aragon *et al.*, 1998, Taillandier *et al.*, 1999, Uscidda, 2001 ; Majdak *et al.*, 2002 ; Romano *et al.*, 2002 ; Romano *et al.*, 2003). Certaines pourraient aussi être responsables de l'apparition de défauts olfactifs dus à la production importante d'acétaldéhyde, d'acétate d'éthyle, d'acidité volatile, de SO<sub>2</sub>, d'une importante formation de mousse ou de fermentations incomplètes (ITV, 2003).

En étudiant 52 souches isolées de différents cépages, Romano *et al.* (2003) ont trouvé que les productions d'acide acétique, d'acétoïne, et de certains alcools supérieurs sur moûts du cépage Aglianico étaient variables selon les souches, l'isobutanol et l'alcool isoamylique étant les produits les plus discriminants entre les souches alors que l'acétaldéhyde, l'acétate d'éthyle et le n-propanol n'ont pas été trouvés variables (**Figure 20**). Lurton *et al.* (1995) ont eux trouvé, en étudiant 15 souches indigènes de *S. cerevisiae* isolées de la région de Cognac et différenciées par l'analyse de leurs caryotypes et la restriction de l'ADNmt, un effet très significatif de la souche sur la composition des distillats de fermentations d'Ugni blanc, notamment en alcools supérieurs, acétaldéhyde et en esters d'acides gras, bien que ces souches aient présenté des caractéristiques technologiques, comme la vitesse de fermentation, la production d'acidité volatile et de composés soufrés, similaires.

Mais on rappellera que la qualité finale du vin ne dépend pas uniquement des levures. Elle est notamment le résultat de l'interaction entre celles-ci et la composition initiale du moût de raisin qui varie d'un cépage à l'autre. Par exemple les cépages Muscatel et Malvasia diffèrent par la teneur en alcools supérieurs et en acides organiques et l'influence de la souche dépend du cépage utilisé et de ses caractéristiques variétales (Aragon *et al.*, 1998). Il a aussi été démontré que la fermentation de moûts de raisin de différentes origines par une même souche de *S. cerevisiae* conduit à des différences qualitatives et quantitatives des composants du moût (Romano *et al.*, 2003 ; **Figure 21**)

Le caractère variétal ne se révèle donc pas toujours spontanément car certains composés du moût sont transformés en composés aromatiques seulement par le métabolisme de la levure. Les composés du moût qui restent inchangés dans le vin constituent le bouquet primaire alors que le bouquet secondaire est le résultat de la transformation des arômes ou de l'apparition de nouveaux arômes. L'activité métabolique de la levure pendant la fermentation opère à deux niveaux: en produisant de nouveaux composés aromatiques ou en agissant sur les précurseurs aromatiques déjà présents dans le moût de raisin et en les transformant (Romano *et al.*, 2003).

#### **I.4.4 Relation entre la diversité phénotypique et la diversité moléculaire**

La diversité moléculaire des souches de *S. cerevisiae* constitue bien entendu le fondement de la diversité phénotypique. Même si la question des relatives contributions de la variation de l'expression génétique et de l'évolution des séquences codantes protéiques à la variation phénotypique reste posée, il n'y a pas de doute que les deux sont responsables de la variation phénotypique et de son évolution (Zeyl, 2004; Landry *et al.*, 2006).

La recherche de corrélations entre des traits phénotypiques et des marqueurs moléculaires a été initialement développée pour la sélection assistée et l'amélioration génétique des plantes et des animaux et la détection de maladies génétiques humaines. Actuellement des kits commerciaux sont même disponibles pour assister la sélection animale (Dekkers, 2004).

Dans le cas de la levure, certaines études ont permis de mettre à jour des corrélations causales entre des phénotypes et des marqueurs moléculaires ou des profils d'expression génétique grâce notamment à l'utilisation de la technologie des puces. Certains phénotypes ont par exemple pu être prédits grâce à la variation de l'expression génétique, comme la sensibilité à l'arsenic d'une souche, sensibilité qui a pu être prédite grâce aux profils d'expression de trois gènes de résistance à l'arsenic (Townsend *et al.*, 2003). De même pour la tolérance à la congélation qui a pu être prédite par l'expression différentielle du gène AQY2 (Fay *et al.*, 2004). Aussi, l'analyse par puces à ADN a permis de corréliser la sensibilité à un herbicide avec le faible nombre de copies du gène CUP1 (Dunn *et al.*, 2005). Quand à la résistance au sulfite mise en évidence par une analyse comparative des transcriptomes de S288c et de souches vinicoles, elle est liée à la surexpression du gène SSU1 résultant d'une translocation entre les chromosomes VIII et XVI (Hauser *et al.*, 2001 ; Perez-Ortin *et al.*, 2002).

Marullo *et al.* (2004 et 2006) ont mis en évidence l'héritabilité de certains traits fermentaires, comme la production d'éthanol, d'acidité volatile, d'acétate ou de sulfure d'hydrogène. Leurs résultats ont montré une grande diversité des caractères fermentaires parmi les descendants d'un même parent, la distribution des caractères dépendant de la souche et du trait sous étude. Mais en dépit de cette diversité, la descendance des souches vinicoles exhibe globalement une ressemblance avec le parent dont elle dérive ce qui souligne la forte implication du déterminisme génétique dans l'explication des traits phénotypiques fermentaires. Ce déterminisme associé à l'apparition fréquente de traits améliorés dans les descendants permet d'entreprendre des schémas d'amélioration génétique des levures

vinicoles par croisements et sporulations. Comprendre toutefois les causes sous-jacentes à la diversité phénotypique et relier cette dernière à des déterminants moléculaires, surtout pour des traits quantitatifs souvent complexes, n'est pas toujours facile. Plusieurs approches de recherche de QTL (Quantitative Trait Loci) impliqués dans l'explication de traits quantitatifs sont utilisées mais les démarches sont encore assez compliquées et elles exigent beaucoup de temps pour être achevées ce qui fait qu'un nombre relativement réduit d'études aboutissent à des analyses complètes allant du trait quantitatif phénotypique au repérage et à la définition des QTL et des QTG (Quantitative Trait Gene) sous-jacents (voir par exemple Darvasi et Pisante-Shalom, 2002 ; Glazier *et al.*, 2002 et Abiola *et al.*, 2003). Le passage entre le phénotype et le QTL requiert bien entendu la détection de l'implication de ce dernier puis son repérage positionnel de plus en plus fin grâce à des marqueurs moléculaires. Pour pousser l'analyse à la détermination du ou des QTG impliqués dans l'explication du trait quantitatif, il faut disposer, en plus des informations positionnelles, d'informations fonctionnelles sur ces gènes.

La réussite de la détection des QTL est cependant conditionnée par plusieurs facteurs. La variation phénotypique de traits quantitatifs a en effet souvent une origine multigénique, d'où sa complexité. La participation d'un QTL particulier dépend donc du fond génétique de l'organisme sous étude et elle est atténuée par l'implication de plusieurs gènes (épistasie). En étudiant l'héritabilité de la transcription d'un grand nombre de gènes chez la levure, Brem et Kruglyak (2005) ont par exemple trouvé que pour des transcrits dont le niveau d'expression est hautement héritable, la majorité des QTL avait de faibles effets sur la transcription d'un gène, et que le pourcentage de la variance de transcription expliqué par un QTL atteignait les 40% dans le meilleur des cas. La moitié des transcrits semblait contrôlée par plus de cinq loci, alors que 3% uniquement dépendaient de l'action d'un seul locus. La participation d'un QTL peut aussi être modulée par divers effets comme l'interaction avec l'environnement. La force de la corrélation entre un phénotype et un QTL particulier sera donc déterminée par la participation relative du QTL en question à la variabilité phénotypique. De plus, la liaison physique entre les marqueurs moléculaires servant à repérer le QTL et ce dernier, est essentielle. Elle dépend de la possibilité de recombinaison dans l'intervalle qui les sépare et elle est d'autant plus forte que la distance physique et la probabilité de recombinaison sont faibles. Pour mettre à jour une liaison significative, des preuves statistiquement solides sont requises ainsi qu'une densité suffisante de marqueurs couvrant la zone ciblée, une taille adéquate des populations testées et la vérification de la validité de plusieurs hypothèses de même que l'héritabilité du caractère étudié.

L'utilisation des puces à ADN dans la cartographie ou le repérage des QTL et le recours à de nouvelles stratégies d'analyses comme la RHA (Reciprocal Hemizyosity Analysis) développée chez la levure (Steinmetz *et al.*, 2002) ont permis de faire des scans génomiques à grande échelle et de repérer plus aisément et plus sûrement des QTL, et de remonter aux fonctions des QTG et même aux QTN (Quantitative Trait Nucleotide) fonctionnels à la base de la variation du trait phénotypique. Là où d'autres approches comme l'analyse comparative des séquences ou de l'expression génétique ont échoué, les études qui ont eu recours à ces techniques ont souligné, en même temps que la limite des méthodes habituellement utilisées, la complexité inhérente à l'architecture des traits phénotypiques quantitatifs et la complexité gouvernant leur expression en phénotypes (Sinha *et al.*, 2006).

## **I.5. Applications industrielles**

La diversité des capacités fermentaires et technologiques des souches de *S. cerevisiae* a été mise à profit pour en sélectionner certaines possédant des caractéristiques spécifiques et adéquates pour la transformation vinicole dans le but de les utiliser dans les industries de vinification.

### **I.5.1 Sélection de souches**

Les variations dans les flores levuriennes observées d'une région à l'autre et au sein d'une même région selon les années conduit à une grande irrégularité dans le déroulement des fermentations et par conséquent à une grande disparité dans la qualité des vins obtenus par fermentations naturelles. De plus, des déviations et des anomalies des fermentations conduites par la flore indigène et reliées au métabolisme fermentaire de levures non-*Saccharomyces* ou de souches de *S. cerevisiae* inadéquates étaient souvent observées ainsi qu'une lenteur ou des accidents d'arrêts de fermentations ou de fins de fermentations difficiles (Cuinier *et al.*, 1987 ; Duteurtre et Moll, 1991 ; Egli *et al.*, 1998).

La pratique du levurage ou de l'inoculation de souches sélectionnées pour conduire les fermentations a été initiée dans le domaine de la brasserie et son expansion à l'œnologie s'est faite à partir des années 70 (Duteurtre et Moll, 1991) pour se développer énormément par la suite. En inoculant, on recherche bien entendu une bonne implantation de la souche et pour ce faire, il faudrait introduire l'inoculum à des taux largement supérieurs aux levures indigènes

résiduelles subsistant après traitement de la vendange (Ribéreau-Gayon, 1993). On peut avoir recours, au cas où la souche inoculée ne supplante pas les non-Sacharomyces, à la régulation de ces populations grâce à deux paramètres importants : la température qui en augmentant au dessus de 20°C favorise le développement de *S. cerevisiae*, et le sulfitage qui réprime la croissance des non-*Saccharomyces* de 10 à 100 fois, alors que le *S. cerevisiae* y sont tolérantes (Egli *et al.*, 1998). Des souches indigènes de *S. cerevisiae* peuvent aussi subsister après l'inoculation mais généralement à des taux plus faibles, et l'inoculation des moûts avec des souches préalablement sélectionnés a permis de maîtriser les fermentations alcooliques et d'assurer des fermentations complètes, régulières et plus uniformes d'une année à l'autre dans une même région (Cuinier *et al.*, 1987 ; Querol *et al.*, 1992b).

On peut aussi éviter par le choix de la souche des déviations aromatiques néfastes ou même améliorer la qualité des vins en optimisant les caractéristiques d'un cépage déterminé et en induisant une expression favorable du profil aromatique (Cuinier *et al.*, 1987 ; Ribéreau-Gayon, 1993 ; Aragon *et al.*, 1998). Mais dans beaucoup de situations aussi la fermentation alcoolique conduite avec la flore indigène donne de bons résultats : c'est le cas de la Vallée de la Loire et du Bordelais, pour la vinification en rouge (Cuinier *et al.*, 1987) ou encore de la Bourgogne. Dans tous les cas l'inoculation influence la composition chimique des vins (Lema *et al.*, 1995, Majdak *et al.*, 2002). Des analyses sensorielles de moûts fermentés naturellement ou inoculés par des souches pré-sélectionnées montrent que les moûts non inoculés ont des saveurs différentes de celles des moûts inoculés et corrélées avec la présence des non-*Saccharomyces* (Egli *et al.*, 1998 ; **Figure 22**). Il reste que la pratique de l'inoculation des moûts assure certainement des résultats fermentaires plus constants.

### **I.5.2 Types de levures sélectionnées**

On sélectionne des souches en vue de divers usages et les levures utilisées actuellement dans l'industrie vinicole appartiennent généralement à l'une ou l'autre des catégories suivantes :

Les levures starter assurent une mise en fermentation alcoolique rapide du moût pour éviter des altérations pré-fermentaires. Elles ont en général de bonnes propriétés fermentaires (niveau d'alcool produit, rendement, faible production de produits néfastes comme l'acétaldéhyde, le SO<sub>2</sub>, le H<sub>2</sub>S ou l'acide acétique...).

Les levures pour la reprise de fermentation sont utilisées en cas d'arrêts ou de ralentissements des fermentations et sont capables de reprendre des fermentations arrêtées à 11-13% d'éthanol (v/v) et de les achever.

Les levures de prise de mousse adaptées à la préparation des levains de tirage et le levurage des vins de base sont utilisées pour la production de vins effervescents et elles ont des caractéristiques particulières (Cuinier et al., 1987, ITV, 2003).

Les levures spécifiques sont sélectionnées pour une application particulière et elles sont destinées à assurer la totalité de la fermentation du moût tout en étant adaptées aux conditions particulières des vins à produire (par exemple fermentation à basses températures) ou à conférer aux vins des qualités aromatiques spécifiques (ITV, 2003).

### **I.5.3 Schémas de sélection**

Selon le but désiré et la finalité d'utilisation de la souche, des tests plus ou moins complets peuvent être faits et des caractéristiques plus ou moins spécifiques peuvent être recherchées. La sélection de souches vinicoles se fait encore à partir des flores indigènes puisque l'utilisation de souches génétiquement modifiées, bien que non interdite par la loi, et malgré les opportunités offertes par cette voie, est encore difficilement acceptée par les consommateurs et son effet sur l'environnement est encore mal évalué (Pretorius, 2000; Dequin, 2001). Une alternative est offerte par les stratégies d'amélioration de souches récemment développées par Marullo *et al.* (2004 et 2006) qui par des séries d'hybridations et de ségrégations, ont pu sélectionner plusieurs caractères fermentaires désirables et les accumuler tous dans une même souche.

Nous ne développerons dans ce qui suit que les schémas "classiques" de sélection. Ceux-ci passent généralement dans un premier temps par la constitution d'une banque préliminaire de souches qui seront caractérisées physiologiquement et/ou génétiquement pour étudier et privilégier la biodiversité et éventuellement assigner des parentés qui pourraient se retrouver dans les caractéristiques fermentaires et bien entendu éviter les doublons. Les souches retenues seront testées en une deuxième étape au laboratoire pour la possession de certains paramètres en mini-vinifications. On étudie les pouvoirs fermentaires des souches et certains critères généraux pour assurer une bonne fermentation et éviter des déviations néfastes. On peut quantifier la production de mousse, le temps de latence, la cinétique de fermentation, le rendement sucre/éthanol, le pouvoir alcoogène, les sucres résiduels, la production de SO<sub>2</sub>, d'acétaldéhyde, de glycérol, d'acide pyruvique, d'acidité volatile. On teste

aussi éventuellement des caractéristiques particulières liées à un type de vinification donné (activités pectinolytiques et fixation de composés phénoliques pour la production de Beaujolais par exemple) ou encore pour la production de molécules aromatiques où les capacités de formation de produits secondaires seront particulièrement prises en compte (Duteurtre et Moll, 1991; Lurton *et al.*, 1996 ; ITV, 2003 ; **Figure 23**).

Après les tests en laboratoire on peut passer à des tests pilotes avec les souches soumises à la pré-sélection pour la production particulière voulue et faire ensuite des analyses sensorielles des vins produits (Lurton *et al.*, 1996 ; Uscidda, 2001). Dans tous les cas, les étapes conduisant à sélectionner des souches devraient être restreintes et facilitées au maximum dans les laboratoires pour ne tester qu'un nombre limité de souches candidates à la commercialisation sous forme de LSA.

Pour prendre un exemple de sélection nous citons l'étude de Querol *et al.* (1992c) qui ont établi un schéma de sélection de souches pour des vins espagnols de la région alicante où les moûts se caractérisent par une teneur initiale en sucres et des températures de fermentation élevées. Le schéma est passé par la recherche du facteur killer pour ne sélectionner que les souches produisant la toxine, puis par l'établissement d'un profil fermentaire à l'échelle du laboratoire en déterminant plusieurs paramètres technologiques comme les vitesses de fermentation, les sucres résiduels, la production d'éthanol ainsi que des paramètres sensoriels comme la production d'acidités volatile et totale, de SO<sub>2</sub>, et de molécules aromatiques comme l'acétaldéhyde, des esters et des alcools. Des analyses de discrimination et de classification des souches ont permis ensuite la sélection de souches représentatives de groupes plus ou moins homogènes et des analyses sensorielles sur les vins produits par les souches retenues ont permis la sélection d'une souche avec laquelle des tests pilotes ont été effectués.

## **Chapitre II**

### **Première Publication**

**Addressing the question of the Biodiversity of the native  
oenological Lebanese *Saccharomyces cerevisiae* flora.**

## **Addressing the question of the biodiversity of the native oenological Lebanese *Saccharomyces cerevisiae* flora.**

**Marie-José Ayoub<sup>1,2</sup>, Jean-Luc Legras<sup>3</sup>, Vang-Huu Nguyen<sup>1</sup>, Rachad Saliba<sup>2</sup>, Claude Gaillardin<sup>1\*</sup>**

**1** *Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique, UMR-INRA1238 UMR-CNRS2585 Microbiologie Génétique Moléculaire, INA P-G, F-78850 Thiverval-Grignon, France.*

**2** *Département des Sciences et Technologies Agroalimentaires, Université Libanaise Faculté d'Agronomie, 13-5368, Chouran, Beyrouth, Liban.*

**3** *Santé de la Vigne et Qualité du Vin, UMR INRA-Université Louis Pasteur Strasbourg-I, F-68021 Colmar, France.*

### **Abstract**

295 isolates of *Saccharomyces cerevisiae* were sampled from naturally fermenting grape musts from various locations in Lebanon and typed by interdelta fingerprinting. 88 of these isolates were further compared with oenological isolates taken from various countries, using microsatellites characterisation of six polymorphic loci. These approaches evidenced a large diversity of the natural oenological Lebanese flora over the territory as well as in individual spontaneous fermentations. Microsatellite typing suggested that the Lebanese flora, despite its diversity, was interrelated. Several cases of dominance and perenniality of isolates were observed. Fermentations taking place in the same wineries appear to involve lineages of sibling isolates. Similarly, related strains could also be detected in vicinal wineries, but relationships between geography and strains were completely lost as the geographical areas were enlarged. On the contrary, isolates sampled from different processes appeared related according to their specific source.

### **Introduction**

Several studies have been devoted to the identification of natural flora of grape musts and to the dynamics of the species involved in wine fermentation. They evidenced the major contribution of *Saccharomyces* strains, generally *S. cerevisiae*, in conducting and finishing the process (Schutz and Gafner, 1993; Constanti *et al.*, 1997; Guillamon *et al.*, 1998). This has been recently confirmed for one of the most ancient wine lees known (Cavaleri *et al.*, 2003).

Many *S. cerevisiae* strains usually coexist in natural fermentations (Schutz and Gafner, 1994; Versavaud *et al.*, 1995; Sabate *et al.*, 1998; Pramateftaki *et al.*, 2000; Lopes *et al.*,

2002). Such a complexity is observed even when musts are inoculated with selected starters, though natural equilibrium is affected in such cases (Querol *et al.*, 1992; Constanti *et al.*, 1997; Egli *et al.*, 1998, Ganga *et al.*, 2004). Several reports have indicated that most of this biodiversity is represented by small, subdominant populations whereas a few strains dominate the fermentation or phases of it (Veziñhet *et al.*, 1992; Schutz and Gafner, 1993; Schutz and Gafner, 1994; Sabate *et al.*, 1998; Pramateftaki *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2002). Several reports indicate that, in a particular winery or wine producing area, some strains maintain themselves over several years (Frezier and Dubourdiou, 1992; Veziñhet *et al.*, 1992; Sabate *et al.*, 1998) and disseminate around these places (Veziñhet *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1995; Schuller *et al.*, 2005; Valero *et al.*, 2005). These observations have brought forth a theory about the possible existence of “terroir specific strains” that may be representative of certain localities. It is supposed that such strains may have been selected by, or have co-evolved with specific wine making conditions and are thus particularly desirable for these local productions (Veziñhet *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1995; Sabate *et al.*, 1998).

Most of these ecological studies have concerned European countries like France, Spain, Switzerland, Portugal or Greece (Frezier and Dubourdiou, 1992; Schutz and Gafner, 1993; Versavaud *et al.*, 1995; Constanti *et al.*, 1997; Pramateftaki *et al.*, 2000; Schuller *et al.*, 2005) and their majority have studied the vineyard fermenting flora which does not necessarily represent the natural fermentations occurring in wineries. To our knowledge, no biodiversity study has concerned the Middle Eastern region which is considered as one of the cradles of winemaking. It thus seemed interesting to explore the diversity of the fermenting *S. cerevisiae* flora of a Middle Eastern country like Lebanon where winemaking is an ancestral practice (McGovern, 2003; Karam, 2005) that is still maintained nowadays. A biodiversity study was consequently conducted for the first time in Lebanon to explore the diversity and the geographical distribution of the indigenous oenological *S. cerevisiae* flora and to examine the possible existence of strains that are specific to geographical areas or to wine type. Since industrial winemaking in Lebanon is a recent activity mainly confined to a limited geographical area, most of the natural flora should have been preserved in traditional wineries. Besides, assuming a role for *S. cerevisiae* strains in the development of particular and characteristic wine traits (Lurton *et al.*, 1995; Romano *et al.*, 2003), identification of specific strains in oenological areas may be relevant for the future development of wine making in this country. In order to assess if there is any specificity of Lebanese strains, we compared isolates from this indigenous flora to floras originating from different countries. We turned for our analysis to interdelta fingerprinting (Ness *et al.*, 1993; Legras and Karst, 2003)

and microsatellite typing (Legras *et al*, 2005), two robust and easy to implement approaches which have proved efficient for the differentiation of *S. cerevisiae* strains.

## Materials and methods

**Strains and Isolation:** 149 samples of naturally fermenting grape musts were collected through the years 2000, 2001, 2002 and 2003 from 79 wineries scattered among 51 villages (Figure 24). The samples were from sweet or dry (red, white or rosé) wines produced according to classical methods of fermentation. The musts fermented to produce sweet wines were either concentrated first by drying the grapes or boiling the juice, or supplemented with wine alcohol to leave residual sugar.

Single colonies were isolated from cultures of appropriate dilutions of the musts, grown on YPD solid medium (yeast extract 10 g.l<sup>-1</sup>, peptone 10 g.l<sup>-1</sup>, D-glucose 10 g.l<sup>-1</sup>, agar 20 g.l<sup>-1</sup>) and incubated at 28°C. A preliminary identification was done using biochemical tests according to Kreger van-Rij (1984) and API ID 32C strips (Biomérieux). PCR/RFLP of ribosomal NTS2 region was used (Nguyen and Gaillardin, 1997) in order to confirm affiliations. Strains were stored at -80°C in YPD liquid medium supplemented with 25% glycerol.

A total of 295 isolates were confirmed as being *Saccharomyces cerevisiae* and retained for biodiversity analysis. Their isolation scheme was as follows. In order to get a large geographical survey of yeast strains in Lebanon, wineries located in different villages spread all over the country were chosen. In the years 2000 and 2001 five wineries were studied, while 69 wineries were sampled in 2002. A single *S. cerevisiae* isolate per vat was taken from these wineries and submitted to interdelta analysis, except when isolates from the same vat differed phenotypically, so that a single winery was represented by one to six isolates according to the number of vats sampled.

To estimate diversity within wineries, we retained 2 to 10 *S. cerevisiae* isolates per vat sampled in 2002 and 2003 in five more wineries as well as in the five wineries initially sampled in 2000 and 2001 (see Table 1). Each of these wineries sampled in 2002-2003, each was thus represented in a given year by 4 to 14 isolates.

To assess the specificity, if any, of the Lebanese strains, they were compared to non-Lebanese isolates. With interdelta fingerprinting, eleven commercial wine strains and eight non-oenological strains were analysed. The commercial strains were Levuline BRG, Levuline CER, Levuline CHP, Ceres C2C, Levuline C19, EG8, Levuline FB, Levuline Killer,

Montbazin 1 (in this paper MBZ), Levuline Primeur, Davis 522 (in this paper 522D). The non-oenological strains included CLIB 409, CLIB 412, CLIB 413, CLIB 414 and CLIB 415 as well as strains S288C, CBS 1171NT and CBS 1907 (Table 2). With microsatellites analysis, 88 Lebanese strains (Table 3a) were compared to non-Lebanese strains including the previous eleven commercial strains plus a subset of 237 *S. cerevisiae* oenological strains characterised by Legras *et al.* (submitted) and originating from different villages and regions in various countries (Table 3b). A set of 51 strains (the eleven commercial strains and 40 Lebanese isolates) were analysed in both laboratories which allowed the definition of variation intervals for the various alleles of each locus.

**Inter-Deltas Fingerprinting :** A standard procedure was used for DNA extraction (Hoffman and Winston , 1987). Primers used for amplification were those designed by Legras and Karst (2003), delta 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') and delta 21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'). Amplification reactions were performed in 25 µl mixtures containing Ex-Taq buffer (2mM Mg<sup>2+</sup>-Taqara), Ex-Taq (0.75 U), 200 µM of each dNTP, 0.5 µM of each oligonucleotide primer and 10-50 ng yeast DNA. A 9600 Perkin-Elmer Cetus thermal cycler was used and the following program applied: initial denaturation for 3 min at 95°C, then 35 amplification cycles (95°C for 30s, 45°C for 40s, 72°C for 90s), final extension step of 5 min at 72°C. The amplification products were separated on 0.8 % agarose gels in 0.5x TBE buffer. Gels were stained with ethidium bromide, visualized and photographed under UV light. Gel pictures were normalized using the Bionumerics program (Applied Maths, version 1.01) and the profiles were clustered using the Neighbor-joining aggregation method based on Dice coefficient from the same software.

**Microsatellites analysis :** Six highly resolutive microsatellite loci (Legras *et al.*, 2005) were tested. The loci are YOR267C, YPL009c, AAT1 and C4, C5, and C11 (see Legras *et al.*, 2005). PCR reactions were performed in 20 µl of Qiagen multiplex mixture on 10-50 ng of template DNA. Primers were used at the concentrations of 0,1 µM except those of locus C4 which concentrations were of 0.2 µM. The reverse primers were labeled with the fluorescent dyes VIC, 6-carboxyfluorescein (6-FAM), benzofluorotrichlorocarboxy-fluorescein (NED) (Applied Biosystems, Cheshire, UK). The first dye was used for loci C5, AAT1 and YOR267C, the second for YPL009c and C11 and the third for C4. Amplifications were done with the following program : 15 min at 95°C, 34 cycles (30s at 95°C, 2 min at 57°C and 1min at 72°C), and a final cycle of 10min at 72°C before holding at 4°C. Electrophoresis on 2%

agarose gels was done to check for successful amplifications. Microsatellite raw data were analyzed using The Genescan software (Applied Biosystems, version 3.7). The different alleles corresponding to each isolate were computed to generate a similarity matrix (according to Dice coefficient) which was used to generate an aggregation of the isolates by the PHYLIP software (version 3.6; Felsenstein 2004) according to the Neighbor-Joining method.

## Results

**Diversity within the natural Lebanese oenological flora:** In order to explore the biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* across the Lebanese territory, isolates were sampled in 2000, 2001, 2002 and 2003 from 149 vats of naturally fermenting musts from 79 wineries in 51 villages (Figure 24). A single winery was represented by one to 14 isolates according to the year of sampling, the number of vats present and the number of isolates sampled per vat. The 295 Lebanese isolates that were retained for study were confirmed as being *S. cerevisiae* (see Materials and Methods) and distances between their interdelta fingerprints were aggregated according to the Neighbor-Joining method of tree construction.

Among the 295 isolates analyzed, 225 exhibited a unique interdelta pattern. The remaining 70 isolates, constituting about 24% of the total, shared identical patterns (see Table 4). 63 of these originated from the same wineries, mainly from the same fermenting vats and less frequently from different vats (the same year or through different years). Their case will be discussed later in more detail. The clustering of the 232 different patterns, including all the isolates harbouring unique patterns, as well as one representative of each identical pattern originating from the same winery and both representatives of identical patterns in provenance of different wineries, is shown on Figure 25. Similarity between patterns ranged from 0 to 96.3% according to the binary Dice coefficient based upon the presence of common bands. No clear relation could be observed between clusters and geographical origin. However, some clustering of strains originating from neighbouring wineries was observed (see below). When the wine type process was considered, no apparent clustering of isolates was observed since identical or very similar strains (90% and more) could indifferently be isolated from dry or sweet wines (results not shown).

**Diversity of the oenological flora in fermenting vats:** The frequent occurrence of identical patterns from the same vats or wineries described above led us to investigate in more details a few wineries. Samples of musts were taken at or near the end of fermentation from one or

several vats of ten selected wineries (one sample per vat for a total of 38 vats; see Table 1 and Materials and Methods). The interdelta patterns of the isolates taken from the same wineries were compared to each other. In 2003 and/or 2002, and in the cases where a single vat was sampled per winery, four to fourteen isolates were studied from one vat. A diversity of profiles could be observed among these isolates but similar patterns were nonetheless repeatedly observed (Fig 4a). One or two patterns were found to dominate in 12 out of 13 such vats analysed (see Table 1). The dominant isolates (21 for a total of 131 isolates from the 13 vats) represented at least 20 or 30 % of the sampled population of a single winery. Four of them represented 40 or 50 %, and three, 75, 80 and 100 % of the sample (Table 1).

In 2003, 2002, 2001 and 2000 and in 6 out of 7 wineries from which several vats were sampled, similar patterns were observed in the different vats of the same winery. The proportion of these patterns varied between 14 and 57% of the winery population. For instance, in winery MC and in 2002, one pattern represented 57% of the sampled population from three vats (a total of seven isolates) and was reisolated during three consecutive years from the same winery (see below, Table 1 and Figure 26b).

**Stability of strains in wineries:** The occurrence of the same pattern in winery MC during three consecutive years led us to look for 7 of the above wineries (including MC) at the possible perenniality of strains. Two wineries were followed in 2002 and 2003, two others in 2001, 2002 and 2003 and three were monitored in 2000, 2001, 2002 and 2003. In 2001 and 2000 one to five isolates were retained per winery while this number ranged between six and 14 in 2002 and 2003.

In five of the seven wineries the same patterns were found for more than one year (Table 1). In two out of the five wineries (WK and MC), one pattern was found for two consecutive years. In both cases this pattern was dominant during the two years, representing in the first winery 75% of the 2002 population and 80 % in 2003, and in the second winery 57% of the 2002 population and 100% in 2003. In this last case, this pattern had been already detected in 2001 where only a single strain had been tested (Figure 26b). Non dominant patterns were also repeatedly found, like in wineries HY and A where two and four isolates were respectively detected for two consecutive years, while in winery M one pattern was found for two non consecutive years.

**Winery and geographic vicinity effects on strain relatedness :** Global comparison of isolates evidenced repeatedly clusters of two or more isolates originating from the same

wineries, either taken the same year or through different years, and to a lesser extent from different wineries of the same village (e.g. for the village WK, wineries a, b and c; see Figure 25). Most of these strains were closely related, with similarity scores above 90%. Out of 122 cases of strains sharing such similarities (excluding 100% identities), 25 cases corresponded to strains isolated from the same wineries, 2 to isolates from different wineries but in the same village and 31 to isolates originating from villages found within 30 Km and in the same altitude ranges. Among the seven cases of identical isolates in provenance of different locations, one concerned wineries of the same village (ANa/ANb), three concerned wineries from vicinal villages found within a range of 30 Km (BSa/BTa and A/M within 5Km each and AL/ DL within 25 Km) and three were of wineries located in more distant villages (JB/Q, Sa/TA, WKb/Ta).

We looked more closely at two pairs of vicinal villages found within a range of 5 Km (M and A, B and WK). A clustering of isolates from these locations and from different wineries of village WK was observed in the global comparison (Figure 25) and one common interdelta pattern was found between wineries A and M. A larger number of isolates was consequently analysed (see Table 1) from a single winery in the villages A, M and B, while for the village WK and in addition to the isolates of winery WKa presented in table 1, isolates from two additional wineries, WKb and WKc, were included in the comparison. The isolates from M and A (Figure 27) were clearly clustered according to their provenance and a common strain was found at both locations (isolate M19 = isolate A17 in table 1). For B and WK, the clustering was less apparent but nonetheless present. We further observed that the clustering was not only related to wineries but also to the village, since a grouping of isolates from different wineries of WK was observed. These results show that, in some geographic areas extending over at least 5 km, wine fermentation may be predominantly conducted by a set of related strains over several years.

**Comparison of Lebanese isolates with floras of diverse origins:** Our observations of interdelta patterns indicated a winery effect on oenological strain relatedness but did not address the question of the possible existence of a specific Lebanese flora. We thus wanted to assess next whether Lebanese strains represented a specific cluster of strains, genetically distinguishable from strains isolated in other parts of the world. Clustering of the interdelta fingerprints showed that this was unlikely: eleven oenological strains isolated outside from Lebanon as well as S288C, CBS 1907 and CBS 1171NT were scattered within the Lebanese isolates and did not cluster separately except for commercial strains that seem to be clones or

derived from each other like 522D, K1 and CER or CHP, FB and C19 (Figure 25). On the contrary, five non oenological strains (CLIB series) isolated on different non-oenological substrates clustered in two separate groups, strongly suggesting that they are more related to each other than to oenological strains.

In order to confirm the result of the non-specificity of the Lebanese flora on a larger set of oenological strains and by a different method, we used the microsatellite typing method of six polymorphic loci which were previously shown to provide discriminatory and reproducible results while revealing relatedness of *S. cerevisiae* strains (Legras *et al.*, 2005). 88 Lebanese isolates were chosen harbouring different or identical interdelta patterns and originating from different villages, from different wineries of the same villages, from different vats of the same wineries or from the same vats (Table 3a). They were compared to 237 non-Lebanese wine strains originating from different villages and regions in different countries as well as to strain S288C (Table 3b).

Microsatellite typing confirmed most of the conclusions reached when using interdelta fingerprinting. Oenological floras from all regions and countries including Lebanon were found to be extremely diverse within and between the countries, showing no clustering according to wine type or geographical origin. In all countries or regions studied, the most frequent observed effect was the “winery effect” as it was very common to find clusters of two or more strains originating from the same winery. Besides, strains coming from different sites of the same villages and limited geographical regions were found related, though this grouping was not obvious for all the sampled regions and not systematic for all the isolates from a given region, possibly reflecting sampling bias. Isolates from different wineries geographically close to each other in either Alsace, Côtes du Rhône or Nantes were related. On the other hand, for countries like Spain where isolates came from locations scattered all over the country, no clustering other than that of strains from the same winery was found.

Surprisingly however, some clustering of Lebanese strains isolated from different wineries was observed (see Figure 28). This clustering was rather broader (in terms of the number of strains involved and of the geographical area concerned) and more frequent than what was observed for other countries. Clustering was not related to the provenance of the isolates within the Lebanese territory, meaning that the wineries involved were not necessarily vicinal. This suggests that according to microsatellite typing, the Lebanese flora, though diverse, is interrelated. The only other observed large clusters were of strains originating from Alsace. But unlike the Lebanese isolates, these Alsacian strains all originated from a narrow

geographical area and the largest Alsatian cluster involved strains related to the commercial strain EG8 initially isolated from Alsace.

## Discussion

While most large-scale biodiversity studies have concerned vineyards floras, we assessed in this study the genetic diversity of the *S. cerevisiae* Lebanese fermenting flora representative of natural fermentations. A pronounced biodiversity was revealed between wineries dispatched across the territory with both interdelta and microsatellites analysis. This observation is in line with previous reports on similar surveys done on wineries of the oenological region of Charentes in France (Versavaud *et al.*, 1995).

The diversity of the oenological flora that we observed over the Lebanese territory reflects a diversity that exists within single fermentations since various interdelta patterns were encountered in the same fermenting vats with a predominance of few patterns. These observations also meet several studies (Vezeinhet *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1995; Egli *et al.*, 1998; Redzepovic *et al.*, 2002).

It further appeared that isolates circulate within wineries and contaminate different vats, which occurs very easily even if care is taken to prevent such contamination (Egli *et al.*, 1998; Beltran *et al.*, 2002). Some of the strains seem to reappear in wineries over several years like again as observed with other floras (Sabate *et al.*, 1998; Gutierrez *et al.*, 1999; Pramateftaki *et al.*, 2000). This, along with the observation of winery specific patterns, supports the idea of winery related lineages conducting the fermentations. These lineages might originate from the winery itself or from the vineyard, a question we did not address. Nevertheless, dominant strains do not seem necessarily more prone to survive and colonize as was proposed earlier by Versavaud *et al.* (1995), since perennial strains were not always dominant in our studies.

On a larger scale of vicinal wineries, some isolates were found to be related which could reflect spontaneous contamination from one location to the other by insects, birds or human related activities. Even if we detected sibling isolates rather than true redundant “terroir strains” like Versavaud *et al.* (1995), which might be due to differences in the discriminatory powers of the methods used, our observations meet theirs concerning the scattering of related strains over a limited geographical area, and the loss of observable strain relatedness over a larger range.

Microsatellites analysis suggested that a specific Lebanese group could be distinguished from non-Lebanese oenological strains, unlike what was assumed from the results of

Interdelta fingerprinting. This discrepancy may possibly reflect a sampling bias, since a larger number of non-Lebanese isolates from diverse geographical origins was included in the microsatellite study. No other wide clustering according to geography was seen for other countries unlike what was observed by Martinez *et al.* (2004). It is however unclear in this last study whether the isolates were sampled within each country over a broad geographical area or on the contrary originated from vicinal locations. In the last case, a “winery effect” could be responsible of the observed clustering and the disagreement with our results. The clustering of the Lebanese flora which is ancestral (Legras *et al.* submitted) might be the result of a rather confined evolution of this flora away from extensive exchange of genetic material from other floras from the time of its first involvement in winemaking.

Neither interdelta nor microsatellite analysis suggested any link between wine type and strain relatedness, suggesting that oenological floras are close regardless of the wine process. On the other hand and according to interdelta analysis, the Asian non-oenological strains seemed more related to each other than to Lebanese isolates. This agrees with previous conclusions on the clustering of *S. cerevisiae* strains according to the thriving media (Fay and Benavides 2005; Ayoub *et al.*, 2006; Legras *et al.*, submitted) which exert specific selective pressures leading to a differential evolution of the lineages involved.

## **Acknowledgements**

The authors thank the Lebanese CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) for financial support in the sampling campaign, the AUF (Agence Universitaire de la Francophonie) for providing a fellowship supporting in part MJA, and Dr. Françoise Irlinger for help with the Bionumerics software.

## **References**

- Ayoub MJ, Legras JL, Saliba R and Gaillardin C., 2006. Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J. Appl. Microbiol.* 100, 699-711
- Beltran G, Torija M.J., Novo M., Ferrer N., Poblet M., Guillamón J., Rozès N. and Mas A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *System. Appl. Microbiol.* 5, 287-293.

Cavaliere D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R and Polsinelli M. 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J Mol Evol.* 57, S226-32.

Comi G., Maifreni M., Manzano M, Lagazio C and Cocolin L. 2000. Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *Int J Food Microbiol.* 58, 117–121

Constanti M., Poblet M., Arola L., Mas A. and Guillamon J. 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am J Enol Vitic.* 48, 3, 339-344.

Egli C.M., Edinger W.D., Mittrakul C.M. and Henick-Kling T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J Appl Microbiol.* 85, 779-789.

Fay J. and Benavides J. (2005). Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, 66-671

Felsenstein J. 2004. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Frezier, V. and Duburdieu, D. 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am J Enol Vitic* 43, 375-380.

Ganga M.A. and Martínez C. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Appl Microbiol.* 96, 76–83

Guillamon J.M., Sabate J., Barrio E., Cano J., Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol.* 169, 5, 387-92.

Gutiérrez A.R., Santamaría P., Epifanio S., Garijo P. and López R. 1999. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Lett Appl Microbiol.* 29. 411–415.

Hoffman CS and Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 57. 2-3, 267-72.

Karam M, 2005. *Wines of Lebanon*. SAQI, London. 263p.

Kreger-van Rij N.J.W. 1984. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier Science Publishers B.V. 1082 p.

Legras J-L., and Karst F. 2003. Optimisation of Inter-Deltas analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol Lett.* 221. 249-255.

Legras J-L., Merdinoglu D., Cornuet J-M. and Karst F. Bread, Beer and Wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Submitted*

Legras J-L, Ruh O., Merdinoglu D. and Karst F. 2005. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol.* 102, 1, 73-83.

Lopes C.A., van Broock M, Querol A and Caballero A. C. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J Appl Microbiol.* 93, 608–615

Lurton, I., Snakkers, G., Roulland, C., Galy, B. and Versavaud, A. 1995. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *J Sci Agric.* 67, 485–491.

Martínez C., Gac S., Lavín and Ganga M. 2004. Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J Appl Microbiol.* 96, 1161–1168

McGovern P.E. 2003. *Ancient wine: The scientific search for the origins of viniculture*. Princeton University, Princeton, NJ. 400 p.

Ness F., Lavalley F., Dubourdiou D., Aigle M. and Dulau, L. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J Sci Agric*, 62, 89-94.

Nguyen H.V. and Gaillardin C. 1997. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Syst Appl Microbiol* 20, 286–294.

Pramateftaki P.V., Lanaridis P. and Typas M.A. 2000. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J Appl Microbiol*. 89, 236-248.

Querol A., Barrio E., Huerta T. and Ramon D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol* 58, 9, 2948-2953.

Redzepovic S., Orlic S., Sikora S., Majdak A. and Pretorius I. S. 2002. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett Appl Microbiol*. 35, 305–310.

Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M. and Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol*. 86, 169– 180.

Sabate J., Cano J., Querol A. et J.M. Guillamon. 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations : analysis for two consecutive years. *Lett Appl Microbiol*. 28, 452-455.

Schuller D, Alves H, Dequin S et Casal M. 2005 Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol Ecol*. 51, 167-177.

Schutz, M., et Gafner, J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J Applied Bacteriol*. 75, 551– 558.

Schutz M., Gafner J., 1994. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol.* 19, 253-257.

Valero E, Schuller D, Cambon B, Casal M et Dequin S. 2005. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three-years study. *FEMS Yeast Res.* 5, 959-969.

Versavaud A, Courcoux P, Roulland C, Dulau L et Hallet J-N. 1995. Genetic Diversity and Geographical Distribution of Wild *Saccharomyces cerevisiae* Strains from the Wine-Producing Area of Charentes, France. *Appl Environ Microbiol.* 61, 10, 3521–3529.

Veziñhet F., Hallet J-N., Valade M., Poulard A. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am J Enol Vitic.* 43, 1, 83-43.

## **Chapitre III**

### **Deuxième Publication**

**Application of Multi Locus Sequence Typing to the  
analysis of the biodiversity of indigenous  
*Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon**

## ORIGINAL ARTICLE

# Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon

M.-J. Ayoub<sup>1,2</sup>, J.-L. Legras<sup>3</sup>, R. Saliba<sup>2</sup> and C. Gaillardin<sup>1</sup>

1 Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique, UMR INA-PG-INRA-CNRS Microbiologie Génétique Moléculaire, INA-PG, Thiverval-Grignon, France

2 Département des Sciences et Technologies Agroalimentaires, Université Libanaise Faculté d'Agronomie, Chouran, Beyrouth, Liban

3 Santé de la Vigne et Qualité du Vin, UMR INRA-Université Louis Pasteur Strasbourg-I, Colmar, France

## Keywords

biodiversity, Multi Locus Sequence Typing, *Saccharomyces cerevisiae*, typing, wine.

## Correspondence

Claude Gaillardin, INA-PG, Microbiologie Génétique Moléculaire, F-78850 Thiverval-Grignon, France.  
E-mail: [claudio@grignon.inra.fr](mailto:claudio@grignon.inra.fr)

2005/0524: received 16 May 2005, revised 28 August 2005 and accepted 26 September 2005

doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02817.x

## Abstract

**Aims:** To assess suitability of Multi Locus Sequence Typing (MLST) for investigating the biodiversity of wine yeast strains. This method was compared with established ones like microsatellite analysis or amplification of genomic regions flanked by repeated (delta) elements.

**Methods and Results:** DNA fragments were amplified and sequenced for 26 loci representing housekeeping genes, open reading frames (ORFs) of unknown functions or intergenic regions. A set of seven loci was tested on 84 *Saccharomyces cerevisiae* strains, including 65 strains isolated from traditional wineries in Lebanon, commercial wine strains and Asian isolates. An overall sequence diversity of 2.05% was observed, consisting of single nucleotide polymorphisms, 60% of them occurring in a heterozygous state. The number of polymorphic sites per locus varied between 4 and 14. The same set of strains was analysed by microsatellite typing on six polymorphic loci and by interdelta amplification.

**Conclusions:** Clustering of MLST profiles clearly differentiated the Asian group of strains from Lebanese and European commercial strains that appear closely related. The current MLST scheme appears less discriminatory (92.27%) on closely related wine yeasts than microsatellite or interdelta typing (>99%).

**Significance and Impact of the Study:** MLST is a highly reliable method for relatedness inference and promising for wine yeast typing.

## Introduction

Identification at strain level of *Saccharomyces cerevisiae* is a prerequisite to study diversity of this species and to monitor population dynamics during food product fermentations (Nadal *et al.* 1999; Pulvirenti *et al.* 2001, 2004; Lopes *et al.* 2002; Granchi *et al.* 2003; Cappello *et al.* 2004). It is also useful to select strains for their use as pure cultures, a practice that is widespread in baking, brewing and wine-making industries where strains contribute to product character (Dequin 2001; Romano *et al.* 2003; Cocolin *et al.* 2004). Unambiguously characterizing clinical isolates that can be responsible for infections in

immunocompromised patients is also an essential feature for understanding the epidemiology of pathogenic strains of this species (Zerva *et al.* 1996; McCullough *et al.* 1998).

Many methods were developed and applied for such purposes. Methods like karyotyping based on chromosome length polymorphism, or mitochondrial DNA polymorphism are the most widely used (Querol *et al.* 1992; Versavaud *et al.* 1995; Nadal *et al.* 1996; Comi *et al.* 2000; Lopez *et al.* 2001), but they can be cumbersome and time-consuming. Several polymerase chain reaction (PCR)-based techniques were proposed, like random amplified polymorphic DNA (RAPD) associated or not

with restriction analysis (Quesada and Cenis 1995; Perez *et al.* 2001) or with sequencing (McGrath *et al.* 1998), amplification of introns of the mitochondrial gene *COX1* or using intron splice site primers (de Barros Lopes *et al.* 1996; Lopez *et al.* 2003), amplification of genomic regions using primers associated with delta elements of retrotransposons (Ness *et al.* 1993; Legras and Karst 2003), or fingerprinting of microsatellite markers (Gallego *et al.* 1998; Hennequin *et al.* 2001; Legras *et al.* 2005). Even if such techniques are easily applied, they do not always ensure a reliable level of intraspecific discrimination, nor do they always permit easy handling of large numbers of isolates. Finally, some of them face problems when it comes to interlaboratory comparisons (Baleiras Couto *et al.* 1996; Perez *et al.* 2001).

To avoid some of these limitations at least, we tried to develop a Multi Locus Sequence Typing (MLST) scheme for *S. cerevisiae*. This method has been widely used in global epidemiology studies for the identification of bacterial pathogens (Enright and Spratt 1999; Urwin and Maiden 2003; Cooper and Feil 2004) since its first description in 1998 (Maiden *et al.* 1998). Databases are already available via the Internet to permit the comparison of allelic profiles (AP) of newly identified isolates (<http://www.mlst.net/>, 2005). Based on direct sequence data of alleles from different polymorphic loci, MLST has the advantage of being highly reliable. It thus permits high-throughput data generation and easy sharing of results between laboratories while minimizing the possibility of errors resulting from local experimental conditions. Recent examples of application of this technology to yeasts have been reported in *Candida albicans* (Bougnoux *et al.* 2002, 2003, 2005; Tavanti *et al.* 2003; Robles *et al.* 2004), where strain clustering using MLST has become a technique of choice. MLST thus appeared as a method worthwhile to test for strain discrimination in the *S. cerevisiae* taxon.

Here, we propose a MLST scheme based on the comparison of APs obtained from the combination of data from 400 to 600 bp regions of seven polymorphic loci. We evaluated the capacity of the method to differentiate between *S. cerevisiae* strains originating from different geographic locations, and to assess their genetic relatedness. As a control, we compared its efficiency with more conventional methods like interdelta and microsatellite typing.

## Materials and methods

### Strains used in the study

Eighty-four *S. cerevisiae* strains were subjected to MLST analysis. Sixty-five Lebanese isolates, 11 commercial

oenological strains used in western countries, five Asian strains and three reference strains (S288C, CBS 1171NT and CBS 1907) were analysed. The Lebanese isolates were initially taken from samples of naturally fermenting musts from scattered geographical Lebanese locations. Samples were taken from wineries found in different locations, from different wineries of the same villages, or from different vats of the same winery. The provenance of the 65 Lebanese strains, the year of isolation, as well as the sampled wine type are detailed in Table 1, along with the origins of the commercial and Asian strains and their AP determined in this study.

### Choice of loci and primers

A total of 26 loci was initially tested in order to choose an adequate set for MLST analysis. The loci *ATF1*, *ATP10*, *FLO1*, *MET4*, *RPN2*, *BUD3*, *SRI1*, *GDH1*, *STE50*, *NUP116*, *SPC72*, *SLF1*, *MSB2*, *DSE2*, *CHS5* and *YRM1* were chosen on the basis of their relative nucleotidic sequence conservation between *S. cerevisiae* and closely related species of the *sensu stricto* group, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces paradoxus*. For this purpose, amino acid sequences of the reference strain S288C, of *S. bayanus* and of *S. paradoxus* were retrieved from the SGD database (<http://www.yeastgenome.org/>, 2005) and aligned. Regions showing different levels of sequence conservation were chosen and further similarity comparisons of the DNA regions to be amplified were performed with the GCG software (Wisconsin Sequence Analysis Package, version 10.3, see <http://www.accelrys.com/bio>). Open reading frames (ORFs) of unknown functions were also tested: *YBL081W*, *YER140W*, *YNL095C*, *YDR102C*, in addition to intergenic regions between *HXT10/AUA1*, *BSC5/YNR070W*, *APP1/YPT53* (this last being named *IntAY* in the present study), as well as genes containing introns: *RPL34B*, *RPL35A*, *RPS9A*. Several couples of 18- to 20-mer oligos were designed for each locus, using the *PRIMER 3* program (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>; Rozen and Skaletsky 2000). While being themselves in conserved regions, primers were chosen so as to amplify variable regions of the loci over 400–600 bp. After assessing polymorphism of a number of isolates at these loci, seven loci were retained for further use. They are shown in Table 2 along with their primers, the expected amplicon sizes and the percentage nucleotide identity between *S. cerevisiae* and *S. bayanus* and *S. paradoxus* of the expected amplicon.

### Amplification conditions and sequencing

PCR amplifications were performed with a 9600 Perkin-Elmer Cetus thermocycler (GMI, Ramsey, MN, USA) in

**Table 1** Origins of the isolates

Isolate	Winery*	Wine type	Year of isolation	AP†
<b>Lebanese isolates</b>				
1	JB	Red	2002	ST2
4	MC	Red	2002	DST3
6	MC	Sweet	2002	–‡
8	MC	White	2002	DST3
10	KFb	White	2002	ST4
11	KFb	White	2002	ST5
13	KFa	White	2002	ST6
14	KFa	White	2002	ST5
18	KFa	White	2002	ST4
20	EE	Red	2002	ST6
21	EE	Red	2002	ST6
23	R	Red	2002	ST6
24	R	Rosé	2002	ST2
25	A	Red	2002	DST7
26	A	Red	2002	ST8
27	AL	White	2002	ST9
28	RA	Sweet	2002	ST9
29	RA	White	2002	ST6
32	DL	Red	2002	ST9
33	DL	White	2002	ST6
34	DL	White	2002	DST10
35	DL	Red	2002	ST6
36	EH	Red	2002	ST9
37	EH	White	2002	ST9
38	EH	Red	2002	ST4
39	EH	White	2002	DST11
40	T	Sweet (boiling)	2002	ST9
41	T	Sweet (boiling)	2002	ST6
42	Q	White	2002	ST4
43	B	White	2002	ST6
44	WKa	Sweet (boiling)	2002	ST2
45	WKb	Red	2002	ST6
46	WKb	Red	2002	ST5
47	WKb	Red	2002	ST6
48	WKb	Red	2002	DST12
49	WKc	White	2002	ST6
50	WKc	Red	2002	ST8
51	Ka	Sweet (boiling)	2002	DST13
52	Ka	Sweet (boiling)	2002	ST14
53	Ka	White	2002	ST15
54	Kb	White	2002	ST16
55	Kc	Red	2002	DST17
57	D	Sweet (boiling)	2002	ST6
61	BZ	Red	2002	ST18
63	HA	White	2002	DST19
64	HA	White	2002	DST19
66	BCa	White	2002	ST20
67	BCa	Sweet	2002	ST6
68	BCa	Red	2002	ST6
69	BCb	White	2002	ST21
70	BCc	White	2002	DST22
71	JDa	Rosé	2002	DST23
73	JDa	Red	2002	DST24
74	JDa	Red	2002	ST6
104	KE	White	2002	DST25

**Table 1** Continued

Isolate	Winery*	Wine type	Year of isolation	AP†
M21	MC	White	2001	DST3
Ca 2	RC	Red	2000	ST21
Ca 6	MC	Sweet	2000	ST2
Ca 7	MC	Red	2000	ST21
Ca 8	MC	Unknown	1993	ST40
Ca 12	M	Red	2000	ST6
Ca 13	WKa	Red	2000	ST6
Ca 14	TZ	Red	2000	DST26
Ca 23	M	Unknown	2000	DST27
D2	JDb	White	2000	DST28
Strain	Source	Country	ST	
<b>Asian strains</b>				
CLIB 409	Sugar cane	Vietnam	DST33	
CLIB 412	Sake	Japan	ST34	
CLIB 413	Fermented rice	China	ST35	
CLIB 414	High-sugar food	Japan	ST36	
CLIB 415	Fermented rice	Taiwan	ST37	
Strain	Reference/source	Country	ST	
<b>Commercial strains</b>				
Levuline BRG	UP30Y5 (isolated in Bourgogne)		DST29	
Levuline CER	Isolate of Davis 522		ST6	
Levuline CHP	CIVC8130 (isolated in Champagne)		DST30	
Ceres C2C	INRA Narbonne		ST6	
Levuline C19	INRA Colmar/Montpellier		DST30	
EG8	INRA Colmar		–	
Levuline FB	GLO 806 (Oenofrance)		DST31	
Levuline Killer	GLO 522 K (Oenofrance)		ST6	
Montbazin 1			ST9	
Levuline Primeur	GLO 7447 (Oenofrance)		DST32	
Montrachet, Davis 522	University of California, Davis		ST6	
Strain	Source	Country	ST	
<b>Other strains</b>				
S288C	Plant	USA	ST1	
CBS 1171NT	Beer	The Netherlands	DST38	
CBS 1907	–	–	DST39	

\*For the Lebanese isolates, the names of the wineries represent the initials of their localities. When two different wineries are located in the same village, their initials are followed by small letters to differentiate between them.

†Allelic profile (AP) which can be a sequence type (ST), or a diploid sequence type (DST).

‡Not determined.

25 or 30  $\mu$ l reaction mixtures containing Ex-Taq buffer (2 mmol l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>; Taqara), Ex-Taq (0.625 U), 200  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> of each dNTP, 0.5  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> of each oligo-nucleotide primer and 10–20 ng of yeast DNA. After denaturation at 95°C for 3 min, four amplification cycles (95°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 90 s) were followed by 30 more cycles (95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 90 s) and a final extension step was carried out

**Table 2** Primers and amplicons retained for the MLST study

Locus	Systematic name	Sequences 5'–3'	Expected amplicon sizes	Percentage identity with <i>Saccharomyces bayanus/Saccharomyces paradoxus</i>
ATF1	YOR377W	CAGATTGCCGCTCACAAAC AAATGCTTGGTGCCAGGA	401	80.3/89.5
MET4	YNL103W	CGAGGATAAGCCGAGCAA GCGCATCCACTCCATTGT	395	71.1/82.4
RPN2	YIL075C	CGGCCGTC AAGAGTTAGC TATCATGGCAGCCTGACG	397	82.6/91.4
NUP116	YMR047C	AAGCAACTGTCACCAACACG CTCCCCATCGTTCTTTGAG	501	74.2/85.8
STE50	YCL032W	CATCTGCCAAATTGCAAGAA ATCCCCATAGCAAATGACCA	503	81.1/92.4
YBL081W	YBL081W	TACCGCAGTTTGAAGCTCCT GGAGAAGTGCCTGGTTGT	501	79.5/86.8
IntAY*		TCGCAGAATTAGGGAGAAGT ACTCCCCGACAGCAGATTC	600	65.2/78.4

\*Intergenic locus between ORFs APP1 and YPT53 (YNL094W and YNL093W).  
MLST, Multi Locus Sequence Typing; ORF, open reading frame.

at 72°C for 5 min. The success of the amplifications was monitored on agarose gels. Sequencing of the amplified fragments was performed from both ends, resulting in an almost completely double-stranded sequence.

### Sequence and data analysis

The GCG (Wisconsin Sequence Analysis Package, version 10.3) and SEQUENCHER (Gene Codes Corporation, Ann Harbour, MI, USA, demo version 4.2) software were used to align and to compare the isolate sequences with the reference sequence of strain S288C. Disagreements were all visually inspected on both strands to make sure that they reflected real polymorphisms and not sequencing errors. Heterozygosities, defined as the concomitant occurrence of two different peaks at the same position, were observed. Presence or absence of alleles at all detected polymorphic sites was encoded into binary data so as to express homozygosity by the combinations (0,1) or (1,0) and heterozygosity by the combination (1,1). A bootstrap analysis was carried out using SEQBOOT program of the PHYLIP package (version 3.6; Felsenstein 2004) and the resampled data were used to generate pairwise comparison matrices of strains with the XLSTAT software (version 6.1.8, Addinsoft, Brooklyn, NY, USA) using the dice coefficient. Neighbor-Joining trees and a subsequent consensus tree were then built with the Neighbor and Consens programs (PHYLIP package). Similar clustering was obtained by analysing raw sequences and building distance matrices with DNADIST program of the PHYLIP package (results not shown). The APs of the strains, obtained by the combination of the different alleles at all tested loci, are referred to as sequence types (STs) or dip-

loid sequence types (DSTs) when they include heterozygosities. The discriminatory power of the method was determined according to the numerical index of Hunter and Fraser (1989). Distances between Asian, Lebanese and commercial strains populations were computed using Nei's distance (GENDIST – PHYLIP package) based on allele frequencies calculations (the alleles of a locus being the APs found for it).

### Interdelta and microsatellite fingerprinting

The 83 strains and S288C were subjected to analysis with the two methods. The conditions for interdelta fingerprinting were those described by Legras and Karst (2003), with slight modifications in the amplification programme. Amplifications were carried out in 25 µl mixtures using Ex-Taq enzyme of Taqara (0.75 U), 0.5 µmol l<sup>-1</sup> of each oligonucleotide primer and 10–50 ng template DNA. Electrophoresis of amplified products was run in 0.8% agarose gels (0.5X TBE). Analysis of the gels was carried out with the BIONUMERICS software (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgium, version 1.01). Microsatellite analysis was carried out using the six polymorphic loci SCAAT1, SCYOR267C, YPL009c, C4, C5 and C11 as described by Legras *et al.* (2005). Reverse primers were labelled with the fluorescent dyes 6-FAM, NED and VIC (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Primers were used at the concentration of 0.1 µmol l<sup>-1</sup> except for locus C4 (0.2 µmol l<sup>-1</sup>) and amplifications were performed as follows: 15 min at 95°C, 34 cycles of 30 s at 95°C, 2 min at 57°C and 1 min at 72°C, with a final step of 10 min at 72°C. The GENESCAN software (Applied Biosystems, version 3.7) was used for microsatellite data analysis. For

both methods, tree construction was performed using the Neighbor-Joining method (dice coefficient) with the BIONUMERICS software for interdelta and PHYLIP software for microsatellites. The discriminatory powers were determined as for MLST.

## Results

### Genetic diversity

After analysis of the sequences for the 84 strains with seven loci (Tables 1 and 2), two strains were finally excluded from the comparison and from the calculations of the parameters relevant to the MLST scheme. The commercial strain EG8 that generated two amplicons from locus YBL081W, and one Lebanese isolate that carried an insertion of 27 bp at the intergenic locus IntAY. The strains that were found identical by all three methods (i.e. 4, 8 and M21 sharing DST3, 41 and 45 sharing ST6 and CER and K1 also sharing ST6 – see Table 1 and Figs 2 and 3) were considered as clones of the same strain and thus only one isolate was retained for the calculations of the parameters involving strain numbers.

Sequencing results for the 82 remaining strains for the seven loci that were retained (Table 2) revealed 62 polymorphic sites for a total of 3013 bp (15 nucleotides were discarded from the 5'-end of each amplified strand to ensure a faithful reading of the sequences, as well as a region of microsatellite repeats in locus YBL081W), thus showing a sequence diversity of 2.05% (Table 3). All mutations were base substitutions except for a heterozygous point deletion in IntAY found in strains Clib 414, Clib 415 and CBS 1907. Heterozygosities could be detected in approximately 60% of the sites (Table 3).

At each polymorphic site, a single nucleotide change was observed, and a given site could be homozygous for either possibility, or heterozygous. In general, for any polymorphic codon triplet, only one mutation was detected.

Only two exceptions were observed, at loci STE50 and YBL081W. In both cases, two possible mutations were recorded, one being synonymous and the other not, while the combination of the two associated mutations yielded the same amino acid change as the nonsynonymous mutation. About 58% of the 48 nucleotide polymorphisms that were found in the five coding loci and YBL081W were nonsynonymous (Table 3).

The combination of the sequences obtained with the seven loci and for the 82 strains resulted in the distinction of 39 APs in addition to the one of the reference strain S288C that was unique (Fig. 1). Of the 39 differentiated profiles, 22 were DSTs and 17 were STs. Twenty-eight profiles were represented by a single strain (20 DSTs and eight STs) while the remaining profiles were shared by 2 (ST8, DST19 and DST30) to 22 (ST6) strains. Twenty-four strains were heterozygous for at least one site. The assignment of the APs to the different strains can be found in Table 1.

### Little variation is observed in the Lebanese strains

Twenty-six polymorphic sites were found in the sequences of the Lebanese strains, 16 of which were heterozygous, and the proportion of polymorphic sites per locus varied between 0.54% (ATF1 and RPN2) and 1.48% (NUP116) with an average of 0.81%. If we exclude five of the seven sites at NUP116 where divergence from S288C sequence was found in all Lebanese strains, the average proportion of polymorphic sites falls to 0.65% and the most variable locus becomes YBL081W with a diversity of 1.01%. These proportions were observed with 61 Lebanese strains (three clones being discarded beside the insertion carrying isolate) while only five Asian strains yielded diversities ranging between 0.42% (NUP116 and STE50) and 2.28% (IntAY) with an average of 1.17%. The global diversities per locus within all the strains varied between 0.84% and 2.69% (Table 3).

**Table 3** Sequence diversities

Locus	Size of examined amplicon*	Sequence diversity (%)	Number of polymorphic sites	Number of heterozygous sites	Number of nonsynonymous amino acid change
ATF1	371	2.69	10	6	5
MET4	365	2.46	9	5	5
RPN2	367	1.36	5	3	4
NUP116	471	2.54	12	9	7
STE50	473	0.84	4	4	3
YBL081W	396†	2.02	8	5	4
IntAY	570	2.45	14	5	NR

NR, non relevant.

\*30 bases of the sequences were discarded from the examination to ensure a clear reading of the chromatograms.

†A microsatellite repeats region was further discarded for this locus.

For each of the seven loci, one AP was more frequently encountered than the others, and was shared on average by approximately 73% of the strains. Except for locus NUP116, this AP was either that of S288C at the considered locus, or the one closest to that of S288C. The majority of the Lebanese and commercial strains (averages of 81% and 61% of the strains respectively) shared these profiles. For the Asian strains, some profiles were also more abundant, but these were different from the above-mentioned and were shared on average by approximately 63% of the Asian strains. After the global classification of the strains, ST6 was the most represented AP and was shared by 33% of the commercial strains, and 28% of the Lebanese strains.

When considering the discriminatory powers of the different loci, we observed that the lowest values are generally found with the Lebanese strains (Table 4). Within the cluster of the Lebanese and commercial strains (Fig. 1), cases of APs differing only by a single homozygous or heterozygous polymorphism were observed and it seemed that strains sharing these APs were very close because they shared similarities (determined according to dice coefficient) varying between 84% and 99% with an average of 93% while similarities between Asian APs varied between 75% and 95% with an average of 86%.

#### Clustering reveals a divergence of the Asian strains

Of the 62 sites of polymorphism, 37 were found in the Asian strains of which seven were shared between them and the Lebanese strains. Half of the remaining 30 sites were Asian-specific in our sample, while 11 were specific to Asian strains and to strain CBS 1907, and four were shared between Asian strains, CBS 1907, CBS 1171NT and Primeur. Only eight of the 26 sites found in the sequences of the Lebanese isolates were exclusively Lebanese while the rest were shared between Lebanese and the other strains from different origins. The five sites of systematic divergence with the reference sequence found for the Lebanese strains at locus NUP116 were also found in the commercial strains but not in the Asian strains, and for two of them, not in the strain CBS 1171NT. Two other sites of systematic divergence with S288C sequence were found at loci STE50 and IntAY, but this time in all strains. Finally, six sites were only found in the sequences of the commercial strains Primeur and BRG, and of the strains CBS 1171NT and CBS 1907.

Consequently, Asian strains that share specific mutations were more related to each other than to Lebanese or commercial strains and formed with strain CBS 1907 a very robust divergent cluster (with a bootstrap value of 100 for 100 resamplings, Fig. 1). The similarities they shared with the Lebanese isolates varied between 51% and

71% (with an average of 61%). On the other hand, the commercial strains did not seem to cluster separately from the Lebanese isolates. Indeed some of them shared the same APs as Lebanese strains (like MBZ, C2C, CER, Killer and Davis 522; see Fig. 1). While Asian strains tended to appear genetically isolated from Lebanese and commercial strains with Nei's distances of 4.5 and 1, respectively, European and Lebanese strains were much more related (distance of 0.06).

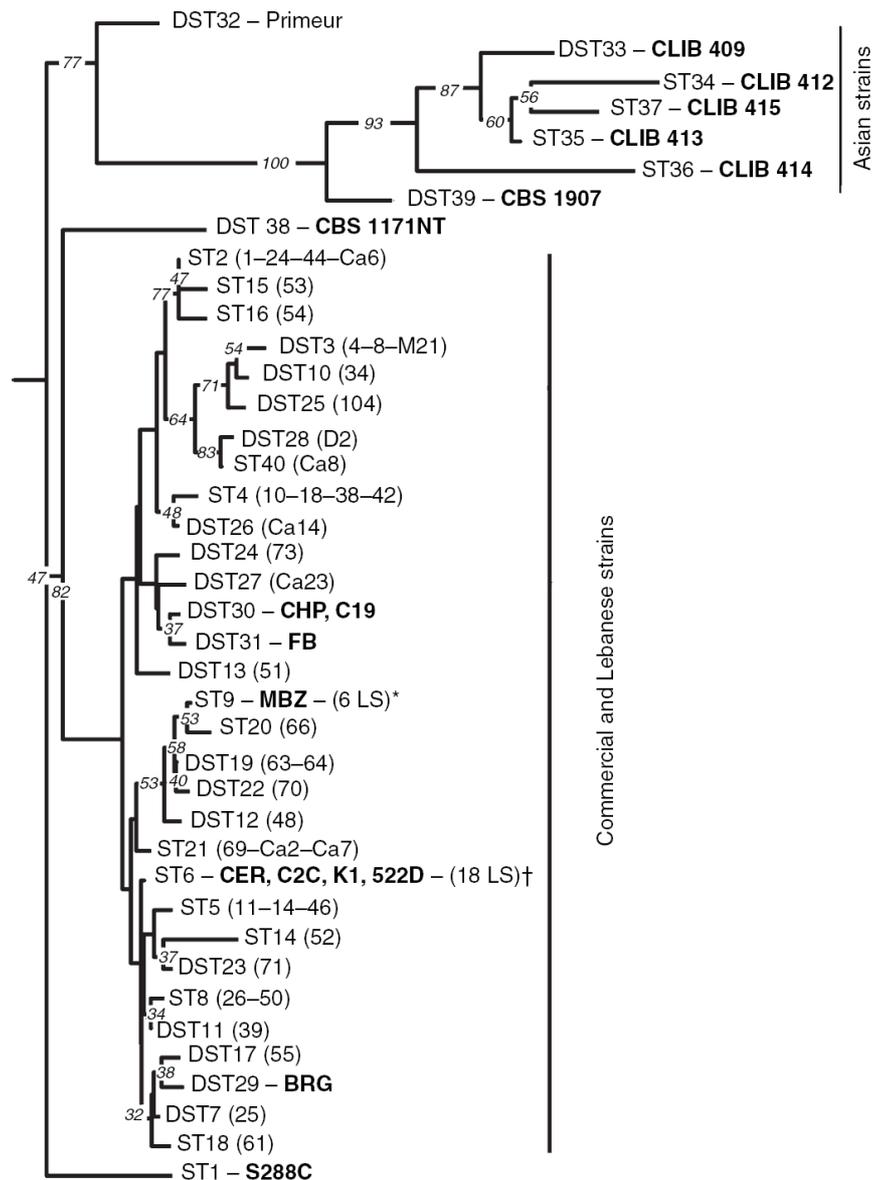
#### Contribution of loci to discrimination

The contribution of the seven loci to the final classification was not related to their individual discriminatory power, or to the number of APs per locus, or to their observed sequence diversity. For example (Tables 3 and 4), locus ATF1 that seemed the most polymorphic locus did not lead to any additional differentiation of APs in the global classification; it just contributed to a reorganization of the APs inside the clusters. NUP116, despite a diversity of 2.54%, distinguished only between seven APs because of its sites of systematic divergence found in Lebanese and commercial strains. MET4 and IntAY were the most discriminating loci. RPN2 and STE50 were the only loci that did not differentiate between Asian strains, and STE50 was the only locus where Asian strains shared APs with three Lebanese strains.

#### Congruence with interdelta and microsatellite analysis

The discriminatory power of our MLST scheme was of 92.27% while the discriminatory powers of interdelta and microsatellite fingerprinting reached 99.90% and 99.84% respectively. Most of the strains that were found identical by interdelta and microsatellite typing shared identical MLST profiles, but many strains that were found identical by MLST were differentiated by either one or both of the two other methods.

For example (see Figs 1–3) strains M21, 4 and 8, which originated from the same winery and shared DST3, were confirmed to be identical by the three methods. In ST6, strains 41 and 45 that originated from different locations were found identical with the three methods. The same was seen with Levuline Killer and CER that appear thus to be clones of the same strain although commercialized under different names, while the strain Davis 522 was found identical to them with MLST and very close by interdelta and microsatellite typing. This was also the case of strains 33 and 35 (ST6), isolated from the same winery and found related with interdelta and microsatellites. Strains 63 and 64 originating from the same winery were identical by MLST (DST19) and microsatellite analysis and related by interdelta typing. Of three Lebanese strains

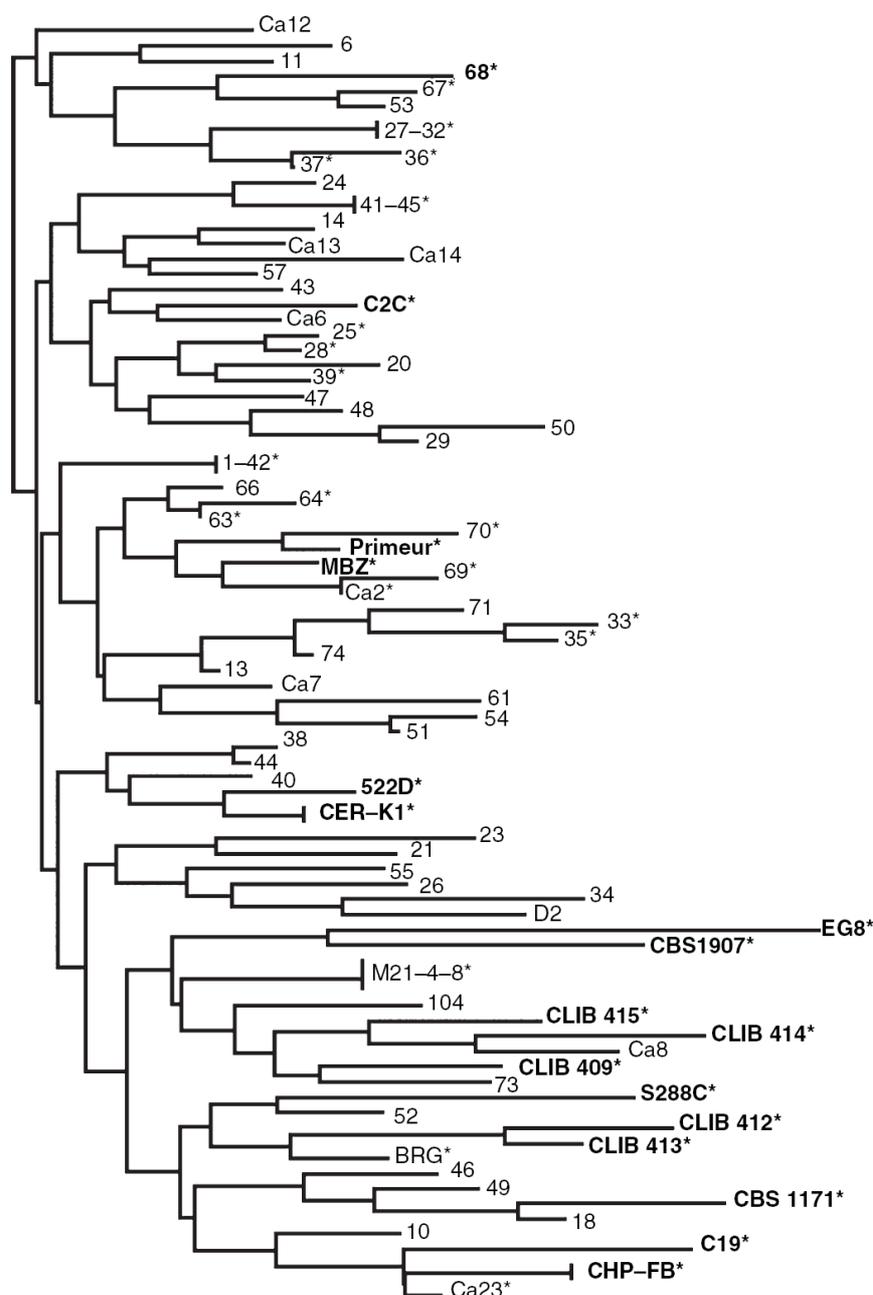


**Figure 1** Multi Locus Sequence Typing (MLST) classification scheme for the different allelic profiles (APs) according to Neighbor-Joining aggregation with dice coefficient. The Lebanese strains are indicated inside parenthesis. Bootstrap values >30 (over 100 repetitions) are reported on the corresponding clusters. LS, Lebanese strains; ST, sequence type; DST, diploid sequence type; 522D, Strain Davis 522; K1, Levuline Killer. \*The six LS are strains 27, 28, 32, 36, 37 and 40. †The 18 LS are strains 13, 20, 21, 23, 29, 33, 35, 41, 43, 45, 47, 49, 57, 67, 68, 74, Ca12 and Ca13.

sharing ST21, strains 69 and Ca2 were very close by interdelta and microsatellite analysis. The Lebanese strain Ca23 (DST27) was found, with the three methods, very close to the cluster of the strains C19, CHP and FB, which suggests that it could be a derivative of a commercial strain. These three commercial strains seemed very related, CHP seemed identical to FB with interdelta, and identical to C19 with MLST. Strains 36 and 37 (from the same winery) were identical with MLST (ST9) and microsatellites and very close with interdelta. Strains 32 and 27 were identical to each other with MLST and interdelta but not with microsatellites. They were also identical or related to 36 and 37 (ST9) with MLST and interdelta, respectively, while with microsatellites only strain 32 seemed close to strains 36 and 37.

In a few cases, however, MLST appeared equally or even more discriminant than the two other methods. Strain 39 (DST11) was found identical to strains 36 and 37 with microsatellites but different by the two other methods. Strains 1 and 42, isolated in separate locations, seemed identical with interdelta but different with MLST and microsatellites. Strains 25 and 28, isolated in separate locations, shared identical microsatellites and related interdelta profiles, but were clearly different by MLST.

Even though cases of similarity or relatedness were found between strains originating from the same wineries (example: strains 67 and 68 – see Table 1 and Figs 1–3) or villages (example: strains 69 and 70), no particular and clear grouping of the Lebanese isolates according to geo-

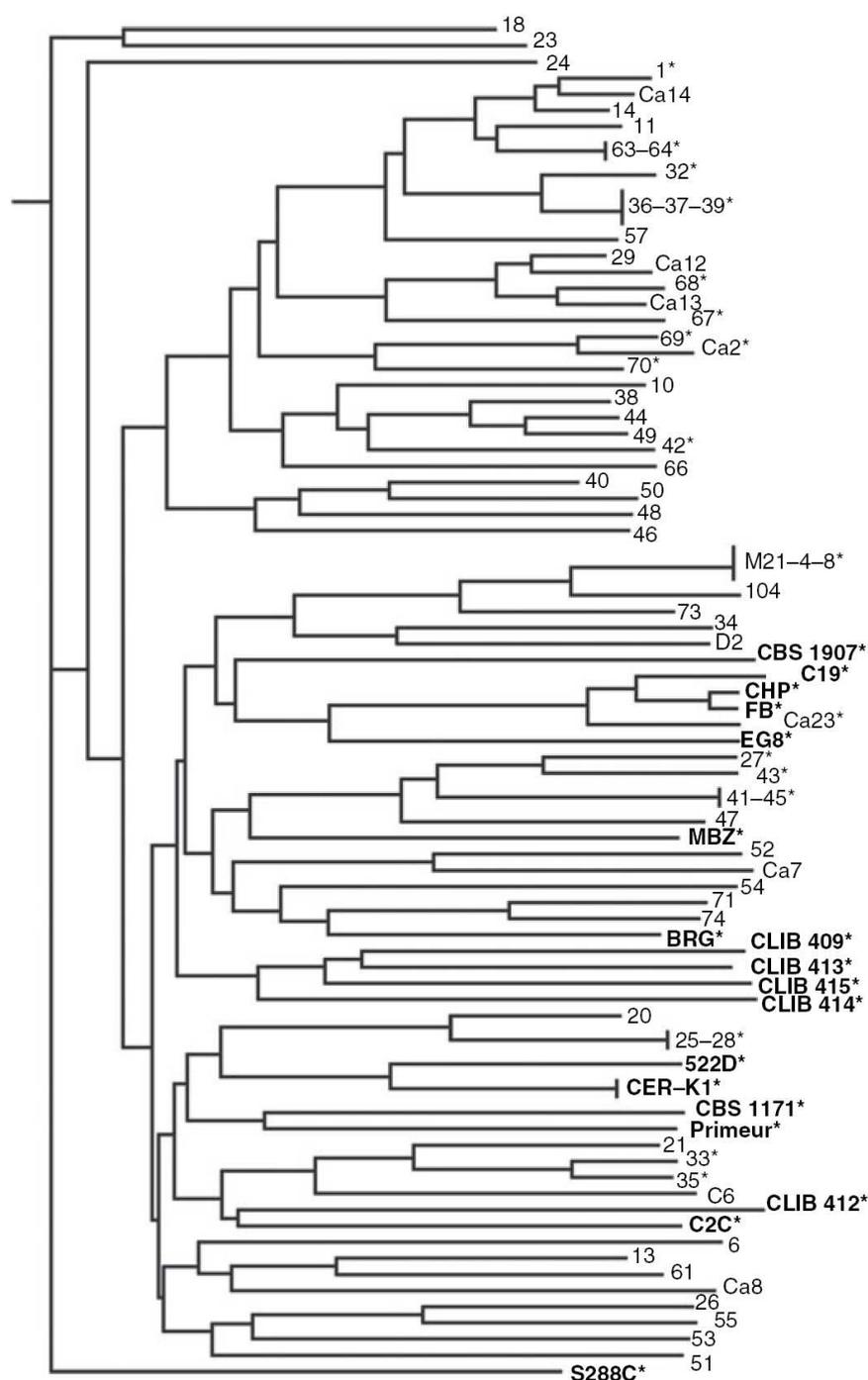


**Figure 2** Interdelta classification of the 84 studied strains according to Neighbor-Joining aggregation with dice coefficient. The labels of the Asian and commercial strains as well as those of the Lebanese strains cited in the Results, are indicated on the tree by (\*). 522D, Strain Davis 522; K1, Levuline Killer.

graphical origin or to wine type was found with any of the three methods.

The divergence of the Asian strains from the Lebanese and commercial strains was less obvious by interdelta and microsatellite fingerprinting than by MLST, both in terms of clustering or of presence of specific interdelta bands or microsatellite alleles (results not shown). Nonetheless, they were grouped in two clusters with interdelta fingerprinting, while with microsatellites only the strain Clib 412 was differently positioned from the rest of the strains.

Heterozygosities were found at all six microsatellite loci in proportions ranging between 12% (locus C4) and 29% (YPL009c) of the isolates. Of the 24 heterozygous strains found with MLST, 17 were also found heterozygous for at least one microsatellite locus while 14 additional heterozygotes were observed. With both MLST and microsatellites, a total of 40 nonhomozygous strains was found of which 27 Lebanese strains (approximately 42%), nine commercial strains (the only exception was Levuline C2C and strains K1 and CER considered as clones of the same strain) and the strains Clib 409, Clib 413, CBS 1907



**Figure 3** Microsatellite classification of the 84 studied strains according to Neighbor-Joining aggregation with dice coefficient. The labels of the Asian and commercial strains as well as those of the Lebanese strains cited in the Results, are indicated on the tree by (\*). 522D, Strain Davis 522; K1, Levuline Killer.

and CBS 1171NT. Cases of occurrence of three or four alleles were recorded for locus C4 in strains 34, 53, 74, Clib 409 and CBS 1907. This last strain had also three or four alleles at loci ScaAT1, C11 and C5.

## Discussion

Our aim was to test the suitability of MLST for *S. cerevisiae* strain typing in order to devise a reliable and discriminat-

ory method that would facilitate data exchange between laboratories. The results reported for the diploid yeast *C. albicans* were encouraging and heterozygosity contributed to the development of a highly discriminating scheme with only a limited number of polymorphic loci and sites, which is very convenient for typing large numbers of isolates (Bougnoux *et al.* 2002, 2003; Tavanti *et al.* 2003).

For *S. cerevisiae* oenological strains, 26 loci were preliminary checked including housekeeping genes, ORFs with

**Table 4** Results obtained with the loci used in the study

Locus	Number of AP per locus	Number of globally differentiated AP	Discriminatory power (%)			
			Global	Lebanese strains	Asian strains	Commercial strains
ATF1	11	0	30.6	15.7	90	41.7
MET4	10	11	48.8	40.9	70	41.7
RPN2	8	5	26.0	9.7	0	22.2
NUP116	10	7	45.6	31.6	90	41.7
STE50	10	3	52.7	35.3	0	72.2
YBL081W	10	2	42.2	27.3	40	63.9
IntAY	18	10	68.3	58.9	100	69.4

AP, allelic profile.

unknown functions, genes containing introns and intergenic loci. The genes were unrelated and the loci were scattered on different chromosomes to avoid marker linkage bias. Several assays of amplification with varying temperature stringencies, and preliminary sequencing of few strains for the loci, allowed the selection of a set of seven loci (Table 2).

The sequencing results with our MLST scheme showed an index of diversity of 2.05%, which was higher than previously reported (approximately 0.3%) in a study on the genetic diversity of 14 *S. cerevisiae* strains (Winzeler *et al.* 2003). In this last study, values were deduced from hybridization data on microarrays, and not from direct sequencing: such an approach may underestimate the real polymorphism because it yields, at a non-negligible rate, false-negative hybridizations. In *C. albicans*, the proportions of variable nucleotide sites for MLST schemes with seven or six housekeeping genes were higher than the values we observed, reaching approximately 3% (Bougnoux *et al.* 2002; Tavanti *et al.* 2003). The locus RPN2 was tested in both yeasts species (although analysed regions were different), and a diversity of 3.6% was recorded for *C. albicans* (Bougnoux *et al.* 2002) while it was of 1.26% for *S. cerevisiae*.

MLST schemes usually rely on the use of housekeeping genes where variation accumulates relatively slowly and tends to be selectively neutral. Such genes are under purifying selective pressure and are expected to yield more reliable data for inferring genetic relationships than genes under positive selection pressure. Limited variations were recorded in our set of loci, and little additional resolution seemed to be achieved by adding new ones. In an attempt to be more discriminative and to see if the choice of the markers was the limiting factor, we complemented our scheme with possibly more variable loci. In this way, we aimed at maintaining a low number of markers in the scheme so as to facilitate data acquisition and handling. More variation in the genome of *S. cerevisiae* was reported to occur in intergenic regions and among ORFs with

unknown functions (Winzeler *et al.* 2003). We thus added to the scheme the hypothetical ORF YBL081w and the intergene IntAY (between ORFs APP1 and YPT53).

While YBL081W was not very polymorphic and did not contribute much to further resolution, IntAY led to the distinction of one of the biggest number of APs. This suggests that more discriminating MLST schemes could be developed, but it cannot be presently stated that intergenic regions would be more useful to this end than housekeeping loci, because locus MET4 was the most discriminating locus.

With a discriminatory power of 92.27%, our MLST scheme with the seven loci seemed less discriminating for typing *S. cerevisiae* strains than the two other methods, interdelta fingerprinting and microsatellite analysis which had discriminatory powers of 99.90% and 99.84% respectively. These results may appear to contradict those reported for MLST schemes developed for other organisms-like *C. albicans*, where very high discriminatory powers of 99.6% and 99.7% were obtained (Bougnoux *et al.* 2002; Tavanti *et al.* 2003) and where MLST schemes were ranked amongst the most discriminating methods used for typing *C. albicans* (Robles *et al.* 2004). For the Lebanese isolates, more resolution was achieved with interdelta and microsatellite analysis and many isolates having the same APs in our MLST typing scheme harboured different interdelta patterns and microsatellite profiles. Two nonexclusive interpretations of this discrepancy can be proposed. The first assumes that delta elements and microsatellites, which are highly mutable and rapidly evolve in the genome (Tautz 1989; Gabriel *et al.* 1996), are intrinsically more prone to variation in *S. cerevisiae* than in *C. albicans*. For instance, there are less active retroelements in *C. albicans* than in *S. cerevisiae* (Goodwin *et al.* 2003). A second reason may be related to the set of markers and methodology chosen in our case for comparing the methods. The primers that we used for interdelta amplifications (Legras and Karst 2003) were optimized to yield more bands and more discrimination

than the primers of Ness *et al.* (1993) that have much less resolutive power. For instance and based on the data of Schuller *et al.* (2004), the primers of Ness *et al.* (1993) yielded a discriminatory power of 80% (according to our calculations) while those of Legras and Karst (2003) reached 99.6% for the same set of unrelated *S. cerevisiae* strains. In addition, our interdelta results take into account all amplified bands and not only the bands <1.5 kb like Legras and Karst (2003). This might have further contributed to the high discrimination obtained. Similarly, the loci chosen for microsatellite analysis were described as being very polymorphic (Legras *et al.* 2005).

Finally, while microsatellite and interdelta typing appear highly discriminant in *S. cerevisiae*, these methods may symmetrically be less useful in shedding light on strain relatedness for the same reason. The results obtained with MLST were congruent with interdelta and microsatellite fingerprinting for strains that seemed closely related, but they allowed a better distinction between Asian and Lebanese or commercial strains (Figs 1–3). MLST could thus be more useful for inferring relationships between isolates of different origins. Combining the results of two robust methods-like microsatellite typing and MLST may prove useful in future studies to build more robust biological trees.

Indeed, our MLST results suggest that the Lebanese strains could be more related to each other and to European commercial strains than to Asian strains which mapped clearly in a separate cluster. This is in accordance with the genetic distances calculated with these three populations, although our sample was clearly biased towards Lebanese strains. The fact that no obvious grouping of the Lebanese isolates was observed, whether in relation to geography or to wine type, probably reflects close relatedness of all strains of Lebanese origins together and with European commercial strains. The discriminatory power of our scheme fell from 92.27% to 90.65% when applied only to the Lebanese strains that constituted 78% of all the isolates studied here. Their large contribution to the analysed sample is likely to have lowered the global discriminatory power of the scheme. In a similar way, the resolutions of *C. albicans* schemes fell from 99.6% for unrelated isolates to 95.6% for related pairs of isolates (Robles *et al.* 2004).

Several theories were proposed to account for the evolution and adaptation of oenological strains. The genome renewal theory stipulates that homothallic strains, appearing after sporulation of already established heterozygotes that have accumulated mutations in their genome, can produce new homozygote diploids more fit and capable of overtaking and replacing the parent heterozygotes (Mortimer *et al.* 1994). Other authors suggest that clonality and mitotic recombina-

tions might be more relevant to the evolution of these yeasts (Puig *et al.* 2000). Our results do not distinguish between both propositions, but clearly suggest that Lebanese autochthonous strains are distant from Asian strains and close to European strains, probably reflecting the unlikely introduction of genetic material from Asian strains into the Lebanese territory.

Sequence-based techniques-like the MLST approach are still promising for more applications to typing. Different levels of discrimination may be reached by selecting more or less variable gene sets. The scheme in its actual form is promising for differentiating between isolates from different origins and seems more useful in inferring relatedness of isolates.

### Note added in proof

While this study was revised, a publication by Fay and Benavides (2005) reported an MLST analysis of *S. cerevisiae* strains of diverse origins. In agreement with our conclusions, these authors showed that oenological strains from different geographic origins display little diversity but differ markedly from sake strains or strains of environmental origin.

### References

- Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H. and van der Vossen, J.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol* **62**, 41–46.
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P.A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of oenological yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol* **62**, 4514–4520.
- Bougnoux, M.-E., Morand, S. and d'Enfert, C. (2002) Usefulness of Multi Locus Sequence Typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **40**, 1290–1297.
- Bougnoux, M.-E., Tavanti, A., Bouchier, C., Gow, N.A.R., Magnier, A., Davidson, A.D., Maiden, M.C.J., d'Enfert, C. *et al.* (2003) Collaborative consensus for optimized Multi Locus Sequence Typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **41**, 5256–5266.
- Bougnoux, M.-E., Aanensen, D.M., Morand, S., Theraud, M., Spratt, B.G. and d'Enfert, C. (2004) Multi Locus Sequence Typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. *Infect Genet Evol* **4**, 243–252 (Review).
- Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. and Zacheo, G. (2004) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J Appl Microbiol* **97**, 1274–1280.

- Cocolin, L., Pepe, V., Comitini, F., Comi, G. and Ciani, M. (2004) Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Res* **5**, 237–245.
- Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C. and Cocolin, L. (2000) Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *Int J Food Microbiol* **58**, 117–121.
- Cooper, J.E. and Feil, E.J. (2004) Multi Locus Sequence Typing – what is resolved? *Trends Microbiol* **12**, 373–377.
- Dequin, S. (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 577–588 (Review).
- Enright, M.C. and Spratt, B.G. (1999) Multi Locus Sequence Typing. *Trends Microbiol* **7**, 482–487 (Review).
- Fay, J. and Benavides, J. (2005) Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **1**, 66–671.
- Felsenstein, J. (2004) *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6*. Distributed by the author. Seattle, USA: Department of Genome Sciences, University of Washington.
- Gabriel, A., Willems, M., Mules, E. and Boeke, J.D. (1996) Replication infidelity during a single cycle of Ty1 Retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7767–7771.
- Gallego, F.J., Perez, G., Martinez, I. and Hidalgo, P. (1998) Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Vitic* **49**, 350–351.
- Goodwin, T.J., Dalle Nogare, D.E., Butler, M.I. and Poulter, R.T. (2003) Ty3/gypsy-like retrotransposons in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: Tca3 and Tcd3. *Yeast* **20**, 493–508.
- Granchi, L., Ganucci, D., Viti, C., Giovannetti, L. and Vincenzini, M. (2003) *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous oenological fermentations of grape musts with 'adequate' and 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Lett Appl Microbiol* **36**, 54–58.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G., Nguyen, H.V., Gaillardin, C. and Dujon, B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Clin Microbiol* **39**, 551–559.
- Hunter, P.R. and Fraser, C.A. (1989) Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **27**, 2156–2160.
- Legras, J.-L. and Karst, F. (2003) Optimisation of inter-delta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol Lett* **221**, 249–255.
- Legras, J.-L., Ruh, O., Merdinoglu, D. and Karst, F. (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol* **102**, 73–83.
- Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A. and Caballero, A.C. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J Appl Microbiol* **93**, 608–615.
- Lopez, V., Querol, A., Ramon, D. and Fernandez-Espinar, M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int J Food Microbiol* **68**, 75–81.
- Lopez, V., Fernandez-Espinar, M.T., Barrio, E., Ramon, D. and Querol, A. (2003) A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int J Food Microbiol* **25**, 1, 63–71.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J. et al. (1998) Multi Locus Sequence Typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3140–3145.
- McCullough, M.J., Clemons, K.V., Farina, C., McCusker, J.H. and Stevens, D.A. (1998) Epidemiological investigation of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates by a genotypic method. *J Clin Microbiol* **36**, 557–562 (Erratum in: *J Clin Microbiol* 2000, **38**, 1311).
- McGrath, A., Higgins, D.G. and McCarthy, T.V. (1998) Sequence analysis of DNA randomly amplified from the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol Cell Probes* **12**, 397–405.
- Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G. and Polsinelli, P. (1994) Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* **10**, 1543–1552.
- Nadal, D., Colomber, B. and Pina, B. (1996) Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1944–1950.
- Nadal, D., Carro, D., Fernandez-Larrea, J. and Pina, B. (1999) Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1688–1695.
- Ness, F., Lavallee, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. and Dulau, L. (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J Sci Food Agric* **62**, 89–94.
- Perez, M.A., Gallego, F.J. and Hidalgo, P. (2001) Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 375–378.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. and Perez-Ortin, J. (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2057–2061.
- Pulvirenti, A., Caggia, C., Restuccia, C., Gullo, M. and Giudici, P. (2001) DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from Sicilian sourdoughs. *Ann Microbiol* **51**, 107–120.
- Pulvirenti, A., Castellari, L., De Paola, M. and Giudici, P. (2004) Étude de la prédominance des levures sélectionnées

- au cours d'une fermentation en cave. *Bull OIV* **77**, 661–675, 883–884.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramon, D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2948–2953.
- Quesada, M.P. and Cenis, J.L. (1995) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am J Enol Vitic* **46**, 204–208.
- Robles, J.C., Koreen, L., Park, S. and Perlin, D.S. (2004) Multi Locus Sequence Typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **42**, 2480–2488.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. and Capece, A. (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* **1**, 1–2, 169–180.
- Rozen, S. and Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* ed. Krawetz, S. and Misener, S. pp. 365–386. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett* **231**, 19–26.
- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* **1**, 6463–6471.
- Tavanti, A., Gow, N.A.R., Senesi, S., Maiden, M.C.J. and Odds, F.C. (2003) Optimization and validation of Multi Locus Sequence Typing for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **41**, 3765–3776.
- Urwin, R. and Maiden, M.C. (2003) Multi-Locus Sequence Typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* **11**, 479–487 (Review).
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. and Hallet, J.-N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3521–3529.
- Winzeler, E.A., Castillo-Davis, C.I., Oshiro, G., Liang, D., Richards, D.R., Zhou, Y. and Hartl, D.L. (2003) Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. *Genetics* **163**, 79–89.
- Zerva, L., Hollis, R.J. and Pfaller, M.A. (1996) In vitro susceptibility testing and DNA typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical isolates. *J Clin Microbiol* **34**, 3031–3034.

**Chapitre IV**  
**Utilité des trois méthodes moléculaires pour  
le typage et la construction phylogénique**

## IV.1 Introduction

Puisque la comparaison des trois méthodes de typage indépendantes utilisées dans notre étude a montré des limitations liées à chacune d'elles et des incohérences entre elles (voir Ayoub *et al.*, 2006 / chapitre III), nous avons exploité les données obtenues pour les 82 souches typées et nous avons procédé à un jumelage des données des trois méthodes moléculaires dans le but de comparer les résultats ainsi produits avec ceux générés par chaque méthode prise individuellement. L'arbre obtenu de la sorte prend en compte un plus grand nombre de marqueurs moléculaires qui se caractérisent de plus par des vitesses évolutives différentes. Ceci devrait donner, et à défaut de comparer des génomes entiers, une image de la parenté entre les souches plus complète, plus solide et plus proche de la réalité que celles données par les arbres obtenus par l'une ou l'autre des méthodes.

Toutes les données ont été transformées en données binaires (0,1), que ce soit les SNP trouvés avec le MLST ou les allèles des loci microsatellites (les différents nombres de répétitions) ou les bandes interdelta. Les arbres de Neighbor Joining ainsi que le bootstrap ont été générés avec le logiciel PHYLIP comme décrit dans Ayoub *et al.* (2006) / chapitre III.

## IV.2 Jumelage des trois méthodes moléculaires

Les résultats du jumelage sont montrés dans la **figure 32**. En les comparant avec les méthodes prises individuellement, nous pouvons voir, comme attendu, que les rapprochements solides entre souches sont retrouvés. D'autres rapprochements moins solides sont mieux regroupés et certaines limitations liées à chaque méthode sont gommées. Nous ne rentrerons pas ici dans les détails des résultats de cet arbre-là mais nous notons qu'il est évident que des clusters déjà solides selon les méthodes individuelles le soient aussi avec le jumelage. Les moins fortes solidités d'autres clusters sont soit améliorées, soit maintenues. Mais globalement nous pouvons remarquer qu'un nombre non négligeable de regroupements ont des valeurs de bootstrap faibles, ce qui pourrait être lié au nombre de marqueurs utilisés qui est finalement assez faible. Nous considérons néanmoins que par rapport aux autres constructions phylogéniques de cette étude, et même si l'arbre du jumelage n'est pas le plus solide ou le plus informatif dans l'absolu, cet arbre est le plus fiable et le plus utile pour la construction phylogénique ainsi que pour le typage pour les raisons citées plus haut. Mais c'est aussi l'arbre le plus difficile à obtenir. Cet arbre sera considéré dans les analyses qui

suivent comme la référence en fonction de laquelle les comparaisons seront faites. La discussion sera faite ultérieurement pour les méthodes individuelles et combinées et certains aspects abordés dans Ayoub *et al.* (2006) / chapitre III seront repris ou développés. Nous nous limiterons à tirer de cet arbre les observations qui suivent.

#### **IV.2.1 Correspondances avec les conclusions obtenues selon les méthodes individuelles**

Le jumelage des trois méthodes permet de rejoindre les conclusions globales mises en évidence par les différentes méthodes ce qui suggère que les erreurs qui peuvent entacher les méthodes individuelles ne conduisent pas à des résultats aberrants.

L'absence de clustering selon le type de vin peut être vérifiée dans la **figure 33**. Une différenciation aurait particulièrement été attendue entre les vins produits à partir de moûts concentrés en sucres et des moûts non concentrés, la résistance au stress osmotique pouvant jouer un rôle important dans la sélection de souches adaptées à fermenter dans de telles conditions (Ivorra *et al.*, 1999). L'absence d'un tel clustering pourrait être due à l'adaptation de la majorité des souches libanaises à la fermentation dans des conditions de stress osmotique vu le recours courant à ce type de fermentation dans la plupart des caves et en parallèle avec la production de vin sec. Alternativement l'absence de clustering pourrait être expliquée par le fait que les parties du génome que nous avons examinées ne sont pas associées ou liés à des loci associés à la résistance au stress osmotique.

L'absence de clustering selon la géographie et "l'effet winery" peuvent être examinés dans la **figure 34**. Nous pouvons en effet voir qu'en dehors du rapprochement entre des couples de souches provenant des mêmes caves, des mêmes villages ou de zones géographiques restreintes, il n'y a pas de rapprochement systématique d'un grand nombre de souches en provenance des mêmes localités, comme il a été souligné dans Ayoub *et al.* (soumis) / chapitre II.

#### **IV.2.2 Souches commerciales et flore indigène**

Nous pouvons voir dans la **figure 32** qu'un cluster de souches libanaises est apparenté aux souches commerciales CHP, FB et C19, plus particulièrement la souche Ca23 et, avec des

valeurs de bootstrap plus faibles, les souches 4 (et ses clones), 34, 73, 104, D2 et Ca8, ce qui n'était pas toujours clair avec les méthodes individuelles. Cette parenté devrait être confirmée par l'analyse d'un nombre plus grand de marqueurs. Si elle s'avérait réelle, elle serait relativement surprenante vu la préservation présumée de la flore indigène de contaminations commerciales et il serait utile de vérifier l'utilisation de ces levures industrielles dans les caves concernées. En effet, tous les sites d'où ces souches ont été isolées, et bien que certains soient éloignés géographiquement, ont pu à un moment ou à un autre (mais en dehors de nos campagnes de prise d'échantillons) avoir recours au levurage avec une ou plusieurs des souches commerciales impliquées, probablement obtenues à partir d'un fournisseur commun. Ceci semble indiquer une implantation des souches commerciales qui pourraient éventuellement évoluer ou se mélanger à la flore indigène pour s'adapter aux conditions fermentaires locales (par exemple la souche 4 était dominante et stable au cours de plusieurs années dans sa cave d'origine). Valero *et al.* (2006) avaient trouvé que les souches commerciales ne s'implantent pas définitivement dans les vignobles et n'affectent par conséquent pas la flore indigène. Nos observations semblent les contredire ou alors indiquer une implantation des souches dans les caves au lieu des vignobles, mais nous ne pouvons pas, selon l'échantillonnage que nous avons conduit (à partir des fermentations), choisir entre ces deux suppositions.

Outre la mise en évidence de la parenté des souches commerciales C19, CHP et FB, nos résultats confirment la parenté des souches CER et 522D rapportée dans la littérature (ITV, 2003) et montrent que la souche K1 (Levuline Killer ou GLO522K) est identique à la souche CER. Bien que la souche Primeur soit utilisée comme souche œnologique, il apparaît qu'elle est proche de souches non vinicoles comme c'est aussi le cas pour les souches CBS 1907 (origine inconnue) et CBS 1171 (isolée de bière). Quant à la souche S288C, lorsqu'elle n'est pas utilisée comme racine de l'arbre (en notant que l'enracinement est artificiel et imposé par le format de sortie du logiciel PHYLIP), elle apparaît plus proche des souches non vinicoles que des souches vinicoles, conformément aux résultats de Fay et Benavides (2005). Les résultats de Aa *et al.* (2006) / chapitre III montrent par contre qu'elle est proche de souches isolées sur des grappes. Par ailleurs le traitement des séquences amplifiées avec le MLST de la souche EG8 ont mis en évidence un chevauchement de séquences apparemment différentes pour le locus YBL081w. Cette observation pourrait rejoindre la nature supposée hybride de cette souche (Bidenne *et al.*, 1992), possiblement entre *S. cerevisiae* et *S. kudriavzevii* comme d'autres souches œnologiques commerciales (Bradbury *et al.*, 2006).

### **IV.3 Utilisation des méthodes individuelles pour la construction phylogénique : comparaison entre elles et avec le jumelage**

On pourrait lier l'utilité d'application d'une méthode de typage à des analyses phylogéniques, à sa capacité de grouper séparément des isolats peu ou pas apparentés et de regrouper entre eux et selon leur degrés de parenté, des isolats très apparentés ou modérément apparentés. Les degrés de parentés que nous considérons par la suite sont définis par rapport à la classification jumelée des trois méthodes qui est prise comme référence. Les caractéristiques des méthodes sont résumées dans le **tableau 9**.

#### **IV.3.1 Les souches très apparentées**

La congruence avec le jumelage et la correspondance entre les classifications des méthodes prises individuellement (**Figures 29, 30 et 31** de Ayoub *et al.*, 2006 / chapitre III) ont varié selon la méthode considérée mais elle ont principalement concerné les souches très apparentées, plus particulièrement les couples ou les groupes de souches solides (selon le jumelage) dont la congruence entre les trois méthodes a déjà été discutée dans Ayoub *et al.* (2006) / chapitre III. Ceci montre que du fait de la forte parenté de telles souches, les effets d'ambiguïtés (qui seront discutées plus loin) liés aux méthodes moléculaires sont affaiblis.

#### **IV.3.2 Les souches modérément apparentées**

Par contre, les relations entre souches moins apparentées sont plus ou moins occultées quand on utilise l'une ou l'autre des méthodes, ce qui montre la limitation de la recherche de parenté basée sur une méthode moléculaire unique. Mais nous pouvons observer qu'en dépit des faiblesses, des clusters plus ou moins grands (de plus de deux souches) et plus ou moins solides sont retrouvés avec l'une ou l'autre des méthodes. Considérons par exemple le cluster qui regroupe les souches 4, 104, 34 etc...jusqu'à C19 (valeur de bootstrap ~45 selon le jumelage des trois méthodes). Nous pouvons voir qu'il n'est retrouvé dans son intégralité avec aucune méthode et qu'il est divisé en divers sous-groupes. Mais à chaque fois quatre à cinq des dix profils formants ce cluster sont regroupés entre eux. Un autre cluster regroupant les souches 33, 35, 71 et 74 (valeur de bootstrap de 56) est divisé en deux groupes avec les microsatellites et avec le MLST qui ne discrimine pas entre trois de ses souches (ST6) mais il est retrouvé dans son intégralité avec les interdeltras. Un troisième cluster, moins solide cette

fois, délimité à une valeur de bootstrap de 20 (non indiquée sur la figure) et regroupant les souches 1, 42, Ca14 etc...jusqu'à la souche 18, est divisé en 3 ST en MLST (ST2, 26 et 4) et dispersé en plusieurs profils ou couples non apparentés avec les interdeltas et les microsatellites. Mais dans ce cas, la faible congruence est attendue du fait de la faible solidité du cluster. Plusieurs autres exemples de petits groupes plus ou moins solides de trois ou quatre souches sont dans les même cas de figure exposés.

Les trois méthodes présentent des faiblesses vis-à-vis de cette question pour des causes sous-jacentes différentes. L'évolution par mutations ponctuelles (telle que visualisée par les SNPs) est beaucoup plus lente (de l'ordre de  $10^{-9}$  par génération; Taylor et Fisher, 2003) que celle de loci variables comme les microsatellites ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$  mutations par génération pour des motifs poly(GT) et poly(G) (Henderson et Petes, 1992) ou  $7 \cdot 10^{-6}$  à  $5 \cdot 10^{-5}$  pour les loci que nous avons utilisés (taux de mutation calculé d'après le taux de glissement estimé par Kruglyak *et al.*, 2000). L'examen de l'accumulation de SNP, particulièrement dans des gènes de ménage, devrait donner une vision plus proche de l'évolution globale du génome de la levure. Dans ces gènes les mutations qui s'accumulent devraient être principalement des mutations sélectivement neutres et leur taux d'accumulation devrait de ce fait ne dépendre que du taux de mutation. L'inclusion de plusieurs de ces loci qui pourraient avoir eux aussi des "horloges moléculaires" spécifiques (voir par exemple Aa *et al.*, 2006) devrait donner une vision plus solide. Mais du fait du faible pouvoir de discrimination du MLST, des risques de saturation si les souches ont anciennement divergé, ou au contraire de la faible variabilité entre les souches œnologiques pour les loci que nous avons choisis, de fausses parentés peuvent être prédites par cette méthode.

Par contre, les éléments delta qui peuvent être impliqués dans des réarrangements génomiques ainsi que les microsatellites qui, de plus, mutent assez facilement par glissement de polymérase lors de la réplication, subissent de la sorte une évolution rapide et se caractérisent par une grande variabilité qui peut livrer une vision erronée de la parenté entre les souches. Tout en rappelant que les méthodes basées sur l'analyse des interdeltas et des microsatellites adoptent des systèmes d'analyses différents (uniquement de grandes différences de taille sont par exemple observées en gel d'agarose avec les interdeltas), nous pouvons remarquer néanmoins qu'un risque d'homoplasie existe avec les interdeltas où des bandes de même mobilité électrophorétique peuvent ne pas être homologues et les similitudes établies entre souches pourraient de ce fait être erronées. Aussi, des allèles microsatellites

identiques (en nombre de répétitions) peuvent être hérités d'un même ancêtre ou être obtenus indépendamment, ce qui fausse la parenté établie sur leur base. Mais l'utilisation de plusieurs loci devrait diminuer les effets de telles erreurs. C'est ce qui a probablement lieu dans notre cas pour nos souches apparentées dans cette comparaison et c'est ce qui explique les correspondances qui sont quand même trouvées malgré les faiblesses des méthodes. On pourrait aussi, dans le cas de l'utilisation d'une méthode de caractérisation basée sur des microsatellites, ajouter au schéma des loci ayant des taux de mutations plus bas que ceux que nous avons utilisés et qui donneront une meilleure fiabilité d'estimation des distances entre individus moyennement éloignés (tel que dans Legras *et al*, soumis)

### **IV.3.3 Les souches peu ou pas apparentées**

La différenciation des souches non-œnologiques des souches œnologiques (très solide avec le jumelage) est bien visible avec le MLST mais pas avec les deux autres méthodes. Pour de telles souches qui ont pu évoluer sans échanges génétiques entre elles, l'accumulation de SNP donne une image claire et plus proche de la divergence génomique. Par contre avec des marqueurs dont la variation est grande, les risques d'erreurs dont nous avons parlé et qui conduisent à assigner de fausses parentés, ont des effets amplifiés lorsqu'il s'agit de souches très distantes.

## **IV.4 Utilisation des méthodes individuelles pour le typage**

L'utilité d'une méthode de typage est principalement liée à sa capacité à différencier des isolats très apparentés (et par conséquent modérément et non apparentés). Mais il est aussi important qu'elle soit reproductible et fiable et donc capable d'identifier sans ambiguïtés une même souche dans des échantillons indépendants. Les caractéristiques des trois méthodes moléculaires examinées sont variables vis-à-vis de ces exigences. Elles sont résumées dans le **tableau 9**.

### **IV.4.1 Interdeltas et Micorsatellites**

Comme souligné dans Ayoub *et al.* (2006) / chapitre III les typages interdeltas et microsatellites ont montré une grande capacité de discrimination des isolats œnologiques libanais ou non-libanais ainsi que des isolats non-œnologiques, ce qui montre que ces

méthodes sont adéquates pour le typage. Cette adéquation au typage est liée à la variabilité et au polymorphisme de ces marqueurs qui détectent de ce fait de petites différences entre souches même très apparentées.

L'amplification interdelta souffre en théorie d'un grand risque d'homoplasie. Mais ce risque semble être faible pour nos souches (du moins les souches libanaises) comme nous l'avons vu plus haut. Cette méthode peut néanmoins poser des problèmes de reproductibilité entre laboratoires, à cause de la sensibilité de la réaction d'amplification à la quantité d'ADN matrice et aux conditions expérimentales incluant l'enzyme utilisée. Des amplifications non spécifiques peuvent survenir, en particulier si l'amorçage se fait à des températures relativement faibles comme l'ont souligné, conformément à nos observations, Fernandez-Espinar *et al.* (2001) et Schuller *et al.* (2004).

#### **IV.4.2 MLST**

Le MLST, comme discuté dans Ayoub *et al.* (2006) / chapitre III, s'est révélé moins efficace que les deux autres méthodes pour le typage des souches libanaises. Fay et Benavides (2006) ont trouvé dans le set de loci et de souches de diverses origines qu'ils ont examinés, une diversité de séquence globale similaire à la nôtre (avec toutes les souches que nous avons analysées) et qui est de l'ordre de 2,5%. Mais ils ont obtenu une discrimination globale plus grande pour l'ensemble de leurs souches (> 99%). Ceci appuie l'idée que la faible discrimination de notre schéma MLST est liée, au moins en partie, à la parenté de notre groupe de souches libanaises qui se sont caractérisées par un polymorphisme de séquence limité (de l'ordre de 0,7%), ce qui a fortement diminué la discrimination globale du schéma .

Mais cette faible discrimination est aussi liée à la méthode elle-même. En effet, les souches commerciales différenciées par les deux autres méthodes ne l'ont pas été par notre schéma MLST ce qui prouve que notre schéma pourrait être amélioré par le choix des loci ayant des capacités de discrimination différentes. Les résultats récents obtenus par Aa *et al.* (2006) ont aussi montré que leur schéma MLST dépendait fortement du choix des loci dont la diversité de séquence était considérablement variable. Mais la diversité de séquence globale de leur sets de souches et de loci est apparue bien moindre que la nôtre (~0,38%) et plus proche de celle de Winzeler *et al.* (2003) et elle a été accompagnée d'une faible capacité de discrimination. Cette capacité de discrimination est apparue, comme dans notre cas, inférieure

à celles d'autres méthodes puisque des souches qui avaient été trouvées différentes par d'autres méthodes de typage (comme un groupe de souches isolées de chênes par Sniegowski *et al.*, 2001) n'ont pas été différenciées. Mais la discrimination de ces schémas basés sur des gènes de ménage, particulièrement dans le cas de souches apparentées et donc peu variables entre elles, n'égalera probablement pas celles atteintes par les autres méthodes basées sur des marqueurs hypervariables.

#### **IV.5 Considérations pratiques de l'utilisation des méthodes moléculaires individuelles**

Mis à part les considérations théoriques affectant l'utilité des méthodes pour les applications discutées ci-dessus, chacune se caractérise par des propriétés facilitant son utilisation ou se heurte à des écueils spécifiques. Les propriétés de chaque méthode sont précisées dans le **tableau 10**.

##### **IV.5.1 L'amplification interdelta**

Les premières amorces utilisées pour ces amplifications ont été développées par Ness *et al.* (1993) qui ont étudié leur efficacité pour la différenciation de souches industrielles. En examinant les résultats des nombreuses études de biodiversité qui ont eu recours à ces amorces, nous pouvons constater que leur pouvoir discriminant était faible et souvent inférieur à celui d'autres méthodes de typage. Le nombre de bandes obtenu était souvent très faible et il fallait mettre en oeuvre d'autres méthodes, comme la restriction de l'ADNmt ou le caryotypage, pour améliorer le pouvoir discriminant. Tout ceci rendait l'utilisation de ces amorces peu pratique. De nouvelles amorces ont été développées pour améliorer la discrimination de la méthode (Legras et Karst, 2003) qui a pratiquement doublé (Schuller *et al.*, 2004).

Mais vu les limitations citées plus haut, notamment la possibilité de survenue d'artefacts durant les amplifications, les essais sont à répéter plus d'une fois pour confirmer les résultats. Le typage interdelta est pourtant relativement simple à mettre en oeuvre et il est peu coûteux puisqu'il ne nécessite pas d'équipements sophistiqués. Il peut être utilisé sur de l'ADN purifié et *a priori* sur des levures entières (Masneuf et Dubourdieu, 1994) ce qui devrait faciliter le suivi des fermentations en temps réel et le suivi de l'implantation de levures inoculées. L'analyse subséquente des données brutes et l'assignation des bandes, du fait de la survenue

d'amplifications non spécifiques et de bandes de faible intensité peut introduire un biais supplémentaire et cette assignation des bandes est une opération qui peut être assez lente. La comparaison entre laboratoires ou entre différentes répétitions expérimentales est donc assez difficile et des conditions très standardisées d'expérimentation doivent être adoptées pour limiter les artefacts.

#### **IV.5.2 L'analyse des répétitions microsatellites**

L'utilisation initiale de marqueurs microsatellites individuels avait mis en évidence l'utilité de cette approche pour différencier des souches de *S. cerevisiae* (Lieckfeldt *et al.*, 1993 ; Gallego *et al.*, 1998 ; Perez *et al.*, 2001a). L'association de plusieurs de ces marqueurs génétiques s'est avérée très utile pour la discrimination entre souches de *S. cerevisiae* puisqu'un grand polymorphisme intraspécifique a été observé (Field and Wills, 1998 ; Hennequin *et al.*, 2001 ; Legras *et al.*, 2005).

La méthode est précise et reproductible et elle permet le multiplexage et l'analyse d'un grand nombre d'échantillons ce qui la rend très pratique. Mais elle requiert un équipement plutôt sophistiqué et des opérateurs spécialisés ce qui limite son utilisation pour des applications industrielles. Des artefacts peuvent être observés durant l'amplification par PCR par un phénomène de glissement de la polymérase similaire à ce qui a lieu *in vivo* durant la réplication de l'ADN (Tautz *et al.*, 1989) mais ces artefacts peuvent être repérés durant l'analyse des résultats si le manipulateur est expérimenté. La comparaison entre différents laboratoires est possible à condition d'adopter une standardisation stricte de l'estimation des tailles des allèles comme nous l'avons expérimenté avec les analyses de données de l'équipe de J.-L. Legras.

#### **IV.5.3 MLST ou Multi-Locus Sequence Typing**

Au cours de notre travail deux études ont été publiées sur le développement de schémas MLST pour des souches de *S. cerevisiae*. Elles ont mis en évidence, conformément à nos résultats et comme nous l'avons déjà indiqué, l'utilité du MLST pour la différenciation de souches de diverses origines (Fay et Benavides, 2006), mais aussi sa limitation dans l'application au typage (Aa *et al.*, 2006). Le MLST avait été utilisé pour la première fois sur une levure avec *Candida albicans*. Son application au typage et à l'étude de l'épidémiologie

de cet organisme avait montré une grande capacité de discrimination même avec l'utilisation d'un nombre de marqueurs limité (Bougnoux *et al.* 2002, Bougnoux *et al.* 2003, Tavanti *et al.* 2003).

Le MLST nécessite une amplification par PCR et un séquençage subséquent. L'accès à cette technologie très fiable devient de plus en plus répandu. L'analyse d'un grand nombre d'isolats est possible. L'analyse des séquences qui est généralement assez facile permet la comparaison des résultats entre différents laboratoires et minimise au maximum les possibilités de divergences et d'erreurs dues aux conditions expérimentales adoptées dans chaque laboratoire. La nécessité d'échanger des souches n'est pas requise, et une base de données peut être créée sur le net pour un échange et une comparaison de résultats. C'est d'ailleurs déjà le cas pour les différents organismes soumis à ce mode de typage (<http://www.mlst.net/>, 2006).

#### **IV.6 Combinaisons binaires des méthodes**

Pour essayer de palier les limitations et les incohérences des méthodes exposées ci-dessus et améliorer leurs rendements là où elles échouent, et pour avoir une image de la parenté qui serait plus proche de la réalité puisque qu'aucune des méthodes individuelles n'offre une classification certaine, nous avons combiné les méthodes deux à deux pour obtenir des arbres qui seraient plus solides (**Figure 35**). De telles combinaisons éviteraient le recours à l'utilisation simultanée des trois méthodes de typage qui serait lourde à mettre en œuvre. Un bilan des rendements améliorés, particulièrement pour l'application à la construction phylogénique, est présenté dans le **tableau 11**.

L'association de deux méthodes discriminantes comme les interdeltras et les microsatellites a donné comme attendu une grande discrimination des souches. En comparaison avec les classifications selon les méthodes individuelles, la consistance pour les souches très apparentées a naturellement été maintenue, celle de petits groupes de souches modérément apparentées a aussi été globalement maintenue ou légèrement améliorée pour certains groupes (comme pour les exemples que nous avons abordés plus haut). Par contre la différenciation des souches peu ou pas apparentées n'a pas été améliorée.

Les associations Interdelta/MLST ou Microsatellites/MLST ont donné des arbres plus proches de l'arbre global particulièrement en terme de différenciation des souches non-œnologiques et dans une moindre mesure de regroupement de souches modérément apparentées qui ont été plus ou moins améliorées selon les clusters. Les parentés proches ont naturellement été retrouvées.

Dans le cas d'associations avec le MLST, la grande discrimination de marqueurs hypervariables palie le manque de discrimination du MLST tout en étant tamponnée. L'association entre méthodes dont les marqueurs évoluent à des vitesses différentes donne une vision plus proche de la réalité quant à la parenté des souches et le nombre plus élevé de marqueurs ainsi utilisés aide à solidifier la topologie de l'arbre.

L'association de marqueurs très variables et avec lesquels un risque d'homoplasie existe accentue les inconsistances et les assignations de fausses parentés comme c'est le cas des souches de différentes origines. L'utilisation d'une association de méthodes comme les interdeltas et les microsatellites semble moins utile que celles incluant des schémas MLST, particulièrement pour la classification phylogénique d'isolats non apparentés. Nous préconisons donc une association incluant des schémas MLST pour la construction phylogénique, particulièrement le MLST et les microsatellites qui est plus fiable que les interdeltas.

Pour le typage et puisqu'un niveau équivalent de discrimination est obtenu par une seule méthode, une association de plus d'une méthode est inutile. Nous préconisons pour le typage l'utilisation des microsatellites qui reste moins sujette que les interdeltas aux artefacts. Mais au besoin, et pour des cas individuels où une méthode échoue à discriminer deux souches, une deuxième pourrait être utilisée pour une meilleure distinction.

**Chapitre V**  
**Diversité physiologique**  
**VS**  
**Diversité moléculaire**

## V.1 Introduction

Avec la diversification de la production vinicole à travers le monde, la recherche d'une typicité et d'une spécificité des vins prend de l'essor. Malgré l'intervention de plusieurs facteurs, la qualité gustative d'un vin est principalement influencée par la variété de raisin, matrice d'arômes primaires, et par la souche de *Saccharomyces cerevisiae* qui fournit par fermentation les arômes secondaires. La tendance est de plus en plus à suggérer l'utilisation de cultures pures ou mixtes de souches indigènes pour améliorer les caractères sensoriels des vins et pour obtenir des goûts typiques et distingués (Fleet, 2003 ; Romano *et al.*, 2003). Le choix de la souche de *S. cerevisiae* à utiliser pour vinifier est donc essentiel.

Dans ce travail nous avons choisi de comparer par leurs capacités fermentaires 24 souches de *S. cerevisiae* incluant des souches indigènes libanaises et des souches non-libanaises. Nous avons utilisé un seul et même milieu fermentaire de façon à ce que les différences observées soient uniquement liées aux souches utilisées. La spécificité des souches a été évaluée en étudiant notamment la production de certaines molécules aromatiques ayant un impact important sur l'arôme du vin et en recherchant la formation d'une faible quantité de molécules pouvant avoir des effets organoleptiques indésirables.

Les 24 souches ont été choisies parmi les 82 précédemment caractérisées par les trois méthodes de typage moléculaire utilisées dans cette étude (MLST, typage interdelta et microsatellites) et pour lesquelles une classification a été générée après le jumelage de ces méthodes (voir précédemment et **Figure 36**). La phylogénie des souches selon les résultats fermentaires a été comparée à leur classification moléculaire dans le but d'examiner la correspondance entre les deux types de classification et de voir si des souches identiques ou apparentées au niveau moléculaire auraient des caractéristiques fermentaires correspondant à cette classification.

## V.2 Matériel et Méthodes

### V.2.1 Choix des souches

24 souches préalablement identifiées comme appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ont été choisies pour ce travail. Parmi elles figurent 18 souches indigènes libanaises : les souches 4, 24, 34, 37, 40, 41, 45, 52, 54, 63, 69, 70, 71, 73, 104, Ca6, Ca8 et D2, une souche œnologique non libanaise (Davis 522 désignée dans la suite 522D) et cinq souches isolées de sources non vinicoles: CLIB 412, CLIB 413, CLIB 414, CLIB 415 et CBS 1907.

Les souches libanaises isolées à partir d'échantillons de moûts de raisins en cours de fermentations naturelles proviennent de différentes régions géographiques qui sont indiquées dans le **tableau 12**. Elles ont été choisies (voir la **figure 36** et le **tableau 12**) de façon à inclure des souches identiques mais isolées d'endroits différents, pour écarter les doublons (les souches 41 et 45), des souches apparentées, présentes dans des clusters solides ayant des valeurs de bootstrap > 50 (les souches CLIB 412, CLIB 413, CLIB 414, CLIB 415 et CBS 1907, les souches 4, 34, 73, 104, Ca8 et D2) et d'autres souches apparentées présentes dans des clusters moins solides ou parsemées entre les différents clusters (les souches 24, 37, 40, 52, 54, 63, 69, 70, 71 et Ca6).

### V.2.2 Fermentations

#### V.2.2.1 Milieu de fermentation

Le milieu fermentaire est un jus de raisin commercial additionné de sucre et constitué des variétés Cabernet Sauvignon (50 %), Cabernet franc (25 %) et Merlot (25 %). Son pH est de 3,4 et il contient 200 g/l de sucres totaux dont le glucose (62 g/l), le fructose (63 g/l) et le saccharose (75 g/l) déterminés par analyse HPLC (voir V.2.3.1). La teneur en azote assimilable par les levures est évaluée à 347 mg/l d'après l'indice de Formol qui est une estimation de l'azote assimilable aminé et ammoniacal (Aerny, 1996). Le moût est sulfité avec 60 mg/l de SO<sub>2</sub> avant son inoculation avec les souches choisies.

L'indice de Formol est déterminé selon la procédure adaptée de Zoecklein *et al.* (1995) : 100 ml de moût sont amenés à pH 8 avec de la soude 1N, dilués au double et mélangés avec 25 ml de formaldéhyde (37%) porté aussi à pH 8. Le mélange est ensuite ramené à pH 8 avec

un volume V de soude 0,1N. La teneur en azote assimilable (N) est calculée comme suit :

$$N_{\text{mg/l}} = (V)_{\text{ml NaOH}} \times (0,1)_{\text{meq OH}^-/\text{ml}} \times (14)_{\text{mg/mmol N}} \times (1)_{\text{mmol N/meq OH}^-} \times (200/100) \times (1000_{\text{ml}}/100_{\text{ml}})$$

Soit :

$$N_{\text{mg/l}} = V_{\text{ml NaOH}} \times 28$$

### V.2.2.2 Conduite des fermentations

Les fermentations avec les 24 souches ont été réalisées à 28°C et répétées en double pour chaque souche. Les moûts ont été inoculés à 3% (v/v) à partir de pré-cultures aérobies de 24h mises en agitation continue à 28°C sur le même moût de raisin utilisé pour les fermentations mais dilué à 80 g/l de sucres.

L'évolution des fermentations a été suivie par la mesure du degré Brix pour obtenir une appréciation approximative des fins de fermentation. Avec l'avancement de la fermentation et l'enrichissement du milieu en éthanol, la mesure du degré Brix par un réfractomètre ne délivre plus la teneur réelle en sucres puisque cet alcool change l'indice de réfraction. Nous avons donc corrigé le degré Brix selon la formule tirée de Weast (1988) :

$$\text{Brix corrigé} = -676,67 + 1286,4 \times \text{SG} - 800,47 \times (\text{SG}^2) + 190,74 \times (\text{SG}^3)$$

$$\text{SG} = 1,001843 - 0,002318474(\text{OB}) - 0,000007775 (\text{OB}^2) - 0,000000034 (\text{OB}^3) + 0,00574 (\text{AB}) + 0,00003344 (\text{AB}^2) + 0,000000086 (\text{AB}^3)$$

Avec SG = Gravité spécifique, OB = Brix initial, AB = Brix corrigé

### V.2.3 Analyses chimiques des moûts fermentés

Les échantillons prélevés après la fin des fermentation pour les analyses chimiques sont centrifugés puis filtrés sur des filtres en acétate de cellulose de porosité 0,45µm. Les filtrats sont conservés à -85 °C jusqu'au moment des analyses.

#### V.2.3.1 Analyse des sucres

Les dosages des sucres du moût initial et des moûts en fin de fermentation ont été réalisés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La colonne utilisée est une

colonne de silice greffée de groupements NH<sub>2</sub> (LC-NH<sub>2</sub>, Supelco ; longueur 30 cm, diamètre interne 4,6 mm, particules 5 µm). La phase mobile est constituée d'une solution d'acétonitrile (Romil) à 83 % (v/v) dans de l'eau distillée. Le débit est réglé à 1,5 ml/min. L'appareil est muni d'un détecteur à indice de réfraction (DIR) (Waters). L'injecteur est manuel (Rheodyne) et le volume de l'injection est de 20 µL. Des solutions standard contenant du D (+)-fructose, D (+)-glucose et du saccharose (BDH) servent à étalonner l'appareil et à déterminer les concentrations des sucres.

### **V.2.3.2 Analyse de l'éthanol**

L'analyse est faite par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en utilisant un chromatographe (GC-17A, Shimadzu) muni d'une colonne à garnissage de 2 mètres de longueur et de 4,6 mm de diamètre interne et de phase stationnaire polaire (Carbowax 20 M, Supelco). L'injection se fait à une température de 170°C sous une pression de 100 KPa, le gaz vecteur constituant la phase mobile étant l'azote gazeux ayant un débit de 18 ml/min. La température de la colonne est de 90°C et celle du détecteur à ionisation de flamme (FID), 200°C.

Le n-propanol (Merck) est utilisé comme standard interne à toutes les injections à une concentration de 0,45 g/l. La solution étalon est composée d'éthanol (1 g/l) et de n-propanol. Les échantillons de vin à analyser sont dilués au 1/100<sup>ème</sup> et additionnés de n-propanol dans les mêmes proportions que la solution étalon. 1,5 µL de ces mélanges sont injectés dans le chromatographe.

Le degré alcoolique est calculé en % (v/v) par la relation [Ethanol] / 7,89, où 0,789 (g/ml) est la masse volumique de l'éthanol.

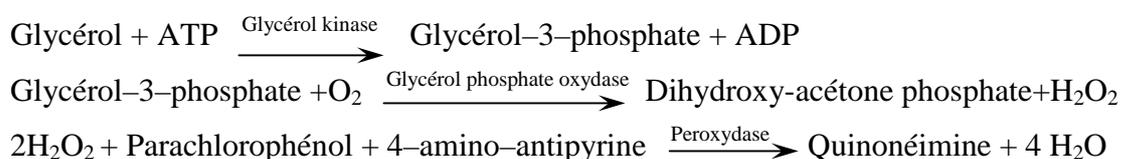
### **V.2.3.3 Analyse de certains composés aromatiques**

L'acétaldéhyde, l'acétate d'éthyle, le n-propanol, l'isobutanol et l'alcool isoamylique ont été analysés dans les vins. Leur dosage a été fait par CPG en utilisant le même appareillage décrit précédemment. Mais la colonne est soumise dans ce cas à un gradient de température allant de 70°C (1 min) à 170°C (2 min) avec une vitesse de 7°C/min. Le standard interne est le n-butanol utilisé à une concentration de 0,2g/l. La solution étalon est constituée de tous les composés recherchés (aux concentrations de 0,1 g/l) et de n-butanol. 1,5µl des échantillons de vin mélangés au standard interne sont injectés dans le chromatographe.

### V.2.3.4 Analyse du glycérol

Le glycérol est dosé par spectrométrie (Spectromètre Secaman Prim) à 505 nm avec une méthode enzymatique (Kit ABX Diagnostics, A11A00071) adaptée de Fossati et Prencipe (1982). Un réactif contenant de l' amino-antipyrine (0,4 mmol/l), de la glycérol kinase ( $\geq 200$ U/l), de la glycérol-3-phosphate-oxydase ( $\geq 2000$  U/l) de la peroxydase ( $\geq 200$  U/l) et de l'ATP (0,8 mmol/l) est mélangé avec un tampon contenant du parachlorophénol (2,7 mmol/l), du magnésium (4 mmol/l) et du tris pH 7,6 (100 mmol/l).

Le principe du dosage se base sur les réactions suivantes :



La quinonéimine a une absorbance maximale à 505 nm. L'augmentation de l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration de glycérol dans l'échantillon. L'échantillon de vin est dilué 10 fois afin de ne pas dépasser la zone de linéarité dont le maximum déterminé par une série de solutions standard de glycérol se situe à 1,05 g/l. La concentration du glycérol dans l'échantillon est calculée selon la formule suivante:

$$[\text{Glycérol}]_{\text{g/l}} = (\text{DO échantillon} / \text{DO étalon}) \times E \times D$$

D = dilution

E = concentration de l'étalon de glycérol (0,209 g/l)

## V.2.4 Caractérisation plus poussée de quelques souches

### V.2.4.1 Souches concernées

Outre la détermination des paramètres présentés plus haut, des tests plus poussés ont été réalisés avec 16 souches libanaises (les souches 4, 24, 37, 40, 41, 45, 52, 54, 63, 69, 70, 71, 73, Ca6, Ca8 et D2) et la souche commerciale 522D.

#### **V.2.4.2 Tests de résistance à l'éthanol**

Les tests de résistance des souches à l'éthanol ont été adaptés de Carrasco *et al.* (2001). Des pré-cultures servent à ensemencer des milieux YPD liquides supplémentés de 10, 12, 14 et 16% (v/v) d'éthanol. Ces milieux sont incubés à 28°C pendant 48h et servent à leur tour à ensemencer des milieux YPD solide. La viabilité (en %) est le rapport entre le nombre de colonies obtenues sur YPD additionné d'éthanol et le nombre de colonies obtenues sur YPD exempt d'éthanol, et les résultats sont la moyenne de trois répétitions indépendantes.

#### **V.2.4.3 Tests de production de H<sub>2</sub>S**

Les souches ont été cultivées sur le milieu Biggy Agar (Bismuth Sulfite Glucose Glycine Yeast, Difco) et incubées à 28°C durant cinq jours. Ce milieu évalué par Jiranek *et al.* (1995) donne une bonne indication de la capacité des souches à produire du H<sub>2</sub>S et induit des productions similaires à celles obtenues sur des milieux synthétiques imitant les jus de raisins, que ce soit en aérobie ou en anaérobie. La production de H<sub>2</sub>S se traduit par une coloration brunâtre ou noirâtre des colonies alors que les souches non productrices présentent des colonies blanchâtres.

#### **V.2.5 Analyses des résultats**

Les diverses figures, les calculs et l'analyse de variance ont été effectués sur Excel-XP (Microsoft). Xlstat (Addinsoft) a été utilisé pour établir les corrélations (selon le coefficient de Pearson ou le coefficient biserial de points qui testent la linéarité de la relation entre deux variables) ainsi que les statistiques descriptives. La classification ascendante hiérarchique (CAH) pour les données technologiques et toutes les analyses en composantes principales (ACP) avec ou sans rotation varimax et qui ont été normalisées pour éviter l'influence des valeurs extrêmes ont aussi été réalisées avec Xlstat, ainsi que tous les tableaux qui les accompagnent. Les CAH pour les données moléculaires ont été faites avec Phylip (version 3,6). Le même programme a été utilisé pour le calcul des valeurs de bootstrap pour les données moléculaires générées sur la base des matrices de corrélations établies avec Xlstat.

### V.3 Résultats

24 souches de *S. cerevisiae* ont été soumises à l'étude, dont 18 souches œnologiques autochtones isolées de différentes régions libanaises (**Tableau 12**), une souche œnologique commerciale (522D) et cinq souches non-œnologiques (CLIB 412, 413, 414, 415 et CBS 1907). Les résultats de deux fermentations ont été pris en compte par souche à l'exception de la souche Ca8 pour laquelle les résultats d'une seule fermentation ont été retenus.

Les fermentations ont été suivies par la mesure du degré brix qui donne une idée de l'évolution de la concentration des sucres totaux (glucose, fructose et saccharose) et c'est sur sa mesure que nous nous sommes basés pour décider de l'arrêt des fermentations. Le degré Brix a diminué progressivement avec la transformation des sucres en éthanol pour se stabiliser en fin de fermentation après 7 à 11 jours selon les souches (**Figure 37**). Nous avons considéré que la stabilisation du degré Brix indique la fin des fermentations et nous avons arrêté ces dernières après l'atteinte de cette phase, soit au premier jour de stabilisation du degré Brix. Nous pouvons remarquer à prime abord que la souche 52 ne conduit pas à une fermentation complète des sucres puisque le degré Brix reste plus élevé que ceux des autres souches et nettement supérieur à zéro.

#### V.3.1 Comparaison des 24 souches selon les paramètres fermentaires

Après avoir conduit les fermentations nous avons déterminé, pour la totalité des souches, la production d'acétaldéhyde, d'acétate d'éthyle, d'alcools supérieurs (n-propanol, isobutanol et alcool isoamylique), de glycérol et d'éthanol (et le degré alcoolique). Pour 17 des 24 souches (la souche 522D et 16 souches libanaises) nous avons en plus déterminé les sucres résiduels ( $S_R$ ), la production de sulfure d'hydrogène et la viabilité aux degrés alcooliques de 10, 12, 14 et 16.

Suite aux analyses, nous avons examiné la variation des paramètres étudiés en procédant à une analyse de variance (**Tableau 13**). Cette analyse a montré que tous les paramètres varient significativement avec la souche (au seuil  $p=0,01$ ). Les paramètres les plus variables et donc les plus discriminants parmi ceux que nous avons étudiés sont l'acétaldéhyde, les alcools supérieurs et l'acétate d'éthyle qui présentent les coefficients de variation (écart-type/moyenne) les plus importants (**Tableau 14**). Nous avons négligé la variation des sucres

résiduels étant donné qu'elle a été causée par les seuls résultats extrêmes de la souche 52 alors qu'en éliminant cette souche le coefficient de variation devient inférieur à 0,1.

### **V.3.2 Distribution des 17 souches selon les paramètres fermentaires, en vue d'une sélection**

Pour les 17 souches avec lesquelles nous avons procédé à des analyses de paramètres technologiques, nous avons effectué une analyse en composantes principales (ACP) avec rotation varimax dans le but d'aboutir à une représentation des souches qui faciliterait leur sélection ou leur élimination pour des tests ultérieurs en vue d'éventuelles utilisations industrielles. Par rapport à une ACP ordinaire, cette rotation permet de distribuer les souches en fonction des paramètres fermentaires tout en minimisant le nombre de ces derniers par axe et tout en maximisant leur contribution individuelle. Les souches seront ainsi mieux séparées en fonction de l'un ou l'autre des paramètres et nous pourrons relier les souches à un paramètre particulier et unique et par conséquent retenir ou écarter une souche selon ce paramètre.

Nous nous sommes basés pour effectuer l'ACP sur les moyennes obtenues par paramètre fermentaire et par souche (**Tableau 14**), et nous avons éliminé le paramètre qui ne varie pas entre les souches ( $S_R$ ). Nous avons aussi tenu compte des corrélations significatives (**Tableau 15**) existant entre la résistance aux degrés alcooliques de 12 d'une part et de 10 et 14 d'autre part, et nous avons par conséquent éliminé de l'analyse qui suit la résistance à 10 et 14 degrés.

Les résultats obtenus montrent qu'à chaque axe correspond un paramètre ayant une contribution minimale à la dispersion de l'axe de l'ordre de 76 % (**Tableau 16a**). Par exemple la dispersion associée à l'axe F1 est principalement due à la viabilité à 12 degrés et celle associée à l'axe F2 est principalement due à l'acétate d'éthyle et ainsi de suite pour les autres axes. Nous pouvons donc relier la distribution des souches selon un axe quelconque à un paramètre unique.

Le glycérol, associé au côté positif de l'axe F6 (**Figure 38** et **Tableau 16b**), est le composé le plus abondant obtenu par fermentation, après l'éthanol et le  $CO_2$ , et il peut apporter au vin du corps et de la rondeur et lui procurer une saveur légèrement sucrée proche

de celle du glucose. Il est généralement produit à des concentrations comprises entre 1 et 10g/l (Gardner *et al.*, 1993 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Les souches D2, 37, 54, 69, Ca6, 4, 45 et 70 ont produit des concentrations proches de la moyenne généralement rencontrée dans les vins (~6g/l) (**Tableau 14** et **Figure 38** accompagnée des **Tableaux 16c** et **16d**). A de telles valeurs de concentrations, les différences enregistrées entre les souches pourraient ne pas être perçues au niveau sensoriel.

L'acétate d'éthyle (côté positif de l'axe F2) est le principal ester trouvé dans les vins. Sa concentration est plus élevée dans les vins jeunes (Lilly *et al.*, 2000) et il est toujours associé à des effets organoleptiques indésirés puisqu'il est responsable de l'apparition d'un goût acétique qui se transforme en odeur de solvant à des valeurs élevées approchant les 150 - 200 mg/l (Ribéreau Gayon 1993 ; Rojas *et al.*, 2003). Les valeurs que nos souches ont produit d'acétate d'éthyle (entre 20 et 45) sont relativement basses par rapport aux valeurs généralement reportées dans la littérature (Comi *et al.*, 2000 ; Majdak *et al.*, 2002 ; Romano *et al.*, 2003 ; Selli *et al.*, 2004).

Le sulfure d'hydrogène (associé au côté positif de l'axe F3), même faiblement produit, est un composé préjudiciable au vin puisque son seuil de perception sensorielle est très faible (de l'ordre de 11 ng/l) alors que les souches de *S. cerevisiae* en produisent dans l'intervalle de 0 à 290 µg/l (Linderholm et Bisson, 2005). Ce composé qui procure au vin une odeur d'œuf pourri peut être synthétisé en réponse à des stressés métaboliques comme le déficit en matière azotée (Jiranek *et al.*, 1995). Les souches 37, 41, 45, 63, 71, 73 et D2 ont la capacité de produire du H<sub>2</sub>S.

Si les basses concentrations d'acétaldéhyde (associé à la partie positive de l'axe F4) qui constitue plus de 90% des aldéhydes du vin peuvent contribuer à la formation d'un arôme fruité, les concentrations élevées rappellent les odeurs de pomme pourrie ou d'herbe verte. De plus, l'acétaldéhyde qui a une forte affinité pour l'anhydride sulfureux utilisé comme agent antimicrobien et antioxydant, peut réduire l'efficacité de cet agent. L'acétaldéhyde peut toutefois contribuer à l'intensité et à la stabilité de la couleur du vin mais il provoque, à forte concentration l'apparition de turbidité (Liu et Pilone, 2000). Les souches 4, 73, Ca8 et D2 produisent des concentrations d'acétaldéhyde beaucoup plus élevées que les autres souches et qui sont largement supérieures à la moyenne (55,5 ; **Tableau 14**) et supérieures au troisième quartile (64,9) au-dessous duquel se retrouvent les 2/3 des valeurs des 17 souches soumises à

la sélection. La souche 522D produit une concentration intermédiaire (égale au troisième quartile des 17 souches) et la souche 40 une concentration moyenne.

En examinant l'axe F5 dont le côté positif est associé au degré alcoolique, nous pouvons confirmer l'observation faite auparavant selon le degré Brix et concernant la souche 52 qui a conduit à une fermentation incomplète et par conséquent à un très faible degré alcoolique (9,2) avec des sucres résiduels de 53,25 g/l (**Tableau 14**). Toutes les autres souches conduisent à des fermentations complètes des moûts et à des vins qui peuvent être désignés comme secs, appellation réservée aux vins renfermant moins que 5 à 10 g/l de sucre (Navarre, 1991).

Mais l'éthanol figure parmi les facteurs les plus importants responsables des arrêts de fermentations. Une diminution de la viabilité des levures due à l'éthanol s'accompagne aussi d'une diminution de la croissance et de la capacité fermentaire (Charpentier, 1993). Il a été suggéré que la croissance séquentielle de diverses souches dans les fermentations naturelles pouvait être influencée par l'augmentation des concentrations en éthanol et les souches les plus résistantes pourraient être celles qui dominent les fins de fermentation. On a pour cela proposé que ce comportement soit pris en compte dans la création de cultures mixtes pour l'inoculation des vins (Fleet, 2003). Les souches 37, 40, 52, 54, 69, 71, 73, Ca6 et D2 présentent des viabilités élevées à 12 degrés (côté positif de l'axe F1). Pour des viabilités élevées à de fortes concentrations en éthanol (16 degrés associés au côté positif de l'axe F9) nous pouvons retenir la souche Ca6 qui présente la viabilité la plus élevée de toutes alors que les souches 24, 37, 52, 54, 71 et 73 possèdent des viabilités supérieures à la moyenne.

A faible concentration, les alcools supérieurs (associés au côté positif de l'axe F8) participent à la complexité aromatique des vins, mais à des valeurs dépassant les 400 mg/l, ils peuvent lui conférer un goût herbacé et des odeurs lourdes évoquant les solvants (Rapp et Versini, 1996). Nous avons donc considéré la somme du n-propanol, de l'isobutanol et de l'alcool isoamylique comme facteur de sélection. En considérant que l'alcool amylique que nous n'avons pas quantifié ne constitue généralement pas plus du 5<sup>ème</sup> des alcools supérieurs (Comi *et al.*, 2000), nous pouvons supposer que nos souches ne produisent pas des concentrations d'alcools supérieurs pouvant avoir un impact sensoriel négatif sur les vins.

Parmi les 17 souches ainsi étudiées et suite aux observations précédentes, nous pouvons écarter la souche 52 qui n'a pas achevé les fermentations, les souches 37, 41, 45, 63 et 71 productrices de H<sub>2</sub>S, les souches 73 et D2 productrices à la fois de H<sub>2</sub>S et de concentrations élevées d'acétaldéhyde et si les fortes concentrations d'acétaldéhyde s'avèrent effectivement néfastes les souches 4 et Ca8 aussi, fortement productrices d'acétaldéhyde.

Les sept souches restantes ne présentent pas, selon les critères que nous avons adoptés, un caractère préjudiciable suffisant à les écarter lors de cette étape préliminaire (à savoir les souches 24, 40, 54, 69, 70, Ca6 et 522D). Elles peuvent donc être soumises à des tests plus amples et à des essais pilotes suivis de tests sensoriels. Le choix subséquent de l'utilisation de l'une de ces souches se fera en fonction de l'application voulue.

Nous rappelons que toutes nos souches ont produit des concentrations faibles d'acétate d'éthyle et d'alcools supérieurs ce qui peut être considéré comme un caractère positif. Les sept souches devraient ne pas poser de problèmes particuliers pour les paramètres abordés ici, mais il serait intéressant d'analyser d'autres paramètres comme les esters, les acétates et l'acidité volatile et il est nécessaire d'évaluer la qualité sensorielle des vins obtenus à l'échelle pilote afin d'évaluer leur aptitude fermentaire finale.

### V.3.3 Classifications des 24 souches selon les paramètres moléculaires

Les 24 souches soumises aux tests fermentaires ont été choisies parmi les 82 souches caractérisées par les trois méthodes moléculaires utilisées dans notre étude (MLST, typage interdelta et microsattellites). Pour avoir une vision claire de leur parenté moléculaire, nous reprenons dans ce qui suit la classification des 24 souches uniquement, en prenant en compte l'ensemble des marqueurs des trois méthodes moléculaires.

Nous pouvons voir dans la **Figure 39** une classification ascendante hiérarchique (CAH) des 24 souches étudiées. Nous observons trois grands clusters délimités aux valeurs de bootstrap supérieures à 40. Le premier regroupe toutes les souches CLIB et CBS. Nous l'appellerons dans la suite de l'étude CLUSTER 1. Ses souches sont marquées en rouge dans les figures. Le second inclut un groupe de six souches libanaises (4, 34, 73, 104, Ca8 et D2 ; CLUSTER 2a, en vert) ainsi qu'un autre groupe constitué des trois souches 24, 54 et Ca6 (CLUSTER 2b, en jaune) et le troisième, ou CLUSTER 3 (en bleu), inclut les souches

libanaises 37, 40, 63, 69, et 70 ainsi que les souches identiques 41 et 45. Les CLUSTERS 1, 2a et 2b semblent fortement congruents avec la classification obtenue avec les 82 souches. Quant aux souches du CLUSTER 3, elles semblent plus apparentées à des souches non incluses dans l'étude technologique mais on peut dire globalement que ces souches se ressemblent entre elles plus qu'aux souches des CLUSTERS 1, 2a et 2b et le CLUSTER 3 sera donc considéré comme tel dans la suite de l'étude, même s'il est moins solide que les autres.

Pour avoir une vision plus fractionnée de la distribution des souches selon divers plans formés par les marqueurs moléculaires, nous avons effectué une analyse en composantes principales ou ACP (**Figure 40**). 22 axes dont cinq ont une contribution individuelle à la variance de plus de 5% et expliquant près de 60% de la variance totale (ou inertie), servent à différencier les 24 souches (**Tableau 17a**). Après examen des différentes combinaisons possibles entre les axes, nous avons trouvé que le plan formé par les axes F1 et F2 donne la répartition la plus rapprochée de la CAH et permet de retrouver l'essentiel de ses clusters. Ce plan explique à lui seul plus de 40% de la variance totale.

L'axe F1 de l'ACP sépare les souches CLIB et CBS du reste des souches (c'est le CLUSTER 1) (voir la **Figure 38** et les **Tableaux 17b et 17c**). Selon l'axe F2, nous retrouvons le regroupement des six souches libanaises du CLUSTER 2a (4, 34, 73, 104, Ca8 et D2) ainsi que le rapprochement des souches du CLUSTER 2b entre elles (les souches 24, 54, Ca6). Nous pouvons aussi voir un rapprochement des souches 37, 40, 63 et 70 du CLUSTER 3 alors que les souches 69, 41 et 45 de ce même cluster sont rapprochées des souches 52 et 71. La souche 522D se retrouve dans une position intermédiaire entre ces deux groupes.

Alternativement, nous pouvons voir dans les plans (F1, F4) et (F1, F6) un rapprochement entre les souches 37, 40, 63 et 70 du CLUSTER 3. Selon l'axe F4 nous voyons en plus un rapprochement entre les souches 69, 41 et 45.

#### **V.3.4 Classifications des 24 souches selon les paramètres fermentaires**

D'autre part, et en nous basant sur les paramètres fermentaires analysés chez les 24 souches de notre étude nous avons effectué une classification ascendante hiérarchique (**Figure 41**). Cette classification fait ressortir un certain entrecroisement avec la classification

moléculaire effectuée avec les trois méthodes. En effet, nous retrouvons un cluster que nous appellerons A, regroupant les souches CLIB et CBS du CLUSTER 1 de la classification moléculaire à l'exception des souches CLIB 414 et 415, ainsi que les souches du CLUSTER 2a à l'exception de la souche Ca8, soit au total, huit des onze souches des CLUSTER 1 et 2a avec en plus, la souche 522D.

Alors que le CLUSTER 3 est retrouvé mais avec en plus les souches 24, 54 et 71 qui s'en rapprochent, le CLUSTER 2b ne l'est pas. La classification technologique ne permet pas non plus de retrouver l'identité moléculaire des souches 41 et 45. Ces deux souches se retrouvent cependant dans le même cluster.

Pour essayer de décortiquer la somme d'informations fournies par les paramètres fermentaires et de comprendre leur contribution à la classification des souches, nous avons effectué une analyse ACP selon les paramètres fermentaires.

Cette ACP permet principalement de retrouver le cluster A selon le plan (F1, F2) grâce particulièrement à l'axe F1. Les neuf souches de ce cluster A sont en effet regroupées entre elles et plutôt séparées des autres souches et se retrouvent du côté négatif de l'axe (**Figure 42** et **Tableaux 18c** et **18d**). Ces souches possèdent donc les valeurs les plus élevées des paramètres variant dans le sens négatif de l'axe F1. En examinant les paramètres nous constatons que la production d'acétaldéhyde et de glycérol varient dans ce sens (**Tableau 18b**). Mais la contribution du glycérol à l'axe est très faible alors que celle de l'acétaldéhyde est plus élevée (**Tableau 18a**). Par ailleurs l'isobutanol, l'acétate d'éthyle et l'alcool isoamylique ont une contribution élevée au sens opposé de l'axe F1. La séparation du cluster A du reste des souches pourrait donc être reliée à une production élevée d'acétaldéhyde et dans une moindre mesure de glycérol, ou à une faible production d'isobutanol, d'acétate d'éthyle ou d'alcool isoamylique.

Nous pouvons aussi voir des rapprochements des souches du CLUSTER 3 (selon les axes F1 et F3 par exemple) mais elles sont aussi rapprochées de diverses souches d'autres clusters moléculaires.

### V.3.5 Correspondance entre la classification moléculaire et la production d'acétaldéhyde

Vu la participation d'un grand nombre de paramètres à la classification précédente et l'incapacité de relier la distribution des souches à des paramètres fermentaires particuliers, nous avons eu recours à une ACP avec rotation varimax (**Figure 43** et **Tableaux 19**). Cette représentation qui permet de mieux cerner l'effet individuel de chaque paramètre fermentaire devrait confirmer ou infirmer la participation potentielle des paramètres cités plus haut au regroupement du cluster A et elle devrait permettre de vérifier si le regroupement des autres clusters pourrait être plus évident.

L'ACP varimax confirme la grande participation de l'acétaldéhyde à la séparation des souches regroupées dans le cluster A et elle permet même de mieux se rapprocher de la classification moléculaire initiale. En effet, selon l'axe F5, le cluster A de l'ACP ordinaire qui était le plus rapproché de la classification moléculaire, est éclaté en deux clusters plus petits. Le premier englobe les souches CLIB du CLUSTER 1 et le second, les souches du CLUSTER 2a (**Figure 43** et **Tableaux 19c** et **19d**). De plus les souches 522D et 24 qui étaient rapprochées selon l'ACP ordinaire des souches des CLUSTERS 1 et 2a ne le sont plus ici. Le rapprochement moléculaire/fermentaire est donc évident en ACP varimax et la seule exception enregistrée avec la classification moléculaire est une substitution des souches 73 et CBS 1907 entre les deux clusters. L'axe F5 est principalement relié à l'acétaldéhyde qui en explique 90 % (**Tableau 19a**).

L'acétate d'éthyle expliquant 85% de l'axe F1 permet de voir un certain regroupement des souches des CLUSTERS 1 et 2a mais ces souches ne sont pas bien distinguées des souches des autres clusters (comme les souches 522D, 24, 52 ou les souches du CLUSTER 3) alors que la souche Ca8 du CLUSTER 2a est assez éloignée des souches de ce même cluster.

Le glycérol contribue quant à lui à ~88 % de l'axe F2 (**Tableau 19a**). Nous pouvons observer que huit des onze souches des CLUSTERS 1 et 2a se trouvent du côté positif de l'axe F3. Mais contrairement à la classification moléculaire, ces souches sont rapprochées des souches 45, 70 et Ca6. De plus, les souches 73, Ca8 et D2 (du CLUSTER 2a) se retrouvent du côté négatif de l'axe avec un grand nombre de souches d'autres clusters.

L'isobutanol (expliquant 83% de l'axe F6) et l'alcool isoamylique (expliquant 85% de l'axe F7) ne semblent pas aboutir à une distribution évidente des souches des CLUSTERS 1 et 2a.

C'est donc essentiellement la production d'acétaldéhyde qui permet de trouver l'entrecroisement moléculaire/fermentaire le plus évident. La production d'acétaldéhyde permet de différencier clairement les 11 souches des CLUSTERS 1 et 2a des autres en les distribuant en deux groupes, l'un constitué des souches CLIB et de la souche 73, souches qui ont une production intermédiaire d'acétaldéhyde (entre la moyenne et le troisième quartile déterminés avec l'ensemble des 24 souches ; **Tableau 14**) et l'autre groupe constitué des souches libanaises 4, 34, 104, Ca8, D2 et CBS 1907, souches qui ont une production élevée d'acétaldéhyde, supérieure au troisième quartile. Toutes les autres souches ont une production inférieure à la moyenne.

Par ailleurs, nous ne retrouvons pas de regroupement et/ou de séparation claires des CLUSTER 2b et 3 dans aucun plan bien que nous puissions voir selon l'axe F1 relié à l'acétate d'éthyle un rapprochement des souches des CLUSTER 3 mais qui sont comme indiqué plus haut rapprochées aussi de souches d'autres clusters.

### **V.3.6 Contributions des marqueurs moléculaires à la classification**

De même qu'il est apparu que la contribution de l'acétaldéhyde est la plus grande à la classification fermentaire et à la distinction des CLUSTERS 1 et 2a, nous avons sondé la contribution des marqueurs moléculaires à la classification et particulièrement à la distinction de ces deux clusters.

Pour trier les marqueurs intervenant dans l'explication des axes selon l'ACP moléculaire et ne garder que ceux dont la contribution est la plus grande, nous avons procédé à une ACP avec rotation varimax basée sur les marqueurs moléculaires (**Figure 44**). Nous nous attarderons sur le plan (F1, F2), le plus informatif de tous.

Nous remarquons que les souches CLIB et CBS du CLUSTER 1 sont différenciées selon l'axe F1 et elles se trouvent du côté de sa partie négative. Les marqueurs qui sont liés à cette partie expliquent 52,35 % de la dispersion totale de l'axe. Nous y retrouvons 11 bandes

interdelta pour un total de 27 bandes trouvées chez l'ensemble des 24 souches. Ces bandes ont une contribution moyenne individuelle à la dispersion totale de l'axe de 0,29 %, soit 0,55 % de la dispersion relative à la partie négative. Sont aussi impliqués, 33 marqueurs microsatellites pour un total de 105 marqueurs. Leur contribution moyenne individuelle à la dispersion de l'axe est de 0,12 %, soit 0,23 % de la dispersion relative à la partie négative. Finalement 48 marqueurs MLST interviennent dans l'explication de la distribution des souches selon l'axe F1, pour un total de 95 marqueurs. Ces marqueurs MLST ont une contribution moyenne individuelle à la dispersion de l'axe de 0,94 %, soit 1,79 % de la dispersion relative à la partie négative. Ils expliquent à eux seuls 86,3 % de la dispersion de la partie négative.

Quant aux six souches libanaises du CLUSTER 2a, nous remarquons qu'elles sont regroupées du côté positif de l'axe F2. La dispersion de cette partie constitue 72,46% de la dispersion totale de l'axe et elle est reliée à 11 marqueurs interdelta, 34 marqueurs microsatellites et 58 marqueurs MLST. Ces marqueurs expliquent individuellement et respectivement 1,15 %, 0,86 % et 0,53 % de la dispersion totale reliée à l'axe (soit 1,58 %, 1,19 % et 0,73 % de sa partie positive). Les marqueurs microsatellites expliquent donc 40% de la dispersion totale de cette partie positive alors que les marqueurs MLST en expliquent 42 %.

Dans la classification obtenue par le jumelage des trois méthodes moléculaires, il semble donc que la contribution du MLST soit la plus informative pour la différenciation des souches CLIB et CBS. Par contre pour les six souches libanaises du CLUSTER 2a ce sont à la fois des marqueurs microsatellites et MLST qui contribuent à leur différenciation.

#### **V.4 Discussion**

Nous avons étudié, pour 24 souches de *S. cerevisiae* incluant des souches libanaises et d'autres non-libanaises, la production des alcools supérieurs les plus abondants (alcool isoamylique, isobutanol et n-propanol), d'acétate d'éthyle et d'acétaldéhyde, respectivement ester et aldéhyde les plus abondants. Toutes ces molécules peuvent avoir des effets organoleptiques indésirables. Nous avons aussi déterminé le glycérol et le degré alcoolique atteint. Pour 17 de ces souches, nous avons de plus testé la capacité de production de H<sub>2</sub>S, d'épuisement des sucres ainsi que leurs résistances au stress éthylique à divers degrés

alcooliques pour examiner leurs viabilités et leurs capacités de mener les fermentations à terme ou pour tester leur possible utilisation pour des applications particulières comme la production de vins doux avec des degrés alcooliques élevés sans recours au mutage, pratique qui est encore commune au Liban.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les souches étudiées de *S. cerevisiae* diffèrent par leurs capacités fermentaires. L'observation de telles différences dans les caractéristiques technologiques et organoleptiques va dans le sens de maintes études précédentes qui ont exploré les caractéristiques de diverses souches commerciales ou indigènes de *S. cerevisiae* (Aragon *et al.*, 1998 ; Taillandier *et al.*, 1999 ; Comi *et al.*, 2000 ; Majdak *et al.*, 2002 ; Patel et Shibamoto, 2003; Romano *et al.*, 2003).

La production de molécules aromatiques est assez différente selon les études et les souches examinées. Dans notre cas, les valeurs produites des différentes molécules se sont situées dans les intervalles rapportés dans la littérature (Comi *et al.*, 2000 ; Majdak *et al.*, 2002 ; Romano *et al.*, 2003 ; Selli *et al.*, 2004) et les variables aromatiques les plus discriminantes entre les souches ont été l'acétaldéhyde, l'acétate d'éthyle et les alcools supérieurs. Dans d'autres études les variables les plus discriminantes ont tantôt été représentées par l'isobutanol et l'alcool isoamylique (Romano *et al.*, 2003), tantôt par le n-propanol et l'alcool isoamylique (Comi *et al.*, 2000), tantôt par les alcools supérieurs, l'acétaldéhyde ou les esters d'acides (Lurton *et al.*, 1995) et tantôt par l'isobutanol, l'alcool isoamylique l'acétaldéhyde ou l'acide acétique (Romano *et al.*, 2002). Mais des souches présentant des caractéristiques diverses peuvent aussi se ressembler pour certains paramètres. Par exemple les productions d'acétaldéhyde, d'éthyle acétate et de n-propanol se ressemblaient entre les souches étudiées par Romano *et al.* (2003). De même pour les caractéristiques technologiques (comme la vitesse de fermentation, l'acidité volatile ou la production de composés soufrés) des souches de Lurton *et al.* (1995).

Les tests que nous avons effectués avec 17 souches nous ont permis d'éliminer certaines d'entre elles selon leur capacité de production de H<sub>2</sub>S, d'acétaldéhyde et de complétion des fermentations car elles peuvent avoir des effets indésirables sur le déroulement des fermentations ou sur la qualité gustative des vins produits sur nos milieux. Ces résultats devraient être validés dans des conditions standardisées sur milieux synthétiques et/ou des moûts de raisins naturels.

Les tests avec les souches non écartées doivent aussi être entrepris dans de telles conditions, en les complétant par l'étude de paramètres supplémentaires dont par exemple l'acide acétique et la production d'acétates et d'esters qui n'ont pas pu être inclus dans le cadre de ce travail. Ces tests pourraient mieux éclaircir la potentialité d'utilisation industrielle des souches libanaises. Après avoir complété les analyses au laboratoire on pourrait passer à des tests pilotes avec les souches ayant passé la sélection bien que les résultats des essais pilotes peuvent s'avérer similaires aux résultats obtenus avec les essais au laboratoire (Lurton *et al.*, 1995, Querol *et al.*, 1992c). Il serait d'autre part pertinent de faire des tests sur diverses variétés de raisin, des variétés locales notamment, pour étudier le potentiel de contribution des souches libanaises à une typicité des vins produits au Liban ou pour vérifier qu'elles présenteraient des caractéristiques intéressantes et adaptées à d'autres types de vinification, tout en comparant ces souches avec un plus grand nombre de souches commerciales.

L'analyse chimique constitue une étape préliminaire à une sélection de souches, et la composition chimique du vin est certainement le fondement de la perception sensorielle. Cette dernière est toutefois la résultante d'interactions chimio-sensorielles. Elle varie avec l'individu, le contexte de la dégustation et elle dépend de plusieurs facteurs qui sont difficilement prévisibles. Une simple analyse de la composition du vin et des composés aromatiques en particulier ne donne donc pas une assurance de qualité pour le vin. Des essais de dégustation des vins produits avec les souches éventuellement sélectionnées devraient par conséquent être entrepris après les essais au laboratoire.

Comme nous l'avons vu, la sélection de souches reste une étape assez complexe et elle demande du temps pour être menée à bien et achevée. Dans cette perspective, l'offre de moyens d'analyses moléculaires diminuant le recours à des études phénotypiques passant par des tests fermentaires longs et compliqués pourrait énormément faciliter la sélection de souches vinicoles ayant des caractéristiques œnologiques particulières. La recherche et l'analyse de QTL qui aboutiraient à identifier des gènes ou des loci impliqués dans des propriétés fermentaires d'intérêt, pourraient faciliter, dans des conditions définies, la sélection assistée par marqueurs, principalement pour des traits simples. Pour des traits quantitatifs complexes polygéniques, la recherche de QTL est plus compliquée et le repérage d'un QTL unique ne suffit pas toujours à définir un marqueur utilisable, à moins que l'implication du QTL en question au trait quantitatif ne soit importante.

Dans la présente étude nous avons eu recours à une analyse comparative de phylogénies de 24 souches de *S. cerevisiae*, l'une construite sur un ensemble de caractères phénotypiques et l'autre sur un ensemble de marqueurs moléculaires. La comparaison entre les deux types de classifications pourrait mettre à jour une éventuelle congruence entre les deux classifications, malgré ses limitations que nous verrons ci-dessous. Pour des souches apparentées ou identiques au niveau moléculaire, on s'attendrait à ce qu'une parenté moléculaire se traduise par une identité ou une similarité fermentaire qui serait d'autant plus forte que la parenté moléculaire est grande. Plus globalement, une congruence entre les deux types de classifications découlerait d'une liaison entre nos marqueurs et des QTL impliqués dans les traits fermentaires étudiés. Cette congruence pour un ou plusieurs traits dépendra de la distance "physique" entre les marqueurs et les QTL concernés dans l'explication du trait phénotypique, distance qui déterminera la force de la liaison. De plus, ces traits phénotypiques étant sous contrôle polygénique, plus la contribution du QTL est grande, plus la chance de trouver une congruence entre les deux classifications est élevée. Même si le nombre réduit de marqueurs moléculaires utilisés dans notre étude diminue en théorie la probabilité de rencontrer des marqueurs liés à des QTL impliqués dans des traits fermentaires, de tels marqueurs pourraient néanmoins être rencontrés, mais dans ce cas leur faible densité ne permettra pas de définir des régions liées à des QTL et de repérer ou d'identifier ces QTL. Notre approche ne s'inscrit donc pas dans la voie de recherche de QTL et elle ne devrait pas permettre en principe d'en repérer. Toutefois, si une congruence réelle est rencontrée, qu'elle n'est pas biaisée par le faible nombre de souches soumises aux deux types d'analyses, et qu'elle est liée à un QTL majeur (les preuves seraient à établir avec des travaux complémentaires), elle pourrait éventuellement aider à prédire le comportement, pour le ou les traits fermentaires concernés, de souches apparentées au niveau moléculaire.

Nous démarche a consisté à construire, à partir des résultats fermentaires que nous avons obtenus, une phylogénie des souches étudiées et nous l'avons comparée avec la phylogénie construite selon l'ensemble des marqueurs moléculaires des trois méthodes de typage. Les souches avaient été choisies sur la base de la classification moléculaire de façon à inclure des souches identiques, apparentées ou éloignées. Les résultats ont mis en évidence une certaine congruence entre les deux types de classifications puisque certaines souches proches au niveau moléculaire ont aussi eu des capacités fermentaires proches. Mais les deux classifications ne se rejoignaient pas entièrement.

Nous avons effectivement remarqué que certaines souches sont apparentées à la fois aux niveaux moléculaire et fermentaire et que globalement les clusters moléculaires sont retrouvés avec la classification fermentaire. Mais dans un même temps, des souches appartenant aux mêmes clusters moléculaires sont divisées en sous-groupes et se retrouvent apparentées à des souches d'autres clusters. De même, l'identité moléculaire des souches 41 et 45 n'est pas retrouvée, mais ces deux souches sont quand même présentes dans un même cluster et elles diffèrent uniquement (d'une façon significative,  $p < 0,01$ ) par la production de glycérol, et par leurs résistances à l'éthanol (non incluse dans la classification des 24 souches).

Il semble par ailleurs que l'absence d'effet du milieu vinicole d'origine observée avec la caractérisation moléculaire se retrouve aussi dans les propriétés fermentaires des souches puisque les souches isolées initialement de vins secs (divers procédés) ou doux n'ont pas présenté des caractéristiques fermentaires spécifiques en fonction de leur origine.

La congruence globale observée entre les classifications suggère que les marqueurs moléculaires utilisés donnent une image qui est proche de la vraie parenté des souches. Mais comme cette congruence est néanmoins limitée, l'image de parenté semble par conséquent incomplète ce qui montre que les méthodes de typage utilisées sont elles-mêmes limitées et qu'elles passent outre des différences moléculaires entre les souches. La limitation de la congruence suggère aussi la complexité des traits phénotypiques étudiés ce qui fait que le suivi d'un petit nombre de marqueurs ne suffit pas à élucider la complexité de ces traits.

En disséquant la congruence observée entre les profils moléculaire et fermentaire nous remarquons qu'elle est principalement due à la congruence entre la production significativement élevée d'acétaldéhyde et les souches appartenant aux CLUSTERS 1 et 2a. La différenciation des souches du CLUSTER 1 est liée à des marqueurs MLST alors que celle des souches du CLUSTER 2a est liée à des marqueurs MLST et microsatellites. Vu cette plus grande participation des marqueurs MLST et microsatellites à la congruence avec l'acétaldéhyde, la classification selon ces deux méthodes uniquement permet de retrouver les mêmes résultats de parentés des souches des CLUSTERS 1 et 2a obtenus avec le jumelage des trois méthodes moléculaires, comme nous pouvons le voir dans la **figure 45**. Notons que malgré la grande participation de l'acétaldéhyde à la congruence, celle-ci est aussi retrouvée en éliminant ce paramètre de la classification (résultats non montrés) ce qui montre que

l'acétaldéhyde n'en est pas le seul responsable et qu'une congruence globale est effectivement observée.

La contribution de l'acétaldéhyde à la congruence trouvée entre les deux types de classifications, si la congruence n'est pas fortuite, pourrait faire penser à un possible rapprochement entre l'un de nos marqueurs moléculaires et un QTL lié à la production d'acétaldéhyde, la probabilité que l'un de nos marqueurs (dont la plupart se trouvent dans des ORFs identifiées; **Tableau 20**) soit lui-même un QTL en relation avec l'acétaldéhyde étant très faible.

Nous avons recherché des corrélations à l'aide du coefficient de corrélation biserial de points (qui mesure la relation linéaire entre deux variables indépendantes, l'une étant numérique et l'autre binaire) et en adoptant un seuil élevé de significativité des corrélations (seuil  $\alpha=0.001$  du test bilatéral) pour ne retenir que les corrélations qui seraient les plus fortes. Sans entrer dans les détails au cas par cas des analyses dont certaines sont imparfaites ou biaisées par le faible nombre de souches (**Annexe 4** et se référer au **tableau 13** et aux **annexes 2** et **3**; Résultats non discutés), nous présentons ci-dessous le cas qui a présenté la plus forte corrélation et qui pourrait faire l'objet d'une étude plus approfondie.

Nous avons observé qu'une substitution synonyme (par rapport à la séquence de S288C) dans le locus YBL081W à la position 252 est présente chez la totalité des 11 souches des CLUSTERS 1 et 2a. Tous les allèles contenant cette mutation appartiennent à des souches présentant de fortes productions d'acétaldéhyde. YBL081W est une ORF hypothétique de fonction inconnue dont la mutation silencieuse n'est *a priori* pas directement responsable du phénotype acétaldéhyde. Les gènes ou les protéines impliquées dans des interactions génétiques ou physiques (Vps4p, Nrp1p, Rps28ap, rad27 et rad53 ; SGD, octobre 2006) avec ce locus ne suggèrent de toute manière pas un rôle fermentaire pour YBL081W qui pourrait tout au plus être lié à un "QTL acétaldéhyde". La substitution impliquée pourrait être intervenue simultanément avec une autre mutation dans le QTL en question. Pour vérifier cette piste éventuelle, des analyses de ségrégation du trait et d'association du marqueur pourraient être envisagées et un séquençage plus ample de YBL081W et des régions flanquantes pourrait être entrepris.

Nous avons par ailleurs examiné les gènes identifiés comme impliqués, durant la fermentation du glucose, dans le métabolisme de l'acétaldéhyde (**Figure 46**) et qui pourraient contribuer à la corrélation entre la concentration d'acétaldéhyde et des marqueurs moléculaires intervenant dans la classification des souches des CLUSTERS 1 et 2a. Dans les environs de YBL081w nous n'avons localisé aucun de ces gènes. En s'intéressant aux facteurs de transcription impliqués dans les gènes participant au métabolisme de l'acétaldéhyde nous n'en trouvons pas non plus à proximité de YBL081w.

En outre, en examinant la localisation de tous ces loci sur les chromosomes de S288C, nous avons trouvé que l'un d'entre eux, ALD4, qui code une aldéhyde déshydrogénase mitochondriale pouvant intervenir dans la conversion de l'acétaldéhyde en acétate durant l'anaérobiose. ALD4 se trouve sur le chromosome XV (coordonnées 1039838 – 1041397) à proximité d'un des loci que nous avons analysé dans le gène ATF1 (coordonnées 1046224 – 1047801; **Tableau 20**). Normalement, ALD6 et ALD5 sont les principaux gènes qui convertissent l'acétaldéhyde en acétate dans le cytoplasme et les mitochondries, respectivement. En l'absence du gène majeur cytosolique ALD6, ALD4 est surexprimé pour pallier cette absence. Son action pourrait dépendre du background génétique de la souche ainsi que du milieu de fermentation (Saint-Prix *et al.*, 2004).

L'acétaldéhyde est un métabolite intermédiaire de plusieurs composés comme l'alcool ou l'acétate. Pour un tel trait phénotypique complexe, l'explication de la congruence entre phénotype et génotype ne se réduit probablement pas à l'effet d'un seul gène comme ALD4. Mais pour essayer de comprendre une éventuelle forme d'implication de ce gène, un séquençage d'ALD4 et des analyses de son expression pourraient être entrepris pour notre lot de souches pour rechercher un éventuel polymorphisme allélique ou des différences d'expression entre elles. Mais il faut savoir qu'une telle approche pourrait s'avérer inefficace, comme observé avec Sinha *et al.* (2002) et des analyses du type RHA (Reciprocal Hemizyosity Analysis) pourraient être plus utiles, surtout qu'elles prennent en compte le background génétique de chaque souche.

Si la corrélation entre la forte production d'acétaldéhyde et les profils moléculaires des CLUSTERS 1 et 2a s'avérait réelle, bien qu'inexpliquée à ce stade, nous pourrions songer à prédire la production d'acétaldéhyde pour des souches de notre banque apparentées aux souches des clusters moléculaires susmentionnées et identifiées uniquement au niveau

moléculaire comme par exemple les souches Ca 23 et CLIB 409. Si les effets organoleptiques d'une telle production s'avéraient effectivement néfastes dans nos conditions ou dans d'autres conditions fermentaires (un seuil organoleptique serait à déterminer après des tests de dégustations), la caractérisation moléculaire pourrait aider à éliminer des souches apparentées aux CLUSTERS 1 et 2a d'analyses fermentaires subséquentes. Ou alors, si cette propriété est recherchée, comme par exemple dans les vins de Xérès, de telles souches pourraient être sélectionnées pour de plus amples études. Mais dans le cas d'applications particulières comme la production de vins de Xérès, l'adéquation de l'utilisation de ces souches est à vérifier.

# **Conclusion**

Nous avons exploré dans un premier temps de ce projet la diversité moléculaire de la flore libanaise indigène de *Saccharomyces cerevisiae* à plusieurs échelles d'étude et en examinant les effets de la géographie et du milieu sur la flore fermentaire. Nous avons aussi évalué les outils moléculaires utilisés pour l'exploration de cette diversité, que ce soit des méthodes déjà mises au point auparavant ou une nouvelle méthode, le MLST, appliquée pour la première fois à *S. cerevisiae*. La diversité phénotypique accompagnant la diversité moléculaire a été examinée elle aussi en vue d'une potentielle sélection de souches et pour envisager son éventuelle correspondance avec la diversité moléculaire.

Une diversité de profils a été enregistrée dans les cuves en cours de fermentations naturelles et une dominance d'un nombre restreint de souches l'a accompagnée. Mais en dépit de cette diversité il semble que des souches ou des lignées de souches s'implantent et évoluent dans "l'écosystème" que constituent les caves (ou/et s'implantent dans les vignobles pour être re-introduites dans les caves). Elles circulent d'une cuve à une autre, elles semblent plus apparentées entre elles qu'avec des souches d'autres caves, et certaines restent dans les caves plus d'une année. Mais il y a une alternance des souches dominantes d'une année à l'autre ce qui suggère que ces souches ne sont pas nécessairement plus robustes ou plus adéquates que les autres pour s'implanter et mener les fermentations plusieurs années, mais que leur apparition ou leur dominance dépendent des conditions qui prévalent chaque saison.

Un rapprochement entre des souches de villages voisins a aussi été observé suggérant que l'effet de parenté observé dans les caves est aussi présent dans des écosystèmes plus larges. Mais malgré l'observation de souches apparentées en provenance de localités proches nous n'avons pas observé de souches qu'on peut qualifier de "souches de terroir" ou souches régionales de chais. Ceci pourrait être dû au nombre relativement faible d'isolats considérés par région, ou aux méthodes qui ont été utilisées dans d'autres études pour caractériser les souches et qui peuvent être moins discriminantes que les nôtres, ou alors à la nature de la flore libanaise. Bien que notre dispositif expérimental ne nous ait pas permis d'aborder la question du lien entre la distance géographique et la divergence génétique, il serait intéressant d'examiner si l'effet de parenté des souches observé pourrait être lié à la proximité géographique. En supposant que les souches évoluent à la fois par méioses et croisements et par clonalité, on pourrait supposer que plus la souche est proche de son foyer d'origine, moindre est l'éventail génétique qui lui est offert pour acquisition. Plus elle se disperse géographiquement, plus les chances d'acquisition et de mélange avec un nouveau matériel

génétique en provenance d'autres foyers sont grandes ainsi que les chances d'évolution dans de nouvelles conditions. Par conséquent, moindre est sa parenté avec son ancêtre. D'ailleurs une très grande diversité génétique a été observée sur l'ensemble du territoire libanais.

Un même effet de "proximité" géographique relative pourrait s'appliquer à la flore libanaise en général, malgré sa diversité. Si, en comparant des sous-groupes libanais entre eux, le degré de diversité/parenté mis en évidence dépend de la méthode utilisée (comme nous le verrons plus loin), en la comparant à plus large échelle avec diverses flores œnologiques et même avec l'utilisation d'une méthode assez discriminante, on peut observer une certaine spécificité, bien que partielle de la flore libanaise. Cette plus grande parenté par rapport à d'autres flores pourrait être liée à un éventuel confinement (en comparaison à d'autres flores plus éloignées), à une relative proximité géographique (le territoire libanais étant finalement assez petit) et à l'origine ancestrale de cette flore (Legras *et al.* 2006). D'ailleurs l'analyse MLST qui donne une idée assez réelle de l'évolution génomique a suggéré une grande parenté de la flore libanaise (mais ici, l'effet de la méthode rentre aussi en jeu comme nous le verrons plus loin).

Pourtant la probabilité d'introduction de souches œnologiques commerciales françaises semble possible dans quelques sites où le levurage a été effectué à un moment donné. Mais seulement dans l'un de ces sites l'introduction semble confirmée et pour les autres une analyse d'un plus grand nombre de marqueurs est nécessaire pour avoir un résultat concluant. Mais si une éventuelle contamination a effectivement eu lieu, elle semble limitée aux sites où des levurages ont été fait. De plus, même si une introduction d'un nombre limité de LSA est probable, des mélanges extensifs récents entre flores œnologiques de différentes origines géographiques est peu probable. Il serait intéressant dans cette perspective d'établir des inventaires des LSA utilisées sur les sites ayant eu recours à un moment ou à un autre au levurage pour mieux cerner la question de la spécificité de la flore libanaise.

Si certaines questions concernant la biodiversité des flores vinicoles ont obtenu des réponses par maintes études et par la nôtre (pour la flore libanaise particulièrement) comme la diversité des souches dans les fermentations naturelles ou la dominance et la stabilité de quelques souches, d'autres questions restent posées. Il est par exemple intéressant d'examiner où s'effectue l'implantation des flores vinicoles et qu'elle est la source d'inoculation des fermentations en suivant à la fois et en parallèle les flores des vignobles et des caves, en

dehors et au cours des saisons de vendanges et de fermentations. Des études plus amples de régions plus ou moins restreintes géographiquement et avec diverses méthodes moléculaires devraient aider à trouver des explications aux divergences trouvées dans les études concernant la question des souches de terroir. De telles études devraient aussi permettre de suivre la dissémination des flores selon la géographie et au cours du temps, et éventuellement d'essayer de comprendre l'évolution qui crée leur grande diversité. Concernant la spécificité de la flore libanaise, elle devrait être confirmée par d'autres méthodes, en élargissant la taille de la flore comparée et en optant pour des approches de génétique de populations.

Si la diversification pourrait être liée au confinement ou à la dispersion géographique plus ou moins grands et au temps d'évolution des génomes, elle pourrait aussi être liée au milieu dans lequel évoluent les souches. Plus ce milieu est différent plus les effets sur les souches sont visibles. Aucune différenciation spécifique selon le type de vin n'a été observée que ce soit à l'intérieur du Liban ou entre les flores viticoles suggérant que les moûts de raisin, sur leur diversité, exercent globalement des pressions sélectives similaires. Par contre, les milieux non-viticoles exercent des pressions assez différentes et l'on peut voir une différenciation entre les flores viticoles et les flores non-viticoles.

La diversification est le résultat de l'évolution qui touche les génomes. Les mécanismes d'évolution des éléments delta et des microsatellites (par transpositions, glissement de polymérase ou translocations) sont plus rapides que les mutations ponctuelles qui ont lieu dans les séquences. Ceci a une incidence sur l'efficacité des méthodes basées sur le suivi de ces marqueurs et utilisées pour les constructions phylogéniques ou le typage.

Les deux méthodes basées sur les amplifications de séquences entre deux éléments delta et de loci microsatellites sont très utiles pour le typage à cause de la grande variabilité de leurs marqueurs et par conséquent de leur grande capacité de discrimination, contrairement au schéma MLST que nous avons développé mais qui semble plus utile pour l'inférence des relations phylogéniques (surtout, avec notre schéma, pour les souches peu apparentées). L'association des microsatellites et du MLST constitue le meilleur moyen, parmi l'éventail qui nous est offert par cette étude, pour assurer à la fois un bon niveau de discrimination et une bonne inférence phylogénique (surtout pour les souches modérément et très apparentées).

Nous proposons d'améliorer notre schéma MLST en augmentant tout d'abord le nombre de marqueurs MLST et d'inclure un nombre restreint de régions non-codantes qui pourraient être plus variables ou de loci sous pression sélective positive. Ceci pourrait être combiné à un séquençage de régions plus grandes qui devrait être rendu possible par l'amélioration de la fiabilité de cette technique et de la diminution de son coût. Eventuellement, si la discrimination de la méthode est améliorée pour se rapprocher de celle des microsatellites pour le typage, le MLST doté d'un grand nombre d'avantages, pourrait être utilisé seul pour le typage (particulièrement pour des souches de diverses origines) et l'inférence phylogénique.

Mais les méthodes moléculaires qui étudient un nombre restreint de marqueurs sont probablement limitées dans l'inférence des parentés réelles entre souches même si elles en donnent globalement une vision proche. Le meilleur moyen disponible actuellement pour avoir l'image la plus proche de la vraie identité d'une souche serait de recourir au typage par des puces génomiques. La congruence de telles méthodes moléculaires est de même limitée avec les expressions phénotypiques qui sont elles aussi diverses comme les profils moléculaires. Les phénotypes sont globalement complexes et les traits sont affectés par les interactions avec l'environnement, par le background génétique de la souche, par des effets d'épistasie etc... donc deux souches proches au niveau moléculaire n'auront pas toujours un profil phénotypique proche. La mise en évidence d'une congruence entre les deux types de diversités dépendra des méthodes d'évaluation des diversités adoptées.

Dans notre cas, et malgré les limitations des méthodes utilisées, un certain degré de congruence a été observé entre les diversités moléculaire et phénotypique de nos souches. Cette congruence a été particulièrement reliée à la production élevée d'acétaldéhyde de certains profils moléculaires. Pour essayer de comprendre la cause de cette congruence probablement liée à plusieurs facteurs, on pourrait examiner l'une des pistes possibles qui pourrait impliquer une liaison entre un de nos marqueurs et le gène ALD4 responsable de la conversion d'acétaldéhyde en acétate en l'absence du gène ALD6. On pourrait aussi vérifier si ces souches suivent les mêmes schémas de production d'acétaldéhyde dans d'autres conditions fermentaires.

Pour comprendre l'éventuelle implication de QTL ou de QTG non identifiés dans la production d'acétaldéhyde ou d'autres traits phénotypiques, une approche indépendante et plus complète ayant recours dans un premier temps à des puces génomiques pourrait être

utilisée pour effectuer des scans génomiques des souches ayant présenté des productions extrêmes des molécules étudiées dans nos conditions. Après localisation de régions, de QTL et/ou de QTG candidats, des analyses fonctionnelles devraient compléter l'étude. En outre, l'étude des différences d'expression entre ces souches pourrait être mise en œuvre par le recours là aussi à la technologie des puces.

Nous avons par ailleurs tenu compte des résultats des analyses faites dans nos conditions fermentaires pour éliminer certaines souches et en retenir d'autres pour qu'elles soient plus amplement testées en vue d'éventuelles sélections. Des essais fermentaires avec des variétés locales ou avec des variétés importées mais cultivées dans les conditions climatiques libanaises pourraient être entrepris, ainsi que des essais de dégustations sur les vins ainsi produits pour étudier l'éventuelle contribution des souches locales à une typicité des vins locaux. La banque de souches qui a été constituée est une source supplémentaire de levains dont l'utilisation serait à étudier. En parallèle, un plus grand nombre de souches commerciales seraient à tester pour examiner leur ressemblance avec les souches libanaises. L'éventuelle particularité fermentaire de la flore libanaise serait ainsi examinée. Si elle s'avérait existante (nos résultats n'étant pas concluants à ce propos) elle correspondrait à l'éventuelle particularité moléculaire et contribuerait à la valider.

# **Bibliographie**

Abiola O, Angel JM, Avner P, Bachmanov AA, Belknap JK, Bennett B, Blankenhorn EP, Blizard DA, Bolivar V, Brockmann GA, Buck KJ, Bureau JF, Casley WL, Chesler EJ, Cheverud JM, Churchill GA, Cook M, Crabbe JC, Crusio WE, Darvasi A, de Haan G, Dermant P, Doerge RW, Elliot RW, Farber CR, Flaherty L, Flint J, Gershenfeld H, Gibson JP, Gu J, Gu W, Himmelbauer H, Hitzemann R, Hsu HC, Hunter K, Iraqi FF, Jansen RC, Johnson TE, Jones BC, Kempermann G, Lammert F, Lu L, Manly KF, Matthews DB, Medrano JF, Mehrabian M, Mittlemann G, Mock BA, Mogil JS, Montagutelli X, Morahan G, Mountz JD, Nagase H, Nowakowski RS, O'Hara BF, Osadchuk AV, Paigen B, Palmer AA, Peirce JL, Pomp D, Rosemann M, Rosen GD, Schalkwyk LC, Seltzer Z, Settle S, Shimomura K, Shou S, Sikela JM, Siracusa LD, Spearow JL, Teuscher C, Threadgill DW, Toth LA, Toyee AA, Vadasz C, Van Zant G, Wakeland E, Williams RW, Zhang HG, Zou F; Complex Trait Consortium. 2003. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet.* 4, 11, 911-6.

Adams J., Puskas-Rozsa S., Simlar J. et Wilke CM. 1992. Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22, 1, 13-9

Aa E., Townsend J., Adams R., Nielsen K et Taylor J. 2006. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6, 702–715

Aigle, M., Erbs, D. et Moll, M. 1984. Some molecular structure in the genome of lager brewing yeast. *Am Soc Brew Chem* 42, 1–7.

el Ajam H., 2001. Les vins libanais figurent parmi les meilleures productions (traduction de l'arabe). *Quotidien Annahar*, Jeudi 15 Novembre.

Alexandre H., Ansanay-Galeote V., Dequin S. et Blondin B. 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 498, 98-103.

Aragon P., Atienza J. et Climent M.D. 1998. Influence of clarification, yeast type, and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohols of Malvasia and Muscatel wines. *Am J Enol Vitic* 49, 2, 211-219.

Aranda, A., Querol, A. et del Olmo, M., 2002. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch Microbiol* 177, 304–312.

Ayoub MJ, Legras JL, Saliba R et Gaillardin C., 2006. Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J. Appl. Microbiol.* 100, 699-711

Ayres Sia, E.A., Kokoska R., Greenwell P. et Petes, T.D. 1997a. Microsatellite Instability in Yeast: Dependence on Repeat Unit Size and DNA Mismatch Repair Genes. *Mol Cell Biol*, 17, 5, 2851–2858.

Ayres Sia E.A., Jinks-Robertson, S., et Petes, T.D. 1997b. Genetic control of microsatellite instability. *Mutat Res* 383: 61–70.

Ayres Sia E.A., Dominska M, Stefanovc L. et Petes, T.D. 2001. Isolation and Characterization of Point Mutations in Mismatch Repair Genes That Destabilize Microsatellites in Yeast. *Mol Cell Biol*, 21, 23, 8157–8167

Aerny J., 1996. Composés azotés des moûts et des vins. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 28, 3, 161-165.

Backhus, L.E., DeRisi, J., Brown, P.O. et Bisson, L.F., 2001. Functional genomic analysis of commercial wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. *FEMS Yeast Res.* 1413, 1 – 15.

Bakalinsky, A. T. et R. Snow. 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6:367–382.

Baleiras-Couto M., Eijsma B., Hofstra H., Huis In't Veld J. et Van der Vossen J. 1996. Evaluation of Molecular Typing Techniques To Assign Genetic Diversity among *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Appl Environ Microbiol.* 62, 1, 41–46

Ballard R.D, Stager L.E., Master D., Yoerger D., Mindell D., Whitcomb L., Singh H. et Piechota D. 2002. Iron Age Shipwrecks in Deep Water Off Ashkelon, Israel. *Am J Archaeol*, 106, 2.

Barnett J. A., Payne R. W. et Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and Identification* - 3rd Ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

de Barros Lopes M, Soden A, Henschke PA et Langridge P. 1996. PCR differentiation of oenological yeast strains using intron splice site primers. *Appl Environ Microbiol.* 62, 12, 4514-4520.

Beltran G, Torija M.J., Novo M., Ferrer N., Poblet M., Guillamón J., Rozès N. et Mas A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *System. Appl. Microbiol.* 5, 287-293.

Benitez T, Martinez P et Codon AC. 1996. Genetic constitution of industrial yeast, *Microbiologia.* 12, 3, 371-84.

Berger K., et Yaffe M., 2000. Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol.* 8, 11 : 508-513

Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S. et Vezinhet, F. 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* **22**, 1-7.

Birren B et Lai E. *Pulsed Field Gel Electrophoresis : A Practical Guide*. Academic Press. 1993.

Blondin, B. et Vezinhet, F. 1988 Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus en électrophorèse en champs pulsé. *Rev. Fr. Oenol.* 28, 7-11.

Boeke, J.D. Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*. In Berg M.M. et Howe (ed): *Mobile DNA*. Washington DC, American Society for Microbiology, 1989, pp335-374.

Bougnoux M.-E., Morand S. et d'Enfert C. 2002. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 40, 4, 1290–1297.

Bougnoux M.-E., Tavanti A., Bouchier C., Gow N.A.R., Magnier A., Davidson A.D., Maiden M.C.J., d'Enfert C. et Odds F.C. 2003. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 41, 11, 5256–5266.

Bradbury JE, Richards KD, Niederer HA, Lee SA, Rod Dunbar P et Gardner RC. 2006. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89, 1, 27-37.

Brem RB, Kruglyak L. 2005. The landscape of genetic complexity across 5,700 gene expression traits in yeast. *Proc Natl Acad Sci.* 102, 5, 1572-7.

Cappello MS, Blevé G, Grieco F, Dellaglio F et Zacheo G. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J Appl Microbiol.* 97, 6, 1274-1280.

Carle G.F. et Olson M.W., 1984. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 12: 5647-5664.

Carle G.F. et Olson M.W., 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 82: 3756-3760

Carrasco, P., Querol, A. et del Olmo, M., 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strain. *Arch Microbiol* 175, 450–457.

Casaregola S., Nguyen H. V., Lepingle A., Brignon P., Gendre F et Gaillardin C. 1998. A Family of Laboratory Strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry Rearrangements Involving Chromosomes I and III. *Yeast.* 14, 551–564.

Castrejón F., Codón A.C, Cubero B. et Benítez. T. 2002. Acetaldehyde and Ethanol are Responsible for Mitochondrial DNA (mtDNA) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in Flor Yeasts. *System. Appl. Microbiol.* 25, 462–467

Cavalieri D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R et Polsinelli M. 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J Mol Evol.* 57 Suppl 1:S226- S 232.

Chatterjee A et K. Singh. 2001. Uracil-DNA glycosylase-deficient yeast exhibit a mitochondrial mutator phenotype *Nucleic Acids Res.* 29: 4935 – 4940.

Chu G. 1991. Bag model for DNA migration during pulsed-field electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88. 11071-11075.

Codon A. C. Benítez T et Korhola M. 1998. Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 154-163

Comi G., Maifreni M., Manzano M, Lagazio C et Cocolin L. 2000. Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *Int J Food Microbiol.* 58, 117–121

Contamine V., et Picard M., 2000. Maintenance and Integrity of the Mitochondrial Genome: a Plethora of Nuclear Genes in the Budding Yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 2, 281–315.

Constanti M., Poblet M., Arola L., Mas A. et Guillamon J., 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 3, 339-344.

Cooper J. et Feil E. 2004. Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends Microbiol.* 12, 8, 374-376.

Cuinier C., Seguin S et Daumas F. 1987. Levures sèches actives : comment les choisir? *Rev Œnol.* 45, 47- 49.

Darvasi et Pisante-Shalom. 2002 Complexities in the genetic dissection of quantitative trait loci. *Trends Genet.* 18, 10, 489-91.

Dekkers J. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* 82 (E. Suppl.): E313–E328

Dequin S. 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56, 5-6, 577-88. Review

Dubourdieu D., Sokol A., Zucca J., Thalouarn P., Dattee A. et Aigle M., 1987. Identification des souches de levures isolées de vin par l'analyse de leur ADN mitochondrial. *Conn Vigne Vin*, 21, 4, 267-278.

Dujon B.. Mitochondrial genetics and functions. In Strathern J. N., Jones E. W. and Broach J. R.(ed): *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1981, pp. 505–592,

Dunn B., Levine P. et Sherlock G. 2005. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics.* 6, 53, 1471-2164

Dunham M. J., Badrane H., Ferea T., Adams J., Brown P. O., Rosenzweig F. et Botstein D. 2002. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* , 99, 25, 16144–16149.

Duteurtre B. et Moll M. Les levures et les boissons alcoolisées. In Larpent J.P. (ed) : *Biotechnologie des levures*, Masson, 1991, pp 273-286.

Edwards-Ingram L., Gent M., Hoyle D., Hayes A., Stateva L et Oliver S. 2004. Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Res.* 14, 1043-1051.

Egli C.M., Edinger W.D., Mitrakul C.M. et Henick-Kling T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Reisling and Chardonnay wines. *J Appl Microbiol*, 85, 779-789.

ENITA. *La filière viticole au Liban : analyse et propositions pour une évolution*. Ministère de l'agriculture, république libanaise et le service de coopération et d'action culturelle, ambassade de France au Liban, Bordeaux, 2003.

Enright M.C. et Spratt B.G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 7, 12, 482-487. Review

Epifanio S., Gutierrez R., Santamaria P. et Lopez R. 1999. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 2, 219-224.

Erasmus D., van der Merwe G. et van Vuuren H. 2003. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Res.* 3, 375-399

Esteve-Zarzoso, B., Peris-Tora'n, M.J., Garcí'a Maizquez, E., Uruburu, F. et Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of Sherry wines. *Appl Environ Microbiol.* 67, 2056–2061.

Ezechiel, 27 : 18. Bible

FAO (Food and Agriculture Organisation). *Résultats globaux du recensement agricole*. Beyrouth, 122 p, 2000.

Fay JC, McCullough HL, Sniegowski PD. et Eisen MB. 2004. Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol*, 5, R26.

Fay J. et Benavides J. 2005. Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 1, 66-671

- Fernández-Espinar M.T., López V., Ramón D., Bartra E. et Querol A. 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol.* 70:1–10
- Field, D. et Wills, C. 1998. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distribution in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 1647–1652.
- Fleet G. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol.* 86, 11 – 22
- Fossati P. et Prencipe L. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 28, 10, 2077-2080.
- Foury F, Hu J. et Vanderstraeten S. 2004. Mitochondrial DNA mutators. *Cell Mol Life Sci.* 61, 22, 2799-811
- Frezier, V. et Duburdieu, D , 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic,* 43, 375-380.
- Galet P. *Précis de viticulture.* JF, Saint-Jean de Védas, 7ème édition. 602p, 2000.
- Gallego, F.J., Perez G., Martinez I. et Hidalgo P. 1998. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Vitic.* 49, 350-351.
- Ganga M.A. et Martinez C., 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J Appl Microbiol,* 96, 76–83
- Gardner N., Rodrigue N. et Champagne C. 1993. Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 59, 7, 2022-2028.

Gargouri, A., 1989. A rapid and simple method for extraction yeast mitochondrial DNA. *Curr Genet.* 15, 235–237.

Gil-Lamaignere C., Roilides E., Hacker J. et F.-M C. Muller. ., 2003. Molecular typing for fungi—a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect.* 9: 172–185.

Glazier A, Nadeau J et Aitman T. 2002. Finding genes that underlie complex traits. *Science.* 298, 5602, 2345-9. Review.

Granchi L, Ganucci D, Viti C, Giovannetti L et Vincenzini M. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous oenological fermentations of grape musts with 'adequate' and 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Lett Appl Microbiol.* 36, 1, 54-58.

Gray W. M., Burger G. et Lang B. F., 2001. The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol*, 2, 6 : 1018.1–1018.5. Minireview

Guijo, S., Mauricio, J.C., Salmon, J.M. et Ortega, J.M. 1997. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines. *Yeast* 13, 101– 117.

Guillamón J. M., Barrio E. et Querol A. 1995. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 122-132.

Guillamón, J.M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J. et Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol.* 169, 387-392.

Gutiérrez A.R., Santamaría P., Epifanio S., Garijo P. et López R. 1999. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Lett Appl Microbiol*, 29, 411–415

Hauser N., Fellenberg K., Gil R., Bastuck S., Hoheisel J.D. et Perez-Ortin J.E. 2001. Whole genome analysis of a wine yeast strain. *Comp. Funct. Genom.* 2, 69–79.

Heard G. et Fleet G. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 3, 727-728.

Henderson S. et Petes T.D. 1992. Instability of Simple Sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 12, 6, 2749-2757

Hennequin C, Thierry A, Richard G.F., Lecointre G, Nguyen H. V., Gaillardin C, et Dujon B. 2001. Microsatellite Typing as a New Tool for Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *J Clin Microbiol.* , 39, 2, 551–559

Herraiz T., Reglero G., Herraiz M., Martin-Alvarez P et Cabuzedo M-D. 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulphur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 4, 313- 318.

Ibeas J.I. et Jiménez J. 1997. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 7–12.

IDEAS. *Proposal for the protection of Geographical indication in Lebanon*, Report of IDEAS Centre, Geneva, Switzerland, 2005.

Infante J., Dombek K., Rebordinos L., Cantoral J, et Young E. 2003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics.* 165, 1745-1759.

ITV. *Choix et emploi des microorganismes en œnologie*. ITV, France, 2003.

Ivorra, C., Pérez-Ortín, J. et del Olmo, M., 1999. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeast. A molecular study. *Biotechnol Bioeng* 64, 698–708.

Jimenez J., Longo E. et Benitez T. 1988. Induction of Petite Yeast Mutants by Membrane-Active Agents. *Appl Environ Microbiol.* 54, 12, 3126-3132.

Jiranek V., Langridge P. et Henschke A. 1995. Validation of Bismuth containing indicator media for predicting H<sub>2</sub>S production potential of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts under oenological conditions. *Am J Enol Vitic.* 46, 2, 269-273

Jordan I.K. et J.F.McDonald. 1999. Tempo and Mode of Ty Element Evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 151, 1341–1351.

Josepa S., Guillamon J. et Cano J. 2000. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiol Lett.* 193, 255-259.

Karam M. *Wines of Lebanon*. SAQI, London, 2005.

Kim, J.M., Vanguri, S., Boeke, J.D., Gabriel, A. et Voytas, D.F. 1998. Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.* 8 : 464–478.

Kruglyak, S., Durrett R. T., Schug M. D. et Aquadro C. F.. 1998. Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:10774–10778.

Kruglyak S, Durrett R.T., Schug M.D. et Aquadro C.F. 2000. Distribution and Abundance of Microsatellites in the Yeast Genome Can Be Explained by a Balance Between Slippage Events and Point Mutations. *Mol. Biol. Evol.* 17 : 1210-1219.

Kurtzman CP et Robnett CJ. 1997 Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol.* 35, 5 :1216-23.

- Kurtzman CP et Robnett CJ. 1998 Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 73, 4, 331-71.
- Landry C., Townsend J., Hartl D. et Cavalieri D. 2006. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol*. 15, 575–591.
- Lee, S.Y., et Knudsen, F.B., 1985. Differentiation of brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA. *J. Inst. Brew.* 91, 169–173.
- Legras J-L. et Karst F 2003. Optimisation of Inter-Deltas analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol Lett*. 221, 249-255.
- Legras J-L, Ruh O., Merdinoglu D. et Karst F. 2005. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol*.
- Legras J-L., Merdinoglu D., Cornuet J-M. et Karst F. Bread, Beer and Wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Soumis*
- Lema C., Garcia-Jares C., Orriols I. et Angulo L. 1996. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic* 47, 206–216.
- Lieckfeldt E, Meyer W et Borner T. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J Basic Microbiol*. 33, 6, 413-25.
- Li Y-C., Korol A., Fahima T et Nevo E. 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Mol. Biol. Evol*. 21, 6, 991–1007.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S., 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavour profiles of wines and distillates. *Appl Environ Microbiol* 66, 744– 753.

Linderholm A. L. et Bisson L. 2005. Eliminating formation of hydrogen sulfide by *Saccharomyces*. *Practical Winery & Vineyard Magazine*. Nov/Dec issue.

Liu S.Q. and G.J. Pilone. 2000. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *Int J Food Sci Technol* 35:49-61.

de Llanos R., Querol A., Planes A. M et Fernández-Espinar M. T. 2004. Molecular Characterization of Clinical *Saccharomyces cerevisiae* Isolates and their Association with Non-Clinical Strains. *System. Appl. Microbiol.* 27, 427–435.

Longo E., Cansado J., Agrelo D. et Villa T.G., 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 2, 141-144.

Lopes C.A., van Broock M, Querol A et Caballero A. C., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J Appl Microbiol*, 93, 608–615

Lopez V., Querol A., Ramon D. et Fernandez-Espinar M.T., 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int J Food Microbiol*, 68, 75–81.

Lopez V, Fernandez-Espinar MT, Barrio E, Ramon D et Querol A. 2003. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int J Food Microbiol.* 25, 81, 1, 63-71.

Lurton, I., Snackers, G., Roulland, C., Galy, B. et Versavaud, A., 1995. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *J Sci Agric* 67, 485–491.

MA (Ministère de l'Agriculture), République libanaise, Direction des études et de coordination. *Atlas Agricole du Liban*, 2004.

Maiden M.C., Bygraves J. A., Feil E., Morelli G., Russell J. E., Urwin R., Zhang Q, Zhou J., Zurth K., Caugnant D. A., Feavers I., Achtman M., et Spratt B. G. 1998. Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 6, 3140-3145.

Majdak A., Herjavec S., Orlic S., Redzepovic S. et Nikola Mirozevic N. 2002. Comparison of Wine Aroma Compounds Produced by *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Food Technol. Biotechnol.* 40, 2, 103–109.

Maleszka, R. et Clark-Walker, G. D. 1992. *In vivo* conformation of mitochondrial DNA in fungi and zoosporic moulds. *Curr. Genet.* 22, 341–344.

Martini A. 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Wine Res* 3:165–176

Martini A., Ciani M. et Scorzetti G. 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 4, 435-440.

Martini A. 2003 Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Microbiol.* 6: 207–209

Martinez P, Codon AC, Perez L et Benitez T. 1995. Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast.* 11(14):1399-411.

Martínez C., Gac S., Lavín et Ganga M., 2004. Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J Appl Microbiol* 2004, 96, 1161–1168.

Marullo P., Bely M., Masneuf-Pomarede I., Aigle M. et Dubourdieu D. 2004. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 4, 711–719.

Marullo P., Bely M., Masneuf-Pomarede I., Pons M., Aigle M. et Dubourdieu D. 2006. Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. *FEMS Yeast Res.* 6, 268–279

Masneuf I. et Dubourdieu, 1994. Comparaison de deux techniques d'identification des souches de levures de vinification basées sur le polymorphisme de l'ADN génomique :

réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse des caryotypes (Electrophorèse en champ pulsé). *J Int Sci Vigne Vin*, 28, 2, 153-160.

Masneuf I, Aigle M. et Dubourdieu D. 1996. Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol Lett.* 138, 239-244.

Masneuf I, Hansen J, Groth C, Piskur J, et Dubourideu D. 1998. New Hybrids between *Saccharomyces Sensu Stricto* Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. *Appl Environ Microbiol.* 64, 10, 3887–3892.

McGrath A, Higgins DG et McCarthy TV. 1998. Sequence analysis of DNA randomly amplified from the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Mol Cell Probes.* 12, 6, 397-405.

McGovern PE, Voigt MM, Glusker DL. et Exner LJ. 1996. Neolithic resinated wine. *Nature* 381:480–481.

McGovern PE. *Ancient wine: The scientific search for the origins of viniculture.* Princeton, NJ, Princeton University, 2003.

Molina, F.I., Inoue, T. et Jong, S.-C. 1992. Restriction polymorphisms in the internal transcribed spacers and 5.8S rDNA of *Saccharomyces*. *Curr Microbiol.* 25, 251-255.

Mortimer R. 2000. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* 10, 403–409.

Mortimer, R., P. Romano, G. Suzzi, et P. Polsinelli. 1994. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast.* 10, 1543–1552.

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

MPT (Ministère des travaux publics et des transports), République libanaise, Direction générale de l'aviation civile, Service météorologique. *Atlas climatique du Liban*, Deuxième édition, 1977.

Nadal D, Colomer B. et Pina B. 1996. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl Environ Microbiol*, 62, 1944–1950.

Nadal D., Carro D., Fernández-Larrea J et Piná B. 1999. Analysis and Dynamics of the Chromosomal Complements of Wild Sparkling-Wine Yeast Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4, 1688–1695

Naumov G., Naumova E., Lanto R., Louis E., et Korhola M. 1992. Genetichomology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: Electrophoretic karyotypes. *Yeast*. 8, 599-612.

Naumov, G.I., 1996. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J Ind Microbiol* 17, 295–302.

Navarre C. *L'oenologie*. Technique et documentation, Lavoisier, Paris, 1991, 300 p.

Ness, F., Lavalée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. et Dulau, L., 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J Sci Agric*, 62, 89-94.

Neueglise C., Feldmann H., Bon E., Gaillardin C. et Casaregola S. 2002. Genomic evolution of the Long Terminal Repeat Retrotransposons in Hemiascomycetous Yeasts. *Genome Res.* 12, 930–943.

Nguyen, H.-V. et Gaillardin, C. 1997. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Syst. Appl. Microbiol.* 20: 286–294.

Nguyen, H.-V., Lépling, A., et Gaillardin, C. 2000a. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* and reveals the existence of hybrids between *S.*

*uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 71–85.

Nguyen, H.-V., Pulvirenti A. et Gaillardin C. 2000b. Rapid differentiation of the closely related *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of the rDNA non transcribed spacer 2. *Can. J. Microbiol.* 46: 1115–1122.

OIV. *Receuil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. OIV, 1990.

Olson, M. V. 1991. Genome structure and organization in *Saccharomyces cerevisiae*, In J. R. Broach, J. Pringle, and E. Jones (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: genome dynamics, protein synthesis, and energetics*, Vol. 1. p. 1–39. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Osée, 14 : 8. Bible

Pardo I., García M-J., Zúñiga et Uruburu F. 1989. Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. *Appl Environ Microbiol.* 55, 2, 539-541.

Parish M.E. et Carroll D. E. 1985. Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165-169.

Parker S.B. *Ugaritic Narrative Poetry*. Society of Biblical Literature, Writings from the Ancient World series. Scholars Press, Atlanta, 1997.

Patel S. et Shibamoto T. 2003. Effect of 20 different yeast strains on the production of volatile components in Symphony wine. *J Food Comp Anal.* 16: 469–476.

Perez M.A., Gallego, F.J., Martinez, I. et Hidalgo, P. 2001a. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett Appl Microbiol* 33, 461– 466.

Perez F, Ramirez M et Regodon JA. 2001b. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79, 3-4, 393-399.

Pérez-ortín J., Querol A., Puig S. et Barrio E. 2002. Molecular Characterization of a Chromosomal Rearrangement Involved in the Adaptive Evolution of Yeast Strains. *Genome Res*. 12, 1533–1539.

Petes, T. D., P. W. Greenwell, et M. Dominska. 1997. Stabilization of microsatellite sequences by variant repeats in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 146:491–498.

Pon L. et Schatz G. Biogenesis of Yeast Mitochondria. In : Broach J., Pringle J. and Jones E (éd.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Vol 1. 1991, pp 333-406.

Poulard A., Simon L. et Cuinier C. 1980. Variabilité de la microflore levurienne de quelques terroirs viticoles du pays nantais. *Connaissance Vigne Vin*. 14, 4, 219-238.

Povhe Jemec K., Cadez N., Zagorc T., Bubic V., Zupec A. et Raspor P. 2001. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiol*. 18, 247-259.

Pramateftaki P.V., Lanaridis P. et Typas M.A., 2000. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J Appl Microbiol*, 89, 236-248.

Pretorius IS. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16, 8, 675-729. Review.

Puig S., Querol A., Barrio E. et Perez-Ortin J. 2000. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl and Environ Microbiol*. 66, 2057–2061.

Querol A., et Barrio E., 1990. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 18, 6, 1657.

Querol. A, Jimenez M. et Huerta T. 1990. Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvests in the region of Alicante (Spain). *J Food Sci.* 55, 6, 1603-1606.

Querol, A., Barrio, E. et Ramón, D., 1992a. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 439–446.

Querol A., Barrio E., Huerta T. et Ramón D, 1992b. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 9, 2948-2953.

Querol A., Huerta T., Barrio E. et Ramon D. 1992c. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *J Food Sci.* 57, 1, 183-185.

Querol A., Fernández-Espinar M.T., del Olmo M., et Barrio E. 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol.* 86, 3–10. Review

Quesada M. P. et Cenis J.L. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. *Am J Enol Vitic.* 46, 2, 204-208

Rachidi N. Barre P. et Blondin B. 1999. Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 261, 841-850.

Ramos JP, Valente P, de Souza RA, Rosa CA et Leoncini O. 2001. Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26S rDNA for differentiation of *Saccharomyces* species. *Lett Appl Microbiol.* 33, 3, 206-10.

Rapp A. 1998 Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung/Food.* 42, 6, 351-63.

Rapp, A. et Versini, G. 1996. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Vitic. Enol. Sci.* 51: 193-203.

Riachy I. *Germplasm characterization and climatic zoning for viticulture in Lebanon*. Thesis for the degree of Master of Science. Department of crop production and protection, Faculty of Agricultural and Food Sciences, American University of Beirut, 1998.

Ribéreau-Gayon P. 1993. Influence de la nature de la souche de levure sur l'arôme des vins. *Comptes Rendu de l'Académie Agricole Française* 79, 2, 73-80.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. et Lonvaud A. *Traité d'œnologie. Volume 1 : Microbiologie du vin, Vinifications*. Dunod, 1998.

Richard G.-F. et Dujon B., 1996. Distribution and variability of trinucleotide repeats in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*.174, 165-174

Rojas V., Gil J. V., Pinaga J. et Manzanares P., 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int J Food Microbiol*. 86, 181– 188

Romano, P., Suzzi, G., Zironi, R., Comi, G., 1993. Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. *Appl Env Microbiol* 59, 1838– 1841.

Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P. et Fatichenti, F., 1997. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 71, 239– 242.

Romano, P., Caruso, M., Capece, A., Lipani, G., Paraggio, M. et Fiore, C. 2002. Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape must. *W J Microbiol Biotechnol*. 19, 3, 311– 315.

Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M. et Capece A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol*, 86, 169– 180.

Rose, O., et D. Falush. 1998. A threshold size for microsatellite expansion. *Mol. Biol. Evol.* 15:613–615.

Roth J-F. 2000. The yeast Ty virus-like particles. *Yeast* 2000; 16: 785-795. Review Articles.

Saint-Prix F., Bonquist L et Dequin S. 2004. Functional analysis of the ALD gene family of *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth on glucose: the NADP<sup>+</sup>-dependent Ald6p and Ald5p isoforms play a major role in acetate formation. *Microbiology*. 150, 2209–2220

Sabate J., Cano J., Querol A. et Guillamon J.M.. 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations : analysis for two consecutive years. *Lett Appl Microbiol*. 28, 452-455.

Sabon I., de Revel G., Kotseridis Y et Bertrand A. 2002. Determination of volatile compounds in Grenache wines in relation with different terroirs in the Rhone valley. *J. Agric. Food Chem*. 50, 6341-6345.

Schuller D., Valero E., Dequin S., et Casal M. 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett*. 231, 19-26.

Schutz, M. et Gafner, J., 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J Applied Bacteriol* 75, 551– 558.

Schutz M. et Gafner J., 1994. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol*. 19, 253-257.

Schwartz C., Saffran W., Elsh W.J., Haas R., Goldenberg M. et Cantor C. R. 1983. *New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47: 189-195.

Schwartz D. C. et Cantor, C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.

Seguin G. Le terroir. In : *La vigne et le vin*. La manufacture et la cité des sciences et de l'industrie, 1988

- Selander R., Caugant D., Ochman H., Musser J., Gilmour M. et Whittman T. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 5, 873-884.
- Selli S., Cabaroglu T., Canbas A., Erten H., Nurgel C., Lepoutre J.P., Gunata Z. 2004. Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasi grown in central Anatolia. *Food Chem.* 85, 207–213.
- Sibly, R. M., J. C. Whittaker, et M. Talbot. 2001. A maximum likelihood approach to fitting equilibrium models of microsatellite evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18:413–417.
- Sinha H., Nicholson B., Steinmetz L. et McCusker J. 2006. Complex Genetic Interactions in a Quantitative Trait Locus. *PLoS Genet.* 2, 2, e13, 140-147.
- Stashenko H., Macku C. et Shibamoto T. 1992. Monitoring Volatile Chemicals Formed from Must during Yeast Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2257-2259 2267
- Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ, McCusker J. et Davis R. 2002. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature.* 416, 326–330.
- Sniegowski PD, Dombrowski PG et Fingerman E. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res*, 1, 299–306.
- Szuchman P, 2005. Shopping: Better Shop Around. *The Wall Street Journal.* June 3.
- Tachida H. et Iizuka M. 1992. Persistence of Repeated Sequences That Evolve by Replication Slippage. *Genetics.* 131, 471-478.
- Taillandier P., Ramon-Portugal F., Seiller I., Favarel J.L., Nepveu F. et Strehaiano P. 1999. Effet de cinq souches de levures sur l'évolution de l'acidité pendant la fermentation alcoolique. *Rev Fr Œnol.* 178, 18-24.

Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1, 16, 6463- 6471.

Tavanti A., Gow N.A.R, Senesi S., Maiden M.C.J., et Odds F.C. 2003. Optimization and Validation of Multilocus Sequence Typing for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 41, 8, 3765–3776.

Taylor J., Geiser D., Burt A et Koufopanou V. 1999. The Evolutionary Biology and Population Genetics Underlying Fungal Strain Typing. *Clin Microbiol Rev.* 12, 1, 126–146.

Taylor J. et Fisher M. 2003. Fungal multilocus sequence typing — it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 6, 351–356.

Techera, A.G., Jubany, S., Carrau, F.M. et Gaggero, C., 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett Appl Microbiol* 33, 71– 75.

Torija, M.J., Roze's, N., Poblet, M., Guillamon et J.M., Mas, A., 2002. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 47– 53.

Torija M-J, Beltran G., Novo M., Poblet M., Guillamón J. M., Mas A. et Rozès N. 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol.* 85, 127– 136.

Tóth G., Gáspári Z., et Jurka J. 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Res.*10, 967–981.

Townsend JP, Cavalieri D et Hartl DL 2003. Population genetic variation in genome-wide gene expression. *Mol Biol Evol*, 20, 955–963.

Tran H., Gordenin D. et Resnick M. 1996 The Prevention of Repeat-Associated Deletions in *Saccharomyces cerevisiae* by Mismatch Repair Depends on Size and Origin of Deletions. *Genetics* 143, 1579-1587.

Urwin R et Maiden MC. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 10, 479-487. Review.

Uscidda. *Maîtrise des fermentations et sélection de souches de levures indigènes*. Document de travail. CIVAM de la région Corse. 2001.

Vagnoli P, Musmanno RA, Cresti S, Di Maggio T et Coratza G. 1993. Occurrence of Killer Yeasts in Spontaneous Wine Fermentations from the Tuscany Region of Italy. *Appl Environ Microbiol.* 59, 12, 4037-4043.

Valero E., Moyano L., Millana M.C., Medina M. et Ortega J.M. 2002. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chem.* 78, 57–61

Vanderstraeten S., Van den Brûle S., Hu J. et Foury F. 1998. The Role of 3'-5' Exonucleolytic Proofreading and Mismatch Repair in Yeast Mitochondrial DNA Error Avoidance. *J Biol Chem.* 273, 37: 23690–23697.

Vasserot Y. 1996. La fermentation alcoolique chez *Saccharomyces cerevisiae* : aspects biochimiques et physiologiques. *Rev Fr Œnol.* 159,

Vaughan-Martini, A. et Kurtzman, C.P. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bact.* 35. 508-511.

Versavaud A, Courcoux P, Roulland C, Dulau L et Hallet J-N. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl Environ Microbiol.* 61, 10, 3521–3529.

Veziñhet F., Blondin B. et Hallet J-N. 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32, 568-571.

Veziñhet F., Hallet J-N., Valade M. et Poulard A. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol 43, No 1, 83-43.

Viguera E., Canceill D., et S. D. Ehlrich. 2001. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* 20, 10, 2587-2595.

Weast R. Concentrative Properties of Aqueous Solutions: Conversion Tables, Table 88. In: *Handbook of Chemistry and Physics, 69th edition*. Boca Ratan, Florida, CRC Press, 1988.

Wierdl M., Dominska M. et Petes T.D. 1997. Microsatellite Instability in Yeast: Dependence on the Length of the Microsatellite. *Genetics* 146, 769-779.

Williamson D. 2002. The curious history of yeast mitochondrial DNA. *Nat. Rev. Genet.* 3: 475–481.

Winzeler E., Lee B., McCusker J., et Davis R. 1999. Whole genome genetic-typing in yeast using high-density oligonucleotide arrays. *Parasitology.* 118, S73-S80.

Xiong, Y. et Eickbush, T.H. 1990. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9: 3353–3362.

Young, E.T., Sloan, J.S. et Van Riper, K. 2000. Trinucleotide repeats are clustered in regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 1053– 1068.

de Zamaroczy M et Bernardi G. 1986. The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*-a review. *Gene.* 47, 2-3, 155-77.

Zeyl C. 2004 Capturing the adaptive mutation in yeast. *Res Microbiol,* 155, 217–223.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S. *Wine Analysis and Production*. Chapman & Hall. Thomson Publishing, 1995.

Zolan ME. 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiol Rev.* 59, 4, 686–98.

Zou, S., Ke, N., Kim, J.M., et Voytas D.F. 1996. The *Saccharomyces* retrotransposon Ty5 integrates preferentially into regions of silent chromatin at the telomeres and mating loci. *Genes Dev.* 10: 634–645.

Zou S. et Voytas D.F. 1997. Silent chromatin determines target preference of the *Saccharomyces* retrotransposon Ty5 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 7412–7416.

A Bequest Unearthed, Phoenicia, Encyclopedia Phoenicia, <http://phoenicia.org/> , février 2006.

MLST, Multi Locus Sequence Typing, <http://www.mlst.net/> , octobre 2006.

SGD (*Saccharomyces* Genom Database) [www.yeastgenom.org](http://www.yeastgenom.org), octobre 2006.

# **Annexes**