



HAL
open science

Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles

Mariette El Khoury

► **To cite this version:**

Mariette El Khoury. Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0357 . tel-01309805

HAL Id: tel-01309805

<https://theses.hal.science/tel-01309805>

Submitted on 1 May 2016

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Œnologie

Par Mariette EL KHOURY

**Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni*
responsables de la fermentation malolactique des vins dans
différentes régions vitivinicoles**

Sous la direction de M. Patrick LUCAS

Soutenue le 16 décembre 2014

Membres du jury :

M. E. COTON	Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale	Président
M. A. BORDONS	Professeur à l'Université Rovira i Virgili de Tarragone	Rapporteur
Mme. R. TOURDOT-MARECHAL	Maître de Conférence à l'Université de Bourgogne	Examineur
M. P. LUCAS	Professeur à l'Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles

Oenococcus oeni est la principale espèce de bactérie lactique d'intérêt œnologique, elle réalise la plupart des fermentations malolactiques. Les souches d'*O. oeni* ont souvent été étudiées dans le but de sélectionner des levains malolactiques. Ces souches possèdent des caractéristiques génétiques, et phénotypiques variées. Néanmoins, l'utilisation de différentes méthodes de typage n'a pas permis à ce jour d'obtenir une image exhaustive de la diversité œnologique de cette espèce. L'intérêt grandissant des viticulteurs pour mieux maîtriser les FML spontanées nécessite de mieux connaître cette diversité.

La population de souches indigènes d'*O. oeni* présentes dans les FML de différentes régions a été étudiée, pour tenter d'obtenir une image plus complète de la diversité de cette espèce et savoir s'il serait pertinent de sélectionner des souches de régions ou d'exploitations. L'analyse d'un très grand nombre de vins a mis en évidence la présence de souches spécifiques aux régions, appellations, produits et exploitations étudiées. Un génotypage à l'aide de SNP a permis de les classer dans les groupes génétiques déjà connus et a confirmé l'existence de groupes spécifiques à un type de produit. Certaines de ces groupes rassemblent des souches présentant des comportements phénotypiques et des capacités fermentaires similaires. En complément de l'analyse de diversité, des essais ont été menés pour proposer des protocoles de production de souches et d'utilisation de lies pour améliorer la réalisation des FML spontanées. L'ensemble de ces travaux soulignent la grande diversité génétique de l'espèce *O. oeni*, l'étude des souches spécifiques de type de vin pourrait aider à comprendre son adaptation à cet environnement.

Mots clés : *Oenococcus oeni*, diversité, indigène, fermentation malolactique, SNP

Study of the diversity of *Oenococcus oeni* strains responsible for malolactic fermentation of wine in different winemaking regions

Oenococcus oeni is the main species of lactic acid bacteria of oenological interest, it performs most of malolactic fermentation. *O. oeni* strains have often been studied to select malolactic starters. These strains have various genetic and phenotypic characteristics. However, the use of different typing methods failed so far to obtain a complete picture of the enological diversity of this species. The growing interest of winegrowers to better control the spontaneous requires a better knowledge of this diversity.

The population of indigenous *O. oeni* strains present during MLF in different regions has been studied in an attempt to obtain a more complete picture of the diversity of the species and to know whether it would be appropriate to select strains of regions or wineries. The analysis of a large number of wines showed the presence of strains specific to wineproducing areas, different kind of wines, and wineries. SNP Genotyping allowed us to classify these strains in the already known genetic groups and confirmed the existence of specific groups to a specific kind of product. Some of these strains belonging to the same specific genetic groups showed similar behavior and technological properties. In addition to the diversity analysis, trials of production of strains and use of lees to ameliorate the MLF have been done to improve the achievement of spontaneous MLF. Taken together, these studies emphasize the high genetic diversity of the species *O. oeni*, the study of specific strains of type of wine could help understand the adaptation of this species to this environment.

Keywords : *Oenococcus oeni*, diversity, indigenous, malolactic fermentation, SNP

Unité de recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon

À mes parents,

À mon parrain

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury M. Emmanuel COTTON, M. Albert BORDONS et Mme. Raphaëlle TOURDOT-MARECHAL qui ont accepté de juger mon travail de thèse et qui ont fait le déplacement depuis Nantes, Tarragone et Dijon. Merci pour tous vos conseils et vos remarques pertinentes qui m'ont été précieuses.

J'adresse également mes chaleureux remerciements à mon directeur de thèse M. Patrick Lucas pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de microbiologie du raisin et du vin. Merci pour tes conseils avisés, ta disponibilité malgré ton emploi du temps serré, ta confiance et la grande part d'autonomie que tu m'as accordé sur ce sujet passionnant. Merci de m'avoir permis de voyager autant grâce aux projets et de réaliser du monitorat, c'était une très belle expérience. Je suis très contente d'avoir pu travailler en ta compagnie.

Je remercie de même tous les partenaires des projets LevainsBio et WildWine, les centres IFV, l'IFPC, le SVBA et plus particulièrement Stéphane Becquet et les châteaux partenaires, qui m'ont fourni des centaines d'échantillons, sans qui ce projet n'aurait pas été réalisable.

Au cours de cette période l'aide de certaines personnes a été indispensable pour mener à bien ce travail. Un grand merci à Olivier Claisse et Marion Favier pour m'avoir formée et soutenue depuis le master et jusqu'au bout de la thèse. Merci pour toutes vos explications, votre patience à toute épreuve et vos encouragements. Olivier merci de m'avoir prêté si souvent ton ordi et bureau même quand tu en avais besoin. Merci à Julie Maupeu et Cécile Miot-Sertier (Tatie) pour votre gentillesse, votre bonne humeur et tous vos conseils pratiques et techniques.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe microbio; Geoffrey (le roi des μ FML), Marie, Aurélie, Hugo (notre bioinformaticien), Claire, Isabelle, Mme. Aline Lonvaud, Marguerite, Marina, Patricia, Guilherme, Marine B., Marion B., et à mes compagnons de bureau ; Margaux, Maxime et Cécile; pour vos encouragements et tous les bons moments

passés en votre compagnie. Je me suis sentie tellement bien parmi vous que ces trois années sont passées en un clin d'œil, j'ai eu beaucoup de chance de vous rencontrer et de partager les apéros/carnavals du labo avec vous. Merci aussi à tous les stagiaires qui m'ont bien aidé, Guillaume, Cécile G., Charly, Camille, Marine et Florian.

Une pensée particulière va à mes collègues et maintenant amis, Fety Jaomanjaka (mon partenaire de rock) et Maroula Dimopoulou (ma grec préférée). Je n'aurais pu imaginer ces dernières années sans votre présence joyeuse à mes côtés dans tous les bons moments mais aussi les mauvais, merci pour tout.

Un grand merci à Nathalie Alvarez, Caroline Baz et Soizic Lacampagne pour votre gentillesse vos encouragements et d'avoir toujours été à mon écoute. Et merci à l'équipe du Hall Techno, à Julien et Isa pour vos petites blagues et votre bonne humeur communicative.

Merci à Marine Gammacurta, Adrien et Charline Zimmer, et à mes amis Alsaciens Lucile, Neila, Nicolas et David pour votre soutien et tous les bons moments ponctués de déco de bureau, brunchs, soirées et weekend inoubliables et surtout merci Rany qui a assuré l'intendance pendant les derniers mois difficile de la rédaction.

Pour finir je souhaite remercier mes parents, mes grands frères, ma belle-sœur pour leur soutien inconditionnel. J'ai de la chance d'avoir une famille qui comprend mon travail et qui a su m'accompagner et me conseiller tout au long de cette aventure. Un Merci tout particulier à Etienne et Nath, vous m'avez poussé à me lancer dans cette voie (la bio la recherche tout ça...) et vous avez eu bien raison. Et puis merci à mon petit neveu Lucas parce que c'est le plus mignon et qu'il était presque sage pendant ma soutenance.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Les bactéries lactiques du vin et la fermentation malolactique	3
1.1. Découverte et diversité des bactéries lactiques du vin	3
1.2. Evolution de la population des bactéries lactiques au cours de la vinification	4
1.3. Les facteurs influençant la croissance des bactéries dans le vin	5
<i>La température</i>	5
<i>Le pH</i>	5
<i>La teneur en alcool</i>	5
<i>Le SO₂</i>	6
1.4. La fermentation malolactique.....	7
<i>Intérêt de la fermentation malolactique pour la bactérie</i>	7
<i>Intérêt de la fermentation malolactique pour la qualité du vin</i>	7
<i>Altérations causées par des bactéries lactiques</i>	8
2. L'espèce <i>Oenococcus oeni</i>	9
2.1. Découverte et description de l'espèce	9
2.2. Autres espèces du genre <i>Oenococcus</i>	11
2.3. Phénotypes d'intérêt œnologique	12
2.4. Caractéristiques génétiques de l'espèce <i>Oenococcus oeni</i>	14
<i>Espèce à évolution rapide</i>	14
<i>Structure de population et évolution de l'espèce</i>	15
3. Les souches de l'espèce <i>Oenococcus oeni</i>	16
3.1. Méthodes de typages	16
<i>PFGE</i>	17
<i>PCR - RAPD</i>	17
<i>AFLP</i>	18
<i>MLST</i>	18
<i>MLVA</i>	19

3.2.	Diversité des souches d' <i>O. oeni</i>	20
	<i>Diversité génétique des souches révélée par les analyses MLST</i>	21
	<i>Diversité des souches dans les régions et les exploitations</i>	21
4.	Souches indigènes et levains malolactiques.....	23
4.1.	Avantages et inconvénients	23
4.2.	Levains malolactiques	24
	<i>Sélection de souche</i>	24
	<i>Production et conditionnement</i>	25
4.3.	Fermentations spontanées	27
	<i>Contexte</i>	27
	<i>Besoins de la filière viticole</i>	27
MATERIELS ET METHODES		30
1.	Collection de travail et échantillonnage.....	30
1.1.	Souches d' <i>Oenococcus oeni</i>	30
1.2.	Régions et millésimes échantillonnés	30
2.	Isolement, culture et conservation	31
2.1.	Culture et isolement des bactéries lactiques.....	31
2.2.	Conservation des bactéries.....	32
2.3.	Préparation des souches sous forme congelée dans l'azote liquide	32
2.4.	Culture des levures et bactéries acétiques.....	32
3.	Mesure de la croissance bactérienne.....	33
3.1.	Mesure de la turbidité du milieu	33
3.2.	Dénombrement des colonies sur milieu solide	33
3.3.	Dénombrement des cellules viables par microscopie à épifluorescence.....	34
4.	Microvinifications	34
4.1.	Préparation du vin	35
4.2.	Préparation des lies post FML.....	35
4.3.	Mode d'inoculation des bactéries	35
-	L'inoculation directe	35
-	L'inoculation après acclimatation	36
-	L'inoculation avec des lies.....	36

4.4.	Suivi des fermentations	36
5.	Techniques de biologie moléculaire.....	36
5.1.	Méthodes d'extraction des acides nucléiques.....	36
5.2.	Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	39
5.3.	Séparation des acides nucléiques	41
5.4.	Génotypage des souches par la méthode MLVA.....	42
5.5.	Génotypage de SNP grâce au kit iPLEX Gold de Sequenom.....	44
6.	Analyses bioinformatiques et biostatistiques	47
6.1.	Comparaison d'une séquence nucléique avec des banques de données	47
6.2.	Analyses phylogénétiques.....	47
6.3.	Analyses biostatistiques : Indices de diversité.....	49
7.	Partenariats	50
7.1.	Entreprise de séquençage et de génotypage	50
7.2.	Contrôle qualité des lies et suivi des essais	51
7.3.	Collecte d'échantillons et essais terrains.....	51
	RESULTATS ET DISCUSSION.....	52
	CHAPITRE PREMIER, Echantillonnage de vins et cidre en cours de FML de six régions et isolement des colonies d' <i>O. oeni</i>	52
1.	Choix des vins et cidres analysés	52
2.	Echantillonnage.....	53
3.	Dénombrement des populations de bactéries lactiques.....	54
4.	Identification des colonies d' <i>Oenococcus oeni</i>	55
5.	Analyse des colonies « négatives » en MLVA	57
6.	Discussion.....	59
	CHAPITRE 2, Analyse de la diversité des souches d' <i>O. oeni</i> au cours de la FML par la méthode MLVA	63
1.	Analyse des produits de PCR multiplex-VNTR	63
2.	Analyse statistique de la représentativité des échantillonnages	64
3.	Détermination du nombre total de souches par région	66

4. Nombre de souches par échantillon en cours de FML, en fonction des régions ou des types de produits.....	66
5. Distribution des souches dans l'ensemble des régions	68
6. Diversité des souches dans chaque région	69
6.1. Aquitaine.....	69
6.2. Bourgogne.....	70
6.3. Languedoc-Roussillon et Côtes du Rhône.....	71
6.4. Liban.....	71
6.5. Val de Loire et Bretagne.....	72
7. Diversité des souches dans les exploitations.....	72
8. Diversité des souches dans les produits.	74
9. Discussion.....	75
CHAPITRE 3, Classement phylogénétique des souches	79
1. Séquençage des génomes et analyse phylogénétique	79
2. PCR spécifique des groupes A et B.....	80
3. Mise au point d'une méthode de génotypage par analyse de SNPs	82
4. Préparation des ADN génomiques et choix des souches pour l'analyse SNP.....	83
5. Analyse des résultats bruts de séquençage par Sequenom	84
6. Distribution des souches dans les groupes phylogénétiques	86
7. Groupes génétiques et origines géographiques des souches.....	87
8. Groupes génétiques et produits d'origine.	88
9. Discussion.....	90
CHAPITRE 4, Caractéristiques phénotypiques des souches de différents groupes phylogénétiques	95
1. Choix des souches.....	95
2. Survie à l'inoculation en milieu acide ou à forte teneur en éthanol	95
3. Croissance en milieu acide ou à forte teneur en éthanol.....	96
4. Survie à l'inoculation dans le vin et des capacités fermentaires	98
4.1. Conditions d'inoculations des souches.	98
4.2. Survie des souches 48h après inoculation	98
4.3. Capacités fermentaires	99
5. Discussion	101

CHAPITRE 5, Mise en œuvre des souches indigènes à l'échelle d'une exploitation: essais de micro-production de souches sélectionnées et d'utilisation de lies de FML	104
1. Mise au point et test d'un protocole de production de souches à petite échelle	104
1.1. Choix d'un protocole de préparation des souches sous forme congelée.....	104
1.2. Résistance des souches à la congélation	105
1.3. Essais des souches congelées comme levains malolactiques.....	106
2. Caractérisation et utilisation de lies fines de FML	107
2.1. Objectifs	107
2.2. Evolution de la population de bactéries lactiques durant la conservation des lies.....	107
2.3. Evolution de la diversité des souches d' <i>O. oeni</i> au cours de la conservation des lies....	108
2.4. Capacité fermentaire des lies conservées	109
2.5. Effet des lies sur la réalisation de la FML.....	110
3. Discussion.....	112
CONCLUSION GENERALE	114
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	117
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	132
ANNEXES.....	134

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Evolution de la population de bactéries lactiques et d'*O. oeni* durant la vinification.
- Figure 2.** Modèle de génération d'ATP par la transformation de l'acide malique en acide lactique.
- Figure 3.** Schématisation des modifications biochimiques intervenant pendant la fermentation malolactique et sur le métabolisme d'*O. oeni*.
- Figure 4.** Position phylogénétique de l'espèce *Oenococcus oeni* par rapport aux autres bactéries lactiques.
- Figure 5.** Position phylogénétique de l'espèce *Oenococcus kitaharae*.
- Figure 6.** Présence et absence des gènes *mutS* et *mutL* chez les bactéries lactiques.
- Figure 7.** Arbre phylogénétique présentant les différents sous-groupes de l'espèce *Oenococcus oeni*.
- Figure 8.** Localisation géographique des sites de prélèvements en France et au Liban.
- Figure 9.** Aspect des billes de suspensions après congélation dans l'azote liquide.
- Figure 10.** Visualisation des chromatogrammes de MLVA par le logiciel GenMarker (SoftGenetics).
- Figure 11.** Processus de réalisation du génotypage de SNP par le kit iPLEX™ (Sequenom).
- Figure 12.** Dispositif Sequenom pour le génotypage par SNP.
- Figure 13.** Visualisation des résultats du génotypage d'une micropuce par le logiciel MassARRAY Typer Software (Sequenom).
- Figure 14.** Localisation géographique des sites de prélèvements en France.
- Figure 15.** Localisation géographique des sites de prélèvements au Liban.
- Figure 16.** Evolution des souches d'*O. oeni* au cours de la vinification.
- Figure 17.** Nombre de colonies par souche d'*O. oeni*.
- Figure 18.** Indice de diversité de Shannon-Weaver en fonction des échantillonnages réalisés dans 4 régions viticoles.
- Figure 19.** Diversité des souches en fonction du nombre de colonies analysées dans 4 régions viticoles.
- Figure 20.** Nombre de souches d'*O. oeni* par échantillon.
- Figure 21.** Représentation en ACM des 514 souches d'*O. oeni* identifiées dans les 6 régions viticoles et cidricoles.
- Figure 22.** Nombre de souches identifiées dans une ou plusieurs régions viticoles françaises.
- Figure 23.** Représentation en ACM des 181 souches d'*O. oeni* identifiées en Aquitaine.
- Figure 24.** Représentation en ACM des 142 souches d'*O. oeni* identifiées en Bourgogne.
- Figure 25.** Représentation en ACM des 134 souches d'*O. oeni* identifiées dans le Languedoc-Roussillon.
- Figure 26.** Représentation en ACM des 57 souches d'*O. oeni* identifiées au Liban.
- Figure 27.** Représentation en ACM des 29 souches d'*O. oeni* identifiées dans le Val de Loire.

Figure 28. Représentation en ACM des 25 souches d'*O. oeni* identifiées dans les échantillons de cidre de Bretagne.

Figure 29. Représentation en ACM des souches d'une exploitation isolées au cours de 2 millésimes.

Figure 30. Nombre de souches identifiées par type de produit.

Figure 31. Répartition des souches de vins blancs et rouges dans les régions Bourgogne et Val de Loire.

Figure 32. Distribution phylogénétique des souches d'*O. oeni*.

Figure 33. Sélection des groupes de souches d'*O. oeni* pour le choix de SNP.

Figure 34. Arbre construit d'après l'alignement des 43 séquences types obtenues par génotypage de SNP.

Figure 35. Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques.

Figure 36. Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques et par région.

Figure 37. Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques et par exploitation.

Figure 38. Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques et par produit.

Figure 39. Survie de 22 souches d'*O. oeni* et *O. kitaharae* 48h après inoculation dans des milieux à différents pH et teneurs en alcool.

Figure 40. Suivi de la croissance des souches Lib 43.8 et LR35.12.

Figure 41. Survie de 10 souches d'*O. oeni* 48h après inoculation dans deux types de vins.

Figure 42. Cinétique de dégradation de l'acide malique de 10 souches dans un vin rouge et un vin blanc.

Figure 43. Mesure de la survie de 10 souches d'*O. oeni* à la congélation dans l'azote liquide.

Figure 44. Cinétique de dégradation de l'acide malique des souches congelées dans l'azote liquide.

Figure 45. Evolution de la population des bactéries lactiques dans les lies au cours de leur conservation.

Figure 46. Evolution des souches d'*O. oeni* dans les lies post-FML conservées à 10 °C.

Figure 47. Cinétique de dégradation de l'acide malique dans un vin inoculé avec des lies de FML.

Figure 48. Effet des lies de FML sur la cinétique de dégradation de l'acide malique.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales espèces de bactéries lactiques présentes dans le moût de raisin et les vins.

Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques et fermentaires requise pour la sélection d'un levain malolactique.

Tableau 3. Liste des amorces utilisées dans cette étude.

Tableau 4. Fluorochromes utilisés pour marquer les amorces pour la MLVA.

Tableau 5. Exploitations et échantillons collectés en cours de FML dans 6 régions.

Tableau 6. Identification des colonies de bactéries lactiques par PCR VNTR « *O. oeni* ».

Tableau 7. Caractéristiques des répétitions en tandem (TR) amplifiées chez 2 997 colonies d'*O. oeni*.

Tableau 8. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées par typage en PCR VNTR.

Tableau 9. Exemple de deux échantillons avec des colonies aux profils VNTR incomplets.

Tableau 10. Valeur de l'indice de diversité de Shannon Weaver (H') et de l'indice d'équité de Pielou (J') pour chaque région.

Tableau 11. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les vins des différentes appellations d'Aquitaine.

Tableau 12. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les vins des différentes appellations de Bourgogne.

Tableau 13. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les vins des différents départements du Languedoc-Roussillon.

Tableau 14. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les échantillons de vins du Liban.

Tableau 15. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les vins des différentes appellations du Val de Loire.

Tableau 16. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les échantillons de cidres bretons analysés.

Tableau 17. Diversité des souches dans les exploitations.

Tableau 18. Souches isolées au cours de deux millésimes consécutifs dans les mêmes exploitations.

Tableau 19. Nombre de colonies et de souches par type de produit et par région.

Tableau 20. Nombre de souches par type de produit et par région.

Tableau 21. Caractéristiques des séquences des 50 génomes de souches d'*O. oeni* publiées

Tableau 22. Application de la PCR spécifique « A/B » pour Identifier les groupes génétiques de 151 souches.

Tableau 23. Echantillons pour lesquels des souches des groupes B ont été identifiées.

Tableau 24. Analyse de 67 ADN totaux extraits de vins par « PCR A/B ».

Tableau 25. Nombre de SNP identifiés et sélectionnés pour la méthode Sequenom.

Tableau 26. Comparaison des 11 séquences des 40 SNP concaténés obtenues à partir des 50 génomes disponibles.

Tableau 27. Souches génotypées par la technique Sequenom.

Tableau 28. Exemples de SNPs et souches aberrants identifiés lors du contrôle des données de génotypage par le logiciel Typer Analyser.

Tableau 29. Liste des 43 séquences types différentes obtenues par analyse de 37 SNPs pour 577 souches et 50 génomes séquencés.

Tableau 30. Profils SNPs de souches non classées dans les groupes A ou B.

Tableau 31. Répartition des souches de chaque région dans les groupes génétiques.

Tableau 32. Résumé des résultats de la croissance des différents groupes de souches.

Tableau 33. Paramètres analytiques des deux vins utilisés pour les essais.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

ACM	Arbre Convrant Minimal
ADNr	AND Ribosomique
ADP	Adénosine Diphosphate
ADN	Acide Désoxyribonuléique
AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	Acide Ribosomique
ATP	Adénosine Triphosphate
BA	Bactéries Acétiques
BET	Bromure d’Ethidium
BL	Bactéries Lactiques
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CRB OENO	Centre de Ressources Biologiques Oenologique
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DMDC	Dicarbonate de Diméthyle
dNTP	Désoxyribonucléotide-5’-triphosphate
DO	Densité Optique
EDTA	Ethylène Diamine Tetra-acétate
FA	Fermentation Alcoolique
FML	Fermentation Malolactique
HiDi	Highly Deionized
IFPC	Institut Français des Productions Cidricoles
IFV	Institut Français de la Vigne et du Vin
LSA	Levures Sèches Actives
LT	Levure Totale
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry
MB	Mégabase
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis
MMR	Mismatch repair
NAD+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
OGM	Organisme Génétiquement Modifié
pb	Paire de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RAST	Rapid Annotations using Subsystems Technology
REA	Restriction Enzyme Analysis
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
RNase	Ribonucléase
s	Seconde
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

ST	Sequence Type
TAE	Tris-Acétate EDTA
TE	Tris-EDTA
TR	Tandem Repeat
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultraviolet
V/V	Volume par Volume
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat Analysis

INTRODUCTION

La transformation du raisin en vin nécessite l'action de deux types de microorganismes : premièrement des levures, principalement *Saccharomyces cerevisiae*, qui vont réaliser la fermentation alcoolique et deuxièmement des bactéries lactiques qui vont réaliser la fermentation malolactique (FML) du vin. C'est l'espèce *Oenococcus oeni* qui est responsable de la réalisation de la plupart des FML dans les vins rouges, certains vins blancs et champagnes. Cette étape est essentielle pour la qualité du vin et sa stabilité microbiologique. Depuis sa découverte dans les années 1960, de nombreuses études ont rapporté la grande diversité des souches d'*O. oeni* qui sont présentes dans les vins. Cette diversité se retrouve tant au niveau génétique, qu'au niveau phénotypique, avec des grandes variabilités de résistance aux paramètres du vin et des performances fermentaires des souches.

Les FML peuvent être réalisées spontanément grâce au microbiote indigène du raisin et du chai, ou bien en inoculant massivement le vin avec des souches de bactéries sélectionnées. Même si la majorité des FML spontanées se déroulent correctement, des retards ou des cinétiques fermentaires très lentes sont parfois observées et le recours à l'utilisation de levain malolactique est parfois indispensable. Toutefois, avec l'apparition de la viticulture et de la vinification biologique, le recours aux souches indigènes issues des exploitations apparaît comme une solution plus respectueuse du cru ou du terroir, bien qu'aucune étude scientifique n'ait déterminé à ce jour s'il existe bien des souches indigènes spécifiques des exploitations ou des régions.

C'est dans ce contexte que les travaux réalisés au cours de cette étude ont été menés. Le but était d'étudier la diversité des souches dans différentes régions vitivinicoles et de comparer la répartition des souches dans les régions pour mettre en évidence la présence ou non, de souches spécifiques. La finalité étant d'avoir une image plus exhaustive de la diversité de cette espèce et de savoir si la sélection de souches spécifiques était envisageable et présentait un réel intérêt en œnologie. Ce travail est partie intégrante d'un projet européen WildWine (FP7-SME-2012) et d'un projet national LevainBio (CASDAR AAP-2012 n°1220), visant à étudier la diversité du microbiote indigène des vins de plusieurs pays et régions. L'objectif étant de proposer des protocoles qui permettraient d'améliorer la

maîtrise des fermentations spontanées, par l'utilisation de pieds de cuves ou de souches indigènes sélectionnées.

Premièrement, nous avons rassemblé un grand nombre d'échantillons de vins de plusieurs régions vitivinicoles et quelques échantillons de cidres. Ces échantillons ont ensuite été analysés au laboratoire pour en isoler les colonies de bactéries lactiques et identifier les *O. oeni* afin d'avoir un échantillonnage représentatif des régions étudiées.

Deuxièmement, nous avons analysé les colonies par la méthode MLVA pour typer les souches d'*O. oeni*. Le but était de connaître la façon dont les souches se répartissaient dans chaque région et de pouvoir comparer toutes les régions analysées entre elles pour identifier les souches uniques aux régions ou aux produits.

Troisièmement, nous avons développé une nouvelle méthode de génotypage basée sur l'analyse de SNP spécifiques de groupes génétiques. Cette méthode avait pour but de classer les souches identifiées dans les groupes phylogénétiques déjà identifiés par d'autres méthodes et comparaisons de génomes. L'objectif était de voir si des souches rencontrées uniquement dans une région ou dans un type de produit seraient proches génétiquement.

Quatrièmement, nous avons réalisé des tests phénotypiques et des microvinifications pour comparer le comportement de souches isolées de produits différents et appartenant à des groupes génétiques différents. Le but était de voir s'il existait un lien entre des groupes génétiques et des caractéristiques phénotypiques ou fermentaires.

Enfin, une dernière partie a porté sur la mise en place de protocoles visant à améliorer la maîtrise des FML indigènes par la sélection de souches et leur production à petite échelle, mais aussi par l'utilisation de lies fines de FML. Le but était de proposer des protocoles simples et pouvant être facilement mis en œuvre au niveau des exploitations.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1. Principales espèces de bactéries lactiques présentes dans le moût de raisin et les vins (d'après Ribéreau-Gayon et al., 1998).

Espèce de bactéries lactiques	Caractère fermentaire	Morphologie
<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Hétérofermentaire facultatif	Bacilles
<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>	Hétérofermentaire obligatoire	
<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Homofermentaire	Coques
<i>Oenococcus oeni</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Hétérofermentaire	

1. Les bactéries lactiques du vin et la fermentation malolactique

1.1. Découverte et diversité des bactéries lactiques du vin

Louis Pasteur, en 1857, fut un des premiers à émettre l'hypothèse de l'existence des bactéries lactiques dans le vin, qu'il nommait « levures lactiques », en affirmant que « de même qu'il existe un ferment alcoolique, (...), de même il y a un ferment particulier, une levure lactique toujours présente quand du sucre devient acide lactique (...) ». Ses nombreux travaux sur le vin mirent en évidence l'implication de ces microorganismes dans de nombreuses altérations des vins (Louis Pasteur, 1866). De ce fait, le développement des bactéries lactiques fut considéré comme néfaste pour la qualité du vin pendant de nombreuses années. Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, avec les travaux de Müller – Thurgau (1891), et ceux de Koch (1900) et de Seifert (1901), que l'action des bactéries dans le phénomène de désacidification est mise en évidence. La réaction de décarboxylation de l'acide L-malique du vin en acide L-lactique et CO₂ est ensuite décrite dès 1913, par Müller – Thurgau et Osterwalder. Mais ce n'est que quelques années plus tard que Ferré (1922) ainsi que Ribéreau-Gayon (1936) et Peynaud (1946) ont mis en évidence l'intérêt de la fermentation malolactique pour l'amélioration de la qualité du vin et ont ainsi démontré le rôle bénéfique des bactéries lactiques du vin.

Les bactéries lactiques sont présentes en amont du processus de vinification, sur les baies de raisin (Peynaud and Domercq, 1961; Bae *et al.*, 2006), ainsi que sur les feuilles de la vigne (Radler, 1958). Elles sont également présentes dans les chais, sur l'équipement vinicole (Webb and Ingraham, 1960), dans les barriques (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975) et dans l'atmosphère des chais (Garijo *et al.*, 2008). Les espèces de bactéries couramment identifiées dans le moût et le vin appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus* (Tableau 1) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Elles sont différenciables par des critères morphologiques et leur caractère fermentaire vis-à-vis du glucose. Les espèces homofermentaires, comme *P. damnosus* et *P. pentosaceus* vont produire uniquement de l'acide lactique à partir du glucose, tandis que les espèces hétérofermentaires comme *L. brevis*, *L. mesenteroides* ou *O. oeni* vont produire en plus de l'acide lactique du CO₂, de l'éthanol et de l'acide acétique.

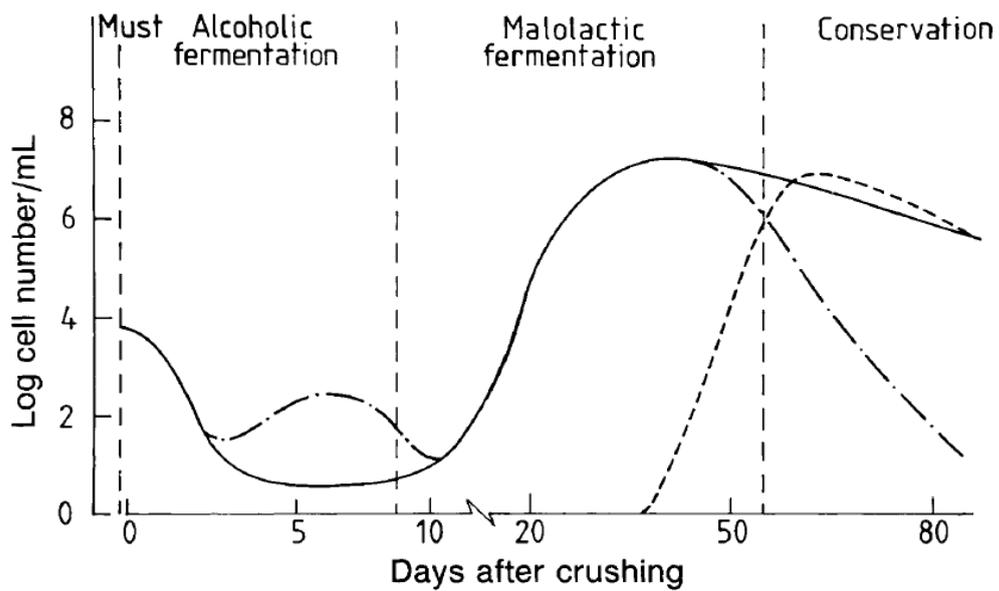


Figure 1. Evolution de la population de bactéries lactiques et d'*O. oeni* durant la vinification.

Les traits pleins représentent la croissance d'*O. oeni* à des pH inférieurs à 3,5. Les traits pleins avec des points représente la croissance des bactéries lactiques à des pH supérieurs à 3,5. Les traits pointillés représentent la croissance d'autres espèces de bactéries lactiques (D'après Wibowo *et al.*, 1985).

1.2. Evolution de la population des bactéries lactiques au cours de la vinification

La vinification débute par une phase où sont présentes un bon nombre d'espèces de bactéries lactiques apportées par la vendange et le matériel vinicole. Cette population, de l'ordre de 10^2 à 10^3 cellules/mL, prolifère pendant la macération des raisins et le début de la fermentation alcoolique (FA), pour atteindre un maximum de 10^4 - 10^5 cellules/mL (Figure 1). Le développement rapide des levures a pour conséquences l'appauvrissement du milieu en sucres fermentescibles, en acides aminés et vitamines, la libération de molécules inhibitrices des bactéries et l'augmentation du taux d'éthanol (Lafon-Lafourcade, *et al.*, 1983; King and Beelman, 1986). Ces modifications du moût vont provoquer une chute de la population des bactéries lactiques, jusqu'à ce que les conditions permettent à nouveau leur multiplication.

A la fin de la FA, les levures entament un processus d'autolyse. Elles vont libérer leur contenu cellulaire et enrichir le milieu en molécules telles que des acides aminés, des peptides, des mannoprotéines, des bases azotées et des vitamines (Arnold, 1981; Kelly-Treadwell, 1988). Le vin se charge de facteurs de croissance et devient favorable à la multiplication des bactéries lactiques, malgré la présence d'éthanol. La biomasse produite, va se développer en tirant son énergie de divers composés comme les acides aminés, les peptides, les sucres résiduels et surtout certains acides organiques comme l'acide malique (Schütz and Radler, 1973), l'acide citrique (Davis *et al.*, 1986) et parfois l'acide tartrique (Liu, 2002). Les bactéries ayant subsisté pendant la FA vont se développer jusqu'à atteindre une population de l'ordre de 10^7 cellules/mL. La population bactérienne est alors suffisante pour qu'une chute significative de la concentration en acide malique apparaisse, accompagnée d'une augmentation de la concentration en acide lactique. Cette étape correspond à la fermentation malolactique (FML). La population bactérienne stagne alors à ce niveau de population et, lorsque tout l'acide malique du milieu a été consommé, elle commence à diminuer lentement avec le temps si le vin n'est pas sulfité.

1.3. Les facteurs influençant la croissance des bactéries dans le vin

Plusieurs paramètres peuvent avoir un impact sur le développement des bactéries dans le vin pendant et après la FA. Certains sont directement liés à la composition initiale du moût.

La température

C'est un facteur déterminant qui peut parfois être modulé par le vinificateur. Une température d'environ 20°C est préconisée pour favoriser le développement des bactéries dans le vin, du moins dans les premiers jours. Il est aussi possible d'obtenir un bon développement avec des températures de l'ordre de 16 – 18 °C. En laboratoire, des températures supérieures, proches de 30°C, sont optimales pour la croissance des bactéries lactiques, mais, combinées à la présence d'éthanol, cette température élevée diminue leur viabilité. Ces deux paramètres ont un effet similaire sur la membrane des bactéries ; des températures élevées ou des forts taux d'alcool entraînent une dénaturation des protéines membranaires et perturbent l'agencement des lipides. A l'inverse, des températures basses rigidifient la membrane et limitent les échanges membranaires (Tourdot-Maréchal *et al.*, 2000; Chu-Ky *et al.*, 2005; Coucheney *et al.*, 2005).

Le pH

Les bactéries lactiques sont acidophiles et donc capables de se développer à des pH proches de 3,5. Cependant, chaque espèce possède sa propre tolérance. Le pH du vin n'est, en général, pas modifié par le vinificateur et dépend de l'état de maturité de la vendange. Il va jouer un rôle de sélection vis-à-vis des espèces présentes. A pH élevé (>3,5), les lactobacilles et les pédiocoques seront favorisés, tandis qu'à des pH plus acides, c'est l'espèce *Oenococcus oeni* qui sera prédominante (Wibowo *et al.*, 1985). En milieu acide, les bactéries doivent maintenir leur pH interne proche de la neutralité, ce qu'elles réalisent grâce aux (H⁺)-ATPases membranaires (Tourdot-Maréchal *et al.*, 1999; Fortier *et al.*, 2003).

La teneur en alcool

Les bactéries lactiques présentes dans le vin, sont naturellement tolérantes à l'alcool. Elles sont capables de se développer après la FA dans le vin à 10 – 12% d'éthanol,

certaines résistent même jusqu'à plus de 15%. Cette tolérance varie en fonction des espèces et des souches, mais dépend aussi des autres paramètres du vin (Britz and Tracey, 1990). La toxicité de l'éthanol s'applique essentiellement au niveau de la membrane, en augmentant la fluidité membranaire, qui peut générer une entrée de protons et une perte du contenu cytoplasmique (Ingram and Buttke, 1984; Graca Silveira *et al.*, 2002; Coucheney, *et al.*, 2005). Pour répondre à ce stress, les bactéries ont développé divers mécanismes pour ajuster leur composition membranaire. La synthèse de protéines chaperonnes, qui vont augmenter la rigidité membranaire en interagissant avec les phospholipides (Coucheney, *et al.*, 2005; Weidmann *et al.*, 2010), fait partie de ces mécanismes, tout comme l'augmentation du ratio protéines/lipides (Garbay and Lonvaud-Funel, 1996; Silveira *et al.*, 2003), ou la modification de certains acides gras membranaires (Teixeira *et al.*, 2002; Grandvalet *et al.*, 2008). L'adaptation des bactéries à la présence d'éthanol dans le milieu se fait progressivement pendant la FA.

Le SO₂

L'ajout de SO₂ au vin, pour son action antioxydante et antimicrobienne, est aussi un facteur qui peut inhiber les bactéries. Le sulfitage est généralement réalisé à la réception de la vendange, pour son action antioxydante et bactéricide, pour limiter la compétition avec les levures, et après la FML pour stabiliser complètement le vin. Les deux formes du SO₂ (libre et combiné) ont un effet sur les bactéries. La forme libre est la plus toxique si sa concentration dépasse les 15 mg/L (Guzzo *et al.*, 1998). Elle est capable de diffuser librement dans la cellule puis est convertie en SO₃²⁻. Les ions sulfites vont interagir avec les protéines et les acides nucléiques et inhiber des cofacteurs et les (H⁺)-ATPase membranaires, provoquant la mort cellulaire (Carreté *et al.*, 2006). La forme combinée affecte également les bactéries à partir de 30 mg/L, car elles sont capables de métaboliser des molécules combinées au SO₂ et de relarguer du SO₂ libre dans le milieu (Lafon-Lafourcade and Peynaud, 1974; Osborne *et al.*, 2006).

La température, le pH, la teneur en éthanol et la présence de SO₂, sont les paramètres affectant le plus la croissance des bactéries dans le vin, mais ce ne sont pas les seuls. Le développement des bactéries peut également être affecté par les carences en nutriments résultant du développement des levures. Les acides gras et peptides

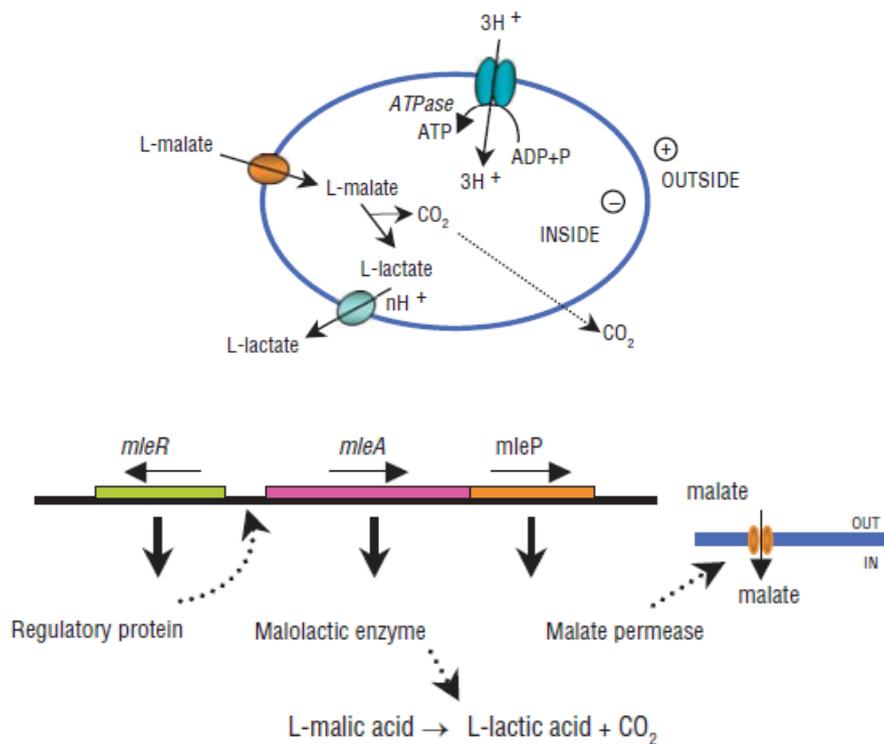


Figure 2. Modèle de génération d'ATP par la transformation de l'acide malique en acide lactique. L'opéron codant pour la voie métabolique est composé de deux gènes *mleA* et *mleP* et d'un régulateur *mleR*. Ils codent pour l'enzyme malolactique (*mleA*), la malate perméase (*mleP*) et un régulateur de transcription (*mleR*) (D'après Bartowsky, 2005).

antimicrobiens produits par les levures, de même que la composition phénolique du vin et la présence de pesticides, sont autant de facteurs qui peuvent freiner ou empêcher la croissance des bactéries lactiques (Bauer and Dicks, 2004).

1.4. La fermentation malolactique

Depuis sa découverte, la fermentation malolactique (FML) n'a cessé d'être étudiée, car elle représente une étape clé du processus d'élaboration de la majorité des vins rouges, de certains vins blancs de garde et des champagnes. La FML permet la désacidification, des modifications aromatiques et la stabilisation microbiologique des vins (Davis *et al.*, 1986; Lonvaud-Funel, 1999; Versari *et al.*, 1999; Liu, 2002; Bartowsky, 2005).

Intérêt de la fermentation malolactique pour la bactérie

La réaction de décarboxylation de l'acide L-malique fournit indirectement de l'énergie à la cellule. La translocation des molécules de malate (mono-anion) et de lactate, ainsi que la décarboxylation du malate, provoquent l'augmentation du pH intracellulaire et une différence de potentiel entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Ces deux facteurs vont générer une force proton motrice, dirigée de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, qui va permettre aux protons de rentrer dans la cellule via les (H⁺)-ATPase membranaires et conduire à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Figure 2) (Cox and Henick-Kling, 1989; Olsen *et al.*, 1991; Salema *et al.*, 1996; Konings *et al.*, 1997). De plus, durant la FML les bactéries peuvent maintenir leur pH intracellulaire sans hydrolyser de l'ATP et perdre de l'énergie (Salema *et al.*, 1996). Même si la décarboxylation de l'acide malique et les changements cellulaires qui en découlent ne permettent pas à la bactérie de couvrir totalement ses besoins énergétiques, leur apport n'est pas négligeable dans les conditions limitantes du vin (Bartowsky, 2005).

Intérêt de la fermentation malolactique pour la qualité du vin

Le principal intérêt de la FML est la diminution remarquable de l'acidité des vins. Selon les cépages, la maturité des raisins et les régions de production, la quantité d'acide malique du moût peut varier de 1 à environ 8 g/L. L'acide L-malique est un diacide qui apporte au vin une saveur dure et verte. Sa décarboxylation par l'enzyme malolactique va le

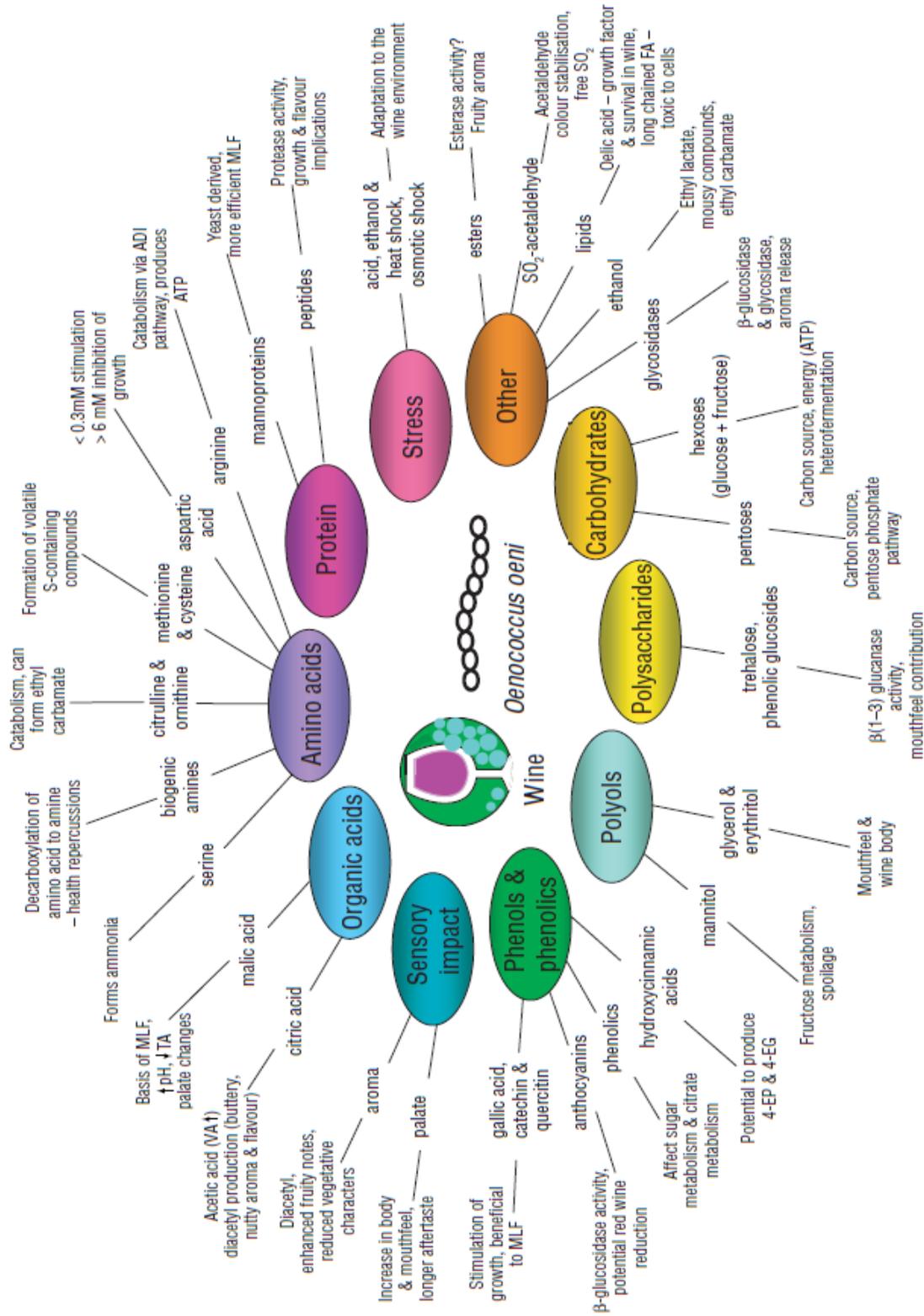


Figure 3. Schématisation des modifications biochimiques intervenant pendant la fermentation malolactique et sur le métabolisme d'*O. oeni* (D'après Bartowsky, 2005).

remplacer par de l'acide L-lactique au goût plus suave. La FML aura pour conséquence une diminution de l'acidité totale du vin, une augmentation de 0,1 à 0,3 unités de pH en moyenne et un assouplissement du vin (Davis *et al.*, 1985).

A cette désacidification du vin s'ajoute des modifications, au niveau de molécules participant à la flaveur du vin, qui peuvent améliorer ou déprécier la qualité finale du produit (Figure 3). La FML a été décrite comme améliorant le caractère fruité des vins et diminuant les notes végétales et herbacées (Liu, 2002). Les molécules qui participent à ces modifications sont les produits du métabolisme des bactéries, par exemple, le diacétyle, issu de la dégradation de l'acide citrique par les bactéries, est connu à faible concentration (<10mg/L) pour conférer des notes beurrées au vin, tandis qu'à des fortes concentrations il a un effet de masque sur d'autres arômes (Bartowsky and Henschke, 2004). D'autres molécules, issues de la réactivité avec des molécules du vin ou du métabolisme d'acides aminés, comme la cystéine ou la méthionine, ont été décrites comme contribuant aux notes de fruits rouges et des odeurs soufrées des vins (Marchand *et al.*, 2000; Pripis-Nicolau *et al.*, 2004; Swiegers *et al.*, 2005). La FML est également connue pour son rôle dans la libération, à partir du bois des barriques, de composés volatils tels que la vanilline ou l'eugénol (de Revel *et al.*, 2005; Bloem *et al.*, 2008)

Les modifications générées par la FML vont également avoir un impact sur la stabilisation microbiologique du vin. Le développement des bactéries lactiques va induire la dégradation de l'acide malique ainsi que la consommation des acides aminés, des vitamines et d'autres molécules utiles pour les bactéries. De plus, certaines souches de bactéries vont produire des bactériocines capables d'inhiber la croissance d'autres microorganismes (de Saad and de Nadra, 1993; Navarro *et al.*, 2000; Knoll *et al.*, 2008). Tous ces paramètres vont limiter la prolifération d'autres microorganismes et contribuent à la stabilisation du vin.

Altérations causées par des bactéries lactiques

Au-delà de leur effet bénéfique, les bactéries lactiques peuvent aussi nuire à la qualité des vins. Il existe peu de connaissances quant à leur action sur les composants de la couleur du vin, cependant il est connu qu'elles entraînent une altération de la couleur lors de la FML, ainsi qu'une diminution de la quantité de tanins et des anthocyanes libres (Ribéreau-

Gayon, 1974; Davis *et al.*, 1986). Néanmoins, le développement des bactéries lactiques dans le vin peut parfois conduire à des altérations plus graves des qualités sensorielles du vin et même le rendre impropre à la consommation. Certaines altérations avaient déjà été décrites par Pasteur en 1866, lors de son « Etude sur le vin ». Parmi elles, la piqûre lactique, due à l'augmentation de la concentration en acides lactique et acétique, l'amertume, causée par la dégradation du glycérol, ou encore la maladie de la tourne, due à la dégradation de l'acide tartrique. La production de certains exopolysaccharides, rendant les vins filants, fait également partie des altérations causées par les bactéries lactiques (Lonvaud-Funel and Joyeux, 1988; Walling *et al.*, 2005; Lonvaud-Funel, 1999). De plus, certaines souches de bactéries sont capables de produire dans le vin des molécules toxiques pour le consommateur, comme les amines biogènes. La consommation d'aliments contenant des fortes quantités d'amines biogènes peut causer des maux de têtes, des vomissements, de l'hypertension, ainsi que des palpitations cardiaques ou d'autres symptômes (ten Brink *et al.*, 1990; Santos, 1996; Shalaby, 1996). Dans le vin, les amines biogènes le plus souvent retrouvées sont l'histamine, la tyramine et la putrescine. Elles proviennent respectivement de la décarboxylation de l'histidine, de la tyrosine et de l'ornithine, ou de la désamination de l'agmatine pour la putrescine (Coton *et al.*, 1998, 2010; Lonvaud-Funel, 2001; Guerrini, *et al.*, 2002; Marcobal *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2008; Nannelli *et al.*, 2008). Néanmoins, les concentrations de ces amines dans les vins restent très inférieures à celles trouvées dans d'autres produits alimentaires, si bien que, malgré leur détection fréquente dans les vins et le risque lié à leur consommation, aucune réglementation n'existe en France et en Europe sur les teneurs en amines biogènes des vins.

2. L'espèce *Oenococcus oeni*

2.1. Découverte et description de l'espèce

Entre les années 1950 et 1960, plusieurs études ont décrit la présence dans le vin de bactéries à Gram positif en forme de coque (Bidan, 1956; Ingraham *et al.*, 1960; Peynaud and Domercq, 1961) qui ont été nommées *Leuconostoc oenos* (Garvie, 1967). Cependant, la comparaison du gène codant pour l'ARNr 16S a mis en évidence une forte divergence de zones conservées, entre *L. oenos* et toutes les autres espèces de *Leuconostoc* connues à

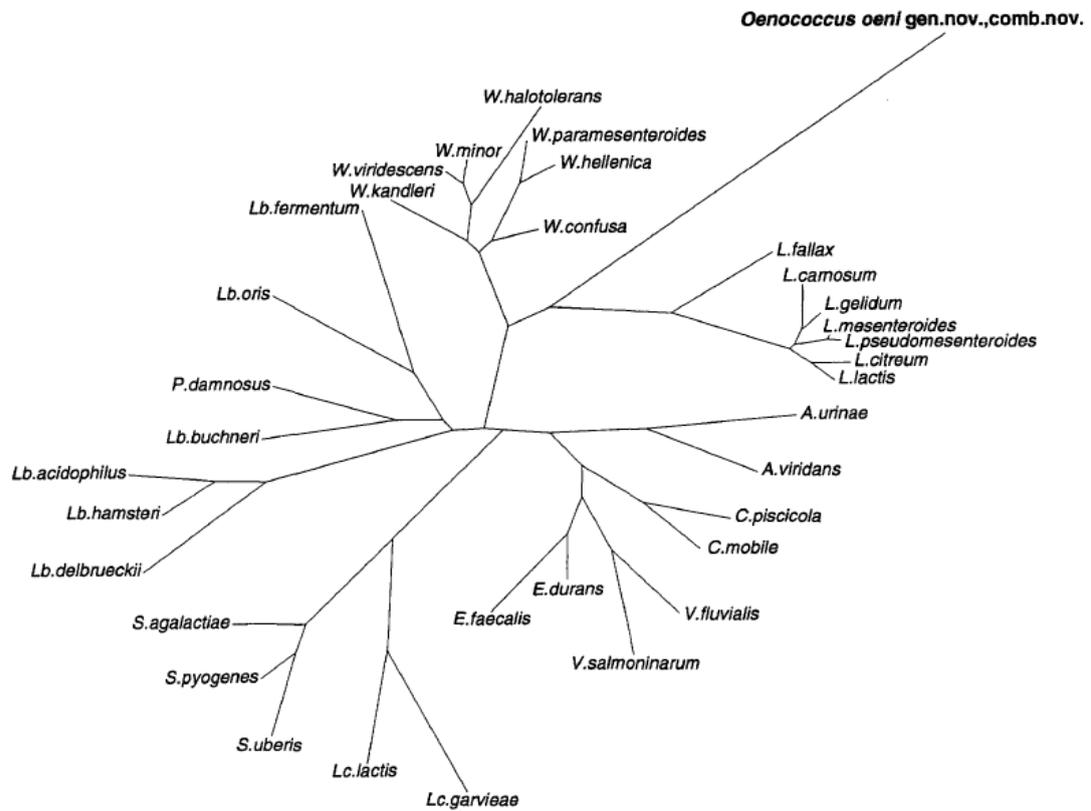


Figure 4. Position phylogénétique de l'espèce *Oenococcus oeni* par rapport aux autres bactéries lactiques. Arbre phylogénétiques non enraciné construit à partir de l'alignement des séquences d'ADNr 16S (D'après Dicks *et al.*, 1995).

cette époque. Le caractère acidophile de cette bactérie, ainsi que ces caractéristiques génétiques, suggéraient fortement l'appartenance de *L. oenos* à un autre genre (Figure 4) (Garvie and Farrow, 1980; Dicks *et al.*, 1990; Martinez-Murcia and Collins, 1990). Ce n'est qu'en 1995 que Dicks proposa de la reclasser en créant un nouveau genre, « *Oenococcus* », ne contenant qu'une seule espèce à l'époque : *Oenococcus oeni* (Dicks *et al.*, 1995).

L'espèce *O. oeni* appartient à la famille des bactéries lactiques, qui sont des bactéries à Gram positif, anaérobies facultatives non pathogènes. Le produit principal de la dégradation du glucose par ces bactéries est l'acide lactique. Elles ont été identifiées à la surface de fruits et légumes, dans le lait, les produits frais (tels que la viande et le poisson) et conservés, ainsi que dans de nombreux produits fermentés : fromage, pain, vin, cidre, choucroute... *O. oeni*, quant à elle, a été identifiée à la surface des baies de raisins, de pommes et de poires, ainsi que dans le vin et le cidre (Garvie, 1967; Bae *et al.*, 2006; Bridier *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2010).

Les cellules d'*O. oeni* sont en forme de diplocoque, parfois arrangées en chaînettes plus ou moins longues. Cette bactérie est acidophile et hétérofermentaire, capable de dégrader le glucose et donc de produire en plus de l'acide lactique, du CO₂, de l'éthanol et de l'acide acétique. Cette espèce est presque indétectable sur la baie de raisin sans passer par une étape d'enrichissement (Renouf *et al.*, 2006). Dans le moût en début de fermentation, on trouve une grande diversité d'espèces de bactéries lactiques, dont l'espèce *O. oeni* qui est présente à un niveau de population très faible. Cependant, au cours de la vinification, elle devient l'espèce majoritaire (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Fleet *et al.*, 1984; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991; Renouf *et al.*, 2007; Ruiz, *et al.*, 2010). Cette espèce est tolérante aux pH acides et à la présence d'éthanol (10 – 15%). Grâce à ces caractéristiques, elle est l'une des espèces les plus adaptées aux conditions difficiles du vin et celle qui, de ce fait, est responsable du déclenchement et de la réalisation de la FML de la plupart des vins (Versari *et al.*, 1999; Bartowsky, 2005). Ces qualités ont mené à la sélection de plusieurs souches (Torriani *et al.*, 2011) dans le but de produire des levains malolactiques pour contrôler au mieux le déroulement de la FML.

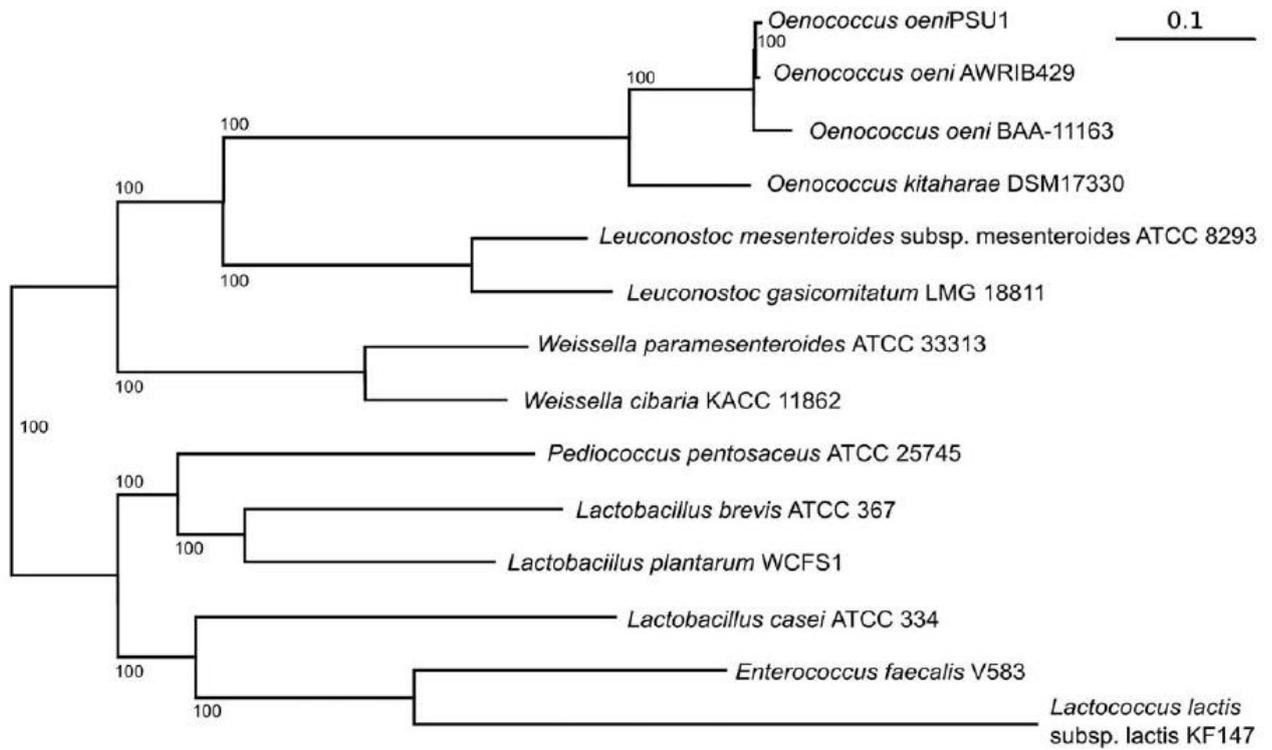


Figure 5. Position phylogénétique de l'espèce *Oenococcus kitaharae*. Arbre phylogénétique construit à partir d'un groupe conservé de 95 protéines (D'après Borneman *et al.*, 2012).

2.2. Autres espèces du genre *Oenococcus*

Pendant de nombreuses années, l'espèce *O. oeni* a été considérée comme une espèce «à part» parmi les bactéries lactiques, car le genre n'était représenté que par une seule espèce. Cependant, en 2006, des chercheurs japonais ont annoncé la découverte d'une nouvelle espèce de bactéries lactiques appartenant au genre *Oenococcus* (Endo and Okada, 2006). Les auteurs ont isolé des souches de bactéries lactiques à partir de résidus de distillation d'un alcool japonais : le Shochu. L'étude de séquences de l'ARN 16S a montré que les nouvelles souches avaient 96% de similarité avec la séquence de l'ADNr 16S d'*O. oeni*. L'hybridation avec l'ADN d'*O. oeni* montrait quant à elle un faible pourcentage d'hybridation (25-30%). Ces résultats indiquaient qu'il s'agissait d'une nouvelle espèce, proche d'*O. oeni*, que les auteurs ont nommé *Oenococcus kitaharae* (Figure 5) (Endo and Okada, 2006).

En 2008, Marcobal *et al.*, ont démontré que ces deux espèces ont un taux de mutation supérieur à celui des autres bactéries lactiques. Les auteurs ont également montré que, contrairement aux autres bactéries, *O. oeni* ne possède pas dans son génome les gènes *mutS* et *mutL*, responsables de la synthèse d'enzymes impliquées dans la correction des mésappariements de l'ADN. Ils n'ont pas non plus détecté ces gènes chez *O. kitaharae*. L'absence de ces deux gènes pourrait être à l'origine de l'évolution rapide et de la divergence du genre *Oenococcus* par rapport aux autres bactéries lactiques (Marcobal *et al.*, 2008).

Comme *O. oeni*, *O. kitaharae* est une bactérie lactique hétérofermentaire, dont la température optimale de croissance est de 30°C en laboratoire. Cependant, son pH optimum de croissance est de 6 à 6,8, contrairement à *O. oeni* qui est une bactérie acidophile (Dicks *et al.*, 1995). La comparaison du génome de la souche séquencée avec celui de la souche d'*O. oeni* de référence PSU-1, a révélé qu'*O. kitaharae* possède de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de défense cellulaire (production de bactériocines, systèmes de restriction-modification et un locus CRISPR) que ne possède pas *O. oeni* (Borneman *et al.*, 2012). Le génome d'*O. kitaharae* contient des gènes qui codent pour plusieurs voies métaboliques associées à la biosynthèse des acides aminés et

l'utilisation des glucides, qui ont des conséquences phénotypiques directes. Les différences les plus remarquables entre ces deux espèces sont l'incapacité d'*O. kitaharae* à transformer l'acide malique en acide lactique, et sa faible tolérance à l'éthanol. Borneman *et al.*, (2012) ont montré que l'absence d'activité malolactique est due à une mutation dans le gène de l'enzyme malolactique, qui conduit à la présence d'un codon stop prématuré. Il semblerait que ces deux espèces aient évolué différemment, *O. oeni* dans l'environnement stressant qu'est le vin et *O. kitaharae* dans un environnement plus riche en microorganismes, donc avec beaucoup de compétition microbienne, d'où la nécessité de mécanismes de défense cellulaire.

Récemment, une équipe de recherche brésilienne a isolé des souches de bactéries lactiques à partir de fermentation de jus de canne à sucre locale, destiné à la production de cachaça et de bioéthanol. Les ADNr 16S des souches isolées étaient similaires à 94,76% à celui d'*O. kitaharae* et à 94,62% à celui d'*O. oeni* (Badotti *et al.*, 2014). Des analyses *in silico* des séquences génomiques réalisées par les auteurs ont confirmé l'appartenance de ces souches à un nouveau taxon du genre *Oenococcus*, qu'ils ont nommé *Oenococcus alcoholitolerans*.

Cette nouvelle espèce n'est pas capable de métaboliser le D-tréhalose, contrairement à *O. oeni* et *O. kitaharae*, et à l'inverse elle métabolise le saccharose, que les deux autres espèces ne métabolisent pas. De plus, sa croissance est très ralentie à pH 4, contrairement à *O. oeni* qui se développe bien à des pH acides. Les auteurs ont séquencé le génome de l'une des 4 souches d'*O. alcoholitolerans* qu'ils ont isolé (UFRJ-M7.2.18^T). La taille du génome de cette espèce est de 1,2 MB, soit nettement plus petit que celui d'*O. oeni* (1,7 MB) et d'*O. kitaharae* (1,8 MB). L'analyse *in silico* a permis de vérifier la présence du gène codant pour l'enzyme malolactique qui est intact, comme pour *O. oeni*. Elle a donc la possibilité de dégrader l'acide malique, capacité que l'espèce *O. kitaharae* a perdue.

2.3. Phénotypes d'intérêt œnologique

Dès lors que l'intérêt de la réalisation de la FML pour la qualité du vin a été démontré, une tendance vers l'étude et la sélection de souches permettant de mener à bien

ce processus s'est développée. Les souches de l'espèce *O. oeni* présentent une grande variabilité d'adaptation au vin et de performances fermentaires (Beelman *et al.*, 1977). Certaines souches peuvent supporter des températures basses, d'autres sont sensibles aux pH acides ou à des forts taux d'éthanol ou encore à la présence de SO₂ (Izuagbe *et al.*, 1985; Davis *et al.*, 1988; Henick-Kling *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 2001; Zapparoli *et al.*, 2012). L'espèce montre également des différences de comportement vis-à-vis des acides gras (Lonvaud-Funel *et al.*, 1988; Guerrini, *et al.*, 2002; Carreté *et al.*, 2006; Renouf and Favier, 2010) ou vis-à-vis des bactériophages (Arendt *et al.*, 1991; Poblet-Icart *et al.*, 1998). D'autres paramètres varient également entre les souches : la composition en acides gras de leur paroi, la capacité à métaboliser certains acides gras (Guerrini *et al.*, 2003); la synthèse de différents types d'exopolysaccharides (Ciezack *et al.*, 2010; Dimopoulou *et al.*, 2012, 2014) ou encore la production d'amines biogènes (Lonvaud-Funel, 2001; Guerrini, Mangani, *et al.*, 2002; Coton *et al.*, 2010).

La particularité la plus importante d'un point de vue œnologique, est bien entendu la capacité des souches à survivre dans le vin et à métaboliser l'acide L-malique le plus rapidement possible (Cappello *et al.*, 2008, 2010). De ce fait, de nombreuses études ont été réalisées dans le but de comparer la résistance des souches au vin et leur capacité à réaliser la FML afin de sélectionner les meilleures candidates pour la production de levains malolactiques. Certaines souches possédant des bonnes caractéristiques technologiques dans un type de vin, pourraient être incapables de se développer dans un vin différent (Coucheney *et al.*, 2005; Capozzi *et al.*, 2010; Solieri *et al.*, 2010).

A la capacité des souches à réaliser la FML et à survivre dans le vin, s'ajoutent d'autres phénotypes qui sont intéressants en vinification, comme notamment l'impact sur le profil aromatique des vins. Ces modifications aromatiques ne sont pas dues uniquement à la transformation de l'acide malique, de nombreuses autres modifications peuvent survenir et diffèrent en fonction des souches d'*O. oeni* (de Revel *et al.*, 1999; Ugliano *et al.*, 2003; Vestner *et al.*, 2011; Malherbe *et al.*, 2012). En effet, des auteurs ont mis en évidence une variabilité des activités enzymatiques de type glycosidases et estérases selon les souches (Bloem *et al.*, 2008; Vallet *et al.*, 2008). Ces activités permettent de libérer des composés glycosylés issus du raisin ou du bois de chêne. Même si les conditions œnologiques ne

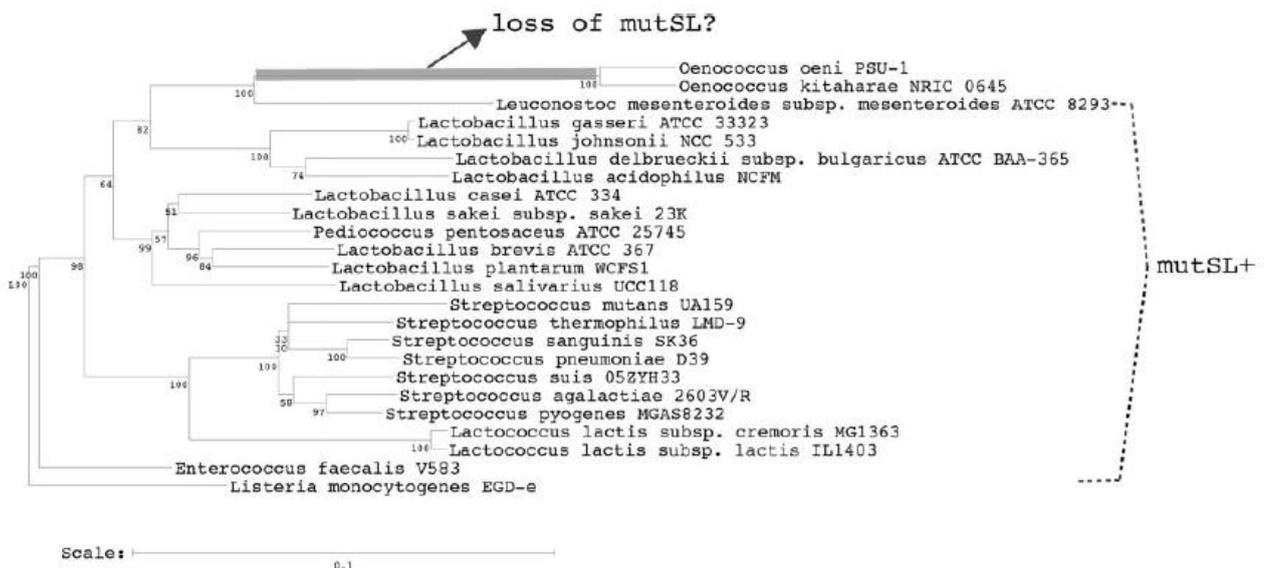


Figure 6. Présence et absence des gènes *mutS* et *mutL* chez les bactéries lactiques. L'arbre phylogénétique est construit à partir des séquences des gènes de l'ADNr 16S (D'après Marcobal *et al.*, 2008).

correspondent pas aux conditions optimales d'activité de ces enzymes, certaines souches conservent une activité non négligeable dans le vin (Barbagallo *et al.*, 2004; de Revel *et al.*, 2005; Grimaldi *et al.*, 2005; Matthews *et al.*, 2007; Gagné *et al.*, 2011; Knoll *et al.*, 2011; Antalick *et al.*, 2012; Pérez-Martín *et al.*, 2012). La production de diacétyl, molécule responsable de la note beurrée des vins, à partir de l'acide citrique est, de même, très variable en fonction des souches qui réalisent la FML (Martineau and Henick-Kling, 1995). Malgré les résultats de ces différents travaux, les connaissances sur l'impact aromatique des souches d'*O. oeni*, qu'il soit positif ou négatif, sont encore très limitées par rapport à celles acquises sur l'impact aromatique des souches de levures sélectionnées pour réaliser la FA (Bartowsky and Borneman, 2011; Malherbe *et al.*, 2012).

2.4. Caractéristiques génétiques de l'espèce *Oenococcus oeni*

Espèce à évolution rapide

Bien avant la séparation d'*O. oeni* du genre *Leuconostoc*, cette espèce constituait une exception dans l'embranchement des *Leuconostoc*, par ses caractéristiques phénotypiques et moléculaires (Garvie, 1967; Garvie and Farrow, 1980). La divergence de son gène d'ARN 16S, par rapport à celui des autres bactéries lactiques, suggérait qu'il s'agissait d'une espèce à évolution rapide (Yang and Woese, 1989; Martinez-Murcia and Collins, 1990). Le séquençage du génome de la souche PSU-1, en 2005, a permis d'apporter une explication à ce phénomène. En effet, sa comparaison avec les génomes de bactéries lactiques d'autres espèces a mis en évidence l'absence des gènes *mutS* et *mutL*, qui sont également absents chez l'espèce *O. kitaharae* (Figure 6) (Mills *et al.*, 2005; Makarova and Koonin, 2007; Marcobal *et al.*, 2008). Ces gènes codent des enzymes du système « MMR » (Mismatch repair), qui corrigent les mésappariements et limitent le taux de mutations spontanées et d'évènements de recombinaison. Leur absence chez les bactéries est très rare et corrélée à une élévation du taux de mutations et à une grande diversité génétique (Prunier and Leclercq, 2005). Marcobal *et al.*, (2008) ont qualifié le génome d'*O. oeni* d'hypermutable. La perte de ces deux gènes chez les deux espèces du genre *Oenococcus* est en adéquation avec la divergence et l'évolution rapide de ce genre. Les auteurs suggèrent

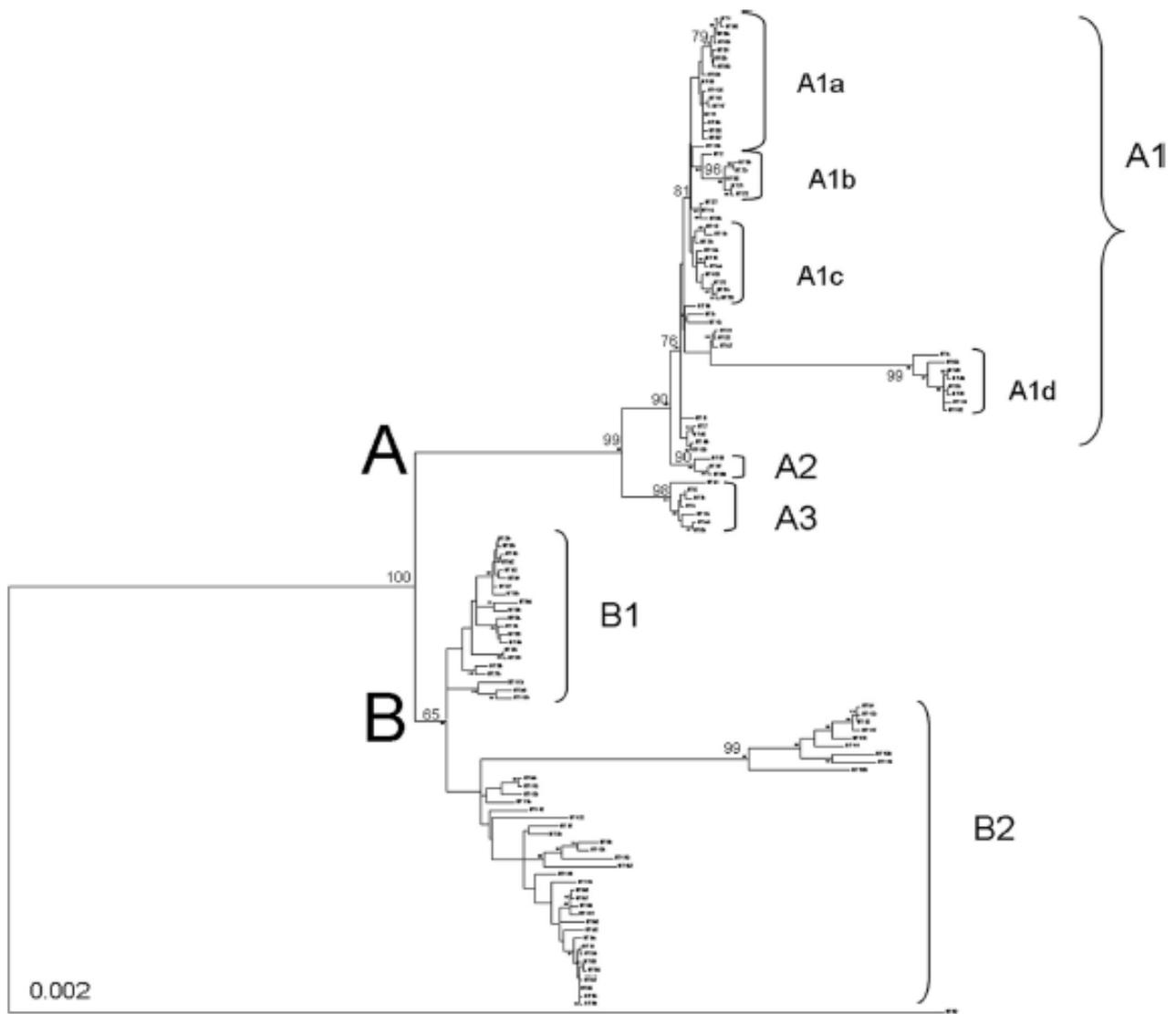


Figure 7. Arbre phylogénétique présentant les différents sous-groupes de l'espèce *Oenococcus oeni*. L'arbre a été construit selon la méthode Neighbor-joining à partir de 127 séquences types concaténées de 7 gènes de ménage (D'après Bridier *et al.*, 2010).

que ce statut hypermutable a grandement contribué à l'adaptation d'*O. oeni* aux conditions particulières du vin (Marcobal *et al.*, 2008).

Structure de population et évolution de l'espèce

La différenciation des souches de l'espèce *O. oeni* était une nécessité pour étudier sa diversité, mais également pour être en mesure de reconnaître les souches industrielles et de suivre leur développement lors de la vinification. Une grande partie des premières études de diversité, s'est basée sur le séquençage des ADN ribosomiaux ou leur digestion par des enzymes de restriction. Elles ont révélé une grande conservation de ces régions parmi les souches, ce qui indiquait que l'espèce était très homogène (Yang and Woese, 1989; Martinez-Murcia and Collins, 1990; Martinez-Murcia *et al.*, 1993; Zavaleta *et al.*, 1996; Le Jeune and Lonvaud-Funel, 1997). L'homogénéité au sein de l'espèce a par ailleurs été confirmée par des PCR RAPD (Zavaleta *et al.*, 1997), des expériences d'hybridations d'ADN, ainsi que des comparaisons de cartes génétiques des souches PSU-1 et GM (Dicks *et al.*, 1990; Zé-Zé *et al.*, 2000). Les différents résultats indiquaient clairement que les souches d'*O. oeni* représentaient un groupe phylogénétique très proche, ce qui correspondrait à l'évolution d'une lignée clonale, qui se serait adaptée aux conditions particulières du vin.

Le développement de méthodes moléculaires plus performantes a permis de discriminer plus précisément les souches. Ainsi l'utilisation de techniques de typage moléculaire comme la PCR multiplexe-RAPD, la REA – PFGE ou la MLST, a révélé une grande hétérogénéité des souches d'*O. oeni* (Kelly *et al.*, 1993; Zapparoli *et al.*, 2000; de las Rivas *et al.*, 2004; Larisika *et al.*, 2008; Cappello *et al.*, 2008). Ces méthodes permettent aussi d'étudier la phylogénie des souches analysées. Une première étude basée sur l'analyse MLST de 18 souches a conduit les auteurs (de las Rivas *et al.*, 2004) à émettre l'hypothèse d'une population panmictique, c'est-à-dire qu'aucune relation de filiation n'est détectable entre les souches, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse d'évolution clonale premièrement proposée. Cependant, d'autres études ont montré que l'espèce *O. oeni* est constituée de deux sous-populations. Même si à l'origine l'espèce avait été décrite comme très homogène, une séparation des souches en deux sous-populations avait déjà été mentionnée à plusieurs reprises, dès 1968 (Peynaud and Domercq, 1968; Tenreiro *et al.*, 1994; Zavaleta *et al.*, 1997). La présence de ces deux groupes phylogénétiques est

maintenant confirmée grâce aux études de diversité réalisées par MLST (Figure 7) (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010). Il semblerait que des évènements de recombinaison et de transferts horizontaux sont à l'origine de la séparation de ces deux groupes. Cependant l'état actuel de la population ne s'explique pas par une seule de ces hypothèses. En effet, aucun évènement de recombinaison n'a été observé entre les deux sous-groupes, il semblerait donc que ces deux sous-populations évoluent séparément sans échanger de matériel génétique.

On sait aujourd'hui que l'espèce est constituée d'au moins 2 groupes génétiques majeurs, désignés A et B. Ils correspondent principalement à des groupes de souches isolées de vin (groupe A) et de cidre (groupe B), bien que plusieurs souches de vin soient également présentes dans le groupe B (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010). Bridier *et al.*, (2010) ont également mis en évidence certains sous-groupes phylogénétiques en rapport avec l'origine géographique et/ou le type de produit dont sont issues les souches (Bridier *et al.*, 2010). Par exemple, les souches isolées de cidre appartiennent quasiment toutes au groupe B, alors que les souches de Champagne ou du Chili forment chacune un sous-groupe spécifique à l'intérieur du groupe A. Cette séparation des souches en deux groupes en fonction de la niche écologique vin/cidre concorde avec l'évolution séparée des deux sous-populations.

3. Les souches de l'espèce *Oenococcus oeni*

L'intérêt œnologique de cette espèce a conduit à étudier sa diversité, souvent dans le but de sélectionner les souches les plus performantes pour la vinification. La mise au point de méthodes permettant d'identifier ces souches, de les différencier les unes des autres et de suivre leur développement s'est révélée nécessaire. L'exploration de la diversité des souches d'*O. oeni* s'est donc déroulée en deux phases, la première correspond à la mise au point de méthodes de biologie moléculaire permettant de différencier et d'identifier des souches, la deuxième est l'utilisation de ces méthodes pour analyser la diversité des souches.

3.1. Méthodes de typages

Jusqu'à la fin des années 1980, la différenciation des souches d'*O. oeni* était principalement basée sur des critères morphologiques, métaboliques et physiologiques. Les

isolats d'*O. oeni* étaient sélectionnés selon leur caractères Gram +, catalase – et leur capacité à dégrader différents sucres. Des tests physiologiques permettaient ensuite de différencier les souches en fonction de leur comportement vis-à-vis de différents paramètres d'intérêt en œnologie, à savoir, la croissance à des pH inférieurs à 4, en présence d'au moins 10 % d'éthanol, en présence de SO₂ et à des températures froides et la capacité à dégrader l'acide malique (Peynaud and Domercq, 1968; Fleet *et al.*, 1984; Izuagbe *et al.*, 1985; Henick-Kling *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1991). La caractérisation phénotypique étant fastidieuse et ne permettant pas d'identifier avec certitude une souche ou de suivre sa croissance durant une vinification en présence d'autres souches, de nouvelles méthodes ont été développées dès l'apparition de la biologie moléculaire, pour y remédier. Le début des années 1990 a donc été marqué par l'apparition de diverses méthodes de biologie moléculaire au service de l'identification des bactéries lactiques du vin.

PFGE

En 1993 et 1994, plusieurs auteurs ont publié l'utilisation de la technique REA-PFGE, ou électrophorèse en champs pulsé, après digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (Restriction Enzyme Analysis – Pulsed-field Gel Electrophoresis), pour l'identification des isolats d'*O. oeni* et la discrimination des souches (Daniel *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1993; Lamoureux *et al.*, 1993; Tenreiro *et al.*, 1994). Cette méthode a dans un premier temps été testée sur des panels de souches de diverses origines pour valider son pouvoir discriminant, puis son utilisation s'est généralisée pour la discrimination de nouveaux isolats de vin (Zapparoli *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001; Guerrini *et al.*, 2003; Larisika *et al.*, 2008). Elle est devenue la méthode de référence pour typer les souches, avec quelques modifications au fil des années, qui concernaient surtout les enzymes de restriction utilisées. Actuellement *Apal*, *NotI* et *SfiI* sont les plus répandues. Néanmoins, cette méthode est longue et coûteuse à mettre en œuvre et les données obtenues sont difficilement comparables d'un laboratoire à un autre.

PCR - RAPD

Toujours dans les années 1990, une deuxième méthode de typage des souches d'*O. oeni* a été développée, la PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Zavaleta *et al.*, 1997). Cette méthode consiste à réaliser une PCR qui amplifie des fragments de façon

aléatoire sur le chromosome bactérien, grâce à des amorces aspécifiques. Les premiers auteurs (Zavaleta *et al.*, 1997) avaient testé cette méthode sur diverses souches provenant de plusieurs pays, mais le pouvoir discriminant de cette méthode s'est révélé être assez faible. Cette conclusion contraste avec celle d'autres études qui ont montré que le pouvoir discriminant de cette technique était égal et parfois supérieur à celui de la méthode PFGE (Zapparoli *et al.*, 2000; Bartowsky *et al.*, 2003; Reguant and Bordons, 2003; Reguant *et al.*, 2005). Cette technique est moins reproductible que la PFGE car les résultats dépendent de la qualité de la matrice ADN utilisée, des conditions PCR et de la migration, mais elle présente l'avantage d'être beaucoup plus simple et rapide à réaliser. La mise au point d'une PCR multiplexe RAPD a permis d'augmenter la reproductibilité de cette méthode en conservant un fort pouvoir discriminant (Reguant and Bordons, 2003).

AFLP

La méthode AFLP est basée sur le polymorphisme de longueur de fragments d'amplification (Amplification Fragment Length Polymorphism). Cette méthode développée en 1995 a été mise au point pour pallier les difficultés rencontrées lors d'amplifications aléatoires (Vos *et al.*, 1995). Elle a été appliquée pour la première fois pour l'espèce *O. oeni* en 2008 (Cappello *et al.*, 2008). Son protocole se résume en 3 étapes : 1/ digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction et fixation d'adaptateurs aux extrémités des sites de restriction, 2/ amplification sélective de fragments de restriction, 3/ analyse des produits d'amplification. La particularité de la méthode réside dans les amorces utilisées, qui possèdent 1 à 3 nucléotides supplémentaires, ce qui permet de diminuer le nombre de fragments amplifiés et de générer des profils comprenant de 50 à 100 fragments. Cette technique possède un fort pouvoir discriminant au niveau des espèces et des sous-espèces et est fréquemment utilisée pour comparer des populations bactériennes (Bleas *et al.*, 1998). Pour *O. oeni*, la méthode a été développée avec 3 enzymes de restrictions et les couples d'amorces correspondants (Cappello *et al.*, 2008). Cette méthode n'a cependant pas été testée en comparaison avec une autre méthode sur un même panel de souches pour connaître réellement son pouvoir discriminant sur les souches d'*O. oeni*.

MLST

Un inconvénient des méthodes PFGE et RAPD est la nécessité d'utiliser des gels d'agarose pour observer les résultats, ce qui ne facilite pas le transfert et la comparaison de

données entre laboratoires. En 2004, de las Rivas *et al.*, mettent au point une nouvelle méthode de typage d'*O. oeni*, la MLST (Multilocus Sequence Typing) qui a été développée à l'origine pour le typage de bactéries pathogènes (Maiden *et al.*, 1998). Le principe de cette méthode est de séquencer plusieurs loci, dans le cas d'*O. oeni* des gènes de ménage, pour obtenir une combinaison d'allèles qui sera propre à chaque souche. On utilise des gènes de ménage pour les études de population, car ils sont supposés être stables au niveau évolutif et sont présents chez tous les individus. Ils permettent ainsi d'étudier à la fois la diversité et la phylogénie des souches d'une espèce. La première étude d'*O. oeni* à l'aide de la MLST fut basée sur le séquençage de 4 gènes de ménage et du gène de l'enzyme malolactique et testée sur un panel de 18 souches (de las Rivas *et al.*, 2004). Malgré le faible nombre d'individus analysés, les résultats ont révélé un important polymorphisme de séquence sur les gènes de ménage (7 à 36 mutations par gène, d'une souche à l'autre) et un grand nombre d'allèles permettant d'identifier chaque souche par un génotype distinct.

En 2009, Bilhère *et al.*, ont proposé une amélioration de la méthode en analysant 8 gènes de ménage et ils ont analysé sur un panel de 43 souches de diverses origines géographiques et de différents produits (Bilhère *et al.*, 2009). Les résultats obtenus ont révélé une grande diversité génétique intraspécifique de l'espèce et montré pour la première fois que la population est structurée en deux groupes phylogénétiques, nommés A et B. Ces résultats ont été confirmés par une deuxième étude de MLST basée sur 7 gènes de ménage et 250 souches, bien que les résultats aient également révélé l'existence d'une souche n'appartenant à aucun des groupes A et B (Bridier *et al.*, 2010). La méthode MLST possède un pouvoir discriminant au moins équivalent à la PFGE, et les résultats obtenus sont facilement échangeables entre laboratoires (Bilhère *et al.*, 2009). Cela en fait donc une méthode de choix pour les études de diversité. Néanmoins, ses inconvénients sont un coût relativement élevé et le temps considérable qu'il est nécessaire pour la réaliser.

MLVA

Récemment, en 2012, Claisse *et al.*, ont mis au point une méthode basée sur le polymorphisme du nombre de séquences répétées en tandem, MLVA (Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis). Cette méthode également désignée par VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), se base sur la présence, sur le chromosome

bactérien, de séquences d'ADN répétées en tandem, ces séquences pouvant avoir une taille de quelques paires de bases à quelques centaines de paires de bases. Le nombre de répétitions de chaque séquence est variable d'une souche à l'autre. L'analyse du nombre de répétitions de quelques une de ces séquences permet donc d'obtenir un profil numérique propre à chaque souche. Cette méthode est aujourd'hui très utilisée pour l'étude des bactéries pathogènes, comme *M. tuberculosis* ou *E. coli*, ou le suivi des épidémies (Frothingham and Meeker-O'Connell, 1998; Noller *et al.*, 2003; Malachowa *et al.*, 2005; Bustamante *et al.*, 2013). La méthode développée pour *O. oeni* permet l'analyse de 5 séquences répétées en tandem (TR) en réalisant 5 réactions d'amplification PCR, puis une électrophorèse capillaire. L'analyse MLVA a été testée par les auteurs sur une collection de 236 souches et s'est révélée plus discriminante que la REA-PFGE et la MLST (Claisse and Lonvaud-Funel, 2012). Cette méthode très discriminante présente également l'avantage d'être rapide, facile à réaliser et nettement moins coûteuse que la MLST. En 2014, les mêmes auteurs ont publié une amélioration de la technique permettant de multiplexer les PCR et de rendre l'analyse de taille plus précise en utilisant des amorces marquées (Claisse and Lonvaud-Funel, 2014). Néanmoins, bien qu'elle permette de différencier très efficacement les souches d'*O. oeni*, la MLVA ne permet pas de les positionner phylogénétiquement comme il est possible de le faire avec la MLST.

3.2. Diversité des souches d'*O. oeni*

Pour mettre au point les différentes méthodes de typage d'*O. oeni*, les auteurs ont toujours utilisé des panels de souches identifiées et en rajoutant parfois de nouveaux isolats de vin. L'intérêt étant de valider les méthodes et de prouver leur utilité pour des échantillons réels. Ces méthodes montrent donc la diversité des souches analysées, qui est une diversité biaisée, car le choix des souches est arbitraire et orienté pour représenter un maximum de diversité génétique, physiologique ou géographique. Néanmoins, la mise au point de ces méthodes a été la première étape vers l'étude de la diversité des souches d'*O. oeni*.

Diversité génétique des souches révélée par les analyses MLST

Comme indiqué précédemment, la diversité génétique des souches d'*O. oeni* a été caractérisée le plus précisément par des études basées sur des analyses MLST. La population est structurée en deux groupes génétiques, A et B, et une souche extérieure non-classée dans ces deux groupes (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010). Bilhère *et al.*, (2009) ont montré que les deux groupes étaient constitués de souches de diverses origines. Sur 43 souches analysées, 28 étaient classées dans le groupe A et 15 dans le groupe B. Elles avaient été isolées de vins rouges de différentes origines (France, Espagne, Italie, Grèce), de cidres et de champagnes. Des groupes génétiques spécifiques de souches isolées d'un même milieu ou d'une même région ont ensuite été mis en évidence par Bridier *et al.*, (2010) en analysant 258 souches provenant de vins de différentes appellations de France, du Chili, d'Afrique du Sud et d'Italie, en plus de souches isolées de cidre. En plus de la forte diversité génétique de la population, l'étude a révélé l'existence de sous-groupes phylogénétiques constitués de souches provenant du Chili, d'Afrique du sud ou encore de Champagne. De plus, les souches isolées de cidre appartenaient toutes à des sous-groupes du groupe génétique B. D'après les auteurs, plusieurs mutations semblaient spécifiques de certaines populations ou groupes phylogénétiques. En 2014, Gonzales-Arenzana ont publié une étude où ils combinaient les résultats d'analyse de PFGE et de MLST de souches d'*O. oeni* isolées de plusieurs exploitations et plusieurs millésimes. Les souches d'une même exploitation ont été classées dans différents groupes génétiques, de même un groupe génétique rassemblait des souches de plusieurs exploitations. Les auteurs ont souligné l'inconvénient de l'utilisation de la PFGE, trop longue à réaliser et dont les résultats sont difficilement échangeables, malgré son fort pouvoir discriminant et proposaient de s'orienter vers une approche combinée de deux méthodes.

Diversité des souches dans les régions et les exploitations

En plus des analyses globales, les différentes méthodes développées pour l'identification des souches ont été utilisées pour explorer la diversité de l'espèce à l'échelle d'une région, d'une exploitation ou d'une cuve. Des études ont été réalisées à partir d'échantillons provenant d'une ou plusieurs exploitations et d'un certain nombre de cuves, et ont analysé la diversité durant le processus de vinification, depuis la FA jusqu'à la FML.

La diversité des souches d'*O. oeni* a déjà été décrite à plusieurs niveaux : dans une seule exploitation (Reguant and Bordons, 2003; Ruiz *et al.*, 2008), ou plusieurs échantillons de quelques exploitations (Zapparoli *et al.*, 2000; Cappello *et al.*, 2008; Cañas *et al.*, 2009; Vigentini *et al.*, 2009; Cappello *et al.*, 2010; Solieri *et al.*, 2010; Marqués, 2011; Mesas *et al.*, 2011; Gonzalez-Arenzana *et al.*, 2012), ou même plus de 10 exploitations et différentes régions (Bartowsky *et al.*, 2003; López *et al.*, 2007; Marqués, 2011; González-Arenzana *et al.*, 2013). Une population hétérogène de souches est souvent présente dans une même cuve, au moment de la FML (Bartowsky *et al.*, 2003; Reguant and Bordons, 2003; Cappello *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2008; Mesas *et al.*, 2011; González-Arenzana *et al.*, 2012). Selon les fermentations et les vins analysés, la FML peut être dominée par un seul ou quelques génotypes différents (Cañas *et al.*, 2009; Gonzalez-Arenzana *et al.*, 2012), ou bien par plusieurs souches. Une étude réalisée par PFGE à partir de 41 échantillons de vins, a révélé la présence de 2 à 6 souches différentes dans une même cuve, pour la majorité des échantillons (López *et al.*, 2007; Solieri *et al.*, 2010). La diversité des souches rencontrées dans une fermentation est aussi rencontrée au niveau de plusieurs exploitations d'une même région.

En Espagne et en Italie, l'analyse de plusieurs échantillons de vins provenant de plusieurs exploitations d'une même région (Rioja et Apulia respectivement), montre la présence de plusieurs génotypes différents dans une même exploitation (López *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2008; Cappello *et al.*, 2010; González-Arenzana *et al.*, 2012). Certains sont présents uniquement dans une exploitation, d'autres ont une plus large distribution (López *et al.*, 2007). De plus, si une souche est identifiée dans les vins de plusieurs exploitations, sa proportion varie selon les exploitations (González-Arenzana *et al.*, 2012). Les différentes pratiques de vinification, les conditions de macération, les différents cépages, les températures de fermentations, semblent avoir une influence sur la diversité des souches durant la FML (Cappello *et al.*, 2008; Vigentini *et al.*, 2009; Cappello *et al.*, 2010; Gonzalez-Arenzana *et al.*, 2012; Zapparoli *et al.*, 2012). Une étude menée sur 10 exploitations, sur une durée de 2 ou 3 ans, a permis d'isoler et de typer plus de 900 isolats d'*O. oeni*, pendant la FA et la FML (González-Arenzana *et al.*, 2013). L'analyse de ces isolats a montré que le type de vin ainsi que les conditions d'élaboration influençaient la population de bactéries lactiques,

mais aussi la proportion des souches présentes. De même, dans d'autres études, les résultats montraient la présence de plusieurs souches différentes dans une même FML, avec des proportions différentes de la même souche présente sur plusieurs millésimes (González-Arenzana *et al.*, 2013).

Toutes ces études ont un point commun, l'analyse de la diversité de la population d'*O. oeni* présente au moment de la FML. Cependant, l'utilisation de techniques de typage différentes rend impossible la comparaison des études entre elles. Pas moins de 5 méthodes de typage différentes ont été utilisées. Il est donc impossible de comparer les résultats de différentes régions d'un même pays et encore moins d'avoir une vision exhaustive de la diversité de l'espèce malgré toutes ces études. De plus, peu d'études se sont intéressées à la structure de population de l'espèce. La construction de dendrogrammes à l'aide des données des analyses de diversité a souvent servi d'illustration à l'hétérogénéité de la population, sans intégration d'autres données de souches connues, pour pouvoir comparer la proximité des souches de plusieurs régions. Il est donc difficile de conclure que des souches isolées sont spécifiques d'une région, si aucune comparaison n'est réalisée avec des souches isolées d'autres régions.

4. Souches indigènes et levains malolactiques

4.1. Avantages et inconvénients

Les fermentations malolactiques peuvent être réalisées spontanément par le microbiote indigène du moût. Cependant, le déroulement de cette étape cruciale en vinification ne peut être totalement maîtrisé par le vinificateur. Le déclenchement de la FML ainsi que sa durée dépendent directement de la quantité de biomasse d'*O. oeni* présente qui dépend elle-même de plusieurs facteurs du vin : le pH, l'alcool, la concentration en acides organiques et d'autres facteurs de croissance et la température (Davis *et al.*, 1985; Wibowo *et al.*, 1988). La majorité des FML se déroulent de manière satisfaisante, mais des conditions défavorables ou une population de bactéries indigène trop faible peuvent se traduire par des déclenchements tardifs de la FML ou des fermentations languissantes. Le retard dans le

Tableau 2. Caractéristiques phénotypiques et fermentaires requises pour la sélection d'un levain malolactique (D'après Torriani *et al.*, 2011).

Categories	Property
Stress resistance	Resistance to high levels of ethanol (14% v/v)
	Tolerance to pH 3.0
	Resistance to high SO ₂ concentrations
	Resistance to low temperatures
	Bacteriophages resistance, not lysogenic
Technological performances	High malolactic activity
	Ability to perform MLF in different types of wine
	Satisfactory growth in a synthetic medium
	Production of desirable flavours or enhancement of fruity aromas
	Low acetic acid production at the pH of grape juice and wine
	No production of ropo polysaccharides
	No production of off-flavours
	Compatibility with the yeast used for the alcoholic fermentation
Can be freeze-dried	
Safety	No production of biogenic amines
	No production of ethyl carbamate
	Inability to transmit antibiotic resistance genes

déclenchement de la FML et la stabilisation du vin laissent l'opportunité à d'autres microorganismes de se développer au risque de causer des altérations. L'exemple le plus redouté des vinificateurs est le développement de la levure *Brettanomyces bruxellensis* (Silva *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2007). Cette espèce est bien adaptée au vin et elle est capable de proliférer dès la fin de la FA. Sa présence au-dessus de 10^3 UFC/mL est considérée comme critique. Au-dessus de ce seuil, le métabolisme de cette levure conduit à des modifications perceptibles dépréciant la qualité du vin. En effet, elle est capable de produire des phénols volatils qui confèrent au vin des notes aromatiques perçues comme « médicinale », « cuir », « sueur de cheval », « animal » et qui peuvent masquer les arômes fruités des vins (Chatonnet *et al.*, 1992).

Pour favoriser le déclenchement rapide de la FML et son bon déroulement, les vinificateurs peuvent recourir à l'utilisation de levains malolactiques. L'inoculation massive d'une souche sélectionnée permet de combler un manque dans la population indigène ou de la supplanter de manière à maîtriser plus efficacement la FML (Kunkee *et al.*, 1964). Néanmoins, malgré toutes ces précautions, des échecs d'implantation de levains malolactiques sont encore rencontrés. Ils ne sont donc pas toujours plus efficaces que les souches indigènes.

4.2. Levains malolactiques

Sélection de souche

La diversité phénotypique de l'espèce *O. oeni* a été largement décrite dans un grand nombre d'études. Cette espèce pourtant adaptée au vin, présente une large gamme de résistance aux paramètres de cet environnement ainsi que des performances fermentaires très diverses (Beelman *et al.*, 1977; Davis *et al.*, 1988; Guerrini *et al.*, 2003; Solieri *et al.*, 2010; Zapparoli *et al.*, 2012). Cette espèce offre donc un panel de souches aux performances et adaptations variées, qu'il est possible d'exploiter dans le but de mener à bien des FML dans tous les types de vins. Chaque équipe de recherche ou industrie possède ses propres critères de sélection mais des points communs se dégagent (Tableau 2) (Torriani *et al.*, 2011). La sélection d'un levain malolactique commence à partir d'une collection de

souches. Dans un premier temps, des isolats de bactéries sont soumis à des tests moléculaires pour identifier ceux appartenant à l'espèce *O. oeni*. Les isolats d'*O. oeni* sont ensuite typés pour déterminer les souches et supprimer les isolats redondants. Les souches sélectionnées sont ensuite soumises à différents tests visant à évaluer différents critères : leur résistance aux stress du vin, leurs performances fermentaires et leur incapacité à altérer directement le vin ou à produire des molécules nocives pour les consommateurs (Coucheney *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2010; Solieri *et al.*, 2010; Torriani *et al.*, 2011). Les souches sélectionnées à l'issue des différents tests sont ensuite inoculées en conditions réelles pour vérifier leurs propriétés technologiques et leur impact sur la qualité sensorielle du vin fini (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Nielsen *et al.*, 1996). Un mode de production et un protocole d'utilisation sont ensuite adaptés en fonction de la souche pour conserver au mieux ses caractéristiques. Des études tentent, depuis quelques années, de mettre en relation les caractéristiques phénotypiques et génétiques des souches, pour identifier les gènes responsables de certains phénotypes et pour finalement faciliter le processus de sélection de souche. Certaines études réalisées portent sur l'analyse de groupes génétiques identifiés par typage moléculaire (Guerrini *et al.*, 2003; Bilhère *et al.*, 2009; Cappello *et al.*, 2008; Bridier *et al.*, 2010; Cappello *et al.*, 2010). D'autres s'intéressent au niveau d'expression de gènes de stress (Coucheney *et al.*, 2005; Grandvalet *et al.*, 2008), ou encore à la présence de gènes spécifiques sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides (Delaherche *et al.*, 2006; Bon *et al.*, 2009; Favier *et al.*, 2012).

Production et conditionnement

L'enjeu de la production industrielle d'une souche est de pouvoir la conserver sous une forme stable et facilement manipulable sans perte des propriétés technologiques. Les protocoles de production sont souvent complexes et peuvent engendrer des stress qui risquent d'endommager les cellules, s'ils ne sont pas bien maîtrisés. Pour cela les préparations sont souvent additionnées d'un cryoprotecteur qui permettra de protéger les cellules tout au long du processus de fabrication et du stockage (Carvalho *et al.*, 2004; Zhao and Zhang, 2005).

Différentes formes de levains. Les levains malolactiques disponibles sur le marché se trouvent sous différentes formes. Le mode de préparation le plus répandu est la lyophilisation. Le principe consiste à éliminer l'eau d'une préparation cellulaire par une action combinée du froid et du vide grâce à un lyophilisateur. La population de bactéries viables dans les préparations lyophilisées peut atteindre les 10^{12} cellules/mL, ce qui permet une inoculation de petites quantités de préparation dans les cuves. Les souches ainsi lyophilisées peuvent être conservées plusieurs mois à +4°C et plusieurs années à -18°C. La deuxième forme de production est la forme congelée, qui a été brevetée par la firme Chr Hansen sous le sigle Viniflora FroZen. La conservation de ces souches durant une longue période ne peut cependant se faire que dans des surgélateurs à -50°C. La troisième forme de préparation est la forme liquide, qui n'est pas utilisée à grande échelle, en raison de la très courte durée de conservation qu'elle permet.

Modalité d'utilisation et d'acclimatation. Actuellement, il existe sur le marché une cinquantaine de préparations de levains malolactiques, la grande majorité étant des souches d'*O. oeni*, mais aussi 3 souches de *Lactobacillus plantarum* (Pasquier, 2014). La préparation et le conditionnement des levains sont réalisés de façon à faciliter au maximum leur utilisation. Pour les souches lyophilisées, une étape de réhydratation ou d'acclimatation (50% eau non chlorée et 50% vin) sont souvent nécessaires pour garantir une bonne survie des souches lors de l'inoculation (Cecconi *et al.*, 2009). De nombreuses études ont démontré une meilleure survie des souches inoculées dans le vin après une étape de réhydratation ou d'acclimatation (Lafon-Lafourcade, Carre, *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1985). Les préparations congelées ou liquides de souches peuvent être inoculées directement dans le vin. Les préparations sont également conseillées en fonction du type d'inoculation souhaité : inoculation séquentielle, précoce ou co-inoculation avec des LSA. Une seule préparation est conseillée pour réaliser la FML avant la FA. Il s'agit d'une souche de *L. plantarum*, qui est une bactérie lactique homofermentaire et qui dégrade très peu l'acide citrique (Toit *et al.*, 2011).

Enjeux économiques. Les données des industriels producteurs de levains malolactiques suggèrent que seulement 4 à 10 % du volume de vin français estensemencé en bactéries. Cette situation est due au fait que la plus grande majorité des FML se déroulent

correctement de façon spontanée avec le microbiote indigène, mais aussi à cause du prix de ces levains. Un article récemment publié dans la revue « La vigne » a estimé que le prix de l'inoculation avec des bactéries est en moyenne 4 fois plus élevé que celui de l'inoculation avec des levures sélectionnées (Pasquier, 2014). De plus, il existe un grand écart de prix entre les différentes préparations bactériennes, le coût de l'inoculation variant de 1 à 5 euros/hL. Certaines souches peuvent coûter jusqu'à 2 euros/L.

4.3. Fermentations spontanées

Contexte

L'utilisation systématique de levains malolactiques est encore très peu répandue. De nombreux vinificateurs font le choix de laisser les FML se dérouler avec le microbiote indigène. Les levains malolactiques sont perçus comme des solutions curatives plutôt que comme des outils préventifs. Les souches indigènes sont donc encore la solution la plus souvent choisie et le développement de la production de vins biologiques ne fait que renforcer ce choix des souches indigènes. Pour la réalisation de « vins naturels », les viticulteurs privilégient au maximum le contrôle de la vinification par des itinéraires techniques adaptés, d'utiliser le microbiote indigène naturellement présente et de limiter l'utilisation d'intrants comme les levains (Messal, 2010).

Besoins de la filière viticole

Les attentes des viticulteurs qui souhaitent réaliser les FML avec le microbiote indigène sont de deux types :

Premièrement, des attentes techniques de protocoles adaptés pour permettre, en cas de millésimes difficiles ou de FML capricieuses, de gérer au mieux les fermentations et de limiter l'apparition d'une flore d'altération. Différents protocoles ont déjà été adaptés et proposés pour les FA, comme la réalisation de pieds de cuve. Pour les FML, beaucoup de pratiques différentes existent, chaque exploitation ayant sa façon de travailler. On trouve par exemple l'assemblage avec une cuve en fin de FML ou encore l'utilisation de lies en différentes proportions. Un grand effort est mené par les centres techniques en partenariat

avec des exploitations et des centres de recherche, pour permettre d'étudier l'efficacité de ces pratiques et de les optimiser.

Deuxièmement, des alternatives à l'utilisation de levains industriels. Les souches industrielles peuvent être sélectionnées partout dans le monde et utilisées de la même façon partout. L'idée d'utiliser des souches d'origine inconnue pour produire des vins régionaux rebute certains vinificateurs. Avoir à disposition des souches sélectionnées dans une région pour produire les vins de cette région pourrait être une alternative aux FML spontanées. Cela permettrait de réaliser les fermentations avec des souches indigènes en s'affranchissant du caractère aléatoire des FML spontanées.

L'agriculture biologique est en pleine expansion depuis plus d'une dizaine d'années, tant en nombre de producteurs qu'en nombre de consommateurs. Avec le Grenelle de l'environnement, l'État français incite les agriculteurs à s'orienter vers une agriculture plus respectueuse de l'environnement en limitant l'utilisation de produits chimiques de synthèse. C'est dans cet esprit que de nombreux viticulteurs se sont convertis à la viticulture biologique. Quand l'agriculture biologique est apparue, il n'y avait pas de mention pour le vin en lui-même, on ne pouvait pas dire que le vin était biologique, mais qu'il était produit à partir de raisins issus de l'agriculture biologique (Règlement (CE) N° 834/2007). Aujourd'hui le « vin bio » existe, suite à une réglementation européenne des vins biologiques entrée en application au 1^{er} avril 2012 (Règlement (UE) 203/2012). Elle demande aux vinificateurs, depuis 2012, des efforts pour mettre en conformité leurs itinéraires techniques de vinification et impose de fournir une traçabilité précise et une documentation exhaustive sur les intrants et pratiques utilisés.

Maîtrise des risques microbiologiques. Les outils pour contrôler les risques de dérives microbiennes sont restreints en vinification biologique. L'utilisation de produits ayant une action antiseptique est interdite (DMDC, sorbate de potassium, lysozyme), de même que la flash pasteurisation. Seule la filtration serrée (0,45 – 0,2 µm) et l'ajout de SO₂ à des doses plus faibles qu'en vinification conventionnelle sont autorisés pour la stabilisation microbiologique des vins.

Réalisation des fermentations. Pour contrôler les FA et limiter le développement de flores indigènes qui pourraient provoquer des altérations, un apport précoce et massif de microorganismes par le biais d'un pied de cuve, ou de levain (« Bio » si disponible) est conseillé. Il est également possible de réaliser un apport de SO₂ avant la fermentation pour favoriser le développement des levures *Saccharomyces* au détriment des non-*Saccharomyces*. Comme en vinification classique, si la FML est souhaitée, elle doit être réalisée rapidement, après la FA, pour laisser le moins de temps à d'autres microorganismes causant des altérations de se développer. Différentes pratiques œnologiques peuvent être mises en place au chai pour favoriser son déclenchement : le soutirage fin FA ou le maintien de la température entre 18 et 20°C, pratiquer une désacidification si le pH est inférieur à 3,5, bâtonner les lies pour favoriser l'autolyse qui libère des nutriments pour les bactéries lactiques ou encore utiliser une cuve en fin de FML en assemblage. Au vu de la réglementation sur l'utilisation du SO₂, il est impossible d'empêcher totalement le démarrage d'une FML avec un sulfitage aux doses classiques. Le sulfitage dans les limites autorisées, des règles d'hygiène strictes, la maîtrise des températures et du pH ainsi que la filtration sont les seuls recours pour les blancs et rosés. Quelques pratiques sont réalisables pour la stabilisation microbiologique après la FML, comme la thermolisation ou l'embouteillage à chaud, qui est une méthode efficace mais difficile à mettre en œuvre. La filtration serrée est également autorisée.

Utilisation de levains. L'utilisation de LSA est autorisée à condition que la préparation soit certifiée « Biologique ». Si des souches commerciales biologiques existent et sont disponibles, elles doivent être préférées aux souches « non-biologiques ». En 2013, on comptait 8 préparations de levures certifiées biologiques. Il est aussi possible d'utiliser des LSA non issues d'OGM, ou produites à partir de matières premières biologiques (non tolérée par certaines réglementations). Pour la FML, il est possible éventuellement d'utiliser un levain commercial de bactéries lactiques ou de procéder à une co-inoculation pour favoriser un enchaînement rapide entre la FA et la FML. De même que pour la FA, les bactéries non issues d'OGM sont autorisées, ainsi que celles produites à partir de matières premières biologiques. L'utilisation de lies fraîches provenant d'un lot de vin produit en respect de chartre « vins biologiques » est également possible.

MATERIELS ET METHODES

a)



b)

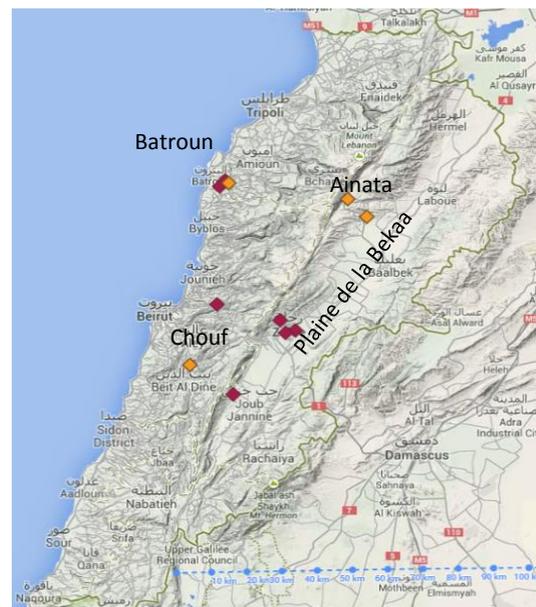


Figure 8. Localisation géographique des sites de prélèvements en France a) et au Liban b).

1. Collection de travail et échantillonnage

1.1. Souches d'*Oenococcus oeni*

Les souches utilisées dans cette étude correspondent à 110 souches de diverses origines issues de la collection du Centre de Ressources Biologiques Oenologique (CRB OENO), et 514 souches isolées au cours de cette étude au Liban en 2011 et en France en 2012 et 2013. En plus de ces souches d'*O. oeni*, 4 souches d'*O. kitaharae* provenant de la collection NODAI Culture Collection Center (Tokyo University of Agriculture) ont été étudiées. L'ensemble des souches est listé dans le tableau en annexe 1.

1.2. Régions et millésimes échantillonnés

Pour étudier la diversité géographique des souches d'*O. oeni* présentes au moment de la fermentation malolactique, un échantillonnage couvrant 5 régions viticoles et une région cidricole a été réalisé (Figure 8a). L'échantillonnage a permis de rassembler 235 échantillons de vins rouges, de vins blancs et de cidres, provenant de 74 d'exploitations, principalement en agriculture biologique et réalisant des FML spontanées. Des partenaires des différents centres de l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), de l'Institut Français des Productions Cidricoles (IFPC) et le syndicat des vignerons Bio d'Aquitaine ont effectué les prélèvements en Aquitaine, en Bourgogne, dans le Languedoc – Roussillon, le Val de Loire et en Bretagne.

Des prélèvements de vin en FML spontanée ont également été réalisés au Liban en 2011 (Figure 8b). Ils ont permis de rassembler 32 échantillons de 9 exploitations situées dans les régions de la Bekaa (Plateau 900 m alt., coteaux > 1000m) de Batroun (versant Ouest Mont Liban, 500 m alt.) de Ainata (versant Est > 1000 m alt.) et du Chouf (versant Ouest Mont Liban, 600 m alt.). La majorité des échantillons proviennent d'exploitations situées dans la plaine de la Bekaa ou à proximité, principale région viticole de ce pays.

La persistance des souches entre deux millésimes a été étudiée dans certaines exploitations. Pour cela, des échantillons de vins ont été prélevés lors des deux millésimes 2012 et 2013 en Aquitaine et en Bourgogne. L'évolution des souches lors du processus de vinification, du moût jusqu'à la fin de la FML, a été suivie dans une exploitation. Des

échantillons de vins ont été prélevés aux différents stades de la vinification dans deux cuves de deux exploitations en Aquitaine.

2. Isolement, culture et conservation

2.1. Culture et isolement des bactéries lactiques.

Des dilutions adéquates des échantillons de vins et les souches de la collection sont cultivés à +25°C pendant 7 à 10 jours sur un milieu « jus de raisin » composé de : 250mL/L de jus de raisin rouge commercial (Jaffaden, E.Leclerc), 5g/L d'extraits de levure, 1mL/L de Tween80, eau distillée qsp 1 L et ajusté à pH 4,8 avec une solution d'hydroxyde de potassium 5N. Le milieu solide est obtenu en ajoutant 20 g/L d'agar avant stérilisation, puis il est coulé dans des boîtes de Petri. Un milieu « jus de raisin blanc » est utilisé pour réaliser des tests phénotypiques de résistance au pH et à l'alcool, il contient 250mL/L de jus de raisin blanc commercial (Jus de raisin blanc Bio, Moulin de Valdonne), 5g/L d'extraits de levure, 1mL/L de Tween80, eau distillée qsp 1 L. Dans le but de tester différentes modalités, le pH est ajusté à 2,8 – 3 - 3,3 - 3,6 avec une solution d'acide orthophosphorique 85% - 15M et à pH 4 avec une solution d'hydroxyde de potassium 10N. Le taux d'alcool est ajusté à 6%, 12% et 14% par addition d'éthanol absolu après stérilisation. Les milieux de culture liquides et solides sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes. Le milieu jus de raisin destiné à l'isolement des bactéries lactiques est supplémenté en pimarcine, après stérilisation, (DELVOCID Instant, DSM) à raison de 0,1 g/L pour inhiber la croissance des levures.

Les milieux liquides sont ensemencés soit à partir d'une colonie remise en suspension dans le milieu, soit à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance (1%V/V). Les ensemencements des boîtes de Petri pour les tests phénotypiques sont réalisés par dépôt de gouttes de 10µL de 4 dilutions successives. Après ensemencement, les boîtes de milieu solide sont placées pendant 7 jours à 25°C en atmosphère anaérobie générée par des sachets AnaeroGen (OXOID). Au bout de 7 jours, les UFC sont comptées, puis 15 colonies sont isolées et repiquées en milieu liquide.

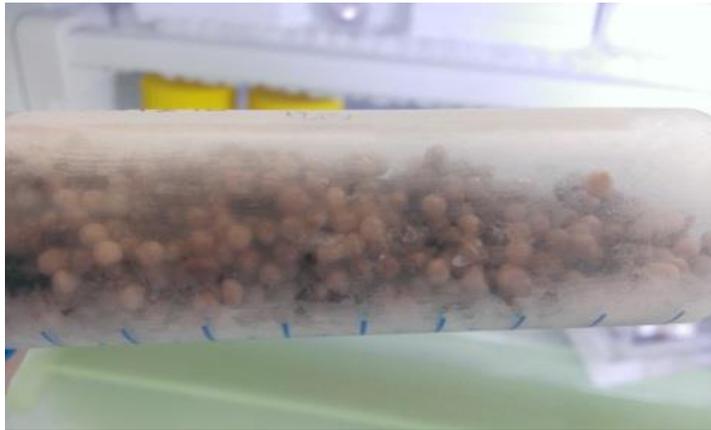


Figure 9. Aspect des billes de suspensions après congélation dans l'azote liquide.

2.2. Conservation des bactéries

Toutes les bactéries isolées sont conservées dans du glycérol. Une fraction de culture en phase exponentielle est supplémentée de glycérol à 30% V/V, pour éviter la rupture des membranes cellulaires puis conservée à -80°C. Les lies post FML sont conservées à +4°C dans des bidons de 5L suffisamment remplis.

2.3. Préparation des souches sous forme congelée dans l'azote liquide

La congélation dans l'azote liquide est un procédé fréquemment utilisé pour la conservation de cellules, de tissus, d'enzymes afin de conserver leur viabilité ou leur activité. Nous avons appliqué ce procédé à des suspensions bactériennes dans le but de les conserver d'une façon simple et ne nécessitant pas l'ajout de cryoprotecteur.

Une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance est centrifugée (4500 rpm pendant 15 minutes à 10 °C) puis concentrée 100 fois dans du milieu jus de raisin. La préparation concentrée est alors aspirée à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson-Marlow). L'extrémité de sortie est branchée à une aiguille (Terumo) placée à 10 cm au-dessus d'un vase Dewar en forme de coupelle rempli d'azote liquide. Le débit de la pompe est réglé à une vitesse de 4 rpm pour créer un goutte à goutte régulier et favoriser une congélation rapide dans l'azote liquide. Les billes de cultures congelées sont ensuite transférées dans un tube stérile, puis conservées à -80°C (Figure9).

2.4. Culture des levures et bactéries acétiques

L'absence de levures et de bactéries acétiques dans les vins filtrés et dans les lies stérilisées, a été vérifiée par des étalements sur des milieux sélectifs.

* *Milieu levures totales* : permet la croissance de toutes les levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* et inhibe les bactéries. Il est composé de : 10g d'extraits de levures, 10g de peptones, 20 g de glucose, eau distillée qsp 1L et pH ajusté à 4,8. Le milieu solide est obtenu en ajoutant 20 g/L d'agar avant stérilisation. Après autoclavage, le milieu est

supplémenté en chloramphénicol (Sigma) et biphenyl (Fulka) à raison de 0,1 mg/mL et 0,15 mg/mL, respectivement.

* *Milieu bactéries acétiques* : permet la croissance de bactéries acétiques et inhibe la croissance des levures et des bactéries à Gram +. Le milieu est préparé à base de MRS (MRS broth, Difco) en poudre selon les préconisations du fabricant. Le milieu solide est obtenu en ajoutant 20 g/L d'agar avant stérilisation. Après autoclavage, le milieu est supplémenté en Pimaricine (DELVOCID Instant, DSM) (0,1 mg/mL) et en pénicilline (Sigma) (0,0125 mg/mL).

3. Mesure de la croissance bactérienne

3.1. Mesure de la turbidité du milieu

La mesure de la turbidité d'une culture par mesure de la densité optique à 600 nm permet d'estimer la population bactérienne présente. La DO 600 nm est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à cuve (BioRad) ou d'un lecteur de microplaque Synergy HT (Bio Tek). Pour l'espèce *Oenococcus oeni* cultivée en milieu « jus de raisin » 0,7 unités de DO_{600 nm} correspond à 1×10^9 cellules/mL.

3.2. Dénombrement des colonies sur milieu solide

Pour évaluer la quantité de bactéries viables et cultivables contenue dans une suspension, 100 µL d'une dilution décimale sont déposés sur un milieu jus de raisin solide puis étalés à l'aide de billes de verre. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées dans les conditions adéquates (température, atmosphère aéro/anaérobie) puis le nombre d'unités formant colonie (UFC) est compté sur celles qui présentent 30 à 300 colonies.

3.3. Dénombrement des cellules viables par microscopie à épifluorescence

Contrairement au dénombrement sur boîte qui demande une longue période d'incubation, cette technique permet une estimation immédiate des cellules viables dans une suspension. Le principe de cette méthode repose sur la dégradation d'un substrat,

l'acétate de fluorescéine, par une estérase intracellulaire des cellules vivantes, en un fluorochrome, la fluorescéine. Cette molécule émet une fluorescence verte qui permet de dénombrer les cellules vivantes à l'aide d'un microscope à épiluminescence.

Une fraction ou une dilution d'un échantillon est filtrée grâce à une pompe à vide, sur une membrane de 0,4 µm de porosité (Chemunex). Cette membrane est ensuite déposée sur un disque de cellulose imbibé d'une solution de marquage (pour une réaction : 500µL de tampon Chemsol B16, 2,5µL de substrat chemChrome V6 Chemunex) puis incubée pendant 20 minutes à 30°C à l'obscurité totale. La membrane est ensuite placée entre lame et lamelle et observée sous un microscope à épifluorescence (Olympus BX51) en choisissant le filtre approprié (Olympus 467803) avec l'objectif à immersion dans l'huile au grossissement X100. Les cellules sont comptées dans 10 ou 20 champs, puis la moyenne est multipliée par le nombre de champs que comporte une membrane, ce qui permet d'obtenir le nombre de cellules viables contenues dans l'échantillon filtré. La limite de détection de la méthode étant de 10^3 cellules/mL, il est nécessaire de filtrer des suspensions dont la concentration est supérieure à cette limite pour être en mesure de réaliser une bonne observation et comptage.

4. Microvinifications

Plusieurs souches et préparations congelées dans l'azote liquide ont été testées en microvinifications. Le but était d'évaluer leur survie à l'inoculation, leur capacité fermentaire et l'impact de certaines pratiques sur l'évolution de la FML : acclimatation, ajout de lies. Toutes les microvinifications ont été réalisées en duplicata pour toutes les souches et conditions testées. Les essais ont été réalisés à partir de vins post-FA provenant des exploitations partenaires des projets.

4.1. Préparation du vin

Les vins obtenus après fermentation alcoolique sont stockés à 4°C. Le vin utilisé pour les essais a été filtré sur plaque de cellulose de 0,65 µm de porosité puis sur des membranes de 0,22 µm. Le pH du vin a été modifié pour atteindre 3,6 et le taux d'éthanol a été ajusté à 12% à l'aide d'éthanol absolu (qualité HPLC). Les vins rouges et blancs provenant de Bourgogne, ont uniquement été filtrés sans modification des paramètres car ils semblaient adéquats pour la réalisation des expérimentations. L'absence de microorganismes est vérifiée par étalement sur milieu LT (levure totale), BA (bactéries acétiques) et BL (bactéries lactiques).

4.2. Préparation des lies post FML

Pour l'une des expérimentations, des lies post-FML ont été utilisées. Pour avoir un témoin négatif sans bactéries, des lies ont été placées dans un tube Falcon rempli à la moitié du volume maximal, puis placé dans un bain Marie à 80°C pendant 15 minutes. Les lies sont ensuite laissées à température ambiante pour refroidir avant utilisation. L'absence de microorganismes dans les lies est vérifiée de la même manière que pour les vins filtrés.

4.3. Mode d'inoculation des bactéries

Un dénombrement par épifluorescence est réalisé pour évaluer la concentration cellulaire de la culture initiale, puis un volume adéquat est inoculé dans le vin à la concentration souhaitée (10^6 cellules/mL). Trois modes d'inoculation des bactéries ont été utilisés lors des différentes expérimentations, pour évaluer leur impact sur la survie des souches dans le vin et la réalisation de la FML.

- L'inoculation directe

A partir des cultures congelées dans l'azote liquide, quelques billes de bactéries (5 – 10) sont transférées dans un tube eppendorf puis placées 10 min à 25°C. Après décongélation, les bactéries sont inoculées dans le vin à la concentration de 10^6 ou 10^7 cellules/mL.

- L'inoculation après acclimatation

L'acclimatation consiste à inoculer les bactéries dans un vin stérile dilué au ½ avec de l'eau à 20°C pendant 24H. Cette phase permet de réduire la mortalité des bactéries lors de l'inoculation dans le vin. Les bactéries sont ensuite inoculées à 10^6 ou 10^7 cellules/mL.

- L'inoculation avec des lies

Des lies fraîches ou stérilisées sont utilisées en complément de l'inoculation des bactéries, ou seules. Les lies sont additionnées directement au vin au moment de l'inoculation des bactéries à 1% du volume total du vin.

4.4. Suivi des fermentations

Le suivi de l'avancement de la FML est réalisé en suivant la dégradation de l'acide L-malique, une ou deux fois par semaine, à l'aide d'un kit enzymatique (Boehringer, Roche). Les dosages ont été réalisés en triplicats. Le principe du dosage de ce kit repose sur l'oxydation de l'acide L-malique en oxaloacétate en présence de NAD^+ et de la L-malate déshydrogénase. La formation du NADH, proportionnelle à la quantité d'acide malique présente dans l'échantillon, est suivie par mesure de l'augmentation de l'absorbance à 340 nm. Les échantillons de vins sont dilués au 1/10 ème avant le dosage. Le dosage est réalisé dans des plaques 96 puits à fond plat transparentes aux UV (Greiner Bio-one) et les lectures d'absorbances sont réalisées à l'aide d'un lecteur microplaques Synergy HT (BioTek).

5. Techniques de biologie moléculaire

5.1. Méthodes d'extraction des acides nucléiques

Extraction de l'ADN génomique à partir de culture

L'ADN génomique des bactéries est extrait et purifié à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN génomique, Wizard Genomic DNA purification kit (Promega). Ce kit permet l'obtention

rapide d'ADN génomique de bonne qualité utilisable en biologie moléculaire et pour le séquençage de génomes.

Pour extraire l'ADN génomique d'une bactérie, une culture est réalisée puis collectée en fin de phase exponentielle de croissance par centrifugation à 10000g pendant 5 min, puis le surnageant est éliminé. Le culot est alors repris dans 600 µL d'une solution d'EDTA 50 mM à pH 8 contenant 10 mg/mL de lysozyme et mis à incuber 1 h à 37 °C pour dégrader les parois bactériennes. Après cette étape, les cellules bactériennes se trouvent à l'état de protoplastes. Une nouvelle centrifugation à 10000g est réalisée pendant 2 min, puis le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 600µL de tampon de lyse (Nuclei Lysis Solution). Le tube est alors incubé à 80°C pendant 5 min pour lyser les cellules, puis il est ramené à température ambiante. Le mélange est alors traité avec 3µL de RNase A et placé à 37°C pendant 30 min pour éliminer les ARN. Après retour à température ambiante, 200 µL de solution de précipitation (Protein Precipitation Solution) sont ajoutés au mélange puis homogénéisés à l'aide d'un vortex pendant 20s, pour précipiter tous les débris cellulaires. Le mélange est ensuite placé dans la glace pendant 5 min, puis centrifugé à 10000g pendant 3 min. Le surnageant est alors transféré dans un tube contenant 600 µL d'isopropanol. Plusieurs mélanges par retournement permettent de précipiter l'ADN. Une centrifugation permet d'éliminer l'isopropanol, puis le culot est lavé à l'éthanol à 70%. Une dernière centrifugation et un séchage pendant 15 min permettent d'éliminer toute trace d'éthanol. Le culot est alors repris dans 20 µL d'eau ppi (pour préparation injectable) et placé à 4°C pendant une nuit pour être réhydraté.

Extraction de l'ADN génomique à partir de vin

Ce protocole est utilisé pour extraire l'ADN total des microorganismes présents dans un échantillon de vin. Le même kit d'extraction d'ADN, cité précédemment, est utilisé. Des modifications ont été apportées au protocole pour optimiser l'extraction d'ADN à partir du vin.

Un échantillon de 10 mL de vin est centrifugé à 10000g pendant 5 min pour concentrer la biomasse. Après élimination du surnageant, le culot est ensuite délicatement repris dans 300 µL de tampon TE à pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Après centrifugation, le surnageant

est éliminé et le culot est remis en suspension dans 300 µL d'une solution d'EDTA (50 mM pH 8). Le mélange est alors transféré dans un tube à vis contenant 200 µL de billes de verre (0,1 mm de diamètre). Le tube est placé dans un homogénéisateur à haute vitesse FastPrep (MP Biomedicals) qui va permettre une lyse mécanique des cellules en effectuant un cycle de 45 s à une vitesse de 6,5 m/s. Les tubes sont ensuite immédiatement placés dans de la glace pendant 1 min pour les réfrigérer. Ces deux étapes sont répétées 5 fois, puis 300 µL de tampon de lyse (Nuclei Lysis Solution) et 200 µL de solution de précipitation (Protein Precipitation Solution) sont ajoutés au mélange. Le tube est vortexé pendant 20 s, puis placé dans la glace pendant 5 min, avant d'être centrifugé à 10000g pendant 3 min. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et une solution de PVP à 10% (Polyvinylpyrrolidone) est ajoutée à 1% du volume final pour éliminer les composés phénoliques. Le mélange est ensuite vortexé pendant 10 s, puis centrifugé à 10000g pendant 2 min. Le surnageant est transféré dans un tube contenant 500 µL d'isopropanol et le tube est mélangé plusieurs fois par retournement puis il est maintenu à température ambiante pendant 15 min. L'ADN est précipité par une centrifugation à 10000g pendant 15 min. L'isopropanol est éliminé et le culot est lavé par ajout de 300 µL d'éthanol à 70%. L'éthanol est ensuite éliminé après centrifugation et le culot est séché comme précédemment. La réhydratation est réalisée en ajoutant 20 µL d'eau ppi et 0,6 µL de RNase A au culot, qui est placé à 4°C pendant une nuit.

Extraction de l'ADN génomique sur carte FTA Whatman

Les cartes FTA Whatman sont une technologie d'extraction, de purification et de conservation d'ADN à partir de matrices diverses. Le principe est simple, il suffit de déposer une goutte d'échantillon sur un emplacement de la carte qui contient tous les composés chimiques nécessaires à la lyse cellulaire, la dénaturation des protéines et la protection de l'ADN vis-à-vis des nucléases, de l'oxydation et des rayons ultraviolets. L'ADN est fixé sur la matrice qui peut être directement utilisé en biologie moléculaire et peut se conserver pour de longues périodes à température ambiante.

Cette technique a été utilisée pour des vérifications lors des congélations dans l'azote liquide et des repiquages successifs de souches. Pour réaliser les dépôts, les cultures de souches pures sont diluées au 1/2 et les cultures concentrées avant congélation dans l'azote liquide sont diluées au 1/10^{ème} avant dépôt de 7 µL sur la carte. La carte est ensuite séchée

Tableau 3. Liste des amorces utilisées dans cette étude

Séquence cible	Amorce	séquences (5'-->3')	Amplicon (pb)	Références
Identification des espèces				
ADN ribosomique 16S	BSF8	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	Edwards et al., 1989
	BSR 1541	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA		
Séquences répétées en tandem				
Lipoprotéine PlpE like (également utilisée pour identification d' <i>O. oeni</i>)	TR1f	GGTAAGGGAAAAGTTATCCTCG	79 - 511	Claisse et al., 2012
	TR1r	GTTTTACCTTCGGTGCAGC		
Protéine kinase	TR2f	CATAATAGAATTCACCTTCGCTTACC	203 - 863	Claisse et al., 2012
	TR2r	GTAGCTGGTACGAGCTCTTC		
Protéine à domaine LysM	TR3f	CTAATTCTTCCTCGCCCTTTG	379 - 967	Claisse et al., 2012
	TR3r	GGACTGACTGTACTTATTTGAGG		
Transporteur ABC	TR4f	GTGACCGACCAAAGCATAAC	0 - 150	Claisse et al., 2012
	TR4r	AAAAACGCTCCAAGAAAAGGT		
Carboxypeptidase membranaire	TR5f	AAATCCTGGTTTTGTCCGTA	83 - 101	Claisse et al., 2012
	TR5r	GGCTTCCTATCCATTTTGGT		
Gènes spécifiques groupe A/B				
cell surface protein precursor	405f	GTGGTCCGGTCTTTTTGTCTG	405	Campbel-Sills et al., 2012
	405r	TCAAGTTGTGTCTCCTGCC		
Protéine hypothétique	469f	ACATTTGCCGATACCAGGCA	469	Campbel-Sills et al., 2012
	469r	AGTCGATGTGTAATCACGTTCT		
Gènes des voies d'altération				
hdc (Histidine decarboxylase)	HDC3	GATGGTATTGTTTCKTATGA3	435	Coton et al., 2010
	HDC4	CCAAACACCAGCATCTTC		
tdc (Tyrosine decarboxylase)	TDC2	ACATAGTCAACCATRTTGAA	1133	Coton et al., 2010
	TDC5	CAAATGGAAGAAGAAGTAGG		
odc (Ornithine decarboxylase)	ODC1	NCAYAARCAACAAGYNGG	900	Coton et al., 2010
	ODC2	GRTANGGNTNNGCACCTTC		
agD (Agmatine déiminase)	AgD1	CAYGTNGAYGGHSAAGG	600	Coton et al., 2010
	AgD2	TGTTGNGTRATRCAGTGAAT		

et conservée selon les préconisations du fabricant. Une pastille de 1,2 mm de diamètre est découpée à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Uni-Core Punch) et déposée dans un tube PCR. Les pastilles sont lavées pour éliminer les débris cellulaires par ajout de 100 μ L de TE pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) avec un temps de contact de 5 min. Deux lavages à l'eau ultra-pure sont réalisés pour éliminer toute trace de TE. Le mélange PCR peut alors être directement ajouté sur la pastille.

5.2. Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

PCR en point final

La réaction PCR classique permet d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN grâce à des amorces spécifiques. La réaction PCR se déroule en plusieurs étapes : une étape de dénaturation initiale à 95°C de 5 min, suivie de 30 cycles comprenant 30 s de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à une température généralement comprise entre 50 et 60°C (en fonction des couples d'amorces) et une étape d'élongation à 72°C comprise entre 30 s et plusieurs min selon la longueur du fragment à amplifier (1 min par kilobase). A la fin des 30 cycles, une dernière étape d'élongation est réalisée à 72°C pendant 10 min. Toutes les réactions sont réalisées en utilisant un thermocycleur iCycler (BioRad). Des PCR classiques sont utilisées pour amplifier le gène de l'ADNr 16S, le fragment TR1, des gènes impliqués dans la production d'amines biogènes et les fragments spécifiques des groupes phylogénétiques A et B.

Le mélange réactionnel est préparé pour un volume final de 20 μ L, comprenant 5 pmol de chaque amorce, environ 25 ng de matrice ADN et 4 μ L de mix « à façon » contenant entre autres, l'ADN polymérase et les dNTP (Taq-&GO Mastermix, MP Biomedicals). La liste des amorces utilisées est présentée dans le tableau 3.

PCR sur colonie et culture pure

La technique PCR étant très sensible, il est possible de la réaliser directement à partir d'une biomasse, ce qui permet l'analyse rapide de plusieurs colonies ou échantillons.

* PCR sur colonies : elle consiste à mettre en suspension une colonie dans 20 µL d'eau ultra pure, puis à congeler la suspension à -20°C. La congélation permet de lyser une partie des cellules rendant l'ADN accessible à la polymérase. Elle permet aussi une longue conservation de la biomasse. Pour réaliser une PCR, 1µL de la suspension est utilisée comme matrice ADN.

* PCR sur culture pure : à partir d'une culture fraîche, 200 µL sont prélevés et centrifugés à 10000g pendant 5 min, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 200 µL d'eau ultra pure, qui sont ensuite congelés à -20°C durant une nuit. Vingt-quatre heures plus tard, les échantillons sont décongelés et dilués au 1/10 ème, puis stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Pour réaliser les PCR, les suspensions sont décongelées et 2 µL sont utilisés comme matrice ADN.

PCR quantitative en temps réel

Les suspensions cellulaires, utilisées comme matrice ADN pour le génotypage par analyse de SNP, ont été contrôlées par PCR quantitative en temps réel (Cf. 5.4). L'obligation de standardiser les quantités d'ADN contenues dans les suspensions de colonies congelées, nous a amené à adapter une PCR quantitative à la PCR sur culture pure pour pouvoir comparer rapidement les différentes suspensions d'échantillons. Le but étant simplement de comparer les échantillons entre eux, nous n'avons pas établi de courbes de quantification.

La réaction PCR est réalisée dans un volume final de 10 µL comprenant 5µL de mix PCR (iQ supermix, BioRad) 2,5 pmol de chaque amorce TR1 (Tableau 3), 1 µL d'une matrice ADN (culture pure diluée et congelée), 1 µL de marqueur fluorescent SYBER Gold (Invitrogen) dilué 100 fois dans du TE pH 8. Le programme PCR comprend une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 3 min, suivie de 35 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 53,8 °C et 30 s à 72°C. Les mesures de fluorescence sont réalisées lors de chaque période d'élongation. A la fin du cycle PCR, une courbe de fusion est établie, pour vérifier la spécificité de chaque amplification. Cette étape consiste en une dénaturation des produits formés par une augmentation progressive de la température de 70°C à 90°C (0,5°C toutes les 5s).

5.3. Séparation des acides nucléiques

Electrophorèse en champs constant sur gel d'agarose

L'électrophorèse classique en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN selon leur taille grâce à un champ électrique constant. Les fragments d'ADN chargés négativement migrent vers le pôle positif en fonction de leur poids moléculaire. Les gels d'agarose sont réalisés à 1% p/v d'agarose dissout à chaud dans du tampon TAE 1X (Tris 0,04M, Acétate 0,02M, EDTA 0,001M pH 8). Du bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant de l'ADN, est ajouté à 0,2 µg/mL au moment du coulage du gel. Il est fluorescent aux UV et permet donc la visualisation de l'ADN. Après polymérisation, le gel est placé dans une cuve de migration contenant du tampon TAE 1X, puis les échantillons d'ADN sont déposés dans les puits après avoir été mélangés à du bleu de charge à 10% V/V (glycérol 50%, TE 50%, bleu de bromophénol 0,25%). La migration est réalisée à 90 V et dure 45 min. Les ADN sont révélés par exposition à la lumière UV grâce à un système d'imagerie Infinity Capt (Fischer Scientific, Bioblock).

Electrophorèse capillaire sur micro-puce

Nous avons utilisé le système MultiNA (Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis, Shimadzu) lorsqu'un grand nombre de produits PCR devait être analysé ou pour obtenir une taille plus précise des fragments analysés. Le principe de l'électrophorèse capillaire est le même que celui de l'électrophorèse classique. La migration des échantillons se fait dans un gel avec un marqueur qui permet de détecter l'ADN. La différence réside dans le fait que le système est entièrement automatisé et que chaque échantillon migre séparément dans un capillaire situé sur une micro-puce. Le logiciel d'acquisition permet de visualiser les résultats sous forme d'électrophorégramme.

Un marqueur de poids moléculaire, phiX174-HaeIII digest (Promega), est déposé dans un tube séparé et migre une fois sur chaque puce au début de l'analyse. Chaque échantillon migre à travers un capillaire dans un tampon de séparation (DNA 1000, Shimadzu) grâce à un champ électrique élevé. Le tampon contient du SYBR Gold (Invitrogen), un fluorochrome dilué 100 fois dans du TE pH 8, ainsi qu'un calibrateur contenant deux types de fragments,

Tableau 4. Fluorophores utilisés pour marquer les amorces pour la MLVA

Amorce	Séquences répétées en tandem	Fluorophore
TR1f	GGTAAGGGAAAAGTTATCCTCG	ATTO550
TR1r	GTTTTACCTTCGGTCGAGC	
TR2f	CATAATAGAATTCACCTTCGCTTACC	6-FAM
TR2r	GTAGCTGGTACGAGCTCTTC	
TR3f	CTAATTCTCCTCGCCCTTTG	HEX
TR3r	GGACTGACTGTACTTATTTGAGG	
TR4f	GTGACCGACCAAAGCATAAC	ATTO565
TR4r	AAAAACGCTCCAAGAAAGGT	
TR5f	AAATCCTGGTTTTGTCCGTA	6-FAM
TR5r	GGCTTCCTATCCATTTTGGT	

de faible et haut poids moléculaire, qui permettent de normaliser la migration. Lors de son passage au travers d'un système émetteur/détecteur à fluorescence, la lumière émise par la molécule marquée est mesurée puis transcrite sous forme d'un pic dans un électrophorégramme. Une image numérique d'un gel est également reconstituée et les fragments apparaissent sous forme de bandes. Le réglage des paramètres de l'analyse et le lancement de l'analyse se font grâce au logiciel « MultiNA Control ». Les résultats sont enregistrés et peuvent être visualisés et analysés grâce au logiciel « MultiNA Viewer ».

5.4. Génotypage des souches par la méthode MLVA

Cette technique est utilisée pour analyser les colonies d'*O. oeni* isolées de vin et typer les souches. Elle permet d'amplifier par deux PCR multiplexes, 5 régions génomiques répétées en tandem de différentes périodes, présentes sur le chromosome d'*O. oeni*. Elle utilise 2 mélanges d'amorces marquées, l'un contenant 2 couples d'amorces et l'autre 3 couples, et nécessite donc 2 PCR multiplexes. La liste des amorces est présentée dans le tableau 4. Seules les amorces sens (f) sont marquées à l'aide de fluorophores.

Préparation des mix d'amorces

Le mix A est constitué du mélange des amorces TR1 et TR2 à 2,5 pmol/ μ L chacune. Et le mix B est constitué du mélange des amorces TR3, TR4 et TR5. Les amorces TR3 et TR4 sont à 1,25 pmol/ μ L chacune et les amorces TR5 à 2,5 pmol/ μ L.

Réalisation de la PCR

Deux PCR sont réalisées séparément dans un volume final de 10 μ L, contenant 5 μ L de mix pour PCR multiplex (Multiplex PCR Kit, QIAGEN), 1 μ L de mix d'amorces A ou B et 1 μ L de matrice ADN (suspension de colonie congelée et diluée). Le programme d'amplification comprend une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min, puis 30 cycles avec 3 étapes : dénaturation à 94°C pendant 30 sec, hybridation à 62°C pendant 90 s, élongation à 72°C pendant 90 s et pour finir une étape à 60°C pendant 30 min. La réaction est réalisée sur un thermocycleur T100™ (Bio-Rad).

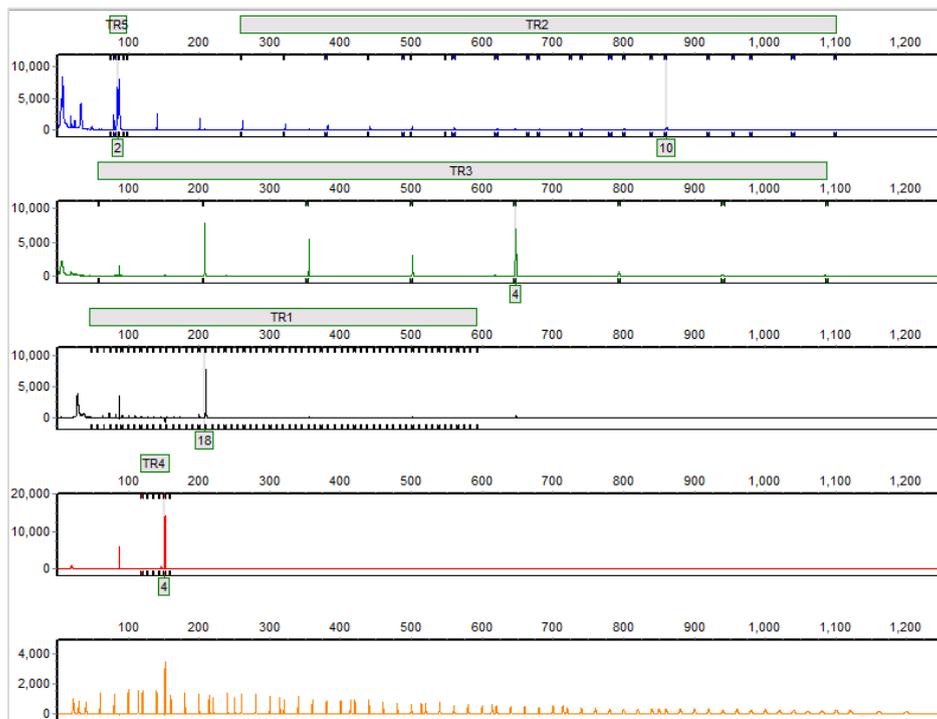


Figure 10. Visualisation des chromatogrammes de MLVA par le logiciel GenMarker (SoftGenetics). Chaque fragment est marqué par un fluorophore différent qui permet de l'identifier. Seuls les fragments TR5 et TR2 sont marqués par la même molécule. Le dernier chromatogramme correspond au marqueur de taille GeneScan 1200LIZ.

Traitement des produits d'amplification pour le génotypage par MLVA

Les produits des PCR multiplex-VNTR doivent être transmis à la plateforme de génotypage prêts à l'analyse. Pour cela les produits de la PCR avec le mix d'amorces A sont dilués 40 fois et ceux de la PCR avec le mix d'amorces B dilués 60 fois, ensembles dans un volume final de 120 μ L avec de l'eau ultra pure. Deux μ L de ce mélange sont transférés dans un tube contenant 9 μ L de formamide Hi-Di (Life Technologies), puis envoyés au laboratoire de génotypage de la société eurofin à l'institut Cochin qui ajoutera 0,2 μ L de marqueur GeneScan 1200 LIZ Size Standard (Life Technologies). Après dénaturation, les fragments sont analysés sur un séquenceur à 16 capillaires (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystem).

Traitement des résultats de génotypage par MLVA

- *Analyse de la taille des séquences nucléiques*

Les résultats de génotypage de PCR multiplex-VNTR sont analysés à l'aide du logiciel GeneMarker V2.4.0 (SoftGenetics). Un script (VNTR Panel) permettant d'affilier directement la taille d'un fragment à un nombre de répétitions a été intégré au logiciel pour faciliter et accélérer l'analyse. Les résultats sont analysés par le logiciel en choisissant le « panel VNTR » et en sélectionnant le marqueur GeneScan 1200LIZ (Applied Biosystems). Les résultats apparaissent sous forme de chromatogramme. Chaque fragment est présenté séparément et colorisé en fonction de la couleur du marquage utilisée pour le génotypage (Figure 10). Les fragments TR5 et TR2 sont marqués par la même molécule et sont donc présentés sur le même chromatogramme. Le nombre de répétition de chaque fragment est directement indiqué en dessous du pic et il est reporté dans un tableau. Le logiciel permet de supprimer des pics non-spécifiques et d'affilier manuellement des allèles non identifiés. Les résultats sont exportables au format Excel.

- *Comparaison des profils obtenus par MLVA*

Le logiciel BioNumerics (Applied Maths) est utilisé pour rassembler tous les résultats de génotypage, ainsi que les informations liées à chaque colonie analysée (Pays d'origine, Région, type de vin etc.). Les profils obtenus par MLVA se présentant comme des profils numériques, ils sont facilement manipulables. La présence de tous les résultats dans une

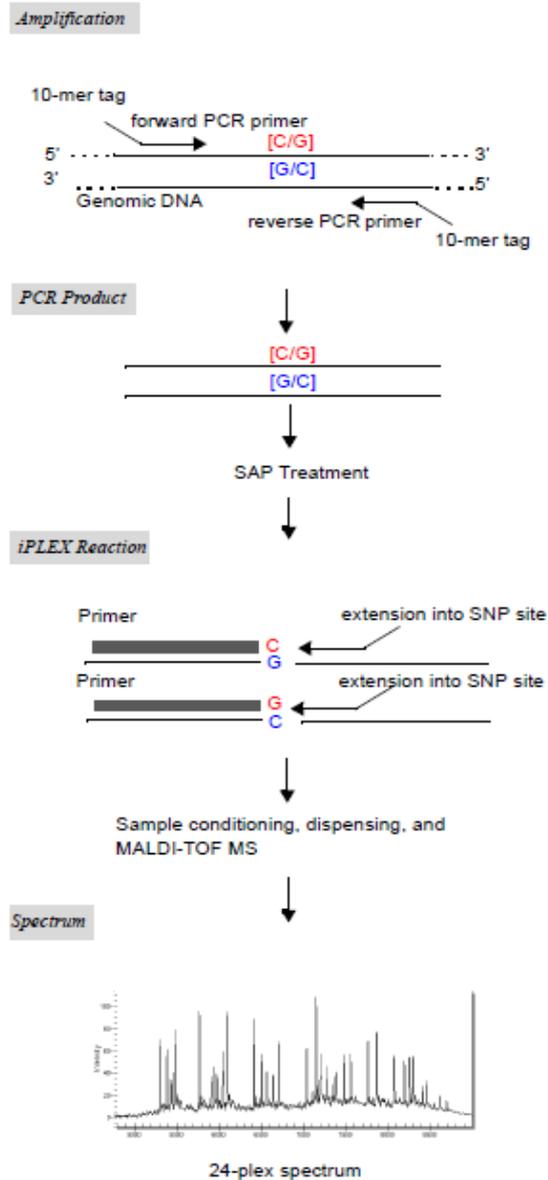


Figure 11. Processus de réalisation du génotypage de SNP par le kit iPLEX (Sequenom) (D'après Oeth *et al.* 2006).

seule base de données permet la comparaison rapide des profils des colonies analysées par la création d'arbres de distance. Il est possible aussi de comparer les résultats en les groupant en fonction des différentes informations connues pour les isolats analysés.

5.5. Génotypage de SNP grâce au kit iPLEX Gold de Sequenom

Le principe du génotypage multiplexé par analyse de SNP grâce au kit iPLEX Gold (Sequenom), repose sur l'amplification simultanée de 40 fragments contenant un SNP, suivi d'une extension d'amorce permettant d'amplifier uniquement le SNP d'intérêt. L'identification des SNP est réalisée par la suite grâce à un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization- time-of-flight mass spectrometry) (Figure 11). Cette méthode étant haut débit, il est possible d'analyser plusieurs centaines d'échantillons à moindre coût et de manière assez rapide. Elle est beaucoup utilisée en analyse biomédicale et pour l'étude des bactéries pathogènes. Toute les étapes du génotypage, du design des amorces jusqu'à l'export des résultats, ont été réalisées à la plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux (cgfb). Chaque étape se déroule dans une pièce et avec du matériel dédiés pour diminuer au maximum les risques de contamination.

Critères de choix des SNP et design d'amorces

* Choix des SNP : Une liste de SNP spécifiques des groupes phylogénétiques de l'espèce *O. oeni* a été établie par comparaison des core génomes de souches appartenant au même groupe phylogénétique (Hugo Campbell-Sills, communication personnelle). Une présélection de SNP est réalisée en vérifiant la présence du SNP sur un gène présent en une seule copie sur le chromosome. L'absence de SNP à moins de 100 pb de proximité est vérifiée par alignement et comparaison des séquences des gènes contenant le SNP. Seuls les SNP non synonymes sont conservés.

* Design d'amorces : Les SNP sélectionnés ainsi que leurs séquences flanquantes, sont transmis à la plateforme de génotypage qui se charge de dessiner les amorces. Le logiciel MassARRAY Assay Designer (Sequenom) dessine 2 types d'amorces : 1/ des amorces avec une queue 10-mer, utilisées pour la PCR d'amplification des fragments contenant les SNP, 2/

des amorces utilisées pour la réaction iPLEX d'extension d'amorce. Le logiciel sélectionne les couples d'amorces compatibles avec la réalisation d'une PCR multiplex avec, dans notre cas, 40 couples d'amorces. Au final 40 SNP sont choisis et 40 x 2 couples d'amorce sont dessinés. Le logiciel génère aussi le fichier contenant les différentes masses en fonction des bases incorporées lors de la réaction iPLEX. Cela permettra au logiciel, lors de l'analyse par le spectromètre de masse, de déterminer la nature des bases incorporées. Les différentes amorces, ainsi que les différents produits d'extension avec leur masse, sont indiqués dans l'annexe 7.

Amplification des SNP grâce au kit iPLEX Gold

La réaction d'amplification des SNP par le kit iPLEX Gold se fait en 4 étapes, permettant d'obtenir au final des produits PCR désalinisés contenant uniquement des amorces avec leur extension SNP (Figure 11).

* 1 ère étape : Amplification d'un fragment d'environ 100 pb contenant le SNP grâce à des amorces possédant une queue 10-mer. Une réaction PCR multiplex est réalisée avec un mix PCR contenant les 40 couples d'amorces sélectionnés. La réaction se déroule dans une plaque PCR 384 puits contenant les ADNs des échantillons à analyser, ainsi qu'un contrôle positif du mix et un contrôle négatif. Le programme PCR est celui d'une PCR classique, avec une étape initiale de dénaturation de 2 min à 95°C suivie de 45 cycles de 30 s à 95°C, 30 s à 56°C, 60 s à 72°C, et une étape finale d'élongation de 5 min à 72°C.

* 2 ème étape : Neutralisation des dNTPs non-incorporés. La réaction est réalisée en ajoutant aux produits PCR de la phosphatase alcaline « SAP » (Shrimp Alkaline Phosphatase), qui permet de cliver les phosphates des dNTPs, pour éviter toute interaction lors des étapes suivantes. La réaction est réalisée par incubation de 40 min à 37°C, suivi d'un cycle de 5 min à 85°C.

* 3 ème étape : Réaction iPLEX. Elle correspond à une PCR qui permet l'extension d'amorce d'une seule base qui correspond au SNP. Les amorces ont été dessinées de telle sorte qu'elles vont s'hybrider de façon adjacente au SNP d'intérêt. Cette réaction est réalisée en ajoutant dans les produits PCR précédents, un nouveau mix PCR contenant les 40 couples d'amorces d'extension et des nucléotides dont la masse a été modifiée. Le

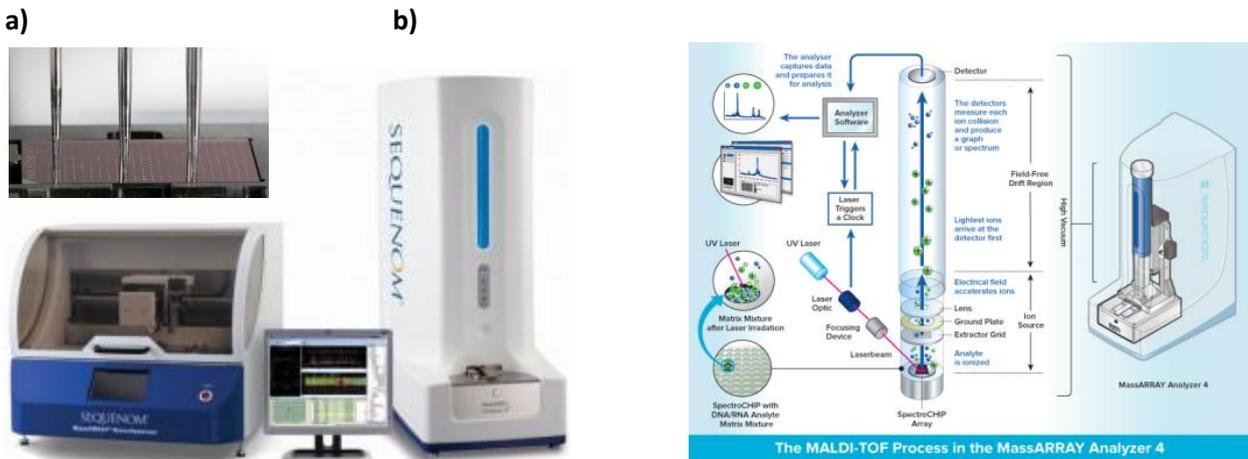


Figure 12. Dispositif Sequenom pour le génotypage par SNP. a) Nanodispenser, transfère les produits d'extension d'amorces sur une micropuce SpectroCHIP. b) MassARRAY Analyser, spectromètre de masse qui va analyser les produits d'extension d'amorces par MALDI-TOF.

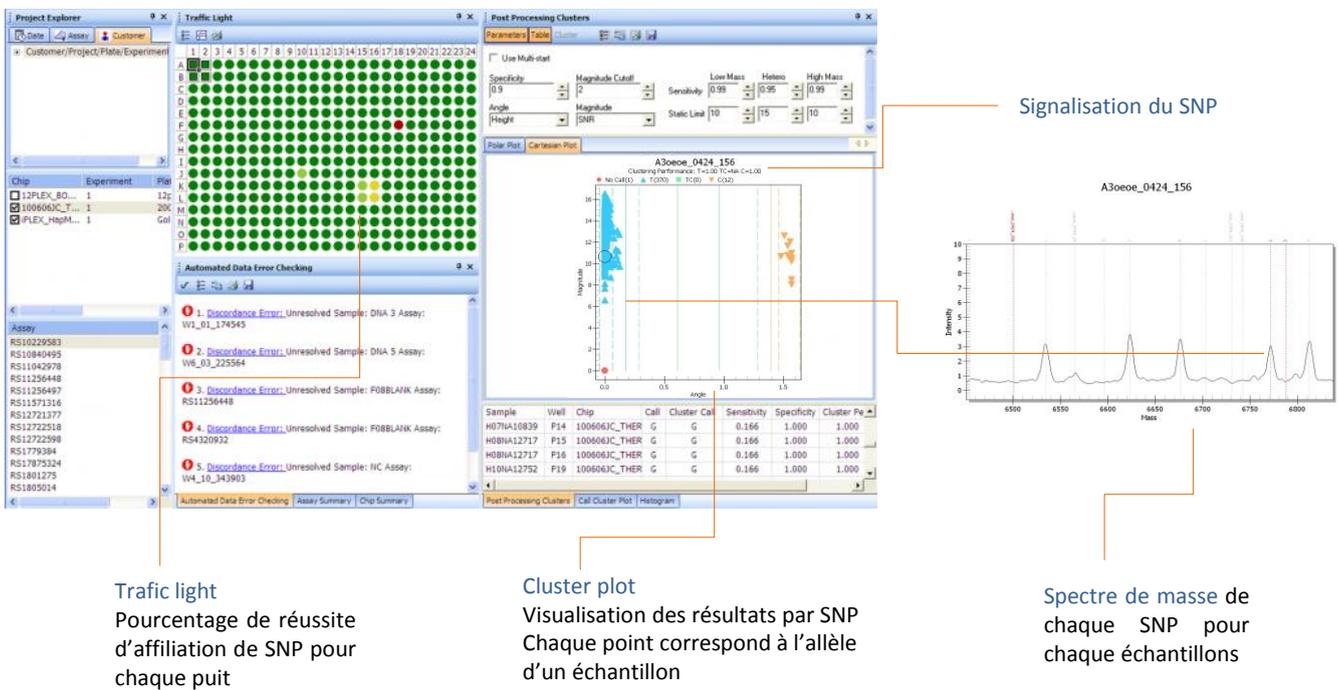


Figure 13. Visualisation des résultats du génotypage d'une micropuce par le logiciel MassARRAY Typer Software (Sequenom).

programme d'extension est particulier. Il comprend, en plus des étapes initiales de dénaturation et finale d'élongation, 40 cycles très courts de 5 s à 94°C, 5 s à 52 et 5 s à 80°C, les étapes à 52 °C et 80°C étant elles-mêmes répétées 5 fois dans chaque cycle.

* 4 ème étape : Dilution et désalinisation des produits de la réaction iPLEX. De l'eau ultra pure et une résine (SpectroCLEAN) fournie avec le kit iPLEX sont ajoutées aux produits de la réaction d'extension. Une centrifugation est réalisée et permet de séparer les produits d'extensions des autres constituants du mix.

Spotting : dépôt des échantillons sur micro-puce

Une fois les produits d'extension d'amorce dilués et dessalés, les échantillons sont placés dans un robot « MassARRAY Nanodispenser » qui transfère les produits d'une plaque PCR 384 puits sur une puce SpectroCHIP (Figure 12a).

Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La micro-puce est placée dans un spectromètre de masse « MassARRAY Analyser » qui analyse les produits d'extension d'amorce à partir du temps de vol (Time Of Flight, TOF) après désorption-ionisation laser assistée par matrice (Figure 12b) (Maxtrix Assisted Laser Desorption Ionisation, MALDI). L'acquisition des spectres se fait en temps réel grâce au logiciel SpectroAcquire. Les données sont automatiquement sauvegardées et les résultats sont visualisés grâce au logiciel MassArray Typer Softwar (Figure 13), qui détermine les génotypes en fonction des masses des produits analysés. Ce logiciel permet également de visualiser les résultats de chaque SNP et de vérifier ainsi les échantillons dont les résultats sont ambigus (résultats négatifs, homozygotes, faux positifs).

Traitement des résultats de génotypage de SNP

Un des avantages de la technique de génotypage de SNP est l'obtention de résultats bruts presque prêts à l'emploi. Les résultats se présentent sous forme d'un fichier Excel comprenant autant de colonnes que de SNP et autant de lignes que d'échantillons analysés, avec à chaque fois, la base correspondant au SNP. Il est donc possible de les exporter facilement dans les logiciels d'analyse comme BioNumerics (Applied Maths). Afin de comparer l'ensemble des isolats testés, les SNP ont été rassemblés en une seule séquence

concaténée, pour chaque souche, au format FASTA. Le fichier a ensuite été converti au format MEGA pour être exploitable par le logiciel MEGA 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

6. Analyses bioinformatiques et biostatistiques

6.1. Comparaison d'une séquence nucléique avec des banques de données

Une technique utilisée pour identifier une espèce bactérienne par une méthode moléculaire, est la comparaison de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S. Pour cela la séquence du gène obtenue après amplification par le couple d'amorce BSF8/BSR1541 et séquençage, est comparée, grâce à l'outil « BLAST » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) à une base de donnée de séquences nucléiques (NCBI).

6.2. Analyses phylogénétiques

A travers l'analyse de similitudes entre des séquences nucléiques ou protéiques, la phylogénie permet d'étudier les relations de parenté ou la proximité entre des individus ou taxons. Nous avons utilisé les résultats de génotypage de SNP et une approche phylogénétique pour analyser la proximité génétique entre les souches isolées lors de cette étude.

Neighbor – Joining ou méthode du plus proche voisin

Cette méthode repose sur les distances séparant les individus. Ces distances peuvent s'exprimer par le nombre de mutations entre des individus. Elle prend en compte la divergence moyenne de chaque séquence avec toutes les autres analysées et autorise un taux de mutation différent entre les branches. Les résultats du génotypage de SNP étant une séquence chimérique résultant de la concaténation des SNP, le modèle utilisé pour construire les arbres phylogénétiques est la p-distance. Les arbres ont été construits à l'aide du logiciel MEGA 6.06 (Tamura K *et al.*, 2007).

Calcul des valeurs de bootstrap

Le test de bootstrap permet d'évaluer la robustesse de chaque branche d'un arbre phylogénétique. Le principe est de recréer, à partir de l'alignement original, un nouvel alignement et de générer un nouvel arbre virtuel. Cette étape est répétée en général 1000 fois, et le nombre d'arbres où un embranchement est maintenu, est compté. La fréquence à laquelle cet embranchement est retrouvé correspond à la valeur de bootstrap. Plus cette valeur est élevée plus l'embranchement est fiable. Le test du bootstrap est effectué à l'aide du logiciel MEGA 6.06.

Arbre couvrant minimal ou minimum spanning tree

Un arbre couvrant minimal (ACM) permet d'avoir une représentation en étoile des différents taxons. Il connecte entre eux les taxons qui ont le moins de différences de façon à minimiser la distance additionnelle de toutes les branches. La technique est basée sur le principe de parcimonie, c'est-à-dire que, pour un groupe d'espèces, la phylogénie la plus vraisemblable sera celle qui nécessite le minimum de changements évolutifs. Les ACM sont construits à l'aide du logiciel BioNumerics (Applied Maths). Le calcul d'un ACM requiert des données suffisamment complètes pour permettre la construction d'un arbre. Cependant, BioNumerics utilise un algorithme qui permet de créer des types hypothétiques lorsque des données sont manquantes.

- *ACM avec les données MLVA*

Le logiciel BioNumerics ne sépare pas les profils numériques possédant un nombre de répétitions incomplètes, lorsque le profil est identique pour une autre souche sur d'autres TR. Un autre paramètre est donc nécessaire pour les séparer. Un numéro de profil a été intégré aux valeurs numériques des 5 TR. Celui-ci a été obtenu par construction d'un dendrogramme de distance pour chaque valeur de TR. L'ACM est ensuite calculé en classant les variables de chaque TR et numéro de profil par catégorie (Calculate minimum spanning tree, Coefficient : Categorical).

- *ACM avec les données SNP*

Construire un ACM directement à partir des données de génotypage SNP est impossible avec BioNumerics. Il faut premièrement calculer une matrice de similarité, puis construire l'ACM à partir de cette matrice.

6.3. Analyses biostatistiques : Indices de diversité

Appréhender la diversité d'un site ou d'une niche écologique peut être une tâche assez complexe. Plusieurs modèles mathématiques ont été développés pour permettre de mesurer la diversité, en se basant sur des indicateurs tels que le nombre d'espèces et/ou le nombre d'individus pour chaque espèce. Ce sont les indices de diversité. De ce fait, il est assez commun d'utiliser conjointement plusieurs indices de diversité pour traduire la diversité sur un site d'étude (échantillonnage ou zone géographique étudiée).

Indice de diversité de Shannon Weaver

L'indice de Shannon Weaver est un des indices les plus fréquemment utilisés en écologie. Il permet de mesurer l'hétérogénéité de la diversité dans un milieu donné, en prenant en compte le nombre d'espèces et l'abondance des individus de chacune des espèces. Il est dépendant de la taille de l'échantillonnage. Sa valeur varie de 0 à $\log S$ (S étant le nombre total d'espèces dans le milieu). Cet indice a été utilisé pour évaluer la diversité des souches d'*O. oeni* à travers les régions étudiées. Il est défini par :

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Où : i = une espèce du milieu

S = nombre total d'espèces dans le milieu (ou richesse spécifique du milieu)

P_i = proportion d'une espèce i par rapport au nombre total d'espèces S .

Avec : $P_i = n_i/N$

n_i = le nombre d'individus pour l'espèce i et N = effectif total (les individus de toutes les espèces)

Cet indice a été calculé à l'aide du logiciel d'analyse de diversité EstimateS 9.1.0. (Colwell and Elsensohn, 2014) qui permet de calculer les indices de diversité les plus courants, mais aussi de réaliser des analyses de biostatistique. EstimateS 9.1.0. réalise des tirages aléatoires, parmi les jeux de données qui lui sont fournis et calcule une valeur de diversité estimée pour chaque tirage. Cela permet de construire les courbes de raréfactions de la diversité pour chaque site étudié. Le logiciel réalise également des extrapolations du nombre d'espèces (souches dans notre cas) qu'il serait probable d'identifier, en se basant sur les données observées.

Indice de Pielou

L'indice de Shannon est souvent accompagné de l'indice de Pielou. Cet indice mesure la régularité de la répartition des individus au sein des espèces, une espèce représentée abondamment ou par un seul individu n'apportera pas la même contribution à l'écosystème. L'indice de Pielou est le rapport entre l'indice de Shannon et la valeur maximale théorique. Lorsque sa valeur tend vers 1 lorsque, la répartition des individus est équiprobable. Lorsqu'elle tend vers 0, la répartition est hétérogène et il y a des espèces dominantes. Il est défini par :

$$J' = H' / H'_{max}$$

Avec $H'_{max} = \log S$ (S = nombre total d'espèces)

7. Partenariats et sous-traitance

7.1. Entreprise de séquençage et de génotypage

Les produits PCR destinés au séquençage ou au génotypage sont expédiés à différentes entreprises spécialisées dans le domaine.

- Produits PCR 16 S : Pour identifier une espèce, les produits d'amplification de l'ADNr 16S sont expédiés à la société Eurofins Genomics pour être séquencés (Ebersberg, Allemagne).
- Produits PCR multiplex-VNTR : Le mélange des produits PCR additionnés de Fromamide HiDi sont expédiés à la Plateforme Séquençage Cochin, (Eurofins Genomics, Paris) pour être analysés sur un séquenceur 3130 Genetic Analyzer.

- Géntotypage par analyse de SNP : Toute la mise au point technique de la méthode, depuis le design des amorces jusqu'à la réalisation du génotypage, a été réalisée par le personnel qualifié de la Plateforme Génome Transcriptome Bordeaux (INRA, Pierroton).
- Séquençage des génomes : Les ADN génomiques des souches ont été expédiés à la société MACROGEN (Seoul, Corée) et séquencés par la technique Illumina sur un appareil HiSeq2000.

7.2. Contrôle qualité des lies et suivi des essais

Les essais de fermentations malolactiques avec les lies ainsi que les contrôles de la qualité sanitaire des lies (détection de *Brettanomyces bruxellensis* par qPCR) ont été réalisés en partenariat avec la cellule de transfert Microflora, sur le site de l'SVV à Villenave d'Ornon.

7.3. Collecte d'échantillons et essais terrains

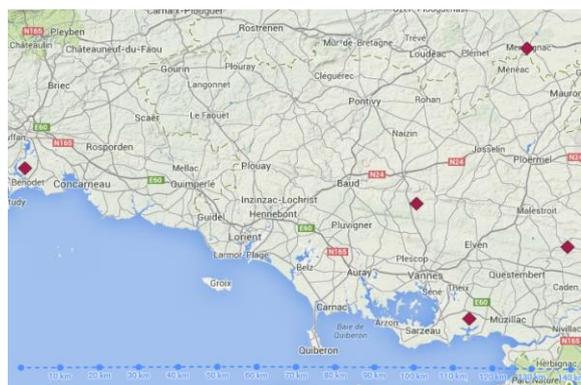
La collecte des échantillons de vins pendant les vinifications a été réalisée par les différents partenaires des projets « WildWine » et « LevainBio ». Les échantillons provenant des différentes régions ont été collectés par les centres de l'institut français de la vigne et du vin (IFV) en Aquitaine, Bourgogne, Languedoc – Roussillon, et Val de Loire. En Aquitaine, la majorité des échantillons a été fournie par le Syndicat des vignerons Bio d'Aquitaine (SVBA). Les échantillons de cidre ont été collectés par le centre de l'Institut Français des Produits Cidricoles (IFPC). Les essais dans les exploitations ont été menés dans des exploitations partenaires des deux projets, à St. Emilion au Château Bellevue, et au Domaine Du Bourdieu situé dans l'entre deux mers.

RESULTATS ET DISCUSSION

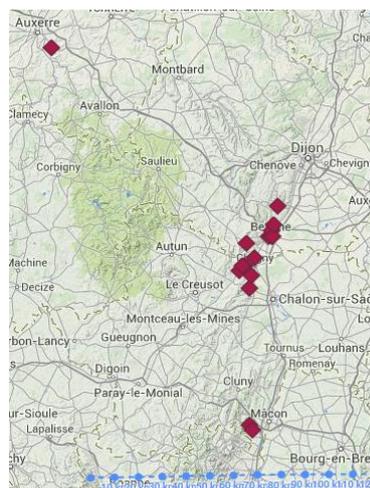
CHAPITRE PREMIER

**Echantillonnage de vins et cidre en cours de FML de six
régions et isolement des colonies d'*O. oeni*.**

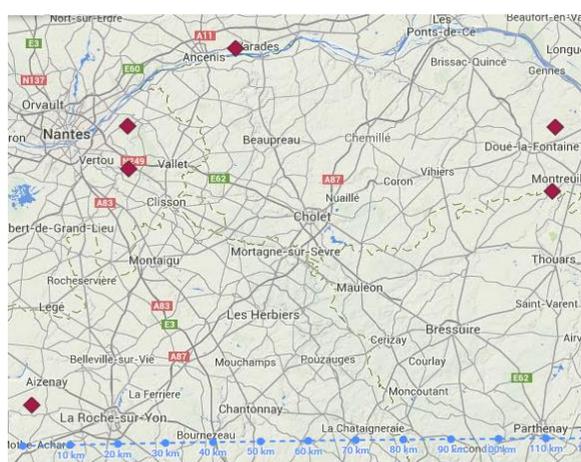
A M. Gérard Darné



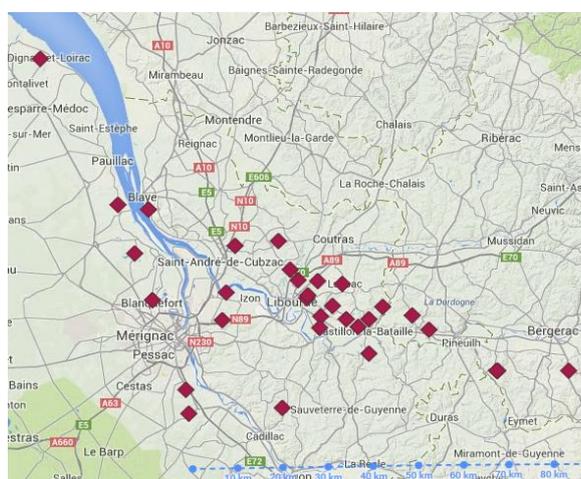
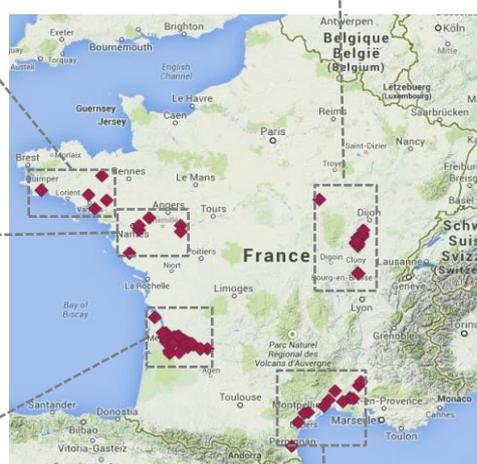
a) Bretagne



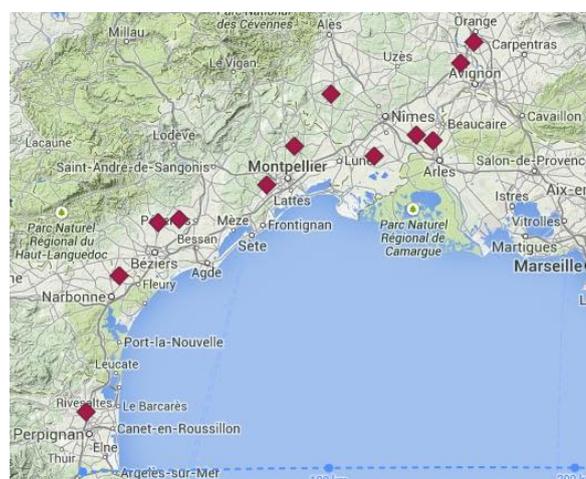
b) Bourgogne



c) Val de Loire



d) Aquitaine



e) Languedoc - Roussillon

Figure 14. Localisation géographique des sites de prélèvements en France.

Carte de France et zooms dans 5 régions obtenus à l'aide de Google Maps Engine Lite. Chaque marqueur rouge représente une exploitation échantillonnée. Si les échantillons d'une exploitation proviennent d'une appellation différente, un marqueur supplémentaire est ajouté pour l'appellation.

1. Choix des vins et cidres analysés

Un échantillonnage a été réalisé pour obtenir des vins de différentes régions viticoles en nombres suffisants pour qu'ils soient représentatifs de celles-ci. Des échantillons de cidre ont également été collectés afin de comparer les souches d'*O. oeni* de vin et de cidre. Tous les échantillons ont été collectés au cours de la FML pour identifier uniquement des souches qui s'étaient bien développées dans les produits. Ils provenaient en quasi-totalité d'exploitations en agriculture biologique et n'utilisant pas de levains malolactiques commerciaux. Celles-ci sont réparties dans quatre régions viticoles françaises: l'Aquitaine, la Bourgogne, le Languedoc Roussillon, le Val de Loire ; et une région cidricole : la Bretagne (Figure 14). Un échantillonnage a également été réalisé dans des exploitations des principales zones de production du Liban, afin de pouvoir comparer les souches d'*O. oeni* des régions françaises et celles d'une région très distante (Figure 15).

En plus de provenir d'origines géographiques diverses, les échantillons provenaient de types de vins différents : vin rouge, vin blanc et vin rosé, de cépages spécifiques ou autorisés dans ces régions. Les cépages analysés étaient, en Aquitaine : Merlot, Cabernet-Sauvignon, Cabernet Franc et Petit Verdot, en Bourgogne : Pinot Noir et Chardonnay, dans le Languedoc Roussillon : Cabernet-Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Cinsault, Mourvèdre et Syrah, dans de le Val de Loire : Cabernet Franc, Gamay, Melon de Bourgogne. Le Liban est un cas particulier pour la diversité des cépages utilisés, car il n'existe pas de réglementation sur l'utilisation ou non de cépages. De plus, peu de cépages autochtones y sont utilisés en vinification. Les variétés les plus répandues sont des cépages français ou provenant d'autres pays européens comme l'Espagne ou l'Italie. Les échantillons obtenus proviennent des cépages suivants : Arinarnoa, Cabernet-Sauvignon et Franc, Caladoc, Merlot, Mourvèdre, Petit Verdot, Pinot Noir, Syrah et Tempranillo.

En Bretagne, les échantillons de cidres ont été collectés dans 5 cidreries, 4 d'entre elles sont des cidreries artisanales la dernière bénéficie du label « Agriculture Biologique ». Elles utilisent un mélange de pommes de différentes variétés qui sont produites dans des vergers situés à proximité des cidreries. Comme pour les vins, les prélèvements ont été réalisés dans les cidres pendant les FML spontanées.

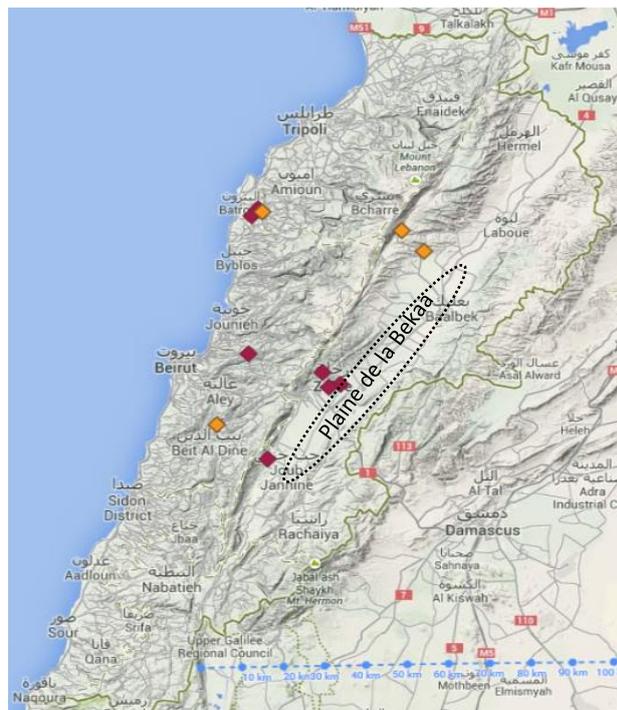


Figure 15. Localisation géographique des sites de prélèvements au Liban.

Carte du Liban obtenue sur Google Maps Engine Lite. Les marqueurs rouges représentent les caves échantillonnées. Les marqueurs jaunes indique les vignobles éloignées des exploitations dont sont issus certains vins échantillonnés.

2. Echantillonnage

Au Liban, l'échantillonnage a été réalisé en 2011. Trente-deux échantillons de vins rouges en cours de FML ont été prélevés dans 9 exploitations. Cinq exploitations étaient situées dans la plaine de la Bekaa ou dans un secteur proche. Toutes vinifiaient des raisins de cette zone. Les autres exploitations étaient localisées dans des zones distantes de 20 à 60 km de la plaine de la Bekaa, sur le versant ouest de la chaîne de montagne du Mont Liban (Figure 15). Elles vinifiaient des raisins de leur zone ainsi que des raisins provenant de la plaine de la Bekaa. Tous les échantillons ont été collectés au mois de novembre.

En 2012, ce sont les régions Aquitaine, Languedoc-Roussillon et Bourgogne qui ont été analysées. Les prélèvements ont été réalisés par des partenaires des projets LevainsBio et Wildwine (Annexe 3). En Languedoc-Roussillon, les premiers échantillons de vins rouges en FML ont été collectés dès la mi-septembre et jusqu'au début du mois de novembre. L'échantillonnage a couvert une zone de 215 km de long, allant de Rivesaltes jusqu'à la région d'Orange (Figure 14e). Trente-six prélèvements ont été réalisés dans 3 à 6 cuves de 12 exploitations situées sur les appellations de Rivesaltes, Aude, Hérault, Gard, ainsi que sur les côtes du Rhône (Tableau 5). En Aquitaine, les prélèvements se sont échelonnés de mi-octobre jusqu'à début décembre 2012 sur une zone de 130 km, allant du Médoc jusqu'à Bergerac (Figure 14d). Une à 5 cuves ont été échantillonnées dans 29 exploitations, ce qui a permis de récolter 69 échantillons de vins en cours de FML. Ces exploitations sont réparties sur les appellations de Bordeaux : Médoc, Haut-Médoc, Pessac Léognan, Entre-deux-mers, Blaye/ Côtes-de-Bourg, Saint-Emilion et Bergerac. Une deuxième série de prélèvements, réalisée pendant les FML du millésime 2013, a permis de récolter 11 échantillons supplémentaires, provenant de 4 exploitations. Au total, 80 échantillons provenant d'Aquitaine ont été analysés. En Bourgogne, l'échantillonnage a débuté en décembre 2012. Il a été stoppé en fin d'année avec l'arrêt des FML spontanées, puis a redémarré de février à fin mai 2013 avec la reprise des FML. Des prélèvements ont été réalisés sur des vins rouges et blancs dans 12 exploitations réparties sur une zone de 100 km, allant du Mâconnais jusqu'au vignoble de Chablis (Figure 14b). Des prélèvements dans 6 exploitations ont été effectués sur le millésime 2013, durant les FML de printemps 2014. Au total, 70 échantillons ont été analysés.

Tableau 5. Exploitations et échantillons collectés en cours de FML dans 6 régions.

Pays	Régions	Millésimes	Nombre d'exploitations	Nombre d'échantillons
France	Aquitaine	2012 – 2013	29 - 4* (31)	69 - 11*
	Bourgogne	2012 – 2013	12 - 6* (12)	59 - 11*
	Languedoc Roussillon	2012	12	36
	Val de Loire	2013	5	8
France	Bretagne Cidre	2013	5	9
Liban		2011	9	32
Total			74	235

*Les deux chiffres correspondent aux millésimes 2012 et 2013, respectivement

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre total d'exploitations. 2 exploitations en Aquitaine et 6 en Bourgogne ont été échantillonnées 2 années de suite.

Tableau 6. Identification des colonies de bactéries lactiques par MLVA.

Pays	Région	Nombre d'échantillons	Nombre de colonies analysées	Résultat de typage par MLVA	
				Positif / <i>O. oeni</i>	Négatif / <i>O. oeni</i>
France	Aquitaine	80	1125	1072	63
	Bourgogne	70	895	837	40 + <u>18</u> *
	Languedoc Roussillon	36	534	514	20
	Val de Loire	8	120	117	3
France	Bretagne (Cidre)	9	135	104	13 + <u>18</u> *
Liban		32	403	353	50
Total		235	3212	2997	225

Environ 14 colonies de bactéries lactiques ont été analysées pour chaque échantillon par PCR VNTR pour identifier celles appartenant à l'espèce *O. oeni*

* Les chiffres soulignés indiquent le nombre de colonies analysées par séquençage du gène de l'ARN 16S.

L'échantillonnage dans le Val-de-Loire et dans les cidreries de Bretagne a eu lieu en 2013. En Val de Loire, 8 échantillons de vins rouges et blancs ont été prélevés dans 5 exploitations des appellations Saumur, Coteaux de la Loire et Muscadet, sur une zone de 120 km (Figure 14c). En Bretagne, 5 cidreries ont été échantillonnées. Trois se situent dans le Morbihan, une sur la côte d'Armor et une dans le Finistère, et bénéficie de l'AOP cidre de Cornouaille (Figure 14a). En moyenne, 2 échantillons de chaque cidrerie ont été analysés.

Au total, ce sont 226 échantillons de vins et 9 de cidres qui ont été collectés au cours de FML spontanées dans 74 exploitations (Tableau 5). Comme indiqué dans les chapitres suivants, d'autres échantillons ont été prélevés dans les mêmes exploitations, mais à différents stades de la vinification. Ils n'ont pas été utilisés pour l'analyse de la diversité des souches d'*O. oeni* pendant la FML et seront traités séparément.

3. Dénombrement des populations de bactéries lactiques

Dès réception, chaque échantillon a été dilué en série, puis déposé sur boîte de Petri afin de dénombrer la population de bactéries lactiques. Comme attendu pour des vins en cours de FML, la population moyenne de bactéries lactiques était de 1 à 3×10^7 UFC/mL, excepté pour les échantillons de vins de Bourgogne et pour les cidres, où la population de bactéries lactiques était généralement inférieure de moitié (5 à 7×10^6 UFC/mL). Le pH acide des vins de Bourgogne, ainsi que les basses températures durant la FML de ces vins et des fermentations des cidres, sont deux facteurs qui peuvent ralentir le développement des bactéries lactiques et expliquer ce plus faible niveau de population (Annexe 3). En complément des échantillons de vins, des échantillons de lies de FML ont été collectés dans certaines exploitations et ont été inclus à l'analyse. Ils contenaient une population de bactéries lactiques 10 fois supérieure à celle dénombrée dans le vin correspondant.

4. Identification des colonies d'*Oenococcus oeni*

Le choix du nombre de colonies à analyser par échantillon a été fixé en nous basant sur la littérature et sur le premier échantillonnage réalisé au Liban en 2011. On trouve dans la littérature qu'il est classique, dans les études de diversité et de sélection de souches de bactéries et notamment d'*O. oeni*, d'analyser de 5 à 50 colonies par échantillon (col/éch) (Cañas *et al.*, 2009; Cappello *et al.*, 2010; Gonzalez-Arenzana *et al.*, 2012). Lopez *et al.*, (2007) ont analysés 3 col/éch pour une étude réalisée sur 13 exploitations, Gonzales *et al.*, (2013) 15 col/éch pour une étude de 3 ans sur 10 exploitations, et Mesas *et al.*, (2011) 20 à 40 col/éch pour une autre étude sur 4 exploitations. Plus le nombre d'exploitations ou d'échantillons analysés est grand, moins les auteurs analysent de colonies.

Au Liban, nous avons prélevé plusieurs échantillons au même moment dans chaque cave et, en analysant une moyenne de 40 colonies par exploitation, nous avons constaté qu'il était possible d'isoler une moyenne de 8 souches différentes. Une autre expérimentation réalisée sur des échantillons en fin de FA, a permis d'isoler 11 souches parmi les 39 colonies analysées. D'après ces résultats, nous avons estimé qu'il serait suffisant d'analyser 15 colonies par échantillon pour identifier le maximum de souches majoritaires. Ce nombre est tout à fait comparable au nombre de colonies qui sont analysées dans des études similaires (González-Arenzana *et al.*, 2013). Nous avons également choisi d'analyser des échantillons de plusieurs cuves dans chaque exploitation, pour identifier un maximum de souches majoritaires de ces exploitations. Dans notre cas, 235 échantillons ont été récoltés dans 74 exploitations, ce qui représente une moyenne de 3 échantillons par exploitation.

Pour chaque échantillon, 15 colonies ont été repiquées et cultivées en milieu jus de raisin liquide, afin de produire suffisamment de biomasse pour la mise en collection des bactéries et suffisamment d'ADN matrice pour la réalisation des PCR de typage (PCR « sur colonies », réalisées à partir de biomasse obtenue après culture, voir la section Matériels et méthodes). Pour certains échantillons, la population de bactéries lactiques était inférieure à la moyenne et n'a pas permis de repiquer 15 colonies. Dans ces cas, la totalité des colonies a été prélevée. Au total, 3 212 colonies ont été analysées, soit une moyenne de 13,6 par échantillon.

Pour identifier les colonies appartenant à l'espèce *O. oeni*, un premier lot de 48 colonies a été analysé par une méthode de PCR spécifique de l'espèce *O. oeni*, qui est basée sur l'utilisation du couple d'amorces TR1f et TR1r, et sur l'amplification d'une séquence répétée en tandem, appelée TR1 (Claisse and Lonvaud-Funel, 2012). Ce fragment est composé de plusieurs répétitions d'une séquence de 9 pb, dont le nombre de répétitions varie fortement entre les souches. L'utilisation de cette PCR nous permet, d'une part, d'identifier les colonies appartenant à l'espèce *O. oeni* et, d'autre part, de voir si les colonies typées sont différentes. Une seule colonie sur 48 n'a pas donné d'amplification lors de cet essai, ce qui indiquait que la très grande majorité des bactéries présentes dans les échantillons étaient des *O. oeni*. Nous avons alors choisi d'analyser directement toutes les colonies isolées par la méthode MLVA (Claisse and Lonvaud, 2014), qui permet d'identifier, à l'aide d'une PCR multiplex-VNTR, l'espèce *O. oeni* et de différencier les souches d'*O. oeni* simultanément. Cette PCR est réalisée avec 5 couples d'amorces qui amplifient 5 régions répétées en tandem, dont la région TR1, qui sont spécifiques de l'espèce *O. oeni*. L'analyse de la taille des séquences répétées en tandem permet d'obtenir le nombre de répétitions de chaque fragment et de construire un profil numérique qui sera différent pour chaque souche. Au total, 3 212 colonies de bactéries lactiques ont été analysées par MLVA. Des produits d'amplification ont été obtenus pour 2 959 d'entre-elles, ce qui indique que toutes ces colonies appartenaient à l'espèce *O. oeni* (Tableau 6). En tenant compte des 38 colonies d'*O. oeni* supplémentaires qui ont été identifiées par PCR spécifique dans des échantillons de cidre (voir ci-dessous), ce sont au total 2 997 colonies d'*O. oeni* qui ont été isolées.

Dans les échantillons en cours de FML analysés, *O. oeni* représente donc plus de 93% de la population de bactéries lactiques. La proportion est de 95,3% en Aquitaine, 93,5% en Bourgogne, 96,2% dans le Languedoc-Roussillon, 97,5% dans le Val de Loire, 87,5% au Liban et 77,0% dans le cidre. La fréquence d'*O. oeni* est donc similaire dans toutes les régions viticoles françaises et légèrement inférieure au Liban. C'est dans le cidre que cette proportion est la plus faible. Des études réalisées sur les populations de bactéries identifiées dans le cidre pendant la FML, ont montré la présence d'*O. oeni* parmi les espèces majoritaires, mais dans des proportions moins importantes et conjointement avec des espèces de lactobacilles (Dueñas *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2010).

5. Analyse des colonies « négatives » en MLVA

Pour 215 des 3212 colonies analysées par la méthode MLVA, aucune amplification n'a été obtenue, ce qui représente en moyenne 1 colonie non identifiée par échantillon. Ces résultats négatifs peuvent s'expliquer soit par des problèmes techniques, soit parce que les colonies analysées ne sont pas des *O. oeni*. En effet, chaque colonie a été repiquée en milieu liquide pendant 7 jours avant d'utiliser la biomasse obtenue pour réaliser les PCR, mais les vitesses de croissance des isolats étant différentes, cette phase de culture de 7 jours était peut être insuffisante dans certains cas. Par ailleurs, même si *O. oeni* est l'espèce la plus souvent associée à la FML, il n'est pas surprenant de rencontrer parfois d'autres espèces (Lonvaud-Funel *et al.*, 1991; Renouf *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2008; Cañas *et al.*, 2009).

Dans les échantillons de vin de Bourgogne et de cidre, plusieurs colonies provenant d'un même échantillon ont donné des résultats de PCR « négatifs ». Dans ces cas, les colonies ont été identifiées par séquençage du gène de l'ARN 16S, après amplification par le couple d'amorces universelles BSF8/BSR1541. Pour deux échantillons de vin blanc de Bourgogne, sur les 15 colonies isolées pour chacun, 9 n'étaient pas identifiés par la méthode MLVA (Tableau 6). En comparant la séquence de leurs gènes de l'ARN 16S avec les bases de données disponibles en ligne, nous avons obtenu 99% d'identité avec l'espèce *Pediococcus damnosus*. Il n'est pas étonnant de rencontrer cette espèce dans le vin. Elle est considérée comme une bactérie d'altération car certaines souches sont capables de produire des exopolysaccharides qui rendent les vins « filants » (Walling *et al.*, 2005). Après entretien avec le partenaire qui avait fourni ces échantillons, il a été confirmé que plusieurs d'entre eux avaient ce caractère « filant », cela est semble-t-il assez courant, lors de la FML, dans certaines exploitations (V. Gerbaux, communication personnelle). Dans les échantillons de cidres, 56 isolats étaient négatifs après le typage par MLVA (Données non montrées). Ils ont été identifiés par séquençage du gène de l'ARN 16S. Trente-huit appartenaient à l'espèce *O. oeni*, 10 à l'espèce *Lactobacillus paracollinoides*, 8 à l'espèce *Zymomonas mobilis*. Pour plus de clarté les chiffres présentés dans le tableau 6 sont les résultats après les identifications à l'aide des ADNr 16S. Les colonies d'*O. oeni* négatives après le typage par MLVA étaient probablement dues à des problèmes techniques lors de la mise en culture des colonies ou la réalisation des PCRs. L'identification de *Z. mobilis* représente un cas particulier, car tous les

isolats proviennent exclusivement du même échantillon. Au contraire *L. paracollinoïdes* a été isolé dans 5 échantillons provenant de 3 cidreries.

6. Discussion

Depuis les premiers inventaires réalisés dans les années 1960 pour identifier les bactéries lactiques responsables de la FML (Peynaud et Domercq, 1968), de nombreux travaux ont été conduits pour analyser la diversité de l'espèce *O. oeni*. Ici, nous avons choisi d'analyser 1/ des échantillons provenant de différentes régions et de différents produits, 2/ un nombre assez importants d'échantillons pour bien représenter la diversité de chaque région et 3/ une quinzaine de colonies de bactéries lactiques par échantillon, ce qui est classique pour ce genre d'étude et apparemment suffisant pour identifier les souches majoritaires au cours de la FML. Au total, cela nous a conduit à analyser plus de 3200 colonies bactériennes, ce qui, à notre connaissance, représente l'inventaire le plus important réalisé jusqu'à aujourd'hui.

La plupart des études similaires réalisées précédemment se sont focalisées sur une seule région de production. Par exemple, cela a été réalisé en Italie, pour les vins de Primitivo et de Malvasia (Cappello *et al.*, 2008, 2010), en Espagne, dans la région de la Rioja (Gonzalez-Arenzana *et al.*, 2012; 2013), ou encore en analysant la diversité des souches dans un même vin à plusieurs étapes de la vinification (Ruiz *et al.*, 2008; Mesas *et al.*, 2011; Zapparoli *et al.*, 2012). Toutes ces études ont porté sur 8 à 41 échantillons et 37 à 925 colonies y ont été analysées. Les résultats ont permis d'identifier et de comparer les souches de ces régions, mais sans permettre d'y évaluer de façon exhaustive la diversité et sans pouvoir comparer les souches avec celles d'autres régions. Cependant, deux études ont bien été menées sur plusieurs régions. La première, réalisée en Australie, a porté sur 15 vins provenant de 7 régions (Bartowsky *et al.*, 2003). L'autre a été conduite au Portugal sur des échantillons de vin provenant de 3 régions (Marques, 2011). Mais les auteurs de ces études n'ont isolé et caractérisé que relativement peu de colonies, 100 au Portugal. En Australie les auteurs n'ont pas communiqué le nombre d'isolats mais ont identifié 17 souches (Bartowsky *et al.*, 2003; Marqués, 2011)

L'utilisation de méthodes culturales impose une limitation importante dans les études de diversité : cela ne permet d'isoler que les souches dominantes. Toutes les études réalisées précédemment sur la diversité des souches d'*O. oeni* pendant la FML indiquent la présence simultanée de plusieurs souches (Ruiz *et al.*, 2008; Cappello *et al.*, 2010; Mesas *et*

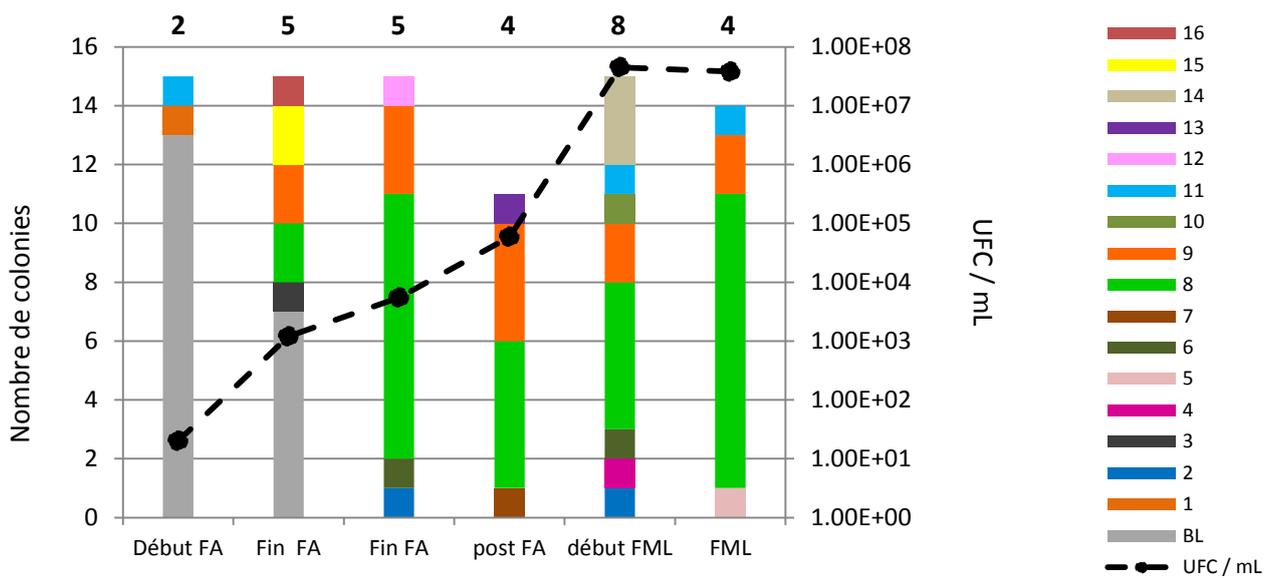


Figure 16. Evolution des souches d'*O. oeni* au cours de la vinification

Six échantillons ont été prélevés dans une même cuve de cabernet franc (château de Bellevue) depuis le début de la FA jusqu'à la fin de la FML. La population totale des bactéries lactiques a été déterminée par dénombrement sur boîte de Petri. Quinze colonies de chaque échantillon ont été analysées par MLVA selon la méthode de Claisse et Lonvaud (2014) pour identifier et différencier les souches d'*O. oeni*. Chaque couleur correspond à une souche. La couleur grise, utilisée pour « BL », indique les colonies d'autres espèces qu'*O. oeni*. Le numéro au dessus de chaque stade indique le nombre de souches différentes identifiées. L'axe secondaire indique la population totale de bactéries lactiques, exprimée en UFC/mL, pour chaque stade.

al., 2011). Quelque-soit la diversité de ces souches dans un échantillon, toutes ne pourront pas être identifiées lorsque des méthodes culturales sont mises en œuvre. Il est donc nécessaire d'analyser plusieurs colonies par échantillon pour identifier au moins les souches dominantes qui contribuent le plus à la réalisation de la FML. Idéalement, il faudrait analyser le plus grand nombre possible de colonies de chaque échantillon pour isoler un maximum de souches. Cependant, une telle approche poserait actuellement des difficultés techniques considérables et obligerait à limiter l'analyse à quelques échantillons. Parmi les inventaires réalisés précédemment, jusqu'à 40 colonies par échantillon ont été analysées, ce qui a permis d'identifier au maximum 6 géotypes différents d'*O. oeni* (Mesas *et al.*, 2011). Une analyse préliminaire nous a conduit à limiter notre analyse à 15 colonies par échantillon, car cela semblait suffisant pour identifier un maximum de souches dominantes. Ce choix était également justifié si l'on considère que la diversité des souches d'*O. oeni* évolue au cours de la vinification. En effet, Le nombre et la proportion des souches varient avant et pendant la FML (Reguant and Bordons, 2003; Ruiz *et al.*, 2008; Cappello *et al.*, 2010; González-Arenzana *et al.*, 2012). Au cours de cette étude, nous avons pu le vérifier en suivant l'évolution des souches dans une même cuve. La figure 16 montre que *O. oeni* est minoritaire en début de fermentation alcoolique (FA), puis devient la seule espèce détectée depuis la fin de la FA jusqu'à la fin de la FML. Quatre à 8 souches différentes ont été détectées à chaque stade et un total de 16 souches a été obtenu à partir de cette cuve. Dans cet exemple, les 2 souches majoritaires pendant la FML (n° 8 et 9) étaient également détectées depuis la mi-FA. L'analyse de 15 colonies pendant la FML aura donc bien permis d'identifier ces souches dominantes, qui étaient responsables de la FML.

Lors de cet inventaire, nous avons identifié une très large majorité de colonies d'*O. oeni*. Ce n'est pas étonnant, car il est bien connu que cette espèce domine largement la population de bactéries lactiques dans les vins en cours de FML (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991; Fleet *et al.*, 1984; Gonzalez-Arenzana *et al.*, 2012; González-Arenzana *et al.*, 2013). La fréquence d'*O. oeni* pendant la FML peut atteindre 100%, mais dans certains cas *O. oeni* peut être associée à d'autres bactéries comme *Pediococcus* (Davis *et al.*, 1986; Renouf *et al.*, 2007). Les différences sont vraisemblablement dues aux types de vins, particulièrement à cause du pH qui, lorsqu'il est élevé, favorise le développement des bactéries « non-*O. oeni* » (Lonvaud, 1999). En France, les vins que nous

avons analysés avaient des pH situés entre 3,16 pour les plus acides (Bourgogne) et 3,97 pour les moins acides (Languedoc-Roussillon), avec des TAV de 10,7% à 14,57%. Au Liban les pH variaient de 2,9 à 3,9 et les TAV de 12,84% à 16,6% (Annexe 3). Ce qui peut expliquer les résultats observés. Néanmoins, nous avons identifié des *Pediococcus* dans plusieurs échantillons de vins blancs de Bourgogne. Il s'agissait probablement de souches dites « filantes », car les vins dont elles provenaient avaient parfois ce caractère. Les pH de ces vins étant bien inférieurs à 4,0, ce n'est pas ce paramètre qui peut expliquer la présence de ces bactéries, mais plutôt la durée de la FML, qui se prolonge pendant plusieurs mois en raison de la basse température à laquelle elle est réalisée. Cette longue durée doit favoriser l'apparition d'autres espèces se développant plus lentement qu'*O. oeni* dans le vin (Wibowo *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991). Par ailleurs, les exopolysaccharides des souches « filantes » confèrent une certaine résistance aux stress environnementaux (Roberts, 1996), ce qui pourrait expliquer la fréquence de ces souches de *Pediococcus* et l'absence d'autres espèces, dans les vins de Bourgogne. Enfin, ce sont dans les cidres que nous avons détecté le plus de bactéries non-*O. oeni*. Cette situation n'est toutefois pas surprenante et conforme aux études antérieures (Dueñas *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 2010). Les 2 espèces identifiées dans ces produits, *L. paracollinoides* et *Z. mobilis*, y ont déjà été décrites et associées à des défauts, respectivement production d'amine biogène et maladie du framboisé (Coton and Coton, 2003; Ladero *et al.*, 2011).

La réalisation d'un inventaire portant sur plusieurs milliers de colonies n'a été rendue possible que par l'utilisation de méthodes simples, rapides et peu coûteuses, pour isoler les colonies, identifier les espèces et typer les souches. La réalisation d'étalements sur boîtes de Petri est tout à fait classique et incontournable pour obtenir les colonies bactériennes. Cependant, une fois les colonies obtenues, nous avons simplifié les procédures de mise en collection et de préparation d'ADN matrices pour la réalisation des PCR d'identification d'espèce et de typage de souche. Chaque culture de bactéries a pu être utilisée à la fois pour déposer les bactéries en collection à -80°C et pour servir de matrice PCR. Les suspensions destinées aux PCR de typage ont été déposées en microplaques de 96 puits, ce qui a permis de manipuler de nombreuses colonies simultanément. Nous avons ainsi optimisé les conditions de réalisation de PCR « sur colonie » et pu identifier la quasi-totalité des colonies par une seule réaction de PCR. Cette approche a échoué pour 225

colonies sur les 3212 identifiées (Tableau 6). Pour ces dernières, une seconde culture et une véritable extraction d'ADN ont été nécessaires. Il est possible que ces échecs soient dus à des difficultés de culture des bactéries ou des difficultés d'extraction de leur ADN génomique. Quoi qu'il en soit, la procédure qui a été mise au point permet maintenant de réaliser de très grands inventaires rapidement et à coût réduit.

CHAPITRE 2

Analyse de la diversité des souches d'*O. oeni* au cours de la

FML par la méthode MLVA

Tableau 7. Caractéristiques des répétitions en tandem (TR) amplifiées chez 2 997 colonies d'*O. oeni*.

Locus	Taille des produits de PCR (pb)	Nombre de répétitions	Nombre d'allèles identifiés	Nombre d'allèles identifiés précédemment*	Allèle dominant et fréquence
TR1	79-511	4 - 52	49	43	19 (7%)
TR2	203-863	2 - 13	21**	14	7 (25%)
TR3	379-967	2 - 6	5	6	4 (44%)
TR4	0-150	0*** - 4	4	4	4 (68%)
TR5	83-101	1 - 4	4	3	3 (57%)

Les amplifications ont été réalisées pour 2 997 colonies d'*O. oeni* selon le protocole de PCR multiplex VNTR décrit par Claisse et Lonvaud (2014). Le nombre de répétitions obtenues pour chaque TR a été calculé en considérant la taille des produits de PCR, la taille de chaque répétition et celle des régions bordantes incluant les amorces de PCR, en plus d'un facteur d'électromobilité dû au marquage des amorces (Matériel et méthodes)

* Claisse and Lonvaud (2014).

** Pour la séquence TR2, des produits de PCR dont la taille ne correspond pas à un nombre de répétitions entier ont parfois été amplifiés. Nous leur avons attribué des allèles avec des nombres de répétitions intermédiaires, comme par exemple « 6,8 ».

*** Aucune amplification n'a été obtenue pour la région TR4 de certaines colonies après plusieurs tentatives. L'allèle « 0 » leur a été attribué pour indiquer l'absence d'amplification.

Tableau 8. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées par typage en PCR VNTR

Région	Nombre de colonies d' <i>O. oeni</i>	Nombre de typages VNTR		Nombre de souches d' <i>O. oeni</i>
		Complets	Incomplets*	
Aquitaine	1072	912	160	200
Bourgogne	837	631	206	142
Languedoc Roussillon	514	379	135	134
Val de Loire	117	91	26	29
Bretagne (cidre)	104	59	45	25
Liban	353	339	14	57
Total	2997	2411	586	514

* Le typage VNTR d'une bactérie était complet lorsque des produits de PCR et des allèles ont été obtenus pour chacune des 5 régions TR analysées.

Le nombre de souches total correspond au nombre de profils VNTR complets et différents obtenus toutes régions confondues.

1. Analyse des produits de PCR multiplex-VNTR

Pour chaque colonie d'*O. oeni* typée par la méthode MLVA, la taille des 5 produits de PCR obtenus a été mesurée pour en déduire le nombre de répétitions de chaque TR et leur attribuer des numéros d'allèles. L'ensemble de ces 5 allèles constitue le profil numérique caractéristique de chaque colonie. Sur les 2 997 colonies d'*O. oeni* analysées par cette technique, nous avons obtenu des profils complets pour 2 411 d'entre elles. Un profil VNTR est considéré complet lorsqu'un produit d'amplification est obtenu pour les 5 séquences répétées en tandem. Si un fragment n'est pas amplifié après 3 essais ou plus, l'allèle zéro lui est affilié, pour indiquer que ce fragment n'a pu être amplifié.

La plus grande variabilité a été observée au niveau des régions TR1, avec 49 allèles, et TR2 avec 21 allèles, alors que seulement 6, 4 et 3 allèles ont été identifiés pour les TR3, TR4 et TR5 (Tableau 7). Des nouveaux allèles (par rapport à ceux qui avaient été décrits par Claisse et Lonvaud en 2012), ont été identifiés pour les séquences TR1, 2, 4 et 5. Deux cas particuliers sont à noter : 1/ L'apparition de fragments TR2 de taille intermédiaire ne correspondant pas à un nombre entier de répétitions ; ils ont été comptabilisés comme allèles avec des répétitions imparfaites ; 2/ L'absence d'amplification pour le fragment TR4 de certains isolats, en majorité ceux provenant du cidre. Dans ce cas également, l'absence d'amplification a été considérée comme un allèle spécifique car elle indique que la région TR4 de ces bactéries est, soit absente, soit organisée différemment, ce qui empêche son amplification. Au total la combinaison des 5 allèles obtenus pour 2 411 clones a permis d'identifier 514 combinaisons différentes, soit au moins 514 souches différentes (Tableau 8). Le chiffre 514 correspond au nombre de profils différents obtenus en prenant la totalité des isolats. La somme du nombre de souche de chaque région donne un résultat supérieur à 514 car certains profils sont communs à plusieurs régions et sont donc comptabilisés plusieurs fois. Chaque souche a été détectée en moyenne 4,7 fois, mais ce nombre varie considérablement selon les souches (Figure 17). En effet, 306 souches (59,5%) n'ont été détectées qu'une ou deux fois et, à l'inverse, les 19 souches les plus abondantes (3,7%) sont apparues de 26 à 62 fois, représentant 27,2% des colonies.

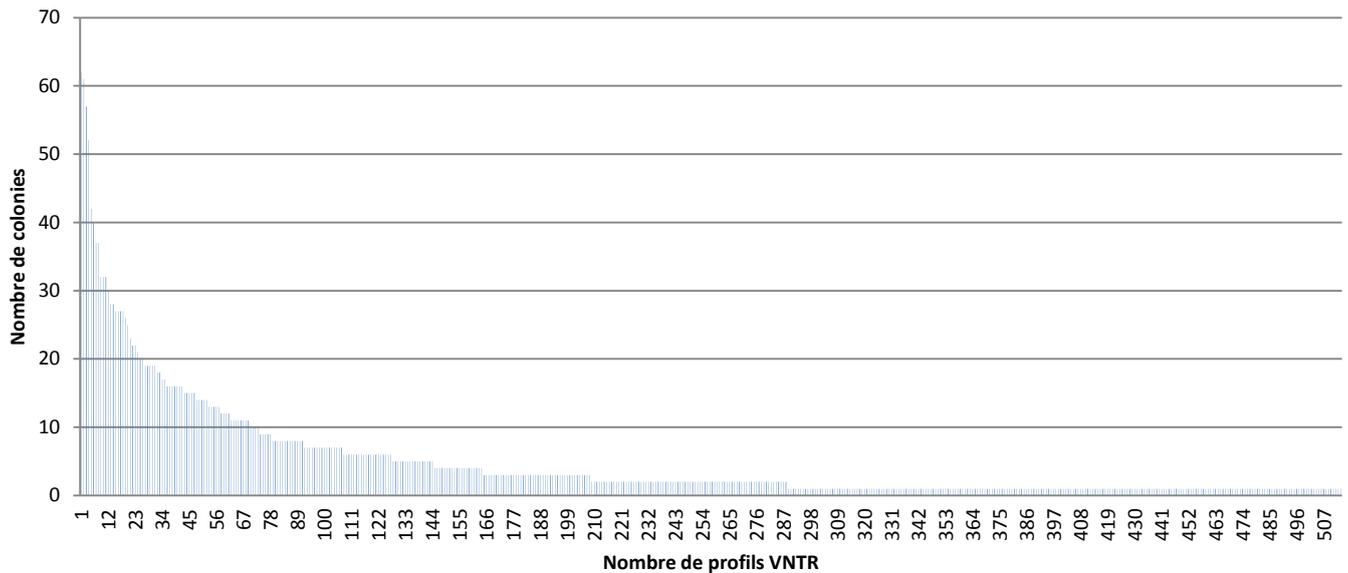


Figure 17. Nombre de colonies par souche d'*O. oeni*.

L'histogramme a été construit en classant les 514 souches d'*O. oeni* en fonction du nombre de colonies identifiées pour chacune d'entre-elles.

Tableau 9. Exemple de deux échantillons avec des colonies aux profils VNTR incomplets.

Echantillon	Nombre de colonies	Allèles VNTR				
		TR1	TR2	TR3	TR4	TR5
A	1	18	11	5	4	3
	1	19	8.8	5	3	3
	7	19	8.8	5	4	3
	1	19	*	5	4	3
	1	20	7	4	3	2
	1	20	8.8	5	4	3
	1	22	8.8	5	4	3
	2	33	9	3	3	2
B	6	19	8.8	5	4	3
	1	20	6	4	4	3
	2	20	8.8	5	4	3
	1	21	*	5	4	3
	5	33	9	3	3	2

* TR manquant

Pour 586 colonies, le typage n'a pas permis d'obtenir un profil VNTR complet, et cela parce que un ou plusieurs TR n'ont pas pu être amplifiés. Ces colonies représentent 19,5% du total de colonies d'*O. oeni* isolées. Au niveau d'un échantillon, le résultat d'un typage incomplet d'une colonie, ou plus, sur les 15 isolées, correspond à deux cas de figure : 1/ le profil de la colonie est identique à celui d'autres colonies de l'échantillon mais un TR est manquant, comme dans l'exemple de l'échantillon A du tableau 9, dans ce cas-là nos résultats vont sous-estimer l'abondance de ce profil ; 2/ le profil est incomplet et différent de tous ceux déjà identifiés dans l'échantillon, dans ce cas nous allons sous-estimer le nombre de souches présentes dans l'échantillon (Echantillon B dans le tableau 9).

2. Analyse statistique de la représentativité des échantillonnages

Une analyse statistique a été effectuée pour déterminer si l'échantillonnage réalisé permet d'avoir une bonne vision de la diversité des souches à travers les régions. L'indice de diversité de Shannon Weaver (H') a été choisi, car il permet d'exprimer la diversité en prenant en compte le nombre de souches et le nombre d'isolats de chaque souche. Mathématiquement, la valeur de cet indice varie de 0 à l'infini, mais en pratique, l'augmentation de la diversité ne suit pas une croissance exponentielle. Il a été observé dans des études de diversité, que cette valeur varie de moins de 1 par individu, jusqu'à 4,5 dans le cas de communautés complexes (Frontier *et al.*, 2008).

L'indice d'équité de Pielou (J') a également été calculé pour chaque région afin d'examiner la répartition des souches. Cet indice permet de mesurer la régularité de la répartition des individus au sein des espèces, donc de renseigner sur la présence de souches dominantes ou non. La valeur de cet indice varie de 0 à 1, selon que la répartition des individus est hétérogène (souches dominantes) ou homogène (même nombre d'individus pour toutes les souches).

Le tableau 10, montre les valeurs des indices de Shannon-Weaver et de Pielou calculées à partir des échantillonnages réalisés dans les 6 régions. La valeur de l'indice de Shannon-Weaver est de seulement 2,96 et 2,7 pour le Val de Loire et la Bretagne, respectivement, ce qui est très faible par rapport aux valeurs 4,57, 4,19 et 4,28 obtenues pour l'Aquitaine, la Bourgogne et le Languedoc-Roussillon. Néanmoins cela n'est pas surprenant car cet indice est dépendant du nombre d'échantillons et les échantillonnages

Tableau 10. Valeur de l'indice de diversité de Shannon Weaver (H') et de l'indice d'équité de Pielou (J') de chaque région

Région	H' (0 à 4,5)	J' (0 à 1)
Aquitaine	4,57	0,86
Bourgogne	4,19	0,84
Languedoc-Roussillon	4,28	0,87
Val de Loire	2,96	0,88
Bretagne	2,7	0,86
Liban	3,17	0,82

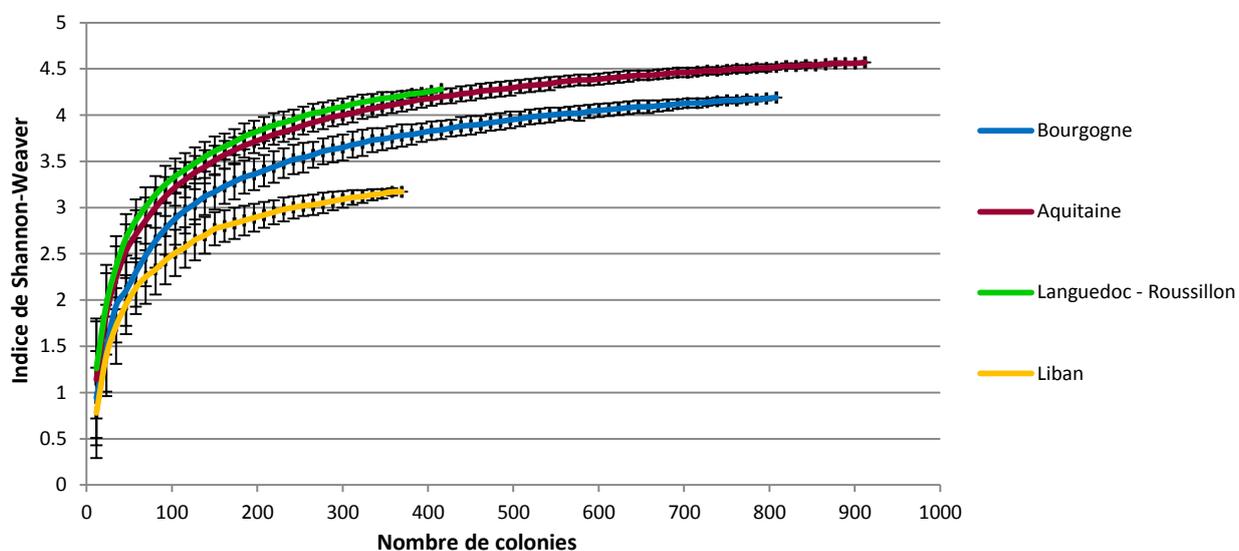


Figure 18. Indice de diversité de Shannon-Weaver en fonction des échantillonnages réalisés dans 4 régions viticoles.

Le gain de diversité obtenu en fonction du nombre de colonies analysées a été mesuré en calculant la valeur de l'indice de Shannon Weaver. Les courbes ont été produites à partir des données générées par le logiciel EstimateS. Elles ne représentent que les 4 régions viticoles pour lesquelles un échantillonnage important a été réalisé.

réalisés dans ces 2 régions étaient nettement moins importants que pour les 3 dernières (seulement 8 et 9 échantillons collectés, contre 36 à 80, voir Tableau 5). Il est usuel d'analyser un échantillonnage composé d'un minimum de 30 souches pour mesurer un indice de diversité fiable. Cela n'est pas le cas pour le Val de Loire et la Bretagne. Pour ces 2 régions, les échantillonnages réalisés sont donc insuffisants pour représenter correctement la diversité des souches qui y sont présentes. Dans le cas du Liban, l'indice de diversité de Shannon-Weaver est également assez faible (3,17), alors que 32 échantillons y ont été collectés et que 57 souches en ont été isolées. Les nombres d'exploitations et d'échantillons analysés au Liban sont similaires à ceux du Languedoc-Roussillon, mais les exploitations y sont réparties sur une surface beaucoup plus petite. De plus, l'échantillonnage a été réalisé majoritairement dans une seule région : la Bekaa. La diversité observée au Liban est donc plus représentative de la diversité de la Bekaa que du Liban dans son ensemble et elle semble nettement inférieure à celle des 3 régions Aquitaine, Bourgogne et Languedoc-Roussillon.

Il est important de compléter l'évaluation de la diversité, représentée par l'indice de Shannon, par un second indice qui renseigne sur la répartition des isolats. Les valeurs de l'indice de Pielou indiquent des différences au niveau de l'homogénéité de la répartition des isolats dans chaque région (Tableau 10). Entre les 3 régions où l'on observe la plus forte diversité, l'Aquitaine, la Bourgogne et le Languedoc-Roussillon, c'est cette dernière qui présente la répartition la plus homogène. La Bourgogne et le Liban-Bekaa sont les deux régions qui possèdent des valeurs légèrement inférieures aux autres, probablement parce qu'elles possèdent quelques souches dominantes.

Pour déterminer si les 4 échantillonnages les plus importants réalisés en Aquitaine, Bourgogne, Languedoc-Roussillon et Liban-Bekaa sont bien représentatifs de la diversité des souches dans ces régions, nous avons réalisé une modélisation de l'augmentation de la valeur de l'indice de Shannon-Weaver en fonction du nombre de colonies analysées à l'aide de l'outil EstimateS 9.1 (Colwell and Elsensohn, 2014). La figure 18, montre que la valeur de l'indice de diversité augmente dans ces 4 régions jusqu'à atteindre quasiment un plateau dès que 300 colonies ont été analysées. Dans la mesure où plus de 300 colonies ont été analysées dans chacune de ces régions, les échantillonnages qui y ont été réalisés semblent bien représentatifs de la diversité des souches d'*O. oeni*.

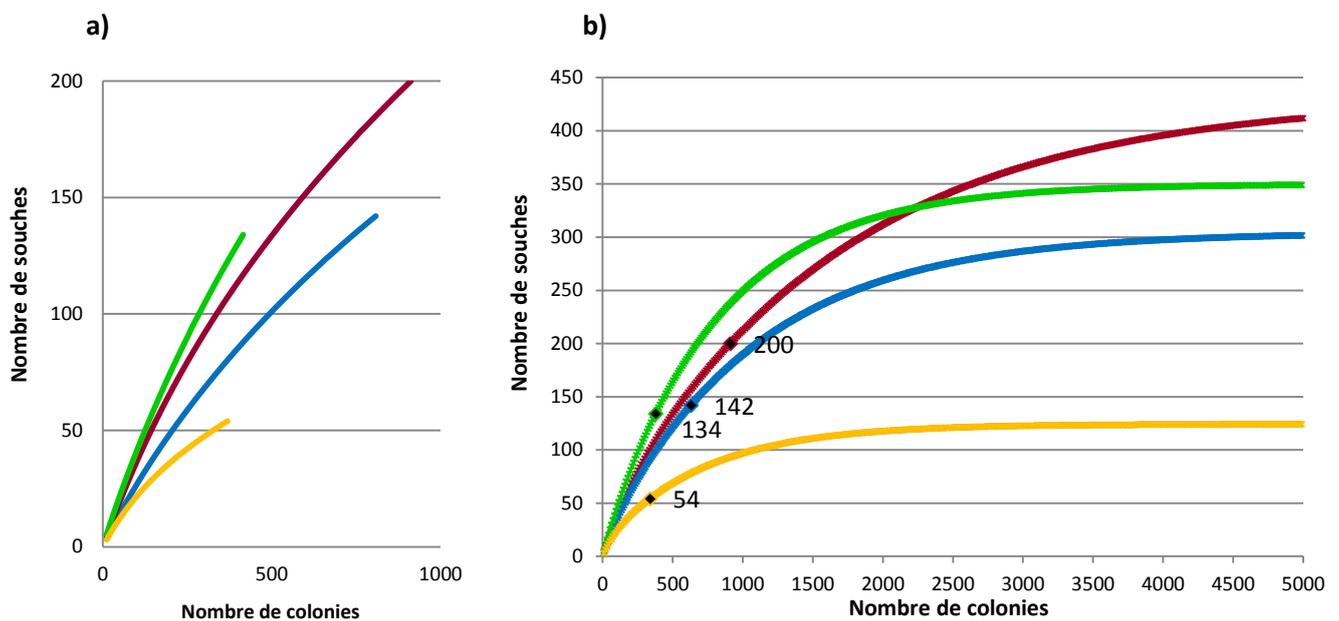


Figure 19. Diversité des souches en fonction du nombre de colonies analysées dans 4 régions viticoles

(a) Les courbes représentent l'augmentation réelle du nombre de souches identifiées en fonction du nombre de colonies analysées dans les 4 régions viticoles pour lesquelles un échantillonnage significatif a été réalisé.

(b) Simulation de l'augmentation du nombre de souches en fonction du nombre de colonies analysées dans les mêmes régions. Les courbes ont été réalisées avec le logiciel EstimateS 9.1, en utilisant les données réelles figurant en (a). Les chiffres sur les courbes indiquent les limites des valeurs réelles. Les régions analysées sont : Bourgogne (bleu), Aquitaine (rouge), Languedoc-Roussillon (vert) et Liban (jaune).

3. Détermination du nombre total de souches par région

Les données de typage par PCR VNTR ont permis d'identifier un certain nombre de profils VNTR différents dans chaque région et autant de souches d'*O. oeni* différentes. Ces mêmes données ont été utilisées pour estimer le nombre maximum de souches qu'il serait possible d'isoler dans les 4 régions où l'échantillonnage réalisé est représentatif de la diversité : Aquitaine, Bourgogne, Languedoc-Roussillon et Liban.

La figure 19a représente l'augmentation du nombre de souches en fonction du nombre de colonies réellement analysées. La diversité des souches augmente sensiblement plus vite pour le Languedoc-Roussillon et l'Aquitaine que pour la Bourgogne et nettement plus vite que pour le Liban, ce qui suggère que le nombre de souches maximum est variable d'une région à l'autre. EstimateS a été utilisé pour extrapoler ces courbes et estimer les nombres maximum de souches qu'il serait possible d'identifier si la progression était similaire à celle observées lors de l'échantillonnage réel.

La figure 19b montre les courbes obtenues par extrapolation du nombre de colonies analysées jusqu'à 5000, au lieu des 339 à 912 colonies réellement analysées dans les 4 régions. EstimateS réalise ces estimations en se basant sur un test non-paramétrique (Chao, 1987; Hughes *et al.*, 2001; Colwell and Elsensohn, 2014). L'estimation du nombre maximum de souches pour chaque région est, 350 pour le Languedoc-Roussillon, 410 pour l'Aquitaine, 300 pour la Bourgogne et 123 pour le Liban. L'estimation à l'aide de test non-paramétrique (Chao 2 ici) est une méthode adaptée pour l'étude de la diversité de population microbienne, mais ces tests sous-estiment la diversité réelle (Kroes *et al.*, 1999; Hughes *et al.*, 2001; Bunge *et al.*, 2014). Concrètement, analyser un grand nombre de colonies (exemple estimé 5000 colonies), équivaldrait à analyser plus de 100 exploitations par région en suivant notre modèle d'échantillonnage (15 colonies/échantillon, 3 échantillons/exploitation). L'utilisation de méthodes culturales n'est plus envisageable pour une si grande étude de diversité.

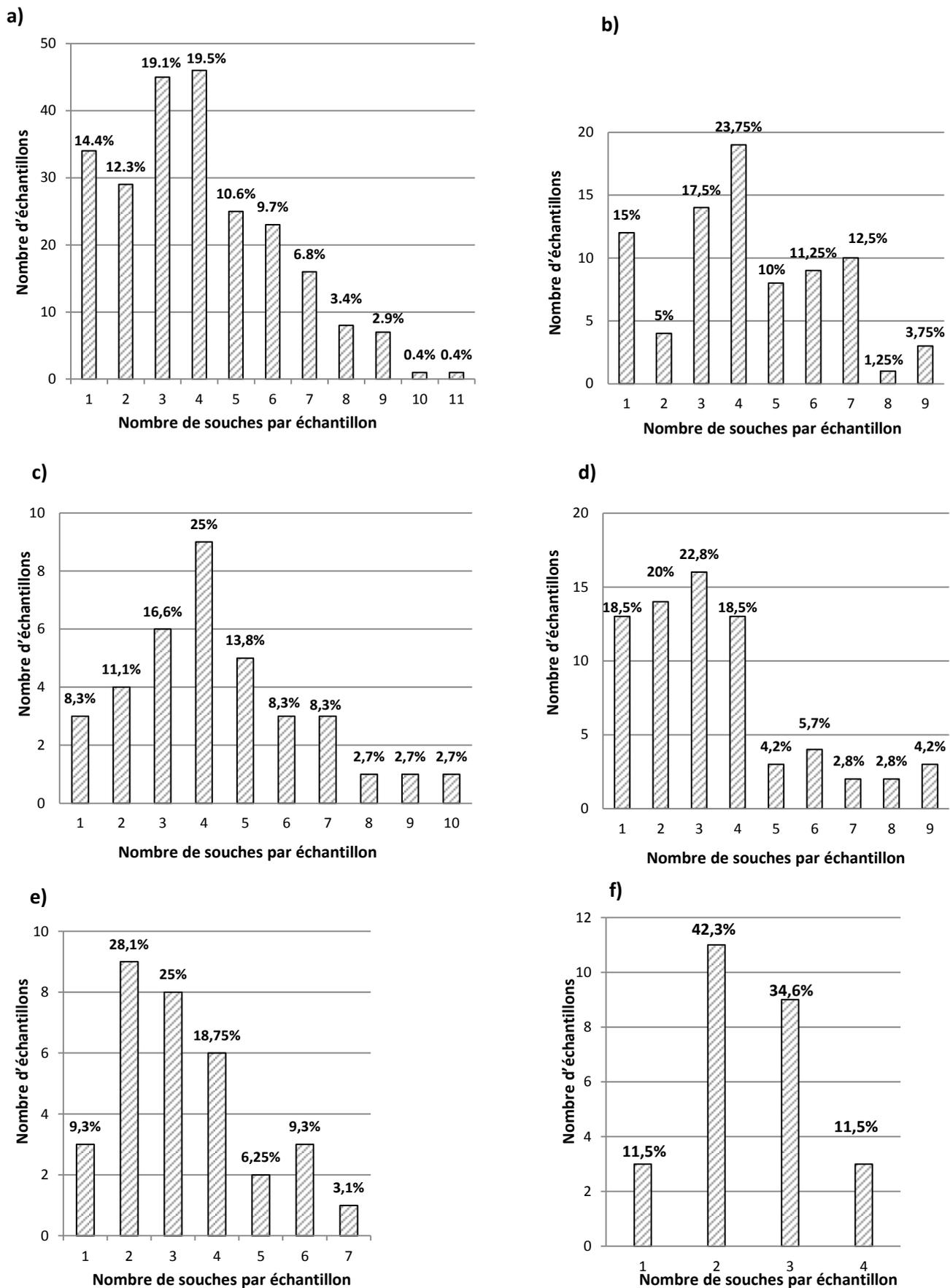


Figure 20. Nombre de souches d'*O. oeni* par échantillon.

Les histogrammes représentent le nombre de souches présentes par échantillon dans l'ensemble des échantillons de vins (a), en Aquitaine (b), dans le Languedoc-Roussillon (c), en Bourgogne (d), au Liban (e) et dans les 26 vins blancs analysés (f). Les données sont issues de l'analyse par MLVA des colonies isolées de vin.

4. Nombre de souches par échantillon en cours de FML, en fonction des régions ou des types de produits.

Le typage par la méthode MLVA d'une quinzaine de colonies par échantillon a permis d'identifier de 1 à 11 souches majoritaires par échantillon. Dans la mesure où tous les échantillons étaient en cours de FML, ces données ont pu être utilisées pour évaluer le nombre moyen de souches d'*O. oeni* présentes simultanément lors des FML en fonction des régions ou types de produit.

La figure 20a représente un histogramme qui a été réalisé en compilant le nombre de souches identifiées dans tous les échantillons de vins pendant la FML, pour avoir une idée du nombre de souches qu'il est possible d'identifier durant une FML. En moyenne, les échantillons contenaient 3 ou 4 souches. Certains (26%) étaient dominés par une seule ou deux souches majoritaires, mais à l'inverse, très peu (0,8%) en contenaient plus de 10. En Aquitaine (Figure 20 b) et dans le Languedoc-Roussillon (Figure 20 c), 23,75% et 25% des échantillons contenaient 4 souches majoritaires. La proportion d'échantillons avec plus ou moins de 4 souches est inférieure à celle des vins contenant 4 souches. En Bourgogne (Figure 20 d), une forte proportion d'échantillons contenait de 1 à 4 souches, avec un maximum à 3 souches. Au Liban, les échantillons contenaient 2 à 3 souches en majorité, avec un maximum de 7 souches (Figure 20 e). Aucune différence n'a été observée selon la région d'origine, avec toujours une majorité d'échantillons contenant 3 – 4 souches dominantes. Si l'on sépare les échantillons par type de produit, le même profil est retrouvé pour les vins rouges (Données non montrées). Pour les vins blancs, nous avons considéré uniquement les 26 vins blancs de Bourgogne car l'échantillonnage de vins blancs en Val de Loire était très faible. La diversité de nombre de souches au moment de la FML semble moins importante, avec un maximum de 4 souches par échantillon. Ainsi, 42,3% des échantillons contiennent 2 souches dominantes, et 34,6% contiennent 3 souches dominantes, les échantillons avec 1 ou 4 souches sont plus rares et représentent 11,5% chacun.

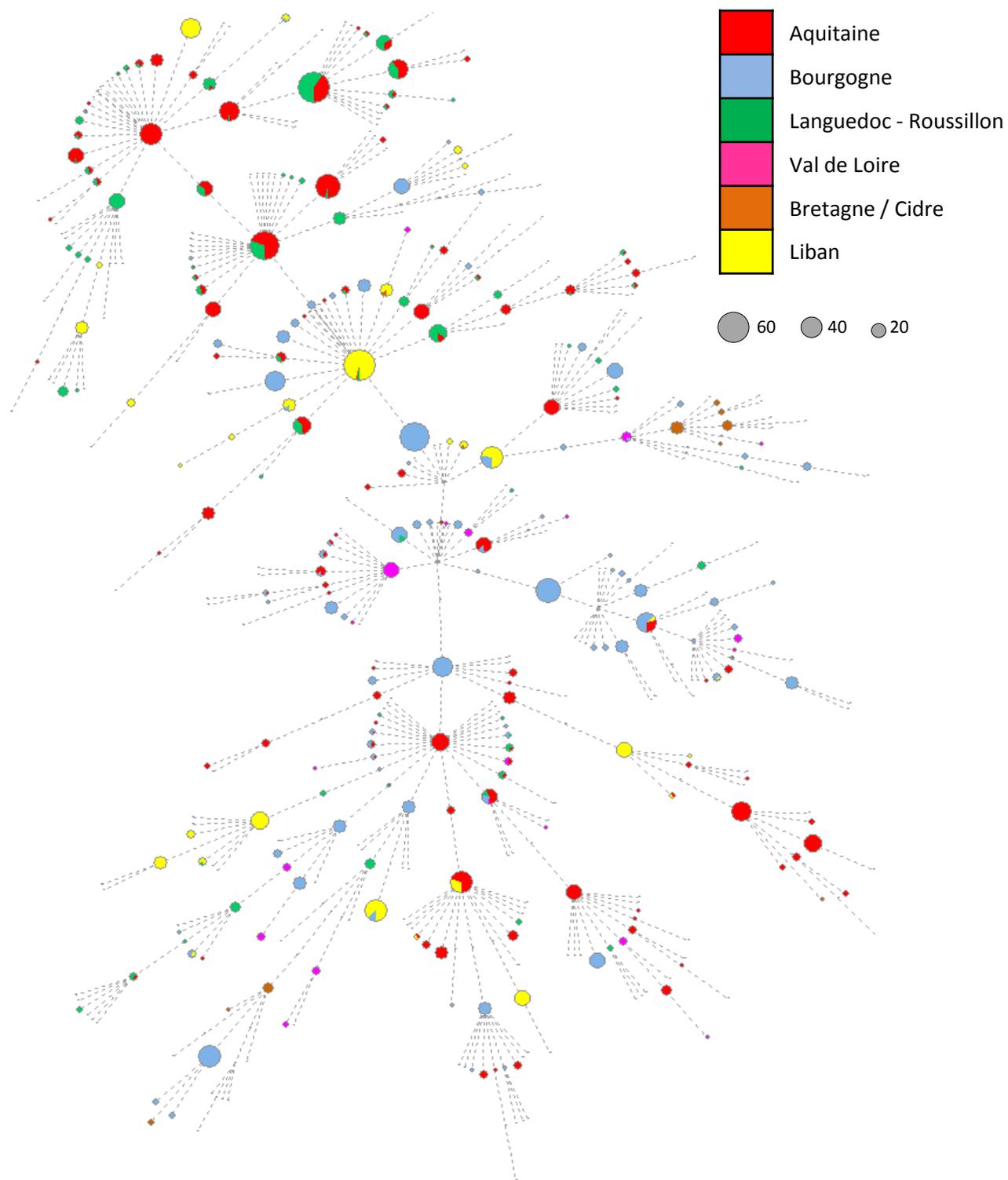


Figure 21. Représentation en ACM des 514 souches d'*O. oeni* identifiées dans les 6 régions viticoles et cidricoles.

Chaque cercle représente une souche. Le diamètre des cercles est proportionnel au nombre de colonies correspondant à chaque souche. Les cercles sont colorisés suivant la région d'origine des souches. Lorsqu'une même souche est retrouvée dans plusieurs régions, le cercle apparaît comme un camembert de plusieurs portions proportionnelles au nombre de colonies identifiées dans chaque région.

5. Distribution des souches dans l'ensemble des régions

Pour visualiser la distribution des souches dans l'ensemble des régions, un arbre couvrant minimal ACM (minimum spanning tree) a été modélisé, en utilisant le logiciel BioNumerics (Applied Maths). Dans un tel arbre, des souches qui ne diffèrent que par une seule répétition dans une région TR sont plus proches que des souches présentant plusieurs répétitions d'écart. Par conséquent, bien que ce ne soit pas un arbre phylogénétique, il est probable que des souches qui sont proches dans un tel arbre, soient également proches génétiquement.

L'ACM qui a été obtenu montre la diversité des souches d'*O. oeni* dans les régions (une couleur par région) et en fonction du nombre d'isolats compté pour chaque souche (taille des cercles) (Figure 21). Dans cet arbre, les souches ne sont pas groupées par région, ce qui suggère que leur distribution dans les régions serait indépendante de leur proximité génétique. De plus, la variabilité de la taille des cercles indique qu'aucune région ne contient une ou quelques souches majoritaires. Au contraire, chaque région contient de nombreuses souches qui ont été isolées peu de fois. Enfin, peu de cercles contiennent plusieurs couleurs, ce qui signifie que peu de souches ont été identifiées dans plusieurs régions. En effet, parmi les 514 souches identifiées, aucune n'est présente dans les 6 régions. D'après la composition de l'arbre, 66 souches sur les 514 ont été isolées dans plusieurs régions, soit 12,84%, et 448 souches (87,15%) ont été isolées uniquement dans seule région. Aucune des souches identifiées dans le cidre n'a été retrouvée dans des échantillons de vins. Parmi les 57 souches identifiées au Liban, 11 possédaient un profil VNTR identiques à des souches isolées dans des échantillons de vin français : 3 en Bourgogne, 5 en Aquitaine, 2 dans le Languedoc-Roussillon et 1 à la fois en Aquitaine et Bourgogne. En comparant les profils VNTR obtenus et ceux de 7 souches d'*O. oeni* commerciales disponibles au laboratoire, 3 profils correspondants à ceux de souches commerciales ont été détectés. La souche Lalvin VP41 (Lallemand) est celle qui a été retrouvée à la fois au Liban (2 colonies), en Aquitaine (7 colonies) et en Bourgogne (16 colonies). Les deux autres sont les souches CiNE (Hansen) et L31 (Lallemand), qui ont chacune été détectées une seule fois au Liban.

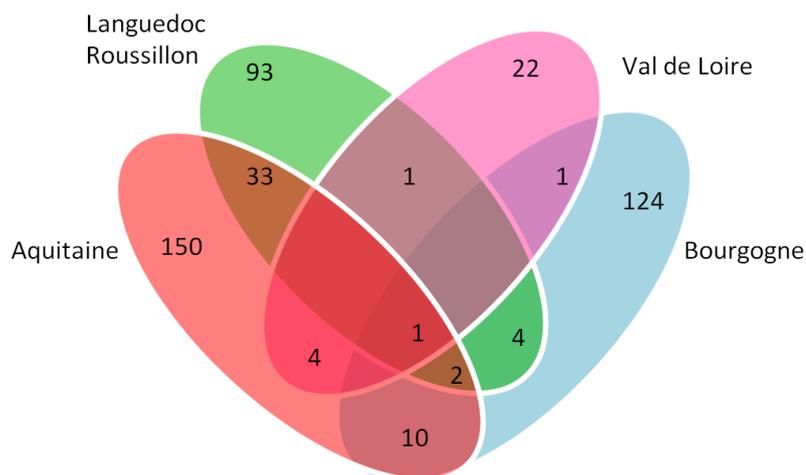


Figure 22. Nombre de souches identifiées dans une ou plusieurs régions viticoles françaises. Chaque ellipse du diagramme de Venn représente une région. Les chiffres indiquent les nombres de souches identifiées, et dans les zones d'intersection, les nombres de souches communes à plusieurs régions.

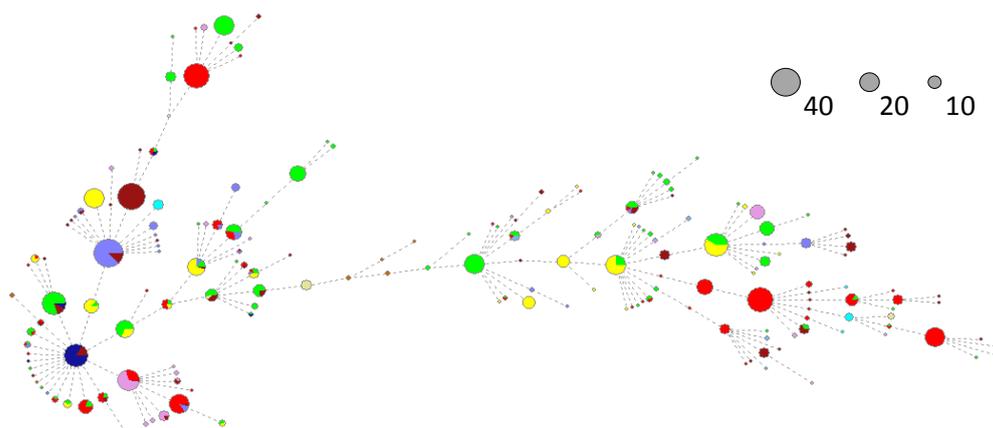


Figure 23. Représentation en ACM des 181 souches d'*O. oeni* identifiées en Aquitaine.

Bergerac /marron foncé, Blaye-Côtes de Bordeaux/jaune pâle, Bordeaux/vert, Côtes de Castillon/rose, Fronsac/marron clair, Graves/bleu ciel, Haut Médoc/bleu marine, Lalande de pomerol/bleu, Médoc/jaune, Pessac Léognan/violet, St. Emilion/rouge.

Tableau 11. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les vins des différentes appellations d'Aquitaine.

Appellations	Nombre de souches	Souches uniques
Bergerac	48	33
Blaye - côtes de Bordeaux	4	3
Bordeaux	63	35
côtes de Castillon	20	14
Fronsac	8	7
Graves	5	5
Haut Medoc	22	12
Lalande de pomerol	7	5
Medoc	5	1
Pessac Léognan	24	14
St Emilion	44	30
Total	200	159

La distribution des souches identifiées dans une ou plusieurs régions viticoles françaises est représentée dans le diagramme de Venn de la figure 22. Chaque région possède des souches qui lui sont propres : 150 pour l'Aquitaine (75%), 124 pour la Bourgogne (87,3%), 93 pour le Languedoc-Roussillon (69,4%) et 22 pour le Val de Loire (75,8%). Une seule souche est commune aux quatre régions. Elle représente un total de 15 colonies, dont 9 en Aquitaine (2 échantillons), 3 en Bourgogne (2 échantillons), 2 dans le Languedoc-Roussillon (un échantillon) et une dans le Val de Loire. Deux autres souches ont été détectées sur 3 régions : L'Aquitaine, la Bourgogne et le Languedoc-Roussillon. L'Aquitaine et le Languedoc-Roussillon sont les deux régions qui partagent le plus de souches communes : 33, soit plus de 35% des souches du Languedoc-Roussillon.

6. Diversité des souches dans chaque région

Pour chaque région étudiée, un arbre de composante minimale (minimum spanning tree) a été construit à l'aide du logiciel BioNumerics. Chaque région a été traitée indépendamment pour analyser la répartition des souches entre les appellations. A partir du nombre de colonies de chaque souche identifiée, l'indice de diversité de Shannon Weaver (H') et l'indice d'équité de Pielou (J') ont été calculés pour chaque région, dans le but d'évaluer la diversité des souches et la répartition des isolats entre les souches (tableau RT6).

6.1. Aquitaine

A partir des 912 colonies d'*O. oeni* analysées en Aquitaine, nous avons différencié 200 souches qui sont réparties sur les appellations de Bergerac, Blaye - Côtes de Bordeaux, Bordeaux, côtes de Castillon, Fronsac, Graves, Haut Médoc, Lalande de pomerol, Médoc, Pessac Léognan et St. Emilion. La répartition des souches entre les appellations est représentée dans la figure 23 et le tableau 11. En général, les souches ont été détectées en très peu d'isolats. Les valeurs des indices de diversité de Shannon (4,5) et de Pielou (0,86) suggèrent qu'il existe une grande diversité de souches avec une distribution assez homogène du nombre d'isolats par souche. En effet, seules 16 souches sont représentées par plus de 15 isolats ; elles représentent 8,7% des souches, et 3 sont représentées par plus de 30 isolats (32 à 40) ; elles ne représentent que 2% des souches. Au total, 159 souches des

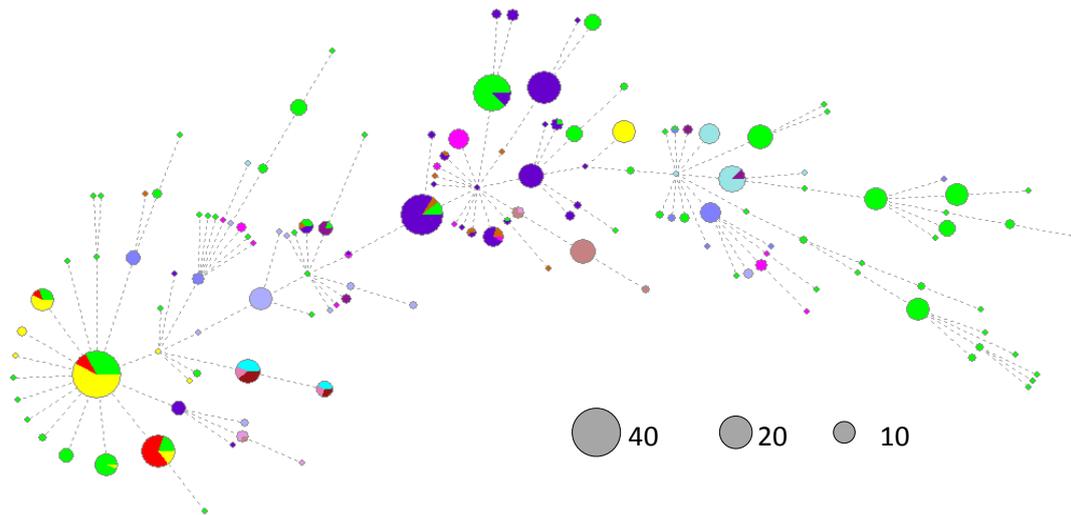


Figure 24. Représentation en ACM des 142 souches d'*O. oeni* identifiées en Bourgogne.

Côtes de Beaune/vert, Bourgogne/rouge, Bourgogne passe-tout-grain/lilas, Cheilly les Maranges/Jaune, Corton Charlemagne/turquoise, Hautes côtes de Beaune/marron, Haute côtes de Nuits/violet, Merurey/vert foncé, Montagny/bleu, Rully/jaune clair, Santenay/rose, St. Aubin, Meursault/rose foncé, Puligny Montrachet/bleu marine, St. Bris le vineux/fushia, Beaune/bleu ciel

Tableau 12. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les vins des différentes appellations de Bourgogne.

Vignoble	Appellation	Nombre de souches		
		Par appellation	Par vignoble	Uniques
Côtes de Nuits	Haute côte de nuit	4	4	3
	Maranges	10		
	Corton Charlemagne	2		
	Haute côte de beaune	9		
Côtes de Beaune	Meursault	4	117	107
	Santenay	25		
	St. Aubin	2		
	Puligny Montrachet	9		
	Autres Côte de Beaune	72		
Côtes Châlonnaise	Rully	2		
	Mercurey	12	17	15
	Montagny	3		
Chablis	St. Bris le vineux	5	5	5
Mâconnais	Solutré, Pouilly, Fuissé	3	3	3
	Bourgogne	8	8	8
Total		142	142	130

200 isolées (soit 79,5%) ont été identifiées dans une seule appellation. Les autres (20,5%) sont présentes dans deux à quatre appellations. Ces dernières ne proviennent pas toujours d'appellations proches géographiquement. Par exemple, une souche identifiée dans le Médoc a également été identifiée à Bergerac, ainsi qu'à Pomerol. Nous avons également reproduit le même ACM en choisissant comme paramètre les exploitations et les souches, dans le but de connaître le nombre de souches uniques ou communes aux exploitations. Le nombre de souches uniques varie énormément entre les exploitations, chacun ayant un nombre d'isolats différents, il est difficile de comparer le nombre de souches entre elles. Cependant, si l'on considère uniquement les exploitations où plus de 10 souches ont été identifiées, la proportion de souches uniques varie de 27,8% à 75%. La seule exploitation qui ne possède pas de souches uniques est l'IFV, mais cela peut sembler normal car cet institut technique rassemble des raisins de plusieurs exploitations pour réaliser ses essais.

6.2. Bourgogne

Les 631 colonies d'*O. oeni* provenant de Bourgogne correspondent à 142 souches réparties sur 5 vignobles principaux: Côtes de Nuits, Côtes de Beaune, Côtes Châlonnaises, Chablis et Mâconnais. La figure 24 et le tableau 12 montrent l'abondance et la répartition des souches de chaque appellation. Comme en Aquitaine, de nombreuses souches sont représentées par peu d'isolats, à l'exception de 3 qui sont fortement représentées (avec 30 à 52 colonies, soit 19,6% des isolats au total). Seules 20 souches parmi les 142 isolées, sont communes à plusieurs appellations, soit 14%. Huit souches ont été identifiées dans les 3 vignobles des côtes de Beaune, côtes Châlonnaises et Mâconnais, et 12 souches ont été identifiées sur 2 vignobles. L'appellation Maranges (Cheilly-lès-Maranges) en côtes de Beaune est la seule à ne pas avoir de souches communes à d'autres appellations, les échantillons de cette appellation proviennent tous de la même exploitation. En groupant les souches par appellation, on compte 130 souches uniques sur les 142 identifiées en Bourgogne, soit 91,5%. En groupant les souches par exploitation, et en considérant celles où plus de 10 souches ont été identifiées, nous constatons que la proportion de souches uniques varie de 61,1% à 100%. A nombre d'isolats équivalents par exploitation, la proportion de souches uniques est plus importante en Bourgogne par rapport à l'Aquitaine (Annexe 4). En accord avec le nombre de souches moins important en Bourgogne, l'indice

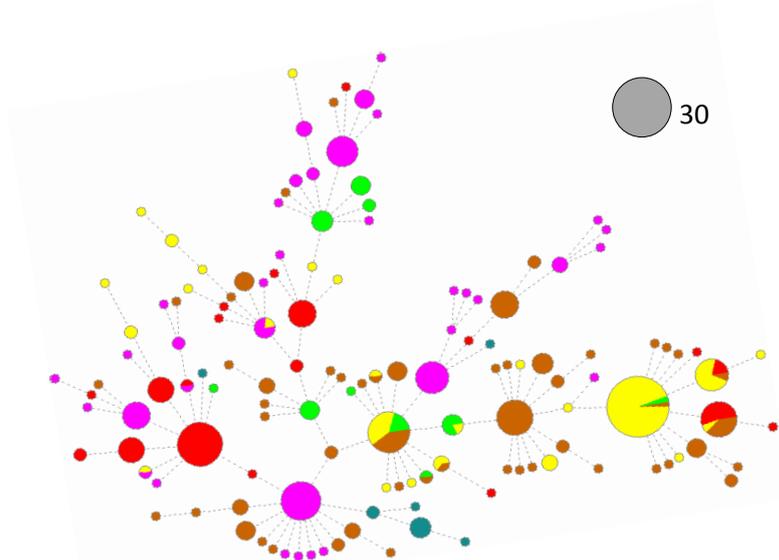


Figure 25. Représentation en ACM des 134 souches d'*O. oeni* identifiées dans le Languedoc-Roussillon. Rivesaltes/bleu canard, Aude/vert, Hérault/marron, Costières de Nîmes/rouge, Gard/jaune, Côtes du Rhône/fushia

Tableau 13. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les vins des différents départements du Languedoc-Roussillon.

Département / Appellation	Nombre de souches	Nombre de souches uniques
Rivesaltes	6	6
Aude	10	6
Hérault	53	46
Costières de Nîmes	19	16
Gard	25	16
Côtes du Rhône	36	33
Total	134	123

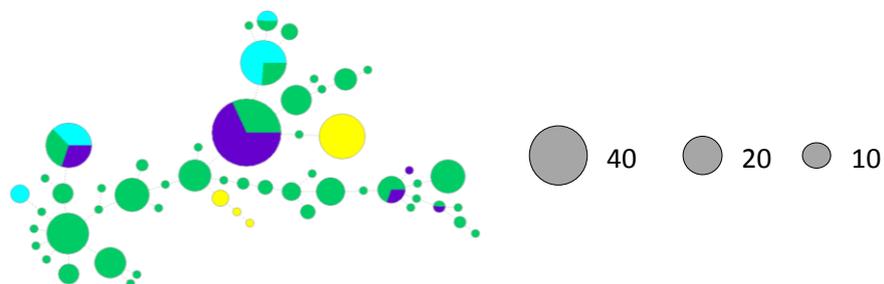


Figure 26. Représentation en ACM des 57 souches d'*O. oeni* identifiées au Liban. Les cercles sont colorisés en fonction des différentes zones de productions: Ainata/bleu ciel, Batroun/violet, Bekaa/vert, Chouf/jaune.

Tableau 14. Nombre de souches d'*O. oeni* identifiées dans les échantillons de vins du Liban

Région	Nombre de souches	Souches uniques
Batroun	7	1
Chouf	4	4
Bekaa	51	45
Ainata	4	1
Total	57	51

de diversité de Shannon Weaver mesuré en Bourgogne (4,18) est plus faible qu'en Aquitaine, de même que l'indice d'équité de Pielou (0,84) (Tableau 10). Ces indices montrent que la diversité des souches de cette région est importante, bien qu'elle soit moindre qu'en Aquitaine, et que la répartition des isolats entre les souches est moins homogène qu'en Aquitaine.

6.3. Languedoc-Roussillon et Côtes du Rhône

A partir des 379 colonies d'*O. oeni* isolées sur les 4 départements du Languedoc Roussillon et en Côtes du Rhône, et typées par VNTR, nous avons pu identifier 134 souches. On peut voir sur l'ACM de la figure 25 qu'il y a peu de souches dominantes et très peu de souches présentes sur plusieurs appellations. Une seule souche est représentée par plus de 30 isolats (0,77%) et 3 souches par plus de 15 isolats (2%). Les indices de diversité H' (4,27) et d'équité J' (0,87) confirment que la diversité des souches de cette région est importante, bien que moindre qu'en Aquitaine, et que la répartition des isolats entre les souches y est plus équilibrée. Le tableau 13, montre que sur les 134 souches identifiées dans le Languedoc-Roussillon, 123 souches (soit 91,7%) n'ont été détectées que dans un seul département. Seules 4 souches ont été détectées dans 3 départements et 7 dans 2 départements. Au niveau des exploitations, pour celles dont nous avons identifié plus de 10 souches, la proportion de souches uniques varie de 60% à 100%. De même qu'en Bourgogne le nombre de souches uniques à une exploitation est plus élevé qu'en Aquitaine.

6.4. Liban

Au Liban, l'échantillonnage a été réalisé sur 4 régions, mais principalement sur la plus grande région viticole, qui est la plaine de la Bekaa. Comme indiqué précédemment, l'échantillonnage est donc plus représentatif de la région de la Bekaa que de l'ensemble du Liban. Sur les 57 souches identifiées à partir des 353 colonies analysées, 51 proviennent de vins de cette région (Figure 26, Tableau 14). Il est donc logique que l'indice de diversité H' (3,31) soit nettement inférieur à celui des régions décrites précédemment, puisqu'il concerne une région dont l'étendue est beaucoup plus restreinte. Néanmoins, l'indice d'équité J' (0,82) est aussi le plus faible qui ait été mesuré. Il indique qu'il existe un certain déséquilibre de répartition des isolats entre les souches. En effet, les 5 souches les plus

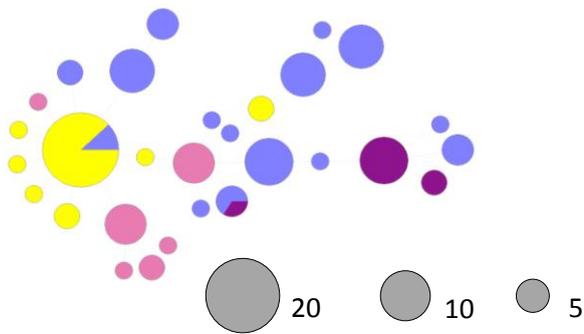


Figure 27. Représentation en ACM des 29 souches d’*O. oeni* identifiées dans le Val de Loire.

Coteaux de la Loire/violet, Muscadet/jaune, Saumure/bleu, Val de Loire rouge non identifié/rose

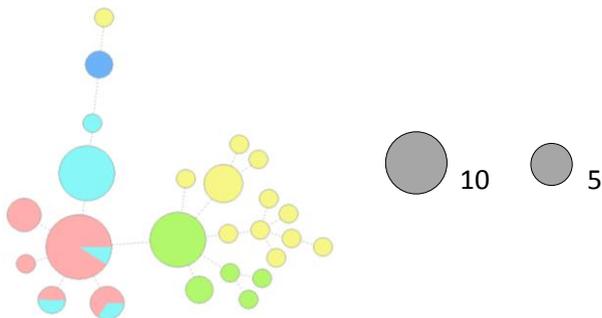


Figure 28. Représentation en ACM des 25 souches d’*O. oeni* identifiées dans les échantillons de cidre de Bretagne.

Les cercles sont colorisés en fonction des différentes zones de production: Finistère: Gouesnac’h/jaune, Côtes d’Armor: Merdrignac/bleu, Morbihan: Colpo/vert, Surzur/bleu ciel, St. Gravé/rose.

Tableau 15. Nombre de souches d’*O. oeni* identifiées dans les vins des différentes appellations du Val de Loire.

Appellations	Nombre de souches	Nombre de souches uniques
Coteaux de la Loire	3	2
Muscadet	7	6
Saumur	15	13
Vin rouge Loire	6	6
Total	29	27

Tableau 16. Nombre de souches d’*O. oeni* identifiées dans les échantillons de cidres bretons analysés.

Département	Origine	Nombre de souches	Nombre de souches uniques
Finistère	Gouesnac'h	12	12
Côtes d'Armor	Merdrignac	1	1
Morbihan	St Gravé	5	2
	Surzur	5	2
	Colpo	5	5
Total		25	22

Tableau 17. Diversité des souches dans les exploitations

Région	Nombre de souches par exploitation	
	moyenne	min - max
Aquitaine	10,5	1 - 33
Bourgogne	14	5 - 45
Languedoc-Roussillon	12,8	5 - 26
Val de Loire	5,2	1 - 13
Bretagne	5,8	1 - 12
Liban	7,3	1 - 21

représentées (20-41 isolats) comptent à elles seules pour 34,5% des isolats. Pour les exploitations dans lesquelles nous avons identifié plus de 10 souches, la proportion de souches uniques varie de 50% à 90,5%.

6.5. Val de Loire et Bretagne

Les échantillonnages réalisés à partir des vins du Val de Loire et des cidres de Bretagne ont porté sur trop peu d'échantillons (8 et 9, respectivement) pour être représentatifs de ces régions. Néanmoins, les représentations en ACM des souches de ces régions suggèrent que, comme pour les autres régions, il y a peu ou pas de souches dominantes et qu'il est peu fréquent de retrouver les mêmes souches dans des endroits éloignés (figures 27 et 28, Tableau 15 et 16). L'intérêt de ces échantillonnages a surtout résidé dans l'isolement de souches issues de produits particuliers (cidres et vins blancs) qui seront utilisées dans l'analyse phylogénétique ci-après.

7. Diversité des souches dans les exploitations

Au sein d'une région, le nombre de souches varie autant entre les appellations qu'entre les exploitations. La moyenne du nombre de souches identifiées par exploitation pour chaque région varie de 5,2 pour le Val de Loire, à 14 pour la Bourgogne (Tableau 17). Ce nombre est très variable entre les exploitations, en Aquitaine il varie de 1 à 33, en Bourgogne de 5 à 45, dans le Languedoc-Roussillon de 5 à 26, dans le Val de Loire de 1 à 13, en Bretagne de 1 à 12 et au Liban de 1 à 21. Au moment de la construction des ACM de chaque région, nous avons regardé la répartition d'une souche en fonction des exploitations. Comme nous l'avons indiqué dans les paragraphes précédents, chaque exploitation possède des souches qui lui sont propres et d'autres qui sont identifiées également dans d'autres exploitations. Les souches d'une exploitation ne sont pas rassemblées en un seul groupe sur les ACM (données non montrées). De plus, comme pour la majorité des souches, certaines ont été identifiées en très peu d'isolats, alors que d'autres sont plus abondantes.

Pour déterminer si la diversité des souches rencontrées dans les exploitations est stable ou bien si elle change d'une année sur l'autre, nous avons comparé les souches présentes au cours des 2 millésimes 2012 et 2013 dans 7 exploitations, 3 en Aquitaine et 4

Tableau 18. Souches isolées au cours de deux millésimes consécutifs dans les mêmes exploitations.

Régions	Exploitations	Nombre d'échantillons		Nombre de souches isolées		Souches présentes en 2012 et 2013
		2012	2013	2012	2013	
Aquitaine	De Bellevue	2	4	9	21	6
Aquitaine	Bichon Cassagnol	2	3	14	7	3
Aquitaine	Du Bourdieu	2	2	8	22	2
Bourgogne	Domaine Leflaive	4	8	8	5	4
Bourgogne	Chapelle Jean François	3	4	14	9	6
Bourgogne	Christophe Buisson	4	2	4	4	1
Bourgogne	Jean Hugues Goissot	4	5	14	3	2
	Total	20	28	71	71	24

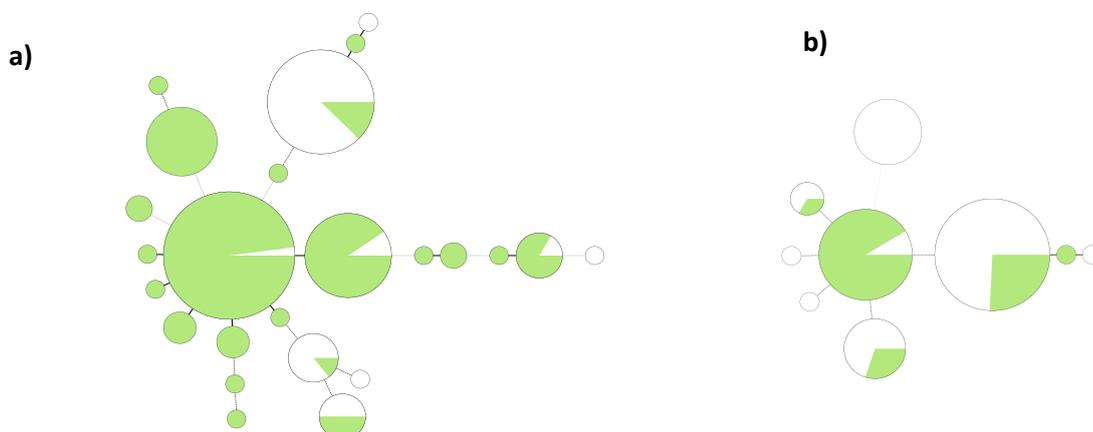


Figure 29 Représentation en ACM des souches d'une exploitation isolées au cours de 2 millésimes.

a) Château de Bellevue, Aquitaine, b) Domaine Leflaive, Bourgogne. Blanc : isolats de 2012. Vert : isolats de 2013.

Tableau 19. Nombre de colonies et de souches par type de produit et par région.

Région	Vin rouge	Vin blanc	Vin rosé	Cidre
Aquitaine	886	0	0	0
Bourgogne	377	254	0	0
Languedoc - Roussillon	365	0	14	0
Val de Loire	55	36	0	0
Bretagne	0	0	0	59
Liban	339	0	0	0
Nombre total d'isolats	2022	290	14	59

en Bourgogne (Tableau 18). Deux à 4 échantillons ont été analysés chaque année dans chaque exploitation, ce qui a permis d'isoler 71 souches dans chacun des 2 millésimes. Le nombre de souches identifiées dans chaque exploitation est assez variable entre les millésimes et ce, quel que soit le nombre d'échantillons prélevés. Par exemple, 8 et 22 souches ont été retrouvées en analysant, respectivement, 2 échantillons de 2012 et 2 de 2013, du Château Du Bourdieu. Mais à l'inverse, dans le Château Bichon Cassagnol et les Domaines Leflaive et Jean Hugues Goissot, moins de souches ont été identifiées en 2013, alors que plus d'échantillons y ont été analysés. Néanmoins, dans toutes les exploitations, au moins une souche identique a été retrouvée au cours des 2 millésimes. Au Château de Bellevue, ce sont 6 des 9 souches isolées en 2012 qui ont été retrouvées en 2013, soit 67% des souches. Au total, 24 souches des 7 exploitations ont été retrouvées dans deux millésimes successifs. Ces résultats suggèrent que la diversité des souches rencontrées dans les exploitations et les régions n'est pas totalement variable d'une année à l'autre, mais qu'au contraire certaines souches peuvent persister.

La figure 29 représente les ACM des souches isolées en 2012 et 2013 de deux exploitations, Château de Bellevue et Domaine Leflaive. Elle permet de voir si les souches retrouvées durant les deux millésimes étaient des souches abondantes ou non. Dans les vins du Ch. de Bellevue, 9 souches ont été isolées en 2012 dont une était dominante. En 2013, 21 souches ont été isolées, dont 2 dominantes. Comme on peut le voir sur l'ACM, la souche dominante en 2012 est peu représentée en 2013, et à l'inverse, les souches dominantes en 2013 n'apparaissent presque pas en 2012. De plus, quelques souches moins abondantes sont présentes uniquement pour un millésime. Pour le domaine Leflaive, on observe la même variation entre les souches des deux années, mais avec un nombre plus restreint de souches. L'abondance d'une souche une année ne garantit donc pas son abondance le millésime suivant, de même une souche peu représentée une année, peut devenir une souche abondante l'année suivante. Tous ces cas de figures ont été retrouvés entre les échantillons des deux millésimes dans les exploitations analysées.

Tableau 20. Nombre de souches par type de produit et par région.

Région	Vin rouge	Vin blanc	Vin rosé	Cidre	Vin rouge* /vin blanc	Vin rouge* /vin rosé
Aquitaine	181	-	-	-	-	-
Bourgogne	109	39	-	-	6	-
Languedoc - Roussillon	131	-	4	-	-	1
Val de Loire	23	7	-	-	1	-
Liban	57	-	-	-	-	-
Bretagne	-	-	-	25	-	-
Total	455	46	4	25	15	1

* Souches retrouvées dans 2 produits différents

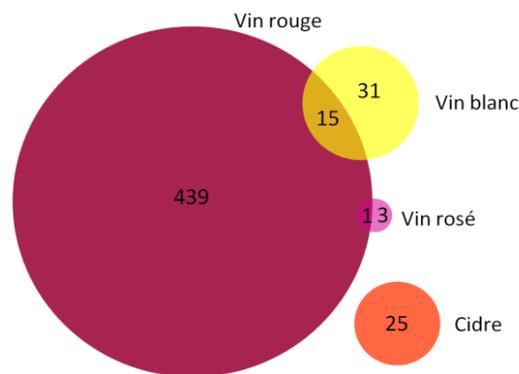


Figure 30. Nombre de souches identifiées par type de produit. Les chiffres contenus dans les zones où les cercles s'entrecroisent correspondent aux souches communes.

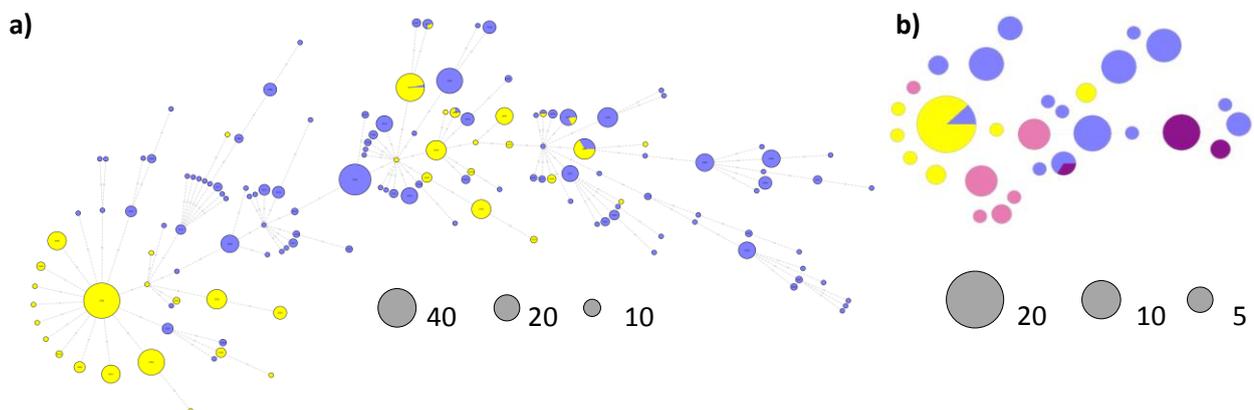


Figure 31. Répartition des souches de vins blancs et rouges dans les régions Bourgogne et Val de Loire.

Les ACM ont été réalisés en utilisant les données de l'analyse MLVA des colonies de Bourgogne (a) ou du Val de Loire (b) et en colorisant les souches selon le type de vin d'origine : jaune: vin blanc; bleu/violet/rose : vin rouge.

8. Diversité des souches dans les produits.

Différents produits ont été échantillonnés dans les 6 régions étudiées : du vin rouge dans toutes les régions viticoles, du vin blanc en Bourgogne et dans le Val de Loire, du vin rosé dans le Languedoc-Roussillon et du cidre en Bretagne. Au total, 2022 colonies de vins rouges ont été analysées, 290 de vins blancs, 14 de vins rosés et 59 de cidres (Tableau 19). A partir de ces colonies, nous avons identifié 455 souches de vins rouges, 46 de vins blancs, 4 de vins rosés et 25 de cidres (Tableau 20). Aucune souche n'a été trouvée à la fois dans le cidre et dans le vin. Cependant, des souches communes à différents types de vins ont été identifiées. Une souche était présente dans des vins rosés et des vins rouges issus de la même exploitation et 15 des 46 souches de vins blancs étaient également retrouvées dans des vins rouges (Tableau 20, figure 30).

En considérant séparément les régions où des vins blancs ont été analysés, on remarque, sur les ACM de Bourgogne et du Val de Loire, peu de souches communes aux vins blancs et rouges de ces régions (Figure 31 a et b). En Bourgogne, sur les 39 souches de vins blancs et 109 souches de vins rouges qui ont été identifiées, seules 6 souches sont communes aux deux types de vins, soit 15% des souches de vin blanc. De plus, en Bourgogne, 5 des 12 exploitations échantillonnées produisent du vin blanc et du vin rouge, et 2 d'entre elles produisent les deux types de vin à partir des mêmes communes. Cependant, dans aucune de ces exploitations il n'a été observé des souches identiques dans les vins blancs et rouges. Dans le Val de Loire, peu de souches ont été identifiées et tous les échantillons de vins blancs proviennent du Muscadet. 6 souches sur les 7 identifiées dans le vin blanc sont uniques à cette appellation. Une seule a également été identifiée dans un vin rouge de Saumur.

9. Discussion

De nombreuses méthodes de typage ont été mises au point au fil des ans pour permettre et faciliter le typage des souches d'*O. oeni*. Ces dernières années, les méthodes les plus répandues étaient la REA-PFGE (Larisika *et al.*, 2008) et la MLST (Bilhère *et al.*, 2009), qui ont un bon pouvoir de discrimination et permettent d'apprécier la proximité génétique des souches. La PCR-RAPD est également largement employée (Zavaleta *et al.*, 1997; Bartowsky *et al.*, 2003), la mise au point d'une PCR multiplexe RAPD a permis d'augmenter la reproductibilité de cette méthode en conservant un fort pouvoir discriminant (Reguant and Bordons, 2003). Cependant, la mise en place de ces méthodes est longue et coûteuse et nécessite pour certaines une extraction d'ADN qui ne serait pas envisageable pour réaliser le typage d'un grand nombre d'isolats, comme cela est le cas dans notre étude. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode de typage MLVA (Multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis)(Claisse and Lonvaud-Funel, 2012) basée sur l'analyse de la taille de séquences répétées en tandem. Cette méthode présente plusieurs avantages : 1/ elle est peu coûteuse et facile à mettre en œuvre, car elle consiste en seulement 2 PCRs multiplex qui peuvent être réalisées « sur colonie », c'est-à-dire sans purification d'ADN, 2/ elle est « haut-débit », dans la mesure où elle peut être réalisée en microplaques, pour analyser simultanément plusieurs dizaines ou centaines de colonies, 3/ son pouvoir discriminant est supérieur à celui des méthodes citées précédemment pour l'espèce *O. oeni* (Claisse and Lonvaud, 2014) et 4/ les résultats obtenus sont sous forme numérique (valeurs d'allèles), et peuvent donc être conservés dans des bases de données et échangés entre des laboratoires, ce qui n'est pas le cas pour les résultats d'autres méthodes telles que la REA-PFGE ou la RAPD. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle ne permet pas de grouper les souches selon leur proximité génétique. Elle ne nous a donc pas permis de déterminer s'il existait des « groupes génétiques » de souches spécifiques des régions ou types de vins analysés.

L'utilisation de la MLVA, de par ses avantages, est très répandue pour le typage des espèces de bactéries pathogènes et le suivi des épidémies (Keim *et al.*, 2000; Sintchenko *et al.*, 2012). Son pouvoir discriminant est égal ou supérieur à celui de la PFGE selon les espèces étudiées (Noller *et al.*, 2003; Malachowa *et al.*, 2005). Les locus analysés (TR) étant

connus pour évoluer rapidement (Belkum *et al.*, 1998), des études ont été menées pour étudier la stabilité de certains d'entre eux, en typant plusieurs générations de bactéries après des repiquages successifs ou des croissances sous différentes conditions (Vogler *et al.*, 2006; Barua *et al.*, 2013; Bustamante *et al.*, 2013; Wuyts *et al.*, 2013). Les résultats ont mis en évidence une instabilité liée à quelques TR et pour quelques souches en particulier. Chez *Salmonella typhimurium*, quelques variants apparaissent après plus de 30 repiquages successifs, ce qui correspondrait à plus de 400 générations. Plus rarement, certains variants apparaissent après seulement 10 repiquages successifs, ce qui correspond à plus de 140 générations (Barua *et al.*, 2013; Wuyts *et al.*, 2013). Chez *E. coli* O157:H7, la stabilité de 28 loci a été testée en analysant plus de 2.10^5 générations. Seize loci avaient un taux de mutations variant de $3,4.10^{-6}$ à 4.10^{-4} mutations/génération (Vogler *et al.*, 2006). La stabilité des loci utilisés pour le typage par MLVA chez *O. oeni* n'est pas connue à ce jour. Cependant, au cours de cette étude, nous n'avons jamais observé de variation lorsque nous avons analysé à plusieurs reprises les mêmes souches. Par exemple, toutes les souches ont été cultivées une seconde fois pour réaliser une analyse SNP (chapitre suivant) et elles ont toutes été testées à l'issue de cette culture par PCR multiplex-VNTR pour vérifier leur nature. Aucune variation n'a été observée pour les 500 souches testées. De plus, dix souches ont été repiquées successivement deux fois en milieu liquide, puis dans du vin pour réaliser la FML, et aucune variation de profil n'a été observée. Néanmoins, il serait intéressant de mesurer la stabilité des TR lors d'expériences de repiquages successifs, car si un phénomène d'instabilité existe, il pourrait être problématique pour le suivi des souches utilisées comme levains malolactiques et qui sont cultivées pendant plusieurs générations au cours de leur production. Dans notre cas, la stabilité ou instabilité des loci que nous avons utilisés pour le typage des souches n'aura pas d'impact sur les résultats, car l'observation est réalisée à un seul instant. Le typage représente donc réellement les souches dominantes présentes à ce moment-là dans le vin analysé.

Cette méthode de typage nous a permis d'analyser près de 3 000 colonies d'*O. oeni* et d'identifier 514 souches différentes isolées de vins et cidres de 6 régions en France et au Liban. La première observation issue de cette analyse est qu'il n'existe pas de souches dominantes dans les régions. Quelques souches ont bien été détectées plus souvent que d'autres (les 3,7% de souches les plus abondantes représentent 27,2 % des colonies

analysées), mais elles étaient souvent très majoritaires dans une exploitation, et apparaissaient faiblement dans quelques autres exploitations, 5 au maximum. De plus, nous n'avons détecté que 3 souches commerciales dans l'ensemble de cette étude. Ces 3 souches ne représentent que 1 à 25 clones chacune, ce qui montre qu'elles n'ont pas envahi les exploitations, malgré le fait que ce sont probablement des souches bien adaptées aux vins. Les souches d'*O. oeni* qui réalisent la FML dans les vins et les cidres sont donc extrêmement diverses. Il n'existe pas de souches dominantes, mais une multitude de souches faiblement représentées. Un calcul statistique, réalisé dans les 4 régions où les échantillonnages ont été les plus importants, suggère que la diversité serait de l'ordre de 123 à 411 souches selon les régions. Par ailleurs, ces chiffres sont sans doute sous-estimés car ils ont été calculés en ne prenant en compte que les souches dominantes isolées au cours de la FML. La diversité des souches d'*O. oeni* présentes dans les régions pourrait donc être beaucoup plus importante.

Nous avons mis en évidence l'existence d'une importante diversité de souches qui, pour la plupart, n'ont été retrouvées que dans une seule région. Sur les 513 souches identifiées, 87,15% n'ont été isolées qu'à partir de vins ou cidres d'une seule région ; seulement 13% des souches ont donc été détectées dans 2 régions ou plus. Dans des travaux précédents, un ratio de 2:1 a été observé entre les souches uniques d'une région et les souches communes à plusieurs régions au Portugal, ce qui représente 66% de souches uniques (Marqués *et al.*, en 2011). Une autre étude réalisée en Espagne a comptabilisé 99 souches sur 112 associées à une seule région, soit 88% des souches (González-Arenzana *et al.*, 2013). Cette proportion doit dépendre des zones géographiques et des échanges de souches qui se produisent entre elles. Cependant, une analyse statistique des échantillonnages réalisés en Aquitaine, Bourgogne et Languedoc-Roussillon suggère qu'ils sont bien représentatifs de la diversité des souches de ces régions. Par conséquent, même si d'autres études étaient réalisées dans ces régions sur des nombres d'échantillons encore plus importants, il est peu probable que la proportion de souches « uniques » et souches « communes » commune de ces régions soit modifiée. La grande diversité des souches uniques aux régions étudiées, suggère qu'il existe une répartition géographique des souches, comme cela avait déjà été suggéré dans des études portant sur moins d'échantillons (Cañas *et al.*, 2009; Marques, 2011; González-Arenzana *et al.*, 2013)

La diversité des souches d'*O. oeni* est si importante que, non seulement la plupart des souches sont « uniques » de certaines régions, mais elles le sont aussi au niveau des appellations et des exploitations. La diversité des souches dans les vins au moment de la FML est variable en fonction des régions. Des FML se déroulant avec plusieurs souches (jusqu'à 6) ont déjà été mises en évidence (Cappello *et al.*, 2010; Mesas *et al.*, 2011; González-Arenzana *et al.*, 2012). Dans les échantillons que nous avons analysés, nous en avons identifié 3 à 4 souches en moyenne, qui sont présentes de façon majoritaire dans les vins rouges et 2 à 3 souches dans les vins blancs. Jusqu'à 10 souches ont pu être identifiées dans les vins rouges et seulement jusqu'à 4 dans les vins blancs. Ce genre de différence n'avait jamais été montré auparavant. Il est probable que les conditions du milieu soient plus sélectives dans le vin blanc et restreignent la diversité des souches qui peuvent s'y implanter. L'abondance ou non de certaines souches au niveau d'une région ou d'une appellation se reflète également au niveau d'une exploitation. Comme le montrent nos résultats, une exploitation possède une diversité importante de souches d'*O. oeni* dans ses vins. Parmi ces souches, certaines dominent la population et sont détectées plusieurs fois, d'autres sont présentes de façon moins importante et n'ont été détectées que quelques fois.

L'analyse des différents types de produits a révélé peu de souches communes entre eux. Ainsi, aucune souche identifiée dans le cidre n'a été retrouvée dans le vin. De plus, parmi les souches isolées de vins blancs, peu ont été identifiées dans des vins rouges. Ceci même pour des exploitations qui produisent les deux types de vins. Il y a donc une séparation des souches en fonction des produits dont elles ont été isolées, ce qui est probablement dû à une sélection causée par le milieu. Ces résultats concordent avec des résultats d'analyses phylogénétiques réalisées par la méthode MLST et par le séquençage de génomes (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010, Campbel-Sills *et al.*, 2014), qui ont mis en évidence des groupes phylogénétiques composés de souches provenant d'une même origine ou d'un même produit, comme le champagne ou le cidre.

CHAPITRE 3

Classement phylogénétique des souches

Tableau 21. Caractéristiques des séquences des 50 génomes de souches d'*O. oeni* publiées

Souche	Alias	Isolement			Séquençage				Références	
		Année	Région	Produit	Méthode	Contigs	taille (bp)	CDS	n° accession	Publication
ATCC_BAA-1163	NA	1984	France	Vin rouge	Sanger	61	1748994	1835	AAUV00000000	NCBI
AWRIB129	DSM 20252 (type strain)	NA	France	NA	Illumina	42	1729193	1780	AJTP00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB202	NA	1994	Australie	NA	Illumina	36	1840757	1914	AJTO00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB304	NA	1999	Australie	NA	Illumina	36	1852239	1928	AJJI00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB318	NCDO 1884	1956/57	Australie	NA	Illumina	26	1814530	1893	ALAD00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB418	MCW (Lallemand)	NA	USA	NA	Illumina	34	1838155	1887	ALAE00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB419	Lalvin EQ54 (Lallemand)	NA	France	NA	Illumina	46	1793208	1861	ALAF00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB422	Viniflora CH35 (CHR Hansen)	NA	NA	Champagne	Illumina	32	1814530	1893	ALAG00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB429	Lalvin VP41 (Lallemand)	2000	Italie	NA	Illumina	58	1927702	2042	ACSE00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB548	MT01, BL01 (Lallemand, Sofralab)	NA	France	Champagne	Illumina	29	1835383	1929	ALAH00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB553	Elios-1 (Lallemand)	NA	France	NA	Illumina	32	1759113	1814	ALAI00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB568	NA	2008	Australie	NA	Illumina	31	1874865	1968	ALAJ00000000	Borneman et al. 2012a
AWRIB576	NA	2008	Australie	NA	Illumina	28	1877204	1964	ALAK00000000	Borneman et al. 2012a
IOEB_0205	NA	2002	France	Champagne	454	42	1795037	1879	AZHH00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_0501	NA	2005	France	Vin rouge	454	38	1826356	1892	AZIP00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_0502	NA	2005	France	Vin rouge	Illumina	39	1822270	1883	AZKL00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_0607	NA	2006	France	Vin rouge	454	122	1815356	1873	AZKK00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_0608	NA	2006	France	Vin rouge	454	41	1812611	1882	AZKJ00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_1491	NA	2001	France	Vin rouge	Illumina	42	1772571	1852	AZLG00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_8417	NA	1984	France	NA	454	65	1842137	1907	AZKH00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_9304	NA	1993	France	Cidre	454	137	1827658	1901	AZKI00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_9517	NA	1995	France	NA	454	56	1743782	1824	AZKG00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_9803	NA	1998	France	NA	454	36	1833906	1889	AZKF00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_9805	NA	1998	France	NA	454	57	1843445	1912	AZKE00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_B10	NA	NA	NA	NA	Illumina	42	1779079	1841	AZJW00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_B16	B16(Laffort)	2000	France	Champagne	454	45	1793397	1875	AZKC00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_C23	NA	2008	France	Cidre	Illumina	47	1837655	1941	AZJU00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_C28	NA	2008	France	Cidre	Illumina	130	1804864	1905	AZLE00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_C52	NA	2008	France	Cidre	Illumina	48	1903774	1946	AZLF00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_CiNe	Viniflora CINE (CHR Hansen)	NA	NA	NA	Illumina	60	1790871	1863	AZJV00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_L18_3	NA	2011	Liban	Vin rouge	Illumina	44	1735746	1790	AZLO00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_L26_1	NA	2011	Liban	Vin rouge	Illumina	26	1794099	1860	AZLP00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_L40_4	NA	2011	Liban	Vin rouge	Illumina	61	1731377	1800	AZLQ00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_L65_2	NA	2011	Liban	Vin rouge	Illumina	39	1776569	1850	AZLR00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_S277	SB3 (Laffort)	2001	France	Vin rouge	454	69	1741397	1798	AZKD00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_S436a	NA	NA	NA	NA	Illumina	44	1764184	1829	AZLS00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_S450	450 (Laffort)	2000	France	NA	Illumina	37	1762120	1826	AZLT00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
IOEB_VF	Vitilactic F (Sofralab)	2000	France	NA	Illumina	48	1782542	1854	AZLM00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
PSU-1	NA	1972	USA	Vin rouge	Sanger	1	1780517	1878	CP000411	Mills et al., 2005
S11	NA	2009	France	Vin blanc pétillant	Illumina	40	1833247	1898	AZJX00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S12	NA	2009	France	Vin blanc	Illumina	35	1813617	1856	AZLH00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S13	NA	2009	France	Vin rouge	454	66	1814452	1870	AZKB00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S14	NA	2009	France	Vin rouge	Illumina	40	1731907	1800	AZLI00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S15	NA	2009	France	Vin rouge	Illumina	37	1740731	1784	AZLJ00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S19	NA	2009	France	Vin rouge	Illumina	65	1810386	1889	AZLK00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S22	NA	2009	France	Vin blanc	454	43	1810137	1883	AZKA00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S23	NA	2009	Angleterre	Vin blanc	Illumina	50	1805457	1859	AZLL00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S25	NA	2009	France	Vin rouge	454	32	1741301	1808	AZJZ00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S28	B28 (Laffort)	2009	France	Vin rouge	454	46	1843403	1924	AZJY00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
S161	350Preac (Laffort)	NA	NA	Vin rouge	Illumina	35	1789533	1850	AZLN00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
DSM_17330	NRIC_0645	2003	Japon	Résidus de Shochu	Illumina	1	1833925	1841	ATZG00000000	Borneman et al. 2012b
NRIC_0647	NA	2003	Japon	Résidus de Shochu	Illumina	27	1839043	1849	JSAG00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
NRIC_0649	NA	2003	Japon	Résidus de Shochu	Illumina	16	1825564	1832	JSAH00000000	Campbell-Sills et al (soumis)
NRIC_0650	NA	2003	Japon	Résidus de Shochu	Illumina	16	1785288	1790	JSAI00000000	Campbell-Sills et al (soumis)

L'échantillonnage réalisé pendant les FML et le génotypage des isolats d'*O. oeni* par analyse VNTR a permis d'identifier près de 500 souches d'*O. oeni*, réparties dans 5 régions viticoles et une région cidricole. En majorité, ces souches n'ont été détectées que dans une

seule région et, la plupart du temps, dans une seule appellation ou une seule exploitation. De même, la plupart des souches n'étaient présentes que dans un seul type de produit : vin blanc, rouge, rosé, ou cidre. Pour déterminer si cette distribution est liée aux caractéristiques génétiques des souches, nous avons souhaité les analyser par une méthode permettant de mesurer leur proximité génétique. En effet, la méthode MLVA s'est avérée efficace pour différencier les souches mais elle n'a pas permis de les grouper phylogénétiquement. Les méthodes couramment utilisées au laboratoire pour les analyses phylogénétiques des souches d'*O. oeni*, REA-PFGE et MLST, n'ont pas été utilisées en raison du temps et du coût qui auraient été nécessaires pour l'analyse de 500 souches. Le laboratoire s'étant engagé dans le séquençage de génomes d'*O. oeni* dans le cadre de plusieurs projets, nous avons tout d'abord choisi de séquencer quelques génomes des souches identifiées dans cette étude, afin de les comparer aux autres génomes disponibles dans un arbre phylogénétique et, si possible, d'identifier des gènes spécifiques qui permettraient de mettre au point des tests de PCR spécifiques de « groupes génétiques » de souches.

1. Séquençage des génomes et analyse phylogénétique

En 2010, le laboratoire avait déjà réalisé le séquençage de 8 génomes d'*O. oeni*. Les génomes de 22 nouvelles souches d'*O. oeni* ont été séquencés en 2012 dans le cadre de cette étude et d'autres projets. La plupart des souches ont été choisies d'après leur position phylogénétique dans un arbre construit par l'approche MLST (Bilhère *et al.*, 2009), afin de séquencer des génomes représentatifs de la diversité génétique de l'espèce. De plus, 4 souches représentatives du Liban et isolées lors de cette étude ont été ajoutées, ainsi que 3 souches de cidre. Enfin, les génomes de 3 souches de l'espèce *O. kitaharae* ont également été séquencés. Les ADNs génomiques de ces souches ont été extraits, calibrés et transmis à la Société Macrogen qui a réalisé leur séquençage et assemblage *de novo*. Les séquences assemblées ont été annotées par RAST (Aziz *et al.*, 2008). Les principales caractéristiques des 30 génomes produits par le laboratoire et des 14 génomes publiés dans les bases de

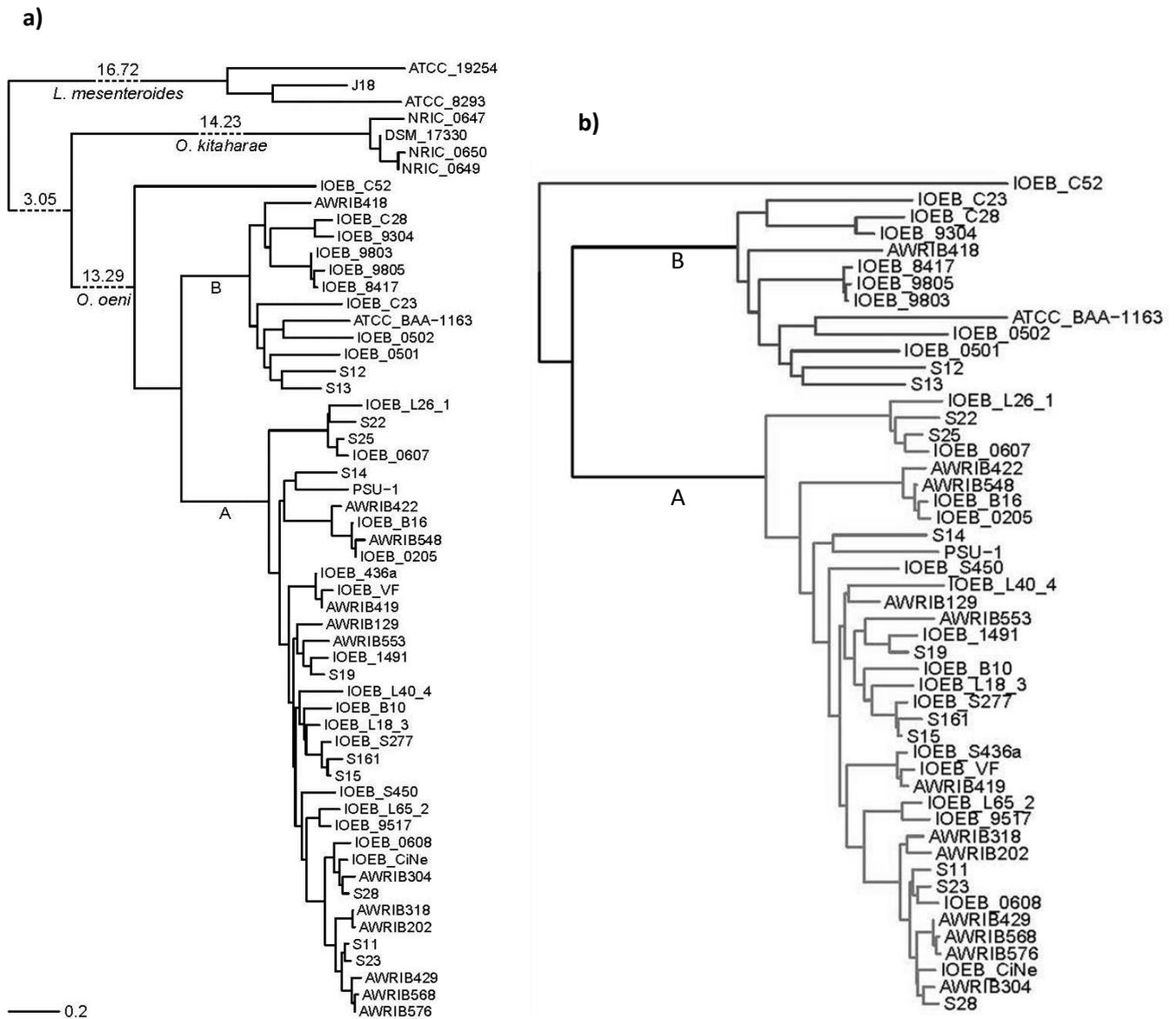


Figure 32. Distribution phylogénétique des souches d'*O. oeni*.

Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant les algorithmes ANIb (a) et ANIm (b) et les génomes de 50 souches d'*O. oeni* et de souches des espèces proches, *O. kitaharae* et *Leuconostoc mesenteroides* (H. Campbell-Sills, communication personnelle). Les groupes génétiques désignés par les lettre « A » et « B » ont été définis d'après Bilhère *et al* (2009, 2010).

données ont été analysées par H. Campbell-Sills et sont indiquées dans le tableau 21. Deux arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant les algorithmes ANIb et ANIm de JSpecies (H. Campbell-Sills, communication personnelle). ANIb permet de comparer les génomes d'espèces différentes et a été utilisé pour positionner les souches d'*O. oeni* par rapport aux espèces voisines *Oenococcus kitaharae* et *Leuconostoc mesenteroides* (Figure 32a). ANIm est plus approprié pour comparer des génomes proches et a été utilisé pour positionner les souches d'*O. oeni* les unes par rapport aux autres (Figure 32b). La topologie générale des 2 arbres est presque identique en ce qui concerne la répartition des souches d'*O. oeni*. Elles sont pratiquement toutes distribuées dans 2 groupes phylogénétiques, A et B, identiques à ceux obtenus par des analyses MLST réalisées précédemment (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010). Une seule souche isolée de cidre (C52) est retrouvée en dehors des 2 groupes. Sa position, par rapport aux espèces *O. kitaharae* et *L. mesenteroides* dans l'arbre ANIb, suggère qu'elle est issue d'une divergence ancestrale qui a précédé l'apparition des groupes A et B. Des analyses supplémentaires de son génome ont montré qu'elle est réellement différente des souches retrouvées dans les groupes A et B (Campbell-Sills *et al.*, soumis). Les 3 autres souches de cidre (C23, C28, 9304) sont groupées ensemble dans le groupe B. Les 4 souches isolées du Liban au cours de cette étude (L26_1, L40_4, L18_3 et L65_2) sont toutes positionnées dans le groupe A, mais très distantes les unes des autres.

2. PCR spécifique des groupes A et B

Dans un premier temps nous avons voulu savoir comment étaient dispersées les souches des différentes régions, dans les deux groupes phylogénétiques A et B. Les génomes des souches de ces 2 groupes ont été comparés afin d'identifier des gènes spécifiques à l'un ou l'autre groupe et deux couples d'amorces spécifiques des souches du groupe génétique A ou du groupe B ont été dessinés (H. Campbell-Sills, communication personnelle). Un contrôle réalisé sur des souches analysées en MLST et connues pour appartenir aux groupes A ou B a permis de confirmer l'efficacité et la spécificité des 2 couples d'amorces.

Des 151 souches provenant d'Aquitaine et Languedoc–Roussillon ont été analysées par cette PCR spécifique « A/B ». Ces souches représentent 58 échantillons de vins

Tableau 22. Application de la PCR spécifique « A/B » pour identifier les groupes génétiques de 151 souches.

Région	Nombre d'exploitations	Nombre d'échantillons	Nombre de souches		
			Total	Groupe A	Groupe B
Aquitaine	13	41	102	91 (89,2%)	11 (10,7%)
Languedoc - Roussillon	9	17	49	46 (93,8%)	3 (6,1%)
Total	22	58	151	137 (90,7%)	14 (9,2%)

Tableau 23. Echantillons pour lesquels des souches du groupes B ont été identifiées.

Echantillons	Origine des échantillons			Nombre de souches		
	Région	Exploitation	Stade	Total	Groupe A	Groupe B
AQ4	Aquitaine	Ch. des Annereaux	FML	1	0	1
13AQ 31	Aquitaine	Ch. Bichon Cassignol	FML	3	1	2
13AQ 50	Aquitaine	Ch. Bichon Cassignol	FML	1	0	1
13AQ 36	Aquitaine	Ch. Bichon Cassignol	FML	1	0	1
LE1	Aquitaine	Ch. Bichon Cassignol	75% FA	7	1	6
LR16	Languedoc-Roussillon	Do. Cazes	FML	5	4	1
LR15	Languedoc-Roussillon	Do. Madagascar	FML	2	0	2

Tableau 24. Analyse de 67 ADN totaux extraits de vins par « PCR A/B ».

Région	Nombre d'exploitations	Nombre d'échantillons	Résultat PCR positif	
			Groupe A	Groupe B
Aquitaine	58	65	65	0
Rioja (Espagne)	2	2	2	0
Total	60	67	67	0

provenant de 22 exploitations réparties sur ces deux régions. En Aquitaine, 91 des 102 souches analysées ont été identifiées comme appartenant au groupe A et 11 au groupe B (Tableau 22). Parmi les 11 souches du groupe B, 10 provenaient de la même exploitation : le Château Bichon Cassagnol, 6 d'un vin à 75% de la FA et 4 de vins en cours de FML. Dans le Languedoc-Roussillon, 46 des 49 souches analysées étaient du groupe A et seulement 3 du groupe B. Deux de ces 3 souches provenaient également de la même exploitation. Les souches des deux régions appartiennent donc en grande majorité (90,7%) au groupe A. Les souches du groupe B sont nettement plus rares et ce, d'autant plus qu'elles sont souvent issues de peu d'échantillons. Néanmoins, des souches des 2 groupes peuvent être présentes simultanément dans le même échantillon, comme observé pour les échantillons AQ4, 13AQ31, LE1 et LR16 (Tableau 23).

Pour obtenir une meilleure vision de la fréquence des souches du groupe A et du groupe B dans les échantillons de vin, nous avons également réalisé des PCR « A/B » sur des ADN totaux extraits des biomasses de vins collectés en cours de FML. Ces biomasses avaient été recueillies et conservées au laboratoire au cours de différents projets. Au total, 67 ADN totaux extraits de vin ont été analysés. 65 vins provenaient d'Aquitaine et 2 de la région de la Rioja en Espagne (Tableau 24). Sur les 67 vins analysés, tous ont donné un résultat positif pour la PCR du groupe A et aucun pour celle du groupe B. Il est possible que les vins analysés ne contenaient pas de souches du groupe B, ou bien qu'elles étaient présentes en trop faible proportion pour être détectées. Ce résultat était cohérent avec le faible nombre de souches « B » détectées en analysant directement des colonies. Il confirme que les souches de ce groupe génétique sont nettement moins fréquentes dans les vins en cours de FML, que celles du groupe A.

A la suite de ces résultats, nous avons tenté de combiner les données de typage par MLVA et les identifications A/B pour mieux grouper les souches, mais la plupart des souches appartenant au groupe A, cet essai n'a pas été concluant (non montré). Par conséquent, nous n'avons pas poursuivi l'analyse des souches par cette PCR « A/B » et nous avons choisi de développer une autre approche pour classer les souches dans des groupes génétiques.

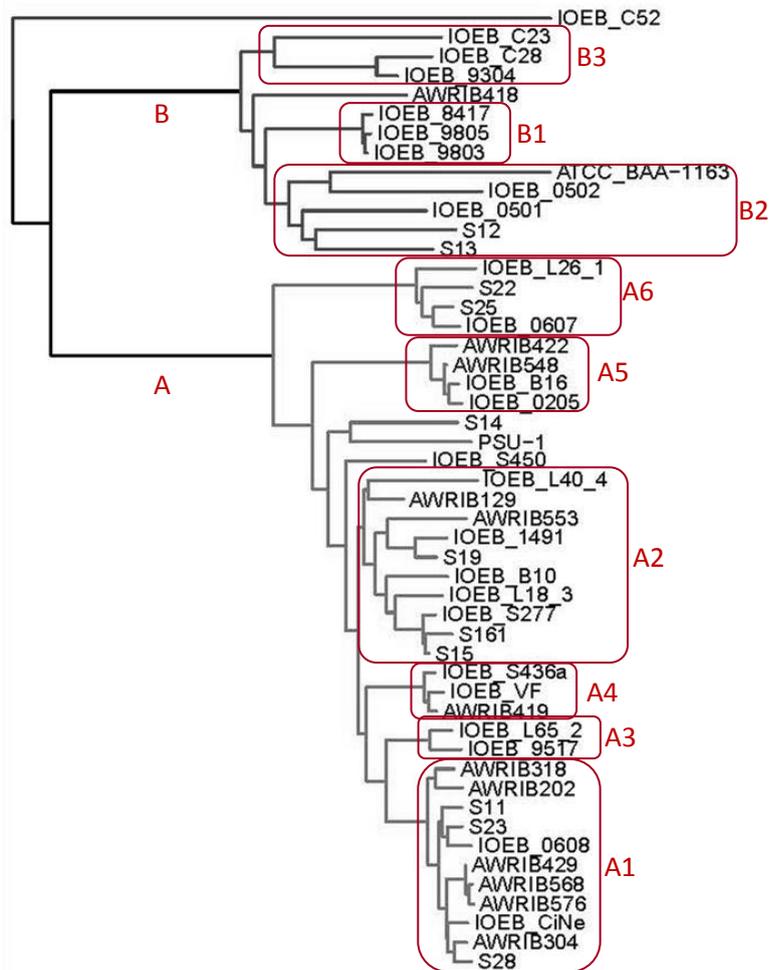


Figure 33. Sélection des groupes de souches d'*O. oeni* pour le choix de SNP.

L'arbre phylogénétique est celui de la figure 32 construit par l'algorithme ANIm à partir des 50 génomes connus d'*O. oeni*. Les 11 groupes génétiques désignés A, B, A1 à A6 et B1 à B3 ont été définis arbitrairement d'après la proximité phylogénétique des souches observée dans cet arbre.

3. Mise au point d'une méthode de génotypage par analyse de SNPs

Avec la disponibilité des 50 séquences de génomes d'*O. oeni*, nous avons pu mettre au point une méthode de génotypage basée sur le séquençage de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) par la technologie Sequenom. En effet, la comparaison des génomes permettait d'envisager l'identification de SNP spécifiques de différents groupes génétiques de souche, et elle était bien appropriée pour analyser rapidement un grand nombre de souches. De plus, la technologie Sequenom nous était facilement accessible via la plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux.

L'arbre phylogénétique obtenu par comparaison des 50 génomes d'*O. oeni* a été utilisé pour définir des groupes génétiques basés sur la proximité des génomes. Le nombre de groupes devait être proche de 10, car la technologie Sequenom permet de séquencer simultanément 40 SNPs par souche et il est conseillé d'analyser 3 à 4 SNPs de chaque groupe de souches pour garantir un bon génotypage. Au total, 11 groupes ont été définis : le groupe A (37 génomes), le groupe B (12 génomes), 6 sous-groupes A (2 à 11 génomes) et 3 sous-groupes B (3 à 6 génomes) (Figure 33). Une analyse bioinformatique a été réalisée pour isoler des SNPs spécifiques de chaque groupe (H. Campbell-Sills, communication personnelle). Brièvement, chaque séquence génomique a été alignée avec celle de la souche de référence *O. oeni* PSU-1 pour identifier un premier ensemble de plus de 47000 SNPs. Les SNP communs à toutes les souches d'un même groupe ont ensuite été identifiés. Puis, les SNPs des 11 groupes ont été comparés afin de ne conserver que ceux qui étaient spécifiques d'un seul groupe. Enfin, un dernier filtrage a été réalisé pour éliminer les SNPs qui n'étaient pas localisés sur des gènes du core génome. Finalement, ce sont 11 (groupe A2) à 1695 SNPs (groupe B) spécifiques de chacun des 11 groupes de souches et localisés sur des gènes du core génome qui ont été identifiés. Pour chaque groupe, de 11 à 100 SNPs ont été vérifiés manuellement pour contrôler : 1/ qu'ils étaient localisés sur des gènes présents en une seule copie sur le génome et 2/ qu'ils ne se trouvaient pas dans une région d'ADN contenant d'autres SNPs à +/- 200 pb (Matériels et méthodes 5.5). Les 12 SNPs spécifiques du groupe B2 ne répondaient à aucun de ces critères, il n'a donc pas été possible de sélectionner de SNP pour ce groupe. A partir de la sélection réalisée, une liste de 94 SNPs spécifiques de 10

Tableau 25. Nombre de SNP identifiés et sélectionnés pour le génotypage par analyse de SNP.

Groupe	Nombre de SNPs		
	Spécifiques de groupe et du core génome	Présélectionnés manuellement	Sélectionnés pour le génotypage
A	1626	10	4
A1	198	10	5
A2	11	7	4
A3	164	9	5
A4	207	9	3
A5	808	10	2
A6	1181	7	2
B	1695	9	6
B1	130	10	5
B2	12	0	0
B3	70	13	4
Total	6102	94	40

Tableau 26. Comparaison des 11 séquences des 40 SNP concaténés obtenues à partir des 50 génomes disponibles.

Séquence type	Souche représentative	Groupe génétique	Séquence concaténée des 40 SNPs
0	PSU_1*	A	T C G A A A G A C A T G C T G A C G G C C A C G A T A G A A C C G G T C C T A T
1	CiNe	A	C T T G G A G A C A T G C T G A C G G C C A C G A T A G A A C C G G T C C T A T
2	S161	A	T C G A A T A G T A T G C T G A C G G C C A C G A T A G A A C C G G T C C T A T
3	s9517	A	T C G A A A G A C G C T T C G A C G G C C A C G A T A G A A C C G G T C C T A T
4	VFplus	A	T C G A A A G A C A T G C T A G T G G C C A C G A T A G A A C C G G T C C T A T
5	AWRIB 422	A	T C G A A A G A C A T G C T G A C A A C C A C G A T A G A A C C G G T C C T A T
6	s0607	A	T C G A A A G A C A T G C T G A C G G T T A C G A T A G A A C C G G T C C T A T
7	IOEB_C52	N	T C G A A A G A C A T G C T G A C G G C C G T A G T A G A A C C G G T C C T A T
8	ATCC BAA1163	B	T C G A A A G A C A T G C T G A C G G C C G T A G T A G A A C C G G C T T C G C
9	s9803	B	T C G A A A G A C A T G C T G A C G G C C G T A G C T T G G C C G G C T T C G C
10	IOEB_C23	B	T C G A A A G A C A T G C T G A C G G C C G T A G T A G A A T A A C T T C G C

*La séquence de la souche *O. oeni* PSU_1 est utilisée comme séquence de référence pour l'alignement.

groupes de souches a été retenue et transmise aux partenaires de la plateforme Génome Transcriptome de Bordeaux (CGFB). Ces 94 SNPs ont été traités à l'aide du logiciel de design d'amorce Assay Design Suite 1.0 (Sequenom), pour retenir 40 SNP compatibles avec la réalisation de PCRs multiplexes. Cette dernière sélection a retenu de 2 à 6 SNPs pour chacun des 10 groupes de souches (Tableau 25). L'annexe 5 montre leur localisation génétique.

L'analyse *in silico* des 40 SNPs présents dans les 50 séquences de génomes disponibles permet de différencier 11 séquences différentes lorsque l'on compare les séquences concaténées des 40 SNPs (Tableau 26). Par la suite, chaque séquence concaténée est désignée « séquence type » par analogie avec la désignation anglosaxonne utilisée dans les analyses de MLST. Sept de ces séquences types correspondent à des souches du groupe A, 3 à des souches du groupe B, et la souche IOEB_C52, qui n'appartient à aucun de ces 2 groupes d'après l'analyse sa position phylogénétique, se trouve dans une position intermédiaire, avec des SNPs correspondants aux 2 groupes A et B.

4. Préparation des ADN génomiques et choix des souches pour l'analyse SNP

Le génotypage de SNP par la technologie Sequenom permet d'analyser jusqu'à 382 échantillons par « run » (réalisation d'un processus complet par la machine), ce qui permet dans le cas de notre étude d'analyser en 2 « runs » la totalité des souches identifiées. Le génotypage nécessite de fournir à la plateforme CGFB des ADNg purifiés et dosés à des concentrations proches. L'extraction d'ADNg pour près de 500 souches étant longue et coûteuse, nous avons testé la possibilité d'utiliser des extraits cellulaires comme il est pratiqué couramment au laboratoire pour réaliser des PCR sur colonies. Pour cela, chaque souche a été striée sur une boîte de milieu MJR solide pour obtenir des colonies isolées. Une colonie de chaque souche a ensuite été diluée dans 20 µL d'eau ultra pure stérile, puis ces préparations de colonies ont été stockées à -20°C. Une PCR quantitative a été réalisée avec chaque préparation de colonie, afin de vérifier si suffisamment d'ADN était présent pour réaliser une amplification et, si besoin, pour diluer les préparations jusqu'à obtenir des niveaux d'amplifications similaires, correspondants à des quantités d'ADNg similaires.

Tableau 27. Souches géotypées par analyse de SNP par la technique Sequenom.

Origine			Typage par Sequenom		
Région ou produit	Année	Collection	Run 1	Run 2	Run 2
Aquitaine	2012 - 2013	cette étude	147	34	-
Bourgogne	2012	cette étude	86	28	-
Languedoc - Roussillon	2012 - 2013	cette étude	90	14	-
Liban	2011	cette étude	31	-	-
Val de Loire	2013	cette étude	-	29	-
Cidre	2013	cette étude	-	25	-
Cidre Espagne	2006 - 2008	CRB-oeno	-	-	8
Cidre France	1993 - 2008	CRB-oeno	-	-	33
Espagne	Inconnue	CRB-oeno	-	-	1
Italie	Inconnue	CRB-oeno	-	-	2
Grèce	Inconnue	CRB-oeno	-	-	2
Aquitaine	Inconnue	CRB-oeno	-	-	23
Jurançon	Inconnue	CRB-oeno	-	-	1
Vin de Liqueur	Inconnue	CRB-oeno	-	-	2
Inconnue	1989	CRB-oeno	-	-	38
Total par run			354	130	110
Total général				594	

Tableau 28. Exemples de SNPs et souches aberrants identifiés lors du contrôle des données de géotypage par le logiciel Typer Analyser.

Souche	N° SNP-groupe génétique										
	5-A1	6-A1	8-A1	9-A1	11-A2	12-A2	13-A2	24-A6	25-A6	32-B1	33-B1
AQ 9.15	T	C	G	A	A	G	T	C	C	T	A
B 10.12	T	C	G	A	G	A	C	C	C	T	A
LR 8.1	C	T	G	G	G	A	C	C	C	T	A
14BZ 9.8	CT	C	G	A	G	A	C	C	C	T	A
AQ 40.3	T	C	G	GA	A	G	CT	C	C	CT	A
13AQ 32.6	CT	CT	G	AG	GA	AG	CT	C	C	CT	A

La couleur rouge indique les 3 SNPs et les 3 souches éliminées de l'analyse.

Parmi les souches isolées lors de cette étude, 15 n'ont pas pu être transmises à la plateforme de génotypage car elles ne s'étaient pas développées lors de l'étape d'isolement des colonies. Pour compléter les plaques d'échantillons utilisées lors des 2 runs d'analyse (2 x 382 échantillons incluant des contrôles internes), nous avons également préparé des souches issues de la collection du laboratoire (CRB-oen). Ces souches ont été isolées de millésimes plus anciens (entre 1989 et 2008) et proviennent d'origines et de produits différents : cidres de France et d'Espagne, vins d'Aquitaine, du Jurançon, d'Espagne, d'Italie et de Grèce, vins de liqueur et vins du millésime 1989 d'origine inconnue (Tableau 27). Au total, 594 souches ont été préparées, dont 484 issues de cette étude et 110 provenant de la collection du laboratoire. De plus, une collection de souches provenant de la région de Priorat (Tarragone, Espagne) a été analysée simultanément par une étudiante réalisant un stage au laboratoire (résultats non montrés).

5. Analyse des résultats bruts de séquençage par Sequenom

Après transmission des échantillons à la plateforme CGFB, leur analyse a été réalisée comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les données brutes de séquençage ont pu être visualisées directement à la plateforme, dès la fin de l'analyse par le MALDI-TOF, par le logiciel « Typer Analyser » (Sequenom). Ce logiciel permet de visualiser tous les SNP et de vérifier les spectres de masse obtenus dans les cas où des SNP sont indéterminés (Matériel et méthode, 5.5). Il permet aussi de générer le rapport final de génotypage qui se présente sous la forme d'un fichier Excel contenant les résultats d'identification de chaque SNP pour chaque souche.

Un cas particulier s'est présenté lors de l'analyse des résultats : le SNP numéro 8-A1, qui avait été sélectionné car il était spécifique du sous-groupe A1. Lors des 2 runs réalisés, toutes les souches possédaient la même base, « G » au niveau de ce SNP (Tableau 28). Le témoin négatif possédait aussi une base « G » qui lui avait été affiliée par le spectromètre, ce qui indiquait vraisemblablement une erreur de séquençage. Ce SNP a donc été supprimé de l'analyse. En réalisant ce contrôle, nous nous sommes aperçus que nous avons négligé l'impact des SNPs lors de leur choix, alors qu'il était nécessaire de choisir des SNPs neutres ou n'introduisant pas de codons stop, pour pouvoir les utiliser dans le classement phylogénétique des souches. Parmi les 40 SNPs sélectionnés, le SNP numéro 8-A1 donnait

Tableau 29. Liste des 43 séquences types différentes obtenues par analyse de 37 SNPs pour 577 souches et 50 génomes séquencés.

	Groupes phylogénétiques	Nombre de souches	Séquences types
1	A0	48 (3)	T C G A A G A C A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
2	A0-1	1	T C G A A G A C A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C C A T
3	A1	116 (11)	C T T G A G A C A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
4	A1-1	3	C C T G A G A C A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C - G T C C T A -
5	A1-2	12	T T T G A G A C A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C - G T C C T A -
6	A1-3	2	T C - G A G A C A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A T
7	A2	148 (10)	T C G A T A G T A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
8	A2-1	7	T C G A T A G T A T G C T G A C G G C A T G A A G A A C C G G T C C T A -
9	A2-2	6	T C G A T A G T A T G C T A A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
10	A2-3	3	T C G A T A G T A T G C T G G C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A T
11	A2-4	2	T C G G T A G T A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
12	A2-5	2	T T G G T A G T A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A T
13	A2-6	1	T C G A T A G T A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C C A T
14	A2-7	4	T C G A T A G C A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C - G T C C T A -
15	A2-8	28	T C G A A A G T A T G C T G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A T
16	A3	18 (2)	T C G A A G A C G C T T C G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
17	A3-1	1	T C G A A G A C G T G T C G A C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
18	A4	32 (3)	T C G A A G A C A T G C T A G T G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
19	A4-1	1	T C G A A G A C A T G C T G G C G G C A C G A A G A A C C G G T C C T A T
20	A5	17 (4)	T C G A A G A C A T G C T G A C A A C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
21	A5-1	1	T C G A A G A C A T G C T G A C G A C A C G A A G A A C C G G T C C T A -
22	A6	33 (4)	T C G A A G A C A T G C T G A C G G T A C G A A G A A C C G G T C C T A -
23	B1	4 (3)	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G T T G G C C G G - T - C G -
24	B1-1	1	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G T T G A C C G G - T T C G -
25	B1-2	3	T C G A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G T T A G C C G G - T - C G -
26	B2	37 (6)	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G A G A A C C G G T T T T G -
27	B3	13 (3)	T C G A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G A G A A A T A A - T T C G -
28	B3-1	9	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G - G A A A T - G - T T C G -
29	B3-2	1	T C G A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G A G A A A T A G - T - C G -
30	B4	2	T C G A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G A G A A C C G A - T T C G -
31	B5	3	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G A G A A C C G G - T - C G -
32	C52	0 (1)	T C G A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G A G A A C C G G T C C T A T
33	N1	1	T C - A A G A C A T G C T A A C G G C G C G G A G A A C C G G T C C T A -
34	N10	1	T C - A A G A C A T G C T A A C G G C G T G G A G A A C C G G T C T T G -
35	N11	1	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T G G A G A A C C G G T T T T G -
36	N2	1	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G C G G A G A A C C G G T T C C A -
37	N3	1	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G C G G A G G A C C G G T T C T G -
38	N4	1	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T G G A G A A C C G G T C C C A -
39	N5	1	T C - A A G A C A T G C T A A C G G C G T G G A G A A C C G G - C C T A -
40	N6	5	T C G A A G A C A T G C T A A C G G C G T G G A G A A C C - G - T C T A -
41	N7	1	T C G A A G A C A T G C T A A C G G C G T A G A G A A C C G G T C C C A -
42	N8	3	T C - A A G A C A T G C T G A C G G C G T A G A G A A - C G G - C - C G -
43	N9	2	T C - A A G A C A T G C T A A C G G C G T G G - G A A C C G G T T T T G -
Total		577 (50)	

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux souches dont les génomes ont été séquencés

lieu à un codon stop situé au niveau de l'amorce. Le logiciel d'annotation n'avait pas détecté correctement le début du gène ce qui décalait le cadre de lecture pour les codons. Quelques SNPs n'ont pu pas être amplifiés pour certaines souches, peut-être à cause de la qualité des ADNs ou de mutations au niveau des sites d'hybridation des amorces de PCR utilisées pour ces SNPs. Trois souches avaient été notées par le logiciel « Typer analyser » comme étant des hétérozygotes, possédant 2 allèles différents, ce qui est impossible chez *O. oeni* et indique une contamination de l'échantillon. Ces souches ont également été supprimées de l'analyse (Tableau 28). 9 souches supplémentaires (2 de Bourgogne et 7 de la collection du laboratoire) n'ont pas non plus été considérées par la suite, car aucune donnée de séquençage n'a été obtenue pour elles.

Des résultats complets d'analyse SNP ont donc été obtenus pour 577 des 594 souches analysées. Pour chaque souche, les 37 SNPs ont été assemblés pour produire une seule séquence concaténée. Les mêmes SNPs ont été recherchés par analyse *in silico* dans les 50 génomes séquencés et ils ont aussi été assemblés pour produire 50 séquences supplémentaires. La comparaison des 577+50 séquences obtenues a permis d'en identifier 43 différentes, qui ont été désignées par la suite « séquences types » (Tableau 29). Onze séquences types sont caractéristiques des souches appartenant aux 11 groupes phylogénétiques définis lors de la mise au point de la méthode. D'autre part, 466 des 577 souches analysées possèdent l'une de ces 11 séquences types et ont donc pu être classées dans les groupes phylogénétiques correspondants (Tableau 29). Cependant, pour les 111 autres souches, l'assemblage des SNPs a mis en évidence 32 nouvelles séquences types, qui ne correspondent à aucune des séquences types caractéristiques des 11 groupes phylogénétiques. Quinze de ces séquences types n'ont été identifiées que chez une seule souche, les 18 autres ont été obtenues pour 2 à 28 souches. De nouveaux groupes génétiques ont donc été définis pour pouvoir classer ces souches. Ils ont été désignés en tenant compte des groupes desquels les souches se rapprochent le plus, comme par exemple « A1-1 », pour des souches ayant une séquence type proche mais différente de celle du groupe A1 (Tableau 29). Onze nouveaux groupes ont été désignés par la lettre « N », (N1 à N11), car les souches concernées avaient des séquences types contenant un mélange de SNP des groupes A et B, ce qui ne permettait pas de les rapprocher d'un groupe

Tableau 30. Profils SNPs de souches non classées dans les groupes A ou B.

Souches	Groupe phylogénétique	SNP A				SNP B				Nombre de souches		
PSU 1*	A	A	C	G	A	T	C	C	T	A	T	486 (84,2%)
1386	?	G	C	G	G	T	C	C	T	A	-	1
13105	?	G	C	G	G	T	T	C	C	A	-	1
1384	?	G	T	G	G	T	T	T	T	G	-	1
1390	?	G	C	G	G	T	T	C	T	G	-	1
1379	?	G	T	G	G	T	C	C	C	A	-	1
IOEB_C52*	N	G	T	A	G	T	C	C	T	A	T	nc
1389	?	G	T	G	G	-	C	C	T	A	-	1
1377	?	G	T	G	G	-	T	C	T	A	-	1
13106	?	G	T	G	G	T	T	C	T	A	-	1
13107	?	G	T	G	G	T	T	C	T	A	-	1
13120	?	G	T	G	G	-	T	C	T	A	-	1
1381	?	G	T	G	G	-	T	C	T	A	-	1
1395	?	G	T	A	G	T	C	C	C	A	-	1
1391	?	G	T	G	G	T	C	T	T	G	-	1
13AQ 36.5	?	G	T	A	G	-	C	T	C	G	C	1
13VL 3.2	?	G	T	A	G	-	C	-	C	G	-	1
LR 16.5	?	G	T	A	G	-	C	T	C	G	C	1
13108	?	G	T	G	G	T	T	T	T	G	-	1
13111	?	G	T	G	G	T	T	T	T	G	T	1
ATCC BAA 1163*	B	G	T	A	G	C	T	T	C	G	C	73 (12,65%)

577

Seuls les SNPs spécifiques des groupes A et B listés. En vert, les allèles permettant d'affilier une souche au groupe B. * Souches dont les SNPs ont été extraits des génomes séquencés

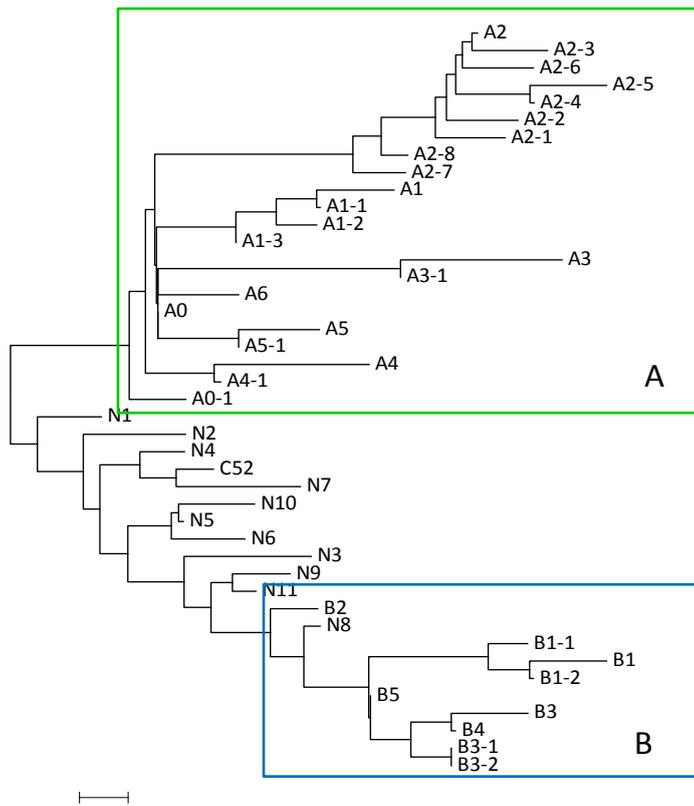


Figure 34. Arbre construit d'après l'alignement des 43 séquences types obtenues par génotypage de SNP. L'arbre a été produit avec le logiciel MEGA par la méthode Neighbor joining. Les noms des groupes génétiques définis d'après l'arbre phylogénétique de la figure 33 sont indiqués par une lettre A ou B, suivie d'un chiffre. Les nouveaux sous-groupes génétiques sont indiqués. Les souches représentées par les groupes « N » ne peuvent être classées dans aucun des groupes connus.

en particulier (Tableau 30). Aucune des souches analysées n'avait une séquence type identique à celle de la souche C52, qui est, elle aussi, exclue des groupes A et B.

6. Distribution des souches dans les groupes phylogénétiques

L'alignement et la comparaison des 43 séquences types a permis de générer un arbre par la méthode Neighbor joining (Figure 34). Il ne s'agit pas d'un arbre phylogénétique à proprement parler, car les séquences types ont été obtenues en analysant des SNPs présélectionnés, au lieu de séquences aléatoires, mais c'est un arbre de proximité qui donne un aperçu de la position relative des 43 séquences types. Les 11 groupes génétiques prédéfinis et les 21 nouveaux groupes γ sont visibles dans les 2 groupes majeurs « A » et « B ». Les autres groupes désignés N1 à N11 sont localisés dans une région intermédiaire où se trouve également la souche C52. Bien que cette distribution ne soit pas phylogénétique, il est probable que la souche C52 et toutes les souches appartenant à ces groupes « N » soient plus proches entre-elles qu'elles ne le sont des autres souches des groupes A et B.

Un arbre couvrant minimal a été construit pour visualiser simultanément la disposition des groupes génétiques et la proportion des souches incluses dans chaque groupe (Figure 35). Cette représentation montre que la très grande majorité des souches (486 sur 577, soit 84,2%) appartient au groupe A (84,2%), contre seulement 73 (12,6%) au groupe B, ce qui confirme les résultats obtenus par des tests de PCR spécifiques. Ces 2 groupes contiennent la quasi-totalité des souches (559 des 577 souches), mais certaines souches en sont exclues (18, soit 3,1%) comme c'est le cas de la souche IOEB_C52. L'arbre phylogénomique construit par comparaison des génomes de 50 souches avait montré que la souche C52 se trouve sur une branche « ancestrale », qui précède la division des 2 groupes A et B (Figure 32a). Il est possible que les 18 autres souches qui sont exclues des groupes A et B occupent une position similaire. Néanmoins, une analyse phylogénétique de ces souches sera nécessaire pour le confirmer. Les sous-groupes A1 et A2 sont également remarquables car ils contiennent à eux seuls 45,7% des souches (116 et 148, respectivement); tous les autres groupes étant représentés par 2 à 48 souches (0,34 à 8,3%).

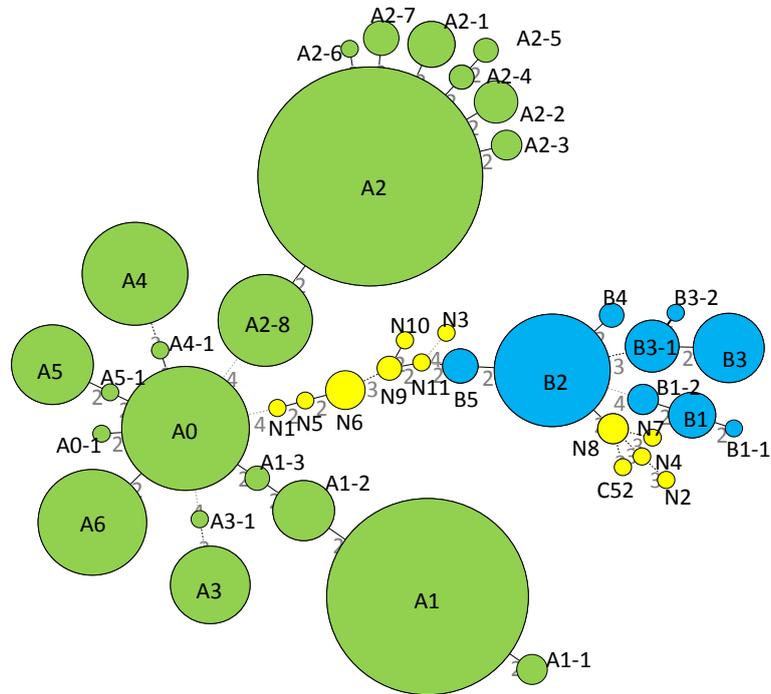


Figure 35 Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques.

La distribution des 577 souches génotypées par analyse de SNPs dans 43 groupes génétiques correspondant aux 43 ST identifiées a été réalisée en construisant un arbre de proximité par la méthode ACM. L'arbre est colorisé par rapport aux groupes génétiques. Vert : groupe A, bleu : groupe B, jaune : autre que les groupes A ou B.

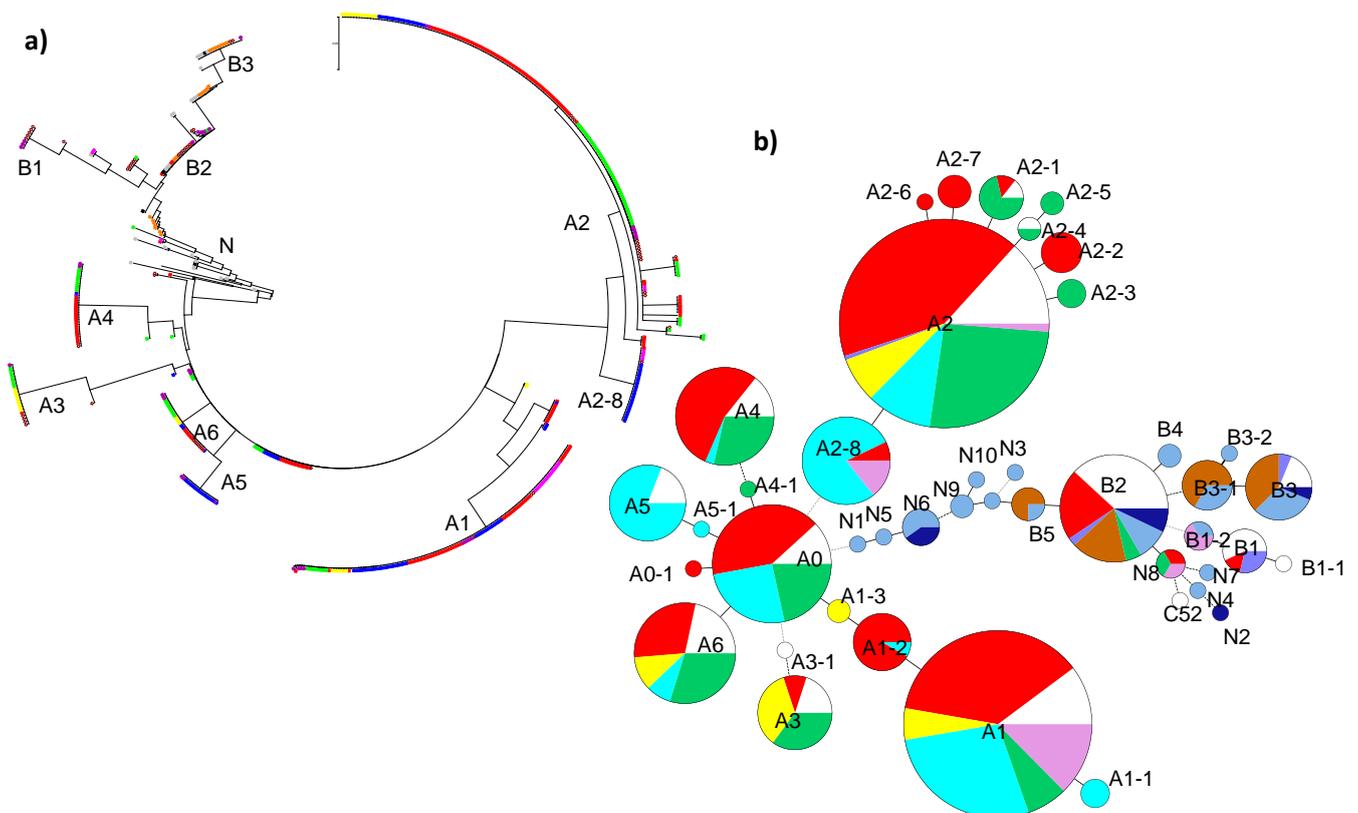


Figure 36 Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques et par région.

Les 2 arbres ont été produits comme indiqué dans la figure 35 et sont colorisés en fonction de l'origine géographique des souches : Rouge/Aquitaine, Bleu turquoise/Bourgogne, Vert/Languedoc-Roussillon, Rose/Val de Loire, Brun/Bretagne, Jaune/Liban. Les souches provenant du CRB-oeno sont en bleu marine pour les souches de cidre d'Espagne, bleu pour les souches de cidre isolées en France, en blanc les souches isolées de vin en 1989.

7. Groupes génétiques et origines géographiques des souches

L'analyse MLVA avait révélé que la plupart des souches n'étaient retrouvées que dans une seule région, voire une seule appellation ou exploitation. L'analyse SNP a permis d'examiner si cette spécificité était due, ou non, à l'existence de différents groupes génétiques de souches dans les régions. Une représentation en ACM de l'ensemble des souches permet de comparer à la fois leurs origines géographiques et leurs groupes génétiques (Figure 36). Les deux groupes les plus importants, A1 et A2 (116 et 148 souches, respectivement), contiennent des souches qui proviennent des 5 régions viticoles analysées. Les groupes A0, A3, A4, A6 et B2 ont des effectifs plus petits (18 à 48 souches), mais contiennent également des souches de 2, 3 ou 4 régions différentes. Il existe bien quelques groupes spécifiques de régions, mais ils sont généralement constitués de peu de souches, ce qui n'est évidemment pas significatif (ex. A1-1, A1-3, A2-3, A2-5, A2-6, A2-7, comprenant 2 à 6 souches). Une exception toutefois est le groupe A5, qui contient 17 souches provenant toutes de Bourgogne, et le groupe A2-8 qui contient 28 souches dont 22 isolées de vins rouge de Bourgogne.

Cette distribution suggère que la plupart des groupes génétiques ne sont pas spécifiques de régions, mais qu'au contraire, ils sont souvent détectés dans plusieurs régions. Le tableau 30 montre la distribution des souches par groupe génétique et par région et permet de comparer les régions entre elles. D'après ce tableau, la Bretagne est la plus différente de toutes. Elle contient une majorité de souches appartenant à différents sous-groupes B et une seule du groupe A, alors que très peu de souches des sous-groupes B sont présentes dans les autres régions. Néanmoins, cette différence est probablement due aux différents types de produits dont sont issues les souches de Bretagne (cidre) et des autres régions. Les 3 régions pour lesquelles les échantillonnages les plus importants ont été réalisés, Aquitaine, Bourgogne et Languedoc-Roussillon, possèdent chacune entre 10 et 16 groupes génétiques. Seulement 5 groupes sont présents chez les 2 autres régions, Liban et Val de Loire, où les échantillonnages sont plus faibles. L'importance relative de chaque groupe génétique est variable selon les régions. Le principal groupe génétique est A2 dans les régions Aquitaine, Languedoc-Roussillon et Liban, alors qu'il s'agit du groupe A1 en Bourgogne et Val de Loire. Le groupe A2-8 est également significatif dans ces 2 dernières

Tableau 31. Répartition des souches de chaque régions dans les groupes génétiques.

Groupe phylogénétique		Nb de souches	Aquitaine	Bourgogne	Languedoc Roussillon	Bretagne	Val de Loire	Liban	Autre	1989
1	A0	48 (3)	22	14	11					1
2	A0-1	1	1							
3	A1	116 (11)	46	35	9		16	7	1	2
4	A1-1	3		3						
5	A1-2	12	11	1						
6	A1-3	2						2		
7	A2	148 (10)	64	16	41		2	13	1	11
8	A2-1	7	1		5					1
9	A2-2	6	6							
10	A2-3	3			3					
11	A2-4	2			1					1
12	A2-5	2			2					
13	A2-6	1	1							
14	A2-7	4	4							
15	A2-8	28	1	22			4			1
16	A3	18 (2)	1		7			7		3
17	A3-1	1							1	
18	A4	32 (3)	19	1	10					2
19	A4-1	1			1					
20	A5	17 (4)		17						
21	A5-1	1		1						
22	A6	33 (4)	10	3	11			5		4
23	B1	4 (3)	3							1
24	B1-1	1							1	
25	B1-2	3					2		1	
26	B2	37 (6)	3		2	7			23	2
27	B3	13 (3)				7				6
28	B3-1	9				6			3	
29	B3-2	1							1	
30	B4	2							2	
31	B5	3				2			1	
32	C52	0 (1)								
33	N1	1							1	
34	N10	1							1	
35	N11	1							1	
36	N2	1							1	
37	N3	1							1	
38	N4	1							1	
39	N5	1							1	
40	N6	5							5	
41	N7	1							1	
42	N8	3	1		1		1			
43	N9	2							2	
Total		577 (50)								

Le nombre de souches dont le génome a été séquencé est noté entre parenthèses.

Pour chaque région, un gradient de couleur représente l'abondance relative des souches dans chaque groupe génétique, du minimum (vert) au maximum (rouge).

régions, alors qu'il n'est pas détecté en Languedoc-Roussillon et au Liban, et ne compte qu'une seule souche en Aquitaine. En conclusion, bien qu'il soit possible de rencontrer les mêmes groupes génétiques dans différentes régions, ils ne sont pas dispersés de manière aléatoire dans toutes les régions. Chaque région est constituée d'un panel de groupes génétiques différents et parfois de groupes génétiques qui pourraient lui être spécifiques, comme le groupe A5 en Bourgogne. A l'exception de la région Bretagne, qui contient exclusivement des souches de cidre, la très grande majorité des souches des autres régions se trouve dans des sous-groupes A. Seulement 6 souches d'Aquitaine isolées pendant des FML, 2 du Languedoc-Roussillon et 2 du Val de Loire appartiennent au groupe B (Tableau 31). Le groupe N8 représente un cas particulier. En effet, tous les autres groupes « N » sont formés par des souches issues de cidre, mais celui-ci est composé de 3 souches isolées de vins d'Aquitaine, de Languedoc-Roussillon et Val de Loire. Il serait intéressant de savoir si, comme la souche C52, elles occupent une position « ancestrale » dans l'évolution génétique de l'espèce.

La figure 37 montre la distribution des souches de quelques exploitations dans les groupes génétiques. On remarque que plusieurs exploitations possèdent des souches qui appartiennent à des groupes génétiques différents. Par exemple, un échantillon du Château de Bellevue contient des souches appartenant aux groupes A2 et A1-2. Le château Bichon Cassagnol possède des souches dans les groupes A2, B2 et N8. Au niveau des exploitations, il y a donc plusieurs souches de groupes génétiques différents qui cohabitent au sein d'une même fermentation.

8. Groupes génétiques et produits d'origine.

La distribution génétique des souches a également été analysée en fonction des produits d'origine (Figure 38). Les souches analysées par SNP, provenant de cette étude ou de travaux antérieurs, avaient été isolées principalement de vins rouges (505 souches), mais aussi de vins blancs (24 souches), de vins liquoreux (3 souches), rosés et de cidres. Les souches de cidres isolées au cours de cette étude provenaient de Bretagne et, comme précisé ci-dessus, elles sont en grande partie classées dans les groupes B2, B3 et B3-1. Les autres souches de cidres provenant de la collection du CRB-oenoproviennent de cidre de

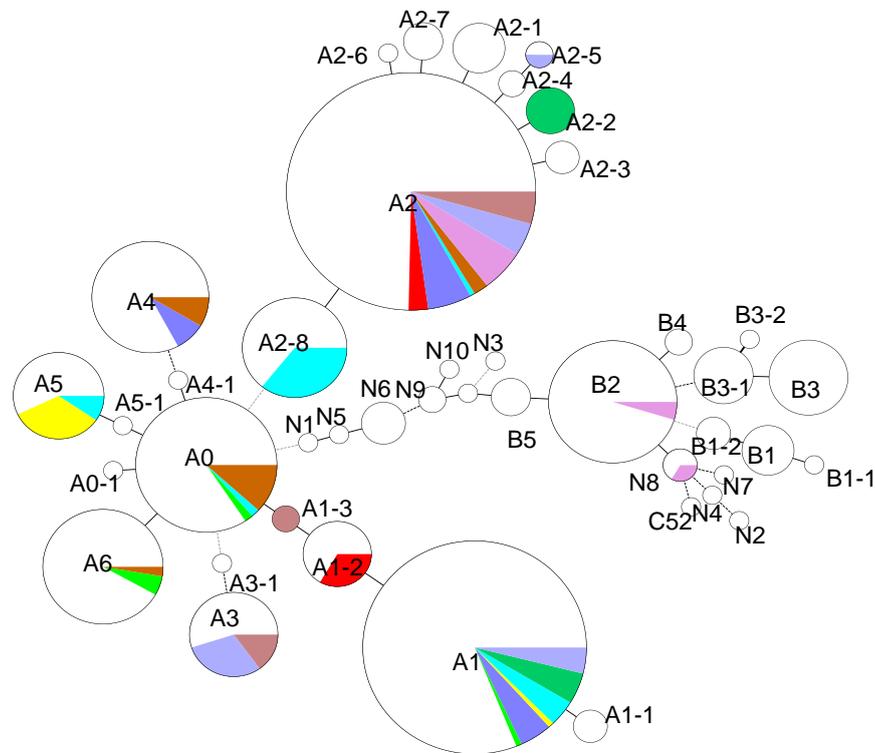


Figure 37. Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques et par exploitation.

L'ACM a été colorisé en fonction des exploitations d'origines. Neuf exploitations ont été colorisées uniquement, et chaque couleur représente une exploitation: Bellevue (Aquitaine) rouge, Du Bourdieu (Aquitaine) vert, Bichon Cassagnol (Aquitaine) rose, BPF (Bourgogne) bleu ciel, Leflaive (Bourgogne) jaune, Christophe buisson (Bourgogne) vert fluo, Ksara (Liban) Beige foncé.

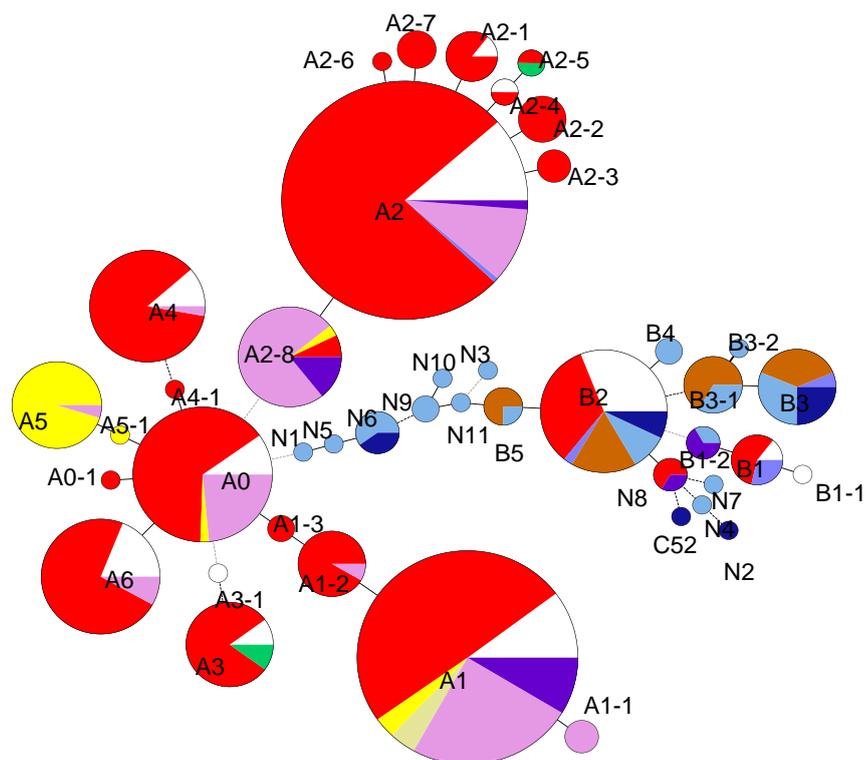


Figure 38. Distribution de 577 souches génotypées par SNP dans des groupes génétiques et par produit.

L'ACM est colorisé en fonction du type de produit d'origine : Vin rouge, rouge; Vin rouge de Bourgogne, rose; Vin rouge du Val de Loire Violet; Vin blanc de Bourgogne Jaune, Vin blanc du Val de Loire , jaune pâle, Vin rosé en vert. Cidre: Bretagne Brun, Normandie + Mayenne bleu clair, Espagne (Asturies) bleu marine

Normandie et des Asturies. Elles sont également localisées dans divers sous-groupes B, mais aussi dans les groupes N.

Comme indiqué précédemment, les groupes A5 et A2-8 contiennent essentiellement des souches de Bourgogne. On remarque que le groupe A5 est composé presque uniquement de souches de vins blancs. Les souches de ce groupe dont les génomes ont été séquencés, proviennent elles aussi de vins blancs. Le groupe A2-8 est composé en majorité de souches de vins rouges de Bourgogne (22) de quelques souches de vins rouges du Val de Loire (4) et d'Aquitaine (1). Une seule souche de vin blanc y est également présente. On retrouve également beaucoup de souches de vins rouges de Bourgogne et 3 de vins blancs dans le groupe A1, avec également des souches de vins rouges et Blanc du Val de Loire. Les autres groupes génétique A2, A3, A4, A6 et les sous-groupes B sont dépourvus de souches de vins blancs. Il y a donc 2 groupes avec des souches provenant presque exclusivement, soit de vin blanc, soit de vin rouge (Bourgogne et Val de Loire) et le groupe B qui est constitué en grande partie de souches isolées du cidre.

9. Discussion

Choix de la méthode SNP. La MLST ou le séquençage complet de génomes sont les seules méthodes qui ont permis jusqu'à aujourd'hui d'analyser la diversité phylogénétique des souches d'*O. oeni* (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010; Borneman *et al.*, 2012). Les autres méthodes basées sur des profils de bandes, telles que la REA-PFGE ou la RAPD, ont très souvent été utilisées pour différencier des souches d'*O. oeni* et pour les positionner les unes par rapport aux autres dans des dendrogrammes (Bartowsky *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2008), mais ces arbres de proximité n'ont pas de valeur phylogénétique et ne peuvent donc pas être utilisés pour différencier des groupes phylogénétiques de souches. Dans notre étude, nous souhaitons obtenir cette information phylogénétique, et il n'était pas envisageable d'utiliser la MLST ou le séquençage de génomes pour analyser le grand nombre de souches que nous avons identifiées, notamment en raison du coût que cela impliquait. Nous nous sommes donc tournés vers une méthode de typage haut-débit basée sur le génotypage de SNP. Cette méthode est très utilisée pour le typage des souches de bactéries pathogènes, mais à notre connaissance, elle n'avait jamais été employée pour des bactéries lactiques ou d'autres bactéries alimentaires (Gutacker *et al.*, 2002; Gut, 2001; Mendisco *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2012). Les marqueurs SNPs ont l'avantage d'être présents en grand nombre dans les génomes et plus stables que d'autres marqueurs de polymorphisme (Schork *et al.*, 2000). Les données de génotypage par analyse de SNP ne peuvent pas être utilisées pour produire des arbres phylogénétiques fiables, car les SNP représentent des variations génétiques sélectionnées, alors qu'une analyse phylogénétique doit être basée sur des variations génétiques aléatoires. C'est par exemple le cas dans les analyses de MLST, dans lesquelles ce sont des mutations aléatoires dans des séquences de gènes qui sont recherchées. Par conséquent, l'analyse de SNP est moins utile que la MLST et, a fortiori, que le séquençage complet des génomes, pour classer des souches phylogénétiquement. Néanmoins, elle permet de classer les souches dans des groupes génétiques qui auront été identifiés au préalable par une autre méthode. De plus, lorsqu'elle est couplée à la technologie Sequenom, cette analyse peut être réalisée rapidement, pour un très grand nombre de souches et à moindre coût. Elle permet donc d'obtenir une image de la structure de population d'un grand ensemble de souches.

Analyse phylogénomique de 50 souches. Il a été possible de débiter la mise au point la méthode SNP au laboratoire, car nous avons disposé très tôt des génomes de 50 souches d'*O. oeni*, dont plusieurs étaient issues de notre étude. Les analyses phylogénomiques réalisées à partir de ces génomes ont confirmé que la population d'*O. oeni* est divisées en 2 groupes génétiques majeurs, A et B, comme il avait été montré par analyse MLST (Bilhère *et al.*, 2009 ; Bridier *et al.*, 2010). Elles ont également confirmé l'existence d'au moins une souche « C52 » qui n'appartient à aucun de ces groupes. Dans un arbre phylogénétique construit en présence des génomes de souches des espèces proches *O. kitaharae* et *Leuconostoc mesenteroides*, cette souche C52 occupe une position ancestrale, elle pourrait avoir évolué à partir d'un ancêtre qui aurait divergé avant la séparation des deux groupes A et B (Figure 32a). Il a été suggéré que *O. oeni* était à l'origine une espèce adaptée à un milieu acide et peu alcoolisé, comme le sont les fruits matures, et que certaines souches, mieux adaptées à la présence d'alcool, ont ensuite produit les groupes génétiques A et B, lorsque l'activité humaine a commencé à les soumettre à un environnement plus alcoolisé tel que le vin. Les souches de certains groupes génétiques seraient donc des souches domestiquées par l'homme lors de l'activité de vinification ou de production de cidre (Campbell-Sills *et al.*, soumis).

Analyse SNP et structure de population d'*O. oeni*. L'analyse SNP que nous avons réalisée a permis d'examiner la distribution des souches d'*O. oeni* collectées au cours de la FML, mais également de réexaminer la structure de population d'*O. oeni* car 110 souches provenaient de la collection CRB oeno et avaient été isolées de diverses origines et millésimes (Tableau 27). Les résultats du génotypage des 577 souches ont révélé 43 séquences types différentes. Seulement 11 ST correspondaient à des groupes génétiques prédéfinis par l'analyse phylogénétique des génomes, mais 21 autres ont été classées dans des nouveaux groupes proches de ces groupes prédéfinis. Sur les 43 ST identifiés, 11 ST (18 souches) n'ont pas pu être rapprochées d'un groupe ou sous-groupe A ou B. Au total, ce sont donc 559 des 577 souches analysées par SNP qui ont été classées dans un groupe ou sous-groupe génétique, et seules 18 souches n'ont pu être affiliées à un groupe. Ces souches présentent un mélange de SNP des groupes A et B et se positionnent donc avec la souche C52 dans un arbre de proximité. Il est donc probable qu'elles occupent une position « ancestrale » comme cette dernière, mais une véritable analyse phylogénétique sera

nécessaire pour les positionner correctement. Il est intéressant de noter que quasiment toutes ces souches étaient issues de cidres. Trois de ces souches proviennent de vins d'Aquitaine, du Languedoc-Roussillon et du Val de Loire, et présentent toutes les 3 le même profil SNP (groupe N8). En ce qui concerne les 559 souches qui ont pu être classées dans des sous-groupes A ou B, la très grande majorité (486, soit 86,9%) appartient au groupe A. Cette disproportion ne reflète pas la structure de population réelle de l'espèce car la plupart des souches provenaient d'échantillons de vins isolés en cours de FML, ce qui a apporté un biais dans la représentativité de l'échantillonnage, mais cela reflète la structure de l'espèce, du moins des souches, qui sont présentes au moment de la FML. Néanmoins, cela confirme les inventaires réalisés par PCR « A/B » qui ont montré que dans les vins analysés, ce sont très majoritairement des souches du groupe A qui réalisent la FML.

Dans cette étude, nous n'avons identifié des souches du groupe B que dans 7 vins de 3 exploitations. Toutes les autres provenaient de cidres. Néanmoins, il serait incorrect de conclure que les souches du groupe A sont mieux adaptées au vin que celles du groupe B. En effet, non seulement nous avons identifié dans cette étude certaines souches « B » au cours de la FML, mais ces souches ont été retrouvées successivement au cours de 2 millésimes (Château Bichon Cassagnol). De plus, les souches de vin présentes dans le groupe B, sont parfois dans des sous-groupes ne contenant pas de souches de cidre. Nous avons participé à la caractérisation de souches isolées de vins en cours de FML dans le sud de la Catalogne, en Espagne, et identifié par MLST 3 souches (sur 6 souches) avec la même ST appartenant au groupe B (Bordas *et al.*, 2013). Parmi elles, 2 ont des propriétés technologiques tout à fait acceptables pour pouvoir être utilisées comme levains malolactiques. En conclusion, même si le groupe A contient la plupart des souches qui réalisent la FML, les souches du groupe B ne doivent pas être assimilées à des souches peu performantes. Néanmoins, à l'intérieur du groupe A, certains sous-groupes correspondent à des souches isolées du même type de vin. Par exemple, Bridier *et al* (2010) ont identifié un groupe de souches de Champagne, groupe dont l'existence est confirmée par la comparaison des génomes de 4 souches (Campbell-Sills *et al*, soumis). Il est probable que ce groupe soit lié à la résistance des souches aux conditions particulièrement acides de ces vins.

Groupes génétiques et distribution des souches. L'analyse SNP avait pour objectif premier de déterminer si les souches « uniques » identifiées dans la plupart des régions et exploitations viticoles et cidricoles formaient des groupes génétiques spécifiques des régions et exploitations ou non. La construction d'ACM (Figure 36) a montré que les souches de diverses origines se distribuaient dans la plupart des groupes génétiques. Que les groupes soient importants, comme les groupes A1 et A2, ou plus petits comme les groupes A0, A3, A4, A6 et B2, ils contiennent tous des souches isolées de 2 à 5 régions. Les groupes ne sont donc pas spécifiques de région, mais ils sont distribués en proportion variable dans toutes les régions. Par exemple, le groupe A2 contient le plus de souches d'Aquitaine et du Languedoc-Roussillon, alors que le groupe A1 rassemble le plus de souches de Bourgogne. Cependant, il existe quelques groupes spécifiques de régions, mais ils sont constitués de trop peu de souches pour confirmer la spécificité du groupe (Figure 36, Tableau 31). Deux groupes font toutefois exception, le groupe A5 qui est exclusivement constitué de souches isolées en Bourgogne (15 de vins blancs et 2 de vins rouges) et le groupe A2-8, qui contient 22 souches de Bourgogne (21 de vins rouges et 1 de vin blanc), 4 souches du Val de Loire, 1 d'Aquitaine et 1 de cidre. Chaque région est donc constituée d'un panel de groupes génétiques différents et parfois de groupes génétiques qui pourraient lui être spécifiques, à l'exception de la Bretagne, qui contient exclusivement des souches de cidre qui se regroupent en majorité dans les groupes B2 et B3 (Tableau 31). Certaines souches proches de C52, proviennent également de cidre, à l'exception du groupe N8 composé de souches isolées de vins d'Aquitaine, du Languedoc-Roussillon et du Val de Loire. Au niveau des exploitations, la distribution des souches dans les groupes génétiques suit la même distribution que pour les régions. C'est-à-dire que les souches d'une exploitation ne sont pas toutes groupées ensemble, mais peuvent appartenir à différents sous-groupes génétiques. Les souches « uniques » de régions et d'exploitation identifiées par MLVA, ne forment donc pas de groupes génétiques spécifiques des régions ou des exploitations.

Si l'on s'intéresse aux souches « uniques » de produits, on remarque que le groupe A5 est composé presque uniquement de souches de vins blancs (Bourgogne et Champagne). Le groupe A2-8 est en grande partie constitué de souches de vins rouges de Bourgogne et le groupe B (principalement B2 et B3 et B3-1) en majorité constitué de souches de cidres. Les autres groupes génétiques A2, A3, A4, A6 ne contiennent aucune souche isolée de vin blanc

ou de cidre et contiennent exclusivement des souches isolées de vins rouges. Il y a donc deux groupes spécifiques de deux types de vin (A 2-8 et A5) et plusieurs sous-groupes B qui contiennent majoritairement des souches isolées de cidres. En d'autres termes, toutes les souches de cidres sont regroupées dans le cluster B qui contient également des souches de vins (35,6%). Le cluster A rassemble presque exclusivement des souches isolées de vins. Bridier *et al.*, (2010) avaient suggéré, d'après des analyses MLST de souches de diverses origines géographiques et de produits, que certaines souches se groupaient, soit en fonction de leur origine géographique (par ex : Chili), soit en fonction de leur produit d'origine (par ex : champagne, cidre).

Les souches que nous avons isolées provenaient de vin rouge, blanc et rosé, principalement de France et du Liban et de cidre de Bretagne ou d'Espagne. La présence de souches de cidres uniquement dans le cluster B et de sous-groupes rassemblant uniquement des souches de vins blancs ou rouges de Bourgogne, indique qu'elles semblent se grouper en fonction de leur spécificité vis-à-vis d'un type de produit plutôt que par leur origine géographique. Il est probable que les milieux particuliers ont sélectionné les souches les plus adaptées aux conditions du milieu, et qu'elles ont par la suite évolué en groupes génétiques adaptés à des matrices spécifiques. Cela n'empêche pas la présence simultanée de souches d'autres groupes génétiques. L'espèce *O. oeni* possède une grande diversité phénotypique qui lui permet de se développer dans une large gamme de milieux (pH bas, forte présence d'éthanol). A part quelques exceptions, les caractéristiques phénotypiques des souches ne semblent pas liées à leur groupe génétique, car des souches d'un même groupe génétique peuvent avoir des capacités différentes, de même que des souches de groupes différents peuvent avoir des capacités similaires, c'est notamment le cas des levains malolactiques qui possèdent des bonnes performances malolactiques et sont dispersés dans plusieurs groupes génétiques (Bilhère *et al.*, 2009; Bridier *et al.*, 2010; Capozzi *et al.*, 2010; Bordas *et al.*, 2013).

CHAPITRE 4

**Caractéristiques phénotypiques des souches de différents
groupes phylogénétiques**

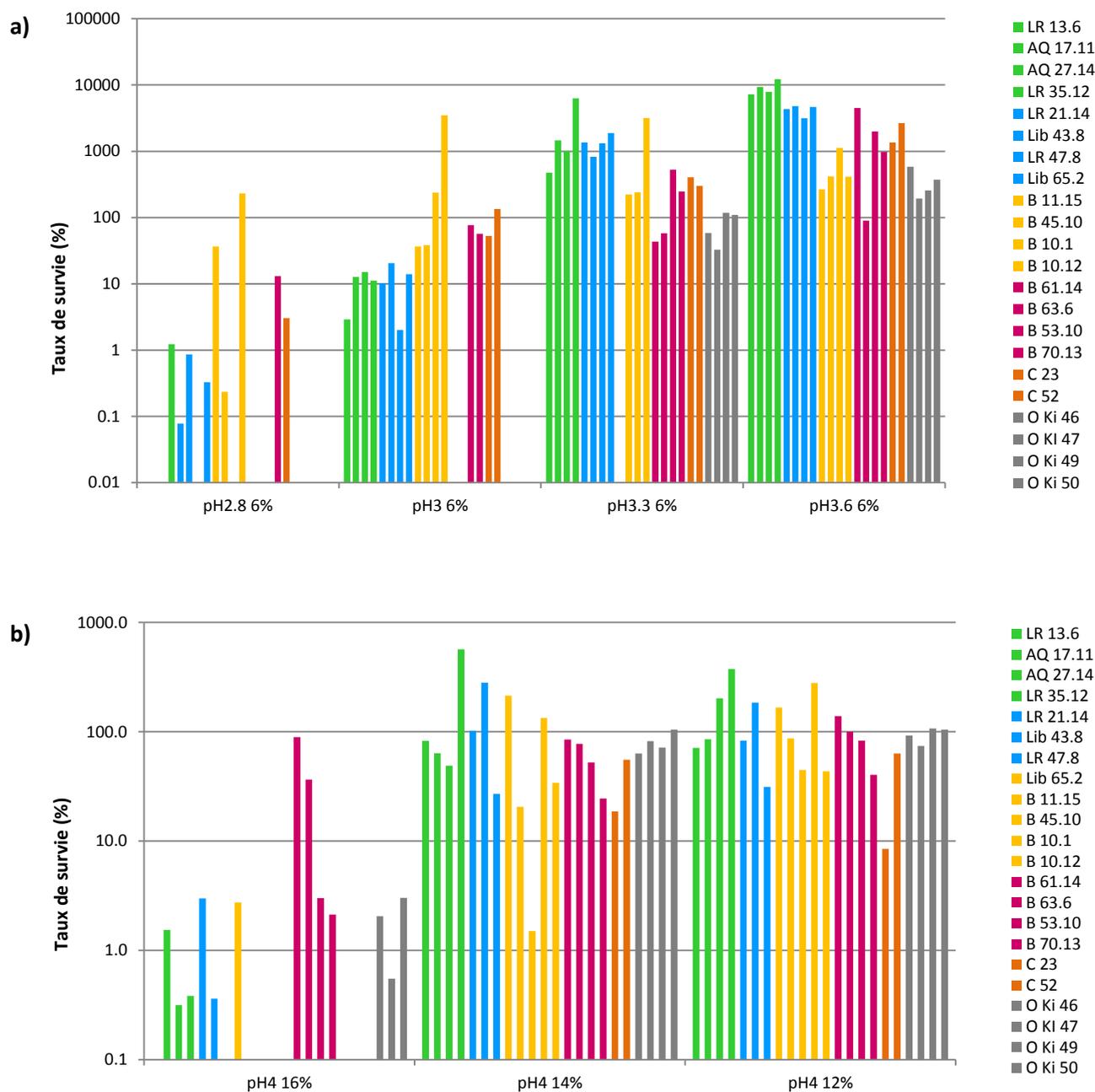


Figure 39. Survie de 22 souches d'*O. oeni* et *O. kitaharae* 48h après inoculation dans des milieux à différents pH a) et teneurs en alcool b). Les 22 souches testées appartiennent à 6 groupes génétiques distincts. Leur survie après inoculation dans des milieux à pH 2,8 à 4 et 12 à 16% d'éthanol ont été évaluée par dénombrement sur milieu gélosé 48h après inoculation. Seuls les conditions montrant des différences significatives entre les souches sont représentées. Tous les essais ont été réalisés en triplicata. Chaque couleur représente un groupe, sous-groupe phylogénétique, ou une autre espèce: vert/A4, bleu/A3, jaune/A5 (vin blanc Bourgogne), rouge/A2-8 (vin rouge de Bourgogne), orange/B,C (cidre), violet/ *O. kitaharae*.

1. Choix des souches

Les résultats de l'analyse phylogénétique des souches identifiées dans les différentes régions ont montré que certains sous-groupes rassemblaient des souches provenant du même type de produits ou de mêmes régions. Nous avons voulu savoir si les souches appartenant à ces sous-groupes avaient des caractéristiques phénotypiques proches, qui pourraient être expliquées par leur proximité génétique et leur adaptation à différents environnements. Nous avons donc décidé de tester les phénotypes de 22 souches choisies de la façon suivante : 4 souches appartenant au sous-groupe A5 (B10.1, B10.12, B11.15, B45.10), qui contient des souches de vin blanc de Bourgogne et de champagne ; 4 souches provenant du sous-groupe A2.8 (B53.10, B61.14, B63.6, B70.13) qui contient une majorité de souches de vin rouge de Bourgogne ; 4 souches du sous-groupe A3 (LR21.14, LR47.8, Lib43.8, Lib65.2) qui contient une majorité de souches du Languedoc-Roussillon et du Liban ainsi que 4 souches du sous-groupe A4 (LR13.6, LR35.12, AQ17.11, AQ27.14) qui contient des souches du Languedoc-Roussillon et d'Aquitaine, 2 souches isolées de cidre, l'une appartenant au groupe B (C23) et l'autre étant extérieure aux groupes A et B (C52), ainsi que les 4 souches d'*O. kitaharae* que nous possédions au laboratoire (O.ki 46 = NRIC 0646, -47 = NRIC 0647, -49 = NRIC 0649 et -50 = NRIC 0650).

2. Survie à l'inoculation en milieu acide ou à forte teneur en éthanol

L'espèce *O. oeni* étant reconnue pour sa tolérance à l'éthanol et aux pH acides, nous avons commencé par comparer ces propriétés chez les 22 souches sélectionnées. Toutes les souches ont été inoculées à près de 2×10^6 cellules/mL, en triplicata, dans un milieu jus de raisin blanc dont le pH et le taux d'éthanol ont été modifiés pour obtenir 8 conditions : pH 2,8, 3,0, 3,3, 3,6 ou 4 à 6% d'éthanol, et pH 4 à 12, 14 et 16 % d'éthanol. Le taux de survie de chaque souche a été mesuré après 48h, par dénombrement sur milieu jus de raisin gélosé. L'ensemble des résultats est résumé dans la figure 39. Ils montrent que, selon les souches et les conditions, la survie après 48h a été extrêmement variable, passant de 100% à 0%. Des différences ont été observées uniquement dans les 4 conditions les plus extrêmes, à pH 2,8, et 3,0 et 6% d'éthanol (Figure 39a), ou à pH 4 et 14% ou 16% d'éthanol (Figure 39b). On

remarque que très peu de souches sur les 22 testées survivent à un pH 2,8 et à 16% d'éthanol. A pH 2,8, 2 souches ont un taux de survie supérieur à 20%, la souche B10.12 avec 100% de survie et B11.15 avec ~35% de survie. Ces deux souches ont été isolées de vin blanc de Bourgogne. La souche B70.13, isolée de vin rouge de Bourgogne, se démarque aussi des autres avec un taux de survie supérieur à 10% dans ces 2 conditions extrêmes. La souche B10.1 semble ne pas avoir survécu, mais cela est probablement dû à une erreur de manipulation lors de la préparation de l'étalement sur milieu gélosé. A pH 3,0, seules 2 souches isolées de vin rouge de Bourgogne et toutes les souches d'*O. kitaharae* n'ont pas survécu. La survie des autres souches varie d'environ 10% jusqu'à 100%. Les 3 souches qui ont un taux de survie de 100% sont les souches B10.1 et B10.12 isolées de vin blanc et la souche C52 isolée de cidre. Les 2 autres souches isolées de vin blanc ont un taux de survie important, qui est proche de 40%. Les autres souches qui ont le mieux résisté à cette condition sont les souches de vin rouge de Bourgogne B53.10 et B70.13, ainsi que la souche de cidre C23, qui ont un taux de survie supérieur à 50%. Les souches les moins résistantes (survie inférieure à 20%) sont celles appartenant aux groupes A3 et A4. Dans les tests réalisés en présence d'éthanol, à 14%, toutes les souches ont un taux de survie supérieur à 20%, excepté la souche B45.10. Seize souches ont un taux de survie proche ou supérieur à 50%. Les quelques souches ayant moins de 50% de survie sont une souche du groupe A3, LR47.8, 3 souches isolées de vin blanc de Bourgogne, une souche isolée de vin rouge et une souche de cidre. A 16% d'éthanol, 20 souches sur les 22 testées ont moins de 10% de survie. Seules deux souches se démarquent, la B61.14 et la B63.3, isolées toutes les deux de vin rouge de Bourgogne, avec respectivement 90% et ~35% de survie.

3. Croissance en milieu acide ou à forte teneur en éthanol

Pour chaque souche, la croissance dans les différentes conditions a été suivie sur une durée de 20 jours, par mesure de DO à 600 nm. Un exemple des courbes de croissance obtenues pour les souches Lib 43.8 et LR35.12 est montré dans la figure 40 (Toutes les souches sont présentées en Annexe 1), et l'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 32. Comme le montre la figure 40, les conditions les plus favorables pour les souches étaient celles où le pH est le plus élevé (pH 4,0) et la teneur en alcool la plus faible

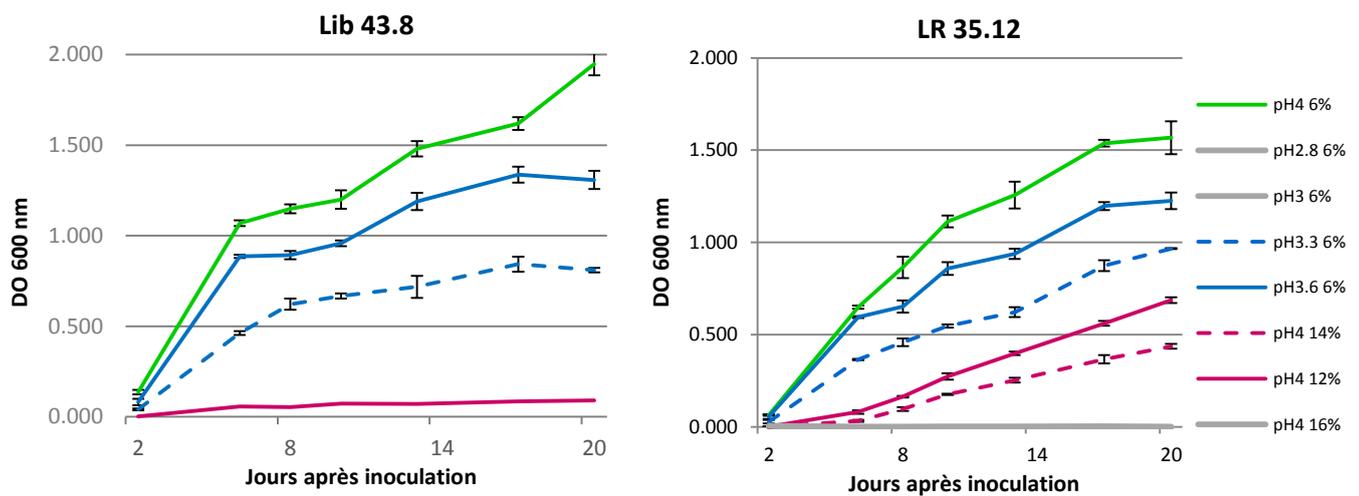


Figure 40. Suivi de la croissance des souches Lib 43.8 et LR35.12. La croissance de 22 souches d'*O. oeni* et *O. kitaharae* dans des milieux de pH 2,8 à 4,0 et des teneurs en alcool de 6 à 16% a été suivie pendant 20 jours par mesure de DO à 600 nm. Seules les courbes obtenues pour les souches Lib 43.8 et LR35.12 sont montrées. Les courbes montrent les valeurs moyennes obtenues pour 3 réplicats, ainsi que les écarts types.

Tableau 32. Résumé des résultats de la croissance des différents groupes de souches

Groupe génétique	Produit/ Origine	Souches	Limites de croissance à	
			6% d'éthanol	pH 4
A4	Vin Rouge	LR 13.6 LR 35.12 AQ 17.11 AQ 27.14	pH≥3,3	≤14%
A3	Vin Rouge	LR 21.14 LR 47.8 Lib 43.8 Lib 65.2	"	<12%
A5	Vin blanc Bourgogne	B 10.1 B 10.12 B 11.15 B 45.10	"	"
A2-8	Vin rouge Bourgogne	B 53.10 B 70.13 B 63.6	"	"
		B 61.14	pH≥3,6	"
B + C	Cidre	C 23 C 52	pH≥3,3	"
<i>O. kitaharae</i>	Shochu	O Ki 46 O Ki 47 O. Ki 49 O Ki 50	pH≥3,6	"

Les souches dont les noms sont rayés n'ont montré aucune croissance aux conditions indiquées.

(6%). Dans ces conditions, la phase stationnaire de croissance était atteinte après 17 jours, à une valeur de DO de 1,5. La même durée était suffisante pour atteindre la phase stationnaire avec un pH légèrement plus contraignant (3,6), mais la DO maximale atteinte était sensiblement plus faible (1,2). Pour toutes les autres conditions, la phase stationnaire de croissance n'a jamais été atteinte au bout de 20 jours. De plus, des croissances détectables n'ont été obtenues que pour 3 des 6 autres conditions uniquement pour les souches du groupe A4: pH 3,3 + 6% éthanol et pH 4,0 + 12 ou 14 % éthanol. Aucune croissance n'a été observée à pH 2,8, pH 3,0 ou en présence de 16% éthanol. Des tendances similaires ont été obtenues pour les 21 autres souches, bien que des différences aient été observées dans les conditions les plus extrêmes tolérées par chaque souche (Tableau 32). Toutes les souches testées se sont développées dans les milieux dont le pH était de 3,3 ou plus, excepté la souche B61.14 et les souches d'*O. kitaharae*, qui ne se sont développées qu'à partir de pH 3,6. Les souches du groupe A4 sont les seules à s'être développées dans les milieux contenant jusqu'à 14% d'éthanol. Les souches B63.6 et *O. ki46* ne se sont développées dans aucune condition.

Le suivi de croissance par mesure de DO à 600 nm présente un inconvénient majeur. En effet, si la population ne dépasse pas une certaine concentration cellulaire, aucune variation de DO ne sera observée. Dans le cas du milieu jus de raisin, une DO de 0,1 correspond à une population d'environ 10^8 cellules/mL (non montré), donc on ne pourra observer une croissance par mesure de DO que pour les souches dont la population arrive à dépasser cette valeur. Si une augmentation de DO à 600 nm n'est pas observée dans certaines conditions, on ne peut exclure qu'il y ait eu malgré tout un développement bactérien, depuis l'ensemencement à 10^6 cellules/mL, jusqu'à une valeur de 10^8 cellules/mL. Cela est problématique, car cette gamme de croissance correspond à celle des souches d'*O. oeni* dans le vin. Quoiqu'il en soit, un groupe de souches se démarque considérablement des autres, le groupe A4, car même en présence de 14% d'alcool on observe une croissance, ce qui indique une population supérieure à 10^8 C/mL. Les souches du groupe A4 semblent plus résistantes et ont une vitesse de croissance supérieure aux autres souches testées en présence de 12% et 14% d'éthanol.

Tableau 33. Paramètres analytiques des deux vins utilisés pour les essais.

Paramètres	Chardonnay 2013	Pinot noir 2013
Alcool (% v/v)	12,8	12,3
Acide tartrique (g/l)	1,9	2,3
Acide malique (g/l)	4,5	2,6
Acide citrique (g/l)	0,25	0,35
SO ₂ libre (mg/l)	<LDQ	<LDQ
SO ₂ total (mg/l)	14	<LDQ
Acidité totale (g/l H ₂ SO ₄)	5,9	4,7
pH	3,07	3,30

Les vins et résultats analytiques ont été fournis par l'IFV.

<LDQ : inférieur à la limite de détection et quantification

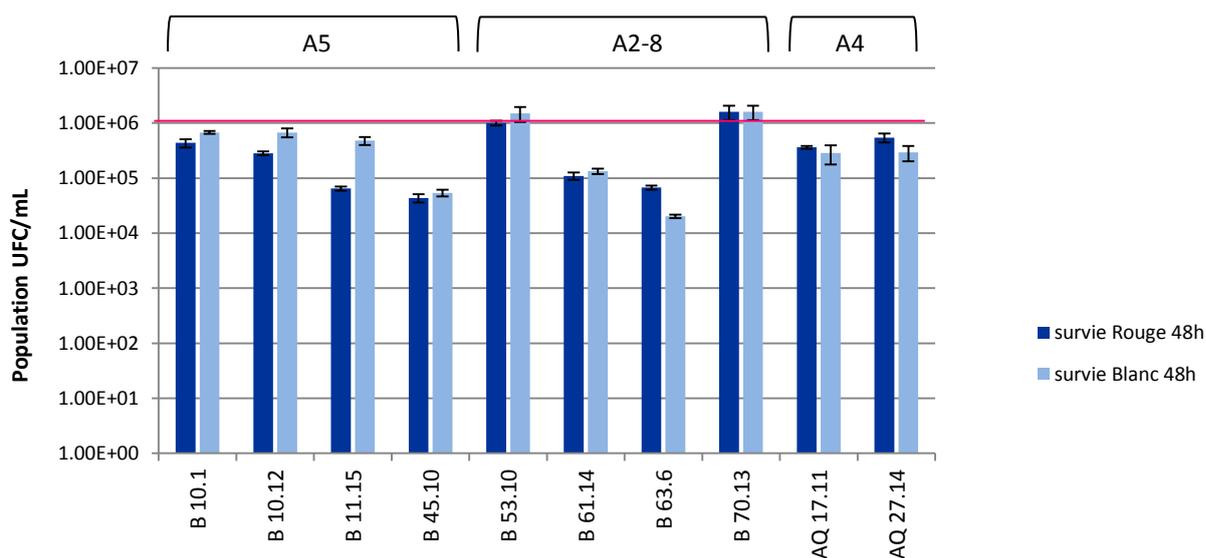


Figure 41. Survie de 10 souches d'*O. oeni* 48h après inoculation dans deux types de vins.

Les 10 souches ont été inoculées à 10^{E6} C/mL dans un vin blanc de Chardonnay et un vin rouge de Pinot noir, après 24h de pré-acclimatation dans un vin dilué au demi. Les populations bactériennes présentes dans les 2 vins après 48h ont été mesurées par dénombrement sur boîte de Petri. Les groupes génétiques auxquels appartiennent les souches sont indiqués en haut des histogrammes. Les valeurs indiquées sont les moyennes de 3 répétitions avec leurs écarts types.

4. Survie à l'inoculation dans le vin et capacités fermentaires

4.1. Conditions d'inoculations des souches.

A la suite des tests phénotypiques, nous avons voulu comparer le comportement dans le vin des souches du groupe A4, qui sont capables de se développer jusqu'à 14% d'éthanol, avec celui des souches des groupes A5 et A2-8, qui ont été isolées de vins blancs et rouges de Bourgogne et qui forment 2 groupes génétiques associés à ces produits. Pour tester toutes les 10 souches choisies dans les mêmes conditions initiales, elles ont toutes été cultivées en milieu jus de raisin classique et congelées dans l'azote liquide, comme cela est réalisé lors de la production de levains malolactiques (voir le chapitre suivant). Les souches choisies étaient : 2 souches du groupe A4, AQ 17.11 et AQ 27.14, et les 8 souches des groupes A5 et A2-8 précédemment testées. Elles ont ensuite été acclimatées pendant 24h dans un vin dilué au demi (Cf Matériels et méthodes 4.3), puis inoculées à 10^6 cellules/mL dans un vin rouge de pinot noir et un vin blanc de chardonnay. Les paramètres des vins utilisés pour les essais n'ont pas été modifiés; ils sont indiqués dans le tableau 33. Mis à part des valeurs de pH assez contraignantes, mais classiques pour ces types de vins (3,07 et 3,30 pour le Chardonnay et le Pinot noir, respectivement), leur teneur en alcool était de 12,8% pour le vin blanc et 12,3% pour le vin rouge, ce qui ne représente pas un stress majeur pour les bactéries, et les concentrations en acide malique étaient assez importantes (4,5 g/L et 2,6 g/l, pour le vin blanc et vin rouge, respectivement), ce qui est plutôt favorable au développement des bactéries lactiques.

4.2. Survie des souches 48h après inoculation

La survie des souches a été évaluée 48h après inoculation dans les 2 vins, par dénombrement sur milieu gélosé (Figure 41). La survie des 4 souches du groupe A5, isolées de vin blanc, a été sensiblement meilleure dans le vin blanc de chardonnay que dans le vin rouge de pinot noir, excepté pour la souche B45.10, alors qu'aucune différence ou une situation inverse a été observée pour les 6 autres souches issues de vins rouges. La souche B45.10 est celle dont la survie est la plus faible parmi les souches de vin blanc. Les souches B53.10 et B70.13 isolées de vin rouge sont celles qui ont le mieux résisté à l'inoculation parmi les souches du groupe A2-8. Ce résultat correspond à ce qui avait été observé lors des

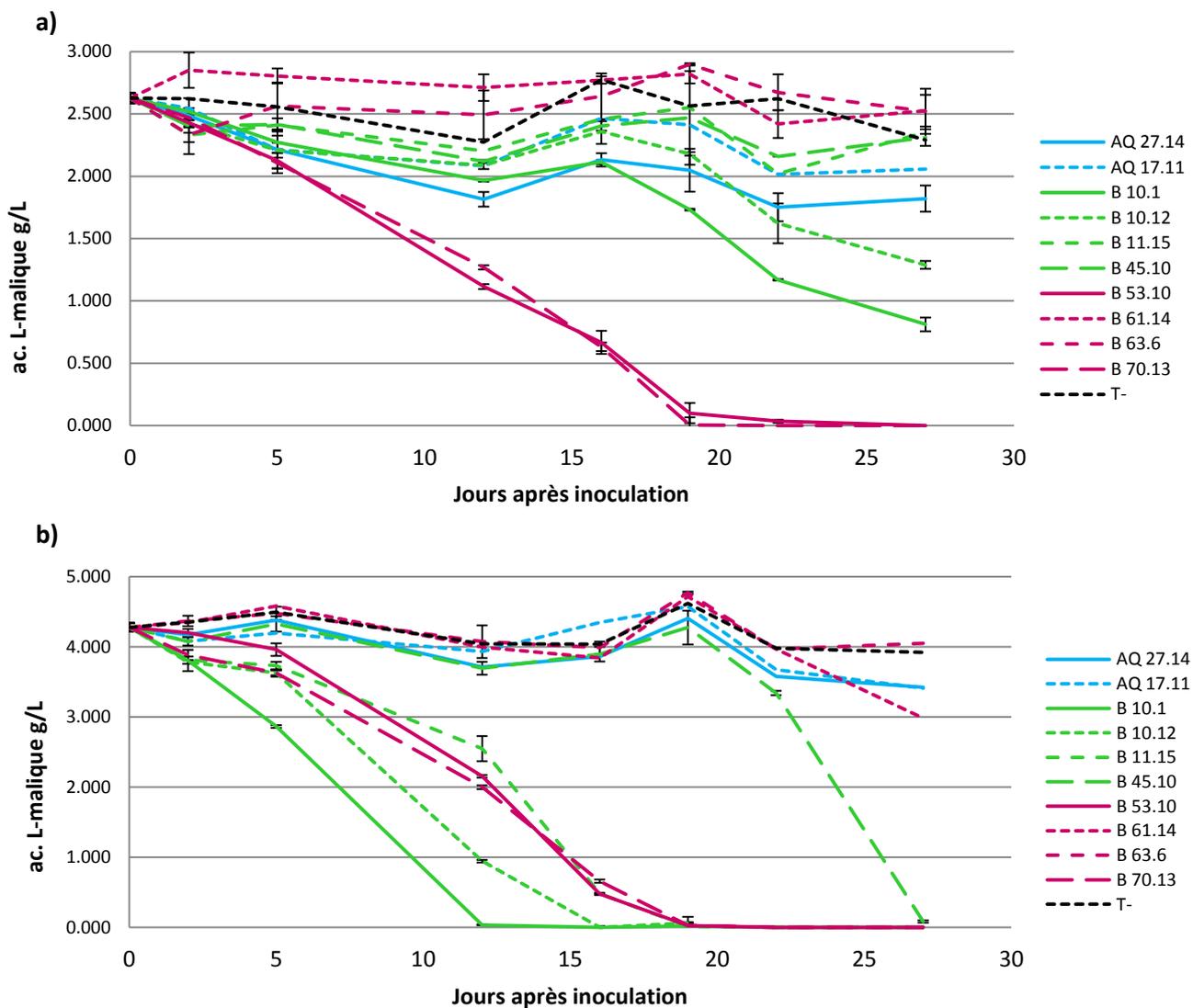


Figure 42. Cinétique de dégradation de l'acide malique de 10 souches dans un vin rouge (a) et un vin blanc (b) de Bourgogne. Chaque couleur représente un groupe génétique: vert/A5, violet/A2-8, bleu/A4. Chaque point a été dosé en triplicata.

tests phénotypiques. Ces deux souches avaient eu également un bon taux de survie après inoculation dans un jus de raisin ajusté à pH 3. La survie des souches de ce groupe est similaire dans les deux vins, excepté pour la souche B63.6, qui n'avait pas survécu dans les conditions à pH acide lors des tests phénotypiques et ne s'était pas développée par la suite dans aucune condition. Les souches AQ17.11 et AQ27.14 ont présenté une bonne survie dans les deux vins, bien que très légèrement meilleure dans le vin rouge, mais les différences ne sont pas toujours significatives. Ces deux souches sont celles qui avaient le mieux résisté, parmi les autres souches du groupe A2-8, à la condition de pH 3,0, lors des tests phénotypiques.

4.3. Capacités fermentaires

La cinétique de la FML a été déterminée pour chacune des 10 souches, dans les 2 vins, en suivant la dégradation de l'acide malique deux fois par semaine, pendant 4 semaines. La figure 42 représente les cinétiques fermentaires. Les dosages d'acide malique ont été réalisés en triplicata. Cette expérience a été menée en duplicata, mais un seul des duplicata est représenté pour plus de clarté. Une grande variabilité de cinétique est observée entre les souches inoculées dans le même vin. Dans le vin rouge (Figure 42a) 5 souches n'ont pas débuté la FML au bout de 15 jours. Trois autres souches, B10.1, B10.12 et AQ 27.14, ont montré une dégradation de l'acide malique très lente, avec une chute de 0,5 g/L en 15 jours. Au contraire, les 2 souches B70.13 et B53.10 ont, quant à elles, commencé à dégrader l'acide L-malique dès l'inoculation et on observe une chute constante de la concentration en acide L-malique. Ces 2 souches sont les seules à avoir réalisé une FML complète dans le vin rouge en 20 jours. Les souches B70.13 et B53.10 sont celles qui présentaient la meilleure survie 48 h après inoculation dans le vin, mais elles avaient aussi un bon taux de survie lors des tests phénotypique à pH 3 et à 14% d'éthanol.

Dans le vin blanc (Figure 42b) toutes les souches du groupe A5 isolées de vin blanc, ont complètement dégradé l'acide malique présent en moins de 30 jours. Trois de ces souches ont commencé à dégrader l'acide malique rapidement après inoculation (B10.1, B10.12 et B11.15). Une seule souche du groupe A5, B45.10, a débuté la FML plus tardivement, après une phase de latence d'environ 20 jour, après cela, la dégradation s'est

achevée en moins de 5 jours. La population de cette dernière avait chuté de plus d'1 log après l'inoculation dans le vin blanc, ce qui peut expliquer la phase de latence très longue observée. Deux souches du groupe A2-8, B53.10 et B70.13 ont également réalisé la FML de façon rapide et complète, avec une durée totale de 20 jours, identique à la souche B11.15. La souche B 10.1 du groupe A5 est celle qui a eu la cinétique de dégradation la plus rapide, la dégradation a commencé dès l'inoculation et s'est achevée en 12 jours. Elle avait eu une bonne survie à l'inoculation dans le vin et 100% de survie à pH 2,8 et 3 lors des tests phénotypiques. Les souches B11.15 du groupe A5, B70.13 et B53.10 du groupe A7 présentent une cinétique fermentaire similaire. Ces souches avaient de même bien survécu à l'inoculation dans le vin, mais aussi à l'inoculation en milieu acide lors des tests phénotypiques. Les souches qui n'ont pas réalisé la FML sont : les 2 souches du groupe A4, AQ17.11 et AQ 27.14, qui avaient pourtant bien survécu à l'inoculation dans le vin, et 2 souches du groupe A2-8 (B61.14 et B63.6) qui avaient perdu de 1 log à 1,5 log, lors de l'inoculation dans le vin blanc. Lors des tests phénotypiques, ces deux dernières souches n'avaient pas supporté l'inoculation dans les pH bas et ne s'étaient pas développées en dessous d'un pH de 3,6.

Les souches du groupe A5 ont une bonne résistance à l'inoculation dans le vin blanc et toutes les souches ont réalisé la FML dans ce vin. Trois des 4 souches testées réalisent une FML rapide et complète de même que 2 souches du groupe A2-8 isolées de vin rouge de Bourgogne, qui présentaient une bonne survie à l'inoculation dans le vin et aux tests phénotypiques. Dans le vin rouge, seules 2 souches du groupe A2-8 ont réalisé une FML rapide et complète, les mêmes qui ont également réalisé la FML dans le vin blanc, deux autres souches une du groupe A5 et une du groupe A4 ont également débuté la FML mais plus tardivement. Les souches isolées de vin blanc avec des bonnes performances fermentaires dans le vin blanc et n'ont pas été capable de réaliser des FML dans le vin rouge, en revanche deux des souches isolées de vin rouge ont été capable de réaliser la FML dans les deux types de vins. Aucune des souches ayant un taux de survie très bas dans les conditions acides, n'a réussi à réaliser la FML dans le vin blanc.

5. Discussion

La sélection de souches se fait classiquement en réalisant des séries de tests en laboratoire, visant à étudier la résistance de souches à différents stress du vin : pH acides et fortes teneur en éthanol par exemple. A ces tests s'ajoutent également des essais pour évaluer les performances fermentaires des souches, capacité à réaliser la FML de façon complète et dans des délais satisfaisants. Les bactéries testées sont inoculées dans des milieux synthétiques ou des vins modifiés, où les paramètres (pH, teneur en éthanol, présence de SO₂) sont modifiés. La croissance et la dégradation d'acide malique sont suivies et les différents résultats permettent de classer les souches et de choisir des candidates pour la production de levain malolactique (Beelman *et al.*, 1977; Ruiz *et al.*, 2010; Solieri *et al.*, 2010). Ces dernières années, les sélections de souches combinent les approches phénotypiques à des données moléculaires ou génomiques. L'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress, comme *hsp18* codant pour la protéine Lo18 (Guzzo *et al.*, 1997), a été proposée comme marqueur de l'état physiologique des souches et de leur capacité à survivre et réaliser la FML (Coucheney *et al.*, 2005). Des sélections combinant les deux approches ont été menées et ont montré une bonne corrélation entre l'expression de ce gène et les performances technologiques, mais cela n'indiquait pas obligatoirement une meilleure capacité fermentaire (Zapparoli *et al.*, 2004; Capozzi *et al.*, 2010). Des approches combinant des analyses de groupes génétiques et des tests phénotypiques ont été menées mais n'ont pas permis de sélectionner des souches en se basant uniquement sur leur groupes génétiques (Bordas *et al.*, 2013). Des approches par recherche de gènes spécifiques ont également été menées, et des corrélations ont été observées entre la présence de certains gènes (chromosomique ou plasmidique) (Bon *et al.*, 2009; Delaherche *et al.*, 2006; Renouf *et al.*, 2008; Favier *et al.*, 2012). Les approches génomiques semblent prometteuses mais il est encore indispensable de réaliser des tests phénotypiques parfois longs et contraignants, en laboratoire et en condition réelles, pour évaluer les performances fermentaires des souches.

Les tests que nous avons réalisés se sont basés sur deux critères, des critères phénotypiques : résistance à des stress et performances fermentaires ; et des critères

génomiques en choisissant des souches selon leurs groupes génétiques. Ces tests ont été réalisés dans le but de déterminer s'il existe une relation entre les souches appartenant à un même groupe génétique et leurs propriétés phénotypiques. Les souches testées ont eu des comportements différents selon les tests réalisés et selon leurs groupes : une majorité des souches résistantes aux bas pH ont été isolées de vins blancs, 4 souches appartenant à un même groupe génétique, A4, étaient les seules à avoir une croissance remarquable en présence de 12 et 14% d'éthanol. Des différences de comportement durant les fermentations ont également été observées. Peu de souches testées ont été capables de réaliser la FML dans le vin rouge. Les seules qui y sont parvenues avaient toutes été isolées de vin rouge de Bourgogne et appartenaient au même groupe génétique. Dans le vin blanc, toutes les souches isolées de vin blanc et appartenant au groupe A5 ont réalisé la FML, de même que deux souches isolées de vin rouge. Les résultats montrent donc que pour certains groupes génétiques, les souches appartenant à ces groupes ont eu des comportements similaires, en milieu synthétiques et lors des microvinifications.

Nous ne connaissons pas les raisons du comportement similaire de souches appartenant à un même groupe génétique. Etudier les niveaux d'expressions des gènes de résistance au stress déjà identifié, pour les souches d'un groupe et réaliser un screening pour rechercher la présence de gènes d'intérêt pourraient être envisageable pour comprendre la raison de ces différences. La comparaison des génomes des souches appartenant à différents groupes est également une option. Cela permettrait peut-être d'identifier les caractéristiques génétiques qui pourraient expliquer ces différences phénotypiques, comme l'identification de gènes impliqués dans la résistance au pH chez les souches du vin blanc, et à la résistance ou sensibilité aux polyphénols chez les souches de vin rouge ou blanc. Il est probable que les souches isolées de vins blancs qui ont été incapables de réaliser la FML dans les vins rouges soient sensibles à la présence de polyphénols. Les polyphénols du vin, à des concentrations plus ou moins importantes, exercent un fort effet antimicrobien sur un grand nombre de bactéries (Vaquero *et al.*, 2007). Certains d'entre eux inhibent fortement la croissance de *O. oeni*, d'autres ont un impact sur la viabilité des souches (Figueiredo *et al.*, 2008). Il serait intéressant de tester l'impact des polyphénols sur les souches isolées de vins blancs et

appartenant au groupe A5, et de les comparer aux souches isolées de vin rouge du groupe A2-8.

CHAPITRE 5

Mise en œuvre des souches indigènes à l'échelle d'une exploitation : essais de micro-production de souches sélectionnées et d'utilisation de lies de FML

La diversité des souches d'*O. oeni* a été analysée dans cette étude dans le cadre de 2 projets collaboratifs (LevainsBio et Wildwine) dont les objectifs finaux étaient de donner aux vignerons la possibilité d'utiliser les microorganismes « indigènes » issus de leurs exploitations ou de leurs régions de production. L'analyse génétique décrite dans les chapitres précédents avait pour but de déterminer s'il existe des souches spécifiques de régions ou d'exploitations, afin de justifier, ou non, la sélection et l'utilisation de ces souches. Les résultats ont démontré qu'une telle sélection n'est pas justifiée génétiquement. Néanmoins, des professionnels sont encore tentés d'utiliser les souches provenant de leur propre exploitation. Par conséquent, en plus de cette analyse de diversité, nous avons tenté de mettre au point deux types de procédés qui permettraient aux vignerons : 1/ d'utiliser des souches indigènes issues de leurs exploitations ou régions, après sélection et production à petite échelle, ou 2/ d'utiliser un mélange de souches indigènes tel que celui que représente les lies fines après la FML.

1. Mise au point et test d'un protocole de production de souches à petite échelle

1.1. Choix d'un protocole de préparation des souches sous forme congelée

La sélection de souches d'*O. oeni* indigènes, au niveau d'une appellation ou d'une exploitation, pose le problème de la production en petite quantité de ces souches qui doit pouvoir être réalisée à un coût comparable à celui des productions en grande masse des levains malolactiques industriels. Aujourd'hui, la plupart des levains malolactiques sont préparés sous forme lyophilisée, ce qui permet de les stocker et de les transporter facilement, mais qui représente un coût et un temps de préparation importants. Une autre possibilité est la production des souches sous forme congelée dans l'azote liquide. Quelques levains industriels sont proposés depuis quelques années sous cette forme. Leur inconvénient majeur est qu'ils ne peuvent être conservés et transportés qu'à très basse température (-50°C). Néanmoins, la congélation en azote liquide est techniquement très

simple à reproduire à petite échelle, et dans le cadre de petites productions, le stockage de petites quantités de bactéries dans des congélateurs à -80°C ne pose pas de difficulté au niveau d'un laboratoire. Nous avons donc choisi de tester ce mode de production pour les souches sélectionnées à partir des exploitations ou des régions. Un protocole, qui serait adapté pour la production de petites quantités de levains, a donc été testé au sein du laboratoire.

Brièvement, ce protocole se déroule de la manière suivante. Une souche est tout d'abord cultivée en milieu jus de raisin liquide à 25°C sous légère agitation. A la fin de la phase exponentielle de croissance, la culture est centrifugée, puis le culot est remis en suspension dans 1% du volume initial. La culture concentrée est ensuite transférée au goutte à goutte dans de l'azote liquide. Les gouttes forment des billes lors de la congélation, qui peuvent être récupérées et stockées sous cette forme à -80°C jusqu'à utilisation. Pour une culture initiale qui atteindrait une population de l'ordre de 10^9 cellules/ml, ce procédé devrait permettre de collecter, à partir d'un litre de culture, 10^{12} cellules totales, soit une quantité suffisante pour inoculer 10hl de vin à 10^6 cellules/ml. Nous avons contrôlé les étapes clés du protocole pour limiter la perte de cellules et obtenir un rendement maximum lors de la production et de la conservation des souches.

1.2. Résistance des souches à la congélation

Dans les deux projets auxquels participe le laboratoire, il est prévu de sélectionner des souches chez les producteurs, pour les tester, les produire et réaliser des essais d'utilisation de ces souches comme levain lors des FML dans ces mêmes exploitations. En vue de ces essais, nous avons sélectionné 10 souches que nous avons produites puis congelées dans l'azote liquide, en vue de tester leur résistance à ce procédé et de poursuivre leur caractérisation en réalisant des FML à partir des préparations congelées. Parmi ces 10 souches, 3 ont été isolées dans les vins du château de Bellevue, 3 dans les vins du château Du Bourdieu et 4 ont été isolées sur plusieurs appellations de Bordeaux. Toutes ont été produites selon le protocole décrit ci-dessus. La population des souches dans les cultures concentrées, puis après congélation, a été évaluée par étalement puis dénombrement des colonies sur milieu nutritif gélosé. Comme le montre la figure 43, la population de bactéries

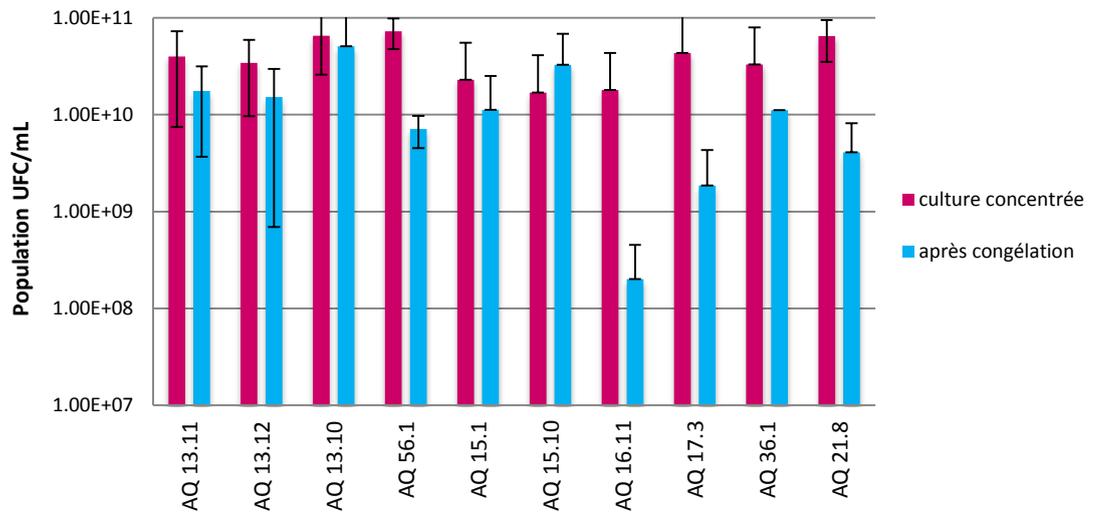


Figure 43. Mesure de la survie de 10 souches d'*O. oeni* à la congélation dans l'azote liquide.

Dix souches d'*O. oeni* ont été cultivées en milieu jus de raisin jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance, puis concentrées par centrifugation et congelées sous forme de billes dans de l'azote liquide. Les populations de chaque souche ont été mesurées avant et après congélation. Les étalements et les dénombrements ont été réalisés en triplicata.

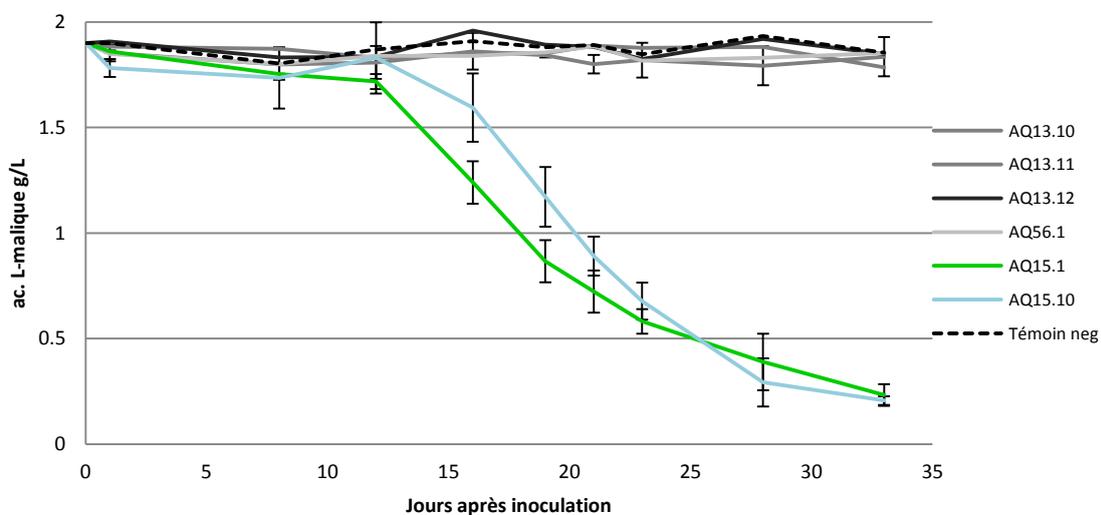


Figure 44. Cinétique de dégradation de l'acide malique des souches congelées dans l'azote liquide.

Six souches d'*O. oeni* préparées sous forme congelée ont été inoculées à 10^6 cellules/ml dans un vin rouge ajusté à pH 3,6 et 12% éthanol. La cinétique de dégradation de l'acide malique a été mesurée pendant 35 jours. Tous les essais ont été réalisés en duplicat et les dosages enzymatiques en triplicata.

dans les cultures concentrées était d'environ 10^{10} à 10^{11} UFC/mL avant congélation. Après la congélation, une perte de près de la moitié de la population de chaque souche a été généralement constatée, mais avec des variations selon les souches. Pour certaines souches, comme AQ13.10 il y a très peu de perte. Pour d'autres souches, comme AQ 16.11 ou AQ 17.3 il y a une perte d'un facteur supérieur à 10. La résistance à la congélation est différente en fonction des souches, cependant la majorité possède une bonne résistance qui permet de conserver une population proche de 10^{10} UFC/mL après congélation. Cette concentration est tout à fait suffisante pour permettre d'inoculer des essais à 10^6 UFC/mL avec un très petit inoculum.

Des PCR pour la détection des gènes impliqués dans la production d'amines biogènes ont été réalisées pour les 10 souches. Aucune des souches testées ne possède les gènes de l'histidine décarboxylase, la tyrosine décarboxylase, l'ornithine décarboxylase et l'agmatine déiminase (non montré).

1.3. Essais des souches congelées comme levains malolactiques

Les souches isolées au château de Bellevue et au château Du Bourdieu ont été inoculées à 10^6 cellules/mL dans un vin de Merlot collecté après FA et dont nous avons ajusté le pH à 3,6 et le taux d'alcool à 12%. La dégradation de l'acide malique a été suivie par dosage enzymatique pour suivre l'avancement de la FML. Les résultats figure 44 montrent que la concentration d'acide malique reste stable durant une période d'environ 10 jours, puis on observe une chute de la concentration en acide malique dans les FML inoculées avec les deux souches AQ 15.1 et AQ 15.10, alors que la concentration ne chute pas pour les FML réalisées avec les autres souches. Pour les deux souches AQ 15.1 et AQ 15.10, la durée totale de la FML est d'environ 35 jours en comptant 10 jours de phase de latence. La congélation dans l'azote liquide a donc permis de conserver la capacité fermentaire des deux souches AQ 15.1 et AQ 15.10. Cependant, nous ne pouvons pas conclure pour les autres souches. Il faudrait réaliser des FML à partir de cultures fraîches non congelées pour savoir si ces souches sont naturellement peu résistantes à l'inoculation dans le vin et/ou la réalisation de la FML, ou bien si c'est la congélation dans l'azote liquide qui leur fait perdre leur capacité fermentaire.

2. Caractérisation et utilisation de lies fines de FML

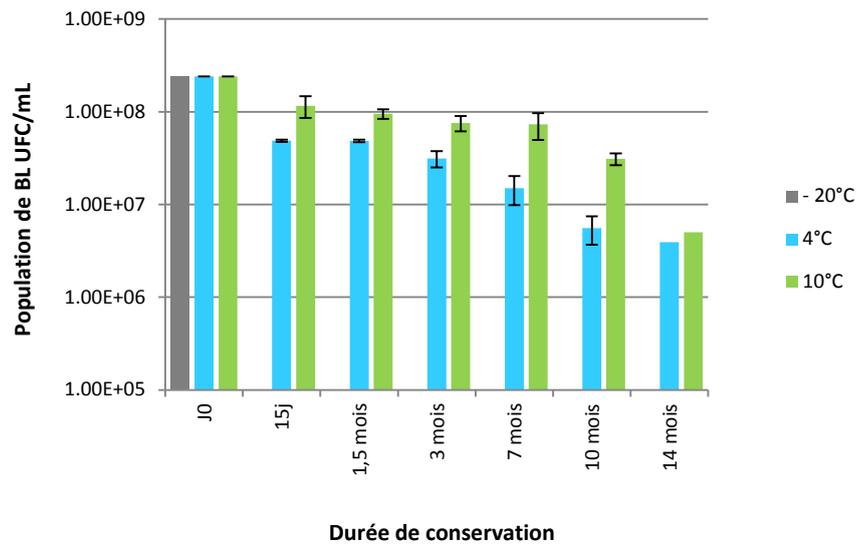
2.1. Objectifs

En vinification, lorsque la FML ne démarre pas spontanément dans certaines cuves, certains vinificateurs choisissent d'incorporer, dans ces cuves, les lies fines post-FML issues d'une autre cuve dans laquelle cette fermentation s'est réalisée précocement. Ce procédé particulièrement efficace repose sur la présence, dans les lies, d'une population importante de bactéries lactiques vivantes et ayant une bonne activité malolactique, ainsi que sur la présence de nutriments utiles au développement bactérien et qui existent sous la forme d'autolysats de levures. La réglementation autorise cette pratique, mais elle interdit l'utilisation de lies issues d'une autre exploitation. Nous avons donc envisagé la possibilité de conserver ces lies pendant une année, afin de les utiliser au millésime suivant, pour maîtriser le départ des premières FML dans une exploitation. Cette pratique serait tout à fait en conformité avec la réglementation si le volume de lies utilisé d'un millésime à l'autre n'excède pas 15% de la cuveensemencée, ce qui est tout à fait envisageable car le volume de lies utilisé traditionnellement pour lancer une FML est de 1 à 3%. Elle présenterait également l'avantage de permettre aux vignerons d'utiliser la population des souches d'*O. oeni* indigènes issues de leur exploitation. Pour savoir s'il était pertinent de conserver des lies sur une longue période, et comment évolue la population d'*O. oeni* durant la conservation selon différentes conditions de température, nous avons donc analysé la population de bactéries lactiques et les souches d'*O. oeni* dans des lies et nous avons également évalué leur capacité à provoquer la FML après une longue période de conservation.

2.2. Evolution de la population de bactéries lactiques durant la conservation des lies

L'analyse de faisabilité de la conservation des lies de FML a été réalisée sur un lot de lies issues d'une cuve de Merlot du millésime 2012 (Château Dillon). Ces lies ont été séparées en trois lots qui ont été stockés à 3 températures différentes : -20°C, +4 °C et +10°C. Chaque lot a été réparti en aliquotes afin de pouvoir en prélever au fur et à mesure de la conservation, sans agir sur l'état des autres. A chaque prélèvement, la population de bactéries lactiques a été suivie par dénombrement sur milieu nutritif gélosé. Au cours de ce suivi, une quatrième

a)



b)

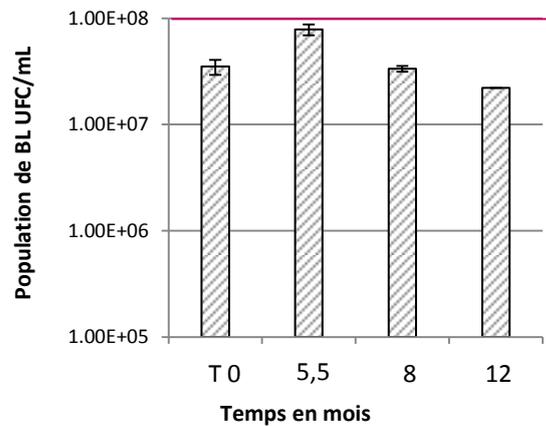


Figure 45. Evolution de la population des bactéries lactiques dans les lies au cours de leur conservation. Des lies de FML issues d'une cuve de Merlot ont été conservées pendant plusieurs mois à -20°C, +4°C ou 10°C (a) ou après congélation dans de l'azote liquide et conservation à -80°C (b). La population totale de bactéries lactiques a été mesurée régulièrement par étalement d'échantillons sur boîtes de Petri et dénombrement des colonies. La population de bactéries lactiques dans les lies avant congélation dans l'azote liquide étaient de 10^8 UFC/mL. Les lies congelées correspondent celles qui avaient été stockées à 10°C pendant 1,5 mois.

condition a été mise en place. Une fraction de lies conservées à +10°C a été congelée sous forme de billes dans de l'azote liquide, puis stockée à -80°C. Des dénombrements de bactéries lactiques ont été réalisés comme pour les autres conditions. La figure 45a montre que la population bactérienne présente initialement dans les lies était d'environ 2.10^8 UFC/mL. Dès la première analyse réalisée après 15 jours de conservation, plus aucune bactérie vivante n'a été observée dans le lot conservé à -20°C. A ce même stade, la population bactérienne avait été divisée par 10 dans le lot conservé à 4°C et de moitié dans le lot conservé à 10°C. Dans les mois qui ont suivi, les populations ont chuté progressivement dans ces 2 dernières conditions, mais nettement plus rapidement à +4°C qu'à +10°C. En effet, après 10 mois de conservation, elles ont atteint environ 6.10^6 UFC/ml à +4°C et 3.10^7 UFC/ml à +10°C. Cependant, la population bactérienne a continué de chuter pendant les mois suivants pour atteindre un niveau presque équivalent dans les 2 conditions, soit environ 8.10^6 UFC/mL.

Après avoir démarré cet essai et en constatant qu'il serait impossible de conserver les lies par congélation à -20°C, nous avons souhaité tester le même mode de conservation dans l'azote liquide que celui utilisé pour les souches pures (chapitre précédent). Des lies conservées pendant 1,5 mois à +10°C ont donc été congelées par ce procédé, puis stockées à -80°C. La figure 45b montre que la congélation a eu pour effet immédiat de faire chuter la population de bactéries de 2.10^8 à 3.10^7 UFC/ml, soit une perte de 1 log suite à la congélation mais cette population reste constante même après 1 an de conservation.

Ces essais ont permis de constater que 2 solutions de stockage des lies seraient envisageables pour conserver une population bactérienne importante pendant les 10 mois qui séparent 2 périodes de vinification : le stockage à +10°C, qui serait facile à mettre en œuvre dans les exploitations, et celui à -80°C, qui peut être réalisé en laboratoire, mais qui ne serait pas envisageable pour des exploitations.

2.3. Evolution de la diversité des souches d'*O. oeni* au cours de la conservation des lies.

Lorsque nous avons réalisé les dénombrements des bactéries lactiques au cours de la conservation des lies à différentes températures, nous avons conservé 15 colonies de

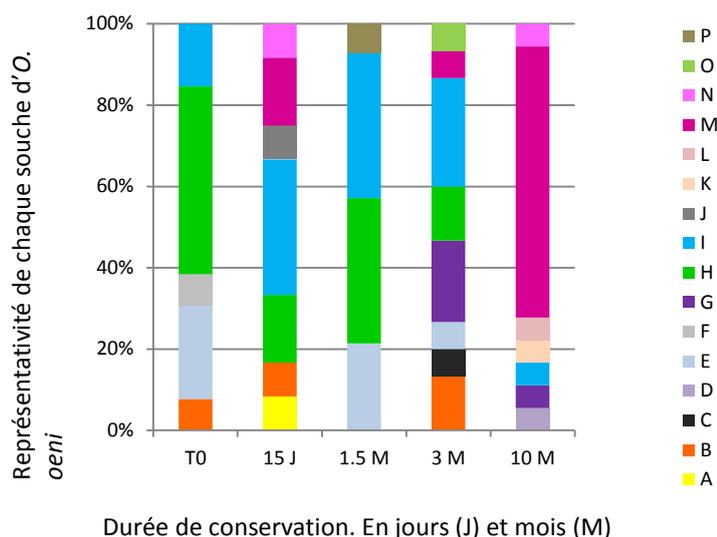


Figure 46. Evolution de la diversité des souches d’*O. oeni* dans les lies conservées à +10 °C

Des lies issues d’un vin en fin de FML ont été conservées pendant 10 mois à +10°C. Des prélèvements ont été effectués en cours de conservation, pour isoler des colonies de bactéries lactiques sur boîte de Petri et identifier les souches d’*O. oeni* par analyse MLVA de 15 colonies par prélèvement. La proportion de chaque souche a été ramenée en pourcentage par rapport au nombre totale de colonie d’*O. oeni* identifiées.

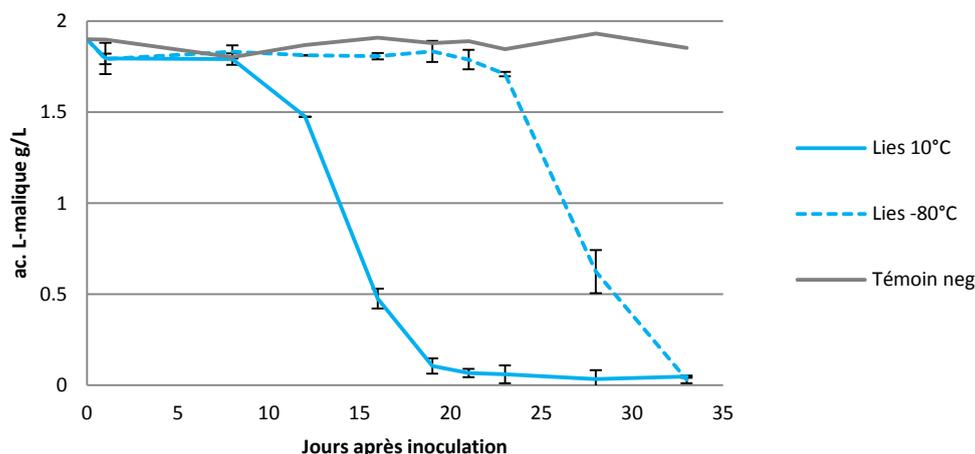


Figure 47. Cinétique de dégradation de l’acide malique dans un vin inoculé avec des lies de FML.

Des lies de FML conservées à +10°C pendant 10 mois, ou congelées dans l’azote liquide et conservées à -80°C pendant la même durée, ont été inoculées à 1% (v/v) dans un vin ayant achevé sa FA. La cinétique de dégradation de l’acide malique a été mesurée par dosage enzymatique. Tous les essais ont été réalisés en duplicat (non montrés) et les dosages ont été réalisés en triplicata.

chaque échantillon en vue de l'identification des espèces et des souches d'*O. oeni* présentes. Au bout de 10 mois de conservation, nous avons choisi d'identifier les souches du lot de lies conservé à +10°C, condition avec la meilleure survie. Les colonies isolées ont été typées par la méthode MLVA, pour identifier les souches présentes à chaque stade. La figure 46 présente la proportion de chaque souche identifiée à chaque stade. On remarque qu'il y a une variation de la proportion des souches entre les différents temps de conservation analysés. Au début de la conservation, 5 souches ont été identifiées. Au cours des 3 mois suivants, 4 de ces souches ont été retrouvées, mais parmi de nouvelles souches qui n'avaient pas été décelées auparavant. Après 10 mois de conservation, plus aucune de ces premières souches n'a été retrouvée. Au 10^{ème} mois de conservation, 7 nouvelles souches étaient détectables, dont une qui était très largement majoritaire. Cette souche avait déjà été détectée dans 2 des prélèvements précédents. Au total, au cours des 10 mois de conservation, 16 souches d'*O. oeni* ont été identifiées. Comme montré dans le paragraphe précédent, la population totale de bactéries lactiques a chuté de 2.10^8 à 3.10^7 UFC/ml tout au long de la conservation. Il est probable que les 5 souches détectées au début de la conservation constituaient la population dominante d'*O. oeni* et qu'elles n'ont pas résisté au 10 mois de conservation. En disparaissant, il est devenu possible de détecter de nouvelles souches qui étaient initialement minoritaires. Par conséquent, bien que les souches présentes après 10 mois de conservation restent des souches indigènes issues de l'exploitation, elles ne sont pas représentatives de la population bactérienne qui a réalisé la FML. De plus, les souches dominantes détectées au début de la conservation, ne constituent que 1/3 des souches totales identifiées.

2.4. Capacité fermentaire des lies conservées

Pour évaluer la capacité fermentaire des lies, nous avons inoculé un vin ayant achevé sa FA, avec le lot de lies que nous avons conservé 10 mois à 10°C et aussi avec les lies congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C. Les lies ont été inoculées à 1% du volume final, soit à une population proche de 10^5 cellules/mL. La capacité de ces bactéries à réaliser la FML a été mesurée en suivant la dégradation de l'acide malique. Les résultats de dosage montrent que la dégradation de l'acide malique a débuté 10 jours après inoculation pour les

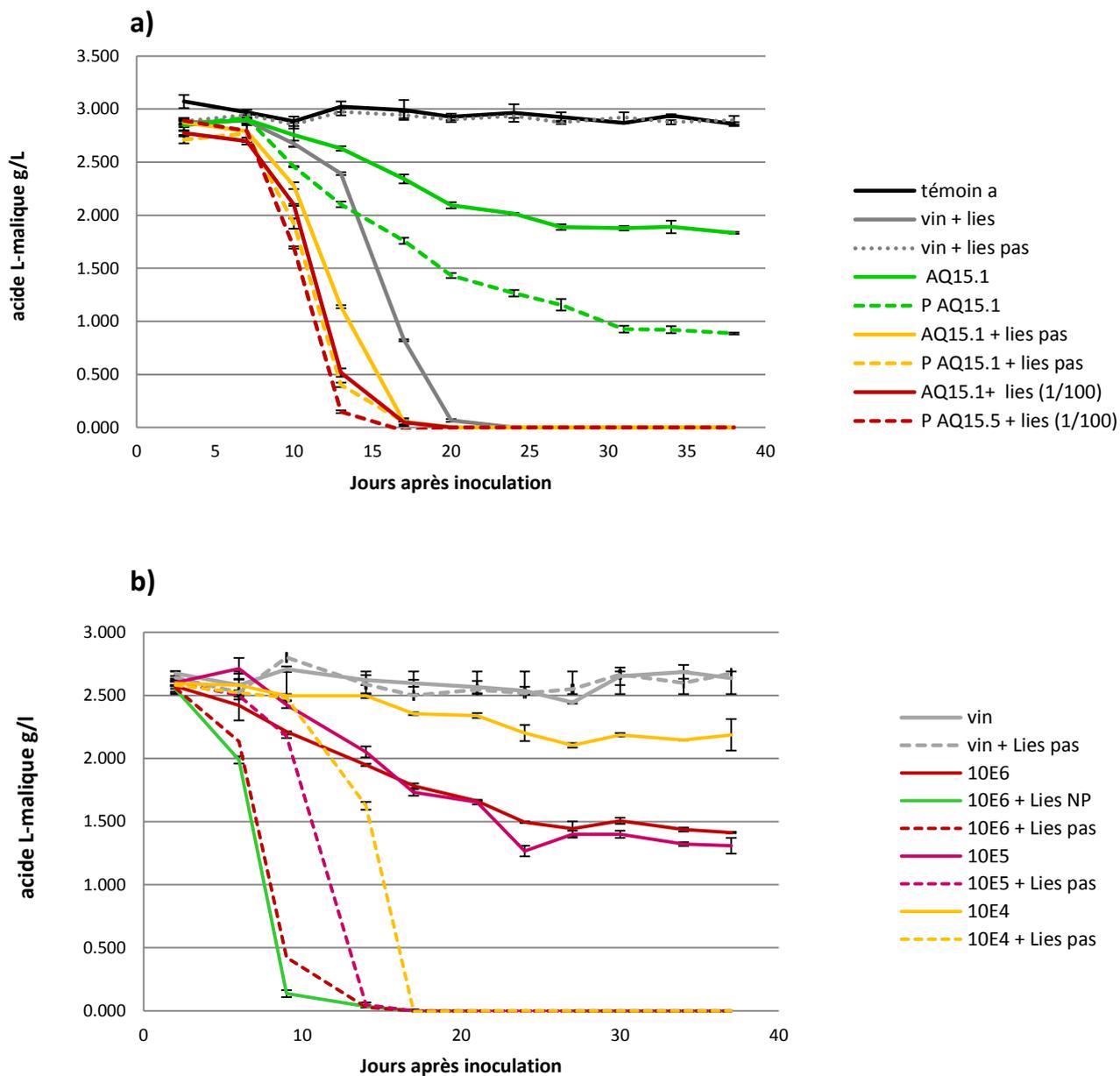


Figure 48. Effet des lies de FML sur la cinétique de dégradation de l'acide malique.

La cinétique de dégradation de l'acide malique a été suivie dans un vin ayant achevé sa FA et inoculé, ou non, avec la souche d'*O. oeni* AQ15.1 et des lies fraîches ou pasteurisées. **a)** souche AQ15.1 seule, inoculée à 10^6 cellules/mL, sans acclimation, ou après une phase d'acclimation (P) de 24h dans un mélange vin/eau 50/50. **b)** souche AQ15.1 inoculée sans acclimation et à différentes concentrations. L'ajout de lies pasteurisées (« lies pas ») ou non (lies) a été effectué à 1% v/v dans les essais comme indiqué.

lies conservées à 10°C et après 20 jours pour les lies congelées dans l'azote liquide (Figure 47). Puis la chute de la concentration en acide malique est identique dans les deux conditions, la FML s'achevant environ 10 jours après le début de la dégradation. Ces résultats étaient assez surprenants, car ils montraient que les cinétiques de FML de vins inoculés par des lies étaient au moins aussi rapides que celles obtenues avec des souches pures, et ce, bien que la population bactérienne inoculée soit 10 fois plus faible lorsque des lies ont été utilisées.

2.5. Effet des lies sur la réalisation de la FML

La cinétique du vin inoculé avec les lies a été similaire à celles obtenues avec les souches AQ 15.1 et AQ 15.10, qui avaient pourtant été inoculées à une concentration 10 fois plus importante. Ces résultats nous ont poussés à réaliser d'autres essais avec les lies, pour mieux comprendre l'origine de cette amélioration de la FML.

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si l'effet sur la FML était dû aux souches présentes dans les lies ou aux autres constituants des lies. Pour cela nous avons inoculé un vin collecté après FA avec différentes préparations : 1/ 1% de lies fraîches, 2/ une souche pure à 10^6 cellules/mL, AQ 15.1, testée précédemment, 3/ la souche AQ 15.1 additionnée de lies fraîches à 1%, 4/ la souche AQ 15.1 additionnée de lies pasteurisées à 1%. Toutes les conditions ont été réalisées en duplicata et testées avec ou sans acclimatation de la souche. Les témoins négatifs étaient le vin non inoculé ou inoculé avec les lies pasteurisées. La pasteurisation des lies a consisté en un traitement de 15 min à 80°C. La stérilité des lies pasteurisées a été vérifiée en réalisant des étalements sur milieu gélosé. Une phase de latence de 7 jours a été observée pour toutes les conditions (Figure 48a). Ensuite, la cinétique fermentaire a été différente selon les conditions d'inoculation. Pour le témoin non inoculé, aucune chute de la concentration en acide malique n'a été observée. Pour la souche AQ 15.1 inoculée directement ou après acclimatation, la dégradation de l'acide malique a bien débuté, mais elle ne s'est pas achevée au bout de 40 jours. Cette souche avait pourtant montré de bonnes capacités fermentaires dans des essais précédents. Il est possible que le type de vin utilisé ici ne lui était pas favorable. Le vin additionné seulement de lies fraîches a terminé la FML au bout de 20 jours. Dans toutes les

autres conditions, au cours desquelles la souche AQ 15.1 a été inoculée avec ou sans acclimatation et avec ou sans lies fraîches ou pasteurisées, la FML s'est terminée en 17 jours ou moins.

Ces résultats ont confirmé que les lies amélioraient considérablement la cinétique de FML et ils ont montré que ce ne sont pas tant les bactéries présentes dans les lies, mais les constituants non bactériens des lies qui ont cet effet stimulateur.

Dans un second temps, nous avons voulu savoir si la présence de lies pasteurisées pouvait améliorer la cinétique de FML en présence d'une faible population bactérienne initiale. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des essais de FML en inoculant un vin avec une souche pure acclimatée à différentes concentrations : 10^4 , 10^5 , et 10^6 cellules/mL en présence ou absence de 1% de lies pasteurisées. Toutes les conditions ont été réalisées en duplicata. Les témoins négatifs étaient du vin non inoculé et du vin inoculé avec les lies pasteurisées. Le suivi de la FML a été réalisé de la même façon que pour les essais précédents. Lors de cet essai nous avons observé peu ou pas de phase de latence pour les conditions inoculées (Figure 48b). Comme précédemment, la souche pure n'a pas eu une cinétique aussi rapide que dans les essais antérieurs, même dans la condition inoculée à 10^6 cellules/mL. A l'inverse, les conditions où les souches ont été inoculées en additionnant des lies pasteurisées ont eu des cinétiques rapides et complètes. La souche inoculée à 10^6 avec des lies pasteurisées ou non, a terminé la FML en moins de 14 jours, la fin de FML étant légèrement plus rapide dans un contrôle réalisé avec les lies non pasteurisées. En présence de lies pasteurisées, la FML s'est terminée en seulement 14 jours pour la souche inoculée à 10^5 cellules/mL et en 17 jours pour l'inoculation à 10^4 cellules/mL. L'addition de lies pasteurisées à un vin au moment de la FML permet donc de réaliser une FML rapide et complète même avec un faible inoculum de souche d'*O. oeni* au départ. La croissance des bactéries est fortement stimulée par les constituants des lies, ce qui favorise la réalisation de la FML. Cet effet stimulant s'explique en grande partie par les autolysats de levures qui sont présents dans les lies. Actuellement certains industriels commercialisent des autolysats de levures en tant qu'activateur de FML.

3. Discussion

Sélection de souches indigènes La sélection de souches en vue de la production de levains malolactiques nécessite, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, un long travail de caractérisation phénotypique et moléculaire. Dans le cadre d'une sélection de souches régionales ou à un niveau plus restreint comme celui d'une exploitation, un protocole de sélection classique serait trop lourd et ne serait pas envisageable. Le but d'une sélection et d'une production à petite échelle est principalement de sélectionner une ou plusieurs souches indigènes, parmi le panel de souches d'une région ou d'une exploitation, capable de réaliser la FML de manière complète avec une durée raisonnable. L'absence de production d'altérations au niveau organoleptique et sanitaire est également importante.

Les essais et protocoles que nous avons mis en place ne sont que préliminaires et nécessitent encore beaucoup d'améliorations notamment au niveau de la production des souches congelées (rendement) et des contrôles à effectuer sur les souches sélectionnées. Cependant, ces résultats préliminaires permettent de dégager quelques points. La sélection réalisée a porté sur des souches dominantes de deux exploitations au moment des fermentations spontanées, en plus de 4 souches qui avaient été identifiées sur plusieurs appellations simultanément. Il apparaît que la résistance à la congélation dépend des souches. De plus, les souches qui sont dominantes au moment de la FML, ou présentes dans plusieurs exploitations, ne possèdent pas forcément toutes de bonnes capacités fermentaires dans le vin que nous avons testé. Le fait qu'une souche soit dominante pendant une vinification ne garantit pas qu'elle soit capable de mener à bien la FML sur un autre vin, la réalisation de test au moins de microvinifications sur différents vins, reste une étape incontournable pour la sélection.

Utilisation de lies fines de FML Une des pistes explorées pour la maîtrise et l'amélioration des FML spontanées, est l'utilisation de lies fines post-FML, fraîches ou stérilisées, en incorporation au vin pour déclencher la FML ou pour l'améliorer. Des lies ont ainsi été stockées pendant 10 mois avant d'être utilisées dans des essais de microvinifications. Différentes modalités d'incorporation ont été testées : 1/ les lies fraîches seules à 1% du volume finale, 2/des lies fraîches avec une souche sélectionnée inoculées à

10^6 cellules/mL, 3/ des lies stérilisées avec une souche sélectionnée et inoculée à différentes concentrations. Ces 3 conditions ont été comparées avec une FML réalisées en inoculant le vin uniquement avec la souche sélectionnée. Alors que le vin inoculé avec la souche seule n'a pas réalisé la FML de manière satisfaisante (acide malique résiduel de 1g/L après 40 jours). L'incorporation des lies fraîches à 1% au vin a eu pour effet d'induire une FML complète en 20 jours. La combinaison lies fraîches ou stérilisées à 1% + souche inoculée à 10^6 cellules/mL a permis de réaliser la FML en 10 et 13 jours selon les essais. De plus, des concentrations d'inoculations différentes de la souche ont été testées en addition des lies. La FML s'est terminée en 17 jours lorsque l'inoculation a été réalisée à 10^4 cellules/mL avec addition de lies stérilisées. L'addition de lies, conservées pendant plus de 10 mois et stérilisées, a eu un effet stimulant sur la réalisation de la FML, même avec un niveau de population de bactérie très faible. Ces premiers résultats sont très encourageants et la compréhension de l'effet des lies sur le vin et les bactéries durant la FML devrait être poursuivie. Ces essais sont néanmoins préliminaires et n'ont été réalisés que sur un seul lot de lies. De nouveaux lots de lies sont actuellement en cours de collecte pour procéder à leur conservation à +10°C dans le but de déterminer si les résultats obtenus pour ce lot peuvent être généralisés, et pour confirmer l'action des lies les bactéries et la réalisation de la FML. De plus, il est également indispensable de contrôler la qualité sanitaire des lies au moment du stockage et avant utilisation, notamment pour éviter la contamination d'un vin avec des lies contenant des levures *Brettanomyces*. Concrètement, l'utilisation des lies à 1% du volume final n'est pas envisageable au niveau d'une exploitation avec des cuves de plusieurs hectolitres, mais cela pourrait être une façon de réaliser des pieds de cuve pour permettre d'inoculer les FMLs.

CONCLUSION GENERALE

L'espèce *Oenococcus oeni* présente un intérêt important en œnologie. Elle est l'espèce responsable de la réalisation de la plupart des fermentations malolactiques. La diversité des souches d'*O. oeni* a longtemps été étudiée par le biais de la sélection de levains malolactiques, car elles possèdent des caractéristiques phénotypiques et fermentaires très diverses qui permettent de les sélectionner en fonction de leur résistance aux stress du vin et de leur performances technologiques. La diversité œnologique des souches, c'est-à-dire des souches présentes pendant le processus de vinification et au moment de la FML, a été décrite dès les années 1960. Différentes études ont montré que la population d'*O. oeni* est très hétérogène au sein d'une fermentation, d'une exploitation ou d'une région. L'utilisation de méthodes de typage moléculaires très différentes ne permet pas cependant de compiler les résultats des études de diversité d'*O. oeni* dans toutes les régions étudiées et de les comparer, pour avoir une image exhaustive de la diversité de cette espèce. Avoir une image de la diversité des souches indigènes qui réalisent la FML est devenue une nécessité, surtout avec la demande grandissante des viticulteurs qui souhaitent mieux maîtriser les FML spontanées et mettre en œuvre des vinifications à l'aide de souches indigènes provenant de leur région ou exploitation. C'est dans ce contexte que les travaux réalisés au cours de cette étude ont été menés. L'objectif était d'étudier la diversité des souches dans différentes régions vitivinicoles et de comparer leur répartition dans les régions pour mettre en évidence la présence ou non, de souches spécifiques. La finalité étant d'avoir une image plus exhaustive de la diversité de cette espèce et de savoir si la sélection de souches spécifiques est envisageable et présente un réel intérêt en œnologie.

Dans un premier temps, **l'utilisation de la méthode de typage MLVA**, nous a permis de réaliser un inventaire portant sur près de 3 000 colonies d'*O. oeni* et d'identifier 514 souches différentes, isolées de vins et cidres de 6 régions en France et au Liban. L'utilisation d'indice de biodiversité a permis de confirmer la représentativité de l'échantillonnage réalisé sur les 3 régions les plus représentées : l'Aquitaine, la Bourgogne et le Languedoc-Roussillon. Les résultats ont montré **une grande diversité et hétérogénéité des souches d'*O. oeni*** dans toutes les régions étudiées, ainsi qu'au niveau des exploitations. La population d'*O. oeni* est représentée par un grand nombre de souches qui, pour la plupart, sont « **spécifiques** » de certaines régions, mais aussi d'appellations et des exploitations. Dans ce contexte, 87,15% n'ont été isolées qu'à partir de vins ou cidres d'une seule région.

Seules 3,7% des souches correspondent à des souches abondantes. De plus, l'analyse des différents types de produits a révélé peu de souches communes entre eux : aucune souche identifiée dans le cidre n'a été retrouvée dans le vin et, parmi les souches isolées de vins blancs, peu ont été identifiées dans des vins rouges. Il y a donc une **séparation des souches en fonction des produits dont elles ont été isolées**, qui est probablement dû à une sélection causée par le milieu.

Dans un second temps, nous avons également mis au point une méthode de typage des souches d'*O. oeni* haut-débit basée sur le génotypage de SNP. Elle a permis de classer les souches dans des groupes génétiques qui avaient été identifiés au préalable par MLST et par comparaison de génomes. Quelques SNP ayant été supprimés de l'analyse, il serait intéressant de les remplacer par des SNP d'intérêt en œnologie. Les résultats du génotypage des 577 souches ont révélé 43 séquences types différentes. Parmi les 557 souches analysées, 559 ont pu être classées dans des sous-groupes A ou B, et près de 86% appartenaient au groupe A. Cela confirme les inventaires réalisés par PCR « A/B » qui ont montré que dans les vins analysés, **ce sont très majoritairement des souches du groupe A qui réalisent la FML**. Seules 18 souches n'ont pu être affiliées à un groupe car elles présentent un mélange de SNP des groupes A et B et se positionnent donc avec la souche C52 dans un arbre de proximité. Il est donc probable qu'elles occupent une position « ancestrale » comme cette dernière. Des analyses phylogénétiques complémentaires seront nécessaires pour les positionner correctement.

Nous avons remarqué que la plupart des groupes génétiques identifiés contenaient des souches isolées de toutes les régions étudiées, à l'exception de trois groupes qui contiennent majoritairement des souches de vins blancs de Bourgogne et de Champagne, de vin rouge de Bourgogne ou encore de cidre. Dans certains groupes, **les souches semblent se grouper en fonction de leur spécificité vis-à-vis d'un type de produit** plutôt que par leur origine géographique. Il est probable que les milieux particuliers ont sélectionné les souches les plus adaptées aux conditions du milieu. Les résultats des tests phénotypiques en milieux synthétiques et de microvinifications, montrent des **comportements similaires de souches appartenant à un même groupe génétique**. Nous ne connaissons pas les raisons du

comportement similaire de ces souches, mais c'est un point qui sera exploré à l'avenir à l'aide d'outils moléculaires et génomiques.

Un dernier volet de ce travail se rapportait à la mise en place de protocole de sélection de souches indigènes et de moyens pour aider les vinificateurs à **maîtriser les FML spontanées**. Ces essais ne sont encore que préliminaires mais sont très encourageants, plus précisément **l'utilisation de lies fines post-FML** pour la réalisation de pied de cuve et incorporation à une FML. Ces essais se poursuivent actuellement, par la conservation de nouveaux lots de lies et par des essais en minicuverie. Plusieurs points sont encore à étudier, notamment les variations de la composition des lies et l'impact que pourrait avoir cette pratique sur la qualité finale du vin.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence l'importante diversité de l'espèce *O. oeni*, qui est encore loin d'être explorée de façon exhaustive. La structure de population que nous connaissons actuellement ne reflète qu'une partie des souches que nous pouvons étudier via les différentes méthodes d'isolement et de typage, et ne représente que la population œnologique et cidricole. La recherche de souches provenant d'autres produits serait intéressante pour comprendre l'adaptation au vin des souches œnologiques. La diversité est aussi bien génétique que phénotypique, et nous avons mis en évidence une corrélation entre des groupes génétiques et des comportements vis-à-vis de paramètres du vin et de la réalisation de la FML qu'il serait intéressant d'étudier. Pour finir, la sélection de souches indigènes et surtout la conservation et l'utilisation de lies, ont donné des résultats très encourageants. Nous allons donc poursuivre les essais pour comprendre les mécanismes et conséquences de cette pratique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Antalick G, Perello M-C, and de Revel G (2012)** Characterization of Fruity Aroma Modifications in Red Wines during Malolactic Fermentation. *J Agric Food Chem* **60**:12371–12383.
- Arendt EK, Lonvaud A, and Hammes WP (1991)** Lysogeny in *Leuconostoc oenos*. *J Gen Microbiol* **137**:2135–2139.
- Arnold, WN (1981)** Autolysis, in Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysic and ultrastructure pp 65–84, CRC Press, Florida.
- Aurore Messal (2010)** Clés et méthodes pour réussir sa conversion en bio, Féret, Bordeaux.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paccian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, and Zagnitko O (2008)** The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**:75.
- Badotti F, Moreira APB, Tonon LAC, de Lucena BTL, Gomes F de CO, Kruger R, Thompson CC, de Morais MA, Rosa CA, and Thompson FL (2014)** *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaça and ethanol fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, doi: 10.1007/s10482-014-0296-z. **106**: 1259-1267
- Bae S, Fleet G h., and Heard G m. (2006)** Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* **100**:712–727.
- Barbagallo RN, Spagna G, Palmeri R, and Torriani S (2004)** Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb Technol* **34**:292–296.
- Bartowsky EJ (2005)** *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Aust J Grape Wine Res* **11**:174–187.
- Bartowsky EJ, and Borneman AR (2011)** Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**:441–447.
- Bartowsky EJ, and Henschke PA (2004)** The “buttery” attribute of wine--diacetyl--desirability, spoilage and beyond. *Int J Food Microbiol* **96**:235–252.
- Bartowsky EJ, McCARTHY JM, and Henschke PA (2003)** Differentiation of Australian wine isolates of *Oenococcus oeni* using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aust J Grape Wine Res* **9**:122–126.
- Barua H, Lindblom IL, Bisgaard M, Christensen JP, Olsen RH, and Christensen H (2013)** In vitro and in vivo investigation on genomic stability of Salmonella enterica Typhimurium DT41 obtained from broiler breeders in Denmark. *Vet Microbiol* **166**:607–616.
- Bauer R., and Dicks L.M.T. (2004)** Control of Malolctic Fermentation in Wine. A Review. *S Afr J Enol Vitic* **25**.

- Beelman RB, Gavin A, and Keen RM (1977)** A New Strain of *Leuconostoc oenos* for Induced Malo-Lactic Fermentation in Eastern Wines. *Am J Enol Vitic* **28**:159–165.
- Belkum A van, Scherer S, Alphen L van, and Verbrugh H (1998)** Short-Sequence DNA Repeats in Prokaryotic Genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:275–293.
- Bidan, P. (1956)** Sur quelques bactéries isolées des vins en fermentation malolactique. *Ann Technol* **4**.
- Bilhère E, Lucas PM, Claisse O, and Lonvaud-Funel A (2009)** Multilocus Sequence Typing of *Oenococcus oeni*: Detection of Two Subpopulations Shaped by Intergenic Recombination. *Appl Environ Microbiol* **75**:1291–1300.
- Blears MJ, Grandis SAD, Lee H, and Trevors JT (1998)** Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **21**:99–114.
- Bloem A, Lonvaud-Funel A, and de Revel G (2008)** Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol* **25**:99–104.
- Bon E, Delaherche A, Bilhère E, Daruvar AD, Lonvaud-Funel A, and Marrec CL (2009)** *Oenococcus oeni* Genome Plasticity Is Associated with Fitness. *Appl Environ Microbiol* **75**:2079–2090.
- Bordas M, Araque I, Alegret JO, El Khoury M, Lucas P, Rozès N, Reguant C, and Bordons A (2013)** Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *Int Microbiol* **16**:113–123.
- Borneman AR, McCarthy JM, Chambers PJ, and Bartowsky EJ (2012)** Comparative analysis of the *Oenococcus oeni* pan genome reveals genetic diversity in industrially-relevant pathways. *BMC Genomics* **13**:373.
- Borneman AR, McCarthy JM, Chambers PJ, and Bartowsky EJ (2012)** Functional Divergence in the Genus *Oenococcus* as Predicted by Genome Sequencing of the Newly-Described Species, *Oenococcus kitaharae*. *PLoS ONE* **7**.
- Bridier J, Claisse O, Coton M, Coton E, and Lonvaud-Funel A (2010)** Evidence of Distinct Populations and Specific Subpopulations within the Species *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* **76**:7754–7764.
- Britz T j., and Tracey R p. (1990)** The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J Appl Bacteriol* **68**:23–31.
- Bunge J, Willis A, and Walsh F (2014)** Estimating the Number of Species in Microbial Diversity Studies. *Annu Rev Stat Its Appl* **1**:427–445.
- Bustamante AV, Sanso AM, Segura DO, Parma AE, and Lucchesi PMA (2013)** Dynamic of Mutational Events in Variable Number Tandem Repeats of *Escherichia coli* O157:H7. *BioMed Res Int* **2013**.
- Cañas PMI, Pérez PR, Prieto SS, and Herreros MLP (2009)** Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha. *J Biosci Bioeng* **108**:220–224.

- Capozzi V, Russo P, Beneduce L, Weidmann S, Grieco F, Guzzo J, and Spano G (2010)** Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett Appl Microbiol* **50**:327–334.
- Cappello MS, Stefani D, Grieco F, Logrieco A, and Zapparoli G (2008)** Genotyping by Amplified Fragment Length Polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine. *Int J Food Microbiol* **127**:241–245.
- Cappello MS, Zapparoli G, Stefani D, and Logrieco A (2010)** Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine. *Syst Appl Microbiol* **33**:461–467.
- Carreté R, Reguant C, Rozès N, Constantí M, and Bordons A (2006)** Analysis of *Oenococcus oeni* Strains in Simulated Microvinifications with Some Stress Compounds. *Am J Enol Vitic* **57**:356–362.
- Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, and Gibbs P (2004)** Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int Dairy J* **14**:835–847.
- Cecconi D, Milli A, Rinalducci S, Zolla L, and Zapparoli G (2009)** Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *ELECTROPHORESIS* **30**:2988–2995.
- Chao A (1987)** Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* **43**:783–791.
- Chatonnet P, Dubourdie D, Boidron J, and Pons M (1992)** The origin of ethylphenols in wines. *J Sci Food Agric* **60**:165–178.
- Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal P-A, and Guzzo J (2005)** Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1717**:118–124.
- Ciezack G, Hazo L, Chambat G, Heyraud A, Lonvaud-Funel A, and Dols-Lafargue M (2010)** Evidence for exopolysaccharide production by *Oenococcus oeni* strains isolated from non-ropy wines. *J Appl Microbiol* **108**:499–509.
- Claisse O, and Lonvaud-Funel A (2012)** Development of a multilocus variable number of tandem repeat typing method for *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol* **30**:340–347.
- Claisse O, and Lonvaud-Funel A (2014)** Multiplex variable number of tandem repeats for *Oenococcus oeni* and applications. *Food Microbiol* **38**:80–86.
- Colwell RK, and Elsensohn JE (2014)** EstimateS turns 20: statistical estimation of species richness and shared species from samples, with non-parametric extrapolation. *Ecography* **37**:609–613.
- Coton E, and Coton M (2003)** Microbiological Origin of “Framboisé” in French Ciders. *J Inst Brew* **109**:299–304.

- Coton E, Rollan G, Bertrand A, and Lonvaud-Funel A (1998)** Histamine-Producing Lactic Acid Bacteria in Wines: Early Detection, Frequency, and Distribution. *Am J Enol Vitic* **49**:199–204.
- Coton M, Romano A, Spano G, Ziegler K, Vetrana C, Desmarais C, Lonvaud-Funel A, Lucas P, and Coton E (2010)** Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol* **27**:1078–1085.
- Coton, Rollan, and Lonvaud-Funel (1998)** Histidine carboxylase of *Leuconostoc oenos* 9204: purification, kinetic properties, cloning and nucleotide sequence of the *hdc* gene. *J Appl Microbiol* **84**:143–151.
- Coucheney F, Desroche N, Bou M, Tourdot-Maréchal R, Dulau L, and Guzzo J (2005)** A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int J Food Microbiol* **105**:463–470.
- Coucheney F, Gal L, Beney L, Lherminier J, Gervais P, and Guzzo J (2005)** A small HSP, Lo18, interacts with the cell membrane and modulates lipid physical state under heat shock conditions in a lactic acid bacterium. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1720**:92–98.
- Cox DJ, and Henick-Kling T (1989)** Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J Bacteriol* **171**:5750–5752.
- Daniel P, Waele E de, and Hallet J-N (1993)** Optimization of transverse alternating field electrophoresis for strain identification of *Leuconostoc oenos*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**:638–641.
- Davis CR, Wibowo D, Eschenbruch R, Lee TH, and Fleet GH (1985)** Practical Implications of Malolactic Fermentation: A Review. *Am J Enol Vitic* **36**:290–301.
- Davis CR, Wibowo D, Fleet GH, and Lee TH (1988)** Properties of Wine Lactic Acid Bacteria: Their Potential Enological Significance. *Am J Enol Vitic* **39**:137–142.
- Davis CR, Wibowo DJ, Lee TH, and Fleet GH (1986)** Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Appl Environ Microbiol* **51**:539–545.
- Delaherche A, Bon E, Dupé A, Lucas M, Arveiler B, Daruvar AD, and Lonvaud-Funel A (2006)** Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* strains determined by sequence analysis of target genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**:394–403.
- De las Rivas B, Marcobal A, and Munoz R (2004)** Allelic Diversity and Population Structure in *Oenococcus oeni* as Determined from Sequence Analysis of Housekeeping Genes. *Appl Environ Microbiol* **70**:7210–7219.
- De Revel G, Bloem A, Augustin M, Lonvaud-Funel A, and Bertrand A (2005)** Interaction of *Oenococcus oeni* and oak wood compounds. *Food Microbiol* **22**:569–575.
- De Revel G, Martin N, Pripis-Nicolau L, Lonvaud-Funel A, and Bertrand A (1999)** Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *J Agric Food Chem* **47**:4003–4008.

- Dicks LMT, Dellaglio F, and Collins MD (1995)** Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **45**:395–397.
- Dicks LMT, Vuuren HJJV, and Dellaglio F (1990)** Taxonomy of *Leuconostoc* Species, Particularly *Leuconostoc oenos*, as Revealed by Numerical Analysis of Total Soluble Cell Protein Patterns, DNA Base Compositions, and DNA-DNA Hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* **40**:83–91.
- Dimopoulou M, Hazo L, and Dols-Lafargue M (2012)** Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. *Int J Food Microbiol* **153**:114–122.
- Dimopoulou M, Vuillemin M, Campbell-Sills H, Lucas PM, Ballestra P, Miot-Sertier C, Favier M, Coulon J, Moine V, Doco T, Roques M, Williams P, Petrel M, Gontier E, Moulis C, Remaud-Simeon M, and Dols-Lafargue M (2014)** Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes. *PLoS One* **9**:e98898.
- Dueñas M, Irastorza A, Fernandez K, Bilbao A, and Huerta A (1994)** Microbial Populations and Malolactic Fermentation of Apple Cider using Traditional and Modified Methods. *J Food Sci* **59**:1060–1064.
- Edwards CG, Jensen KA, Spayd SE, and Seymour BJ (1991)** Isolation and Characterization of Native Strains of *Leuconostoc oenos* from Washington State Wines. *Am J Enol Vitic* **42**:219–226.
- Endo A, and Okada S (2006)** *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:2345–2348.
- Favier M, Bihère E, Lonvaud-Funel A, Moine V, and Lucas PM (2012)** Identification of pOENI-1 and Related Plasmids in *Oenococcus oeni* Strains Performing the Malolactic Fermentation in Wine. *PLoS ONE* **7**:e49082.
- Ferré, L. (1922)** Influence de la rétrogradation de l'acide malique sur la composition des vins blancs. *Ann Sc Agronomiques* **5**.
- Figueiredo AR, Campos F, de Freitas V, Hogg T, and Couto JA (2008)** Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol* **25**:105–112.
- Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, and Ribereau-Gayon P (1984)** Evolution of Yeasts and Lactic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Bordeaux Wines. *Appl Environ Microbiol* **48**:1034–1038.
- Fortier L-C, Tourdot-Maréchal R, Diviès C, Lee BH, and Guzzo J (2003)** Induction of *Oenococcus oeni* H⁺-ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol Lett* **222**:165–169.
- Frontier S., Denise Pichod-Viale, Alain Lepêtre, Dominique Davoult, and Christophe Luczak (2008)** *Ecosystèmes : Structure, Fonctionnement, Evolution*, Dunod.
- Frothingham R, and Meeker-O'Connell WA (1998)** Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144**:1189–1196.

- Gagné S, Lucas P m., Perello M c., Claisse O, Lonvaud-Funel A, and De Revel G (2011)** Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates. *J Appl Microbiol* **110**:218–228.
- Garbay S, and Lonvaud-Funel A (1996)** Response of *Leuconostoc oenos* to environmental changes. *J Appl Bacteriol* **81**:619–625.
- Garijo P, Santamaría P, López R, Sanz S, Olarte C, and Gutiérrez AR (2008)** The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int J Food Microbiol* **125**:141–145.
- Garvie EI (1967)** *Leuconostoc oenos* sp.nov. *J Gen Microbiol* **48**:431–438.
- Garvie EI, and Farrow JAE (1980)** The Differentiation of *Leuconostoc oenos* from Non-Acidophilic Species of *Leuconostoc*, and the Identification of Five Strains from the American Type Culture Collection. *Am J Enol Vitic* **31**:154–157.
- González-Arenzana L, López R, Santamaría P, Tenorio C, and López-Alfaro I (2012)** Dynamics of Indigenous Lactic Acid Bacteria Populations in Wine Fermentations from La Rioja (Spain) During Three Vintages. *Microb Ecol* **63**:12–19.
- González-Arenzana L, Santamaría P, López R, and López-Alfaro I (2013)** Indigenous lactic acid bacteria communities in alcoholic and malolactic fermentations of Tempranillo wines elaborated in ten wineries of La Rioja (Spain). *Food Res Int* **50**:438–445.
- Gonzalez-Arenzana L, Santamaria P, Lopez R, Tenorio C, and Lopez-Alfaro I (2012)** Ecology of Indigenous Lactic Acid Bacteria along Different Winemaking Processes of Tempranillo Red Wine from La Rioja (Spain). *Sci World J* **2012**.
- Graca da Silveira M, Vitoria San Romao M, Loureiro-Dias MC, Rombouts FM, and Abee T (2002)** Flow Cytometric Assessment of Membrane Integrity of Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl Environ Microbiol* **68**:6087–6093.
- Grandvalet C, Assad-García JS, Chu-Ky S, Tollot M, Guzzo J, Gresti J, and Tourdot-Maréchal R (2008)** Changes in membrane lipid composition in ethanol- and acid-adapted *Oenococcus oeni* cells: characterization of the *cfa* gene by heterologous complementation. *Microbiology* **154**:2611–2619.
- Gregory Pasquier (2014)** Souches à malo pour tous les besoins. **267**:20–27.
- Grimaldi A, Bartowsky E, and Jiranek V (2005)** A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* **105**:233–244.
- Guerrini S, Bastianini A, Blaiotta G, Granchi L, Moschetti G, Coppola S, Romano P, and Vincenzini M (2003)** Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *Int J Food Microbiol* **83**:1–14.
- Guerrini S, Bastianini A, Granchi L, and Vincenzini M (2002)** Effect of oleic acid on *Oenococcus oeni* strains and Malolactic fermentation in wine. *Curr Microbiol* **44**:5–9.

- Guerrini S, Mangani S, Granchi L, and Vincenzini M (2002)** Biogenic Amine Production by *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol* **44**:374–378.
- Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CAL, Ricklefs SM, Hua S, Cousins DV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, and Musser JM (2002)** Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* **162**:1533–1543.
- Gut IG (2001)** Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* **17**:475–492.
- Guzzo J, Jobin M-P, and Diviès C (1998)** Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiol Lett* **160**:43–47.
- Henick-Kling T, Sandine WE, and Heatherbell DA (1989)** Evaluation of Malolactic Bacteria Isolated from Oregon Wines. *Appl Environ Microbiol* **55**:2010–2016.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, and Bohannon BJM (2001)** Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl Environ Microbiol* **67**:4399–4406.
- Ingraham J.L., Vaughn R.H., and Cooke G.M. (1960)** Studies on the malolactic organisms isolated from California wines. *Am J Enol Vitic* **11**:1–4.
- Ingram LO, and Buttke TM (1984)** Effects of alcohols on micro-organisms. *Adv Microb Physiol* **25**:253–300.
- Izuagbe YS, Dohman TP, Sandine WE, and Heatherbell DA (1985)** Characterization of *Leuconostoc oenos* Isolated from Oregon Wines. *Appl Environ Microbiol* **50**:680–684.
- Joshi D, Harris NB, Waters R, Thacker T, Mathema B, Krieswirth B, and Sreevatsan S (2012)** Single Nucleotide Polymorphisms in the *Mycobacterium bovis* Genome Resolve Phylogenetic Relationships. *J Clin Microbiol* **50**:3853–3861.
- Keim P, Price LB, Klevytska AM, Smith KL, Schupp JM, Okinaka R, Jackson PJ, and Hugh-Jones ME (2000)** Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**:2928–2936.
- Kelly-Treadwell PH (1988)** Protease activity in yeast: Its relationship to autolysis and champagne character. *Aust Grapegrow Winemak Aust.*
- Kelly WJ, Huang CM, and Asmundson RV (1993)** Comparison of *Leuconostoc oenos* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **59**:3969–3972.
- King SW, and Beelman RB (1986)** Metabolic Interactions Between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a Model Grape Juice/Wine System. *Am J Enol Vitic* **37**:53–60.
- Knoll C, Divol B, and du Toit M (2008)** Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiol* **25**:983–991.

- Knoll C, Fritsch S, Schnell S, Grossmann M, Rauhut D, and du Toit M (2011)** Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT - Food Sci Technol* **44**:2077–2086.
- Koch, A. (1900)** *Weinbau Weinhandel*.
- Konings WN, Lolkema JS, Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, and Driessen AJ (1997)** The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**:117–128.
- Kroes I, Lepp PW, and Relman DA (1999)** Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14547–14552.
- Kunkee RE, Ough CS, and Amerine MA (1964)** Induction of Malo-Lactic Fermentation by Inoculation of Must and Wine with Bacteria. *Am J Enol Vitic* **15**:178–183.
- Ladero V, Coton M, Fernández M, Buron N, Martín MC, Guichard H, Coton E, and Alvarez MA (2011)** Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: Application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers. *Food Microbiol* **28**:554–561.
- Lafon-Lafourcade S, Carre E, and Ribereau-Gayon P (1983)** Occurrence of Lactic Acid Bacteria During the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines. *Appl Environ Microbiol* **46**:874–880.
- Lafon-Lafourcade S, Lonvaud-Funel A, and Carre E (1983)** Lactic acid bacteria of wines: stimulation of growth and malolactic fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**:349–352.
- Lafon-Lafourcade, S., and Peynaud, E. (1974)** Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Conn Vigne Vin* **8**:187–203.
- Lamoureux M, Prévost H, Cavin JF, and Diviès C (1993)** Recognition of *Leuconostoc oenos* strains by the use of DNA restriction profiles. *Appl Microbiol Biotechnol* **39**:547–552.
- Larisika M, Claus H, and König H (2008)** Pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of *Oenococcus oeni* isolates from different wine-growing regions in Germany. *Int J Food Microbiol* **123**:171–176.
- Le Jeune C, and Lonvaud-Funel A (1997)** Sequence of DNA 16S/23S spacer region of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*): application to strain differentiation. *Res Microbiol* **148**:79–86.
- Liu S-Q (2002)** Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *J Appl Microbiol* **92**:589–601.
- Lonvaud-Funel A (2001)** Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **199**:9–13.
- Lonvaud-Funel A (1999)** Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**:317–331.
- Lonvaud-Funel A., and Joyeux A. (1988)** Etude d'une altération des vins. « La maladie des vins filants ». *Sc Alim* **8**:33–49.

- Lonvaud-Funel A, Joyeux A, and Desens C (1988)** Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J Sci Food Agric* **44**:183–191.
- Lonvaud-Funel A, Joyeux A, and Ledoux O (1991)** Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J Appl Bacteriol* **71**:501–508.
- López I, Tenorio C, Zarazaga M, Dizy M, Torres C, and Ruiz-Larrea F (2007)** Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. *Eur Food Res Technol* **226**:215–223.
- Louis Pasteur (1866)** *Etude sur le vin*.
- Lucas PM, Claisse O, and Lonvaud-Funel A (2008)** High Frequency of Histamine-Producing Bacteria in the Enological Environment and Instability of the Histidine Decarboxylase Production Phenotype. *Appl Environ Microbiol* **74**:811–817.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, and Spratt BG (1998)** Multilocus 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.
- Makarova KS, and Koonin EV (2007)** Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *J Bacteriol* **189**:1199–1208.
- Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC, and Hryniewicz W (2005)** Comparison of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, spa Typing, and Multilocus Sequence Typing for Clonal Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates. *J Clin Microbiol* **43**:3095–3100.
- Malherbe S, Tredoux AGJ, Nieuwoudt HH, and Toit M du (2012)** Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**:477–494.
- Marchand S, de Revel G, and Bertrand A (2000)** Approaches to Wine Aroma: Release of Aroma Compounds from Reactions between Cysteine and Carbonyl Compounds in Wine. *J Agric Food Chem* **48**:4890–4895.
- Marcobal AM, Sela DA, Wolf YI, Makarova KS, and Mills DA (2008)** Role of Hypermutability in the Evolution of the Genus *Oenococcus*. *J Bacteriol* **190**:564–570.
- Marcobal Á, Rivas B de las, Moreno-Arribas MV, and Muñoz R (2006)** Evidence for Horizontal Gene Transfer as Origin of Putrescine Production in *Oenococcus oeni* RM83. *Appl Environ Microbiol* **72**:7954–7958.
- Marqués AP, Duarte AJ, Chambel L, Teixeira MF, San Romao MV, Tenreiro R (2011)** Genomic diversity of *Oenococcus oeni* from different winemaking regions of Portugal. *Int Microbiol* **14**:155–62.

- Martineau B, and Henick-Kling T (1995)** Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine. *J Appl Bacteriol* **78**:526–536.
- Martinez-Murcia A j., and Collins M d. (1990)** A phylogenetic analysis of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16 S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* **70**:73–83.
- Martinez-Murcia AJ, Harland NM, and Collins MD (1993)** Phylogenetic analysis of some *Leuconostocs* and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large-subunit rRNA derived trees. *J Appl Bacteriol* **74**:532–541.
- Matthews A, Grbin PR, and Jiranek V (2007)** Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**:329–337.
- Mendisco F, Keyser C, Hollard C, Seldes V, Nielsen AE, Crubézy E, and Ludes B (2011)** Application of the iPLEXTM Gold SNP genotyping method for the analysis of Amerindian ancient DNA samples: Benefits for ancient population studies. *ELECTROPHORESIS* **32**:386–393.
- Mesas J m., Rodríguez M c., and Alegre M t. (2011)** Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra. *Lett Appl Microbiol* **52**:258–268.
- Mills DA, Rawsthorne H, Parker C, Tamir D, and Makarova K (2005)** Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *FEMS Microbiol Rev* **29**:465–475.
- Müller-Thurgau, H (1891)** Ergebnisse neuer Untersuchungen auf dem gebiete der Weinbereitung. *Weinbau und Weinhan- del* **9**:421–428.
- Nannelli F, Claisse O, Gindreau E, De Revel G, Lonvaud-Funel A, and Lucas P m. (2008)** Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Lett Appl Microbiol* **47**:594–599.
- Navarro L, Zarazaga M, Sáenz J, Ruiz-Larrea F, and Torres C (2000)** Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J Appl Microbiol* **88**:44–51.
- Nielsen JC, Prahil C, and Lonvaud-Funel A (1996)** Malolactic Fermentation in Wine by Direct Inoculation with Freeze-Dried *Leuconostoc oenos* Cultures. *Am J Enol Vitic* **47**:42–48.
- Noller AC, McEllistrem MC, Pacheco AGF, Boxrud DJ, and Harrison LH (2003)** Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Distinguishes Outbreak and Sporadic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates. *J Clin Microbiol* **41**:5389–5397.
- Olsen EB, Russell JB, and Henick-Kling T (1991)** Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J Bacteriol* **173**:6199–6206.
- Osborne J p., Dubé Morneau A, and Mira de Orduña R (2006)** Degradation of free and sulfurdioxide-bound acetaldehyde by malolactic lactic acid bacteria in white wine. *J Appl Microbiol* **101**:474–479.

- Pérez-Martín F, Seseña S, Izquierdo PM, Martín R, and Palop ML (2012)** Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World J Microbiol Biotechnol* **28**:1423–1432.
- Peynaud, E. (1946)** *Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins*, Bordeaux.
- Peynaud, E., and Domercq, S. (1961)** Etude sur les bactéries du vin. *Ann Techno Agric* **10**:43–60.
- Peynaud E, and Domercq S (1968)** [Study of 400 strains of heterolactic cocci isolated from wine]. *Ann Inst Pasteur Lille* **19**:159–169.
- Poblet-Icart M, Bordons A, and Lonvaud-Funel A (1998)** Lysogeny of *Oenococcus oeni* (syn. *Leuconostoc oenos*) and Study of Their Induced Bacteriophages. *Curr Microbiol* **36**:365–369.
- Pripis-Nicolau L, de Revel G, Bertrand A, and Lonvaud-Funel A (2004)** Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* **96**:1176–1184.
- Prunier A-L, and Leclercq R (2005)** Role of mutS and mutL Genes in Hypermutability and Recombination in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **187**:3455–3464.
- Radler, F. (1958)** Untersuchung des biologischen säureabbaus im wein. III. Die energiequelle der Apfelsäure-abbaenden bakterien. *Arkiv Mikrobiol* **31**:224–230.
- Reguant C, and Bordons A (2003)** Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol* **95**:344–353.
- Reguant C, Carreté R, Constantí M, and Bordons A (2005)** Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain. *FEMS Microbiol Lett* **246**:111–117.
- Renouf V, Claisse O, and Lonvaud-Funel A (2007)** Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:149–164.
- Renouf V, Claisse O, Miot-Sertier C, and Lonvaud-Funel A (2006)** Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis. *Food Microbiol* **23**:136–145.
- Renouf V, Delaherche A, Claisse O, and Lonvaud-Funel A (2008)** Correlation between indigenous *Oenococcus oeni* strain resistance and the presence of genetic markers. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**:27–33.
- Renouf, V., and Favier, M. (2010)** Genetic and Physiological Characterisation of *Oenococcus oeni* Strains to Perform Malolactic Fermentation in Wines. **31**.
- Ribéreau-Gayon, J (1936)** Sur la “désacidification biologique” des vins. *S Sci Phys Nat Bordeaux* **23**–25.
- Ribéreau-Gayon, J, Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P, and Sudrau, P (1975)** *Sciences et Technologie du vin.*, Dunod, Paris.

- Ribéreau-Gayon, P (1974)** The chemistry of red wine color. In: Chemistry of Winemaking. A. D. Webb. *Adv Chem Ser* **137**:50–87.
- Ribéreau-Gayon, P, Dubourdieu, D, Donèche, B, and Lonvaud, A (1998)** *Traité d'œnologie. Tome 1: Microbiologie du vin, vinification*, Dunod, Paris.
- Roberts IS (1996)** The Biochemistry and Genetics of Capsular Polysaccharide Production in Bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**:285–315.
- Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, and Palop ML (2008)** Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiol* **25**:942–948.
- Ruiz P, Izquierdo PM, Seseña S, and Palop ML (2010)** Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int J Food Microbiol* **137**:230–235.
- Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM, and Palop ML (2010)** Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:1555–1562.
- Salema M, Lolkema JS, Romão MVS, and Dias MCL (1996)** The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *J Bacteriol* **178**:3127–3132.
- Sánchez A, Rodríguez R, Coton M, Coton E, Herrero M, García LA, and Díaz M (2010)** Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. *Food Res Int* **43**:2101–2107.
- Santos MHS (1996)** Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol* **29**:213–231.
- Sato H, Yanagida F, Shinohara T, Suzuki M, Suzuki K, and Yokotsuka K (2001)** Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS Microbiol Lett* **202**:109–114.
- Schork NJ, Fallin D, and Lanchbury JS (2000)** Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* **58**:250–264.
- Schütz M, and Radler F (1973)** Das „Malatenzym“ von *Lactobacillus plantarum* und *Leuconostoc mesenteroides*. *Arch Für Mikrobiol* **91**:183–202.
- Seifert, W. (1901)** Z. Landwirtschaft. Versuchsw. *Deut-Oesterr* **4**:980–992.
- Shalaby AR (1996)** Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int* **29**:675–690.
- Silva P, Cardoso H, and Gerós H (2004)** Studies on the Wine Spoilage Capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am J Enol Vitic* **55**:65–72.
- Silveira MGD, Golovina EA, Hoekstra FA, Rombouts FM, and Abee T (2003)** Membrane Fluidity Adjustments in Ethanol-Stressed *Oenococcus oeni* Cells. *Appl Environ Microbiol* **69**:5826–5832.

- Sintchenko V, Wang Q, Howard P, Ha CW, Kardamanidis K, Musto J, and Gilbert GL (2012)** Improving resolution of public health surveillance for human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection: 3 years of prospective multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). *BMC Infect Dis* **12**:78.
- Solieri L, Genova F, De Paola M, and Giudici P (2010)** Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *J Appl Microbiol* **108**:285–298.
- Strasser de Saad AM, and Manca de Nadra MC (1993)** Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *J Appl Bacteriol* **74**:406–410.
- Suárez R, Suárez-Lepe JA, Morata A, and Calderón F (2007)** The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem* **102**:10–21.
- Swiegers J h., Bartowsky E j., Henschke P a., and Pretorius I s. (2005)** Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* **11**:139–173.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, and Kumar S (2007)** Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596–1599.
- Teixeira H, Gonçalves MG, Rozès N, Ramos A, and San Romão MV (2002)** Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? *Microb Ecol* **43**:146–153.
- Ten Brink B, Damink C, Joosten HMLJ, and Huis in 't Veld JHJ (1990)** Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* **11**:73–84.
- Tenreiro R, Santos M a., Paveia H, and Vieira G (1994)** Inter-strain relationships among wine *Leuconostocs* and their divergence from other *Leuconostoc* species, as revealed by low frequency restriction fragment analysis of genomic DNA. *J Appl Bacteriol* **77**:271–280.
- Toit M du, Engelbrecht L, Lerm E, and Krieger-Weber S (2011)** Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. *Food Bioprocess Technol* **4**:876–906.
- Torriani S, Felis GE, and Fracchetti F (2011)** Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *Ann Microbiol* **61**:33–39.
- Tourdot-Maréchal R, Fortier L-C, Guzzo J, Lee B, and Diviès C (1999)** Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiol Lett* **178**:319–326.
- Tourdot-Maréchal R, Gaboriau D, Beney L, and Diviès C (2000)** Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* **55**:269–273.
- Ugliano M, Genovese A, and Moio L (2003)** Hydrolysis of Wine Aroma Precursors during Malolactic Fermentation with Four Commercial Starter Cultures of *Oenococcus oeni*. *J Agric Food Chem* **51**:5073–5078.

- Vallet A, Lucas P, Lonvaud-Funel A, and De Revel G (2008)** Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* **104**:1833–1840.
- Vaquero MJR, Alberto MR, and de Nadra MCM (2007)** Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* **18**:93–101.
- Versari A, Parpinello GP, and Cattaneo M (1999)** *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**:447–455.
- Vestner J, Malherbe S, Du Toit M, Nieuwoudt HH, Mostafa A, Górecki T, Tredoux AGJ, and de Villiers A (2011)** Investigation of the Volatile Composition of Pinotage Wines Fermented with Different Malolactic Starter Cultures Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC×GC-TOF-MS). *J Agric Food Chem* **59**:12732–12744.
- Vigentini I, Picozzi C, Tirelli A, Giugni A, and Foschino R (2009)** Survey on indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from red wines of Valtellina, a cold climate wine-growing Italian area. *Int J Food Microbiol* **136**:123–128.
- Vogler AJ, Keys C, Nemoto Y, Colman RE, Jay Z, and Keim P (2006)** Effect of Repeat Copy Number on Variable-Number Tandem Repeat Mutations in *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **188**:4253–4263.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T van de, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, and Zabeau M (1995)** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**:4407–4414.
- Walling E, Gindreau E, and Lonvaud-Funel A (2005)** A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *Int J Food Microbiol* **98**:53–62.
- Webb RB, and Ingraham JL (1960)** Induced Malo-Lactic Fermentations. *Am J Enol Vitic* **11**:59–63.
- Weidmann S, Rieu A, Rega M, Coucheney F, and Guzzo J (2010)** Distinct amino acids of the *Oenococcus oeni* small heat shock protein Lo18 are essential for damaged protein protection and membrane stabilization. *FEMS Microbiol Lett* **309**:8–15.
- Wibowo D, Eschenbruch R, Davis CR, Fleet GH, and Lee TH (1985)** Occurrence and Growth of Lactic Acid Bacteria in Wine: A Review. *Am J Enol Vitic* **36**:302–313.
- Wibowo D, Fleet G h., Lee T h., and Eschenbruch R e. (1988)** Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *J Appl Bacteriol* **64**:421–428.
- Wuyts V, Mattheus W, De Laminne de Bex G, Wildemauwe C, Roosens NHC, Marchal K, De Keersmaecker SCJ, and Bertrand S (2013)** MLVA as a Tool for Public Health Surveillance of Human *Salmonella* Typhimurium: Prospective Study in Belgium and Evaluation of MLVA Loci Stability. *PLoS ONE* **8**:e84055.
- Yang D, and Woese CR (1989)** Phylogenetic Structure of the “*Leuconostocs*”: An Interesting Case of a Rapidly Evolving Organism. *Syst Appl Microbiol* **12**:145–149.

- Zapparoli G, Fracchetti F, Stefanelli E, and Torriani S (2012)** Genetic and phenotypic strain heterogeneity within a natural population of *Oenococcus oeni* from Amarone wine. *J Appl Microbiol* **113**:1087–1096.
- Zapparoli G, Moser M, Dellaglio F, Tourdot-Maréchal R, and Guzzo J (2004)** Typical metabolic traits of two *Oenococcus oeni* strains isolated from Valpolicella wines. *Lett Appl Microbiol* **39**:48–54.
- Zapparoli G, Reguant C, Bordons A, Torriani S, and Dellaglio F (2000)** Genomic DNA Fingerprinting of *Oenococcus oeni* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR. *Curr Microbiol* **40**:351–355.
- Zavaleta AI, Martínez-Murcia AJ, and Rodríguez-Valera F (1996)** 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology* **142**:2105–2114.
- Zavaleta AI, Martinez-Murcia AJ, and Rodriguez-Valera F (1997)** Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl Environ Microbiol* **63**:1261–1267.
- Zé-Zé L, Tenreiro R, and Paveia H (2000)** The *Oenococcus oeni* genome: physical and genetic mapping of strain GM and comparison with the genome of a “divergent” strain, PSU-1. *Microbiology* **146**:3195–3204.
- Zhao G, and Zhang G (2005)** Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *J Appl Microbiol* **99**:333–338.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications dans des journaux à comité de lecture

Bordas M, Araque I, Alegret JO, El Khoury M, Lucas P, Rozès N, Reguant C, Bordons A. Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *Int Microbiol.* 2013 Jun;16(2):113-23.

Garofalo C, El Khoury M, Lucas P, Bely M, Russo P, Spano G, Capozzi V. Characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from North-Apulian wines and their MLF performances in 'Nero di Troia' wine using sequential inoculation versus co-inoculation. (Article soumis)

Campbell-Sills H, El Khoury M, Favier M, Romano A, Biasioli F, Spano G, Sherman D, Bouchez O, Coton E, Coton M, Okada S, Tanaka N, Dols-Lafargue D, Lucas P. Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals the species population structure and domestication of wine-adapted strains. *Genome Biol. Evol.* (Article soumis)

Communications orales

El Khoury M, Claisse O, Campbell-Sills H, Lucas P. M. Diversité et dissémination d'*Oenococcus oeni* dans l'environnement œnologique. Journée scientifique de l'école doctorale, Arcachon, 9 Avril 2014

El Khoury M, Gerbaux V, Lucas P. M. Intérêts et limites de l'utilisation des pieds de cuve « malo » et souches « à façon ». Journée technique micro-organismes indigènes, Bordeaux, 10 Avril 2014

Communications affichées

El Khoury M, Campbell-Sills H, Guichou E, Salin F, Claisse O, Lucas P. Diversity and dissemination of *Oenococcus oeni* in the oenological environment. *ICFMH Food Micro. Nantes 1-4 September 2014.*

El Khoury M, Claisse O, Lucas P. Diversity of *Oenococcus oeni* strains in five wine-producing regions and selection for the production of indigenous malolactic starters. *PSS1.18,*

Microbial Diversity 2013, Microbial Interactions in Complex Ecosystems. Turino, Italy. 13-25 October 2013.

El Khoury M, Claisse O, Lucas P. Diversity of *Oenococcus oeni* strains in five wine-producing regions and selection for the production of indigenous malolactic starters. *19ème Colloque du Club des bactéries lactiques. Bordeaux, 16-18 Oct. 2013.*

Garofalo C, El Khoury M, M. Lucas P, Beneduce L, Grieco F, Spano G, Capozzi V. Biodiversity of *Oenococcus* strains isolated from wine produced in Apulian region *PSS1.10, Microbial Diversity 2013, Microbial Interactions in Complex Ecosystems. Turino, Italy. 13-25 October 2013.*

ANNEXES

Annexe 1. Liste des souches utilisées lors de cette étude.

Liste 1. Souches issues du CRB-OENO

N° de collection	Produit	Stade	Région	Pays	Informations
8908	vin rouge	FA	Bordeaux	Aquitaine	Haut Brion
9115	vin rouge	barrique	Bordeaux	Aquitaine	La Tour
0607			St. Denis de pile	Aquitaine	Ch. La Dominante
0608			St. Denis de pile	Aquitaine	Ch. La Dominante
89023				Italie	
89021	1989			Italie	
89002	1989		Eclair		
89010	1989		Eclair		
89076	1989		Eclair		
89105	1989		Eclair		
89004	1989		Eclair		
89007	1989		Eclair		
89008	1989		Eclair		
89009	1989		Eclair		
89011	1989		Eclair		
89013	1989		Eclair		
89015	1989		Eclair		
89016	1989		Eclair		
89018	1989		Eclair		
89019	1989		Eclair		
89020	1989		Eclair		
89022	1989		Eclair		
89030	1989		Eclair		x
89031	1989		Eclair		
89035	1989		Eclair		
89043	1989		Eclair		
89048	1989		Eclair		
89050	1989		Eclair		
89058	1989		Eclair		
89070	1989		Eclair		
89095	1989		Eclair		
89111	1989		Eclair		x
89127	1989		Eclair		
89132	1989		Eclair		x
89151	1989		Eclair		
89168	1989		Eclair		
89144	1989		Eclair		
89001	1989		Eclair		
89005	1989		Eclair		
89006	1989		Eclair		
89014	1989		Eclair		
89024	1989		Eclair		
89065	1989		Eclair		
8406	vin rouge	FA	Gironde	Aquitaine	
8413	vin rouge	FML	Gironde	Aquitaine	
8417	vin rouge	filant	France	Aquitaine	
8419	vin rouge	filant	France	Aquitaine	
8802	vin rouge	FML	Gironde	Aquitaine	

Liste 1. (Suite) Souches issues du CRB-OENO

N° de collection	Produit	Stade	Région	Pays	Informations
1378	Calvados			France	calvados baeux 2007 divoeni
9304 (10)	Cidre				
1380	Cidre			Espagne	Asturias 2008 Dioeni
13104	Cidre			Espagne	asturias nava 2006 divoeni
13105	Cidre			Espagne	asturia nava 2006 divoeni
13106	Cidre			Espagne	asturia colloto 2006 divoeni
13107	Cidre			Espagne	asturia colloto 2006 divoeni
13112	Cidre			Espagne	x Espagne asturia 2008 divoeni
13124	Cidre			Espagne	Asturias 2008 Dioeni
1379	Cidre			France	VV 2007 divoeni
1381	Cidre			France	normandie 1993 divoeni
1384	Cidre			France	calvados 2008 divoeni
1385	Cidre			France	manche 2008 divoeni
1386	Cidre			France	normadie 1993 divoeni
1387	Cidre			France	manche 2008 divoeni
1388	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
1389	Cidre			France	mayenne 2008 divoeni
1390	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
1391	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
1392	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
1393	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
13108	Cidre			France	normandie 2008 divoeni
13109	Cidre			France	calvados 2008 divoeni
13110	Cidre			France	vire 2009 divoeni
13111	Cidre			France	normadie 1999 divoeni
13113	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
13116	Cidre			France	normandie 2008 divoeni
13117	Cidre			France	normandie 1993 divoeni
13118	Cidre			France	nrmandie 1999 divoeni
13119	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
13120	Cidre			France	calvados 2008 divoeni
13121	Cidre			France	calvados 2008 divoeni
13122	Cidre			France	pays d'auge 2008 divoeni
1395	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
1383	Cidre			France	calvados (longues) 2008 divoeni
1398	Cidre			France	normandie 2008 divoeni
13101	Cidre			France	ferrière-aux-Etangs 2008 divoeni
13115	Cidre			France	normandie 1999 divoeni
13125	Cidre			France	normandie 1999 divoeni
1377	Cidre			France	calvads bayeux 2007 divoeni
1394	Cidre			France	mayenne le prieuré 2008 divoeni
9517	Floc de Gascogne				
9204 HDC	vin rouge		Gironde	Aquitaine	Langoiran
9614	Pineau		Charente		
8403	Raisin		Gironde	Aquitaine	
8905 (3)	Vin Blanc	FML		Juranson	
9806	vin rouge	FML	Gironde	Aquitaine	
9807	vin rouge	FML	Gironde	Aquitaine	
9902	vin rouge			Aquitaine	La Dauphine 97
9903	vin rouge			Aquitaine	Fonroque 98
11105	vin rouge			Aquitaine	Ch. Minvielle
9628 HDC	vin rouge			Aquitaine	cocumont coop.
9804 (10)	vin rouge	FML	Gironde	Aquitaine	
9804 (9)	vin rouge	FML	Gironde	Aquitaine	
9808 HDC	vin rouge	FML		Aquitaine	Gironde
89003	Vin rouge		Rioja	Espagne	casa del vino
9220	Vin rouge	fin FML	Naoussa	Grèce	
9221	Vin rouge	fin FML	Néméa	Grèce	
0027	vin rouge	FML	Bordeaux	Aquitaine	Haut Brion
0503	vin rouge		Centre France	Aquitaine	
0506	vin rouge		Pomerol	Aquitaine	Guimberteau

Annexe 1. Liste des souches utilisées lors de cette étude.

Liste 2. Souches identifiées au cours de cette étude

Occurrenc							Occurrenc							Occurrenc						
Numéro de Profil numérique MLVA e							Numéro de Profil numérique MLVA e							Numéro de Profil numérique MLVA e						
Profil	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5		de Profil	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5		Profil	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	
1	17	5	4	3	2	1	59	38	8	4	3	2	2	117	25	8	3	3	2	11
2	25	5	4	3	2	1	60	16	8	4	3	2	2	118	29	8	3	3	2	42
3	13	5	4	3	2	2	61	10	8	4	3	2	2	119	20	9	4	3	3	1
4	24	5	4	3	2	8	62	22	8	4	3	2	2	120	7	9	4	3	3	1
5	23	5	4	3	2	14	63	31	8	4	3	2	2	121	9	9	4	3	3	1
6	22	5	4	3	2	15	64	34	8	4	3	2	2	122	27	9	4	3	3	1
7	18	9	4	3	2	1	65	32	8	4	3	2	3	123	40	9	4	3	2	19
8	12	9	4	3	2	1	66	28	8	4	3	2	2	124	32	8	4	3	2	6
9	25	9	4	3	2	2	67	40	8	4	3	2	2	125	6	9	4	3	3	7
10	28	9	4	3	2	2	68	42	8	4	3	2	1	126	35	7	4	3	3	1
11	24	9	4	3	2	2	69	26	8	4	3	2	11	127	20	7	4	3	3	1
12	13	9	4	3	2	5	70	29	8	4	3	2	4	128	32	7	4	3	3	2
13	23	9	4	3	2	6	71	19	8	4	3	2	3	129	34	7	4	3	3	2
14	22	9	4	3	2	6	72	20	8	4	3	2	3	130	34	4	3	3	3	1
15	19	9	4	3	2	10	73	20	10	4	3	2	1	131	8	7	3	3	3	1
16	22	7	4	3	2	1	74	15	8	4	3	2	5	132	33	10	4	3	3	1
17	32	7	4	3	2	1	75	30	8	4	3	2	5	133	31	8	4	3	2	2
18	28	7	4	3	2	2	76	27	8	4	3	2	6	134	6	6	4	3	3	1
19	23	7	4	3	2	3	77	39	8	4	3	2	8	135	27	6.8	4	3	3	1
20	33	7	4	3	2	3	78	35	8	4	3	2	6	136	29	6.8	4	3	3	1
21	36	7	4	3	2	4	79	24	8	4	3	2	8	137	28	6.8	4	3	3	2
22	14	7	4	3	2	2	80	24	8	4	2	2	1	138	30	6	5	3	3	1
23	14	0	4	3	2	3	81	25	8	4	3	2	19	139	29	6	5	3	3	1
25	35	7	4	3	2	2	82	21	8	4	3	2	16	140	19	6	5	3	3	1
26	35	6.8	4	3	2	1	83	14	8	4	3	2	22	141	21	8	3	3	2	2
27	37	7	4	3	2	11	84	12	4	3	3	1	2	142	32	7	5	3	3	1
28	18	7	4	3	2	4	85	12	8	3	3	1	1	143	32	6	5	3	3	1
29	29	4	4	3	2	20	86	12	3	3	3	1	1	144	25	6.8	5	3	3	1
30	25	4	4	3	2	18	87	12	9	3	3	1	2	145	13	6.8	5	3	3	1
31	20	7	4	3	2	9	88	12	9	3	3	2	13	146	26	6.8	5	3	3	1
32	21	0	4	3	2	1	90	8	9	3	3	2	1	147	25	8	3	3	2	2
33	21	10	4	3	2	1	91	40	9	3	3	2	1	148	27	9	5	3	3	1
34	21	5	4	3	2	1	92	42	9	3	3	2	1	149	22	9	5	3	3	2
35	21	9	4	3	2	5	93	26	9	3	3	2	2	150	11	8	4	3	3	1
36	21	7	4	3	2	8	94	39	9	3	3	2	2	151	46	8	4	3	3	1
37	27	7	4	3	2	11	95	41	9	3	3	2	6	152	21	8	4	3	3	1
38	17	7	5	3	2	2	96	33	9	3	3	2	7	153	44	8	4	3	3	1
39	17	7	4	3	2	3	97	16	6.8	3	3	2	1	154	31	8	4	3	3	2
40	19	7	3	3	2	1	98	39	6.8	3	3	2	1	155	13	8	4	3	3	1
41	13	7	3	3	2	1	99	8	3	3	3	2	1	156	40	7	3	3	2	2
42	17	7	3	3	2	3	100	37	7	4	3	2	2	157	34	8	0	3	3	1
43	34	7	4	3	2	17	101	38	7	4	3	2	2	158	34	8	2	3	3	1
44	35	6	4	3	2	2	102	40	7	4	3	2	2	159	34	8	4	3	3	2
45	34	6	4	3	2	1	103	13	4	3	3	2	2	160	32	8	0	3	3	2
46	22	6	4	3	2	1	104	32	6	3	3	2	7	161	32	8	6	3	3	1
47	28	6	4	3	2	1	105	7	5	3	3	2	15	162	32	8	4	3	3	6
48	31	6	4	3	2	1	106	33	8	3	3	2	1	163	29	8	4	3	3	9
49	24	6	4	3	2	1	107	21	8	3	3	2	1	164	45	8	4	3	3	17
50	30	6	4	3	2	2	108	34	8	3	3	2	1	165	33	8	4	3	3	20
51	36	6	4	3	2	2	109	21	9	4	3	2	2	166	16	10	4	3	3	27
52	50	6	4	3	2	3	110	7	8	3	3	2	1	167	28	8	5	3	4	1
53	33	6	4	3	2	7	111	41	9	4	3	2	2	168	27	8	5	3	4	1
54	33	6	3	3	2	2	112	9	8	3	3	2	3	169	21	8	5	3	2	1
55	32	6	4	3	2	7	113	20	8	3	3	2	3	170	21	8	5	3	4	1
56	32	6	4	3	2	26	114	38	8	3	3	2	6	171	22	8	5	3	3	1
57	30	6	5	3	2	12	115	14	8	3	3	2	6	172	22	8	5	3	4	1
174	33	8	5	3	3	3	231	19	8	4	4	4	2	288	12	0	0	4	3	1
175	24	8	5	3	4	6	232	26	8	4	4	4	1	289	13	0	0	4	3	1
176	25	8	2	3	2	1	233	19	8	4	4	2	6	290	35	7	3	4	3	1
177	25	8	2	3	4	2	234	20	8	4	4	2	1	291	48	7	3	4	3	1
178	25	8	5	3	4	7	235	18	8	4	4	2	1	292	4	9	3	4	3	1
179	26	8	5	3	4	23	236	15	8	4	4	2	1	293	33	6	3	4	3	1
180	9	8	6	3	4	1	237	38	8	4	4	2	2	294	19	6	3	4	3	1
181	5	8	6	3	4	1	238	29	8	4	4	2	2	295	19	7	3	4	3	4
182	15	8	6	3	4	13	239	28	8	4	4	2	2	296	21	7	4	4	3	1
183	16	6	4	4	2	1	240	28	7.8	4	4	2	1	297	48	7	4	4	3	1

Liste 2. (Suite) Souches identifiées au cours de cette étude

Occurrenc						Occurrenc						Occurrenc								
Numéro de Profil		Profil numérique MLVA e				Occurrenc	Numéro de Profil		Profil numérique MLVA e				Occurrenc	Numéro de Profil		Profil numérique MLVA e				Occurrenc
TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR1		TR2	TR3	TR4	TR5	TR1	TR2		TR3	TR4	TR5				
184	32	6	4	4	2	1	241	27	8	4	4	2	13	298	12	7	4	4	3	1
185	14	6	4	4	2	2	242	26	8	4	4	2	32	299	34	7	4	4	3	2
186	9	6	4	4	2	1	243	14	8	4	4	2	27	300	6	7	4	4	3	4
187	48	6	4	4	2	1	244	14	12	4	4	2	7	301	19	7	4	4	3	7
188	26	6	4	4	2	1	245	28	8	4	3	4	1	302	24	7	4	4	3	6
189	19	6	4	4	2	3	246	28	5	4	3	4	1	303	16	6.8	4	4	3	1
190	25	6	4	4	2	3	247	29	8	4	3	4	1	304	28	6.8	4	4	3	1
191	27	6	4	4	2	3	248	25	9	4	3	4	1	305	13	6.8	4	4	3	1
192	22	6	4	4	2	2	249	33	9	4	3	4	1	306	14	6.8	4	4	3	1
193	22	6	6	4	2	7	250	26	8	4	3	4	4	307	31	6.8	4	4	3	1
194	20	6	4	4	2	12	251	25	8	4	3	4	10	308	44	6.8	4	4	3	1
195	24	6	4	4	2	11	252	19	9.8	4	0	4	1	309	38	6.8	4	4	3	1
196	24	9	4	4	2	6	253	19	9.8	4	2	4	1	310	35	6.8	4	4	3	2
197	14	11	4	4	2	1	254	24	9.8	4	0	4	1	311	29	6.8	4	4	3	3
198	8	11	4	4	3	1	255	28	9.8	4	4	4	3	312	26	6.8	4	4	3	4
199	18	11	4	4	2	6	256	28	9.8	4	3	4	6	313	23	5	4	4	3	5
200	18	10	4	4	2	8	257	18	8	4	4	4	15	314	10	11	4	4	3	7
201	23	6	3	4	2	2	258	28	6	4	0	4	2	315	16	9	4	4	3	1
202	23	6	4	4	2	40	259	39	6	4	0	4	1	316	24	9	4	4	3	1
203	21	7	4	4	2	2	260	37	5	4	0	4	1	317	31	9	4	4	3	1
204	33	7	4	4	2	1	261	29	6	4	0	4	8	318	30	9	4	4	3	1
205	34	7	4	4	2	1	262	29	6	4	3	4	1	319	28	9	4	4	3	1
206	9	7	4	4	2	1	263	10	6	5	0	4	1	320	25	9	4	4	3	2
207	24	7	4	4	2	1	264	11	6	5	0	4	1	321	29	9	4	4	3	3
208	11	7	4	4	2	1	265	12	6	5	0	4	4	322	28	13	4	4	3	1
209	14	7	4	4	2	1	266	13	6	4	4	4	4	323	28	4	4	4	3	1
210	15	7	4	4	2	1	267	11	6	4	4	4	3	324	19	9	4	4	3	4
211	23	7	4	4	2	2	268	30	6	4	2	4	1	325	14	9	4	4	3	7
212	22	7	4	4	2	3	269	37	6	4	2	4	1	326	13	9	4	4	3	16
213	26	7	4	4	2	5	270	36	6	4	2	4	1	327	26	9	4	4	3	19
214	25	7	4	4	2	25	271	38	6	4	2	4	1	328	34	6.8	4	0	3	11
215	12	12	4	4	2	1	272	39	6	4	2	4	1	329	34	7	4	0	3	1
216	20	8.8	4	4	2	9	273	38	6	5	2	4	1	330	34	6.8	4	4	3	8
217	19	10	4	4	2	1	274	12	6	4	4	4	32	331	36	6.8	4	0	3	3
218	17	10	4	4	2	1	275	18	7.8	4	4	4	4	332	36	6.8	4	4	3	1
219	17	9	4	4	2	3	276	16	7.8	4	4	4	3	333	36	7	4	0	3	1
220	17	6.8	4	4	2	1	277	17	7.8	4	4	4	5	334	36	0	4	0	3	1
221	17	7	4	4	2	2	278	17	6.8	4	4	4	32	335	32	6.8	4	0	3	2
222	16	7	4	4	2	5	279	18	6.8	4	4	4	1	336	35	6.8	4	0	3	1
223	16	7	3	4	2	1	280	13	6.8	4	4	4	1	337	33	6.8	4	0	3	3
224	16	9	4	4	2	3	281	19	6.8	4	4	4	3	338	30	6.8	4	0	3	8
225	16	3	4	4	2	1	282	15	6.8	4	4	4	4	339	30	6.8	4	4	3	1
226	12	7	4	4	2	15	283	14	6.8	4	4	4	22	340	30	6.8	3	0	3	1
227	13	0	4	4	2	3	284	19	9	2	4	3	1	341	29	8	4	0	3	9
228	13	11	4	4	2	1	285	19	7	2	4	3	1	342	25	7	4	4	3	27
229	13	7	2	4	2	2	286	19	8.8	0	4	3	1	343	26	7	4	4	3	16
346	15	0	6	4	3	1	403	20	10	5	4	3	3	460	37	6.8	5	4	3	1
347	23	10	6	4	3	1	404	20	10	5	3	3	1	461	34	6.8	5	4	3	1
348	16	6	6	4	3	1	405	16	10	5	4	3	1	462	15	6.8	5	4	3	2
349	16	9	6	4	3	1	406	10	10	5	4	3	1	463	23	6.8	5	4	3	2
350	24	9	6	4	3	1	407	18	10	5	4	3	5	464	18	6.8	5	4	3	2
351	22	10	6	4	3	2	408	32	6	4	4	3	4	465	12	6.8	5	4	3	4
352	22	12	6	4	3	1	409	20	6	4	4	3	1	466	17	6.8	5	4	3	4
353	17	6.8	6	4	3	1	410	32	6	5	4	3	15	467	17	6.8	5	4	4	1
354	8	6.8	6	4	3	1	411	14	9	5	4	3	1	468	35	6.8	5	4	3	5
355	10	6.8	6	4	3	1	412	4	9	5	4	3	1	469	14	6.8	5	4	3	5
356	7	6.8	6	4	3	1	413	33	9	5	4	3	1	470	26	6.8	5	4	3	5
357	18	6.8	6	4	3	2	414	35	9	5	4	3	1	471	25	6.8	5	4	3	6
358	15	6.8	6	4	3	3	415	17	9	5	4	3	1	472	22	6.8	5	4	3	6
359	20	6.8	6	4	3	3	416	19	9	5	4	3	2	473	20	6.8	5	4	3	6
360	14	6.5	6	4	3	2	417	26	9	5	4	3	2	474	24	6.8	5	4	3	11
361	14	6.8	6	4	3	7	418	21	9	6	4	3	1	475	19	6.8	5	4	3	16
362	11	6.8	6	4	3	19	419	21	9	5	4	3	1	476	21	6.8	5	4	3	18
363	11	6.8	6	4	2	1	420	24	9	5	4	3	3	477	13	6.8	5	4	3	28
364	22	11	6	4	3	13	421	27	9	5	4	3	3	478	16	6.8	5	4	3	37
365	12	6.8	6	4	3	30	422	25	9	5	4	3	4	479	44	7	5	4	3	1
366	12	6.8	6	3	3	1	423	5	9	5	4	3	4	480	15	7	5	4	3	1
367	10	7	6	4	3	3	424	16	9	5	4	3	16	481	51	7	5	4	3	1
368	24	7	6	4	3	3	425	13	8	5	4	3	1	482	52	7	5	4	3	1
369	20	7	6	4	3	3	426	6	8	5	4	3	1	483	36	7	5	4	3	1
370	18	7	6	4	3	3	427	24	8	5	4	3	2	484	46	7	5	4	3	3
371	12	7	6	4	3	3	428	11	8	5	4	3	2	485	24	7	5	4	3	2

Liste 2. (Suite) Souches identifiées au cours de cette étude

Occurrenc						Occurrenc						Occurrenc								
Numéro de Profil	Profil numérique MLVA e					Occurrenc	Numéro de Profil	Profil numérique MLVA e					Occurrenc	Numéro de Profil	Profil numérique MLVA e					Occurrenc
TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	de Profil		TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	de Profil		TR1	TR2	TR3	TR4	TR5		
346	15	0	6	4	3	1	403	20	10	5	4	3	3	460	37	6.8	5	4	3	1
347	23	10	6	4	3	1	404	20	10	5	3	3	1	461	34	6.8	5	4	3	1
348	16	6	6	4	3	1	405	16	10	5	4	3	1	462	15	6.8	5	4	3	2
349	16	9	6	4	3	1	406	10	10	5	4	3	1	463	23	6.8	5	4	3	2
350	24	9	6	4	3	1	407	18	10	5	4	3	5	464	18	6.8	5	4	3	2
351	22	10	6	4	3	2	408	32	6	4	4	3	4	465	12	6.8	5	4	3	4
352	22	12	6	4	3	1	409	20	6	4	4	3	1	466	17	6.8	5	4	3	4
353	17	6.8	6	4	3	1	410	32	6	5	4	3	15	467	17	6.8	5	4	4	1
354	8	6.8	6	4	3	1	411	14	9	5	4	3	1	468	35	6.8	5	4	3	5
355	10	6.8	6	4	3	1	412	4	9	5	4	3	1	469	14	6.8	5	4	3	5
356	7	6.8	6	4	3	1	413	33	9	5	4	3	1	470	26	6.8	5	4	3	5
357	18	6.8	6	4	3	2	414	35	9	5	4	3	1	471	25	6.8	5	4	3	6
358	15	6.8	6	4	3	3	415	17	9	5	4	3	1	472	22	6.8	5	4	3	6
359	20	6.8	6	4	3	3	416	19	9	5	4	3	2	473	20	6.8	5	4	3	6
360	14	6.5	6	4	3	2	417	26	9	5	4	3	2	474	24	6.8	5	4	3	11
361	14	6.8	6	4	3	7	418	21	9	6	4	3	1	475	19	6.8	5	4	3	16
362	11	6.8	6	4	3	19	419	21	9	5	4	3	1	476	21	6.8	5	4	3	18
363	11	6.8	6	4	2	1	420	24	9	5	4	3	3	477	13	6.8	5	4	3	28
364	22	11	6	4	3	13	421	27	9	5	4	3	3	478	16	6.8	5	4	3	37
365	12	6.8	6	4	3	30	422	25	9	5	4	3	4	479	44	7	5	4	3	1
366	12	6.8	6	3	3	1	423	5	9	5	4	3	4	480	15	7	5	4	3	1
367	10	7	6	4	3	3	424	16	9	5	4	3	16	481	51	7	5	4	3	1
368	24	7	6	4	3	3	425	13	8	5	4	3	1	482	52	7	5	4	3	1
369	20	7	6	4	3	3	426	6	8	5	4	3	1	483	36	7	5	4	3	1
370	18	7	6	4	3	3	427	24	8	5	4	3	2	484	46	7	5	4	3	3
371	12	7	6	4	3	3	428	11	8	5	4	3	2	485	24	7	5	4	3	2
372	17	7	6	4	3	3	429	23	8	5	4	3	8	486	26	7	5	4	3	5
373	16	7	6	4	3	7	430	42	8	4	4	3	1	487	16	7	5	4	3	6
374	21	7	6	4	3	9	431	5	8	4	4	3	1	488	49	7	5	4	3	28
375	19	7	6	4	3	10	432	29	8	4	4	3	2	489	17	7	5	4	3	8
376	13	6.8	6	4	3	61	433	12	8	4	4	3	1	490	47	7	5	4	3	14
377	19	0	5	4	3	1	434	12	8	6	4	3	1	491	50	7	5	4	3	14
378	19	10.8	5	4	3	1	435	27	8	6	4	3	1	492	20	7	5	4	3	16
379	19	2.8	5	4	3	1	436	18	8	4	4	3	3	493	22	7	5	4	3	21
380	19	11	5	4	3	2	437	25	8	4	4	3	5	494	21	7	5	4	3	27
381	22	11	5	4	3	1	438	5	8	5	4	3	14	495	48	7	2	4	3	2
382	10	11	5	4	3	1	439	12	8.8	5	4	3	1	496	48	7	5	4	3	52
383	19	7	5	4	3	5	440	21	8.8	5	4	3	1	497	20	7	4	4	4	1
384	19	6	5	4	3	11	441	13	8.8	5	4	3	1	498	20	7.8	4	4	4	1
385	8	6.8	5	4	3	1	442	22	8.8	5	4	3	1	499	20	12	5	4	4	1
386	8	8	5	4	3	1	443	11	8.8	5	4	3	1	500	20	9.8	5	4	4	1
387	8	5	5	4	3	2	444	16	8.8	5	4	3	2	501	17	7	5	4	4	6
388	9	5	5	4	3	3	445	24	8.8	5	4	3	2	502	43	7	5	4	4	1
389	13	4.8	5	4	3	1	446	18	8.8	5	4	3	4	503	30	8.8	5	4	4	7
390	17	4.8	5	4	3	1	447	27	8.8	5	4	3	4	504	23	7	5	4	2	1
391	17	7.8	5	4	3	1	448	20	8.8	5	4	3	8	505	20	7	5	4	2	1
392	49	2	5	4	3	1	449	10	8.8	5	4	3	19	506	22	7	5	4	2	2
393	16	2	5	4	3	1	450	17	8.8	5	4	3	37	507	17	7	5	4	2	2
394	14	6.5	5	4	3	1	451	19	8.8	5	4	3	57	508	13	6.8	5	4	2	1
395	14	8.8	5	4	3	1	452	27	7	4	4	3	5	509	13	8	5	4	2	1
396	14	4.8	5	4	3	2	453	27	6.8	5	4	3	14	510	25	6.8	5	4	2	1
397	30	6	5	4	3	2	454	38	6.8	3	4	3	3	511	21	7	5	4	2	7
398	23	6	5	4	3	1	455	40	6.8	3	4	3	1	512	9	7	5	4	3	13
399	14	6	5	4	3	3	456	39	6.8	3	4	3	7	513	10	7	5	4	3	12
400	9	6	5	4	3	5	457	42	6.8	3	2	4	2	514	11	7	5	4	3	62
401	18	10.8	5	4	3	4	458	10	8.8	3	2	4	1							
402	18	7	5	4	3	8	459	33	6.8	5	4	3	1							

Annexe 2. Projets

* Projet européen: **WildWine** 315065, FP7-SME-2012

Multi-strain indigenous Yeast and Bacterial starters for 'Wild-ferment' Wine production

* Projet national: **LevainsBio**, CASDAR AAP-2012 n°1220

Améliorer la qualité des vins et des cidres biologiques obtenus par l'utilisation des levures et bactéries indigènes

Annexe 3. Echantillons analysés lors de cette étude

1. Aquitaine

Echantillon	Stade	population UFC/mL	Exploitation	Appellation	Cépage
AQ 1	mi malo	2.8E+07	Segue Longue	Medoc	Merlot
AQ 2	mi malo	9.6E+04	Segue Longue Monnier	Medoc	Petit Verdot
AQ 3	début	1.3E+04	des Annereaux	Lalande de pomerol	Merlot
AQ 4	début	4.7E+03	Annereaux	Lalande de pomerol	Merlot
AQ 5	début		Beauregard	Pomerol	Merlot
AQ 6		1.9E+07	La croix de Roche	Fronsac	Melot/Carménère
AQ 7	malo en cours	4.9E+07	La croix de Roche	Fronsac	Malbec
AQ 8	malo		La croix Peyreyre	côtes de Castillon	Merlot
AQ 9	fin malo	4.1E+06	De Piote	Bordeaux	Merlot
AQ 10	fin malo	6.9E+06	De Piote	Bordeaux	Merlot
AQ 11	malo en cours	5.8E+06	De Piote	Bordeaux	Malbec
AQ 12	fin malo	9.6E+06	De Piote	Bordeaux	Cabernet sauvignon
AQ 13	malo en cours	2.3E+07	De Bourdieu	Bordeaux	Merlot
AQ 14	malo en cours	3.6E+07	De Bourdieu	Bordeaux	Cabernet sauvignon
AQ 15	fin malo	1.7E+07	Belle vue	Lussac St.Emilion	Merlot
AQ 16	fin malo	1.4E+06	Bichon Cassignols	Graves	Merlot
AQ 17		3.37E+07	Lavergne Dulong	Bordeaux	
AQ 18		1.77E+04	Lavergne Dulong	Bordeaux	
AQ 19		1.53E+06	Lavergne Dulong	Bordeaux	
AQ 20		6.70E+07	Lycée Montagne	Libourne	
AQ 21	FML en cours	1.23E+04	Baulos - Charmes	Pessac Léognan	
AQ 22	FML en cours	1.19E+06	Baulos - Charmes	Pessac Léognan	
AQ 23	FML en cours	1.50E+07	Baulos - Charmes	Pessac Léognan	
AQ 24	FML en cours	1.06E+07	Baulos - Charmes	Pessac Léognan	
AQ 25	FML en cours	1.67E+07	Baulos - Charmes	Pessac Léognan	
AQ 26	FML en cours	1.46E+07	Micalet	Haut Medoc	
AQ 27	FML en cours	3.34E+06	Dillon	Haut Medoc	
AQ 28	FML en cours	1.05E+07	Dillon	Haut Medoc	
AQ 29	FML en cours	2.10E+08	Dillon	Haut Medoc	
AQ 30	FML en cours	2.68E+07	Closeries des Moussis	Haut Medoc	
AQ 31	Lies	2.60E+08	Closeries des Moussis	Haut Medoc	
AQ 32	FML finie	2.32E+07	Laroque	Bergerac	Cabernet Franc
AQ 33	FML finie	1.38E+06	Laroque	Bergerac	Cabernet sauvignon
AQ 34	FML finie	8.00E+06	Richard	Bergerac	Merlot + presses
AQ 35	FML finie		Richard	Bergerac	CF + M
AQ 36	FML finie	1.71E+07	Brandeau	côtes de Castillon	Merlot
AQ 37	FML finie	1.83E+07	Brandeau	côtes de Castillon	Cabernet Franc
AQ 38	FML finie	2.27E+07	Brandeau	côtes de Castillon	Presses
AQ 39	FML en cours	2.86E+07	Beynat	côtes de Castillon	Merlot
AQ 40		2.80E+07	De l'ancienne cure	Bergerac	Merlot
AQ 41		1.23E+07	De l'ancienne cure	Bergerac	Merlot
AQ 42		1.28E+06	Grinou	Bergerac	
AQ 43		2.76E+07	Grinou	Bergerac	
AQ 44		1.87E+07	Tuquet	Bergerac	Merlot
AQ 45		2.51E+07	Tuquet	Bergerac	Merlot
AQ 46		3.07E+07	Tuquet	Bergerac	Cabernet Franc
AQ 47		4.70E+02	d'Esther	Bordeaux, St.Loubès	Merlot vieux
AQ 48		3.92E+03	d'Esther	Bordeaux, St.Loubès	Merlot jeune
AQ 49	Lies	2.74E+07	Bichon Cassignols?	St . Emilion	Merlot
AQ 50	Vin 136	1.00E+08	Rioublanc	Bordeaux	
AQ 51	Lies 136	8.80E+07	Rioublanc	Bordeaux	
AQ 52	vin t0 + Lies	8.90E+07	Rioublanc	Bordeaux	
AQ 53	c6 FML en cours	1.17E+07	Tour Haut Labalette	côtes de Castillon	Merlot
AQ 54	c3 FML en cours	2.06E+07	Tour Haut Labalette	côtes de Castillon	M + CF + CS
AQ 55	c12 FML en cours	3.23E+07	Trapaud	St. Emilion GC (castillon)	Merlot
AQ 56	fin malo	2.80E+07	Belle vue	Lussac St.Emilion	
AQ 57		6.86E+07	Moulin de Peyronin	pujol, Est st.emilion	Cabernet
AQ 58		1.93E+07	Moulin de Peyronin	pujol, Est st.emilion	Malbec
AQ 59		2.55E+08	Micalet	Haut Medoc	
AQ 60		4.45E+07			
AQ 61		2.08E+08			
AQ 62		6.70E+07	d'Arcole	St.Emilion	CS
AQ 63		2.07E+07	d'Arcole		Merlot
AQ 64		1.10E+08	Trapaud	St. Emilion GC (castillon)	CF
AQ 65		7.70E+05	La Mesteyrie de		
M3		2.21E+07	Monconseil	Blaye - côtes de Bordeaux	Merlot
M2	post FA	6.50E+04	Belle vue	Lussac St.Emilion	
Lies 1	post FML	2.40E+08	Moulin de Lagnet	St. Emilion	
Lies 2	post FML	1.19E+08	Château Dillon		
			Château Dillon		

Annexe 3. Echantillons analysés lors de cette étude

2. Bourgogne

Echantillon	Type de vin	stade	population UFC/mL	Exploitation	Appellation	Cépage
B1	Rouge	mi FML	2.90E+04	Lyc. Viti Beaune	côte de beaune	
B2	Rouge	mi FML	4.00E+07	Lyc. Viti Beaune	côte de beaune	
B3	Rouge	début FML	3.82E+05	Lyc. Viti Beaune	côte de beaune	
B4	Rouge	début FML	110	Lyc. Viti Beaune	côte de beaune	
B5	Rouge	Fin FML	1.50E+06	Lyc. Viti Beaune	côte de beaune	
B6	Blanc	FML	6.40E+04	Christophe Buisson	côte de beaune	Chardonnay
B7	Rouge	FML	1.72E+05	Christophe Buisson	côte de beaune	Pinot Noir
B8	Blanc	FML	8.30E+04	Christophe Buisson	côte de beaune	Chardonnay
B9	Rouge	FML	3.60E+06	Christophe Buisson	côte de beaune	Pinot Noir
B10	Blanc	FML	2.00E+05	Anne Claude Leflaive	côte de beaune	Chardonnay
B11	Blanc	FML	6.20E+04	Anne Claude Leflaive	côte de beaune	Chardonnay
B12	Blanc	FML	1.62E+06	Anne Claude Leflaive	côte de beaune	Chardonnay
B13	Blanc	FML	1.90E+04	Anne Claude Leflaive	côte de beaune	Chardonnay
B16	Blanc	FML	1.28E+03	Goisot		Chardonnay
B17	Blanc	FML	3.90E+03	Goisot		Chardonnay
B18	Rouge	FML	3.32E+07	IFV Beaune		Pinot Noir
B19	Rouge	FML	1.46E+07	IFV Beaune		Pinot Noir
B20	Rouge	FML	1.27E+03	IFV Beaune		Pinot Noir
B21	Rouge	FML	1.40E+02	IFV Beaune		Pinot Noir
B22	Rouge	FML	5.70E+06	IFV Beaune		Pinot Noir
B23	Rouge	FML	5.70E+06	IFV Beaune		Pinot Noir
B24	Blanc	FML	2.70E+03	IFV Beaune		Chardonnay
B25	Blanc	FML	2.60E+03	IFV Beaune		Chardonnay
B26	Blanc	FML	1.92E+07	IFV Beaune		Chardonnay
B27	Blanc	FML	3.04E+07	IFV Beaune		Chardonnay
B28	Blanc	FML	4.27E+07	IFV Beaune		Chardonnay
B29	Blanc	FML	6.20E+07	IFV Beaune		Chardonnay
B30	Blanc	FML	1.87E+06	IFV Beaune		Chardonnay
B31	Blanc	FML	1.53E+06	IFV Beaune		Chardonnay
B32	Blanc	FML	8.40E+05	IFV Beaune		Chardonnay
B33	Blanc	FML	1.88E+06	IFV Beaune		Chardonnay
B34	Blanc	FML	1.06E+06	IFV Beaune		Chardonnay
B35	Blanc	FML	7.60E+05	IFV Beaune		Chardonnay
B36	Blanc	FML	1.72E+06	IFV Beaune		Chardonnay
B37	Blanc	FML	1.07E+06	IFV Beaune		Chardonnay
B38	Blanc	FML	7.86E+06	IFV Beaune		Chardonnay
B39	Blanc	FML	1.17E+07	IFV Beaune		Chardonnay
B40	Blanc	FML	1.30E+07	IFV Beaune		Chardonnay
B41	Blanc	FML	1.07E+07	IFV Beaune		Chardonnay
B45	Blanc	FML	7.90E+02	BPF		Chardonnay
B51	Rouge	FML	1.01E+06	BPF		Pinot Noir
B52	Rouge	FML	9.50E+06	BPF		Pinot Noir
B53	Rouge	FML	6.50E+05	BPF		Pinot Noir
B54	Rouge	FML	2.30E+06	BPF		Pinot Noir
B55	Rouge	FML	1.81E+05	Latour		Pinot Noir
B56	Rouge	FML	6.70E+06			Pinot Noir
B59	Rouge	FML	3.60E+02	Muzard Hervé		Pinot Noir
B60	Rouge	FML	2.00E+02	Muzard Hervé		Pinot Noir
B61	Rouge	FML	1.90E+02	Muzard Hervé		Pinot Noir
B62	Rouge	FML	5.70E+04	Chevrot		Pinot Noir
B63	Rouge	FML	1.12E+05	Chevrot		Pinot Noir
B64	Rouge	FML	1.00E+04	Chevrot		Pinot Noir
B65	Rouge	FML	6.70E+04	Chevrot		Pinot Noir
B66	Rouge	FML	3.60E+02	Chevrot		Pinot Noir
B67	Rouge	FML	6.10E+05	de la Monette		Pinot Noir
B68	Rouge	FML	8.22E+05	de la Monette		Pinot Noir
B69	Rouge	FML	5.20E+05	de la Monette		Pinot Noir
B70	Rouge	FML	3.10E+05	de la Monette		Pinot Noir
B76	Rouge	FML	1.30E+04	Chapelle		Pinot Noir

Annexe 3. Echantillons analysés lors de cette étude

3. Languedoc-Roussillon

Echantillon	Stade	population UFC/mL	Exploitation	Appellation	Cépage
LR13	mi malo	2.8E+07	Abbaye Sylva Plana	Hérault	Cinsault
LR 28		3.2E+07	Abbaye Sylva Plana	Hérault	Syrah
LR 29		4.2E+07	Abbaye Sylva Plana	Hérault	Syrah
LR 30		5.3E+07	Do. Bassac	Hérault	
LR 37	FML en cours E6	1.11E+07	Do. Bassac	Hérault	Syrah
LR 38	lies P10	2.21E+08	Do. Bassac	Hérault	
LR 39	cuve T0	2.17E+06	Do. Bassac	Hérault	CF
LR 46	Lies E9	1.67E7	Do. Bassac	Hérault	
LR3	FML en cours	2E+07	Do. Cazes	Rivesaltes	
LR4	lies	2E+08	Do. Cazes	Rivesaltes	Cabernet
LR5		1E+06	Do. Cazes	Rivesaltes	Merlot
LR6	FML en cours	1.6E+07	Do. Cazes	Rivesaltes	Merlot
LR16	malo en cours	2.8E+07	Do. Cazes	Rivesaltes	Merlot
LR 35	malo en cours	7.6E+06	Do. Costeplane	Gard	Syrah
LR 41		1,56E7	Do. Costeplane	Gard	Syrah
LR 45		1,22E6	Do. Costeplane	Gard	Grenach
LR11	mi malo	2.7E+07	Do. De La Prose	Hérault	Cinsault
LR12	début malo	1.6E+06	Do. De La Prose	Hérault	Syrah
LR22		8.6E+07	Do. De La Prose	Hérault	Syrah
LR 40		3,82E6	Do. De La Prose	Hérault	Mourvèdre
LR 47		8,6E6	Do. De La Triballe	Hérault	Syrah
LR21		3.8E+06	Do. Des Carabiniers	Côtes du Rhone	Syrah
LR7	fin malo	3E+07	Do. Madagascar	Costières de Nimes	
LR17	début malo	1.3E+07	Do. Pastouret	Costières de Nimes	Grenache
LR18	début malo	1.2E+07	Do. Pastouret	Costières de Nimes	Grenache
LR19	mi malo	8.8E+07	Do. Pastouret	Costières de Nimes	Grenache
LR20	début malo	4.3E+06	Do. Pastouret	Costières de Nimes	Grenache
LR 33		1.5E+07	Ricardelle de Lautrec	Aude	Pinot
LR 34		1.3E+07	Ricardelle de Lautrec	Aude	Caladoc
LR 42		1,31E7	Ricardelle de Lautrec	Aude	CS
LR24	fin malo	9.0E+07	Do. Tavernel	VDP Gard	
LR25	début malo	6.6E+06	Do. Tavernel	VDP Gard	
LR 31		2.7E+07	Lyc. viti d'Orange	Côtes du Rhone	Grenache
LR 32		1.8E+07	Lyc. viti d'Orange	Côtes du Rhone	Grenache
LR 43		4,03E6	Lyc. viti d'Orange	Côtes du Rhone	
LR 44		1,21E6	Lyc. viti d'Orange	Côtes du Rhone	

Annexe 3. Echantillons analysés lors de cette étude

4. Val de Loire

Echantillon	Type de vin	Stade	population UFC/mL	Exploitation	Appellation	Cépage
13 VL 1	Rouge	fin FML	5.70E+07	Domaine Regnier-David	saumur	Cabernet Franc
13 VL 2	Rouge	FML finie	2.40E+06	Domaine Regnier-David	saumur	Cabernet Franc
13 VL 3	Rouge	FML en cours	1.07E+07	Domaine Regnier-David	saumur	Cabernet Franc
13 VL 4	Blanc	FML en cours	1.03E+07	Landron	Muscadet	Melon de Bourgogne
13 VL 5	Blanc	FML en cours	2.51E+06	Landron	Muscadet	Melon de Bourgogne
13 VL 8	Rouge		2.26E+07	de la Paonnerie	côteaux de la loire	Gamay
13 VL 10	Rouge		1.52E+06	De l'Enchantoir	saumur	Cabernet Franc
13 VL 12	Rouge	FML	1.60E+07			

5. Bretagne

Echantillon	population UFC/mL	Producteur	Localisation
14BZ1	1.70E+07	Cidrerie des Terroires	Colpo (56)
14BZ2	9.90E+06	Cidrerie des Terroires	Colpo (56)
14BZ4	7.40E+04	Barbé	Merdrignac (22)
14BZ7	8.70E+06	Nicol	Surzur (56)
14BZ8	1.30E+07	Nicol	Surzur (56)
14BZ9	7.30E+05	Solion	Gouesnac'h (29)
14BZ10	6.70E+06	Solion	Gouesnac'h (29)
14BZ11	8.30E+06	Gelée de cidre	Saint Gravé (56)
14BZ12	6.10E+06	Gelée de cidre	Saint Gravé (56)

6. Liban

Echantillon	Cave	Région	UFC/mL	pH	% EtOH
1	St.Thomas	Tanaïl	2*10E8	3.7	13.9
2	St.Thomas	Tanaïl + Kab Elias	4*10E5	3.9	14.6
5	Kefraya	Kefraya	8*10E4		
17	Adyar	Chouf, Rechmaya	5*10E5	3.72	13.7
25	Adyar	Presse 3 régions	4*10E5	3.61	14.3
26	Ixsir	Mechairfe	3*10E7	3.78	15.2
28	Ixsir	Kab Elias	6*10E6	3.64	15.3
29	Ixsir	Btedaai	2*10E7	3.85	15
31	Ksara	Kanafar	4*10E4	3.42	13.90
33	Ksara	Presses	5*10E5	3.41	12.84
34	Ksara	Wardy	8*10E4	3.61	13
36	Ksara	Tal Dnoub	4*10E5	3.64	14.22
38	Ksara	Tal el Deir	3*10E5	3.22	13.47
39	Ksara	Mansoura	7*10E6	3.22	13
40	Ksara	Mansoura	7*10E5	3.19	13.52
43	Ksara	Kefraya	8*10E6	3.31	13.50
45	Ksara	Wardy	2*10E5	3.51	13.72
49	De Baal	Dhour Zahlé	4*10E6		
54	Ixsir	Ainata	4*10E6		
58	Coteaux de Botrys	Eddé	1*10E6	3.2	
60	Coteaux de Botrys	Eddé village	1*10E6	3.2	
61	Khoury	Dhour Zahlé	2*10E5	3.36	16.6
62	Khoury	Dhour Zahlé	1*10E7	3.3	14.4
65	Khoury	Dhour Zahlé	1*10E6	3.38	15.2
66	Khoury	Dhour Zahlé	8*10E6	3.35	14.6
67	Atibaïa	Batroun (Eddé)	3*10E7		
4	Kefraya	Kefraya	70		
6	Kefraya	Kefraya	40		
8	Kefraya	Kefraya	4*10E3		
18	Adyar	Chouf	2*10E2	3.74	13.9
55	Botrys	Jran	3*10E4	3.2	12.5-13
64	Khoury	Dhour Z	60	3.34	15.6

Annexe 4. Nombre total de souches et souches uniques par exploitation

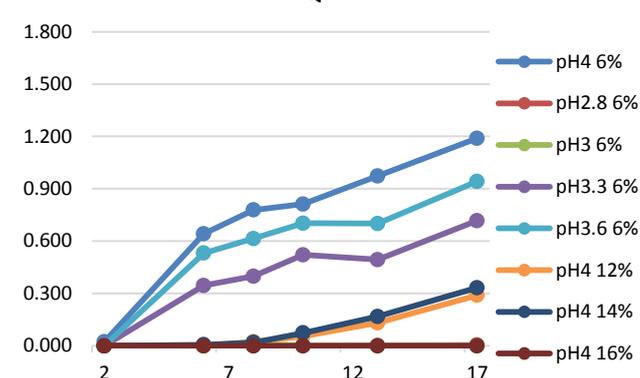
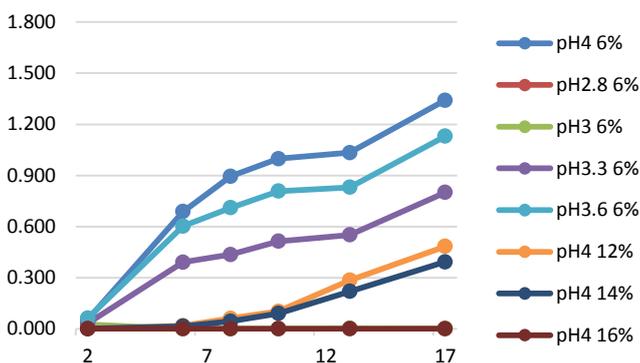
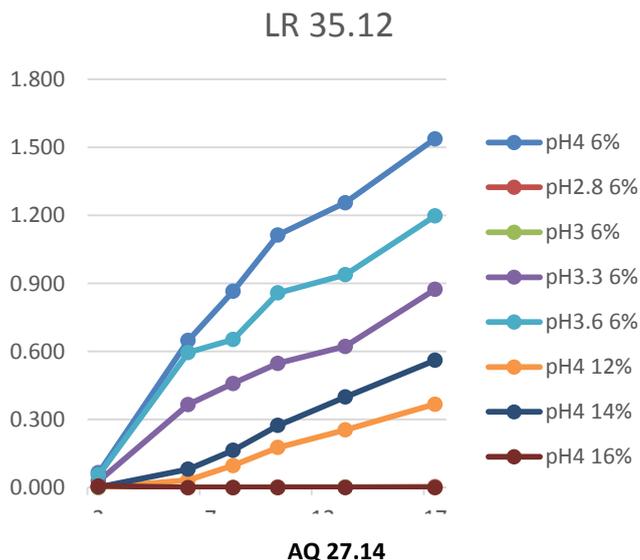
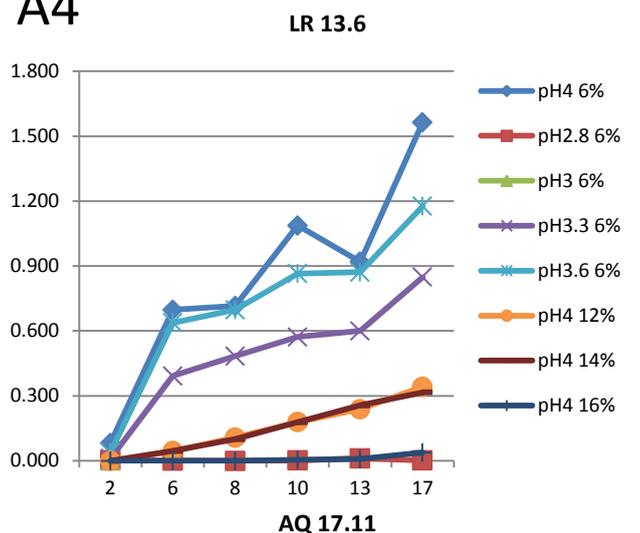
Région	Exploitation	Souches identifiées	Souches uniques	% souches uniques
Aquitaine	Fonplegade	2	2	100.0
	Tour Haut Labalette	9	9	100.0
	La Mesteyrie de Monconseil	4	3	75.0
	Laroque	16	12	75.0
	Tuquet	8	6	75.0
	Baulos - Charmes	15	10	66.7
	Richard	20	13	65.0
	Bellevue	31	20	64.5
	Brandeau	7	4	57.1
	des Annereaux	7	4	57.1
	Du Bourdieu	33	18	54.5
	Dillon	17	9	52.9
	Beynat	4	2	50.0
	Closeries des Moussis	8	4	50.0
	d'Arcole	4	2	50.0
	De l'ancienne cure	8	4	50.0
	Bichon Cassagnol	30	14	46.7
	Lycée Montagne	9	4	44.4
	Rioublanc	12	5	41.7
	Grinou	5	2	40.0
	De Piote	11	4	36.4
	d'Esther	6	2	33.3
	Moulin de Lagnet	3	1	33.3
Trapaud	3	1	33.3	
Lavergne Dulong	18	5	27.8	
Micalet	4	1	25.0	
Segue Longue Monnier	5	1	20.0	
Moulin de Peyronin	7	1	14.3	
IFV	1	0	0.0	
Bourgogne	Chevrot	10	10	100.0
	La croix de Roche	7	7	100.0
	Latour	5	5	100.0
	de la Monette	12	10	83.3
	Lycée viticole de Beaune	16	13	81.3
	IFV Beaune	45	36	80.0
	Jean Hugues Goissot	5	4	80.0
	Christophe Buisson	7	5	71.4
	BPF	26	17	65.4
	Chapelle Jean François	18	11	61.1
	Anne Claude Leflaive	9	5	55.6
	Muzard Hervé	9	4	44.4
	Languedoc Roussillon	Cazes	6	6
Lycée viticole d'Orange		10	10	100.0
Pastouret		14	13	92.9
Abbaye Sylva Plana		9	8	88.9
Des Carabiniers		26	23	88.5
De La Prose		17	14	82.4
De La Triballe		8	6	75.0
Costeplane		10	7	70.0
Bassac		22	15	68.2
Madagascar		5	3	60.0
Ricardelle de Lautrec	10	6	60.0	
Tavernel	17	9	52.9	
Val de Loire	De l'Enchantoir	2	2	100.0
	Regnier-David	13	12	92.3
	La Sénéchalière	7	6	85.7
	de la Paonnerie	3	1	33.3
	de la Paonnerie	1	0	0.0
Bretagne	Barbe	1	1	100.0
	Solion	12	12	100.0
	Cidrierie des terroirs	6	5	83.3
	Gelée de cidre	5	2	40.0
	Nicol	5	2	40.0
Liban	Adyar	4	4	100.0
	Ksara	21	19	90.5
	Kefraya	13	11	84.6
	St.Thomas	5	4	80.0
	Khoury	10	5	50.0
	Ixsir	7	3	42.9
	Atibaïa	3	1	33.3
	Botrys	2	0	0.0
De Baal	1	0	0.0	

Annexe 5. Liste des 40 SNP et position sur le génome de PSU_1

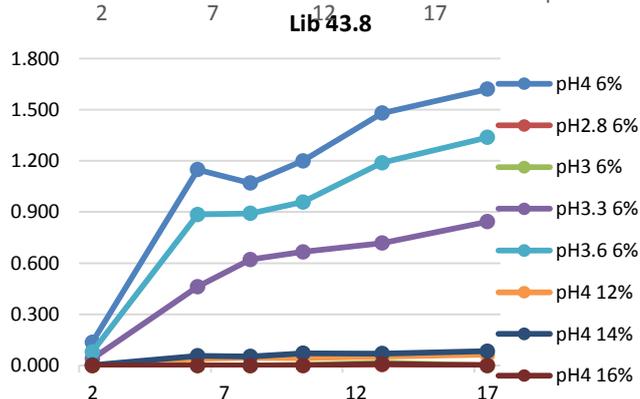
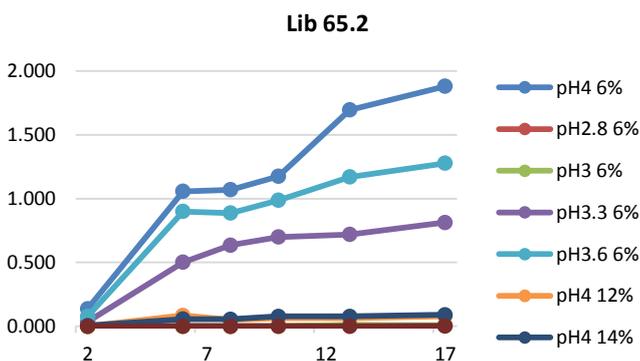
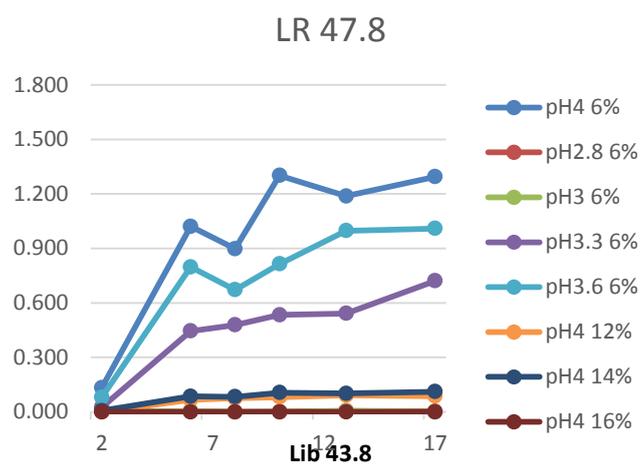
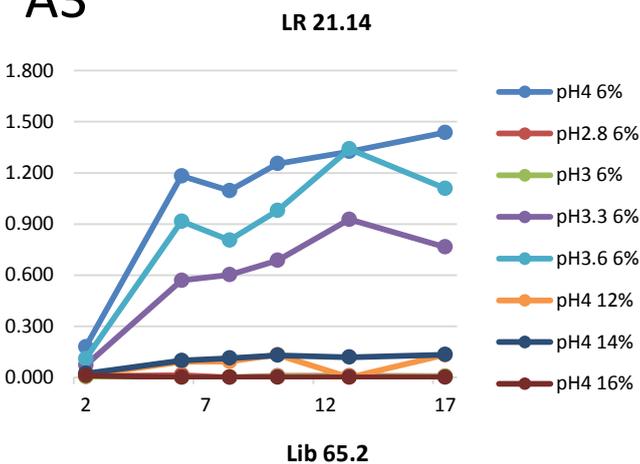
	Groupe phylogénétique	Position	Gène chez PSU-1	Nature du SNP	Annotation RAST
1	A	100	OEOE_0566	NS	Thioredoxin reductase
2	A	1092	OEOE_1783	S	Serine kinase of the HPr protein, regulates carbohydrate metabolism
3	A	106	OEOE_0552	NS	HP
4	A	109	OEOE_0683	NS	FOF1 ATP synthase subunit alpha
5	A1	2565	OEOE_0309	S	ATP-dependent nuclease, subunit A
6	A1	212	OEOE_1069	NS	Adenine phosphoribosyltransferase
7	A1	910	OEOE_0190	NS	Lysyl-tRNA synthetase (class II)
8	A1	29	OEOE_0724	NS	erreur detection gène RAST. STOP au niveau de l'amorce
9	A1	542	OEOE_1144	NS	Cell division protein FtsA
10	A2	1382	OEOE_1043	NS	Beta-galactosidase
11	A2	218	OEOE_1043	NS	Beta-galactosidase
12	A2	1722	OEOE_1043	S	Beta-galactosidase
13	A2	1579	OEOE_1043	NS	Beta-galactosidase
14	A3	792	OEOE_1157	S	6-phosphogluconolactonase
15	A3	156	OEOE_0697	S	Alkaline phosphodiesterase
16	A3	112	OEOE_0551	NS	Alkanesulfonates ABC transporter ATP-binding protein / Sulfonate ABC transporter, ATP-binding subunit SsuB
17	A3	818	OEOE_1701	NS	X
18	A3	1681	OEOE_0995	S	DNA primase
19	A4	394	OEOE_1757	NS	Serine acetyltransferase
20	A4	1270	OEOE_0426	NS	ATP-dependent DNA helicase UvrD/PcrA
21	A4	374	OEOE_1038	NS	Choloylglycine hydrolase
22	A5	101	OEOE_0970	NS	SOS-response repressor and protease LexA
23	A5	106	OEOE_1330	NS	Alcohol dehydrogenase
24	A6	102	OEOE_0734	S	ABC transporter permease component
25	A6	1001	OEOE_0527	NS	Alcohol dehydrogenase
26	B	114	OEOE_1854	S	Transcriptional regulator, MarR family
27	B	1122	OEOE_0136	S	permease of the major facilitator superfamily
28	B	114	OEOE_1593	S	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, KASIII
29	B	105	OEOE_0328	S	Acetoin dehydrogenase E1 component alpha-subunit
30	B	1053	OEOE_1585	S	Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase
31	B	105	OEOE_1856	S	hypothetical protein
32	B1	492	OEOE_1174	S	3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase
33	B1	236	OEOE_0199	NS	X
34	B1	452	OEOE_0268	NS	ABC transporter permease protein
35	B1	211	OEOE_1181	NS	nudix/MutT family protein, putative
36	B1	587	OEOE_0700	NS	Alpha/beta hydrolase fold
37	B3	1393	OEOE_0423	NS	Citrate lyase alpha chain
38	B3	410	OEOE_0429	NS	FIG000325: clustered with transcription termination protein NusA
39	B3	1467	OEOE_0415	S	Transport ATP-binding protein CydD
40	B3	433	OEOE_0299	NS	permease of the major facilitator superfamily

Annexe 6. Suivie de DO des test phénotypiques.

A4



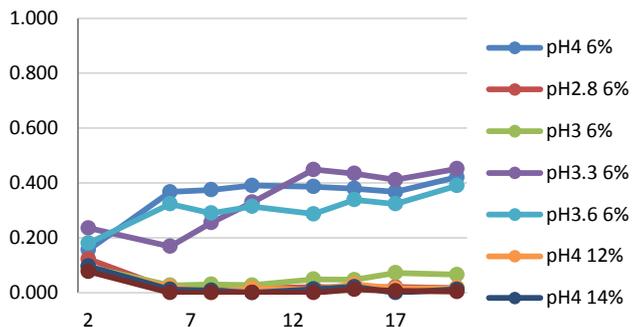
A3



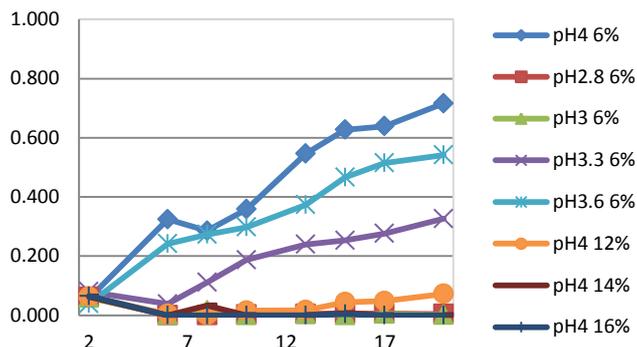
Annexe 6. (Suite) Suivre de DO des test phénotypiques.

A5

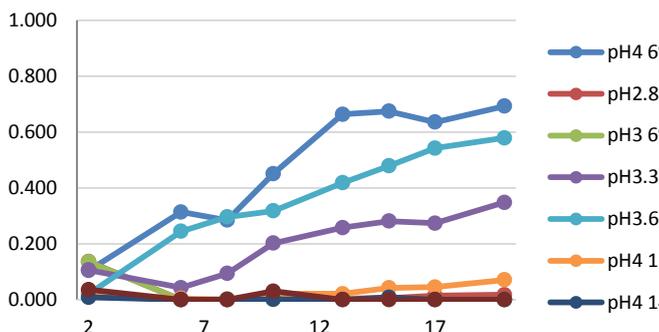
B 45.10



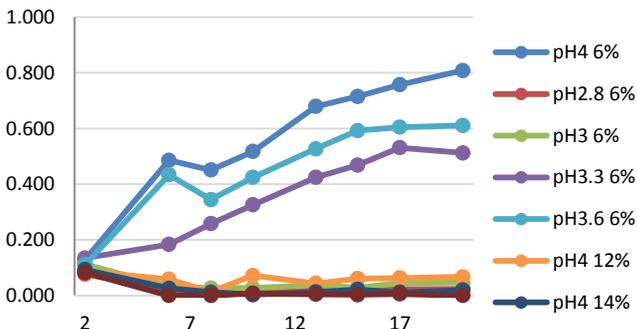
B 10.1



B 10.12

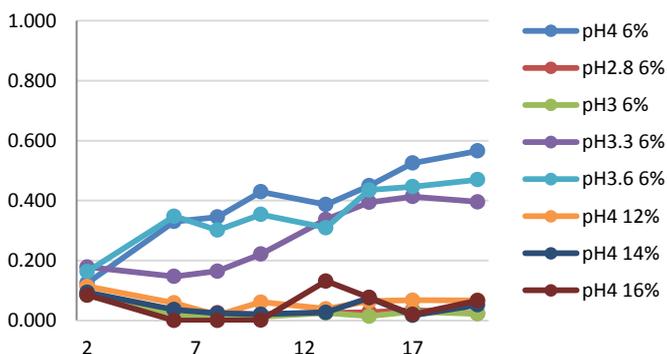


B 11.15

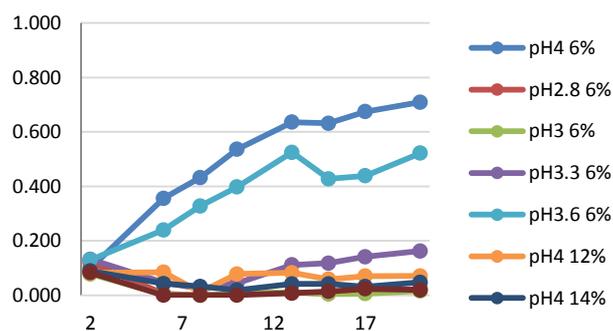


A2-8

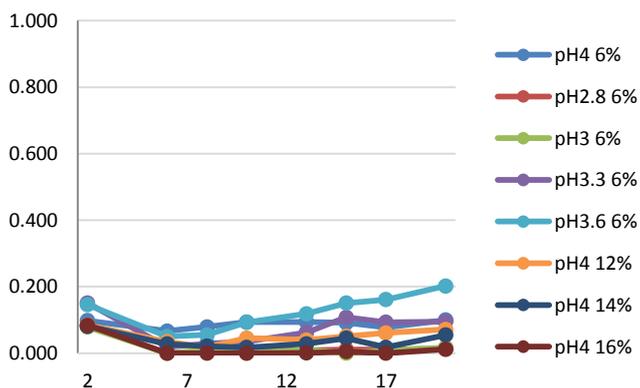
B 53.10



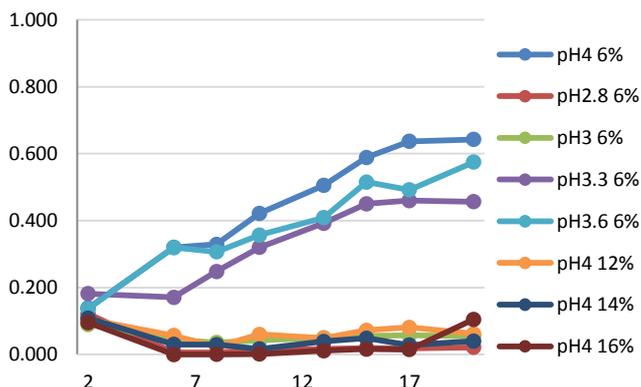
B 61.14



B 63.6

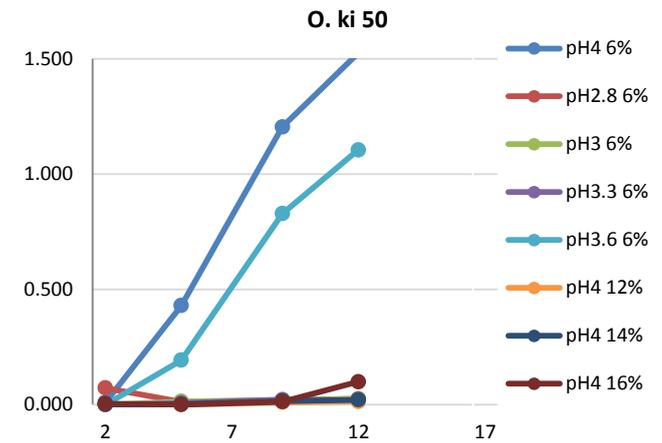
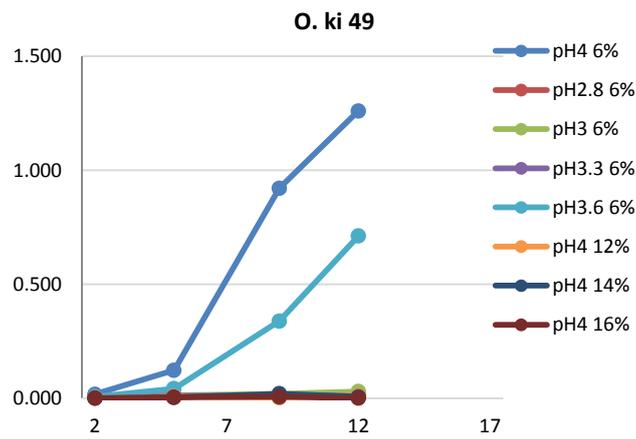
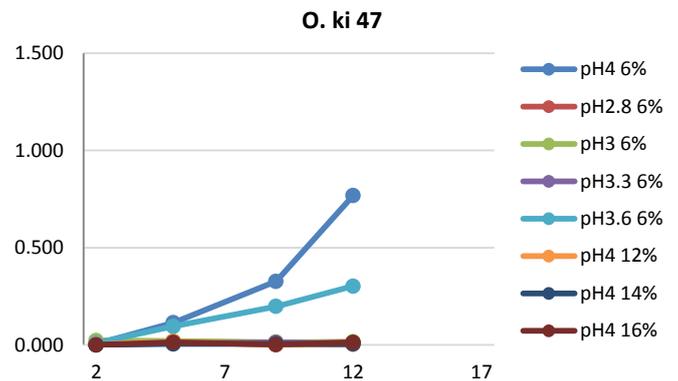
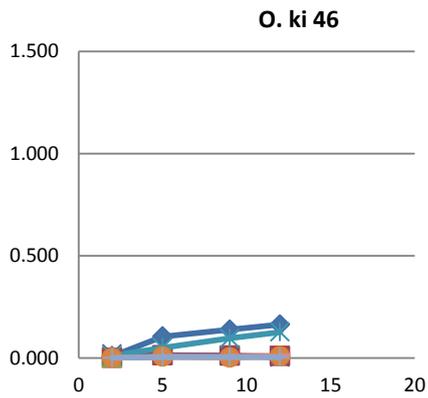


B 70.13

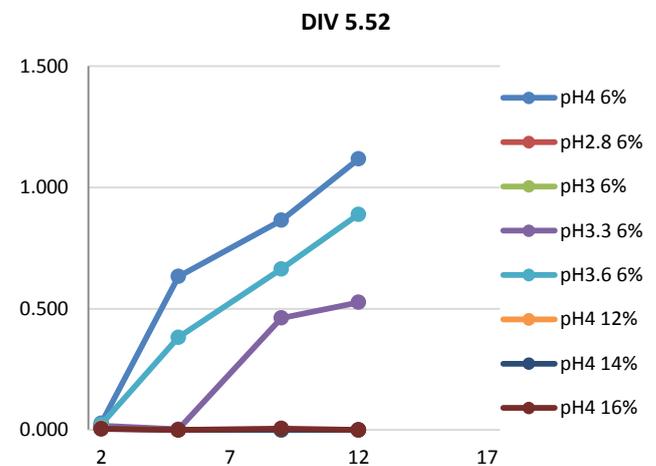
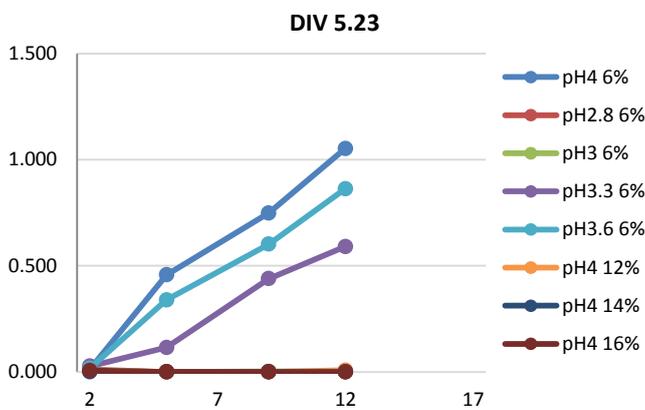


Annexe 6. (Suite) Suivre de DO des test phénotypiques.

O. kitaharae



Cidre



Annexe 7. Liste des amorces utilisées pour le génotypage par analyse de SNP.

TERM	SNP_ID	2nd-PCR	1st-PCR	AMP_LEN	UP_CONF	MP_CONF	Tm	PcGC	PWARN	UEP_DIR	UEP_MASS
iPLEX	A1oeoe_0413_212	ACGTTGGATGTGGTTTCGCTGGTGGATCAC	ACGTTGGATGGTTTTCCGATTTTCGCTGCC	94	99.9	70.7	46.0	60.0	d	F	4553.0
iPLEX	A2oeoe0450_200	ACGTTGGATGAGTGTATAAAGCGGCATCG	ACGTTGGATGTACACGGCATCGCAATCATC	109	98.2	70.7	55.0	73.3	D	R	4665.0
iPLEX	A3oeoe_0425_112	ACGTTGGATGAGCAAGGTGCTTTTCTCC	ACGTTGGATGTGGCAATCATCTGATCTTGG	119	97.1	70.7	47.8	56.2	D	R	5057.3
iPLEX	A3oeoe_0529_139	ACGTTGGATGGGCTCTTGAATCTGCTGCTT	ACGTTGGATGGCACTTCTTGAAGGGCAGT	119	96.1	70.7	46.8	41.2	ds	R	5120.4
iPLEX	A3oeoe_0433_150	ACGTTGGATGGGTGTTTTAGCTCTTTGCC	ACGTTGGATGAGCGAACCAAGGCTTCTCG	109	98.2	70.7	46.2	53.3	D	F	5217.4
iPLEX	A5oeoe_0326_101	ACGTTGGATGATCGATAGCCCATGAACGG	ACGTTGGATGAAGTTACCTCCCAACAGTC	100	100.0	70.7	49.4	56.2	D	F	5244.4
iPLEX	Boeoe_0402_105	ACGTTGGATGGCTCAAGATGATGCTTTCC	ACGTTGGATGCCTTAAATCAGCACGTTCC	111	98.1	70.7	46.1	47.1	D	F	5265.4
iPLEX	Boeoe_0340_216	ACGTTGGATGGGATTTTTATGGATCGTGG	ACGTTGGATGACACGGCCATCCAAAGAAC	100	98.6	70.7	47.7	50.0	ds	F	5616.6
iPLEX	A4oeoe_0344_196	ACGTTGGATGCCATTTTTGCGTACTTGCC	ACGTTGGATGTGCGTATCCTCACATTGCC	111	98.1	70.7	46.9	36.8	R	R	5777.8
iPLEX	A5oeoe_0420_106	ACGTTGGATGCGCATTTCTGGGGAATCT	ACGTTGGATGGGTTATGCTTATGAAACCTG	107	91.8	70.7	46.0	42.1	D	R	5802.8
iPLEX	A2oeoe0450_176	ACGTTGGATGCGATGTTCTGAAATTTGGG	ACGTTGGATGATTGCCAATTCGATGGCACC	94	98.4	70.7	48.0	44.4	F	F	5900.9
iPLEX	Boeoe_0456_151	ACGTTGGATGGGACATCCCAATGGAAATG	ACGTTGGATGGAACTCAACTCCGAAGATCCG	102	100.0	70.7	47.2	35.0	D	R	6073.0
iPLEX	B1oeoe_0360_186	ACGTTGGATGCTTCCGAGTGTGTTTTCGG	ACGTTGGATGCTTCCAAACCAATTCGATG	97	94.3	70.7	46.0	35.0	d	F	6207.1
iPLEX	Aoeoe_0558_100	ACGTTGGATGTGATCGTTCATCTGACCGC	ACGTTGGATGACACCGCAACATATGCAAG	104	99.9	70.7	48.2	38.1	d	R	6349.2
iPLEX	A2oeoe0450_97	ACGTTGGATGAGAAGTGGATTTGGTCTTCC	ACGTTGGATGCCAAACTGTGGCCATATC	99	100.0	70.7	49.8	58.8	D	F	6376.2
iPLEX	A3oeoe_0424_156	ACGTTGGATGGGCTCACAAATAGTTGATG	ACGTTGGATGGAACTCAACTCCGAAGATCCG	99	94.2	70.7	45.0	35.0	g	R	6500.2
iPLEX	A1oeoe_0449_29	ACGTTGGATGGTGCAGTAACCTGCACAATC	ACGTTGGATGGAAGATTTCTGTTCTATCG	85	86.8	70.7	45.2	36.8	D	R	6565.3
iPLEX	B1oeoe_0384_211	ACGTTGGATGTTTTTTGCTGCCAAGCGG	ACGTTGGATGGGGTGCACAACTAATTGGG	87	97.9	70.7	49.1	31.8	R	R	6730.4
iPLEX	Aoeoe_0642_106	ACGTTGGATGGCATCCCAATCATAAGGGC	ACGTTGGATGTCGGGTCTATACAAAGTCC	106	99.9	70.7	46.7	38.1	F	F	6742.4
iPLEX	A2oeoe0450_37	ACGTTGGATGTTGGATGGGTGCGACCCAG	ACGTTGGATGGCTCCCATAGGCAATAAAGC	92	98.3	70.7	47.1	44.4	d	F	6848.5
iPLEX	Aoeoe_0563_200	ACGTTGGATGACTCGATTTGCTGATCTC	ACGTTGGATGAATGCTTCCCAACGCTGG	102	94.3	70.7	47.2	35.0	D	R	6949.5
iPLEX	B3oeoe_1166_150	ACGTTGGATGACCAAGTATCGGACCGATTG	ACGTTGGATGCCGAAAATCGTCAAGCCTC	98	100.0	70.7	46.5	42.1	D	R	6952.5
iPLEX	B3oeoe_0574_239	ACGTTGGATGTTGGAGATTAGCTGGAAAG	ACGTTGGATGCTATGCTCTGATTTAACG	111	92.6	70.7	48.8	50.0	F	F	7095.6
iPLEX	B1oeoe_0375_150	ACGTTGGATGAGCCACAAGACAGGCAAAAC	ACGTTGGATGGTCTGCTGGTCAAAACCAG	108	99.7	70.7	49.3	29.2	F	F	7312.8
iPLEX	B1oeoe_0379_150	ACGTTGGATGGCGCTTTTTATCGGTTGAC	ACGTTGGATGATCGCCGGTAACTATGAAG	119	97.1	70.7	47.0	30.4	F	F	7381.8
iPLEX	A4oeoe_0390_191	ACGTTGGATGTTCTAGCAGCAAAAGAGCG	ACGTTGGATGAACGACTGCTTTGAACG	112	98.0	70.7	51.0	38.1	DS	R	7560.9
iPLEX	A3oeoe_0370_150	ACGTTGGATGCCCTCTGCGATATTGTTG	ACGTTGGATGCTACAACCAACAGAGGG	117	96.0	70.7	48.9	28.0	R	R	7612.0
iPLEX	Boeoe_0622_105	ACGTTGGATGCTGCTTTATGATCGTTCAG	ACGTTGGATGAAGAGAAAAGATAATATCAG	115	62.2	70.7	45.4	28.6	D	F	7742.0
iPLEX	B3oeoe_0490_154	ACGTTGGATGTTGCCGACGATTTGTTGGG	ACGTTGGATGCTCCGATGATTTGCTGAAAC	116	99.0	70.7	48.7	36.4	D	R	7913.2
iPLEX	A6oeoe_0378_102	ACGTTGGATGAAAAGCTACGTTATGGACTG	ACGTTGGATGATTTTTCTGAGCCAGGCC	120	93.0	70.7	49.4	38.1	h	F	8014.2
iPLEX	A1oeoe_0391_241	ACGTTGGATGTTACAAGAGCCGAACAGAG	ACGTTGGATGTTCCGATGAAACCGGAGTG	114	97.8	70.7	47.4	33.3	Ds	F	8048.3
iPLEX	A6oeoe_0423_179	ACGTTGGATGCAACTTTTCAACAATTTGGG	ACGTTGGATGGTCTGGCTCATTAGTTG	114	93.6	70.7	53.8	47.8	Dg	R	8171.3
iPLEX	Aoeoe_0663_109	ACGTTGGATGAGCTCGCTCAAGAGAAAC	ACGTTGGATGGCGCATCATACCTAAATC	107	99.8	70.7	45.1	20.8	F	F	8317.5
iPLEX	B3oeoe_1057_150	ACGTTGGATGGCAACAACGCTTTTCAATAG	ACGTTGGATGGTTAAAGGATCGAGGCTCAC	110	98.2	70.7	45.9	30.4	D	F	8402.5
iPLEX	Boeoe_0357_114	ACGTTGGATGGGACACATCGGATGAATGG	ACGTTGGATGGAAGGACGCTTTCATCAAC	99	100.0	70.7	54.4	47.8	D	F	8404.5
iPLEX	B1oeoe_0428_164	ACGTTGGATGCTGCTGATTTTGTCCACCAC	ACGTTGGATGCTGAAAACCAAGAGACGG	116	92.1	70.7	45.9	28.0	DH	F	8488.5
iPLEX	A1oeoe_0440_163	ACGTTGGATGACTGATCTGACCTCTGTCG	ACGTTGGATGGTCCCAATCACTCAATG	113	97.9	70.7	50.9	33.3	DH	R	8553.6
iPLEX	Boeoe_0327_114	ACGTTGGATGGAATCTGCTTTCCAAATCTC	ACGTTGGATGAACCGGAACCAATGACG	106	98.4	70.7	48.3	25.0	dh	R	8631.6
iPLEX	A4oeoe_0483_150	ACGTTGGATGGTCTGGCTAATTTGTGAAAC	ACGTTGGATGACAAAGTACGGGATTTGGAC	110	94.0	70.7	47.7	29.2	d	F	8710.7
iPLEX	A1oeoe_0469_150	ACGTTGGATGCTGAAAACAGCTGTTAAAC	ACGTTGGATGTXAAMGCCCTTTCCGAAATC	97	88.2	70.7	53.4	40.0	dh	F	8878.8

TERM	SNP_ID	UEP_SEQ	EXT1_CALL	ASS	EXT1_SEQ	EXT2_CALL	L	EXT2_MASS	EXT2_SEQ
iPLEX	A1oeoe_0413_212	CACCGATGGCCTATG	C	4800.2	CACCGATGGCCTATGC	T	4880.1	CACCGATGGCCTATGT	
iPLEX	A2oeoe0450_200	GCGGCATGGTTGCGG	G	4912.2	GCGGCATGGTTGCGCG	A	4992.1	GCGGCATGGTTGCGGT	
iPLEX	A3oeoe_0425_112	gCCTCCACCACCTTTTGC	G	5304.5	gCCTCCACCACCTTTTGCC	T	5328.5	gCCTCCACCACCTTTTGCA	
iPLEX	A3oeoe_0529_139	TCTGTTCAATTGCCACA	T	5391.6	TCTGTTCAATTGCCACAA	C	5407.6	TCTGTTCAATTGCCACAG	
iPLEX	A3oeoe_0433_150	ggTTGGCGATCATGCTC	C	5464.6	ggTTGGCGATCATGCTCC	T	5544.5	ggTTGGCGATCATGCTCT	
iPLEX	A5oeoe_0326_101	cTGAGGTCGACGACAGA	G	5491.6	cTGAGGTCGACGACAGAC	A	5571.5	cTGAGGTCGACGACAGAT	
iPLEX	Boeoe_0402_105	GTTTTGGACAACGATGG	C	5512.6	GTTTTGGACAACGATGGC	T	5592.5	GTTTTGGACAACGATGAT	
iPLEX	Boeoe_0340_216	tgTGGATCGTGGTTGGAT	C	5863.8	tgTGGATCGTGGTTGGATT	T	5943.7	tgTGGATCGTGGTTGGAT	
iPLEX	A4oeoe_0344_196	GCGTACTTGCCAATTTTAA	G	6025.0	GCGTACTTGCCAATTTTAAAC	A	6104.9	GCGTACTTGCCAATTTTAAAT	
iPLEX	A5oeoe_0420_106	CTGGGAATCTTTTCAAGAA	G	6050.0	CTGGGAATCTTTTCAAGAAC	A	6129.9	CTGGGAATCTTTTCAAGAACT	
iPLEX	A2oeoe0450_176	tAAAATTTGGGCAGATCGAG	A	6172.1	tAAAATTTGGGCAGATCGAGA	T	6228.0	tAAAATTTGGGCAGATCGAGT	
iPLEX	Boeoe_0456_151	ACAGATTTTATTTTCCGGC	G	6320.1	ACAGATTTTATTTTCCGGCC	A	6400.1	ACAGATTTTATTTTCCGGCT	
iPLEX	B1oeoe_0360_186	AATATGGACAACACGATGAG	C	6454.3	AATATGGACAACACGATGAGC	T	6534.2	AATATGGACAACACGATGAGT	
iPLEX	Aoeoe_0558_100	GACCGCCATAAAATCTTTATC	G	6596.3	GACCGCCATAAAATCTTTATCC	A	6676.3	GACCGCCATAAAATCTTTATTT	
iPLEX	A2oeoe0450_97	cccaGTTCTCCCGAGAAAACG	C	6623.3	cccaGTTCTCCCGAGAAAACGC	T	6703.2	cccaGTTCTCCCGAGAAAACGT	
iPLEX	A3oeoe_0424_156	cATAGTTGATGGCTAGGATA	T	6771.5	cATAGTTGATGGCTAGGATAA	C	6787.5	cATAGTTGATGGCTAGGATAG	
iPLEX	A1oeoe_0449_29	cccCACCTCATTTTCCGATAAT	G	6812.5	cccCACCTCATTTTCCGATAATC	A	6892.4	cccCACCTCATTTTCCGATAATT	
iPLEX	B1oeoe_0384_211	AGCGGATCACTTTTGGATAT	G	6977.6	AGCGGATCACTTTTGGATATC	A	7057.5	AGCGGATCACTTTTGGATATT	
iPLEX	Aoeoe_0642_106	tGGCCTATACGGAATAATCA	A	7013.6	tGGCCTATACGGAATAATCAA	G	7029.6	tGGCCTATACGGAATAATCCG	
iPLEX	A2oeoe0450_37	gaggCCAGGACTTTTGAAGAA	A	7119.7	gaggCCAGGACTTTTGAAGAAA	G	7135.7	gaggCCAGGACTTTTGAAGAAG	
iPLEX	Aoeoe_0563_200	cccTCTCTAAATAACTTGGCGT	T	7220.7	cccTCTCTAAATAACTTGGCGTA	C	7236.7	cccTCTCTAAATAACTTGGCGTG	
iPLEX	B3oeoe_1166_150	tccGCATAACCTAAATCCAGC	G	7199.7	tccGCATAACCTAAATCCAGCC	A	7279.6	tccGCATAACCTAAATCCAGCT	
iPLEX	B3oeoe_0574_239	gggtcGCTGGAAGTTTCAACAG	C	7342.8	gggtcGCTGGAAGTTTCAACAGC	T	7422.7	gggtcGCTGGAAGTTTCAACAGT	
iPLEX	B1oeoe_0375_150	AACAACCTGTAACAATCGATTACT	A	7584.0	AACAACCTGTAACAATCGATTACTA	T	7639.9	AACAACCTGTAACAATCGATTACTT	
iPLEX	B1oeoe_0379_150	gGATAATGATTTATTTCTGCAGA	G	7669.0	gGATAATGATTTATTTCTGCAGAG	T	7708.9	gGATAATGATTTATTTCTGCAGAT	
iPLEX	A4oeoe_0390_191	ccctAGCGCAATTTTCAATCGAAC	G	7808.1	ccctAGCGCAATTTTCAATCGAAC	A	7888.0	ccctAGCGCAATTTTCAATCGAAT	
iPLEX	A3oeoe_0370_150	CAACATTTTCTGATTTTCCGATAT	G	7859.2	CAACATTTTCTGATTTTCCGATATC	A	7939.1	CAACATTTTCTGATTTTCCGATATT	
iPLEX	Boeoe_0622_105	ggagAATTAATTGGTTTTTCCAG	C	7989.2	ggagAATTAATTGGTTTTTCCAGC	T	8069.1	ggagAATTAATTGGTTTTTCCAGT	
iPLEX	B3oeoe_0490_154	ttgaAACTCTTCAATCGTATAAACCG	C	8200.4	ttgaAACTCTTCAATCGTATAAACCGG	A	8240.3	ttgaAACTCTTCAATCGTATAAACCGT	
iPLEX	A6oeoe_0378_102	gggtgTTTGGATTTTCTGCTGACCG	C	8261.4	gggtgTTTGGATTTTCTGCTGACCGC	T	8341.3	gggtgTTTGGATTTTCTGCTGACCGT	
iPLEX	A1oeoe_0391_241	taCGAACAGAGATTATATTAGTTGG	C	8295.4	taCGAACAGAGATTATATTAGTTGGC	T	8375.4	taCGAACAGAGATTATATTAGTTGGT	
iPLEX	A6oeoe_0423_179	ccccCAATTGGGTAACCTTACCTTCG	T	8442.5	ccccCAATTGGGTAACCTTACCTTCGA	C	8458.5	ccccCAATTGGGTAACCTTACCTTCGG	
iPLEX	Aoeoe_0663_109	ccgGAATTAATTAATAAAGCCAAAGAT	A	8588.7	ccgGAATTAATTAATAAAGCCAAAGATA	G	8604.7	ccgGAATTAATTAATAAAGCCAAAGATG	
iPLEX	B3oeoe_1057_150	gggtGCAAGAATTTTAAAGGGATAC	A	8673.7	gggtGCAAGAATTTTAAAGGGATACA	G	8689.7	gggtGCAAGAATTTTAAAGGGATACG	
iPLEX	Boeoe_0357_114	gggtGATGAATGGATTCGACGTCGAAC	C	8651.6	gggtGATGAATGGATTCGACGTCGAACC	T	8731.6	gggtGATGAATGGATTCGACGTCGAAC	
iPLEX	B1oeoe_0428_164	cccTTTTCTATAATCATATGGCTAATG	A	8759.7	cccTTTTCTATAATCATATGGCTAATGA	G	8775.7	cccTTTTCTATAATCATATGGCTAATGG	
iPLEX	A1oeoe_0440_163	ccacTTTTATGGCTTGTATGTAATGAA	C	8800.8	ccacTTTTATGGCTTGTATGTAATGAA	T	8824.8	ccacTTTTATGGCTTGTATGTAATGAA	
iPLEX	Boeoe_0327_114	agtaTTATTTTATTTGCGGAAAAGATA	G	8912.9	agtaTTATTTTATTTGCGGAAAAGATA	C	8918.9	agtaTTATTTTATTTGCGGAAAAGATG	
iPLEX	A4oeoe_0483_150	agttAAACAAATCAAGAAGTTAGAAGAG	C	8957.9	agttAAACAAATCAAGAAGTTAGAAGAGT	T	9037.8	agttAAACAAATCAAGAAGTTAGAAGAGT	
iPLEX	A1oeoe_0469_150	ctgaCTGAAAACAGCTGTTAAACAGCTC	A	9150.0	ctgaCTGAAAACAGCTGTTAAACAGCTCA	G	9166.0	ctgaCTGAAAACAGCTGTTAAACAGCTCG	