



**HAL**  
open science

# Communautés microbiennes de la baie de raisin : Incidence des facteurs biotiques et abiotiques

Guilherme Marques Martins

► **To cite this version:**

Guilherme Marques Martins. Communautés microbiennes de la baie de raisin : Incidence des facteurs biotiques et abiotiques : Incidence des facteurs biotiques et abiotiques. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Bordeaux Ségalen (Bordeaux 2), 2012. Français. NNT : . tel-02802218

**HAL Id: tel-02802218**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02802218>**

Submitted on 5 Jun 2020

**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.

Année 2012

Thèse n°1924

# THÈSE

pour le

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Ecole doctorale**

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Œnologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 3 juillet 2012

Par **Guilherme MARTINS**

Né le 7/10/81 à Coimbra, Portugal

### **Communautés microbiennes de la baie de raisin**

**Incidence des facteurs biotiques et abiotiques**

#### **Membres du Jury**

Mr. P. REY, Professeur à Bordeaux Sciences Agro  
Mr. R. DURAN, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour  
Mme M.C. MONTEL, Directrice de recherche à l'INRA de Clermont-Ferrand  
Mr. S. COMPANT, Maître de conférences à l'Université de Toulouse  
Mme A. LONVAUD-FUNEL, Professeur à l'Université Bordeaux Segalen  
Mme I. MASNEUF-POMAREDE, Professeur à Bordeaux Sciences Agro

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de thèse



*Amai-vos e instruí-vos.*



## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin au sein de l'équipe Microbiologie du raisin et du Vin grâce au soutien financier du Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux, de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agronomiques de Bordeaux - Bordeaux Sciences Agro et du Conseil Régional d'Aquitaine.*

*Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans de nombreuses personnes que je souhaite remercier.*

*En tout premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et ma grande reconnaissance à Mme Isabelle Masneuf-Pomarède, ma directrice de thèse, pour l'opportunité qu'elle m'a offerte, pour sa confiance ainsi que pour son soutien amical et sa disponibilité. Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de toute ma gratitude pour son aide permanente.*

*Mes remerciements vont également à Mme Aline Lonvaud-Funel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir permis de travailler dans d'excellentes conditions. Qu'elle reçoive également toute l'expression de ma reconnaissance pour avoir accepté de participer au jury de soutenance.*

*J'exprime ma gratitude à Mr Patrice Rey, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Toute ma reconnaissance également à Mme Marie Christine Montel, Mr Robert Duran et Mr Stéphane Compant pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger.*

*Je remercie les châteaux Luchey Halde, Château Gombaude Guillot, Château Clinet, Château de Bellevue, Château Haut - Piquat, Château de Beauséjour et Château Soleil qui ont très cordialement accepté de me mettre à disposition du raisin pour permettre mes recherches.*

*Je remercie Cécile Miot-Sertier, Olivier Claisse, Guy et Marie-Louise Soulas, Katharina Zott et Anne Mercier pour leur participation à ce travail, pour m'avoir formé au travail de laboratoire et pour toute l'aide technique et scientifique apportée. Je leur suis infiniment reconnaissant.*

*Merci au personnel de la cellule de transfert Microflora (Geoffrey Bourbon, Julie Maupeu et Joana Coulon). J'ai vraiment apprécié travailler à vos côtés! Je sais tout ce que je vous dois et vous en serai éternellement reconnaissant.*

*Je tiens à remercier à l'Equipe Environnement et Microbiologie de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, particulièrement à Béatrice Lauga. J'exprime tout mon respect et mes remerciements pour son accompagnement et son soutien.*

*Je tiens à remercier l'UMR Santé et Agroécologie du vignoble INRA – Bordeaux et particulièrement à Marc Fermaud et Jean Roudet pour leur collaboration dans le dispositif expérimental.*

*Mes sincères remerciements à Jessica Vallance, pour son soutien scientifique et technique dans la validation de la technique CE-SSCP pour l'étude de la communauté fongique de la baie de raisin. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur.*

*Une mention toute particulière pour Warren Albertin pour sa patience et disponibilité et pour ces belles figures obtenues sous "R". Merci pour tout.*

*Merci à la cellule de transfert Amarante Process (Arnaud Massot et Fabrice Meunier) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis ainsi le dosage de cuivre. Merci pour votre bonne volonté et pour votre amitié.*

*Merci à Emmanuel Baugier pour tout le temps qu'il m'a consacré pour le traitement des images. Je n'oublie pas ta caisse de porto. Merci également à Patrick Leger pour ses bricolages qui ont réparé plusieurs machines que j'ai cassées.*

*A mon cher camarade de bureau, Julen Bridier, un grand merci pour tout ces cours de langue française, génétique et culture basque.*

*À Greg Pasquier, pour le plaisir de travailler ensemble et pour sa grande aide et disponibilité. À mes chers compatriotes Maria "Laidinha" et Telma da Silva, merci pour les sourires, les coups de mains et les encouragements.*

*Je tiens bien sur à remercier tous les stagiaires qui ont participé à ce travail parmi eux, Panagiotis Solimanoglo Stamatopoulos, Ccori Martinez et surtout Cosimo Cosini, qui même étant italien a travaillé comme un portugais.*

*Je tiens également à remercier à mes camarades d'armes, Andrea "El Roma", Greg Schmauch, Igor Chichiuc "Генеральныйсекретарь", Kleopatra Chira, Armin Gerd Müller Schuttler et FofixTempere.*

*Merci aux personnes que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse et qui grâce a leur sympathie m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions: Marula, Marion, Mariette, Rémy, Fety, Patrick, Marguerite, Claire, Patricia, P. Marullo, P. Renault,*

*Poggi, Paulo, Jean-Baptiste, Maude, Charles, Annie, Soizic, M. Claire, Laurent, Stéphanie, Davide, Julien-Michel, Cécile, Christiane, Yann, Sabine, Stéphane, ....*

*Enfin, mes derniers remerciements je me permettrai de les faire dans ma langue maternelle :  
À minha grande família, do Minho a Timor, passando por Catete, Arta e Condeixa, aos meus pais e a Jiouli por todo o amor e preocupação. A minha irmã, ao meu cunhado, as minhas afilhadas e aos meus tios e primos.*

*Aqueles que, mesmo não me apercebendo, estiveram sempre comigo, desde o principio.*

*A todos vocês muito obrigado e bem-hajam.*



INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	3
1. Ecologie et écosystèmes microbiens .....	4
1.1. Définition d'un écosystème.....	4
1.2. Ecologie microbienne, importance et applications .....	4
1.3. Biodiversité .....	6
1.4. Facteurs affectant le développement des microorganismes .....	7
1.4.1 La température.....	8
1.4.2 L'humidité.....	9
1.4.3 L'activité de l'eau .....	9
1.4.4 Le pH.....	10
2. Ecosystème et communautés microbiennes viticoles.....	11
2.1. La Plante et le Fruit .....	11
2.2 Les (différents écosystèmes) différentes communautés microbiennes viticoles.....	13
2.2.1 Le sol et la rhizosphère viticole.....	13
2.2.2 La partie aérienne de la vigne, la colonisation endophytes et épiphytes.....	16
2.3 Communauté microbienne de la baie de raisin .....	18
2.3.1 Les moisissures .....	19
2.3.2 Les levures.....	24
2.3.3 Les bactéries .....	31
3. Méthodes d'analyse en écologie microbienne .....	36
3.1 Analyse des communautés microbiennes par les méthodes classiques.....	36
3.1.1 Milieu de culture sélectif, d'enrichissement et d'isolement.....	37
3.1.2 Tests biochimiques et profils d'activité métabolique.....	38
3.2. Analyse des communautés microbiennes par les méthodes de biologie moléculaires .....	38
3.2.1 Les marqueurs moléculaires (gènes cibles).....	39
3.2.2 Biais liés à l'amplification de l'ADN par PCR .....	42
3.2.3 Techniques d'empreintes moléculaires pour la caractérisation des communautés .....	42
3.2.4 Avantages et inconvénients des techniques empreintes moléculaires .....	45
3.2.5 Détection et de quantification moléculaire- PCR Quantitative.....	47
3.2.6 Approches de type « méta » .....	49
3.2.7 Identification et taxonomie.....	51
3.2.8 Analyse phylogénétique .....	52
3.3. Méthodes culture dépendante et culture indépendante- avantages et inconvénients - la complémentarité d'information .....	53

CHAPITRE II- MATERIELS ET METHODES .....	55
1. Dispositif expérimental et choix des parcelles d'étude .....	56
2. Échantillonnage et récupération d'une suspension cellulaire .....	60
3. Culture et isolement de microorganisme.....	60
3.1 Les milieux sélectifs.....	60
3.2 Dénombrements .....	61
3.3 Mise en collection .....	62
4. Test biochimiques et d'activité métabolique.....	62
4.1 Profils physiologiques des communautés microbiennes - détermination de la diversité métabolique .....	62
4.2 Détermination de la Concentration Minimum d'Inhibition de différents fongicides cupriques .....	64
5. Méthodes d'analyse biomoléculaires .....	66
5.1 Extraction d'ADN .....	66
5.1.1 Extraction et stockage d'ADN des cultures pures.....	66
5.1.2 Extraction d'ADN des souches références.....	66
5.1.3 Extraction d'ADN des eaux de lavage des baies.....	67
6. Détermination des profils génétiques par les techniques d'empreintes moléculaires .....	67
6.1 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) .....	67
6.2 Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) .....	69
6.3 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) .....	69
6.4 Conditions d'amplification de l'ADN utilisées dans les différentes techniques d'empreintes moléculaires.....	72
7. Détection de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel.....	73
8. Identification des micro-organismes par séquençage.....	74
9. Analyse de constituants pelliculaires, quantification du cuivre dans les eaux de lavage de baies.....	75
9.1 Dosage de Glucose et Fructose par méthodes enzymatiques .....	75
9.2 Mesure de l'activité de l'eau .....	75
9.3 Dosage de cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique.....	76
10. Traitement de données et analyse statistique .....	76
10.1 L'analyse de la variance (ANOVA) .....	76
10.2 Statistique Descriptive Multidimensionnelle .....	77
10.2.1 Analyse par réduction des dimensions .....	77
10.2.2 Analyse par classification hiérarchique.....	77
10.3 Indices de diversité.....	78
10.4 Phylogénie moléculaire .....	79

CHAPITRE III - Développement de la technique CE-SSCP (Capillary - Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism) pour l'étude de la communauté fongique de la baie de raisin.....	81
1. Le matériel biologique .....	82
2. Régions cibles et amorces .....	82
2.1 Conditions de PCR.....	84
2.2 Le type de marquage .....	84
2.3 Analyse de la taille des amplicons .....	84
2.4 Choix du type de marquage.....	85
3. Choix de la meilleure combinaison amorces/marquage.....	87
4. Validation de la technique sur des mélanges des souches et des échantillons environnementaux .....	89
5. Discussion .....	92
CHAPITRE IV – La communauté microbienne de la baie de raisin .....	93
1. Evolution des niveaux de populations microbiennes au cours de la croissance et de la maturation de la baie .....	94
1.1 Campagne de prélèvements 2009.....	94
1.1.1 Population cultivable sur milieu LT et LB 1/10.....	94
1.1.2 Population cultivable sur milieu BA et BL .....	96
1.2 Campagne de prélèvements 2010.....	96
1.2.1 Population cultivable sur milieu LT et LB 1/10.....	97
1.2.2 Population cultivable sur milieu BA et BL .....	98
2. Diversité et distribution temporelle des espèces bactériennes et des levures .....	99
2.1 Espèces bactériennes .....	100
2.2 Identification des espèces fongiques .....	105
3. Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel .....	109
4. Analyse des profils métaboliques - Impact du stade phénologique .....	112
5. Effet du stade phénologique sur la structure des communautés microbiennes .....	118
5.1 Analyse des populations bactériennes par T-RFLP .....	118
5.2 Analyse des populations fongique par CE-SSCP 2010.....	121
6. Détermination de la teneur en sucres des exsudats de la baie de raisin .....	121
7. Discussion .....	124
CHAPITRE V – Impact de facteurs abiotiques sur les communautés microbiennes .....	130
1. Les conditions climatologiques et l'effet terroir .....	131
1.1 Suivi des températures et de la pluviométrie pour les 3 zones (2009 – 2010).....	131
1.2 Mesure de l'activité de l'eau (Aw).....	132
1.3 Suivi des populations cultivables pendant la campagne de 2009 -2010 pour les trois terroirs .....	133

1.4	Analyse des profils et activités métaboliques - effet terroir .....	137
1.5	Effet de l'effet terroir sur la structure des communautés microbiennes .....	138
1.5.1	Analyse de la population bactérienne cultivable par DGGE – Libournais 2009 .....	138
1.5.2	Analyse la population bactérienne totale par T-RFLP - Libournais-2010 .....	139
1.5.3	Analyse la population fongique par CE-SCCP - Libournais 2010.....	141
1.6	Discussion .....	142
2.	L'influence du mode de conduite et des pratiques phytosanitaires.....	145
2.1	Comparaison des niveaux de populations de cultivables pendant la campagne de 2009 -2010.....	145
2.1.1	Campagne de 2009 .....	145
2.1.2	Campagne de 2010 .....	147
2.2	Analyse des profils et activités métaboliques .....	150
2.3	Effet du mode conduite sur la structure des communautés microbiennes .....	152
2.3.1	Analyse la population bactérienne cultivable par DGGE - Lussac 2009 .....	152
2.3.2	Analyse la population bactérienne totale par T-RFLP - Lussac 2009.....	152
2.3.3	Analyse la population bactérienne totale par T-RFLP - Libournais 2010 .....	155
2.3.4	Analyse la population fongique par CE-SCCP - Libournais 2010.....	157
2.4	Dosage du cuivre dans les eaux de lavage de baies ; corrélation avec les niveaux de populations cultivables et les indices de diversité.....	159
2.5	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de différents fongicides cupriques.....	163
2.6	Discussion .....	166
3.	Synthèse générale de l'impact des facteurs abiotiques .....	169
CHAPITRE VI- Influence des facteurs biotiques sur la communauté microbienne – le cas de <i>Botrytis cinerea</i> . .....		174
1.	Résultats concernant la campagne 2010.....	175
1.1	Analyse de la population microbienne cultivable. Campagne 2010, parcelles INRA .....	175
1.2	Comparaison de la structure des populations bactériennes des baies saines provenant de grappes atteintes par <i>Botrytis cinerea</i> .....	180
1.3	Comparaison de la structure des populations fongiques des baies saines provenant de grappes atteintes par <i>Botrytis</i> .....	181
2.	Résultats concernant la campagne 2011 – Parcelles INRA et Médoc .....	181
2.1	Analyse de la population microbienne cultivables – Campagne de 2011 .....	182
2.1.1	Parcelles de l'INRA .....	182
2.1.2	Parcelles du Médoc .....	184
2.2	Impact de <i>Botrytis cinerea</i> sur la structure de la communauté bactérienne.....	185
2.3	Le cas particulier des bactéries acétiques – conséquences œnologiques .....	186

4. Discussion .....	188
CHAPITRE VII – La communauté microbienne de la baie de raisin et l'écosystème viticole - l'hypothèse d'un <i>continuum</i> sol, écorces, feuilles et baies .....	192
1. Etude de la population bactérienne .....	193
1.1 Analyse la population bactérienne totale des différents compartiments par T-RFLP .....	194
1.2 Analyse de la richesse et de la diversité des communautés bactériennes .....	195
1.3 Comparaison des profils et identification des OTU's communs.....	197
1.4. Discussion .....	198
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	199
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	203
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	205
ANNEXE 1 .....	232
ANNEXE 2 .....	242
ANNEXE 3 .....	251

## Glossaire et abréviations

**ACP:** Analyse en Composantes Principales

**ADN:** acide désoxyribonucléique

**ADN (r):** acide désoxyribonucléique (ribosomal)

**ANOVA:** Analysis of Variance (analyse de la variance)

**ARN:** acide ribonucléique

**ARN(r):** acide ribonucléique (ribosomal)

**AWCD:** average well color development

**CAH:** classification ascendante hiérarchique

**CLPP:** community level physiological profiles

**CMI :** concentration minimale d'inhibition

**°C :** degré Celsius

**DGGE :** denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse en gel à gradient dénaturant)

**DNase:** Désoxyribonucléase

**dNTP:** désoxynucléotide triphosphate

**DO:** densité optique

**EDTA:** éthylène diamine tétra-acétate

**EMBL:** European Molecular Biology Laboratory

**HSD:** Honestly Significant Difference

**IGS:** intergenic spacer

**INRA:** institut national de la recherche agronomique

**ITS:** internal transcribed spacers

**MANOVA:** Multivariate analysis of variance (Analyse de la Variance Multivariée)

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**OTA:** ochratoxine A

**OTU:** operational taxonomic unit

**pb :** paires de bases

**PCR:** polymerase chain reaction(réaction de polymérisation en chaîne)

**S :** coefficient de sédimentation exprimé en Svedberg

**SSCP:** Single Strand Conformation Polymorphism (polymorphisme de conformation des acides nucléiques simples brins)

**TE:** tampon tris-EDTA

**Tris:** trihydroxyméthylaminométhane

**T-RFLP :** terminal-restriction fragment length polymorphism (Polymorphisme de longueur de fragments de restriction terminaux)

**T-RF's:** terminal-restriction fragments (fragments de restriction terminaux)

**Tween:** polyoxyéthylène-sorbitane-monoléate

**UPGMA:** unweighted pair group method with arithmetic averaging (méthode de regroupement par paire et par estimation des liens moyens)

**UFC:** Unité Formant une Colonie

**v/v:** volume par volume

**YPD:** Milieu Yeast extract Peptone glucose

## Liste de Tableaux

**Tableau 1:** Produits Phytosanitaires de type Biocontrôle utilisés en viticulture.

**Tableau 2:** Mycotoxines produites par des moisissures de la baie de raisin. \*Mycotoxines considérées comme les plus importantes du point de vue de la santé humaine selon le Conseil pour l'Agriculture, Science et Technologie (Rapport n° 139, CAST, 2003).

**Tableau 3:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des moisissures présentes dans/sur la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

**Tableau 4:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des levures de la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

**Tableau 5:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des bactéries de la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

**Tableau 6:** Avantages et inconvénients spécifiques aux techniques d'empreintes moléculaires. D'après Cho et Tiedje, (2001); Hurst (2002); Kirk et al. (2004).

**Tableau 7:** Comparaison des techniques de séquençage. D'après Hugenholtz P, Tyson GW: Microbiology: metagenomics. *Nature* 2008.

**Tableau 8:** Récapitulatif de prélèvements réalisés au cours de cette étude.

**Tableau 9:** Substrats disposés sur les microplaques Biolog® EcoPlates.

**Tableau 10:** Récapitulatif des régions ciblées dans les différentes techniques d'empreintes moléculaires et les conditions d'amplification de l'ADN.

**Tableau 11:** Conditions utilisées pour l'amplification par PCR quantitative.

**Tableau 12:** Amorces testées et régions d'amplification respectives (Delaherche et al., 2004) (Zott et al., 2010).

**Tableau 13:** Souches de levures et de moisissures utilisées (CLIB: Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique ; L = souches appartenant à la collection de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux).

**Tableau 14:** Amorces testées et régions d'amplification respectives.

**Tableau 15:** Conditions de PCR selon les différentes régions ciblées.



**Tableau 16:** Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel. Échantillons provenant des vignobles de Lussac, campagne de 2008, à différents stades phénologiques pour les parcelles en mode de conduite biologique (Bio) et Conventionnel (Conv).

**Tableau 17:** Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel. Échantillons provenant des vignobles des Pomerol, Lussac et Puisseguin concernant la campagne de 2010, à différents stades phénologiques pour les parcelles en mode de conduite biologique (Bio) et Conventionnel (Conv).

**Tableau 18:** Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel. Échantillons provenant de la parcelle expérimentale INRA–Grande Ferrade concernant la campagne de 2010, à différents stades phénologiques.

**Tableau 19:** Indice de diversité de Shannon et AWCD calculés à partir des substrats dégradés, Plaque Biolog® EcoPlate, pour les différents stades et les parcelles de Pomerol et Puisseguin en 2010. \* indique des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ANOVA un facteur « stade phénologique ». Les valeurs représentent la moyenne des triplicatas.

**Tableau 20: A** - Somme des écarts carrés obtenus à partir de l'analyse de variance à deux facteurs : Sucres et Terroir. **B** - coefficient de corrélation de Spearman entre les sucres (D-Glucose et D-Fructose) et les niveaux de population cultivable sur milieu LT et LB 1/10. Niveau de significativité : \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,005$ ) \*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

**Tableau 21:** Données climatiques concernant la campagne de 2009 (A) et 2010 (B). TM : température moyenne de l'air sous abri (°C); UM : humidité relative moyenne (%); RR : cumul des précipitations en mm.

**Tableau 22:** Activité de l'eau ( $A_w$ ) mesurée sur la pellicule des raisins aux différents stades phénologiques pour les parcelles en mode de conduite biologique et en mode de conduite conventionnel de Pomerol et de Puisseguin en 2010. \* indique des différences significatives (ANOVA un facteur « terroir »  $p < 0,05$ ).

**Tableau 23:** Indice de diversité de Shannon et AWCD calculés à partir des profils métaboliques plaque Biolog®, concernant les échantillons provenant des parcelles de Pomerol et Puisseguin aux différents stades. \* indique des différences significatives  $p < 0,05$ , ANOVA à un facteur « terroir ».

**Tableau 24:** Teneurs en cuivre des eaux de lavage de baies, aux différents stades phénologiques. Valeurs moyennes de trois répétitions. ANOVA à un facteur « mode de conduite ». \*, \*\*, \*\*\* valeurs significatives au seuil  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  et  $p < 0,001$ . Campagne de 2009.

**Tableau 25:** Teneurs en cuivre des eaux de lavage de baies, à partir du stade de mi-véraison. Valeurs moyennes de trois répétitions.. \*, \*\*, \*\*\* valeurs significatives au seuil  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  et  $p < 0,001$ . Campagne de 2010.

**Tableau 26:** Analyse de variance par comparaisons multiples, sur les niveaux de populations LT et LB 1/10. **A :** analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique sur la population de 2009 et 2010 respectivement. **B :** analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime. **C :** analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique sur la population de 2009 et 2010 respectivement, en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. **D :** analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, *P*= Niveau de significativité.

**Tableau 27:** Analyse de variance par comparaisons multiples sur les niveaux de populations cultivées sur les milieux BA et BL **A :** analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique et millésime. **B :** analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime sur les niveaux de population BA et BL en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, *P*= Niveau de significativité.

**Tableau 28:** Analyse de variance par comparaisons multiples sur les indices de diversité métabolique **A :** analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique et millésime. **B :** analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime sur les indices de diversité métabolique en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, *P*= Niveau de significativité.

**Tableau 29:** Analyse de variance par comparaisons multiples des indices de diversité calculés à partir des profils T-RFLP. Analyse des facteurs mode conduite et stade phénologique. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, *P*= Niveau de significativité.

**Tableau 30:** Pourcentage de baies pourries dans les échantillons prélevés 5, 10 et 20 jours après l'apparition des premiers symptômes de pourritures sur grappe ; parcelles de l'INRA.

**Tableau 31: Indices de sévérité de *Botrytis cinerea* sur les parcelles (données Marc Fermaud, 2012, communication personnelle).** Les valeurs représentent la moyenne de 3 prélèvements. 1: Début maturité, 2 : maturité; 3: maturité avancée.

**Tableau 32:** Richesse en termes de n° de OTU's et indice de diversité de Shannon, calculée à partir des profils T-RFLP des différents échantillons provenant de sol, écorces, feuilles et baies de raisin. Lussac campagne de 2009.

**Tableau 33:** Résultats de l'ANOVA à un facteur (origine des échantillons en ce qui concerne les compartiments biologiques sol, écorces feuilles et baies) et test de comparaisons multiple (HSD de Tuckey). **A :** Comparaison de la Richesse (n° de OTU's) concernant la parcelle en mode de conduite biologique, **B :** Comparaison d'indices de diversité de Shannon concernant la parcelle en mode conduite biologique, **C :**

Comparaison de la Richesse (n° de OTU's) concernant la parcelle en mode de conduite conventionnel, **D** :  
Comparaison d'indices de diversité de Shannon concernant la parcelle en mode conduite conventionnel.

## Liste de Figures

**Figure 1:** Dimensions de la biodiversité

**Figure 2:** Évolution de la composition de la baie de raisin à 10 jours d'intervalle après la floraison, (Coombe & McCarthy 2000).

**Figure 3:** Effet d'une souche de *Pseudomonas* PGPR sur la croissance végétative (Barka et al. 2000): à gauche de plantules inoculés à droite le plantule contrôle.

**Figure 4:** Pied de vigne atteint par la Tumeur du Collet (source : [www.omafra.gov.on.ca](http://www.omafra.gov.on.ca)).

**Figure 5:** Présence de moisissures dans les baies de raisin sur forme de différentes pourritures. A : Pourriture noble due à *Botrytis cinerea* (source: [www.myquem.com](http://www.myquem.com)); B : *Aspergillus carbonarius* sur une baie de raisin éclaté (Photo : B. Molot, ITV France) ; C : symptômes de l'oïdium sur grappes (source : [www.ephytia.inra.fr](http://www.ephytia.inra.fr)) ; D : grappe atteinte de pourriture grise (source : [www.inra.fr](http://www.inra.fr)).

**Figure 6:** Observation de levures sur la baie de raisin en microscopie électronique à balayage. Localisation des levures dans les zones pérystomatiques. (Photo : B. Pucheu-Plante et M. Mercier, département de microscopie électronique de l'université de Bordeaux I, Traité d'œnologie, Tome I, édition Dunod).

**Figure 7:** Représentation schématique des gènes d'ADNr de la cellule procaryote et eucaryote.

**Figure 8:** Suivi en temps réel d'une PCR. Dans l'exemple ci-dessus, le cycle seuil (Ct) est d'environ 11.

**Figure 9:** Courbe de fusion représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de cette courbe. Dans l'exemple ci-dessus, tous les échantillons ont un Tm d'environ 76,2 °C.

**Figure 10:** Carte des zones de prélèvements de la région du Libournais.

**Figure 11:** Les stades phénologiques de la vigne, échelle d'Eichhorn et Lorenz modifiée (d'après Coombe, 1995).




**Figure 12:** Utilisation de l'appareil de Steers en milieu solide.

**Figure 13:** Exemple de gel de DGGE des produits PCR obtenue à partir à l'ADN extrait de la biomasse cultivable sur milieu LB 1/10. Echantillons de la campagne de 2009.

**Figure 14:** Profils T-RFLP obtenus à partir de l'ADN extraits d'eaux de lavage de baies des échantillons environnementaux prélevés lors de la campagne 2009.

**Figure 15:** Gel d'agarose des amplifiants obtenus à partir des paires d'amorces ITS1/ITS2 (gauche) et NL3A/NL4 (droite).

**Figure 16:** Profils de CE-SSCP de *Saccharomyces cerevisiae* selon les différentes combinaisons paires d'amorces / marquages.





**Figure 17:** Superposition des pics des fragments amplifiés avec les amorces NL3A/NL4, avec les trois types de marquage (brin forward , brin reverse  et double marquage ) pour *Saccharomyces cerevisiae*.

**Figure 18:** Profils de CE-SSCP pour les souches *Candida zemplinina* et *Zygoascus hellenicus* avec un simple marquage à gauche et un double marquage à droite (amorces utilisés NL3A/NL4).

**Figure 19:** Profils CE-SSCP obtenus avec le couple d'amorces NL5/NL6 en double marquage.

**Figure 20:** Profils CE-SSCP obtenus avec le couple d'amorces Lev1/Lev2 en double marquage

**Figure 21:** Profils CE-SSCP obtenus avec le couple d'amorces NL3A/NL4 en double marquage.

**Figure 22:** Comparaison de profils obtenus avec l'amplification de mélange d'ADN de 3 espèces et la superposition des profils des mêmes espèces, (*Pichia anomala* , *Hanseniaspora uvarum*  *Saccharomyces cerevisiae* , mélange de souches ).

**Figure 23:** Profils CE-SSCP obtenus à partir de l'ADN extraits d'eaux de lavage de baies des échantillons environnementaux prélevés lors de la campagne 2008.

**Figure 24:** Evolution des populations cultivables sur milieu LT et sur milieu LB 1/10 à partir du début de véraison et jusqu'à maturité avancée. Pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite) (les résultats présentés sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles). Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

**Figure 25:** Evolution des populations sur milieu BA et BL. Pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite). Les résultats présentés pour le Libournais sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

**Figure 26:** Evolution des populations des levures sur milieu LT et de bactéries sur milieu LB 1/10 à partir de la fermeture de la grappe pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et à partir du début de véraison pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite) jusqu'au stade maturité avancée. Les résultats présentés pour le Libournais sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

**Figure 27:** Evolution des populations BA et BL pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite). Les résultats présentés pour le Libournais sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

**Figure 28:** Phylogénie moléculaire basée sur l'homologie des séquences partielles de l'ADNr 16s des espèces bactériennes isolées sur milieu LB 1/10 provenant de Lussac et de 36 souches types (les numéros d'accèsion des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite). Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.

**Figure 29:** Phylogénie moléculaire basée sur l'homologie des séquences partielles de l'ADNr 16s des espèces bactériennes isolées sur milieu LB1/10 provenant de Pomerol et de 36 souches types (les numéros d'accèsion des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite). Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-paramètre (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.

**Figure 30:** Distribution et abondance des genres bactériens à différents stades phénologiques dans le vignoble de Lussac. Les cercles de couleur rose représentent les genres Gram-négatifs et la couleur bleue les genres Gram-positifs. Le diamètre des cercles est proportionnel à l'abondance des populations. L'arbre phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir des souches types d'espèces identifiées parmi les isolats.

**Figure 31:** Distribution et abondance des genres bactériens à différents stades phénologiques dans le vignoble de Pomerol. Les cercles de couleur roses représentent les genres Gram-négatifs et la couleur bleue les genres Gram-positifs. Le diamètre des cercles est proportionnel à l'abondance des populations. L'arbre phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir de souches types d'espèces identifiées parmi les isolats.

**Figure 32:** Phylogénie moléculaire basée sur l'homologie des séquences partielles de LSU 26/28s, des espèces eucaryotes isolées sur milieu LT provenant de Lussac et de 5 souches types (les numéros d'accèsion des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite). Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.



**Figure 33:** Phylogénie moléculaire basée sur l'homologie des séquences partielles de LSU 26/28s, des espèces eucaryotes isolées sur milieu LT provenant de Pomerol et de 7 souches types (les numéros d'accèsion des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite). Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.



**Figure 34:** Distribution et abondance des genres de levures à différents stades phénologiques dans le vignoble de Lussac. Les cercles de couleur rose représentent les genres *Ascomycète* et la couleur bleue les genres *Basidiomycète*. Le diamètre des cercles est proportionnel à l'abondance des populations. L'arbre

phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir de souches types d'espèces identifiées parmi les isolats.









**Figure 35:** Distribution et abondance des différents genres de levures à différents stades phénologiques dans le vignoble de Pomerol. Les cercles de couleur rose représentent les genres *Ascomycète* et le couleur bleue les genres *Basidiomycète*. Le diamètre des cercles est proportionnel à l'abondance des populations. L'arbre phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir de souches types, d'espèces identifiées parmi les isolats.

**Figure 36:** Corrélation entre les AWCD et les Indices de diversité de Shannon, calculés à partir de substrats dégradés dans les Plaques Biolog® EcoPlate, pour les différents stades et pour parcelles étudiées. Le prélèvement de Puisseguin à maturité, considéré comme *outlier* (indice de Cook =0,11) n'est pas représenté.

**Figure 37:** Indice de diversité  et population cultivable sur milieu LB/10  aux différents stades phénologiques. **A** : parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B** : parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C** : parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D** : parcelle de Puisseguin en mode de conventionnel. Les valeurs d'indice de diversité représentent la moyenne de triplicatas, les valeurs de population cultivable représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

**Figure 38:** AWCD  et population cultivable sur milieu LB/10  aux différents stades phénologiques. **A** : parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B** : parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C** : parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D** : parcelle de Puisseguin en mode de conventionnel. Les valeurs d'AWCD représentent la moyenne de triplicatas, les valeurs de population cultivable représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

**Figure 39:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques obtenus à partir des substrats dégradés dans les Plaques Biolog® EcoPlate. **A** : parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B** : parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C** : parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D** : parcelle de Puisseguin en mode de conventionnel.

**Figure 40:** **A** : Richesse un OTU's  et populations cultivable sur milieu LB 1/10 , concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite biologique aux différents stades phénologiques; **B** : Indice de Shannon  et populations cultivable sur milieu LB 1/10 , concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite biologique aux différents stades phénologiques, **C** : Richesse un OTU's  et populations cultivable sur milieu LB 1/10 , concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite conventionnel aux différents stades phénologiques **D** : Indice de Shannon  et populations cultivables sur milieu LB 1/10 , concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite Conventionnel aux différents stades phénologiques. Les valeurs de richesse en OTUs et de l'indice de diversité représentent la moyenne

de triplicatas, les valeurs de population cultivable représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

**Figure 41:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *Hinf*I). Echantillons provenant des parcelles de Pomerol en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2010.

**Figure 42:** Evolution de la concentration en D-Glucose et D-Fructose dans les exsudats de la baie de raisin aux différents stades phénologiques pour les trois terroirs en 2009.

**Figure 43:** Corrélation entre les teneurs en sucres des exsudats de la baie de raisin (D-Glucose + D-Fructose) et les niveaux de population cultivable sur milieu LT à droite et sur milieu LB 1/10 à gauche, pour les trois derniers stades, terroir du Libournais, année 2009.

**Figure 44:** Stades phénologiques et date de prélèvements dans les différentes terroirs. Campagne de 2009 et 2010.

**Figure 45:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (A) et maturité avancée (B) pour les parcelles en mode de conduite biologique. Campagne de 2009. Projection des variables sur les axes 1 et 2. Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.

**Figure 46:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (C) et maturité avancée (D) pour les parcelles en mode de conduite conventionnelle. Campagne 2009. Projection des variables sur les axes 1 et 2. Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.

**Figure 47:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (A) et maturité avancée (B) pour les parcelles en mode de conduite biologique. Campagne de 2010. Projection des variables sur les axes 1 et 2 Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.

**Figure 48:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (A) et maturité avancée (B) pour les parcelles en mode de conduite biologique. Campagne de 2010. Projection des variables sur les axes 1 et 2. Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.

**Figure 49:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques obtenus à l'aide des microplaques Biolog® issus des échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique et conventionnel à Pomerol et Puisseguin. Dendrogramme construit en utilisant la méthode UPGMA à partir d'une matrice de distance euclidienne.

**Figure 50:** Comparaison de profils moléculaires de la région V3 de l'ADNr 16s des populations cultivables sur milieu LB 1/10. Dendrogramme obtenu en utilisant l'algorithme du *neighbor-joining* à partir d'une matrice de distance euclidienne. Cercles rouges: Pomerol, cercles jaunes: Lussac, cercles bleus: Puisseguin



**Figure 51:** Analyse en composante principale des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Echantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge) Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite biologique. Campagne de 2010.

**Figure 52:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Echantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge) Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2010.

**Figure 53:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Echantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge), Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite biologique. Campagne de 2010.

**Figure 54:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Echantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge), Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2010.

**Figure 55:** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, pour les prélèvements à maturité, parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C : Puisseguin. Campagne 2009. Mode de conduite biologique ▲ , mode conduite conventionnel ◆ .

**Figure 56:** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, pour les prélèvements à maturité avancée, parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C : Puisseguin. Campagne 2009. Mode de conduite biologique ▲ , mode conduite conventionnel ◆ .

**Figure 57:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité dans les parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C : Puisseguin. Campagne 2010. Mode de conduite biologique ▲ , mode conduite conventionnel ◆ .

**Figure 58:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité avancée dans les parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C : Puisseguin. Campagne 2010. Mode de conduite biologique ▲ , mode conduite conventionnel ◆ .

**Figure 59:** Indice de diversité de Shannon calculés à partir des profils métaboliques plaque Biolog® aux différents stades phénologiques, A : Pomerol, B : Puisseguin. Mode de conduite biologique ■ , mode de conduite conventionnel ■ .

**Figure 60:** AWCD (*Average Well Colour Développement*) calculés à partir des profils métaboliques plaque Biolog® aux différents stades phénologiques. A : Pomerol, B : Puisseguin. Mode de conduite biologique ■ , mode de conduite conventionnel ■ .

**Figure 61:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques des échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique et conventionnel à Pomerol. Dendrogramme construite en utilisant la méthode UPGMA à partir d'une matrice de distance euclidienne.

**Figure 62:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques des échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique et conventionnel à Puisseguin. Dendrogramme construite en utilisant la méthode UPGMA à partir d'une matrice de distance euclidienne.

**Figure 63:** Comparaison de profils moléculaires de la région V3 de l'ADNr 16s des populations cultivables sur milieu LB 1/10. Dendrogramme obtenu en utilisant l'algorithme du *neighbor-joining* à partir d'une matrice de distance euclidienne. Les cercles verts représentent les échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique et les cercles bleus en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2009.

**Figure 64:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Échantillons provenant des parcelles de Lussac en mode de conduite biologique (couleur vert) et mode de conduite conventionnel (couleur bleu). Campagne de 2009.

**Figure 65:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP et identification de TRFs à l'aide du logiciel T-RFLP PAT\* (Phylogenetic Assignment Tool) (MicrobialCommunityAnalysis III (Shyuet al., 2007)). Projection des variables sur les axes.

**Figure 66:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Échantillons provenant des parcelles de Pomerol en mode de conduite biologique (couleur verte) et en mode de conduite conventionnel (couleur bleue). Campagne de 2010.

**Figure 67:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Échantillons provenant des parcelles de Lussac en mode de conduite biologique (couleur verte) et mode de conduite conventionnel (couleur bleue). Campagne de 2010.

**Figure 68:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Échantillons provenant des parcelles de Puisseguin en mode de conduite biologique (couleur verte) et mode de conduite conventionnel (couleur bleue). Campagne de 2010.

**Figure 69:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Échantillons provenant des parcelles de Pomerol en mode de conduite biologique (vert) et mode de conduite conventionnel (bleu).

**Figure 70:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Echantillons provenant des parcelles de Lussac en mode de conduite biologique (vert) et mode de conduite conventionnel (bleu).

**Figure 71:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Echantillons provenant des parcelles de Puisseguin en mode de conduite biologique (vert) et mode de conduite conventionnel (bleu).

**Figure 72:** Corrélation entre la quantité de cuivre présent sur les baies de raisin et la population cultivables sur milieu LT et LB 1/10 pour les différents terroirs. Campagne 2009.

**Figure 73 :** Corrélation entre la quantité de cuivre présent sur les baies de raisin et la population cultivables sur milieu LT et LB 1/10 pour les différents terroirs. Campagne de 2010, aux stades début maturité I et début de maturité II.

**Figure 74:** Classification ascendante hiérarchique des 92 isolats. Le dendrogramme a été établi à partir des CMI obtenues pour les 4 formulations de cuivre comme variables actives. Les histogrammes représentent la quantité (mg/L) de produits à base de cuivre pour laquelle la croissance est nulle. \* signifie que la CMI est supérieure à 32 mg/L.

**Figure 75:** Niveaux de populations dénombrées sur milieu LT (A), LB 1/10 (B), BA (C) et BL (D). Parcelles INRA. . Baies provenant de la parcelle traitée I\_Tr, ■. Baies provenant de la parcelle non traitée ■ I\_Nt, Baies proches des baies pourries provenant de la parcelle traitée ■ I\_Ntpbp , Baies provenant de la parcelle non traitée présentant le niveau de sévérité le plus important ■ I\_BP. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements minimum par échantillon.

**Figure 76 :** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10, BA et BL pour les prélèvements au stade surmaturité. Campagne de 2010. Projection des variables sur les axes 1 et 2.

**Figure 77:** Classification ascendante hiérarchique des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Échantillons provenant des parcelles INRA, stades de maturité et sur-maturité. Campagne de 2010.

**Figure 78:** Classification ascendante hiérarchique des profils CE-SSCP. Échantillons provenant des parcelles INRA aux stades de maturité et sur-maturité. Campagne de 2010.

**Figure 79:** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10, BA et BL sur les prélèvements à surmaturité A et maturité avancée B. les cercles bleus représentent la modalité non traitée (I\_Nt) et les cercles rouges la modalité traitée. (I\_tr) Parcelles INRA. Campagne de 2011.

**Figure 80:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10, BA et BL pour les prélèvements à maturité, les cercles bleus représentent la modalité non traitée (Leo\_Nt) et les cercles rouges représentent la modalité traitée (Leo\_tr). Parcelles du médoc. Campagne de 2011.

**Figure 81:** Corrélation entre les variables *Sévérité* et *Richesse* en OTU's (A) *Sévérité* et *Indices de diversité de Shannon* (B). Parcelles INRA. Campagne 2011.

**Figure 82:** Corrélations entre les niveaux de bactéries acétiques évalués sur les baies et dans le moût (A), dans le moût et dans le vin (B), sur les baies et dans le vin de la modalité *non ensemencée* (D) et sur les baies et dans le vin de la modalité *ensemencée* (D). Parcelles de l'INRA et du Médoc, modalités traitée en non traitée. Campagne 2011.

**Figure 83:** Analyse en composants principal (A) et classifications ascendant hiérarchique (B) des profils T-RFLP obtenues des échantillons de différentes niches écologiques viticoles : Chaque échantillon est codifié par couleur de la manière suivante: sol = couleur grise, écorces = couleur marron, feuilles = couleur verte, baies = couleurs rose. Echantillons prélevées à de Lussac dans la parcelle en mode de conduite biologique au stade de début véraison. Campagne de 2009.

**Figure 84:** Analyse en composants principal (A) et classifications ascendant hiérarchique (B) des profils T-RFLP obtenues des échantillons de différentes niches écologiques viticoles : Chaque échantillon est codifié par couleur de la manière suivante: sol = couleur grise, écorces = couleur marron, feuilles = couleur verte, baies = couleurs rose. Echantillons prélevées à de Lussac dans la parcelle en mode de conduite conventionnel au stade de début véraison. Campagne de 2009.

## INTRODUCTION

Il est désormais bien établi que des microorganismes de la baie de raisin sont retrouvés dans le moût puis dans le vin tout au long de son élaboration. En revanche, peu de travaux sont consacrés à l'étude de l'origine, de la composition de l'écosystème microbien de la baie, et des facteurs environnementaux susceptibles d'interagir sur son évolution. Les microorganismes de l'écosystème viticole contribuent activement à l'amélioration de la croissance et de la santé du végétal et jouent un rôle prépondérant sur la qualité de la récolte.

Les conditions de production de raisin de qualité vont évoluer dans les années à venir avec d'une part, l'augmentation du nombre de surfaces consacrées à l'agriculture biologique et les recommandations restrictives concernant l'usage des traitements phytosanitaires (recommandations proposées suite au «Grenelle de l'Environnement», ECOPHYTO2018), et d'autre part, l'évolution climatique vers un réchauffement.

La viticulture doit faire face à des exigences sociétale et environnemental vis-à-vis de la réduction des intrants phytosanitaires. Il en résulte une forte demande de la part de la filière pour le développement d'itinéraires culturaux à bas niveaux d'intrants. A l'heure actuelle, beaucoup de producteurs choisissent des itinéraires alternatifs pour protéger leur vignoble. En Aquitaine, la viticulture biologique se développe à un rythme exponentiel : les surfaces consacrées à la vigne biologique ont augmenté de plus de 30 % ces cinq dernières années. Considérant leurs larges spectres d'action vis à vis des différents pathogènes de la vigne, les produits phytosanitaires d'origine cuprique sont très utilisés en viticulture, indépendamment du mode de conduite du vignoble (viticulture biologique, viticulture intégrée ou viticulture conventionnelle). L'écotoxicité du cuivre sur les populations microbiennes de différents écosystèmes a déjà été constaté, cependant son impact sur les communautés microbiennes de la baie de raisin n'a jamais été évalué.

Dans la plupart des travaux menés jusqu'à présent, la microflore étudiée provenait de baies broyées, ce qui constitue une première étape de sélection des microorganismes.

Les colonies ainsi isolées sont proches de la réalité de l'écosystème « moût » mais une partie de la microflore native à la surface de la baie est déjà éliminée par le pressurage des grappes. L'approche proposée dans ce travail diffère en ce sens que nous lavons les baies afin de récupérer la communauté microbienne présente à la surface du fruit.

Ce projet de recherche a pour objectif principal de décrire la dynamique et la diversité des populations microbiennes de la baie de raisin puis d'évaluer l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur ces populations (tels que le stade phénologique, le micro - climat, les pratiques culturales et le développement de *Botrytis cinerea*). Ces données doivent contribuer à une meilleure compréhension de l'écologie des communautés microbiennes présentes sur la baie de raisin.

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire de microbiologie, Faculté d'Œnologie de Bordeaux – Institut des Sciences de la Vigne et du Vin. Cette étude s'inscrit en amont d'un projet de recherche mené depuis plusieurs années dans ce laboratoire, concernant l'étude de l'écosystème microbien du raisin au vin.

## **CHAPITRE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Ecologie et écosystèmes microbiens

### 1.1. Définition d'un écosystème

Le terme « écosystème », créé par Arthur George Tansley par contraction de l'expression anglaise *ecological system* (1871-1955), peut être défini comme un ensemble formé par un groupement ou une communauté d'organismes (*biocénose*) et un environnement physico-chimique abiotique (Adachi et al. 1996) (*biotope*) (Whittaker 1962).

En accord avec cette définition, Thomas L. Brock a désigné l'écologie microbienne, comme l'étude d'écosystèmes, où le *biotope* et la *biocénose* sont en constante interaction (Brock 1966) . Un écosystème comprend différents agents classés selon la complexité d'interaction de ces deux composantes (Begon et al. 1996; Anderson & Cairney 2004)

**Individu** - unité distincte, au sein d'un groupe qui assume un rôle spécifique.

**Population** - groupe d'individus ayant un espace fonctionnel commun, nommé **niche écologique**.

**Communautés** - regroupement de populations dans un même contexte spatio-temporel.

**Environnement** - milieu où s'insère un individu au niveau duquel les facteurs physiques, chimiques ou biologiques peuvent agir sur les micro-organismes.

### 1.2. Ecologie microbienne, importance et applications

L'écologie microbienne qui constitue aujourd'hui une discipline distincte dans les sciences biologiques, a eu comme pionniers Sergei Winogradsky (1845–1916) et Martinus Beijerinck (1851–1931). Leurs études ont démontré le rôle des bactéries dans le cycle des nutriments et les interactions entre les micro-organismes du sol.

Les avancés scientifiques en biologie et l'intérêt croissant, dans les années 60, sur les sujets concernant l'environnement, ont contribué à un développement exponentiel des études en écologie microbienne (Atlas et al. 1992) .

Des ouvrages comme "Principles of Microbial Ecology" de Thomas D. Brock (1966), "Experimental Microbial Ecology" de Sheldon Aaronson (1970), "Microbial Ecology" de



Martin Alexander (1971) et le premier journal scientifique "The journal of Microbial Ecology" (Springer Verlag) en 1974, ont marqué le début d'une époque à partir de laquelle l'écosystème microbien s'affirme comme un domaine d'importance pour la science, l'industrie et l'environnement (Guerrero 2002).

L'écosystème microbien du tube digestif (humain et animal) est un sujet d'étude récurrent ; il exerce un effet de barrière à l'égard des espèces potentiellement pathogènes et ces communautés sont capables d'agir sur plusieurs fonctions physiologiques de l'hôte, notamment en métabolisant des fractions indigestibles (Ley et al. 2006).

En ce qui concerne le domaine alimentaire, l'étude de l'écosystème microbien associé aux produits fermentaires tels que les produits laitiers, carnés, les produits issus de la panification ou les boissons comme le vin, le cidre et la bière est particulièrement importante. En effet, l'élaboration et la qualité de ces produits dépend de l'activité des microorganismes (Lonvaud-Funel 1995; Montel et al. 1998; Cocolin et al. 2004; Hammes et al. 2005; Montel et al. 1998; Rantsiou et al. 2005; Coton et al. 2006; Renouf & Lonvaud-Funel 2007).

Dans le domaine de l'environnement et de la conservation des ressources, les études en écologie microbienne se sont consacrées notamment à la bioremédiation, qui consiste à éliminer des polluants organiques ou minéraux par des microorganismes. L'équilibre de ces écosystèmes favorise les processus biologiques de recyclage des eaux de décontaminations des métaux lourds et de la biodégradation des déchets (Flemming et al. 1990; Pringault et al. 2010; Murphy 2010)

D'un point de vue agronomique, les micro-organismes ont un rôle essentiel dans l'équilibre du sol, participant activement aux cycles nutritifs d'éléments comme le carbone et l'azote, et influençant la croissance végétal et la santé des plantes (Ovreas & Torsvik 1998; Glick 2003). La relations de ces microorganismes avec les plantes peut avoir un caractère pathogène (Nehl et al. 1997); mais peut aussi être bénéfique, favorisant la croissance (Sturz & Christie 2003; Compant et al. 2005). Certaines populations sont aussi utilisées comme agents de lutte biologique constituant ainsi une ressource importante pour les programmes de

protection intégrée contre les ravageurs (Weller 1988; Ait Barka et al. 2002; Barahona et al. 2011).

### 1.3. Biodiversité

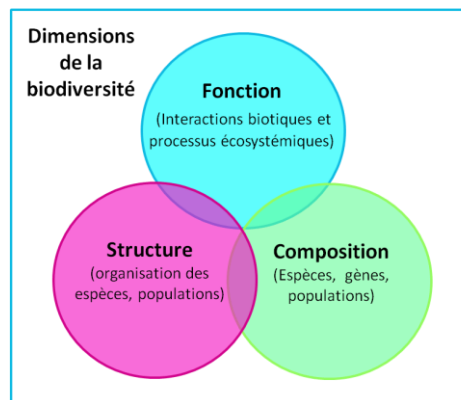
La diversité biologique ou biodiversité a été définie comme: « la variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes.»<sup>\*1</sup> La biodiversité est habituellement divisée en trois niveaux :

- **La diversité génétique**, elle se définit par la variabilité des gènes à l'intérieur d'une même espèce (diversité intraspécifique) ou d'une population. Elle est caractérisée par la différence de deux individus d'une même espèce ou sous-espèce
- **La diversité spécifique** (ou diversité interspécifique), correspond à la diversité qui existe au niveau des différentes espèces trouvées dans une aire donnée. Chaque groupe défini peut être caractérisé par le nombre des taxons qui le composent.
- **La diversité écosystémique**, qui correspond à la diversité des écosystèmes qui existe au niveau des environnements physiques et des communautés biotiques dans un paysage, elle concerne les interactions des populations naturelles et de leur environnement physique.

La biodiversité comporte trois dimensions : sa **composition** (ce qui est présent), sa **structure** (comment sont organisés les éléments présents les uns par rapport aux autres) et sa **fonction** (les processus qui génèrent la biodiversité et qui affectent la structure et la composition) (Noss 1990).

---

<sup>\*1</sup>Extrait du texte de la convention sur la diversité biologique tenue en 1992 à Rio de Janeiro lors de la conférence des Nations Unies. Le texte intégral est disponible sur: [www.cbd.int/doc/legal/cbd-fr.pdf](http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-fr.pdf)



**Figure 1:** Dimensions de la biodiversité.

La biodiversité est difficile à quantifier, néanmoins divers indicateurs écologiques sont utilisés pour l'étudier et la décrire. Les indicateurs de biodiversité par rapport à la **composition** sont par exemple la richesse en termes d'espèces présent et les fréquences géniques.

En ce qui concerne la dimension « **structure** », les facteurs comme la distribution, la taille et l'abondance relative des espèces d'une communauté sont pris en compte. Les indicateurs de biodiversité relatifs à la dimension « **fonction** », sont entre autres, le taux d'échanges génétiques entre les populations, la croissance des populations et de recyclage des éléments nutritifs (**Figure 1**).

Ces indicateurs sont une composante importante pour la compréhension de la biodiversité en ce qui concerne la façon dont elle change, ainsi que les causes et les conséquences de ce changement.

#### **1.4. Facteurs affectant le développement des microorganismes**

Par leur métabolisme, les micro-organismes élaborent des éléments biosynthétiques nécessaires à leur reproduction. La disponibilité des substrats et les conditions de biosynthèse dans un écosystème donné peuvent varier selon plusieurs facteurs spécifiques à un biotope. Dans la réponse aux changements physico-chimiques de l'environnement, les microorganismes modifient leur comportement métabolique par une réponse adaptative. Cette réponse peut comprendre une phase de latence ou d'inactivité, mais elle peut aussi

induire la répression ou la modulation de l'expression de certains gènes afin d'optimiser l'utilisation d'énergie pour les fonctions cellulaires indispensables à leur survie dans les conditions qui leurs sont imposées.

Les facteurs écologiques affectant un écosystème microbien donné sont nombreux et agissent de façon simultanée. Dans le cas où la biocénose est soumise à des conditions de pH, température, pression osmotique extrême, la sélection s'opère en supprimant certains individus de la population, altérant par conséquent sa structure.

#### 1.4.1 La température

Parmi les différents paramètres que le climat rassemble, la température et l'humidité sont des facteurs connus comme ayant un impact sur la dynamique et la structure des communautés microbiennes. En viticulture, ces deux facteurs constituent les principaux indicateurs du risque épidémiologique des pathogènes fongiques comme *Plasmospora viticola* (Mildiou), *Uncinula necator* (Oïdium) et *Botrytis cinerea* (Pourriture Grise) (Sall 1980; Lalancette 1988; Broome 1995).

La **température** est un des facteurs les plus importants dans la croissance et la survie des micro-organismes (Rosso et al. 1995) et a été reconnu comme une variable environnemental importante qui influence la structure des populations (Pettersson & Baath 2003; Bell et al. 2009). La température optimale de croissance de chaque microorganisme est très variable. Si une augmentation de température peut accélérer les réactions enzymatiques favorisant ainsi la croissance, au delà d'une certaine température, certaines protéines peuvent se dénaturer affectant ainsi le développement de la cellule. Quand la température descend en dessous de la température optimale, la structure lipidique de la membrane cellulaire est modifiée, affectant le transport actif des substrats organiques et inorganiques et diminuant ainsi l'affinité au substrat (Nedwell 1999; Pomeroy & Wiebe 2001).

L'influence de ce paramètre sur la dynamique des populations a été constatée dans plusieurs travaux. Landa et al. 2004 a étudié l'effet de la température sur la croissance de *Pseudomonas fluorescens* (un agent de biocontrôle sur des phytopathogènes d'origine fongique) et a conclu que lorsque la température n'est plus optimale, les activités biologiques deviennent moins performantes et les effets antagonistes deviennent plus

faibles. Un comportement similaire a été observé chez *Trichoderma* sp., où son effet inhibiteur sur d'autres espèces devient limité lorsque la température est inférieure à la température optimale (Mukherjee & Raghu 1997).

Il a été montré, dans des écosystèmes microbiennes comme celui du sol ou le marin, que la modification de structure d'une population au cours des saisons est principalement liée à des variations de température (Pommier et al. 2005; Hall et al. 2008; Bell et al. 2009).

#### 1.4.2 L'humidité

Les conclusions de plusieurs études dans différents écosystèmes ont montré que l'humidité peut potentialiser la croissance et la diversité microbienne (Leyden et al. 1987; Butenschoen et al. 2011). Cependant, dans certaines conditions, une augmentation excessive de l'humidité peut ralentir l'activité microbienne (Linn & Doran 1982; Duhail 1999; Horz et al. 2004), a constaté que la présence d'eau à la surface de la baie de raisin, lors de pluies, favorise la prolifération des micro-organismes épiphytiques, alors que des baies soumises à des périodes de sécheresse montre une diminution de la microflore épiphytique. L'effet de biocontrôle des certaines espèces peut être aussi affecté par ce paramètre. Le potentiel antagoniste de *Pseudomonas* et de *Bacillus* vis à vis de champignons pathogènes peut diminuer dans des conditions de faible humidité (Andrews 1992).

#### 1.4.3 L'activité de l'eau

L'effet de l'humidité sur le développement des populations repose sur des principes liées à la quantité d'eau qui peut être amenée à un milieu (Zamora et al. 2006). Mais, pour le développement des micro-organismes, le plus important c'est la disponibilité de cette eau. Ce paramètre, désigné par le terme **activité de l'eau** (aw : activity of water) (Scott 1953), représente la pression de vapeur d'eau d'un produit par rapport à la pression de vapeur saturante à la même température. Cette eau libre, qui est un facteur fondamental dans la croissance microbienne qui est considérée comme un des principaux paramètres influençant la conservation des aliments (Leistner 2000).

Chaque microorganisme présente des besoins en eau spécifique ; dans la majorité des cas, les levures sont plus exigeantes que les bactéries et les champignons (Christian 1980).

Rousseau & Doneche 2001 ont étudié l'effet de l' $a_w$  sur la croissance de différents micro-organismes de la baie de raisin (bactéries, levures et champignons) montrant que chaque type de microorganisme requiert des  $A_w$  spécifiques. Dans un travail récent, Deytieux-Belleau et al. 2009 montre que la mesure  $A_w$  constitue un bon indicateur de la sensibilité de la baie de raisin à l'attaque de *Botrytis*. Au laboratoire sur milieu PDA, les auteurs montrent que la croissance du champignon est significativement plus élevée pour les valeurs  $> 0,98$  par rapport à des valeurs comprises entre 0,95 et 0,93.

#### 1.4.4 Le pH

La gamme de pH où les micro-organismes présentent une croissance optimale est variable selon le type de micro-organisme. Dans des écosystèmes aquatiques ou écosystèmes telluriques l'influence du pH a été vérifiée (Chamier 1987; Rousk et al. 2010).

Sur la pellicule des plantes et des fruits, ce paramètre est plus difficile à mesurer, dû au fait que cet environnement n'est pas sous forme liquide.

Cependant, les exsudats pelliculaires ont certainement une activité ionique, ce qui peut en partie déterminer le potentiel hydrogène de la surface extérieure. De plus, l'excrétion de protons par la plante modifie également la composition du milieu externe (de Vos et al. 1986). Tous ces mécanismes influent donc sur le pH, et par conséquent sur la croissance des microorganismes dans cet environnement.

## 2. Ecosystème et communautés microbiennes viticoles

### 2.1. La Plante et le Fruit

La **vigne** est une plante sarmenteuse et ligneuse appartenant à la **famille des vitacées**. Sa culture est une des plus anciennes au monde, elle représente actuellement 7,5 millions d'hectares <sup>\*1</sup>. Parmi les dix-neuf genres que cette famille comprend (Galet 2000), le genre *Vitis* lui-même est divisé en trois groupes, classée en fonction de leur origine géographique : les espèces américaines (*V. riparia*, *V. labrusca*, *V. berlandieri*, *V. rupestris*), les espèces asiatiques (*V. amurensis*, *V. Romaneti*) et l'espèce européenne *V. vinifera* cultivée (sativa) et sauvage (silvestris) (Huglin & Scheneider 1998). L'espèce *V. vinifera* qui produit des raisins de table <sup>\*2</sup> et des raisins de cuve <sup>\*3</sup> comprend plus de 6000 variétés, que les botanistes appellent cultivars et les vignerons cépages (Galet 2000).

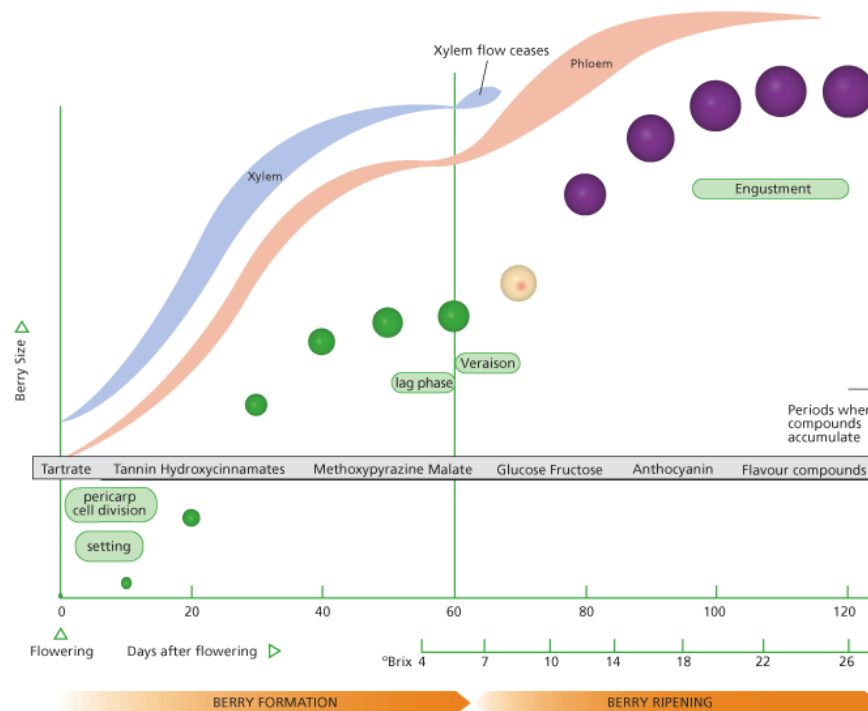
Le développement des **baies de raisin** comprend une phase de croissance végétative et une phase de maturation (Staudt et al. 1986), au cours desquelles on distingue différents stades phénologiques (Coombe 1995). La période de croissance végétative se caractérise par des divisions et des expansions cellulaires qui conduisent à une augmentation de la taille des baies (Ojeda et al. 1999), accompagné par le stockage d'acides aminés, d'acides organiques notamment malique et tartrique, d'acides hydroxycinnamiques et des composés phénoliques.

Après une phase de latence pendant laquelle la baie n'accumule plus d'assimilat, la phase de maturation commence par la véraison. Au cours de cette période, des nombreux solutés tels que les sucres, les composés aromatiques et les anthocyanes vont être accumulés (**Figure 2**).

À la fin de cette période, les concentrations en acides tendent à diminuer à cause de la dégradation de l'acide malique et des phénomènes de dilution liés à l'augmentation du volume des baies (Ollat et al. 2002).

---

<sup>\*1</sup>Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). <sup>\*2</sup>Raisin qui est exclusivement destiné à la consommation comme fruit de bouche et qui n'est pas vinifiable. <sup>\*3</sup> Raisin utilisés en viticulture pour l'élaboration de vins par fermentation alcoolique



**Figure 2:** Évolution de la composition de la baie de raisin à 10 jours d'intervalle après la floraison, (Coombe & McCarthy 2000).

Cette couche cireuse constitue un support épiphytique intéressant pour les micro-organismes. Elle contient des nutriments formés par exsudation comme certains sucres (dont le glucose et fructose) et acides aminés stimulant ainsi l'activité microbienne (Donèche 1986; Padgett & Morrison 1990). La cuticule des autres organes végétaux tels que les feuilles, a la capacité de retenir l'eau. Cette rétention dépend de l'humidité relative (Kerstiens 1996) de façon à ce que lorsque les valeurs d'humidité sont plus élevées, l'absorption de l'eau sera plus importante (Chamel et al. 1991). La présence d'eau cuticulaire est un facteur essentiel pour la croissance des micro-organismes (Zehr 1996). Les autres parties constitutives de la vigne comme les **racines**, le **bois** (tronc et sarments) et les **feuilles**, sont formées par différents éléments qui permettent aux micro-organismes de coloniser et de créer des niches écologiques.



## 2.2 Les (différents écosystèmes) différentes communautés microbiennes viticoles

### 2.2.1 Le sol et la rhizosphère viticole

Le sol est un environnement particulièrement intéressant pour les microbiologistes, puisqu'il héberge une quantité et une diversité d'espèces notable (Curtis et al. 2002). De plus, les communautés microbiennes telluriques jouent un rôle primordial dans un grand nombre de processus d'importance écologique comme les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote (Kowalchuk & Stephen 2001; Högberg et al. 2007), la modification de la structure du sol (Rillig & Mummey 2006) et l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Smith & Read 2008). L'interaction des microorganismes d'origine tellurique avec les plantes montre, dans le cas de la vigne, des effets bénéfiques ou délétères sur leur croissance et leur santé.

La **rhizosphère** peut être définie comme la région où le volume de sol est soumis à l'influence de l'activité racinaire (Darrah 1993). Ce micro-environnement est le lieu de nombreuses interactions entre les plantes et les microorganismes associés.

La plante peut libérer dans l'environnement rhizosphérique des photosynthétats organiques appelées 'rhizodépôts' (Nguyen 2003). En modifiant l'environnement par exsudations de ces composés, la plante influence la diversité et la structure des communautés microbiennes de la rhizosphère (Bais et al. 2006) et à son tour peut aussi être modifiée par l'activité microbienne. En effet, cette dernière peut influencer la croissance et la santé des plantes (Lemanceau 1992; Whipps 2001; Richardson et al. 2009).

Dans le cas de la vigne, différentes espèces présentent un effet positif sur la croissance de la plante par la stimulation des hormones ou par d'autres mécanismes indirects comme la réduction et la suppression des pathogènes (Mazzola 2002; Raaijmakers et al. 2008). Ces espèces sont désignées sous le terme de *Plant Growth-Promoting Rhizobacterium* (PGPR) (Barka et al. 2000). L'effet de ces organismes sur le développement de la plante peut être expliqué par la production de cytokinines et de phytohormones dans les racines indispensables à la formation de la plante (Kakimoto 1998). Des études ont montré que sur des plantes inoculées avec ce type de micro-organismes, le niveau de ces hormones était beaucoup plus élevé (Wei 1996; Holland 1997).

Le biocontrôle par les bactéries peut comporter différents mécanismes : phénomènes de compétition vis à vis de nutriments ou de substrats, antibiose ( Whipps 2001; Compant et al. 2005), parasitisme, résistance systémique (ISR - Induced Systemic Resistance) (Bloemberg & Lugtenberg 2001; Whipps 2001).

Aballay et al. 2011, au cours de leurs travaux de dépistage de bactéries ayant un effet suppressif vis à vis des nématodes parasites, ont isolé 25 genres à partir de la rhizosphère de la vigne, parmi lesquels *Pseudomonas* et *Bacillus* sont les plus fréquents (49,8 et 13,9 % respectivement).

L'effet antagoniste des PGPR vis à vis de *Botrytis* a été analysé dans les travaux de (Barka et al. 2000; Ait Barka et al. 2002; Compant et al. 2008; Compant et al. 2011). L'inoculation du système racinaire des plantules de vigne avec *Pseudomonas sp.* et *Burkholderia phytofirmans* (souches PsJN) stimule le développement végétatif de la plante et inhibe la croissance de *Botrytis* (**Figure 3**). D'autres bactéries isolées dans la rhizosphère de la vigne, notamment les genres *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Candidatus* ont montré le même effet inhibiteur sur la croissance du champignon (Loqman et al. 2008). Des observations microscopiques ont montré que l'exposition de *Botrytis* à ces souches antagonistes provoque une altération des structures des hyphes, par coagulation et fuites du cytoplasme cellulaire, conduisant ainsi à une rupture de mycélium fongique (Barka et al. 2000).

Ces espèces PGPR et d'autres micro-organismes de la rhizosphère ont la capacité de coloniser le système racinaire de la vigne et de se propager au travers du xylème jusqu'aux tiges de l'inflorescence, des pédicelles et des baies de raisin (Compant et al. 2008; Compant et al. 2011).

Au-delà des populations microbiennes d'intérêt potentiel pour la plante, le sol et en particulier la rhizosphère viticole, abrite aussi des microorganismes pathogènes qui sont à l'origine de différentes maladies. Parmi les microorganismes nuisibles, on peut trouver des champignons comme *Cylindrocarpon* (Halleen et al. 2006) qui est le principal agent de la maladie "Blackfoot" ; *Armillaria* responsable pour la *Armillaria root disease* (Hood 1991; Pertot et al. 2008), *Fusarium oxysporum*, évalué par (de Andrade 1995) comme le principal pathogène de la vigne au Brésil, *Pythium* et *Phytophthora* considérés comme pathogènes

racinaires de la vigne à l'origine d'importantes pertes (Marais 1980; Spies et al. 2011), des espèces du genre *Phaeoaniella* associées aux maladies de Pétri et Esca (Surico 2001), *Verticillium dahliae* responsable du Verticillium Wilt Disease (Gubler et al. 2004). Le sol est également un réservoir des spores de *Plasmopara viticola* (Kennelly et al. 2007), et de *Uncinula necator* (Cortesi et al. 1997) agents pathogènes respectivement du mildiou et de l'oïdium, maladies considérées comme étant les plus redoutables pour les viticulteurs.

Des pathogènes bactériens peuvent aussi avoir une origine rhizosphérique, c'est le cas de *Agrobacterium tumefaciens* (Burr 1983; Bien et al. 1990) responsable de la Tumeur du Collet (Crown gall). Cette maladie est présente dans plusieurs régions viticoles et peut causer la mort du cep (**Figure 4**).



**Figure 3:** Effet d'une souche de *Pseudomonas* PGPR sur la croissance végétative (Barka et al. 2000): à gauche de plantules inoculés à droite le plantule contrôle.



**Figure 4:** Pied de vigne atteint par la Tumeur du Collet (source : [www.omafra.gov.on.ca](http://www.omafra.gov.on.ca))

Les communautés microbiennes du sol et de la rhizosphère viticole constituent une structure dynamique qui peut être influencée par différents facteurs.

La pratique du désherbage chimique à l'aide d'herbicides présente un impact négatif sur différentes populations bactériennes et fongiques (Whitelaw-Weckert et al. 2007; Cordero-Bueso et al. 2011).

L'effet de monoculture viticole à long terme sur les populations de *Pseudomonas* portant les gènes *phlD* et *hcnAB* (pour la biosynthèse de 2,4-diacetylphloroglucinol et acide cyanhydrique respectivement) reconnu comme agents de biocontrôle (Haas & Défago 2005; Weller et al. 2007) a montré une prévalence de ces espèces bactériennes dans les sols (Svercel et al. 2009).

Les études des microorganismes du sol et de la rhizosphère viticole concernent également la présence d'espèces d'intérêt œnologique comme les levures fermentaires, dont l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Davenport 1973; Sabate et al. 2002; Francesca et al. 2009; Cordero-Bueso et al. 2011) et certaines bactéries lactiques et acétiques associées au raisin et au vin (Yanagida et al. 2008).

### 2.2.2 La partie aérienne de la vigne, la colonisation endophytes et épiphytes

Le **tronc**, les rameaux herbacée nommés **sarments**, les **feuilles**, les bourgeons, les fleurs puis les futures baies et grappes constituent les parties aériennes de la vigne. La présence des micro-organismes a été vérifiée dans tous ces organes, et le mode de colonisation peut se faire soit à la surface de la plante « *épiphyte* », soit à l'intérieur « *endophyte* ».

Les micro-organismes **endophytes**, sont omniprésents chez la plupart des espèces végétales. La présence de genres fongiques *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phoma*, *Stemphylium*, *Aureobasidium* et *Epicoccum* a été vérifiée chez la vigne. Parmi eux, les espèces *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans* et *Epicoccum nigrum*, connues pour leurs propriétés antagonistes vis à vis des pathogènes, ont été identifiées (Musetti et al. 2006; Martini et al. 2009).

Les bactéries endophytes de la vigne peuvent provenir de communautés bactériennes épiphytes de la rhizosphère (Compant et al. 2008), qui une fois à l'intérieur des tissus se propagent à travers le xylème et parcourent toute la plante, pour atteindre divers organes comme le tronc, les sarments, les feuilles, les bourgeons et les fleurs et les baies (Chatelet et

al. 2006; Thorne et al. 2006; Compant et al. 2011). Elles peuvent également pénétrer dans les plantes par les blessures de taille de la vigne (West et al. 2010) ou à travers les stomates des feuilles (Whitelaw-Weckert et al. 2011). Plusieurs études ont montré la diversité des espèces bactériennes endophytes dans les différents tissus de la vigne. Les genres *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Chromobacterium*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Staphylococcus*, et *Streptomyces* ont été identifiés ( Bell et al. 1995; Bulgari et al. 2009; West et al. 2010).

Les espèces *Xylella fastidiosa* (cause de la maladie de Pierce) et les *Agrobacterium tumefaciens* (Burr 1983; Newman et al. 2003) sont des exemples d'endophytes de la vigne ayant un effet pathogène.

Au contraire, certains endophytes comme *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, présents dans la vigne, ont des effets bénéfiques en favorisant la croissance de la plante et en augmentant la résistance aux phytopathogènes (Hudson et al. 2010).

La microflore endophyte peut être affectée par différents paramètres, dont le principal est la relation plante-hôte. La survie des endophytes dépend des nutriments fournis par la plante ; ainsi tous les facteurs affectant l'état nutritionnel et la santé de la plante peuvent, par conséquent, affecter cette communauté (Hallmann et al. 1997).

Si la diversité de la communauté endophyte est significative, la communauté **épiphyte** est encore plus riche et abondante.

Du tronc jusqu'à la baie, la surface d'un pied de vigne est colonisée par de nombreux microorganismes, comme des bactéries, des levures et autres champignons.

Les parties ligneuses de la vigne comme le tronc et les sarments, peuvent fournir des éléments nutritifs à partir des tissus riches en cellulose et hémicellulose (écorces) et à partir des exsudats riches en nutriments provenant des blessures de taille (pleure). Elles constituent une niche écologique pour des champignons saprophytes comme les *Hyphomycetes* (Magyar et al. 2010) et d'autres souvent retrouvées dans la baie des raisin *Alternaria alternata*, *Aerobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Diplodia spp.*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium laterium*, *Penicillium spp.*, *Phomopsis viticola*,

*Rhizopus stolonifer*, *Ulocladium atrum* (Munkvold 1993; Barata et al. 2012). Les tissus externe du tronc peuvent aussi contenir des spores d' autres champignons pathogènes comme *Unicola Nector* (Cortesi et al. 1997; Grove 2004).

Belin 1981 dans ses travaux de thèse, a réalisé la première étude descriptive des levures dans les différentes parties de la plante de vigne. Depuis, d'autres chercheurs se sont intéressés au sujet et montrent la présence des espèces *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia fructicola* (Francesca et al. 2009), *Aureobasidium pullulans* (Dimakopoulou et al. 2008) et des espèces du genre *Saccharomyces* (Cordero-Bueso et al. 2011) , ainsi que des bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* (Munkvold 1993).

Dans les parties herbacée comme les bourgeons et les feuilles, différentes types de levures et champignons filamenteux ont été isolés à la surface des tissus, tels que *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia fructicola* (Francesca et al. 2009), *Sporidiobolus pararoseus* (Schmid et al. 2011) *Saccharomyces spp.* (Cordero-Bueso et al. 2011) *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus carbonarius*, *Cladosporium sp.*, *Alternaria tenuissima*, *Fusarium proliferatum* (Falk 1996; Dimakopoulou et al. 2008; Schmid et al. 2011; Grube et al. 2011). En ce qui concerne la communauté fongique endophyte des feuilles, (Musetti et al. 2006) ont isolé différentes espèces du genre *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phoma* et *Stemphyliu*. Dans cette même étude, l'auteur a observé l'effet antagoniste de l'espèce *Alternaria alternata* vis à vis de *Plasmopara viticola*.

Les communautés bactériennes ont aussi fait l'objet de travaux récents, montrant la présence des genres *Sphingomonas*, *Hymenobacter* et *Methylobacterium* (Leveau & Tech 2011).

### **2.3 Communauté microbienne de la baie de raisin**

La microflore présente à la surface de la baie de raisin constitue une communauté complexe, composée d'une grande variété de moisissures, levures et bactéries.

De nombreuses études ont permis d'identifier les différents intervenants de ce consortium microbiologique, et les facteurs qui peuvent l'influencer.

Les conclusions de ces travaux montrent l'importance de cet écosystème du point de vue technologique, puisqu'il peut influencer l'état sanitaire des raisins et peut également conditionner de façon déterminante l'élaboration du vin et ses propriétés organoleptiques.

### 2.3.1 Les moisissures

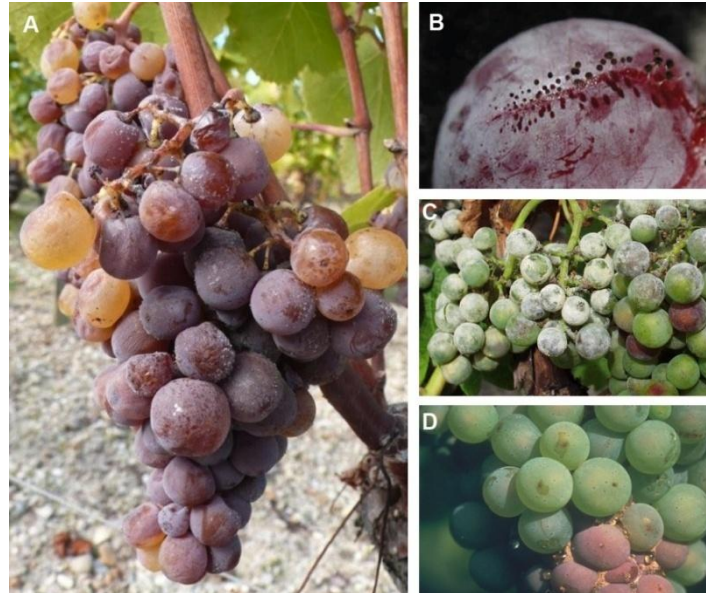
La diversité fongique des baies a été mise en évidence dans plusieurs travaux qui ont répertorié différentes espèces appartenant à plus de 30 genres de moisissures différents. *Aureobasidium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. ont été les plus fréquemment retrouvés sur raisins ( Sage et al. 2004; Bau et al. 2005; Serra et al. 2005; Doaré-Lebrun et al. 2006; Laforgue et al. 2009).

La présence des champignons sur la baie est souvent associée à un effet néfaste sur les raisins. En fait, les champignons sont à l'origine de différents types de pourritures et sont la cause de perte de rendements de récolte. *Uncinula necator*, déjà mentionné comme pathogène de la vigne, peut aussi avoir un effet nuisible sur les baies. À un stade précoce de développement de ce pathogène, il est visuellement indétectable, mais il provoque déjà un changement de la communauté microbienne (Gadoury et al. 2007), favorisant la présence de microorganismes associés à des pourritures (**Figure 5**). Une fois que le champignon se développe, la qualité et le rendement de la récolte sont gravement compromis. Les moûts et les vins provenant de baies atteintes par l'oïdium présentent ainsi des odeurs de « champignon » (Darriet et al. 2002; Stummer et al. 2005).

*Botrytis cinerea*, joue un rôle prépondérant dans le développement des pourritures du raisin. Il pénètre dans les tissus de la baie, et altère leur structure et ainsi facilite la colonisation du fruit par les levures et les bactéries d'altération (Nisiotou et al. 2011).

La pourriture grise, occasionnée par *Botrytis*, peut aussi être provoquée par d'autres champignons tels *Penicillium* et *Rhizopus*. Au delà de la formation de composés responsables des défauts du vin, ce type de pourriture induit la production par la plante de protéines liées à la pathogenèse (Girbau et al. 2004), affectant par la suite la limpidité des vins blancs.

La pourriture acide se manifeste dans les plupart des cas sur des baies à maturité avancée et riches en sucres.



**Figure 5:** Présence de moisissures dans les baies de raisin sur forme de différentes pourritures. A : Pourriture noble due à *Botrytis cinerea* (source: [www.myquem.com](http://www.myquem.com)); B : *Aspergillus carbonarius* sur une baie de raisin éclaté (Photo : B. Molot, ITV France) ; C : symptômes de l'oïdium sur grappes (source : [www.ephytia.inra.fr](http://www.ephytia.inra.fr)) ; D : grappe atteinte de pourriture grise (source : [www.inra.fr](http://www.inra.fr)).

En dehors de *Botrytis*, d'autres organismes participent activement au développement de ce type de pourriture tels que les champignons *Aspergillus carbonarius*, *Colletotrichum acutatum* (Dimakopoulou et al. 2008), les levures *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, et les bactéries *Gluconobacter* spp., *Acetobacter* spp., (Blancard et al. 2000) La pourriture noble est le seul processus de colonisation fongique où l'activité de *Botrytis* est souhaitée. En conditions climatiques particulières, le métabolisme de *Botrytis* stimule la production de précurseurs d'arômes caractéristiques des vins liquoreux issus de pourritures nobles (Thibon et al. 2009).

L'étude des interactions entre ces pathogènes fongiques et d'autres micro-organismes, a permis d'isoler des espèces ayant un effet antagoniste avéré. La lutte biologique en viticulture consiste à utiliser des micro-organismes comme principe actif (**Tableau 1**).



Micro-organisme	Pathogène cible	Nom commercial	Fabriquant
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Botrytis, Uncinula necator</i>	Serenade <sup>®</sup>	BASF
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	<i>Botrytis, Fusarium, Alternaria</i>	Mycostop <sup>®</sup>	Verdera
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	<i>Uncinula necator</i>	AC10 <sup>®</sup>	Ecogen
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Botrytis</i>	Trichodex <sup>®</sup>	Makhteshim-Agan

**Tableau 1:** Produits Phytosanitaires de type Biocontrôle utilisés en viticulture.

D'autres moisissures capables de produire des mycotoxines comme l'ochratoxine A ont fait l'objet d'études spécifiques (**Tableau 2**). Cette molécule potentiellement cancérigène pour l'homme présente des propriétés néphrotoxiques, tératogènes, immunotoxiques et lymphotoxiques (Battaglia et al. 1996). La présence de cette toxine dans le vin et les jus de raisins a été pour la première fois mise en évidence par (Zimmerli & Dick 1996).

Mycotoxines	Moisissures Responsables	Références
Aflatoxine *	<i>Aspergillus flavus, A. parasiticus</i>	Bau et al. 2000; Serra et al, 2005
Citrinine	<i>Penicillium expansum, P. verrucosum</i>	Serra et al, 2005; Bragulat et al, 2008
Ochratoxine A*	<i>Aspergillus carbonarius, A. Niger</i>	Abrunhosa et al., 2001; Battilani et al., 2001
Patuline*	<i>Penicillium expansum, P.griseofulvum</i>	Abrunhosa et al, 2001, Serra et al, 2005,
Trichothécènes*	<i>Fusarium spp, Trichotecium roseum</i>	Serra et al, 2005

**Tableau 2:** Mycotoxines produites par des moisissures de la baie de raisin. \*Mycotoxines considérées comme les plus importantes du point de vue de la santé humaine selon le Conseil pour l'Agriculture, Science et Technologie (Rapport n° 139, CAST, 2003).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur l'étude de cette flore mycotoxinogène et sur ses microorganismes potentiellement antagonistes. Au sein des genres *Aspergillus* et *Penicillium*, Serra et al (2005) mettent en évidence que *A. carbonarius* et *A. niger* sont les principales espèces productrices d'ochratoxine A. Il a été aussi montré que les régions avec un climat de type méditerranéen sont plus fréquemment concernées par ce problème (Zimmerli & Dick 1996; Serra et al. 2005) (**Tableau 3**).

Le champignon levuriforme *Aureobasidium pullulans* figure également parmi les espèces fongiques présentes sur la baie de raisin. Il est ubiquitaire dans l'environnement viticole et est reconnu comme un des genres le plus fréquent dans les baies de raisin (Barata et al.

2012). Il est particulièrement intéressant pour son effet de biocontrôle sur des pathogènes, notamment de la baie de raisin(Dimakopoulou et al. 2008; Martini et al. 2009).

Références	Sage et al. (2004)	Serra et al. (2005)	Diguta et al. (2011)	Bau et al. (2005)	Abrunhosa et al. (2001)	Guérin et al. (2007)
Origine	France	Portugal	France	Espagne	Portugal	France
Cépage	Chardonnay, Chasselas, Gamay, etc.	Non communiqué	Pinot noir	abernet Sauvignon, Garnatxa blanca,	Cépages rouges et blancs	Non communiqué
Méthode d'isolement	Lavage des baies	Baies en contact avec le milieu	Lavage des baies	Baies en contact avec le milieu	Lavage des baies	Lavage des baies
Stade phénologiques	Fin véraison et maturité,	Différents Stades de maturité,	Maturité,	Différents Stades de maturité,	Maturité et avant maturité	Non communiqué
Méthode d'identification	analyse macro et microscopique	Méthodes classiques	ITS-RFLP-Sdul, HinfI, MseI etc.	analyse macro et microscopique	analyse macro et microscopique	microscopie et séquençage ITS
<b>Acremonium spp.</b> ( <i>A. Alternatum</i> , <i>A. Egyptiacum</i> , <i>A.strictum</i> )	+	+	+	+		
<b>Aureobasidium</b> ( <i>A. Pullulans</i> )	+	+			+	
<b>Alternaria spp.</b> ( <i>A.alternata</i> , <i>A.tenuissima</i> )	+	+	+	+	+	+
<b>Arthrinium spp.</b>	+	+				
<b>Aspergillus spp.</b> ( <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. Parasiticus</i> , <i>A parasiticus</i> , <i>A. Japonicus</i> )	+	+	+	+	+	+
<b>Beauveria spp.</b> ( <i>B. bassiana</i> )	+	+				
<b>Botrytis spp.</b> ( <i>B. cinerea</i> )	+	+	+	+	+	+
<b>Chaetomium spp.</b> ( <i>C. globosum</i> )	+	+				
<b>Cladosporium spp</b> ( <i>C. cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , <i>C. sphaerospermum</i> )	+	+	+	+	+	+
<b>Drechslera spp.</b>	+	+				
<b>Emericella spp.</b> ( <i>E. nidulans</i> )	+	+				
<b>Epicoccum spp.</b> ( <i>E. nigrum</i> )	+	+	+			
<b>Fusarium spp.</b> ( <i>F. culmorum</i> , <i>F. lateritium</i> , <i>F. oxysporum</i> )	+	+	+		+	
<b>Geotrichum spp.</b>		+				+
<b>Mucor spp.</b>	+	+				+
<b>Nigrospora spp.</b> ( <i>N. oryzae</i> , <i>N. sphaerica</i> )	+	+				
<b>Paecilomyces spp.</b>	+	+				
<b>Penicillium spp.</b> ( <i>P. simplicissimum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>P. glabrum</i> , etc.)	+	+	+	+	+	+
<b>Phoma spp.</b>	+	+				
<b>Rhizopus spp.</b>	+	+				
<b>Scytalidium spp.</b>	+	+				
<b>Trichoderma spp.</b> ( <i>T. harzianum</i> , <i>T. koningiopsis</i> , <i>T. koningii</i> )	+	+	+	+		
<b>Ulocladium spp.</b> ( <i>U. atrum</i> , <i>U.botrytis</i> , <i>U. chartarum</i> )	+	+				

**Tableau 3:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des moisissures présentes dans/sur la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

### 2.3.2 Les levures

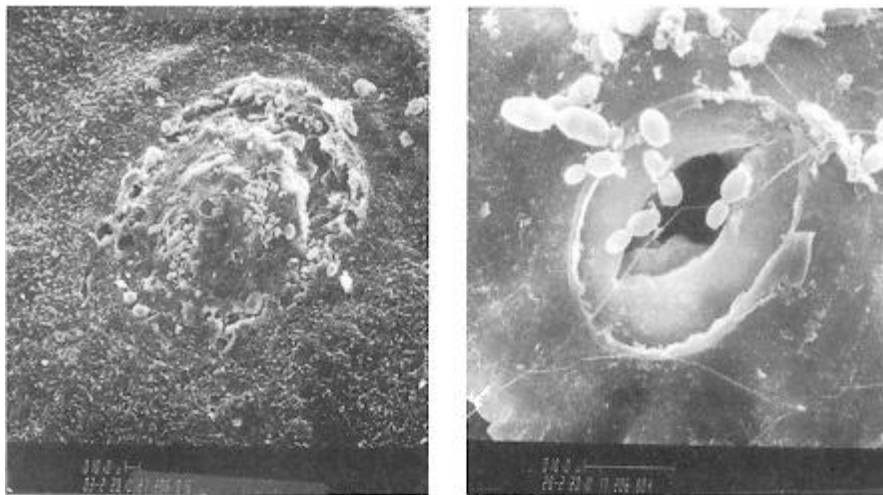
L'importance indéniable des levures dans l'élaboration du vin a conduit de nombreux chercheurs à s'intéresser à leur écologie. Néanmoins, si la communauté de levures du vin est depuis longtemps connue, celle présente dans le vignoble et en particulier dans la baie a été moins étudiée. Les premières études concernant la présence des levures dans/sur la baie de raisin ont été réalisées par Parle et Di Menna (1966), Davenport, (1973) et Belin (1981), montrant que les raisins hébergent une diversité importante de levures.

Les baies de raisin sont la source primaire de levures lors de la fermentation du moût (Fleet et al. 2002) (**Figure 6**). Dans différentes régions viticoles au monde, les travaux d'isolement et d'identifications des levures ont montré que les genres *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Dekkera*, *Schizosaccharomyces* et *Sporidiobolus* sont les plus fréquemment retrouvées (Sabate et al. 2002; Fleet et al. 2002; Prakitchaiwattana et al. 2004; Raspor et al. 2006; Nisiotou & Nychas 2007; Chavan et al. 2009). Cependant, l'agent principal de la fermentation alcoolique (*Saccharomyces cerevisiae*) est rarement isolé à partir d'échantillons de baies de raisin (Mortimer & Polsinelli 1999). D'autres espèces Non-*Saccharomyces*, comme *Issatchenkia orientalis*, *Candida zemplinina*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii* et *Hanseniaspora spp* constituent également une partie importante de la diversité de la communauté de la baie et sont présentes durant la fermentation alcoolique, en particulier lors des stades pré fermentaires (Zott et al. 2008). Ces levures peuvent être intéressantes d'un point de vue œnologique, et contribuer à la complexité aromatique des vins (Renault et al. 2009; Zott et al. 2010).

Si certaines levures présentes dans les baies de raisin peuvent participer de façon favorable à l'élaboration du vin, d'autres peuvent se développer au détriment de sa qualité (Renouf et al. 2007). C'est le cas notamment des levures du genre *Brettanomyces*, reconnues comme les principaux agents de contamination des vins rouges et qui, à partir des acides phénols présents dans le raisin, produisent des composés volatils responsables des défauts olfactifs

de caractère animal tels que l'odeur d'écurie, de sueur ou d'urine de cheval (Loureiro & Malfeito-Ferreira 2003).

De la nouaison jusque aux stades de maturité, la structure de la communauté de levures varie. Aux stades les plus précoces, les espèces *Basidiomycètes* sont dominantes, puis l'augmentation du nombre d'espèces *Ascomycètes*, notamment celles qui possèdent des capacités fermentaires, est observé aux stades de maturité (*Metschnikowia Hanseniaspora*, *Candida*, et *Pichia*) (Rementeria et al. 2003; Renouf, 2006; Barata et al 2012). Ce changement peut être lié à la disponibilité et à la composition en nutriments, puisqu'au cours du développement de la grappe, la quantité d'exsudats augmente, la teneur en sucres augmente et l'acidité diminue.



**Figure 6:** Observation de levures sur la baie de raisin en microscopie électronique à balayage. Localisation des levures dans les zones pérystomatiques. (Photo : B. Pucheu-Plante et M. Mercier, département de microscopie électronique de l'université de Bordeaux I, Traité d'œnologie, Tome I, édition Dunod).

Des autres facteurs influencent la densité et la diversité des levures de la baie (Pretorius et al. 1999). L'impact des conditions climatologiques a été évalué dans différentes études. (Combina et al. 2005) a conclu que les périodes de pluviosité avant la vendange avait une influence sur la diversité des espèces et favorisaient une augmentation du niveau de population. Les auteurs expliquent ce phénomène d'une part, par l'augmentation de la taille

des baies ce qui favorise le passage de jus à l'extérieur de la pellicule, et d'autre part, par l'humidité qui augmente l'exosmose ce qui facilite la libération des nutriments contenu à l'intérieur de la baie de raisin. Cette constatation a été aussi réalisée par (Čadež et al. 2010), qui concluent que, lors des millésimes froids et pluvieux, la population de levure est plus importante. D'autres études ont cependant montré des résultats opposés : en effet (Comitini & Ciani 2008) ont remarqué des niveaux de population inférieurs dans des années pluvieuses, et qu'un climat plus sec et chaud augmentait le nombre des levures présentes sur la baie (Rementeria et al. 2003).

Le climat peut être un des facteurs expliquant l'effet millésime et la variabilité des espèces retrouvées sur plusieurs années dans les baies d'un même vignoble (Guerzoni & Marchetti 1987; De La Torre et al. 1999; Sabate et al. 2002).

L'impact des traitements phytosanitaires de la vigne sur les populations de levures du moût en fermentation a été plusieurs fois évalué. Les travaux montrent un effet négatif sur la densité et la diversité des populations de levure, notamment sur l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Viviani-Nauer et al. 1995; Guerra et al. 1999). Néanmoins, ces résultats ne peuvent pas être extrapolés à la baie de raisin, puisque dans le moût du fait de la teneur en sucres élevée, du pH, de l'apport de dioxyde de soufre, de l'anaérobiose, la communauté des levures est différente de celle de la baie de raisin. L'impact direct des produits de traitements phytosanitaires des baies de raisin sur la communauté levure a été évalué par (Čadež et al. 2010), où il a analysé l'effet de trois produits anti-*Botrytis* (iprodione, pyrimethanil et fludioxonil plus cyprodinil). Ces résultats ont montré que le pyrimethanil et fludioxonil plus cyprodinil n'avaient pas d'effet significatif sur la population et que les baies traitées avec l'iprodione possédaient une population plus importante que les baies contrôles.

(Cordero-Bueso et al. 2011) ont comparé l'effet de deux **modes de conduite** (biologique et conventionnel), et ont observé des niveaux plus importants en terme de diversité et de densité pour la communauté levures dans les vignobles en mode biologique par rapport au mode conventionnel.

L'effet cépage a été considéré dans différentes études, montrant qu'il peut influencer la diversité (Guerzoni & Marchetti 1987) et la densité des populations de levures (Zahavi et al. 2002). Cependant, il a aussi été constaté que la population de levures pouvait varier, pour un même cépage, dans une même parcelle (Sabate et al. 2002).

Parmi les facteurs qui influent sur la diversité de la communauté microbienne de la vigne, en particulier la communauté levures, l'état sanitaire des baies est sans doute un des plus prépondérants. La dégradation de la structure de la pellicule de la baie par l'action de champignons comme *Botrytis* ou par des phénomènes climatiques comme la grêle ou par l'éclatement pelliculaire par absorption d'eau suite à des pluies, entraîne la modification de la structure de la population de levures (Nisiotou et al. 2007), notamment avec l'apparition de certaines espèces associées à des défauts du vin comme *Zygosaccharomyces bailii*, *Issatchenkia* spp. , *Kluyveromyces dobzhanskii*, *Kazachstania* sp. (Guerzoni & Marchetti 1987; Nisiotou et al. 2007).

Un autre aspect important mais beaucoup moins exploré est l'effet de biocontrôle que certaines populations de levures peuvent avoir sur des micro-organismes préjudiciables à la qualité du fruit, au déroulement de la fermentation du moût de raisin et la qualité du futur vin.

Des travaux antérieurs ont montré, au niveau de la baie, la présence d'espèces ayant un effet antagoniste sur des pathogènes comme *Botrytis* (Duhaill 1999). L'étude de facteurs influençant certains de ces effets antagonistes a été aussi réalisée (Rousseau & Doneche 2001). Néanmoins, l'information disponible reste toujours insuffisante pour comprendre les fonctions et interactions entre les levures et les champignons pathogènes (**Tableau 4a, 4b, 4c**).

Références	Parle et Di Menna (1966)	Barnett <i>et al.</i> (1972)	Davenport (1973)	Belin (1981)	Guerzoni et Marchetti (1986)	Vercesi et Locci (1989)
Origine	Nouvelle-Zélande	France	Angleterre	France	Italie -	Italie
Cépage	Pinotage et Chardonnay	Non communiqué	Non communiqué	Pinot noir et Chardonnay	Sangiovese, Rossiola	Non communiqué
Méthode d'isolement	Lavage des baies	Baies écrasées	Baies écrasées	Baies écrasées	Lavage des baies et sonication	Non communiqué
Stade phénologiques et sanitaire	Différents Stades de maturité	Maturité	Maturité et Début de maturité	Différents Stades de maturité	Maturité, Baies sains et baies atteint de Botrytis	Non communiqué
Méthode d'analyse et d'identification	Méthodes classiques (Ladder et Kreger-van Rij, 1952)	Méthodes classiques	Méthodes classiques	Méthodes classiques	Méthodes classiques (Kreger Van-Rij, 1984)	Méthodes classiques (Sneath et Sokal, 1973)
<b>Hanseniaspora- Kloechera spp.*</b> ( <i>H.uvarum</i> , <i>K.apiculata</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>H. occidentalis</i> , <i>H. Vineae</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>H. viniae</i> , <i>H. osmophila</i> , etc.)	+	+	+	+	+	
<b>Metschnikowia spp.*</b> ( <i>M. pulcherrima</i> )		+	+	+	+	
<b>Candida spp.*</b> ( <i>C. sorbosa</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. fructus</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>C. stellata/zemplinina</i> , <i>C. ethanolica</i> , <i>C. tropicalis</i> , etc.)			+	+	+	+
<b>Pichia spp.*</b> ( <i>P. membranaefaciens</i> , <i>P. anomala</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. toletana</i> )					+	+
<b>Issatchenkia spp. *</b> ( <i>I. orientalis</i> , <i>I. terricola</i> , <i>I. occidentalis</i> )					+	
<b>Zygosaccharomyces spp.*</b> ( <i>Z. bailii</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>Z. fermentati</i> )					+	+
<b>Saccharomycopsis spp. *</b> ( <i>S. vini</i> , <i>S. crataegensis</i> , <i>S. lipolytica</i> )				+	+	+
<b>Saccharomyces spp.*</b> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> )	+			+	+	
<b>Torulaspota spp.*</b> ( <i>Torulaspota delbruecki</i> , <i>Torulaspota pretoriensis</i> )						+
<b>Kluyveromyces spp.*</b>						
<b>Zygoascus spp. *</b> ( <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Zygoascus steatolyti</i> )						
<b>Brettanomyces spp.*</b>					+	
<b>Aureobasidium spp. ***</b> <i>A. Pullulans</i>		+	+	+	+	
<b>Cryptococcus spp. **</b> ( <i>Cr. Diffuens</i> , <i>Cr. Albidus</i> , <i>Cr. Uniguttulatum</i> , <i>Cr. Laurentii</i> , <i>Cr. Magnus</i> , <i>Cr. Victoriae</i> , <i>Cr. Flavescens</i> )	+		+	+	+	
<b>Rhodotorula spp.**</b> ( <i>R. mucilaginoso</i> , <i>R. minuta</i> , <i>R. laryngis</i> , <i>R. graminis</i> , <i>R. glutinis</i> )	+	+	+	+	+	
<b>Sporobolomyces spp.**</b> ( <i>S. roseus</i> )			+			
<b>Sporidiobolus spp. **</b> ( <i>S. pararoseus</i> )						

**Tableau 4a:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des levures de la baie de raisin dans différentes zones géographiques.



Références	Martini <i>et al.</i> (1996)	Sabate <i>et al.</i> (2002)	Prakitchaiwattana <i>et al.</i> (2004)	Renouf <i>et al.</i> (2005, 2007)	Nisiotou <i>et al.</i> (2007)	Barata <i>et al.</i> (2008)
Origine	Italie	Espagne	Australie	France	Grèce	Portugal
Cépage	Cabernet Sauvignon, Ciliegiole, etc.	Carinyena et Grenache	Syrah et Chardonnay	Merlot, Cabernet Sauvignon etc.	Mavroliatis et Sefka	Trincadeira Preta
Méthode d'isolement	Lavage des baies et sonication	Baies écrasées	Lavage des baies	Lavage des baies	Baies écrasées	Baies écrasées
Stade phénologiques et sanitaire	Maturité	Maturité	Dif. Stades de maturité. Bais sains et attentes de pourriture	Différents Stades de maturité	Maturité	Dif. Stades de maturité. Bais sains et attentes de pourriture
Méthode d'analyse et d'identification	Méthodes classiques (Kreger Van-Rij, 1984)	RFLP- ITS - Cfol, Haelll et HinfI	séquençage de bands de DGGE, culture et séq. du 26s	RFLP- ITS - Cfol, Haelll, HinfI; séq. bands DGGE, culture et séq. du 26s	RFLP- ITS - HinfI, Haelll, Hhal, Dral et Ddel- sequ. D1/D2 26s	RFLP- ITS - Haelll et HinfI, séquençage de D1/D2 du 26s
<b>Hanseniaspora- Kloechera spp.*</b> ( <i>H.uvarum</i> , <i>K.apiculata</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>H. occidentalis</i> , <i>H. Vineae</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>H. viniae</i> , <i>H. osmophila</i> , etc.)	+	+	+	+	+	+
<b>Metschnikowia spp.*</b> ( <i>M. pulcherrima</i> )	+		+	+	+	+
<b>Candida spp.*</b> ( <i>C. sorbosa</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. fructus</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>C. stellata/zemplinina</i> , <i>C. ethanolica</i> , <i>C. tropicalis</i> , etc.)		+		+	+	+
<b>Pichia spp.*</b> ( <i>P. membranaefaciens</i> , <i>P. anomala</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. taletana</i> )				+		+
<b>Issatchenkia spp.*</b> ( <i>I. orientalis</i> , <i>I. terricola</i> , <i>I. occidentalis</i> )				+	+	+
<b>Zygosaccharomyces spp.*</b> ( <i>Z. bailii</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>Z. fermentati</i> )				+	+	+
<b>Saccharomycopsis spp.*</b> ( <i>S. vini</i> , <i>S. crataegensis</i> , <i>S. lipolytica</i> )						
<b>Saccharomyces spp.*</b> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> )				+		
<b>Torulospora spp.*</b> ( <i>Torulospora delbruecki</i> , <i>Torulospora pretoriensis</i> )				+		+
<b>Kluyveromyces spp.*</b>				+		
<b>Zygoascus spp.*</b> ( <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Zygoascus steatolyti</i> )				+		+
<b>Brettanomyces spp.*</b>				+		
<b>Aureobasidium spp.***</b> <i>A. Pullulans</i>		+	+	+	+	
<b>Cryptococcus spp.**</b> ( <i>Cr. Diffluens</i> , <i>Cr. Albidus</i> , <i>Cr. Uniguttulatum</i> , <i>Cr. Laurentii</i> , <i>Cr. Magnus</i> , <i>Cr. Victoriae</i> , <i>Cr. Flavescens</i> )		+	+	+		
<b>Rhodotorula spp.**</b> ( <i>R. mucilaginoso</i> , <i>R. minuta</i> , <i>R. laryngis</i> , <i>R. graminis</i> , <i>R. glutinis</i> )			+	+		
<b>Sporobolomyces spp.**</b> ( <i>S. roseus</i> )				+		
<b>Sporidiobolus spp.**</b> ( <i>S. pararoseus</i> )				+		

**Tableau 4b:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des levures de la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

Références	Francesca <i>et al.</i> (2009)	Chavan <i>et al.</i> (2009)	Li <i>et al.</i> (2010)	Cordero-Bueso <i>et al.</i> (2011)
Origine	Italie	Inde	Chine	Espagne
Cépage	Greco Muscio	Bangalore blue, Zinfandel, etc.	Cabernet Sauvignon, Merlot, etc.	Syrah, Grenache et Barbera
Méthode d'isolement	Baies écrasées	Baies écrasées	Baies écrasées	Baies écrasées -mout
Stade phénologiques et sanitaire	Maturité. Baies sains, botrytisées et abimés par d'oiseaux	Maturité	Maturité	Maturité
Méthode d'analyse et d'identification	RAPD-PCR, séquençage D1/D2 région of the 26S rRNA	culture et séquençage d'ITS	RFLP- ITS -Hin6I, BsuRI, et Hinfi sur les isolats cultivés	RFLP- ITS-CfoI, HaellI et Hinfi; PCR-RAPD; Microsatellite
<b>Hanseniaspora- Kloehera spp.*</b> ( <i>H.uvarum</i> , <i>K.apiculata</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>H. occidentalis</i> , <i>H. Vineae</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>H. viniae</i> , <i>H. osmophila</i> , etc.)	+	+	+	+
<b>Metschnikowia spp.*</b> ( <i>M. pulcherrima</i> )	+		+	+
<b>Candida spp.*</b> ( <i>C. sorbosa</i> , <i>C. zeylanoides</i> , <i>C. fructus</i> , <i>C. membranifaciens</i> , <i>C. stellata/zemplinina</i> , <i>C. ethanolica</i> , <i>C. tropicalis</i> , etc.)	+	+	+	+
<b>Pichia spp.*</b> ( <i>P. membranaefaciens</i> , <i>P. anomala</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. guilliermondii</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. toletana</i> )	+	+	+	+
<b>Issatchenkia spp. *</b> ( <i>I. orientalis</i> , <i>I. terricola</i> , <i>I. occidentalis</i> )	+	+	+	
<b>Zygosaccharomyces spp.*</b> ( <i>Z. bailii</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>Z. fermentati</i> )			+	
<b>Saccharomycopsis spp. *</b> ( <i>S. vini</i> , <i>S. crataegensis</i> , <i>S. lipolytica</i> )				
<b>Saccharomyces spp.*</b> ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> )	+	+		+
<b>Torulaspota spp.*</b> ( <i>Torulaspota delbruecki</i> , <i>Torulaspota pretoriensis</i> )				+
<b>Kluyveromyces spp.*</b>				+
<b>Zygoascus spp. *</b> ( <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Zygoascus steatolyti</i> )		+		
<b>Brettanomyces spp*</b>				
<b>Aureobasidium spp. ***</b> <i>A. Pullulans</i>	+			
<b>Cryptococcus spp. * *</b> ( <i>Cr. Diffuens</i> , <i>Cr. Albidus</i> , <i>Cr. Uniguttulatum</i> , <i>Cr. Laurentii</i> , <i>Cr. Magnus</i> , <i>Cr. Victoriae</i> , <i>Cr. Flavescens</i> )			+	
<b>Rhodotorula spp.**</b> ( <i>R. mucilaginoso</i> , <i>R. minuta</i> , <i>R. laryngis</i> , <i>R. graminis</i> , <i>R. glutinis</i> )	+			
<b>Sporobolomyces spp.**</b> ( <i>S. roseus</i> )				
<b>Sporidiobolus spp **</b> ( <i>S. pararoseus</i> )			+	

**Tableau 4c:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des levures de la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

### 2.3.3 Les bactéries

La présence des bactéries dans/sur les baies de raisin est depuis longtemps démontrée (Lafon-Lafourcade et al. 1983). Les premiers travaux sur les communautés bactériennes de la baie de raisin se sont intéressés à des populations spécifiques comme les bactéries lactiques (BL) (Lafon-Lafourcade et al. 1983) et les bactéries acétiques (BA) (Joyeux et al. 1984) étant donné leur importance œnologique. Chez les bactéries lactiques, *Oenococcus oeni* est l'espèce majoritaire responsable de la fermentation malolactique (FML). Cette étape, qui succède normalement à la fermentation alcoolique, est considérée comme essentielle pour la qualité des vins rouges et de certains vins blancs. Elle permet la désacidification naturelle des vins par la transformation de l'acide malique en acide lactique, atténuant ainsi l'astringence du vin, renforçant la couleur des vins rouges et entraînant des modifications aromatiques significatives. D'autres BL du genre *Lactobacillus*, *Pediococcus*, et *Leuconostoc* ont un effet défavorable sur le vin, produisant des composés indésirables tels que les amines biogènes, et autres métabolites responsables de défauts organoleptiques (Lonvaud-Funel 1999; Lonvaud-Funel 2001). Contrairement à l'espèce *Oenococcus oeni*, la présence de ces espèces bactériennes est très fréquente dans/sur la baie de raisin (Bae et al. 2006).

Au sein des BA, *Acetobacter* et *Gluconobacter*, utilisent le sucre et l'éthanol comme source de carbone et produisent des quantités importantes d'acide acétique, compromettant ainsi la qualité du vin (Lonvaud-Funel 2001; González et al. 2005).

En dehors des BL et des BA dont l'impact direct sur le vin est bien connu, d'autres espèces peuvent également avoir un effet néfaste sur vin. Il s'agit de *Streptomyces* (La Guerche et al. 2007), dont la présence est associée à des défauts aromatiques dans le vin, notamment la géosmine responsable de l'odeur moisie-terreuse (Darriet et al. 2002).

La baie de raisin abrite également des populations bactériennes tout au long de sa croissance (Bae et al. 2006) pathogènes (**Tableau 5a, 5b**). Ainsi, au-delà des genres déjà mentionnés précédemment, des études plus récentes ont révélé la diversité de cette communauté décrivant les genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Sporolactobacillus*, *Asaia*, *Bacillus* (Bae et al. 2006), *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*,

*Enterobacter*, *Curtobacterium* (Prieto et al. 2007), *Streptomyces* (La Guerche et al. 2007), *Citrobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Providencia*, *Tatumella* (Nisiotou et al. 2011) *Paenibacillus* (Compant et al. 2011) *Exiguobacterium* (Verginer et al. 2010).

L'interaction entre la communauté bactérienne et d'autres composantes microbiennes de la baie de raisin s'avère être un phénomène complexe. L'activité de certaines bactéries peut être potentialisée par la présence de *Botrytis* (Barbe et al. 2001). Au contraire, certaines espèces comme *Brevibacterium casei*, *Brevibacterium oxydans*, *Bacillus coagulans* et le genre *Acinetobacter* peuvent inhiber le développement de ce champignon (Duhail, 1999; Grube et al. 2011).

Le champignon *Aureobasidium* montre un effet inhibiteur sur certains bacilles, alors que lui-même peut être inhibé par des souches de *Pseudomonas* (Grube et al. 2011).

Outre leur impact sur le vin et leur intérêt comme agent potentiel de biocontrôle, les communautés bactériennes de la baie de raisin, sont capables de dégrader certains herbicides. C'est le cas de l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia* (Barreiros et al. 2003; Prieto et al, 2007).

Références	Lafon-Lafourcade et al. (1983)	Joyeux et al. (1984)	Sieiro et al. (1990)	Duhail (1999)	Barbe et al. (2000)	Gonzales et al. (2005)
<b>Origine</b>	France	France	Espagne	France	France	Espagne
<b>Cépage</b>	Non communiqué	Non communiqué	Non communiqué	Sémillon, Sauvignon	Non communiqué	Grenache
<b>Méthode d'isolement</b>	Baies écrasées	Baies écrasées	Baies écrasées	Baies lavées (Le Roux et al., 1973)	Baies écrasées	Baies écrasées
<b>Stade phénologique et sanitaire</b>	Maturité et avant maturité	Maturité, Baies sains et baies atteinte de Botrytis	Maturité	Différents Stades de maturité	Différents Stades de maturité	8 et 3 jours avant vendage
<b>Méthode d'analyse et d'identification</b>	Méthodes classiques - Buchanan et Gibbons	Méthodes classiques - Buchanan et Gibbons	Méthodes classiques - Bergey's Systematic Bacteriology	Non communiqué	Méthodes classiques	RFLP et séquençage du 16S rDNA
<i>Lactobacillus</i> spp.* (L. casei, L. hilgardii, L. plantarum, L. curvatus, L. buchneri, L. mali, L. kunkeei, L. lindneri, L. brevis, etc.)	+		+			
<i>Leuconostoc</i> spp.* (Leuconostoc mesenteroides)	+					
<i>Bacillus</i> spp.* (B. coagulans, B. mycoides, B. subtilis, B. simplex)				+		
<i>Lactococcus</i> spp.* (L. lactis)						
<i>Enterococcus</i> spp.* (E. faecium, E. avium, E. durans, E. hermanniensis, E. gergoviae, E. ludwigii)						
<i>Weissella</i> spp.* (W. paramesenteroides)						
<i>Sporolactobacillus</i> spp.*						
<i>Pediococcus</i> spp.* (P. parvulus, P. damnosus, P. acidilactici)						
<i>Oenococcus oeni</i> *						
<i>Paenibacillus</i> spp.* (Paenibacillus illinoisensis)						
<i>Staphylococcus</i> spp.* (S. epidermidis)						
<i>Exiguobacterium</i> sp*						
<i>Asaia</i> spp. ** (A. Siamensis)						
<i>Acetobacter</i> spp. ** (A. Pasteurianus, A. Aceti, A. cerevisiae)		+			+	+
<i>Gluconobacter</i> spp. ** (G. oxydans, G. cerinus)		+			+	+
<i>Acinetobacter</i> spp. ** (A. Lwoffii)				+		
<i>Tatumella</i> spp. ** (T. ptyseos)						
<i>Providencia</i> spp. ** (P. rettgeri)						
<i>Stenotrophomonas</i> ** (S. maltophilia)						
<i>Citrobacter</i> spp. ** (C. freundii)						
<i>Klebsiella</i> spp. ** (K. oxytoca)						
<i>Pseudomonas</i> spp. ** (P. jessenii, P. Corrigata)						
<i>Pantoea</i> spp. ** (P. agglomerans, P. dispersa)						
<i>Serratia</i> spp. ** (Serratia rubidaea, S. marcescens)						
<i>Burkholderia</i> spp. ** (B. vietnamiensis)						
<i>Brevibacterium</i> spp. *** (B. casei, B. Oxydans)				+		
<i>Curtobacterium</i> spp. *** (C. floccumfaciens, C. pusillum)						
<i>Leifsonia</i> spp. *** (Leifsonia xyli)						
<i>Clavibacter</i> spp. *** (C. michiganensis)						

**Tableau 5a:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des bactéries de la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

Références	Bae et al. (2006)	Prieto et al. (2007)	Renouf et al. (2005 ,2007)	Nisiotou et al. (2011)	Subden et al. (2003)	Verginer et al. (2010)
Origine	Australie	Chili	France	Grèce	Canada	Autriche
Cépage	Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Syrah, etc.	Cabernet Sauvignon, Carmenère, Pinot Noir, etc.	Merlot, Cabernet Sauvignon et Cabernet Franc	Mavroliat, Sefka	Riesling "icewine"	Blaufraenkisch
Méthode d'isolement	Baies écrasées	Baies écrasées	Baies lavées	Baies écrasées	Baies écrasées	Baies écrasées
Stade phénologique et sanitaire	30 jours avant vendage et le propre jour. Baies sains et endommagées	Maturité	De la nouaison jusqu'à maturité	Maturité	Maturité	Maturité
Méthode d'analyse et d'identification	DGGE- analyse séquençage du 16S rDNA	RFLP et 16S-23S rDNA, AP-PCR, séquençage du 16S rDNA	DGGE. Fragments de 250pb du gène rpoB	DGGE, RFLP région V1-V3 du 16S rDNA	Méthodes classiques Biolog Micro plates TM Bergey's Systematic	Séquençage du 16S rDNA
<b>Lactobacillus spp.*</b> (L. casei, L. hilgardii, L. plantarum, L. curvatus, L. buchneri, L. mali, L. kunkeei, L. lindner, L. brevis, etc.)	+	+	+	+		
<b>Leuconostoc spp.*</b> (Leuconostoc mesenteroides)						
<b>Bacillus spp.*</b> (B. coagulans, B. mycoides, B. subtilis, B. simplex)			+	+		+
<b>Lactococcus spp.*</b> (L. lacti)	+					
<b>Enterococcus spp.*</b> (E. faecium, E. avium, E. durans, E. hermanniensis, E. gergoviae, E. ludwigii)	+	+	+	+		
<b>Weissella spp.*</b> (W. paramesenteroides)	+					
<b>Sporolactobacillus spp.*</b>	+					
<b>Pediococcus spp.*</b> (P. parvulus, P. damnosus, P. acidilactici)			+	+		
<b>Oenococcus oeni *</b>			+			
<b>Paenibacillus spp.*</b> (Paenibacillus illinoisensis)						+
<b>Staphylococcus spp.*</b> (S. epidermidis)		+			+	
<b>Exiguobacterium sp.*</b>						+
<b>Asaia spp.**</b> (A. Siamensis)	+					
<b>Acetobacter spp.**</b> (A. Pasteurianus, A. Aceti, A. cerevisiae)		+				
<b>Gluconobacter spp.**</b> (G. oxydans, G. cerinus)		+	+		+	
<b>Acinetobacter spp.**</b> (A. Lwoffii)		+				
<b>Tatumella spp.**</b> (T. ptyseos)					+	
<b>Providencia spp.**</b> (P. rettgeri)					+	
<b>Stenotrophomonas**</b> (S. maltophilia)		+				
<b>Citrobacter spp.**</b> (C. freundii)					+	
<b>Klebsiella spp.**</b> (K. oxytoca)						
<b>Pseudomonas spp.**</b> (P. jessenii, P. Corrigata)			+			+
<b>Pantoea spp.**</b> (P. agglomerans, P. dispersa)					+	+
<b>Serratia spp.**</b> (Serratia rubidaea, S. marcescens)		+	+		+	
<b>Burkholderia spp.**</b> (B. vietnamiensis)			+			
<b>Brevibacterium spp.***</b> (B. casei, B. Oxydans)						
<b>Curtobacterium spp.***</b> (C. flaccumfaciens, C. pusillum)					+	
<b>Leifsonia spp.***</b> (Leifsonia xyli)		+	+			
<b>Clavibacter spp.***</b> (C. michiganensis)						+

**Tableau 5b:** Inventaire des travaux portant sur l'étude des bactéries de la baie de raisin dans différentes zones géographiques.

Les travaux réalisés jusqu'à présent ont révélé que la baie de raisin héberge un écosystème microbien riche et complexe. Ces études ont contribué à une meilleure connaissance de ces communautés en répertoriant de nombreuses espèces et en analysant les facteurs d'impact. Cependant, les méthodologies et approches utilisées présentent parfois des limites dans la mesure où l'information générée est insuffisante pour appréhender l'écosystème microbien dans sa globalité.

Une partie de ces études, basées sur l'analyse des populations cultivables, utilisent des milieux de culture riches en nutriments, adaptés à espèces copiotrophiques de type fermentaire. Ces milieux, dont la composition diffère considérablement de la composition de la baie de raisin, favorisent la croissance de certains types d'espèces au détriment d'autres.

Par ailleurs, les méthodes le plus souvent utilisées pour la récupération des micro-organismes de la baie, consistent à écraser les fruits. Cette procédure provoque un changement brutal de milieu, passant d'un milieu solide et relativement pauvre en substrat comme les baies, à un milieu liquide, le moût de raisin, hyperosmotique du fait de sa richesse en sucre et avec un pH acide. Ce changement exerce une pression sélective importante, réduisant ainsi drastiquement la diversité microbienne.

Les travaux de Prakitchaiwattana et al. 2004, Renouf et al. 2005 et Renouf et al. 2007, consistant à analyser la biomasse directement récupérée de la baie de raisin, s'affranchissent des étapes de culture. Ces résultats, utilisant comme méthodes d'empreinte moléculaire la PCR-DGGE, ont révélés une structure de population susceptible d'être influencée par différents facteurs. Ce type d'approche semble essentiel dans le cadre d'études de cet écosystème microbien afin de pouvoir comprendre sa structure, son fonctionnement et les facteurs d'impact.

Les travaux sur la communauté bactérienne et levures de la baie de raisin visent surtout l'étude des espèces d'intérêt œnologique, intervenant dans le processus fermentaire. Les rôles de cette communauté microbienne dans la qualité du raisin et les phénomènes d'interaction entre espèces notamment avec des pathogènes sont beaucoup moins étudiés.

Un des principaux intérêts de l'étude de ces interactions, est d'identifier des souches ayant des effets inhibiteurs sur des phytopathogènes, et de pouvoir utiliser ces micro-organismes comme agents dans la lutte biologique.

Les préoccupations environnementales actuelles conduisent les viticulteurs à s'orienter vers des modes de production agricole raisonnés, particulièrement en ce qui concerne l'utilisation de produits phytosanitaires.

À la suite du Grenelle de l'environnement, le plan Ecophyto 2018 a établi comme objectifs la réduction de 50 % de l'usage des pesticides au niveau national dans un délai de dix ans.

A cet égard, la lutte biologique des nuisibles de la vigne utilisant des micro-organismes pourrait constituer une solution alternative intéressante, et il apparaît donc essentiel de mieux connaître l'écosystème microbien de la baie de raisin.

### **3. Méthodes d'analyse en écologie microbienne**

#### **3.1 Analyse des communautés microbiennes par les méthodes classiques**

Les techniques classiques de microbiologie contribuent d'une façon importante à l'étude des écosystèmes microbiens. Parmi elles, la culture des micro-organismes, l'observation microscopique et les tests biochimiques, sont des outils souvent utilisés dans ce type d'études.

L'utilisation des milieux cultures sélectifs pour étudier la composition spécifique des communautés microbiennes fait l'objet de vifs débats (Hill et al. 2000; Ritz 2007; Nichols 2007). Même si ces méthodes donnent des résultats peu représentatifs des communautés (revue par Amann et al. 1995), elles sont toujours utilisées afin d'étudier la fonction et la contribution écologique de certaines espèces ou groupes particuliers de populations (Ellis et al. 2003; Köpke et al. 2005). Les avantages et inconvénients de ces techniques seront discutés en détails dans la section 3.3.



### 3.1.1 Milieu de culture sélectif, d'enrichissement et d'isolement

L'étalement d'un échantillon environnemental sur un milieu de culture, permet la multiplication des microorganismes visant soit à l'isolement clonale soit à l'estimation du nombre de microorganismes cultivables.

La quantification de micro-organismes à partir de milieux de culture, repose sur le principe qu'un microorganisme, après incubation, génère une colonie repérable macroscopiquement. Néanmoins, les microorganismes peuvent exister sous la forme de groupements d'individus, qui ne formeront qu'une seule colonie, ainsi, les résultats de dénombrements seront exprimés en Unité Formant Colonie (UFC) et non en nombre de cellules.

L'utilisation de méthodes dites « culture dépendante » pour la quantification de micro-organismes est limitée par plusieurs facteurs. Cette technique illustre de façon restreinte la diversité et l'abondance des microorganismes dans un échantillon. (Staley & Konopka 1985), ont décrit les limites inhérentes à ces méthodes. Ils montrent que seulement une fraction entre 0,001 et 15 % de bactéries présentes dans différents échantillons peuvent être cultivables. La cultivabilité des micro-organismes dépend du type de milieu utilisé et des conditions de culture. Un seul milieu ne peut pas reproduire toutes les conditions environnementales auxquelles une diversité de microorganismes est soumise pour sa croissance (Davis et al. 2005). Un milieu de culture générique sous conditions d'incubations standard est donc inadapté à la croissance de l'ensemble des microorganismes dans un échantillon, surtout si ceux-ci proviennent d'environnements extrêmes à fort gradient physico-chimiques.

Plusieurs travaux ont simulé des conditions de croissance environnementale en milieu de culture synthétique, en adaptant les concentrations en nutriments (Bruns et al. 2002; Connon & Giovannoni 2002; Cho & Giovannoni 2004), en augmentant les périodes d'incubations (Stevenson et al. 2004; Davis et al. 2005), en ajoutant des molécules signales dans la communication intercellulaire (Bruns et al., 2002), en permettant le contact avec la source environnementale par l'utilisation de membranes et en utilisant dans la composition du milieu des substrats provenant de l'environnement d'origine des microorganismes étudiés

(Bruns et al., 2002; Connon & Giovannoni, 2002; Kaeberlein et al. 2002 ; Cho & Giovannoni 2004).

Ces études, tentant de faire correspondre les conditions *in vivo* avec les conditions *in vitro*, ont montré une augmentation significative de la diversité et de la quantité des micro-organismes cultivables.

### **3.1.2 Tests biochimiques et profils d'activité métabolique**

L'étude d'une communauté microbienne peut être réalisée d'un point de vue de la diversité génétique mais aussi dans un point de vue du potentiel métabolique. La corrélation entre ces deux approches a été le sujet de nombreux travaux de recherches (Giller et al. 2004; Findlay & Sinsabaugh 2006; Bertilsson et al. 2007). La réponse métabolique d'une communauté face à des facteurs biotiques ou abiotiques reste un facteur important pour la caractérisation fonctionnelle de cet écosystème.

L'analyse de la diversité métabolique peut être réalisée en examinant le comportement catabolique d'un individu ou d'une communauté vis à vis de plusieurs substrats. Les données concernant la dégradation de ces substrats peuvent être rassemblées formant ainsi un profil métabolique. Bochner 1989 propose l'utilisation de systèmes de microplaques (Biolog ®), contenant différents substrats carbonés pour réaliser l'identification de différentes souches de bactéries. Plus tard, (Garland & Mills 1991) ont adapté son utilisation à l'étude des communautés microbiennes.

Les empreintes métaboliques générées par cette méthode, nommées par Lehman et al. 1995 Community Level Physiological Pattern (CLPP), seront la base de plusieurs études en écologie microbienne (Insam et al. 1997). Le carbone étant un facteur clé dans plusieurs écosystèmes microbiens (Grayston et al. 1998), l'utilisation de cette technique apparaît comme tout spécialement adaptée pour la détermination de la versatilité métabolique d'un échantillon environnemental.

### **3.2. Analyse des communautés microbiennes par les méthodes de biologie moléculaires**

L'émergence de la biologie moléculaire a amené des changements considérables dans la manière d'aborder la microbiologie environnementale, apportant un large éventail de

techniques et de méthodes. Cette nouvelle approche a permis d'élargir les champs d'investigations et l'horizon des connaissances, contribuant ainsi à une vision différente des l'écosystème microbien.

La nouveauté de ces approches est l'analyse génétique des espèces préalablement cultivées ou de l'ADN total directement extrait des échantillons environnementaux. Ce deuxième cas peut être particulièrement intéressant, car il permet d'appréhender des communautés microbiennes i) soit par des « approches de type meta-génomique » à partir du séquençage de l'ADN directement extrait d'un échantillon, évitant ainsi des étapes de clonage ou d'amplification (Shendure & Ji 2008) ii) soit en ciblant des gènes sélectionnés pour leur intérêt en analyse taxonomique : les gènes de l'ARN ribosomiques (16S, 26S) ou les gènes dits fonctionnels associés à des fonctions écologiques spécifiques (*rpoB*, *nifH*, *nirS*, etc.) (Dahllöf et al. 2000).

### **3.2.1 Les marqueurs moléculaires (gènes cibles)**

Parmi différents marqueurs génétiques possibles, l'ADNr codant pour les ARN ribosomiques s'est avéré comme la cible moléculaire de choix pour les études écologiques (Giovannoni et al. 1990; García-Martínez et al. 1999; Smit et al. 1999; Anderson & Cairney 2004).

Ces séquences existent dans tous les organismes, avec une fonction conservée de part leur rôle essentiel dans le fonctionnement de la cellule : le codage de l'ARNr qui compose les ribosomes, structure responsable de la synthèse des protéines.

Ces gènes présentent l'avantage d'être constitués d'une alternance de régions variables et de régions conservées (Gutell et al. 1994; Stackebrandt et al. 2002). Les régions conservées permettent d'avoir accès à différents niveaux de taxonomie et l'identification des grands groupes de microorganismes (eucaryotes, eubactéries, archaebactéries) (Woese et al. 1990) et les régions variables permettent une identification au niveau de l'espèce (Amann et al. 1995).

Les gènes d'ADNr sont groupés sous forme d'opéron, qui peut être présents en plusieurs copies. Ces copies sont généralement identiques ou très proches en raison des fortes pressions évolutives (Hillis & Dixon 1991). Néanmoins, il a été observé des variations entre

les différentes copies au sein d'une même souche (Clayton et al. 1995). Ce fait constitue un facteur limitant à l'utilisation de ces gènes comme marqueurs moléculaires car cette hétérogénéité peut en induire une surestimation du nombre d'espèces détectées dans un échantillon environnemental.

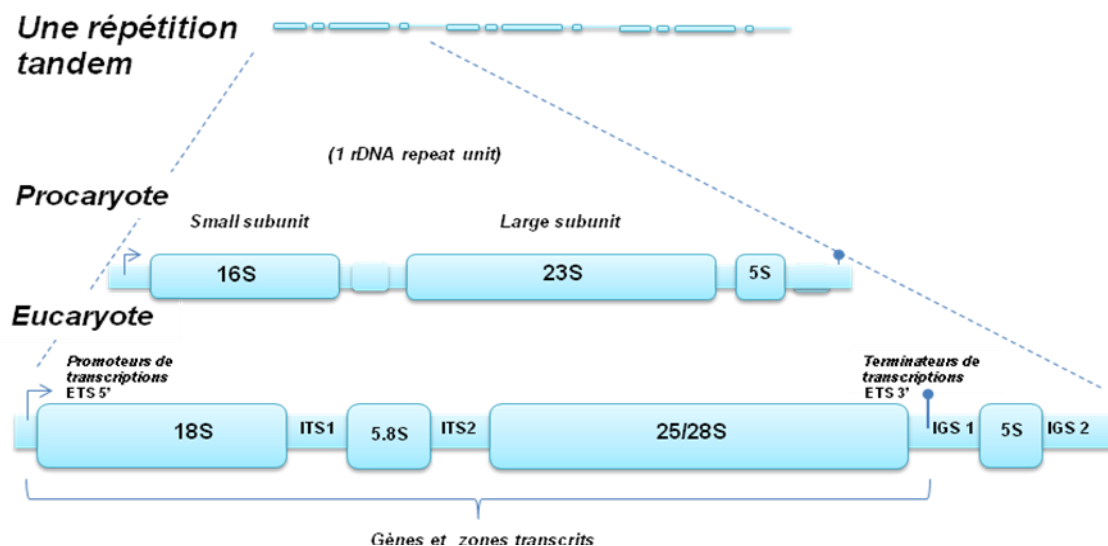
Chez les organismes procaryotes, l'opéron de l'ADNr est constitué de trois gènes, intercalés par régions séparatrices (Spacer Regions). La classification de ces gènes se fait selon leur coefficient de sédimentation exprimé en Svedberg (S): le 5S qui compte environ 120 nucléotides, le 16S qui contient environ 1 500 nucléotides nommé SSU (Small Subunit) et le 23S qui présente environ 3 000 nucléotides LSU (Large Subunit). Dans l'étude phylogénique, l'ADNr 16S a été choisi comme marqueur moléculaire préférentiel. Ce gène est constitué par différents domaines dont la vitesse d'évolution est très variable. Les parties conservées, où la vitesse d'évolution est presque nulle, sont identiques chez toutes les bactéries et sont indiqués comme sites d'hybridation pour des amorces universelles. La comparaison de ces domaines permet de déterminer les liens de parenté entre des taxons éloignés. Les domaines à vitesse d'évolution plus rapide correspondent à des régions variables, permettent l'étude des relations phylogénétiques d'espèces plus proches. Un avantage majeur lié à l'utilisation de l'ADNr 16S est la possibilité d'utiliser les autres séquences disponibles dans des bases de données bioinformatiques telles que Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), EMBL Nucleotide Sequence Database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

En ce qui concerne les microorganismes eucaryotes, l'ADNr comprend quatre gènes: 18S (SSU), 5S, 5.8S, 25/28S (LSU) de taille comprise entre 8 et 12 kb, présent en plusieurs copies disposées les unes après les autres (répétition tandem) sur un ou plusieurs chromosomes. Ces gènes sont séparés par deux types de régions: *internal transcribed spacers* (ITS1 et 2) et *intergenetic transcribed spacers* (IGS). Ces différents gènes possèdent différents taux d'évolution qui leur donne un pouvoir résolutif variable selon le niveau de la classification visé (Adachi et al. 1996).

L'ADNr 18S ne présente pas assez de variations pour permettre la distinction de groupes au niveau de l'espèce (Anderson & Cairney 2004). Pour les études au niveau de l'espèce ou

intra-espèce, d'autres marqueurs génétiques tels que la grande sous-unité ribosomale, et les régions ITS sont souvent choisis puisqu'ils présentent des séquences plus variables avec un taux d'évolution plus rapide, ce qui permet une résolution taxonomique plus importante au niveau de l'espèce (LaJeunesse 2001) (**Figure 7**).

L'ubiquité des gènes ribosomiques et la possibilité que l'ADN d'autre origine que celle de la communauté en étude, puisse être amplifié simultanément à celui envisagé, perturbent l'analyse et l'interprétation des résultats.



**Figure 7:** Représentation schématique des gènes d'ADNr de la cellule procaryote et eucaryote.

C'est le cas de l'ADN plastidial et mitochondrial, qui du fait de similitudes de région avec l'ADN bactérien, permet l'hybridation de certaines amorces universelles et par conséquent un résultat positif à l'amplification. Pour éviter que ce problème, il est nécessaire de choisir des régions que spécifiques à la communauté en question (Chelius & Triplett 2001) ou dans le cas où sa présence est inévitable, il faut donc repérer les pics ou bandes de liés à cette amplification aspécifique et les supprimer des profils obtenus (Yang & Crowley 2000).

### 3.2.2 Biais liés à l'amplification de l'ADN par PCR

Une première difficulté est liée à l'étape d'extraction de l'ADN, avec la possibilité de co-extraire des inhibiteurs de la PCR (acides humiques, tannins, etc.). Pour réduire la présence de ces substances, des étapes de purifications d'ADN sont rajoutées au protocole d'extraction. Néanmoins, une purification excessive peut induire la perte d'une fraction d'échantillons. Une autre solution pour minimiser l'effet inhibiteur de ces composés consiste à rajouter de la BSA (*bovine serum albumin*) sur laquelle ces substances se fixeront (Plante et al. 2011).

La lyse cellulaire, étape clé dans l'extraction d'acides nucléiques, peut influencer de façon déterminante la représentativité de la diversité des échantillons, dans la mesure où la constitution des tissus des certaines espèces peut amener à une lyse incomplète des cellules (Frey et al. 2006). D'autre part, l'application de protocole d'extraction trop sévère peut endommager les acides nucléiques (Wintzingerode et al. 1997).

Les biais liés à l'amplification de l'ADN par PCR, concernent le fait que, dans un mélange de séquences, il y aurait une amplification préférentielle de certaines séquences par rapport à d'autres. Cela est lié d'une part, à l'abondance de certaines séquences parmi l'ensemble et d'autre part, à la constitution de ces séquences, notamment leur richesse en bases G et C qui modifie le taux de dénaturation de l'ADN et par conséquence, le taux d'amplification (Head et al. 1998; Polz & Cavanaugh 1998).

Enfin, la formation d'hétéroduplex ou molécules chimériques due à des erreurs d'élongation peut interférer dans l'analyse, générant des bandes ou des pics difficiles à interpréter (Muyzer 1999).

### 3.2.3 Techniques d'empreintes moléculaires pour la caractérisation des communautés

Les techniques d'empreinte moléculaire sont des méthodes couramment utilisées en écologie microbienne, visant la caractérisation de communautés microbiennes. Son principe repose sur l'analyse des profils obtenus, eux-mêmes fonction de l'information génétique spécifique à un échantillon. Ces méthodes impliquent l'amplification d'un gène ou marqueur moléculaire cible, qui doit être ubiquitaire à la communauté à étudier, mais qui doit porter

une variabilité taxonomique permettant la différenciation des espèces. Les amplifiats sont ensuite traités de façon à pouvoir être distingués, illustrant ainsi la diversité sous forme d'un profil. La comparaison de ces profils permet d'évaluer des changements structurels et de diversité d'une communauté donnée. Les différentes techniques développées se différencient par les principes de séparation de l'ADN, qui peut être basés soit sur la taille des fragments amplifiés, soit sur leur constitution ou conformation secondaire ; on peut citer par exemple: DGGE/TGGE (Denaturing or Temperature Gradient Gel Electrophoresis), la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), la SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), l'ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) et la l'ARISA (Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis).

La **DGGE** et la **TGGE** initialement développée dans le domaine médical pour détecter des mutations ponctuelles impliquées dans des maladies génétiques, ont été utilisées pour des études en écologie microbienne par (Muyzer et al. 1993). Le principe de la technique consiste en une migration de fragments d'ADN sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes, entraînant ainsi une séparation des brins. La dénaturation peut être faite en fonction d'un gradient chimique utilisant le formamide ou l'urée (DGGE) ou d'un gradient de température (TGGE). La mobilité électrophorétique d'une molécule double-brin ou complètement dénaturée dans un gel de polyacrylamide est beaucoup plus importante que celle d'un fragment composé en partie de la double hélice classique et en partie de deux simples-brins. Afin d'éviter la dénaturation totale des produits PCR et par conséquent leur élution du gel, une structure à très haute température de fusion, le «GC clamp » est associée à l'ADN lors de l'amplification (Myers et al. 1985). Les propriétés de ces fragments, en ce qui concerne leur longueur et leur constitution nucléotidique (notamment leur contenu en GC), vont déterminer leur comportement migratoire, générant ainsi des profils.

Ces techniques ont été appliquées à l'étude des bactéries (Renouf et al. 2007; Nisiotou et al. 2011), des levures (Hernán-Gómez et al. 2000; Prakitchaiwattana et al. 2004; Nisiotou et al. 2007; Renouf et al. 2007) des baies de raisin et du vin, et de la communauté fongique présente à la surface de baies de raisins (Doaré-Lebrun et al. 2006; Laforgue et al. 2009). Ces méthodes sont très sensibles, permettant de distinguer deux fragments divergents d'une seule paire de bases (Muyzer 1999). Les gels de DGGE/TGGE offrent la possibilité d'exciser

des bandes d'intérêt et de les séquencer, sachant que du fait de la petite taille des fragments amplifiés, l'information relative à la séquence reste toujours limitée. Cette technique présente l'inconvénient d'être longue et laborieuse à mettre en œuvre et ne permet pas de résoudre les séquences très riches en GC (Wu et al. 1999) et les écosystèmes complexes. De la même façon, la **SSCP** a d'abord été développée pour détecter des mutations dans des gènes humains (Orita et al. 1989; Hayashi 1991), puis ensuite appliquée aux études en écologie microbienne (Lee et al. 1996; Schwieger & Tebbe 1998). Les travaux réalisés révèlent que cet outil est bien adapté pour l'étude de communautés microbiennes.

Son principe est basé sur le comportement électrophorétique de molécules d'ADN simple brin en conditions non dénaturantes. Quand elle est soumise à un refroidissement, la molécule d'ADN se plie et par des appariements internes, prend une conformation tridimensionnelle. Cet encombrement stérique, dépendant de la constitution nucléotidique, présente un comportement électrophorétique spécifique, rendant ainsi possible la séparation de mélanges complexes au sein d'une population. Ce technique permet ainsi de distinguer des amplifiats de taille similaire mais ayant des séquences nucléotidiques différentes. Les amplifiats peuvent être analysés sur un gel de polyacrylamide ou par capillarité à l'aide d'un séquenceur automatique (CE-SSCP). Dans ce dernier cas, l'amplification d'ADN implique l'utilisation d'un fluorochrome sur l'une ou les deux amorces utilisées.

La SSCP a été utilisée à plusieurs reprises pour des études de communautés microbiennes de la baie de raisin et du vin, notamment la communauté bactérienne (Grube et al. 2011) et la communauté fongique (Dellinger et al. 2006; Schmid et al. 2011).

Cette technique s'est révélée très sensible, permettant la détection d'espèces représentant moins de 1,5 % de l'ADN total extrait (Lee et al. 1996). Le principal désavantage de la SSCP réside dans la possibilité de ré-appariement des brins séparés (Lee et al. 1996; Selvakumar et al. 1997) avec pour conséquence la présence de plusieurs bandes provenant d'une seule espèce (double brin non dénaturé, simple brin Watson et simple brin Crick) (Schwieger et Tebbe, 1998). Ce problème peut être atténué par la fixation d'un groupe phosphate à l'extrémité 5' de l'ADN lors de la PCR et par la mise en œuvre d'une dénaturation utilisant l'exonucléase *lambda* (Schwieger et Tebbe, 1998).



La **T-RFLP** exploite le polymorphisme de taille de fragments amplifiés obtenu après restriction enzymatique des brins d'ADN. Cette technique, utilisée pour analyser la diversité microbienne de différents environnements (Avaniss-Aghajani et al. 1994; Liu et al. 1997; Moeseneder et al. 1999), consiste à amplifier de l'ADN en utilisant l'une ou les deux amorces marquée en 5' par un fluorochrome, suivie d'une digestion des produits de PCR par des endonucléases de restriction. De cette digestion résulte plusieurs fragments de différentes longueurs selon la séquence de l'ADN et le type d'enzyme utilisée. Ces fragments sont ensuite analysés par un séquenceur capillaire où seulement les fragments de restriction terminaux (T-RF) seront détectés et représentés sous forme de pics appelés d'OTU (*Operational taxonomic Unit*). On obtient ainsi un profil de migration (ou *électrophérogramme*), où les pics représentent les différentes tailles des fragments, et la hauteur des pics la proportion des fragments dans le produit total.

La puissance de cette analyse dépend de la performance de la digestion enzymatique, (Spiegelman et al. 2005). Le choix de sites de restriction en régions conservées génère parfois des profils similaires difficiles à distinguer ; il est alors conseillé la combinaison de plusieurs enzymes (Dunbar et al. 2001). Néanmoins, en optimisant les conditions d'analyse, la T-RFLP est une technique très sensible, qui permet la détection des espèces représentant 0,5 % de l'ADN total (Liu et al. 1997).

Que ce soit pour la CE-SSCP ou la T-RFLP, l'automatisation de la technique permet un débit d'analyse important, les profils obtenus en électrophorèse capillaire sont précis et reproductibles, présentant une haute résolution et facilitant le traitement de données.

#### **3.2.4 Avantages et inconvénients des techniques empreintes moléculaires**

La caractérisation de communautés microbiennes par des méthodes d'empreintes moléculaires peut être biaisée par des différents facteurs. Au delà des biais inhérents aux étapes préliminaires d'extraction et amplification d'ADN, ils présentent des limitations communes à toutes les techniques de profilage moléculaire.

Une des limitations de ces approches concernent les seuils de détection. Seules les populations dominantes peuvent être détectées : une espèce qui génère des bandes ou un

signal de fluorescence faible ne sera pas distinguée du bruit de fond et donc pas pris en compte pour estimer la diversité (Bent & Forney 2008).

L'existence de fragments provenant d'espèces différentes mais qui présentent le même comportement électrophorétique, fait qu'une bande ou un pic peut appartenir à plusieurs microorganismes (Gelsomino et al. 1999). Le contraire est également possible, plusieurs bandes peuvent appartenir à un même organisme du fait de l'hétérogénéité du code génétique. Les données apportées par les techniques empreintes moléculaires permettent d'accéder à la diversité d'une communauté microbienne ; néanmoins cette information est difficilement reliée à la structure fonctionnelle.

Malgré les biais et les limitations inhérentes aux techniques d'empreintes moléculaires, elles restent toujours des outils à forts potentiels pour l'étude de la diversité microbienne (Yannarell & Triplett 2005) . La richesse d'informations générée par ces techniques permet de corréler la structure d'une communauté à différents facteurs abiotiques et biotiques (Dorigo et al. 2005; Loisel et al. 2006).

Technique	Principe de séparation des fragments	Avantages	Inconvénients
DGGE/TGGE	Polymorphisme de séquences de fragments	Très sensibles, permet de distinguer deux fragments divergents d'une seule paire de bases; Possibilité d'exciser des bandes d'intérêt et de les séquencer	Longue et laborieuse à mettre en œuvre, admet seulement des fragments de faible taille, limitant l'étude phylogénique par la suite; Ne permet pas de résoudre ni des séquences très riches en GC ni des écosystèmes complexes.
SSCP	Polymorphisme de séquences de fragments	Automatisable (CE-SSCP) : Permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons; Sensible et reproductible; Dispense d'une étape de digestion enzymatique	Ré-appariement de brins : présence de plusieurs bandes provenant d'une seule espèce
T-RFLP	Polymorphisme de séquences de taille des fragments	Automatisable: Permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons; Très sensible et reproductible	Dépend de la performance de la digestion enzymatique; Intérêt de combiner plusieurs enzymes

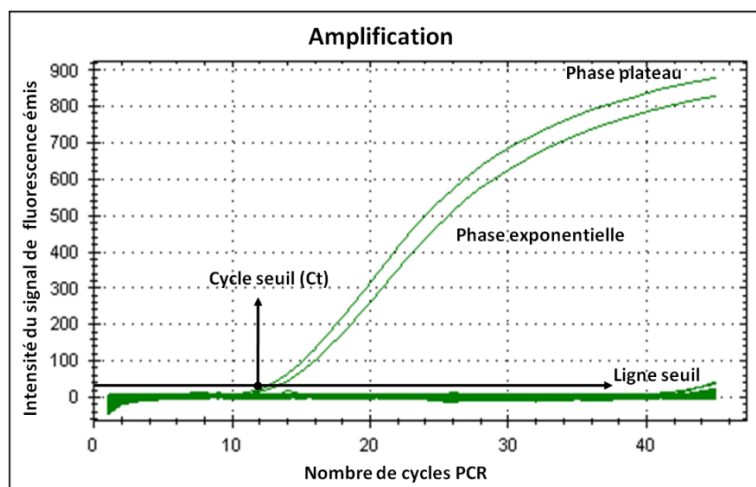
**Tableau 6:** Avantages et inconvénients spécifiques aux techniques d'empreintes moléculaires. *D'après Cho et Tiedje, (2001); Hurst (2002); Kirk et al. (2004)*

Ainsi, pour mieux bénéficier de ces techniques, il est nécessaire d'optimiser les étapes qui précèdent l'électrophorèse afin de réduire ces biais, de prendre en compte les limitations inhérentes à ces approches et de choisir la technique la plus en adéquation avec les objectifs de l'étude (**Tableau 6**).

### 3.2.5 Détection et de quantification moléculaire- PCR Quantitative

Le principe de la PCR quantitative en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent formé pendant l'amplification, dont le signal d'émission est proportionnel à la quantité d'amplicons formés (Higuchi et al. 1993). Il est ainsi possible de suivre le processus d'amplification cycle par cycle, « en temps réel ».

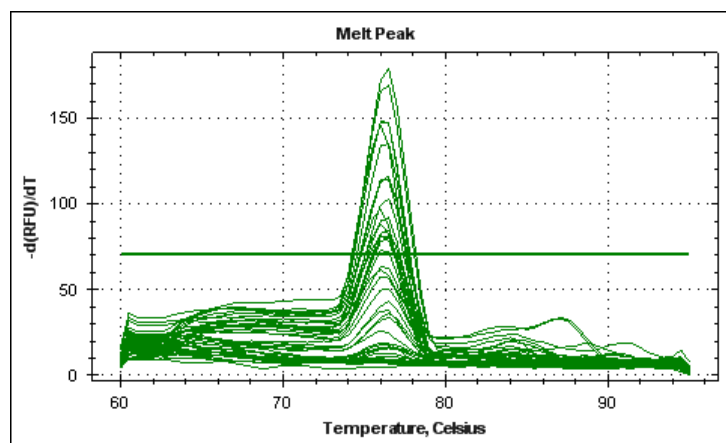
La cinétique d'une réaction de PCR en temps réel comme pour la PCR classique peut se décomposer en trois phases : phase d'initiation, phase exponentielle de croissance et phase de plateau. En PCR en temps réel, la phase initiale correspond au bruit de fond, se termine lorsque le nombre d'amplicons formés dépasse la valeur du seuil de la technique, cette valeur correspond au seuil de fluorescence à partir duquel la variation de l'intensité suit une loi exponentielle. Le cycle auquel correspond cette valeur est appelée Ct (Cycle threshold) ou Cp (Crossing Point). Il existe une corrélation directe entre la quantité de la séquence cible au départ et le Ct obtenu pour cette séquence, cette linéarité étant à la base de la quantification (Gibson et al. 1996). L'intensité du signal émis est mesurée à chaque étape d'élongation, jusqu'à la phase plateau où la fluorescence devient constante (**Figure 8**).



**Figure 8 :** Suivi en temps réel d'une PCR. Dans l'exemple ci-dessus, le cycle seuil (Ct) est d'environ 11.

Les marqueurs fluorescents utilisés en PCR quantitative sont classés selon leur spécificité : des marqueurs aspécifiques qui s'intercalent dans l'ADN double brin (ex. SYBR® Green, bromure d'éthidium), et des marqueurs spécifiques constitués d'oligonucléotides d'ADN modifié, qui fluorescent quand le fluorochrome émetteur (reporter) est libéré du fluorochrome suppresseur (quencheur) (ex. sondes Taqman®) (Morrison et al. 1998).

Le SYBR® Green est un des agents intercalant le plus souvent utilisé, il présente l'avantage d'être plus sensible que le bromure d'éthidium, plus simple d'utilisation, et n'inhibant pas la réaction. Il se fixe sur n'importe quelle molécule d'ADN double brin, sans aucune spécificité (Bustin 2000; Pfaffl 2001).



**Figure 9:** Courbe de fusion représentée par un pic unique sur la dérivée primaire de cette courbe. Dans l'exemple ci-dessus, tous les échantillons ont un  $T_m$  d'environ 76,2 °C.

La spécificité d'une réaction PCR utilisant des agents intercalants peut être vérifiée par l'analyse de la courbe de fusion, déterminée après la réaction (**Figure 9**).

La technologie basée sur le SYBR® Green présente aussi ses désavantages, notamment le mauvais appariement d'amorces qui peut générer des amplicons non spécifiques surestimant ainsi la quantification.

Les sondes telles que la Taqman® sont marquées à leur extrémité 5' par un (reporter) et à leur extrémité 3' par un (quencher) qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Lors de la PCR, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences cibles, au

passage de la Taq polymérase elle est hydrolysée, le reporter est alors séparé du quencher qui émet alors un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées.

Les sondes fluorescentes offrent une spécificité beaucoup plus importante que les agents intercalants de l'ADN. Cependant, le risque de faux négatifs est beaucoup plus élevé, du à la présence de mutations dans la région reconnue par la sonde empêchant l'hybridation.

La quantification peut se faire d'une façon absolue par étalonnage à partir d'une courbe de dilutions standards (Pfaffl 2001). La concentration absolue d'une séquence cible est ainsi déterminée et cette valeur peut être rapportée à un nombre de cellules (bactéries, levures, etc.) dans des échantillons environnementaux.

La PCR quantitative a été utilisée par plusieurs équipes comme outil de détection et de quantification de microorganismes d'intérêt œnologiques, tels que *Botrytis cinerea* (Diguta et al. 2010), les bactéries lactiques (Neeley et al. 2005) mais surtout les levures présentes dans le processus d'élaboration du vin (Phister & Mills 2003; Delaherche et al. 2004; Martorell et al. 2005; Hierro et al. 2007; Tessonnière et al. 2009; Zott et al. 2010).

### **3.2.6 Approches de type « méta »**

Le terme *métagénomique*, utilisé par la première fois par (Handelsman et al. 1998), se rapporte à l'étude des génomes de l'ensemble des organismes présent dans une niche environnementale donnée. Le principe de cette approche repose sur le séquençage de l'ensemble des acides nucléiques contenus dans un échantillon. Les méthodes métagénomique ont été appliquées à de nombreux écosystèmes et ont permis de mettre en évidence une grande variété de nouveaux génotypes (Venter et al. 2004; Gill et al. 2006; DeLong et al. 2006) mais également d'apporter des informations concernant l'abondance, la distribution des espèces et la structure fonctionnelle des communautés (Kurokawa et al. 2007).

Ces dernières années, les nouvelles techniques de séquençage ont contribué de façon décisive au développement des approches de métagénomique. Les méthodes de séquençage de nouvelle génération, appliquées soit aux gènes préalablement amplifiés soit

à l'ADN environnemental directement extrait, permettent la description de la diversité microbienne à un haut niveau de résolution, et une grande rapidité d'analyse.

Le pyroséquençage haut débit développé par la société "454 Life Sciences" (Connecticut USA) utilisant les séquenceurs GS FLX (Roche) (Margulies et al. 2005), a été appliqué pour l'étude de communautés microbiennes par des approches de métagénomique (Liu et al. 2007; Frias-Lopez et al. 2008; Schütte et al. 2008). Cette technique permet d'avoir accès à de milliers de séquences simultanément, évitant le biais du clonage, une fois que la quantité d'ADN requise est très faible (Harkins & Jarvie 2007).

Le "Illumina sequencing" ou "Solexa sequencing" est aussi une technique de séquençage nouvelle génération, souvent utilisée dans des études d'écologie microbienne (Qin et al. 2010; Lecroq et al. 2011). Elle permet un débit de séquence encore plus important que le Pyroséquençage (GS FLX titanium) (**Tableau 7**).

Méthode de séquençage	Productivité (Mb/heure)	Coût (€ par base)	Taille des séquences (pb)
Sanger (ABI 3730xl)	0,07	0,75	700 - 900
Pyroséquençage (GS FLX titanium)	400	0,0023	400
Illumina/Solexa (GAii)	2000	0,0005	35

**Tableau 7:** Comparaison des techniques de séquençage. D'après Hugenholtz P, Tyson GW: Microbiology: metagenomics. *Nature* 2008.

Néanmoins, ces deux techniques présentent l'inconvénient de générer des fragments très courts, ce qui requiert des techniques de co-assemblage de séquences, à partir d'alignements avec des données de référence et utilisant des algorithmes d'insertion/délétion (Hugenholtz 2002; Ludwig et al. 2004). Ces procédures peuvent conduire à des erreurs de

reconstruction phylogénétiques qui affectent ainsi l'interprétation des résultats (Fox et al. 1977; Liu et al. 2007).

### **3.2.7 Identification et taxonomie**

L'identification d'un microorganisme consiste à déterminer à quel groupe taxonomique il appartient. Cette notion présuppose donc une classification existante. Le processus d'identification est basé sur la comparaison des propriétés phylogéniques ou biochimiques de l'espèce isolée par rapport à plusieurs souches considérées comme représentatives.

Jusqu'au début des années 1960, la taxonomie microbienne s'appuyait sur des méthodes biochimiques et phénotypiques (taxonomie phénotypique et numérique), basées sur le comportement métabolique d'un isolat vis à vis de certains substrats et sur un nombre restreint de caractères tels que la morphologie ou la taille. Cette classification s'est révélée inefficace, fournissant peu d'information pour l'identification de beaucoup d'organismes.

Suite à l'avènement des méthodes moléculaires, (Fox et al. 1977) propose les acides nucléiques comme marqueurs de l'évolution et d'identification des organismes.

Cette nouvelle approche, basée sur le principe que chaque microorganisme possède un génome qui lui est spécifique, a pallié les limitations inhérentes aux méthodes classiques, et modifié profondément la classification des microorganismes.

L'identification moléculaire s'effectue par l'analyse comparative de séquences d'un gène ou de régions orthologues aux organismes étudiées.

Carl Woese en 1987, suggère la possibilité d'utiliser du gène de l'ADNr 16S comme marqueur de phylogénie (Woese 1987). La même année, Wayne définit l'espèce procaryote et considère que deux souches appartiennent à une même espèce si les valeurs d'hybridation ADN-ADN sont supérieures ou égales à 70 % et une valeur de  $T_m(e)$  inférieure ou égale à 5 °C (Wayne et al. 1987). Compte tenu de la généralisation de l'usage de l'ADNr pour l'identification des espèces et les progrès concernant la connaissance de la systématique bactérienne, l'International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) en 2002, a revue la définition d'espèce, considérant que des souches présentant plus de 97% d'homologie de l'ADNr appartient à la même espèce (Stackebrandt et al. 2002).

De même, la classification fongique a été longtemps basée sur des caractères phénotypiques et biochimiques. L'identification des champignons filamenteux reposait essentiellement sur les caractères culturels macroscopiques, alors que celui des levures reposait plutôt sur des tests phénotypiques. En ce qui concerne l'identification des levures, la première approche moléculaire consistait à mesurer le pourcentage de G+C des différents isolats (Price et al. 1978). Kurtzman 1993 propose la comparaison des pourcentages d'hybridation ADN-ADN pour l'étude de la systématique des levures.

L'étude de l'ADNr s'est avérée pertinente (Kurtzman & Robnett 1997), notamment la région D1/ D2 de la grande sous-unité (Kurtzman & Robnett 1998). L'information générée par ces approches conduira à des décisions taxonomiques importantes, doublant ainsi le nombre d'espèces ces 15 dernières années.

### 3.2.8 Analyse phylogénétique

La phylogénie permet d'étudier l'évolution d'objets biologiques au cours du temps et d'observer des liens de parenté entre eux, prenant comme principe fondamental que la ressemblance de deux individus est due à l'existence d'une ascendance commune. Cette analyse se fait à partir de l'étude de caractères spécifiques comparables pour plusieurs individus. La phylogénie moléculaire a pour objet l'analyse de la similarité entre séquences biologiques (ADN et protéines). Les résultats de cette analyse sont représentés sous forme graphique : arbre phylogénétique. Cette représentation graphique de la phylogenèse facilite ainsi l'interprétation des degrés de parenté entre les groupes étudiés. Plusieurs méthodes basées sur deux approches différentes permettent l'élaboration de ces arbres phylogénétiques.

Les **méthodes basées sur approches cladistique**, opère directement sur les séquences alignées, analysant les homologies, c'est-à-dire la conservation des caractères. Cette méthode utilise un scénario évolutif qui minimise le nombre total de étapes (substitutions, insertions, délétions) nécessaires pour passer d'une séquence à une autre en parcourant l'arbre phylogénétique. De méthodes comme le Maximum Parsimony et Maximum Likelihood, sont les plus utilisées dans ce type d'approche. La première, permet la construction d'un arbre en minimisant le nombre de substitutions (Insertions, délétions,



etc.), c'est la méthode qui demande le minimum d'hypothèses de transformations de caractères. Le Maximum Likelihood cherche une conformation qui en termes de probabilité représente mieux le modèle évolutif.

Les **méthodes phénétiques** (ou de distances) utilise le calcul préalable de la distance entre deux taxons. Cette distance est inscrite dans une matrice qui servira de base à la construction des arbres. UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) et Neighbor- Joining sont deux exemples de méthodes couramment utilisées.

La méthode UPGMA calcule la distance entre des séquences deux à deux pour générer une matrice de distance avec l'ensemble des séquences étudiées. Elle contraint les distances à être ultra-métrique, et donc qu'elles évoluent à une vitesse constante; sachant que cette hypothèse est rarement confirmée, cette méthode devient inappropriée dans l'étude des phylogénies. Le Neighbor Joining est la méthode de distances préconisée actuellement. Elle tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation différent sur les branches prenant en compte la divergence moyenne de chaque séquence avec toutes les autres.

Le simple comptage des différences entre deux séquences peut sous-estimer le nombre d'évènements mutationnels. Afin de corriger ce biais, des hypothèses ont été proposées pour expliquer la façon dont les bases ou acides aminés se sont substituées à un locus donné. Pour répondre à ce problème Kimura (1980) a proposé un modèle de correction.

L'objectif est de tenter de restituer au mieux la distance réelle, en prenant en compte les homéoplasies possibles dans les séquences et en supposant une fréquence plus importante pour les transitions que les transversions, ce qui permet d'estimer les distances évolutives en termes de nombre de substitutions de nucléotides.

### **3.3. Méthodes culture dépendante et culture indépendante- avantages et inconvénients - la complémentarité d'information**

Les outils moléculaires basés sur des méthodes culture indépendante présentent l'avantage d'accéder à un grand nombre des espèces présentes dans une communauté, y compris les

microorganismes non cultivables. Néanmoins, cette globalité d'accès représente ainsi l'ADN total des microorganismes qui sont sous différentes formes, ceux qui sont dormant ou ne contribuent pas au système fonctionnel d'un écosystème et ne prend donc pas en considération l'activité cellulaire. Les méthodes de culture dépendante malgré tous les biais qui leur sont associés, restent toujours importantes pour les études en écologie. Elles permettent l'isolement d'espèces pour la mise en collection, leurs analyses postérieures et fournissent des informations sur le potentiel fonctionnel d'un écosystème (Ellis et al. 2003)

L'application de ces deux méthodes doit donc se faire en synergie, de sorte que la complémentarité des informations générées puisse contribuer à une meilleure compréhension des écosystèmes microbiens (Nichols 2007).

## **CHAPITRE II- MATERIELS ET METHODES**

## 1. Dispositif expérimental et choix des parcelles d'étude

Pour étudier la dynamique de la population microbienne au cours des différents stades phénologiques et évaluer l'impact de facteurs abiotiques tel que le micro-climat et les pratiques culturales (mode de conduite), plusieurs parcelles de la région du Libournais ont été choisies. Cette région regroupe autour de la ville de Libourne et le long de la rive droite de la Dordogne, les vignobles de Saint-Émilion, Pomerol, Lalande de Pomerol, Fronsac, Canon-Fronsac, et les vignobles des Côtes de Castillon et des Côtes de Francs. Les sols de cette zone sont variés: graves, sables alluvionnaires, argilo-sableux, marnes, argileux, calcaires. Le climat est océanique tempéré avec la présence d'un micro-climat décrit sur certaines zones de cette région (Bois 2007).

Cette région présente des conditions compatibles avec la pratique de l'agriculture biologique en viticulture. Les différences entre viticulture biologique et conventionnelle s'expriment au niveau de la conduite de la vigne, notamment en ce qui concerne la lutte cryptogamique et l'entretien du sol. Les exigences agronomiques en viticulture biologique excluent l'utilisation de produits de traitement de synthèse et le désherbage chimique est interdit sur les parcelles destinées à obtenir l'appellation « vin issu de viticulture biologique ». La protection du vignoble se fait surtout avec des produits d'origine naturelle tels que le soufre et le sulfate de cuivre.

La région du Libournais, regroupant plusieurs exploitations viticoles en culture conventionnelle et en culture biologique de la vigne, avec un historique des itinéraires techniques précis, a donc été choisie pour conduire notre étude sur l'écosystème de la baie de raisin et répondre aux différents objectifs du projet.

Trois zones ont été sélectionnées : Pomerol, Lussac, Puisseguin (**Figure 10**). Sur chaque zone, deux propriétés, l'une en viticulture conventionnelle, la seconde en viticulture biologique ont été sélectionnées. Le critère du choix des parcelles a été la proximité géographique des deux types de culture sur une même zone (caractères physico-chimiques des sols et conditions micro-climatiques identiques) et l'homogénéité du vignoble par rapport l'âge des pieds de vigne, taille et opérations en vert, tout en s'assurant qu'il n'y ait pas d'échanges possibles entre la parcelle biologique et la parcelle conventionnelle, notamment lors des traitements phytosanitaires.

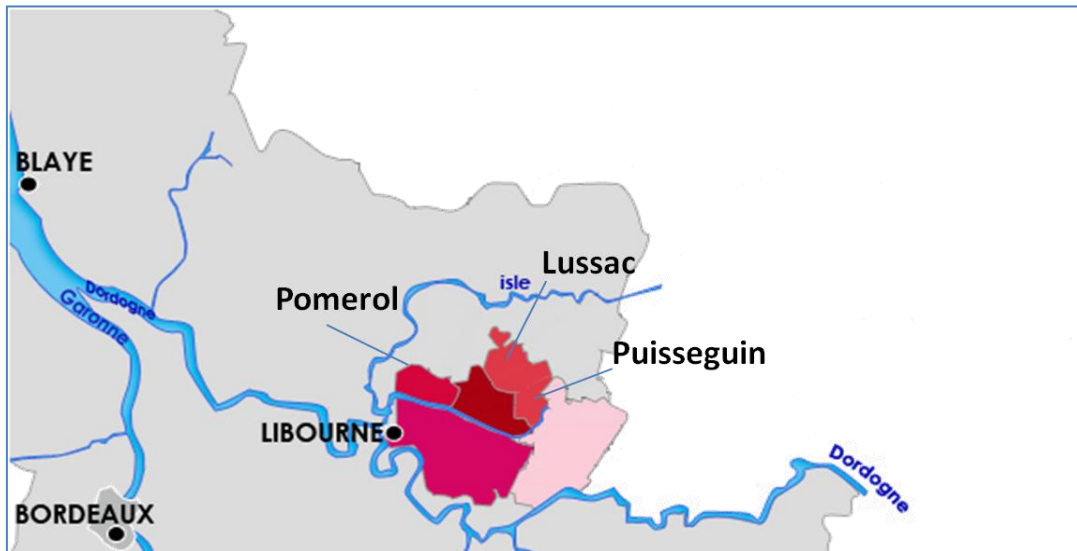


Figure 10: Carte des zones de prélèvements de la région du Libournais.

Le merlot, cépage dominant dans cette région, est présent sur les 6 parcelles. Par ailleurs, les trois zones présentent des contrastes micro-climatiques, afin d'étudier l'incidence du micro-climat sur la diversité des communautés microbiennes présentes sur les baies de raisin. Pomerol est considéré comme un terroir chaud et précoce, comparativement à Lussac, défini comme un terroir plus frais, et Puisseguin présentant un micro-climat intermédiaire (Bois 2007). Les propriétaires et responsables viticoles des différentes parcelles sélectionnées ont été contactés et rencontrés. Ils se sont engagés dans le projet en permettant l'accès à leur parcelle, les prélèvements à différents stades phénologiques de la vigne et du raisin (**Tableau 8**), et en communiquant les dates et informations sur les traitements phytosanitaires et le travail du sol réalisés. Ces données seront prises en considération lors de l'interprétation des résultats.

Les baies de raisin ont été échantillonnées sur les différents sites de juillet à septembre ou octobre selon les années, de la nouaison à la maturation et ce jusqu'à maturité avancée (**Figure 11**), pendant les campagnes de 2008, 2009, 2010 et 2011 pour Lussac et pendant les campagnes de 2009, 2010 pour Pomerol et Puisseguin.

Par ailleurs, sur les parcelles à Lussac, des prélèvements d'écorces de vigne et de sol à proximité des pieds de vigne ont été réalisés afin d'étudier l'incidence potentielle de la

microflore du sol comme source d'inoculum et de structuration de la communauté microbienne de la baie de raisin. Ces prélèvements ont été effectués en septembre 2009 lors d'une période active du point de vue de la phénologie de la plante et dans un deuxième temps, en janvier de 2010, quand la vigne se trouve dans une période de repos végétatif.

Pour évaluer l'impact du développement de *Botrytis* sur cet écosystème, des parcelles expérimentales (témoin traité et non traité vis à vis de *Botrytis*), ont été choisies. Situées sur le site de l'INRA de Bordeaux Grande Ferrade, ces parcelles ont été suivies en collaboration avec l'UMR 1065 Santé et Agroécologie du vignoble INRA – Bordeaux Sciences Agro, ISVV, IFR 103. Ce suivi permet d'intégrer aux données microbiologiques des données concernant les constituants de la pellicule des baies (exsudats, activité de l'eau Aw).

Parcelles	Année/Stades Phénologiques				
	2008	2009	2010	2011	
Libournais	<b>Pomerol</b> (Parcelles Biologique et Conventionnel)		34 Début de véraison	34 Début de véraison	
			35 Mi-véraison	35 Mi-véraison	
			37 Début de maturité	36 Début maturité	
			38 Maturité	37 Début maturité II	
			39 Maturité avancée	38 Maturité	
				39 Maturité avancée	
	<b>Lussac</b> (Parcelles Biologique et Conventionnel)	36 Début de maturité	34 Début de véraison	34 Début de véraison	36 Début Maturité
		37 Début de maturité	35 Mi-véraison	35 Mi-véraison	38 Maturité
		38 Maturité	37 Début de maturité	36 Début maturité	39 Maturité Avancée
		39 Maturité avancée	38 Maturité	37 Début maturité II	
			39 Maturité avancée	38 Maturité	
				39 Maturité avancée	
	<b>Puisseguin</b> (Parcelles Biologique et Conventionnel)		34 Début de véraison	34 Début de véraison	
			35 Mi-véraison	35 Mi-véraison	
			37 Début de maturité	36 Début maturité	
		38 Maturité	37 Début maturité II		
		39 Maturité avancée	38 Maturité		
			39 Maturité avancée		
Grande Ferrade (INRA)	<b>Parcelle expérimental</b> Traitée et Non Traités vis à vis Botrytis		34 Début de véraison	33 Fermeture grappe	36 Début Maturité
			35 Mi-véraison	34 Début véraison	38 Maturité
			37 Début de maturité	35 Mi-véraison	39 Maturité Avancée
			38 Maturité	36 Début Maturité	
			39 Maturité avancée	37 Maturité I	
				38 Maturité II	
				39 Mat avancée I	
				39 Mat avancée II	
Autres	<b>Médoc</b> Traitée et Non Traités vis à vis Botrytis				36 Début Maturité
					38 Maturité
					39 Maturité Avancée

**Tableau 8:** Récapitulatif de prélèvements réalisés au cours de cette étude. Les numeros correspondent aux stades phénologiques de la vigne selon l'échelle d'Eichhorn et Lorenz modifiée d'après (Coombe 1995)

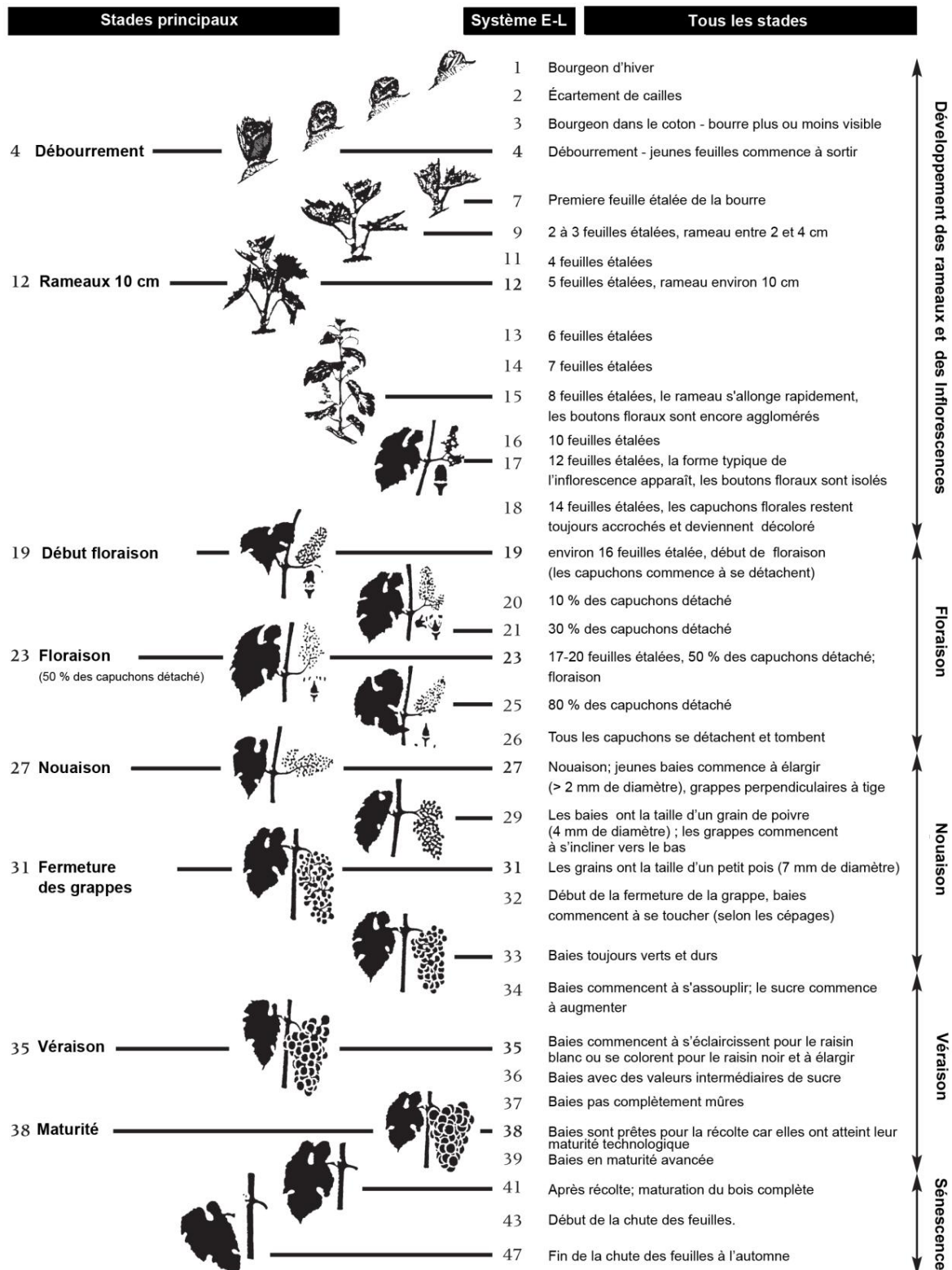


Figure 11: Les stades phénologiques de la vigne, échelle d'Eichhorn et Lorenz modifiée (d'après Coombe, 1995).

## 2. Échantillonnage et récupération d'une suspension cellulaire

Pour tenir compte la variabilité intra-parcellaire, trois points/ceps ont été repérés par parcelle et identifiés, en considérant la position du cep dans le rang, le rang dans le vignoble et l'état général du cep afin d'assurer une représentativité / homogénéité parcellaire. Pour chaque point, les quatre pieds adjacents ont été choisis, constituant ainsi une placette de cinq pieds de vigne par point.

Sur ces points, les baies ont été prélevées stérilement aux différents endroits des grappes (haut, bas, ailes), placées dans des poches de plastique stérile et traitées ultérieurement dans le laboratoire de notre unité.

Par point, environ 400 gr de raisin sont prélevés et 250 baies sont sélectionnées de façon aléatoire puis mises dans une solution de lavage constituée par 0,1% de peptone et 0,01 % de Tween 80. Les baies sont mises en agitation pendant une heure à température ambiante, cette étape permet de « décrocher » les micro-organismes présents à la surface des baies. La suspension cellulaire va ainsi servir pour partie à la culture et isolement de microorganismes et l'autre partie est filtrée sur une membrane circulaire en acétate de cellulose de 47 mm de diamètre et 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité (Sartorius AG, Göttingen, Germany). C'est donc à partir de ces filtres contenant la biomasse que les extractions d'ADN seront réalisées.

## 3. Culture et isolement de microorganisme

### 3.1 Les milieux sélectifs

La dynamique des communautés microbiennes cultivables a été suivie à partir de l'ensemencement de la suspension cellulaire obtenue par lavages de baies sur quatre milieux sélectifs, ciblant des groupes spécifiques de populations microbiennes. i) la communauté totale des levures, ii) la communauté totale bactérienne aérobie ou aérotolérante iii) les bactéries Gram négatif aérobies (principalement des bactéries



acétiques) iv) les bactéries Gram positif anaérobies et anaérobies facultatives (principalement les bactéries lactiques).

**i)** Le milieu Levure Total (LT) permet le dénombrement de la communauté totale des levures. C'est un milieu de base YPD constitué de 10 g /L d'extrait de levure, 10 g /L de bactopeptone, 20 g /L de D-glucose. Le pH est ajusté à 4,8 avec l'acide orthophosphorique. Pour inhiber la croissance des champignons et des bactéries, le milieu a été supplémenté respectivement en biphenyl (150 mg /L, Fluka, France), et en chloramphénicol (100 mg /L, Sigma Aldrich, France)

**ii)** Le milieu LB Dil  $1/10^{\text{ème}}$ , permet le dénombrement de la communauté bactérienne globale. Il s'agit d'une formulation du milieu *Lysogène Broth* dilué au dixième constitué de 1 g /L d'extrait de levures, 1 g /L bactotryptone, 0,5 g /L NaCl. Le pH a été ramené à la neutralité (pH=7). Pour inhiber la croissance des champignons, du biphenyl a été rajouté à la même concentration que dans le milieu LT.

**iii et iv)** Pour le dénombrement des populations de bactéries acétiques (BA) et lactiques (BL), un même milieu de base est utilisé, composé de 5 g /L d'extrait de levures, 1 mL /L de Tween 80 et 250 mL /L de jus de raisin ; le pH est ajusté à 4,8 avec du KOH. Dans le milieu BA, de la piméricine (100 mg /L, DSM, Nederland) comme antilevure et de la pénicilline (12.5 mg /L, Sigma Aldrich, France) sont rajoutés ; dans le milieu BL, seule la piméricine est ajoutés à la même concentration que dans le milieu BA.

Dans tous les milieux, 20 g /L d'agar sont ajoutés au milieu liquide avant stérilisation (121 °C, 15 min). Les milieux ensemencés sont incubés à une température de croissance de 25 °C. Pour les milieux LT, LB Dil  $1/10^{\text{ème}}$  et BA, la période d'incubation dure cinq jours ; pour le milieu BL, la période est de 10 jours en atmosphère anaérobie.

### 3.2 Dénombrements

Un volume de 0,1 mL d'échantillon non dilué ainsi que des séries diluées sont étalés en surface du milieu gélosé en triplicata. Après une période d'incubation spécifique à chaque culture, les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont dénombrées. Le volume ensemencé est rapporté à la quantité de raisin traité par échantillon et le résultat est

exprimé en Unités Formant Colonie par gramme de raisin (UFC /gr de raisin). La valeur obtenue correspond à une moyenne du triplicata (9 comptages).

### **3.3 Mise en collection**

Pendant les différentes campagnes, plusieurs colonies de levures et de bactéries ont été isolées. Ces isolats ont été inoculés dans 1 mL de milieu liquide avec la même composition de celle d'où ils ont été isolés. Après une période d'incubation de cinq jours, 0,5 mL de glycérol ont été ajoutés en tant qu'agent cryoprotecteur et le milieu a été homogénéisé. Le mélange placé dans des tubes NUNC™ (Nunc, Roskilde, Denmark) a été mis en conservation à -80 °C. Ces microorganismes ont été par la suite analysés par le Centre de Ressources Biologiques Œnologie ([www.crboeno.univ-bordeauxsegalen.fr](http://www.crboeno.univ-bordeauxsegalen.fr)) où après une procédure d'identification, ils ont intégré la collection.

## **4. Test biochimiques et d'activité métabolique**

### **4.1 Profils physiologiques des communautés microbiennes - détermination de la diversité métabolique**

Les profils physiologiques des communautés microbiennes (*Community Level Physiological Profil- CLPP*) ont été déterminés en analysant l'utilisation des différentes sources de carbone par la communauté et donc la diversité métabolique de l'échantillon. L'étude a été conduite avec des microplaques commerciales Biolog® EcoPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA). Cette méthode a été conçue pour des études en écologie microbienne. Elle comprend différents substrats testés simultanément en triplicata visant en particulier des applications pour des communautés environnementales (Stephan et al. 2001; Fritze et al. 2006).

La technique consiste à l'inoculation directe d'un échantillon dans chacun des puits d'une microplaque Biolog®, contenant un substrat carboné et un indicateur redox coloré (le tétrazolium violet dont la coloration pourpre est marqueur de l'oxydation due à la respiration cellulaire des microorganismes). Après une période d'incubation, le changement de couleur des puits est déterminé. L'ensemble des résultats génère une empreinte phénotypique qui est analysée à postériori.

Cette technologie offre différentes options selon le nombre de substrats utilisés. Le choix doit être représentatif des sources carbonés disponibles dans le milieu environnemental étudié (Insam, 1997; Choi & Dobbs 1999). L'option Biolog EcoPlates (Insam 1997) propose 31 sources de carbone (**Tableaux 9**), regroupées en 6 classes chimiques : Glucides, Acides carboxyliques, Acides aminés, Sources de carbone complexe, Amines et Acides phénoliques.

<b>Classes chimiques</b>	<b>Composés</b>
<b>Glucides</b>	D-cellobiose, Érythritol, Acide D-galactonique $\gamma$ -lactone, N-acétyl-D-glucosamine, Glucose-1-phosphate, $\beta$ -méthyl-D-glucoside, D,L- $\alpha$ -glycérol-phosphate, $\alpha$ -D-lactose, D-mannitol, D-xylose
<b>Acides carboxyliques</b>	Acide $\gamma$ -hydroxybutyrique, Acide $\alpha$ -cétobutyrique, Acide D-galacturonique, Acide D-glucosaminique, Acide itaconique, Acide D-malique, Acide pyruvique méthyl ester
<b>Acides aminés</b>	L-arginine, L-asparagine, Acide glycy-L-glutamique, L-phénylalanine, L-sérine, L-thréonine
<b>Sources de carbone complexe</b>	$\alpha$ -cyclodextrine, Glycogène, Tween 40, Tween 80
<b>Amines</b>	Phényléthylamine, Putrescine
<b>Acides phénolique</b>	Acide 4-hydroxybenzoïque, Acide 4-hydroxybenzoïque

**Tableau 9:** Substrats disposés sur les microplaques Biolog® EcoPlates.

Dans chaque puits sont déposés 100  $\mu$ L d'échantillon (suspension cellulaire obtenue par lavage de baies). Les microplaques sont incubées pendant 5 jours à 25°C dans l'obscurité. Les lectures d'absorbance à 590 nm sont réalisées (soustraite pour chaque DO du témoin d'eau de lavage stérile), après 2 et 5 jours d'incubation, dans un lecteur de microplaques (Synergy

TM HT, Biotek). Les mesures à 5 jours montrent les valeurs d'absorbance les plus élevées et sont utilisées pour l'analyse.

A partir des données obtenues, la moyenne des absorbances sur l'ensemble des substrats est calculée, aussi appelée AWCD (*Average Well Colour Development*) (Garland & Mills 1991).

$$AWCD = \Sigma (C-R)/n$$

Où :

**C** = DO de chaque substrat

**R** = DO du témoin d'eau de lavage stérile

**n** = nombre de substrats (31)

Les valeurs d'absorbance ont été également analysées par des tests statistiques multivariés et utilisées pour des calculs d'indice de diversité.

#### **4.2 Détermination de la Concentration Minimum d'Inhibition de différents fongicides cupriques**

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration d'inhibiteur empêchant toute croissance visible d'une souche bactérienne (Alcamo 1984).

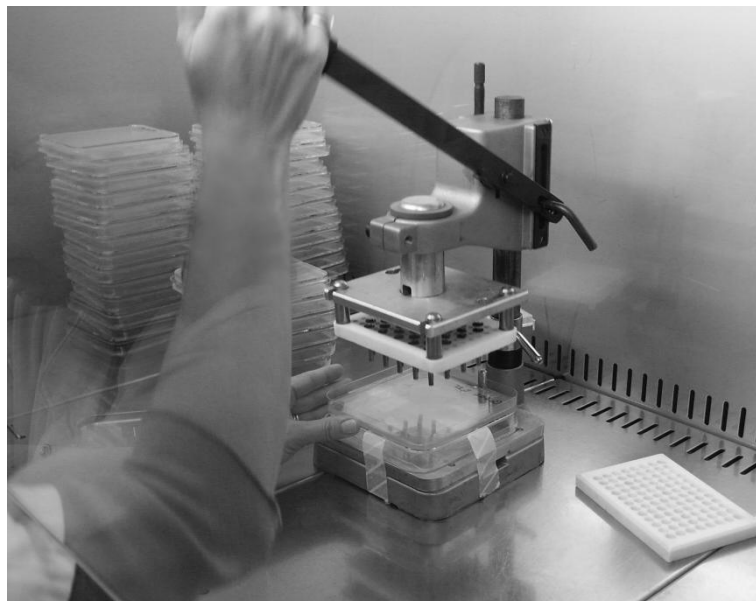
Cette méthode est habituellement utilisée pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques. L'application de cette technique pour d'autres substances inhibitrices, tel que le cuivre, permet de déterminer le seuil de résistance des bactéries.

Nous avons mis en place une étude de CMI analysant plusieurs formulations de cuivre : la bouillie bordelaise ( $CuSO_4 + Ca(OH)_2$ ), le sulfate de cuivre ( $CuSO_4$ ), l'oxyde de cuivre ( $Cu_2O$ )

et l'hydroxyde de cuivre ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ). Une collection de 92 souches isolées pendant la campagne de 2009 à Lussac a été testée.

Les souches sélectionnées pour cette étude ont été remises en culture sur milieu LB Dil  $1/10^{\text{ème}}$ . La biomasse fraîchement repiquée est mise en suspension dans un sérum physiologique (0,9 % NaCl). La concentration cellulaire est mesurée puis ajustée afin d'obtenir des concentrations cellulaires proches de  $10^2$  UFC m /L. Le milieu LB Dil  $1/10^{\text{ème}}$  est coulé au moment de l'expérimentation dans des boîtes de Petri carrées de 120 X 120 mm, auxquelles sont additionnées différentes quantités de produits à tester. A partir de la solution mère de 32 mg /ml, nous avons dilué successivement les concentrations jusqu'à atteindre une concentration de 0,0035 mg /ml.

La surface de la gélose estensemencée à l'aide de l'appareil de Steers, inoculateur à têtes multiples permettant de déposer 10  $\mu\text{L}$  de la suspension cellulaire à raison de 48 isolats par boîte. Les milieux sont incubés pendant 3 jours à 30 °C (**Figure 12**).



**Figure 12:** Utilisation de l'appareil de Steers en milieu solide.

Des témoins de croissances sont réalisés en inoculant les milieux de culture sans aucun produit à base de cuivre. Ensemencés au début et en fin d'expérimentation, ils permettent

ainsi de contrôler d'éventuelles contaminations et la viabilité de la concentration cellulaire pendant la période d'ensemencement.

La lecture des boîtes est réalisée en comparant la croissance à celle du témoin, la CMI est ainsi déterminée, correspondant à la plus petite concentration de produits à base de cuivre pour laquelle la croissance est nulle.

## **5. Méthodes d'analyse biomoléculaires**

### **5.1 Extraction d'ADN**

#### **5.1.1 Extraction et stockage d'ADN des cultures pures**

L'ADN des colonies isolées d'échantillons environnementaux est extrait en utilisant le Kit FTA® CloneSaver™ (Whatman® BioScience, USA) qui est un moyen simple d'extraire et de stabiliser des acides nucléiques à température ambiante. Une colonie est prélevée à l'aide d'une pointe de cône de pipette stérile puis mise en suspension dans 50 µL d'eau PPI. Un aliquote de 7 µL de cette suspension cellulaire est déposés sur la carte FTA® puis mise à sécher pendant 1 heure. L'ADN est ensuite récupéré à l'aide d'un emporte-pièce (Harris Micro-Punch®), qui en poinçonnant la carte, découpe un petit disque (1,2 mm). Celui-ci sera lavé dans 200 µL d'une solution spécifique (FTA® purification reagent) pendant 5 minutes puis rincé avec 200 µL d'eau PPI. L'ADN immobilisé dans les pastilles est ainsi prêt à être utilisée.

#### **5.1.2 Extraction d'ADN des souches références**

Dans le cadre des travaux de mise au point de la technique CE-SSCP, l'extraction d'ADN de souches de références a été réalisée selon un protocole adapté des travaux de Ausubel et al. 1995. Une petite quantité de biomasse de colonies est prélevée puis mélangée à 200 µL de tampon de lyse (Triton X-100 2 % v/v, SDS 1% p/v, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH=8, 10 mM, EDTA 1mM). Dans un microtube à vis, 300 milligrammes de billes de verre (de diamètre entre 0,45 et 0,52 mm) et 200 µL de mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1 v/v/v) sont ajoutées à la suspension. Le mélange est agité vigoureusement au

vortex pendant 5 min afin de casser les cellules, puis 200 µL de TE (Tris-EDTA) sont rajoutés. Une centrifugation (10000 rpm, 5 min) permet de séparer les débris cellulaires du surnageant. Ce dernier est ensuite transféré dans un microtube contenant 1 mL d'éthanol absolu. Après homogénéisation par inversion du tube, le mélange est placé 30 min à -20°C, pour permettre la précipitation de l'ADN. Après centrifugation (10000 rpm, 5 min) et élimination du surnageant, le culot d'ADN est repris dans 400 µL de TE avec 30 µg de RNase afin d'éliminer les ARNs. Après une incubation de 15 min à 37°C, 10 µL d'acétate d'ammonium sont ajoutés afin de stopper la réaction d'hydrolyse et 1 mL d'éthanol 100 % est ajouté. Une dernière centrifugation de 15 min à 10000 rpm permet de récupérer le culot d'ADN génomique qui ensuite est séché sous une cloche à vide avant d'être dissous dans un volume d'eau ppi compris entre 25 et 100 µL, selon la quantité d'ADN visible sur la paroi du micro-tube. Les ADN sont réhydratés une nuit à 4°C dans de l'eau ppi avant d'être utilisés.

### **5.1.3 Extraction d'ADN des eaux de lavage des baies**

Pour l'extraction des acides nucléiques des échantillons d'eaux de lavage des baies, le kit commercial Mobio PowerSoil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc) est utilisé. Ce kit, spécialement adapté aux échantillons environnementaux, combine deux types de lyses cellulaires : une lyse mécanique et une lyse enzymatique. Son utilisation s'est avérée adaptée à notre étude, permettant d'extraire des quantités d'ADN satisfaisantes (1 à 50 µg/mL).

Les filtres contenant la biomasse sont tout d'abord découpés en petits fragments dans des conditions stériles puis introduits dans les tubes de réaction du Kit, l'extraction se poursuit suivant le protocole du fournisseur.

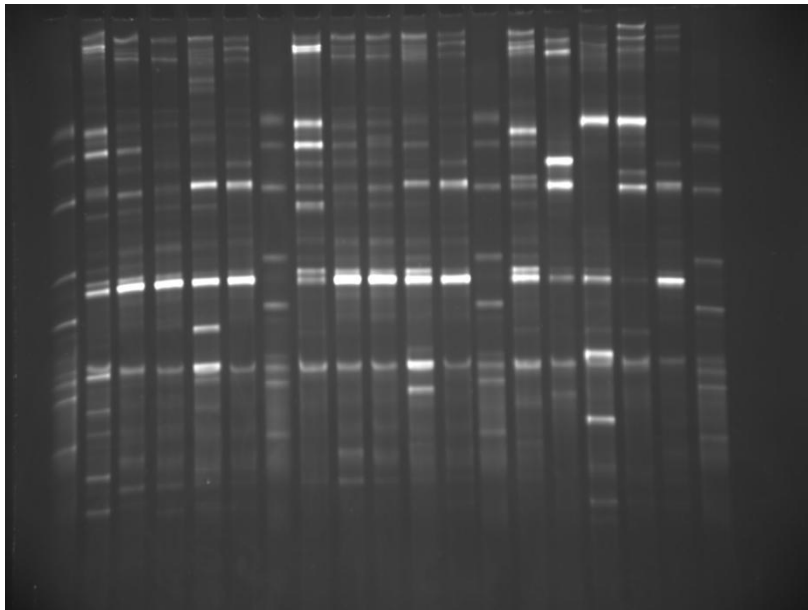
## **6. Détermination des profils génétiques par les techniques d'empreintes moléculaires**

### **6.1 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)**

L'analyse DGGE a été appliquée à l'ADN extrait à partir de la biomasse cultivable sur milieu LB 1/10 concernant les échantillons de la campagne de 2009 (**Figure 13**). Les amorces

utilisées et les conditions d'amplification de l'ADN microbienne sont détaillées dans le **Tableau 10**.

Après amplification, la taille des fragments est vérifiée sur gel d'agarose à 2%. Les amplicons sont séparés sur gels à 8 % (v/v) d'acrylamide:bis-acrylamide (37.5:1), contenant un gradient linéaire de dénaturation de 30 à 50 % de urée et de formamide (100% de dénaturant correspond à 7 M d'urée et 40% de formamide déionisé). La migration DGGE est réalisée en utilisant le system DCode™ (Bio-Rad), contenant du tampon TAE 1x. Une quantité de 20 µL de produits PCR (contenant 3 % de bleu de charge) est chargée sur le gel ainsi qu'un marqueur contenant huit fragments différents provenant de cultures pures souvent retrouvées dans des échantillons environnementaux. L'électrophorèse s'effectue à un voltage de 80 V pendant 17 heures dans le cas de la DGGE / bactéries et 130 V pendant 4 heures et 30 minutes pour la DGGE / levures.



**Figure 13:** Exemple de gel de DGGE des produits PCR obtenue à partir à l'ADN extrait de la biomasse cultivable sur milieu LB 1/10. Echantillons de la campagne de 2009.

Après migration, le gel est maintenu pendant 20 min dans un bain contenant 300 mL de TAE 1X et 30 µL de BET (bromure d'éthidium) pendant 15 min, puis révélé sous UV par un transilluminator (Vilber Lourmat Bio-1D). Les profils DGGE sont ensuite analysés à l'aide du



logiciel Bionumerics (Applied Maths, Austin, E.U.A). La présence ou l'absence de bandes à une distance de migration donnée, permet de générer une matrice à partir de laquelle le coefficient de similarité Jaccard est calculé (Sneath & Sokal 1973). Des dendrogrammes selon la méthode *Neighbor-Joining* sont alors construits.

## 6.2 Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP)

Après vérification sur gel d'agarose, 1 µl de produits PCR de chaque échantillon est mélangé avec 18,8 µL de formamide déionisé (Applied Biosystem) et 0,2 µL d'étalon interne (GeneScan-400 ROX, Applied Biosystem). Les échantillons sont dénaturés pendant 5 minutes à 95 °C, puis immédiatement plongés dans la glace pendant 10 minutes afin d'éviter leur réappariement. Les brins d'ADN ainsi obtenus sont séparés puis détectés par un séquenceur automatique du type ABI PRISM 3130 (Applied Biosystem) équipé de quatre capillaires de 36 cm X 50 µm, remplis de polymère composé de 5,6% de GeneScan polymère (Applied Biosystem), 10% de glycérol (Sigma), de TBE 10X et d'eau. La migration est effectuée sous une tension de 12kV pendant 50 minutes à 32°C. Les profils CE-SSCP obtenus sont ensuite alignés et normalisés à l'aide de l'application StatFingerprints (Micheland et al. 2009) (utilisé avec le logiciel de statistique R : <http://cran.r-project.org/>), avant d'être comparés par analyse en classification ascendante hiérarchique (CAH) à l'aide du logiciel Stat Box (version 6.6 Pro, Grimmersoft).

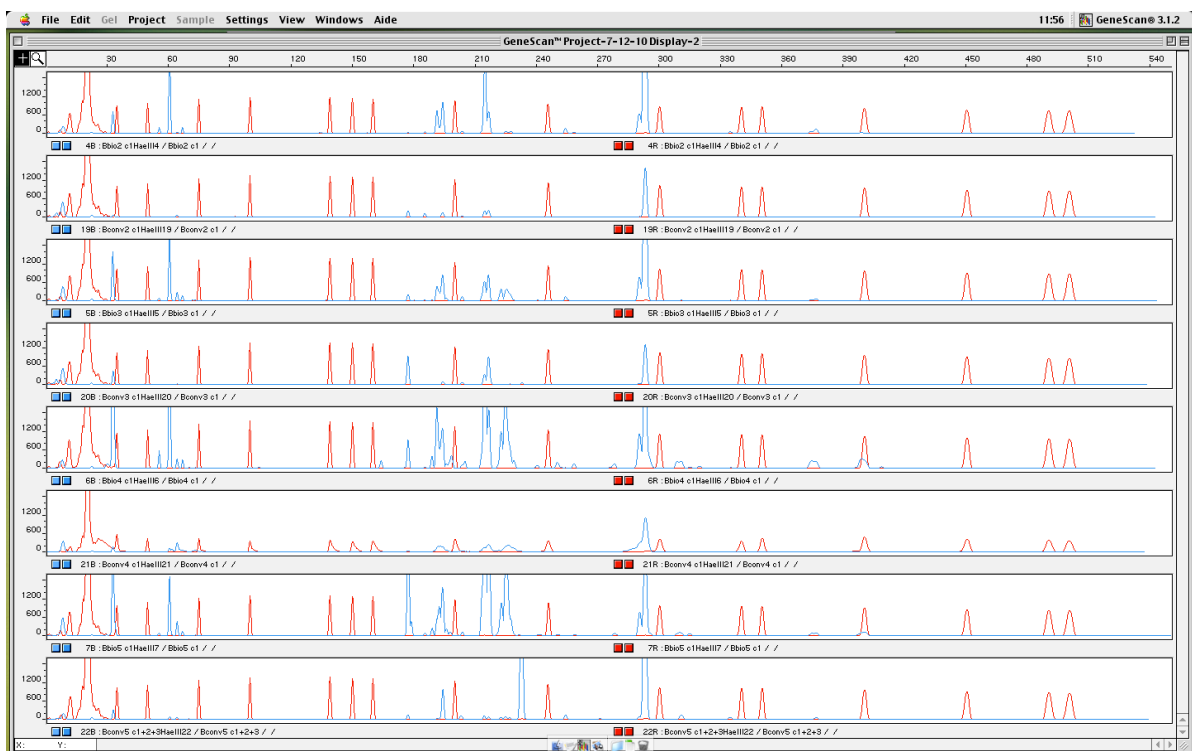
## 6.3 Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Après purification à l'aide du kit *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), 100 ng de produits PCR sont digérés avec 3 U des Enzymes *HaeIII* et *Hinfl* (New England Biolabs). Pour chacun des échantillons, 10 ng des produits PCR digérés sont mélangés avec 9 µL de formamide déionisé et 0,5 µL de 5-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA 500) comme standard interne. Ce mélange est ensuite dénaturé à 95 °C pendant 5 minutes puis immédiatement placé dans la glace pour éviter toute ré-hybridation des brins d'ADN.

Les fragments de restriction sont analysés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique ABI prism 310 (Applied Biosystems). Après une période d'induction initiale de

10 sec, dans un capillaire contenant un gel de polyacrylamide (*Pop4*, Applied Biosystems), la migration est effectuée sous une tension de 15 kV pendant 30 minutes à 60°C.

Les électrophorégrammes obtenus sont soumis à une analyse préliminaire avec le logiciel Genescan v3.0 (Applied Biosystems) permettant de déterminer les tailles des fragments détectés (**Figure 14**). Les profils obtenus sont regroupés dans une matrice pour analyse postérieure.



**Figure 14:** Profils T-RFLP obtenus à partir de l'ADN extraits d'eaux de lavage de baies des échantillons environnementaux prélevés lors de la campagne 2009.

Le traitement de données brutes implique la réduction du bruit de fond en éliminant les T-RF's ayant une intensité de fluorescence inférieure (UF) à 50 unités (Blackwood et al. 2003). Seuls les T-RF's de tailles comprises entre 50 et 500 pb sont considérés pour l'analyse. Afin de comparer les différents profils, la quantité de fluorescence est normalisée en calculant l'intensité de fluorescence de chaque T-RF comme étant le pourcentage relatif à la somme

de l'intensité de fluorescence totale de tous les T-RF's dans le profil. Les profils sont alignés à l'aide du logiciel T-Align, avec un intervalle de confiance de 1,0 (Smith et al. 2005).

Les données traitées sont compilées dans une matrice où chaque T-RF correspond à une variable. Ces données sont ensuite soumises à différentes analyses statistiques.

La spécificité des amorces utilisées dans l'étude des populations bactériennes vis-à-vis de *Vitis vinifera* a été vérifiée et il est apparu que cette espèce pouvait être amplifiée. Nous avons donc amplifié de l'ADN extrait de vigne (cépage merlot) cultivée *in vitro*\* (absente des microorganismes endophytiques ou ephytiques), sous les mêmes conditions réactionnelles que celles d'échantillons environnementaux (**Tableaux 10**). Les amplifiats ainsi générés ont été restreints par l'endonucléase *Hinfl* et les produits de cette digestion analysés. Les résultats d'électrophorèse capillaire, selon les conditions décrites précédemment, présentent deux pics (78 et 175 pb). L'analyse *in silico* a mis en évidence que ces fragments correspondaient, respectivement, à de l'ADN chloroplastique et mitochondrial de la vigne. Nous avons donc choisi d'exclure les T-RF's ayant ces tailles lors d'analyse des populations bactériennes dans des échantillons environnementaux.

\*Le matériel biologique a été gentiment fourni par l'unité de recherche UMR 1287 Ecophysiologie et Génétique Fonctionnelle de la Vigne-ISVV

## 6.4 Conditions d'amplification de l'ADN utilisées dans les différentes techniques d'empreintes moléculaires

Méthode	DGGE						T-RFLP						CE-SSCP		
Région Cible	Région D1 de l'ADNr 26s			Région V3 de l'ADNr 16s			ADNr 16s						ADNr 26s		
Amorces utilisées	NL1:5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGCCATATCAATAAAGCGGAGGAAAAG3', LS2:5'ATTCCCAAACAACACTCGACTC3' (Cocolin et al., 2000)			V3.1:5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGCACGGGGGCGCTACGGGAG3' GCAGCAG, V3.2:5'ATTACCGCGTGTGG3' (Myers et al. 1985)			Première PCR 8F:5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3', 1406R:5'ACGGCGGTGTGTRC3' (Schute et al., 2008)			PCR niché 8F-6-FAM (6-carboxyfluorescein):5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3', 1063R(5'CTCACGRACAGAGCTGACG3' (Wang et al., 2009)			NL3A:5'-GAGACCGATAGCGAACAAG-3', NL4:5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (Voight et al. 1999)		
Mélange réactionnel	Reactifs	Conc. final	µL/25 µL	Reactifs	Conc. final	µL/25 µL	Reactifs	Conc. final	µL/25 µL	Reactifs	Conc. final	µL/40 µL	Reactifs	Conc. final	µL/25 µL
	Mastermix DyNAzymell™ (Finnzymes)	1 x	4	Mastermix DyNAzymell™ (Finnzymes)	1 x	4	AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems)	1 x	12.5	AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems)	1 x	20	Tampon Pfu Turbo® (Stratagene)	1 x	2.5
	Amorce sens	0.4 µM	0.1	Amorce sens	0.4 µM	0.1	Amorce sens	0.4 µM	0.1	Amorce sens	0.4 µM	0.16	Pfu Turbo® (Stratagene)	0.05 unités	0.5
	Amorce antisens	0.4 µM	0.1	Amorce antisens	0.4 µM	0.1	Amorce antisens	0.4 µM	0.1	Amorce antisens	0.4 µM	0.16	dNTP	0.2 mM	2.0
	Eau PPI		19.8	Eau PPI		19.8	Eau PPI		11.3	Eau PPI		18.68	Amorce sens	0.5 µM	0.5
	ADN	1 - 50 ng/µL	1	ADN	1 - 50 ng/µL	1	ADN	1 - 50 ng/µL	1	ADN	1 - 50 ng/µL	1	Amorce antisens	0.5 µM	0.5
										Produit de la première PCR		1	Eau ppi		18
													ADN	[1 - 50 ng/µL	1
Programme de PCR	Dénaturation initiale	Cycling	Extension finale	Dénaturation initiale	Cycling	Extension finale	Dénaturation initiale	Cycling	Extension finale	Dénaturation initiale	Cycling	Extension finale	Dénaturation initiale	Cycling	Extension finale
	95 °C pendant 5 min	(95 °C pendant 1 min, 52 °C pendant 45 sec, 72 °C pendant 1 min) x30	72 °C pendant 7 min	95 °C pendant 5 min	(95 °C pendant 30 sec, 52 °C pendant 30 sec, 72 °C pendant 30 sec) x30	72 °C pendant 5 min	95°C pendant 5 min	(94 °C pendant 1 min, 58°C pendant 1 min, 72 °C pendant 1 min et 30 sec)x 20	72 °C pendant 7 min	95°C pendant 5 min	(94 °C pendant 1 min, 58°C pendant 1 min, 72 °C pendant 1 min et 30 sec)x 15	72 °C pendant 7 min	95 °C pendant 5 min	(95°C pendant 30 sec, 60 °C pendant 40 sec, 72 °C pendant 1 min)x35	72 °C pendant 7 min

**Tableau 10:** Récapitulatif des régions ciblées dans les différentes techniques d'empreintes moléculaires et les conditions d'amplification de l'ADN.

## 7. Détection de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel

Pour la détection d'espèces d'intérêt œnologique par PCR en temps réel, nous avons utilisé des méthodes développées par Delaherche et al. (2004) pour l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* et par Zott et al. (2010) pour les espèces *Metschikowia pulcherrima*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida zemplinina*, *Issatchenkia orientalis* et pour les genres *Saccharomyces* et *Hanseniaspora*.

Les analyses sont réalisées dans un volume final de 20 µl, contenant 1X IQ SYBR Green PCR Supermix (Bio-Rad), 5 pmol de chaque amorce et une quantité de formamide (Formamide Amide C1, Eurobio, France) variable selon le couple d'amorces utilisé (**Tableau 11**). Le thermocycleur à fluorescence CFX 96™ (BioRad) est utilisé et les données traitées avec le logiciel Bio-Rad CFX Manager version 1.6.

Les conditions PCR pour les différentes réactions sont basées sur une méthode standard où seule la température d'hybridation varie selon les différents taxons (**Tableau 12**).

Phase	Nombre des cycles	Température	Durée
Dénaturation initiale	1	95 °C	3 minutes
Dénaturation	40	95 °C	15 secondes
Hybridation d'amorces		60-63 °C	1 minute
Elongation		72 °C	30 secondes
Elongation finale	1	73 °C	10 minutes

**Tableau 11:** Conditions utilisées pour l'amplification par PCR quantitative.

La spécificité de chaque réaction est vérifiée par l'analyse de la courbe de fusion, déterminée après la réaction. Les produits PCR sont soumis à une augmentation de température de 0,3 °C entre 63 et 95 °C et la variation de fluorescence est mesurée.

Espèce ciblée	Température d'hybridation (°C)	Concentration de formamide (μL/réaction)	Amorces spécifiques
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	63	0,8	Tods 1 : 5' CAAAGTCATCCAAGCCAGC 3' TodsR2: 5' TTCTCAAACAATCATGTTTGGTAG 3'
<i>Issatchenkia orientalis</i>	62	1,2	ISA1: 5' GTTTGAGCGTCGTTTCCATC 3' ISA2: 5' AGCTCCGACGCTCTTTACAC 3'
<i>Candida zemplinina</i>	62	0,7	CZ-2: 5' CTTGGGTGTCGAAAGGCG 3' CAST: 5' CAATATGCGTTCAAAAATTCAT 3'
<i>Metschikowia pulcherrima</i>	60	0,75	MPL3: 5' CTCTAACCTCCGGTTTG 3' MPR3: 5' GATATGCTTAAGTTCAGCGGG 3'
<i>Hanseniaspora spp.</i>	62	0,82	Hauf 2L: 5' CCCTTGCTAAGGTACG 3' Hauf 2R: 5' CGCTGTTCTGCTGTGATG 3'
<i>Saccharomyces spp.</i>	63	0,85	SC1: 5' GAAAACTCCACAGTGTGTTG 3' SC2: 5' GCTTAAGTGCGCGGTCTTG 3'
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	63	0,6	Brett1: 5' CGAAGAAGTGAACGCGCGAT 3' Brett2: 5' TCTTCGATATGCCGTCCAAAAG 3'

**Tableau 12:** Amorces testées et régions d'amplification respectives (Delaherche et al. 2004) (Zott et al. 2010).

## 8. Identification des micro-organismes par séquençage

Les différents micro-organismes isolés au cours de nos travaux ont été identifiés par des méthodes moléculaires.

L'identification des espèces procaryotes est réalisée à partir de l'amplification de la région 16S de l'ADNr utilisant les amorces universelles 8f et 1063r et pour les espèces eucaryotes à partir de l'amplification de la région du 26/28S utilisant les amorces NL1 et NL4. Les doubles brins des inserts sont séquencés (GATC Biotech, Constance, Allemagne) et comparés à la banque de séquences nucléiques GenBank DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Benson 2006) et EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) (Kulikova et al. 2007).

Les séquences ont été assignées à une catégorie taxonomique en utilisant le program Ribosomal Database Project's Classifier (Cole et al. 2009) pour les bactéries et le BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1997) pour les eucaryotes.

## **9. Analyse de constituants pelliculaires, quantification du cuivre dans les eaux de lavage de baies**

### **9.1 Dosage de Glucose et Fructose par méthodes enzymatiques**

Nous avons déterminée la quantité de glucose et fructose exsudée à partir de l'analyse d'eaux de lavage des baies.

Les concentrations de glucose et fructose sont déterminées en utilisant des kits Boehringer Mannheim (Roche Molecular Biochemicals).

Le principe de ce dosage est basé sur la phosphorylation du glucose et du fructose par l'adénosine triphosphate (ATP) au cours d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK), qui donne du glucose-6-phosphate (G6P) et du fructose-6-phosphate (F6P). Le glucose-6-phosphate est à son tour oxydé en gluconate-6-phosphate par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate-déhydrogénase (G6PDH) avec la libération équimolaire de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduite (NADPH). La mesure du NADPH déterminée par absorbance à 340 nm, correspond à la quantité de glucose-6-phosphate et donc à celle du glucose.

Pour le dosage du fructose une étape additionnelle est nécessaire pour transformer le fructose-6-phosphate sous l'action de la phosphoglucose-isomérase (PGI) en glucose-6-phosphate. Le principe des réactions suivantes est le même que celui décrit pour le dosage du glucose.

### **9.2 Mesure de l'activité de l'eau**

L'activité de l'eau ( $A_w$ ) se définit comme le rapport entre la pression de vapeur saturante à la surface de la baie et la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température. Ce rapport, inférieur ou égal à 1, est déterminé selon un protocole basé sur les travaux de Deytieux-Belleau et al. (2009), utilisant un Awmètre Labmaster (Novasina).

Pour chaque échantillon, 14 baies sont prises au hasard dans un lot d'environ 250 baies et analysées. Pour chaque baie, le pédicelle est paraffiné, évitant ainsi que cette zone fragile, susceptible à scissures, puisse perturber la mesure.

Les analyses sont réalisées au sein du laboratoire de Physiologie et de Biochimie de la Vigne de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux.

### **9.3 Dosage de cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique**

La concentration de cuivre dans l'eau de lavage des baies est déterminée par spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme (SAAF).

Dans son principe, la SAAF consiste à vaporiser l'échantillon liquide à l'aide d'un atomiseur (une flamme). Les éléments à doser sont portés à l'état d'atomes neutres en phase vapeur. Ces atomes vont alors absorber de façon spécifique le rayonnement émis par une source lumineuse. La mesure de cette absorption qui correspond au rapport des intensités incidente et transmise est directement proportionnelle à la concentration de l'élément (loi de Beer-Lambert)

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) modèle AAnalyst 100, alimenté par une flamme air/acétylène à un débit de 2,1 L / min) et équipé d'un correcteur d'absorption à arc au deutérium. Comme source de lumière, une cathode creuse au cuivre est utilisée à 15 mA. La lecture d'absorbance est faite à une longueur d'onde de 324,8 nm.

Une solution-mère de Cuivre 1 mg/l dans l'acide nitrique dilué (VWR BDH Prolabo) a servi pour la préparation de solutions étalons aux concentrations suivantes: 0,1, 0,5, 1, 3 et 5 mg/L. Elles ont été utilisées lors de l'étalonnage de l'appareil, rendant possible la transformation de nos données, mesurées en absorbance, en concentrations de cuivre. Les échantillons sont préalablement filtrés à travers un filtre seringue de 0,45 µm, éliminant ainsi d'éventuels débris susceptibles de perturber l'analyse.

## **10. Traitement de données et analyse statistique**

### **10.1 L'analyse de la variance (ANOVA)**

L'analyse de variance (ou ANOVA) a été utilisée par comparer les niveaux des populations cultivables (u.f.c.) issus de différents prélèvements. L'ANOVA à un facteur s'applique lorsque l'on souhaite prendre en compte un seul facteur de variabilité (Stade Phénologique, Mode



de conduite, *Terroir*). L'analyse de variance à deux facteurs a permis d'analyser l'impact de deux facteurs combinés, par exemple "terroir" et "mode de conduite".

Les différents types d'analyse de variance ont été suivis de tests post hoc (tests de comparaisons multiples) pour déterminer quelles distributions étaient statistiquement différentes. Plusieurs tests existent, nous avons choisi le test HSD (Honestly Significant Différence) de Tukey, celui-ci est considéré comme conservatif car il est le plus sévère dans la différenciation de deux groupes.

## **10.2 Statistique Descriptive Multidimensionnelle**

La statistique descriptive multidimensionnelle désigne l'ensemble des méthodes permettant de traiter simultanément un nombre quelconque de variables. Ces méthodes descriptives sont des outils très réponsus en bio-statistique et ils sont particulièrement bien adaptés à l'analyse numérique de données écologiques.

### **10.2.1 Analyse par réduction des dimensions**

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode utilisée pour réduire  $p$  variables corrélées, en un nombre  $q$  de variables non corrélées de telles manières que les  $q$  variables soient des combinaisons linéaires des  $p$  variables initiales. Cette méthode a été appliquée à l'analyse des profils d'empreintes moléculaires (Clement et al. 1998). Dans notre étude, l'ACP a servi pour l'analyse des profils générés par T-RFLP et CE-SSCP, utilisant comme variables les OTU /Pics.

Cette technique a également servie à l'analyse de la composition microbienne cultivable des échantillons, permettant ainsi de visualiser et de comparer les différentes populations.

### **10.2.2 Analyse par classification hiérarchique**

Le principe de la classification ascendante hiérarchique (CAH) consiste à créer une nouvelle partition de l'ensemble des données en agrégeant les deux éléments les plus proches (basée sur ces similitudes/dissimilitudes) selon une distance choisie à priori. La ressemblance des individus est mesurée par différents indices (similarité, dissimilarité ou distance). Pour l'analyse des données binaires, les indices les plus fréquemment utilisés sont l'indice de

Jaccard et l'indice de Dice. Pour des données quantitatives, la distance euclidienne est la plus appropriée.

La relations entre profils de T-RFLP, CE-SSCP et DGGE a été analysée à partir de ces méthodes soit transformant les variables en matrices binaires (l'indice de Jaccard) basée sur la présence/absence de pics/bandes, soit gardant les valeurs quantitatives (T-RFLP, CE-SSCP) comme la hauteur/l'aire des pics pour le calcul d'une distance euclidienne. Ces matrices de distances ont permit de générer des dendrogrammes en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group *Method* with Arithmetic Mean). L'analyse de profils métaboliques Biolog® a également été réalisée par (CAH), les valeurs d'absorbance standardisée de chaque substrat ont été prises comme variables. Après le calcul d'une matrice de distance euclidienne, des dendrogrammes ont été générés selon les méthodes déjà mentionnées.

### 10.3 Indices de diversité

Plusieurs modèles mathématiques ont été développés pour mesurer la diversité, fournissant des informations relatives à la richesse et l'abondance des espèces, caractères ou fonctions. Parmi plusieurs indices existants, celui de Shannon est fréquemment utilisé en écologie (Shannon 1948). Il est défini par :

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i (\ln P_i)$$

Où :  $i$  = une espèce du milieu d'étude.

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

$P_i$  = proportion d'une espèce  $i$  par rapport au nombre total d'espèces ( $S$ ), qui se calcule de la façon suivante :

$$P_i = n_i / N$$

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

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé l'indice de diversité de Shannon pour étudier la diversité métabolique à partir des données de microplaques Biolog® EcoPlate et pour analyser de diversité d'OTU générée par CE-SSCP et T-RFLP.

#### 10.4 Phylogénie moléculaire

La phylogénie d'espèces isolées a été faite en analysant les similarités nucléotidiques. Dans le cas de bactéries, les séquences contiguës des brins reverse et forward ont été comparés (environ 900 pb). Ensuite, l'ensemble des séquences a été aligné l'aide du module *CLUSTALW* (Thompson et al. 1994) du logiciel *BioEdit* (Hall 1999) ([www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)). Les résultats des alignements ont été traités avec le logiciel MEGA version 4 (Tamura et al. 2011), pour construire des arbres phylogénétiques selon la méthode du Neighbour-Joining, utilisant le modèle de Kimura à deux paramètres (Kimura 1980) pour la correction de la distance. L'outil de représentation d'arbres *iTOL* (Letunic & Bork 2007) a été utilisé pour la notation et la manipulation des arbres préalablement générés.

Les risques d'erreur dans la construction d'arbres a été vérifié par le test de robustesse Bootstrap. Il s'agit d'une technique de rééchantillonnage, adaptée en phylogénie par Bradley Efron (1979) , qui permet de connaître la solidité des branches d'un arbre phylogénétique. Cette méthode est basée sur la création d'un pseudo-alignement en tirant au hasard un certain nombre de sites, puis consiste à recalculer l'arbre. On réalise ainsi un grand nombre d'arbres (à partir de 100) et la fréquence avec laquelle un embranchement est retrouvé constitue la valeur de bootstrap pour cet embranchement. Plus le nombre est élevé, plus cette branche est fiable, nous considérons qu'un regroupement est solide lorsqu'il présente une valeur de bootstrap supérieure à 70.

## RESULTATS ET DISCUSSION

**CHAPITRE III - Développement de la technique CE-SSCP (Capillary - Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism) pour l'étude de la communauté fongique de la baie de raisin**

Nous avons consacré une partie de notre travail à la mise au point de la technique CE-SSCP pour l'étude de la communauté fongique présente à la surface de la baie de raisin. Ce travail a été réalisé dans le cadre du master 2 recherche, mention Œnologie et Environnement Vitivinicole (Université Bordeaux Segalen) de Panagiotis Stamatopoulos, avec la participation de Dr. Anne Mercier et en collaboration avec Dr Jessica Vallance du laboratoire de l'UMR SAVE. La raison principale du développement de cette technique était d'avoir une méthode d'analyse des communautés fongiques en haut débit.

La CE-SSCP a été appliquée à l'analyse de la communauté fongique en raison de sa simplicité d'application par rapport à d'autres méthodes, telle que la DGGE (Schwieger et Tebbe, 1998).

Dans un souci d'adaptation de cette technique à la spécificité de notre écosystème, nous avons testé différents paramètres ayant un impact potentiel sur la qualité de l'analyse et des profils obtenus.

## **1. Le matériel biologique**

Différentes souches des levures et de moisissures, représentatives de notre écosystème, ont été utilisées dans nos expérimentations. La liste des espèces et de leur code d'identification est présentée dans le **Tableau 13**.

## **2. Régions cibles et amorces**

Le choix de l'ADNr comme marqueurs moléculaires pour cette étude est justifié dans la section 3.2.1. La technique SSCP capillaire impose que la taille des fragments amplifiés soit de moins de 350 pb (Qi-Ming Wang et al. 2008). Ainsi, plusieurs paires d'amorces décrites dans la littérature (**Tableau 14**) ont été testées sur les 23 souches afin de choisir les mieux adaptées en terme de taille des fragments. La **spécificité** des amorces est testée vis à vis des souches de références et de l'ADN d'origine végétale tel que par exemple celui de la vigne.

Les souches de références sont cultivées sur milieu YPD. L'ADN chromosomique est extrait selon la méthode décrite dans le paragraphe **5.1.2**.

Espèces	Code d'identification
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	F33
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CLIB 303
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	L 0312
<i>Candida boidinii</i>	L 0402
<i>Candida cantarellii</i>	L 0403
<i>Pichia anomala</i>	CLIB 284
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	CLIB 503
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CLIB 833
<i>Cryptococcus albidus</i>	CLIB 373
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	L 0536
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	L 0672
<i>Arthroascus schoeni</i>	L 0648
<i>Candida zemplinina</i>	L 0726
<i>Zygoascus hellenicus</i>	L 0686
<i>Issatchenkia orientalis</i>	L 0558
<i>Kazachstania unispora</i>	L 0770
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	L 0701
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	CLIB 300
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CLIB 233
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	L 0445
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	L 0442
<i>Debaryomyces hansenii</i>	L 0657
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CLIB 403
<i>Penicillium expansum</i>	
<i>Botrytis cinerea</i>	

**Tableau 13:** Souches de levures et de moisissures utilisées (CLIB: Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique ; L = souches appartenant à la collection de l'Institut d'Œnologie de Bordeaux).

Amorces	Séquences	Région amplifiée	Références
(f)ITS1	5'-GTCGTAACAAGGTTCCGTAGGTG-3'	ITS1	Wang et al. 2008
(r)ITS2	5'-GCTGCGTTCATCGATGC-3'		
(f)ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	ITS2	Wang et al. 2008
(r)ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
(f)NL3A	5'-GAGACCGATAGCGAACCAAG-3'	26S	Voight et al. 1999
(r)NL4	5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'		
(f)NL5	5'-CGAGTTGTAATTTGGAGA-3'	26S	Dellinger et al. 2006
(r)NL6	5'-TACACCACTTAGAGCT-3'		
(f)Lev1	5'-AGTTGTTGCAGTTAAAAAG-3'	18S	Callon et al. 2006
(r)Lev2	5'-CCTATTAATCATTACGA-3'		

**Tableau 14:** Amorces testées et régions d'amplification respectives.

## 2.1 Conditions de PCR

Les conditions de PCR utilisées varient selon la région à amplifier. Les spécificités de chaque phase d'amplification sont décrites dans le **Tableau 15**.

Région: ITS				Région: 26s				Région: 18s			
Phase	Nombre des cycles	Température	Durée	Phase	Nombre des cycles	Température	Durée	Phase	Nombre des cycles	Température	Durée
Dénaturation initial	1	94 °C	4 min	Dénaturation initial	1	95 °C	2 min	Dénaturation initial	1	94 °C	5 min
Dénaturation	36	94 °C	1 min	Dénaturation	35	95 °C	30 sec	Dénaturation	30	94 °C	30 sec
Hybridation		57 °C	1 min	Hybridation		60 °C	40 sec	Hybridation		47 °C	30 sec
Elongation		73 °C	20 sec	Elongation		72 °C	1 min	Elongation		72 °C	1 min
Elongation final	1	72 °C	4 min	Elongation final	1	72 °C	7 min	Elongation final	1	72 °C	7 min

**Tableau 15:** Conditions de PCR selon les différentes régions ciblées.

Pour confirmer l'amplification et déterminer la taille des amplifiats, les produits des réactions PCR sont analysés par électrophorèses sur gel d'agarose à 2 % contenant de bromure d'éthidium (BET). Le marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs) est ajouté afin de calculer la taille des fragments.

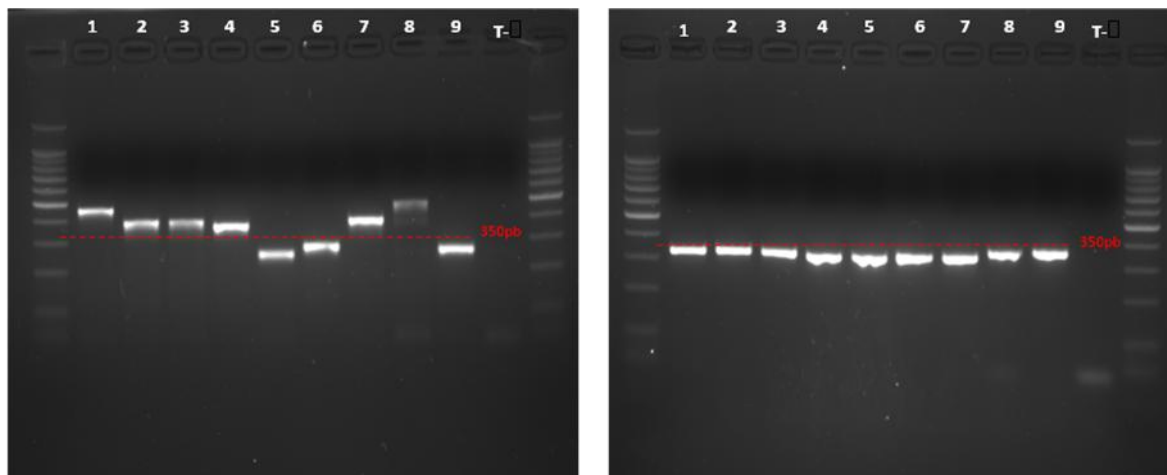
## 2.2 Le type de marquage

Le type de **marquage** le mieux adapté à la technique est celui pour lequel la discrimination des espèces sur les profils SSCP est la meilleure. Différentes combinaisons de marquage fluorescent utilisant 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) ont été évaluées : simple marquage sur l'amorce *forward*, simple marquage sur l'amorce *reverse* ou marquage sur les deux amorces.

## 2.3 Analyse de la taille des amplicons

Le choix des amorces a été réalisé à partir d'analyse des gels d'agarose permettant de d'évaluer la taille des amplifiats.





**Figure 15:** Gel d'agarose des amplifiants obtenus à partir des paires d'amorces ITS1/ITS2 (gauche) et NL3A/NL4 (droite).

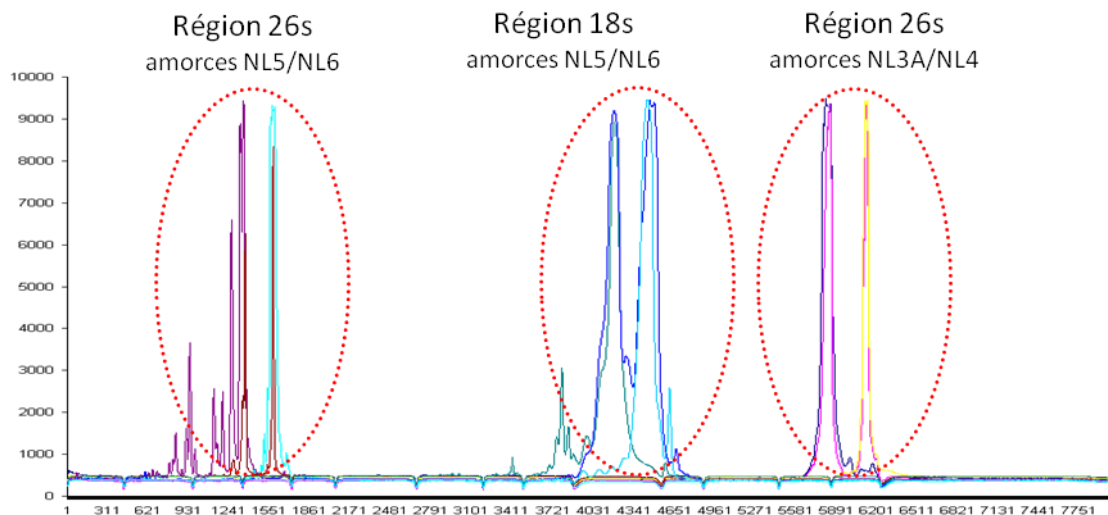
Après amplification de la région ITS1 à l'aide des amorces ITS1/ITS2, et de la région ITS2 à l'aide des amorces ITS3/ITS4, nous avons constaté que ces paires d'amorces n'étaient pas adaptées ; un grand nombre de souches (14 sur 23 pour le couple d'amorces ITS1/ITS2 et 20/23 pour le ITS3/ITS4) génèrent des amplifiats de tailles supérieures à 350 pb (**Figure 15**). Concernant les amorces ciblant la grande sous-unité 26S, le couple NL3A/NL4 permet d'obtenir des amplicons d'une taille comprise entre 250 et 350 pb, et le couple NL5 et NL6 d'une taille d'environ 200 pb.

L'amplification de la sous-unité 18S avec les amorces Lev1/Lev2 génère des amplicons de taille variable de 250 à 300 pb. Les couples d'amorces ciblant les sous-unités 18S et 26S, ont ainsi produit des amplicons dont la taille est adaptée à l'analyse en CE-SSCP. Leur spécificité permet d'amplifier toutes les souches de levures et moisissures testées. Ainsi ces couples d'amorces ont été retenus pour la suite de notre étude et testés vis à vis leur capacité à amplifier l'espèce *Vitis vinifera*. Aucun de ces couples d'amorces n'a permis d'amplifier la région à partir de la matrice ADN de *V. Vinifera*.

## 2.4 Choix du type de marquage

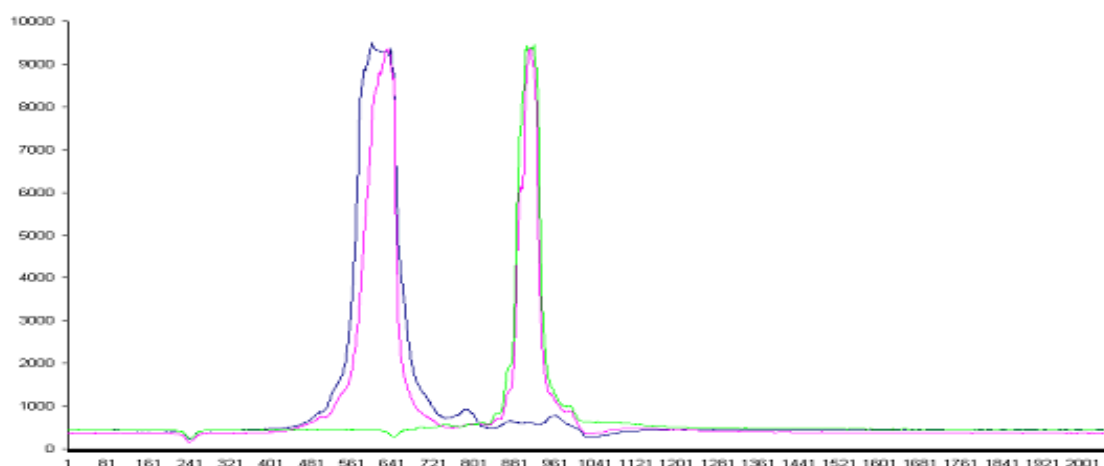
Les souches pures ont été d'abord étudiées individuellement, afin d'obtenir leurs profils avec les différents marquages. En analysant les profils obtenus pour *Saccharomyces cerevisiae* (**Figure 16**), il est possible de distinguer trois zones selon la paire d'amorces utilisée : la zone

de 200 pb en début du profil (amorces NL5/NL6), au milieu du profil, la zone de 300 pb (amorces Lev1/Lev2) et en fin de profil, la zone de 350 pb (amorces NL3A/NL4).



**Figure 16:** Profils de CE-SSCP de *Saccharomyces cerevisiae* selon les différentes combinaisons paires d'amorces / marquages.

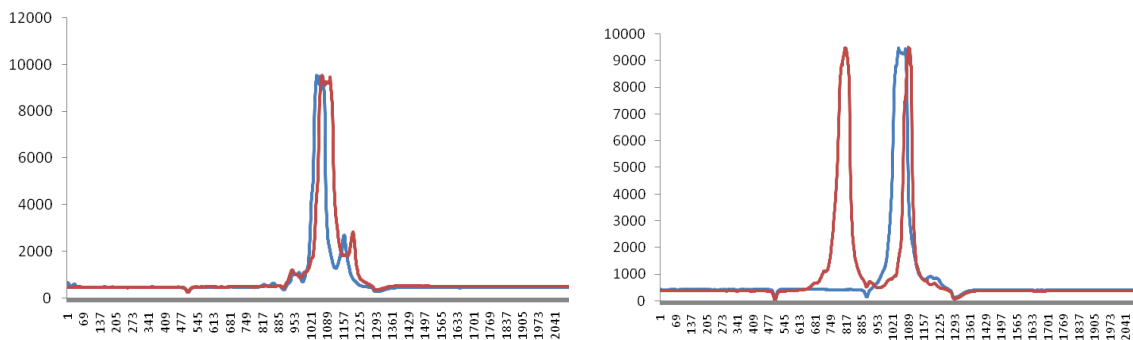
Nous avons vérifié que les pics obtenus à partir du double marquage sont superposés à ceux obtenus avec les marquages simple brin (**Figure 17**).



**Figure 17:** Superposition des pics des fragments amplifiés avec les amorces NL3A/NL4, avec les trois types de marquage (brin forward ■, brin reverse ■ et double marquage ■) pour *Saccharomyces cerevisiae*.

En analysant l'ensemble des profils obtenus à partir de réactions en simple marquage, nous avons observé, pour certaines espèces, une superposition de pics. Cette superposition existe dans certains cas, lorsque le brin *forward* seul est marqué et dans d'autres cas, lorsque le marquage concerne le brin *reverse*.

L'intérêt du double marquage réside dans le fait que s'il n'est pas possible de distinguer les espèces sur un seul pic, il est possible de le faire sur le deuxième pic. Un exemple est montré avec la paire d'amorces NL3A/NL4 pour *Candida zemplinina* et *Zygoascus hellenicus* (**Figure 18**). Le mono-marquage génère des profils très proches difficilement distinguables. En revanche, les profils générés avec le double marquage permettent de différencier les deux espèces.

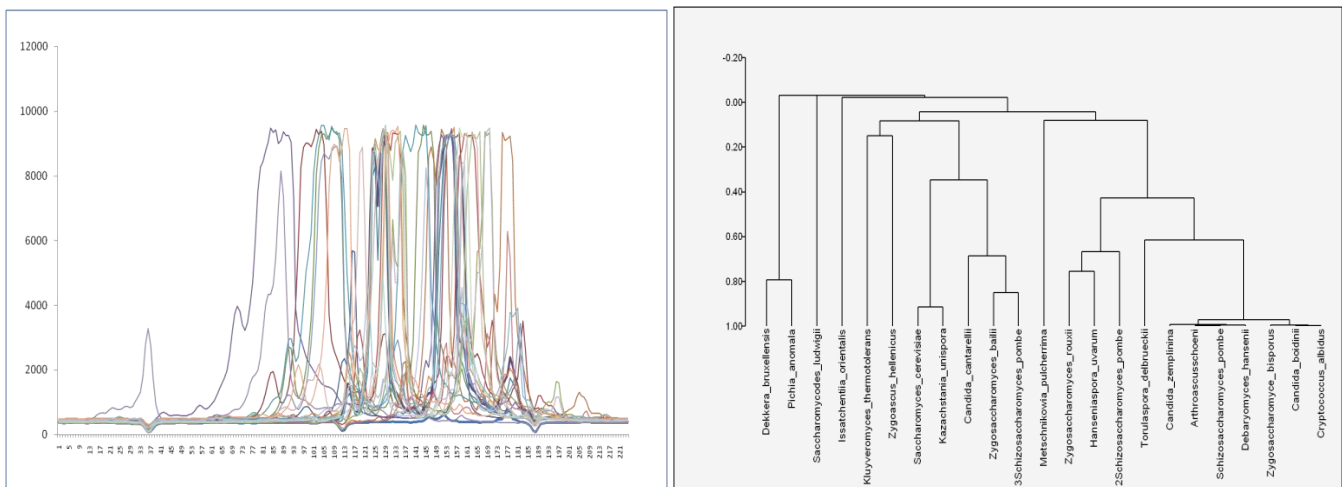


**Figure 18:** Profils de CE-SSCP pour les souches *Candida zemplinina* et *Zygoascus hellenicus* avec un simple marquage à gauche et un double marquage à droite (amorces utilisés NL3A/NL4).

### 3. Choix de la meilleure combinaison amorces/marquage

Le choix de la combinaison amorce/marquage a été guidé par la possibilité de pouvoir distinguer un maximum d'espèces. Les profils obtenus à partir de chaque souche ont été analysés par la méthode de la classification ascendante hiérarchique, produisant ainsi des dendrogrammes. L'analyse comparative des différentes combinaisons montre que les meilleurs résultats sont obtenus avec les amorces en double marquage. Parmi les trois

couples doublement marqués, les amorces NL5/NL6 ont permis de distinguer 18 branches ; 16 branches correspondaient à des espèces distinctes, mais les deux dernières comprenaient 7 espèces qui n'ont pas pu être différenciées (**Figure 19**). Les couples Lev1/Lev2 et NL3A/NL4 ont permis d'obtenir une meilleure résolution, permettant de distinguer 20 branches, pour 23 espèces analysées (**Figure 20** et **21**). En comparant les dendrogrammes produits à partir de ces deux derniers couples, on observe qu'avec le couple d'amorce Lev1/Lev2, une des trois souches de *Schizosaccharomyces pombe* est placée loin des deux autres souches dans le dendrogramme. Cependant, dans le dendrogramme obtenu en utilisant les couples NL3A/NL4, les trois souches sont groupées ensemble. Il apparaît ainsi que le couple NL3A/NL4 est le plus intéressant des couples testés, car il permet la discrimination du plus grand nombre d'espèces, tout en permettant le regroupement de souches d'une même espèce.



**Figure 19:** Profils CE-SSCP obtenus avec le couple d'amorces NL5/NL6 en double marquage.

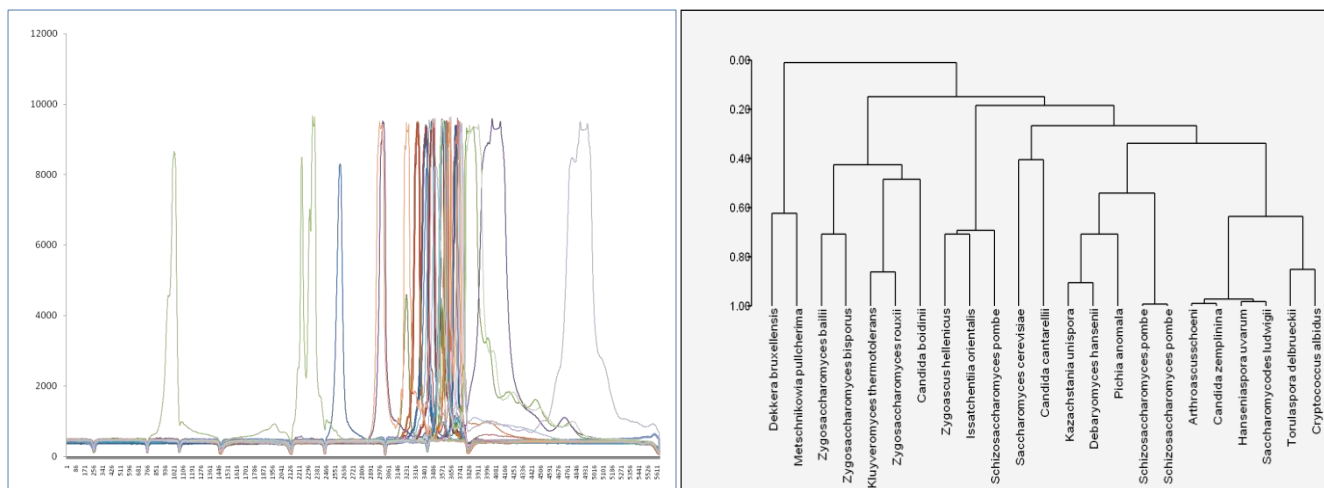


Figure 20: Profils CE-SSCP obtenus avec le couple d'amorces Lev1/Lev2 en double marquage.

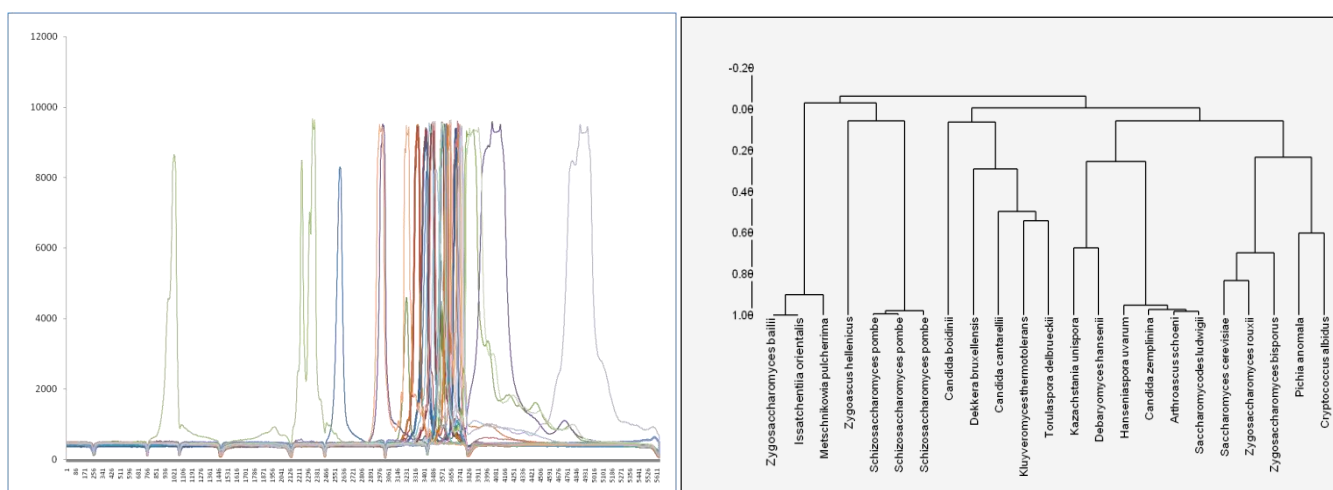


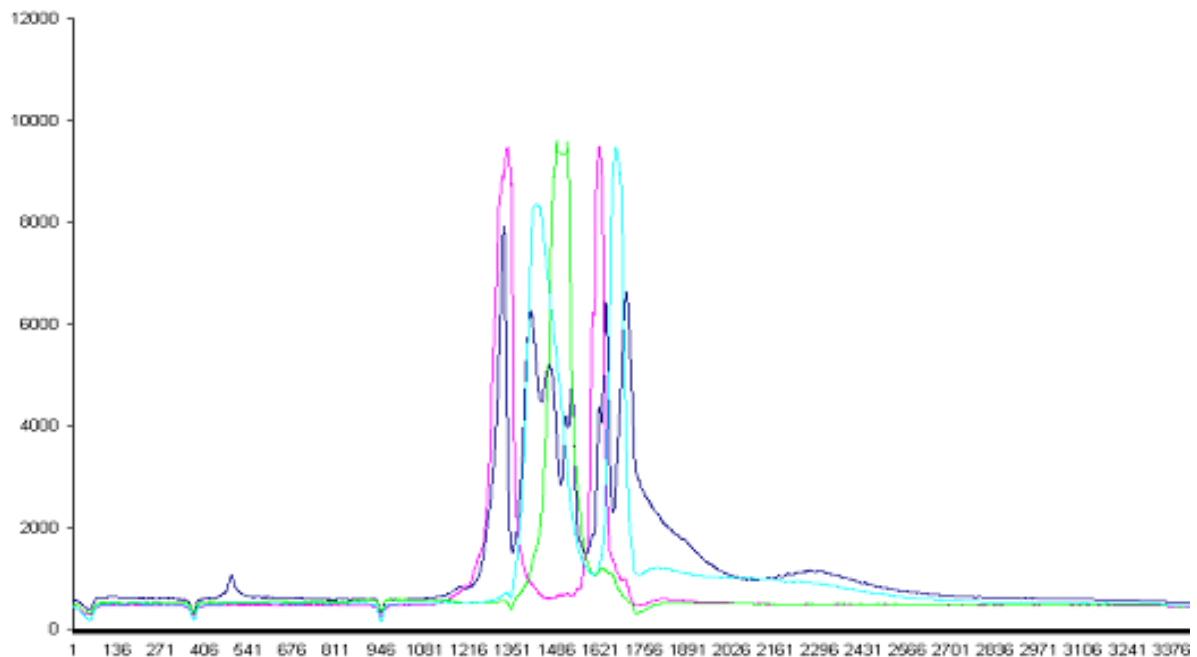
Figure 21: Profils CE-SSCP obtenus avec le couple d'amorces NL3A/NL4 en double marquage.

#### 4. Validation de la technique sur des mélanges des souches et des échantillons environnementaux

Les deux couples d'amorces Lev1/Lev2 et NL3A/NL4 ont été testés sur des échantillons constitués par des mélanges d'ADN de plusieurs souches et sur des échantillons environnementaux.

En ce qui concerne les mélanges d'ADN, les profils obtenus sont similaires pour les deux couples d'amorces.

La complexité des profils et la superposition des pics selon le nombre d'espèces en culture pure, en mélange ou dans des échantillons environnementaux ont été analysées. La zone des signaux obtenue par la combinaison des profils des souches pures coïncide avec celle obtenue avec les mélanges d'ADN des espèces (exemple donnée pour 3 espèces **Figure 22**).



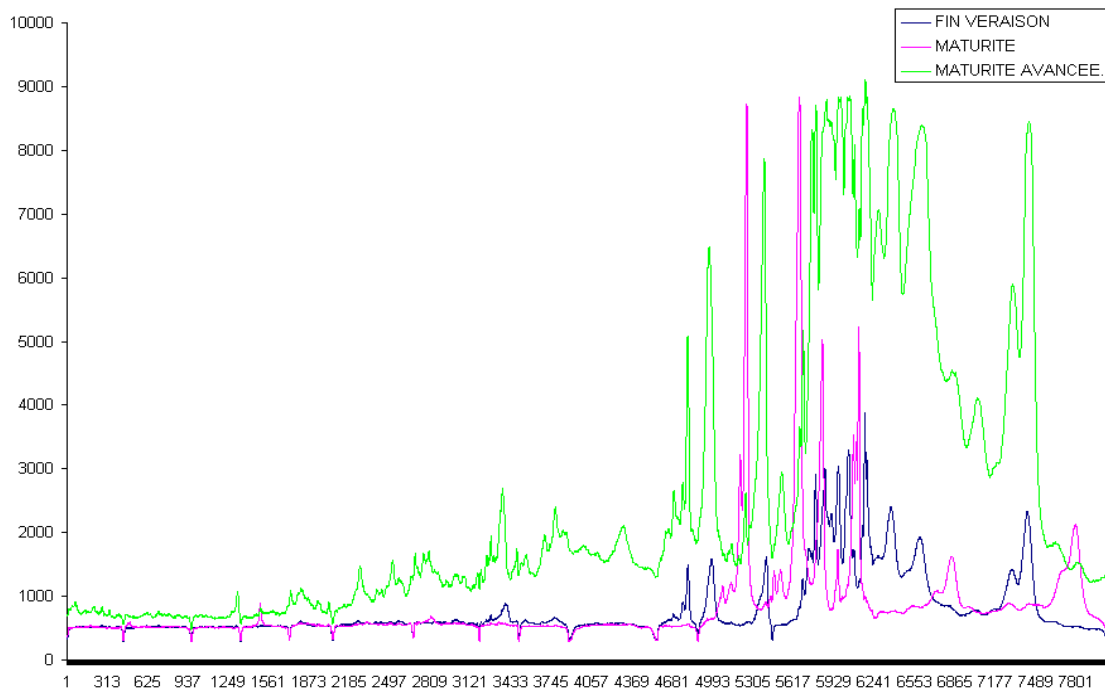
**Figure 22:** Comparaison de profils obtenus avec l'amplification de mélange d'ADN de 3 espèces et la superposition des profils des mêmes espèces, (*Pichia anomala* ■, *Hanseniaspora uvarum* ■, *Saccharomyces cerevisiae* ■, mélange de souches ■).

Une augmentation de la complexité des profils selon le nombre des espèces est observée, également constatée dans des études précédentes (Zinger et al. 2007).

Nous avons analysé les échantillons environnementaux en utilisant la paire d'amorces NL3A/NL4 en double marquage. Les échantillons proviennent de raisins prélevés dans la parcelle de Lussac en mode de conduite biologique aux stades de début maturité, maturité et maturité avancée lors de la campagne 2008.

Les profils obtenus, issus de l'amplification d'ADN extrait d'eau de lavage des baies, se superposent et sont relativement simples montrant ainsi que l'analyse CE-SSCP est possible compte tenu de la diversité de la communauté fongique présente dans les eaux de lavage de baie.

La comparaison des échantillons montre clairement une évolution des profils selon le stade phénologique (**Figure 23**). Les profils sont plus complexes au stade maturité avancée.



**Figure 23:** Profils CE-SSCP obtenus à partir de l'ADN extraits d'eaux de lavage de baies des échantillons environnementaux prélevés lors de la campagne 2008.

Nous avons également observé que l'aire des pics augmente au fur et à mesure de la maturation des baies. L'analyse CE-SSCP ne permet pas l'analyse quantitative des communautés microbiennes. Néanmoins, ce résultat est cohérent avec l'augmentation du niveau de populations cultivables sur la baie au fur et à mesure de l'avancement de la maturité.

## **5. Discussion**

La technique CE-SSCP a été appliquée avec succès à l'étude des communautés microbiennes de différents écosystèmes (King et al. 2005; Hong et al. 2007; Verdier-Metz et al. 2009). Cette méthode permet notamment d'aborder l'étude globale de la diversité microbienne d'un écosystème dans un contexte donné. Au cours de ce travail, nous avons développé une méthode CE-SSCP pour l'étude de l'écosystème fongique de la baie de raisin et évaluer son intérêt. Après avoir défini les conditions d'amplification et par la suite les conditions de migration sur le capillaire, nous avons sélectionné deux combinaisons d'amorces/marquage adaptées à la séparation en CE-SSCP d'une vingtaine d'espèce décrites sur la baie de raisin. Cette méthode a été testée sur des mélanges d'ADN puis sur des échantillons environnementaux. Nous montrons qu'il s'agit d'une technique rapide et facile à mettre en œuvre, avec une grande résolution et rapidité pour l'interprétation des résultats. De plus, cette technique à haut débit permet le traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons. En ce qui concerne le traitement des données obtenues, il se fait avec des logiciels faciles à manipuler.

Concernant le traitement des échantillons environnementaux, nous avons constaté que la technique de CE-SSCP peut être un outil fiable pour le suivi de la dynamique des populations fongiques au cours du cycle végétatif.

Ainsi, cette étude rapporte, pour la première fois, l'utilisation de la technique CE-SSCP pour le suivi du système microbien fongique de la baie de raisin. Les résultats obtenus montrent que cette technique peut être un outil d'obtention d'empreinte moléculaire très performant pour l'étude de l'écosystème microbien de la baie de raisin, apportant des informations complémentaires à d'autres approches.



## **CHAPITRE IV – La communauté microbienne de la baie de raisin**

## **1. Evolution des niveaux de populations microbiennes au cours de la croissance et de la maturation de la baie**

La présence de micro-organismes sur la baie de raisin à différents stades phénologiques a été constatée dans plusieurs études. Cependant, la dynamique de ces différentes populations tout au long de la croissance et de la maturation de la baie est relativement peu connue. Nous avons analysé l'évolution de différentes populations cultivables, des stades précoces jusqu'à maturité avancée, dans plusieurs parcelles correspondant à différents terroirs et modes de conduite.

Dans cette partie de notre travail, nous décrirons ce suivi, présentant les données concernant les niveaux des populations cultivables et l'identification d'espèces présentes. Nous avons décidé de présenter les résultats concernant les années 2009 et 2010, pour lesquelles le plus grand nombre de prélèvements a été réalisé.

### **1.1 Campagne de prélèvements 2009**

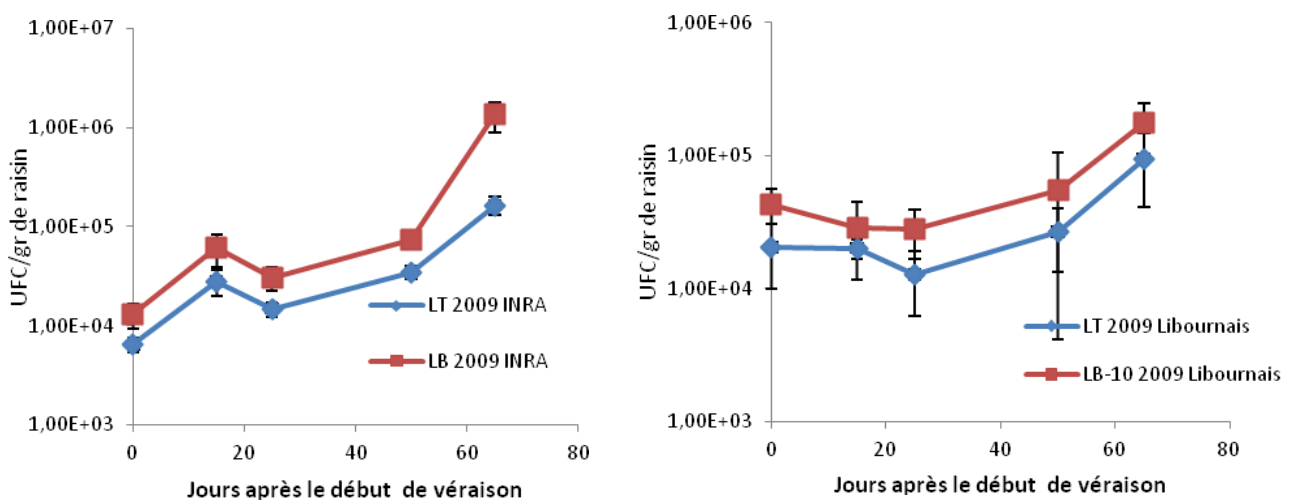
Pendant la campagne de 2009, les prélèvements ont été réalisés dans la parcelle expérimentale INRA-Grande Ferrade et dans les six parcelles de la région du libournais. Les échantillons ont été prélevés à cinq stades successifs, du début de la véraison jusqu'à maturité avancée (**Tableau 8, Chapitre II**).

#### **1.1.1 Population cultivable sur milieu LT et LB 1/10**

Pour la parcelle expérimentale INRA-Grande Ferrade et pour les six parcelles de la région du Libournais, les résultats de dénombrements sur milieu LT montrent une population initiale en début de véraison de  $10^4$  UFC/gramme de raisin. L'évolution des niveaux de populations montre une baisse, soit après le stade de mi-Véraison (INRA et Pomerol), soit après le début de la véraison (Lussac et Puisseguin). Cette baisse est suivie par une augmentation de population tout au long de la maturité, pour atteindre des valeurs maximales à maturité avancée (entre  $10^5$  et  $10^6$  UFC/gramme de raisin) (Annexe I, Figure I).

La dynamique de la population sur milieu LB 1/10, est en général similaire à celle du milieu LT, où les niveaux augmentent à partir de la mi-véraison. Néanmoins, une seule exception a été remarquée,

c'est le cas de la parcelle traitement conventionnel à Pomerol où les niveaux de population ont été de plus en plus bas jusqu'à maturité, suivi d'une augmentation exponentielle à maturité avancée (**Figure 24**).



**Figure 24:** Evolution des populations cultivables sur milieu LT et sur milieu LB 1/10 à partir du début de véraison et jusqu'à maturité avancée. Pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite) (les résultats présentés sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles). Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

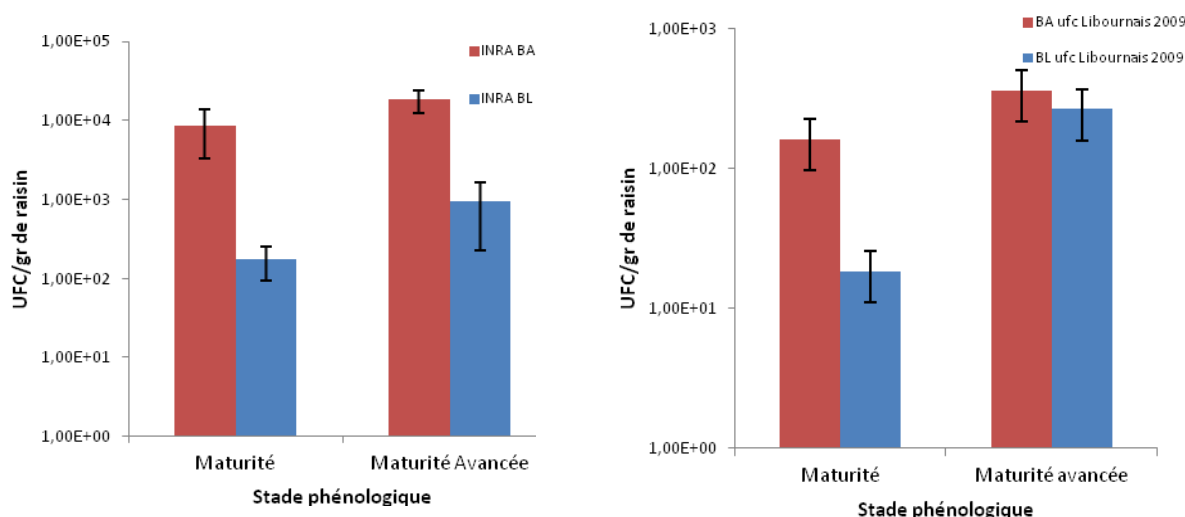
Les résultats de l'ANOVA, prenant en compte le stade de maturité comme le seul facteur de variabilité, montrent un effet significatif sur la population, que ce soit pour la parcelle expérimentale INRA-Grande Ferrade, ou pour les parcelles du Libournais (Annexe 1: Tableaux I et II).

Les tests de comparaisons multiples révèlent que le stade de maturité avancée constitue un groupe homogène distinct de tous les autres stades. Les stades de mi- véraison présentent

des niveaux de populations proches des stades de maturité, formant dans la plupart des cas un groupe homogène.

### 1.1.2 Population cultivable sur milieu BA et BL

Sur les cinq stades prélevés, il a été possible d'isoler et de dénombrer des colonies sur les milieux BA et BL uniquement à maturité et maturité avancée. La population de BA est plus abondante que celle de BL. Une augmentation du stade de maturité au stade de maturité avancée est observée (**Figure 25**). Les résultats de l'ANOVA montrent un effet significatif du stade phénologique sur les niveaux de population (Annexe 1: Tableaux III).



**Figure 25:** Evolution des populations sur milieu BA et BL. Pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite). Les résultats présentés pour le Libournais sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

## 1.2 Campagne de prélèvements 2010

Pendant la campagne de 2010, le nombre de prélèvements réalisés a varié selon les parcelles. Dans le site INRA – Grande Ferrade, les prélèvements ont été effectués à huit moments différents, de la fermeture de la grappe jusqu'à maturité avancée (**Chapitre II: Tableau 8**). Les derniers échantillons (aux stades de maturité avancée) ont été récoltés

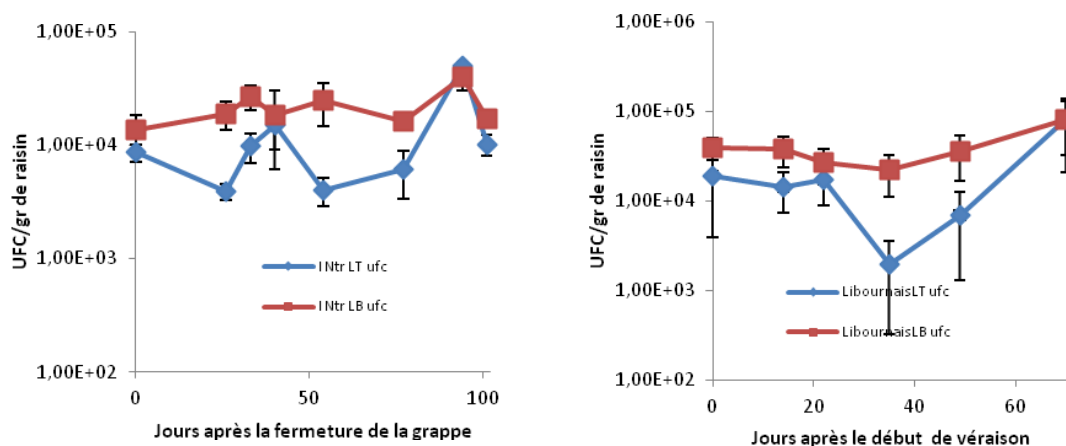
longtemps après la maturation ; en effet, cette parcelle a été également suivie pour étudier l'impact de *Botrytis* sur les communautés microbiennes de la baie de raisin et les signes épidémiologiques de cette pourriture sont apparus très tardivement.

Dans la région du libournais, les prélèvements ont été réalisés dans les six parcelles, pour six stades phénologiques, du début de la véraison jusqu'à maturité avancée.

### 1.2.1 Population cultivable sur milieu LT et LB 1/10

Dans les parcelles de l'INRA Grande Ferrade, les populations initiales sur milieu LT et LB 1/10 sont similaires, de l'ordre de  $10^4$  UFC/gramme de raisin. La population de LT varie significativement au cours des périodes de croissance et de développement de la baie. Une baisse importante de population est enregistrée après la fermeture de la grappe et en début de maturité, suivi d'une période d'augmentation continue de population, le niveau plus haut étant noté au stade maturation avancée.

En ce qui concerne le milieu LB 1/10, les variations de niveau de population entre prélèvements ont été beaucoup moins importantes. Les valeurs sont restées légèrement supérieures à  $10^4$  UFC/ gramme de raisin (**Figure 26**).



**Figure 26:** Evolution des populations des levures sur milieu LT et de bactéries sur milieu LB 1/10 à partir de la fermeture de la grappe pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et à partir du début de véraison pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite) jusqu'au stade maturité avancée. Les résultats présentés pour le Libournais sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

Concernant les parcelles du libournais, la population cultivable sur milieu LB 1/10 est dans la plupart des cas supérieure à celle du milieu LT. Pour les deux milieux, les valeurs les plus basses sont obtenues aux stades de mi-véraison ou début de maturité (Annexe 1, Figure II). Ces populations plus faibles, en particulier pour la population cultivable sur milieu LT, peuvent être liées à un épisode de pluie qui s'est produit la veille des prélèvements (enregistrement des valeurs de 6 mm à Lussac et 23 mm à Puisseguin, cumul des précipitations en mm (du jour J-1 à 6h TU au jour J à 6h TU)). Les phénomènes de lessivage de micro-organismes par la pluie ont déjà été décrits dans des travaux précédents (Comitini et Ciani, 2006).

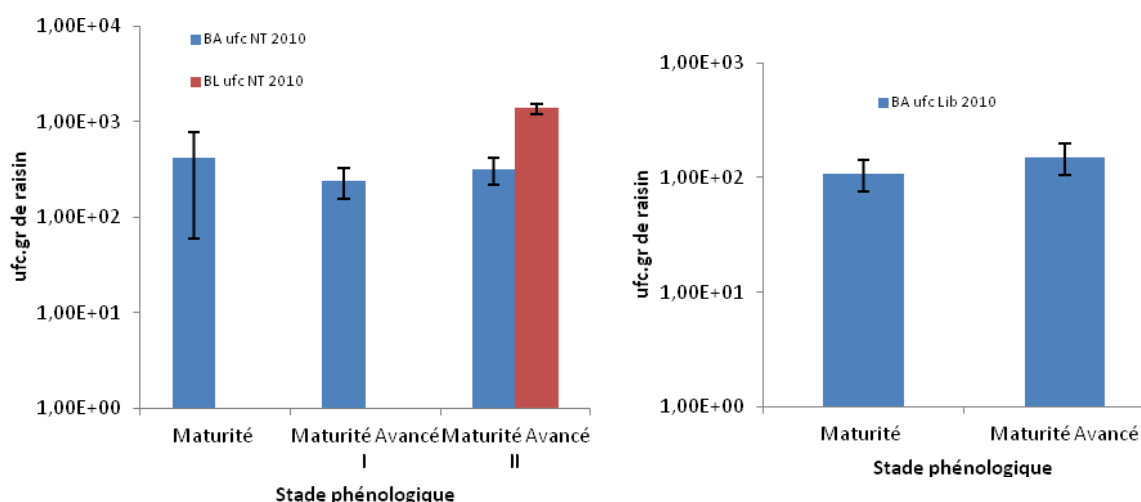
L'analyse de variance à un facteur des niveaux de population microbiens sur milieu LT et LB 1/10, montre des différences significatives selon le stade de prélèvement (Annexe 1: Tableaux IV et V).

### **1.2.2 Population cultivable sur milieu BA et BL**

Comme en 2009, la présence des bactéries acétiques est détectée qu'à partir du stade maturité, avec des valeurs comprises entre  $10^2$  et  $10^3$  UFC/gramme de raisin.

Pour les parcelles INRA-Grande Ferrade, il a été possible d'isoler et de dénombrer des bactéries lactiques uniquement lors du dernier stade, celui de maturité avancée, tandis que dans les parcelles du Libournais, les bactéries lactiques sont absentes du milieu BL (**Figure 27**).

Les résultats de l'ANOVA à un facteur concernant l'effet stade phénologique sur les populations bactériennes sur milieu BA n'est pas significatif (Annexe 1: Tableaux VI).



**Figure 27:** Evolution des populations BA et BL pour la parcelle d'expérimentale INRA-Grande Ferrade (à gauche), et pour les six parcelles de la région de Libournais (à droite). Les résultats présentés pour le Libournais sont la moyenne des valeurs obtenues pour les 6 parcelles. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

## 2. Diversité et distribution temporelle des espèces bactériennes et des levures

Afin d'identifier les espèces présentes dans les différents prélèvements, les colonies dénombrées sur les milieux LT et LB 1/10, pendant la campagne de 2009, ont été isolées puis analysées.

Pour des raisons de logistique, il n'a pas été possible d'analyser la totalité des parcelles. Parmi les différentes régions de notre dispositif expérimental, nous avons donc choisi d'analyser les colonies provenant des parcelles de Lussac et Pomerol. Ce choix a été effectué, d'une part pour l'étude de la distribution temporelle, mais également pour analyser l'influence du climat sur l'évolution des populations microbiennes, ces deux terroirs ayant les conditions météorologiques les plus contrastées.

A partir des boîtes de cultures correspondant aux séries non diluées, entre 10 à 15 colonies sont repiquées aléatoirement, tout en s'assurant que cet échantillonnage inclue les différents morphotypes existants. Les colonies sont purifiées et conservées en suivant la procédure détaillée en (**Chapitre II: 3.3**) pour intégrer la collection du Centre de Ressources

Biologiques de la Faculté d'œnologie. Les isolats sont ensuite décongelés puis identifiés par des méthodes moléculaires précédemment décrites.

## 2.1 Espèces bactériennes

Les séquences obtenues par amplification de l'ADNr 16s des différents isolats sont comparées à des séquences enregistrées dans des banques de données GenBank DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). L'identification est validée quand le fragment de 800 à 900 pb présente un pourcentage d'homologie supérieur à 98 %.

L'identification des isolats provenant de deux parcelles à Lussac montre que, parmi les 93 espèces identifiées, 47 appartiennent au phylum *Proteobacteria* dont la majorité (43 isolats) à la classe des *Gammaproteobacteria*, 3 isolats à la classe des *Betaproteobacteria* et un seul à la classe des *Alphaproteobacteria*. Le phylum des *Actinobacteria* est le deuxième le plus abondant avec 36 isolats, puis vient le phylum des *Firmicutes*, dont les 10 isolats appartenant en totalité à la classe des *Bacilli* (**Figure 28**).

Au total, 36 espèces appartenant à 17 genres ont été identifiées. Le genre le plus représenté dans toutes les parcelles est *Pseudomonas*, avec 37 % des isolats. Dans ce genre, 7 espèces différentes ont été identifiées en proportions variables : *P. cannabina* (10,8 %), *P. congelans* (10,8 %), *P. graminis* (5,3 %), *P. koreensis* (2,2 %), *P. poae* (1,1 %), *P. rhizosphaerae* (3,2%), et *P. viridiflava* (3,7 %).

Le genre *Micrococcus* est le deuxième plus abondant, représentant 20 % des espèces isolées, dont les espèces *M. endophyticus* et *M. luteus* en proportions équivalentes.





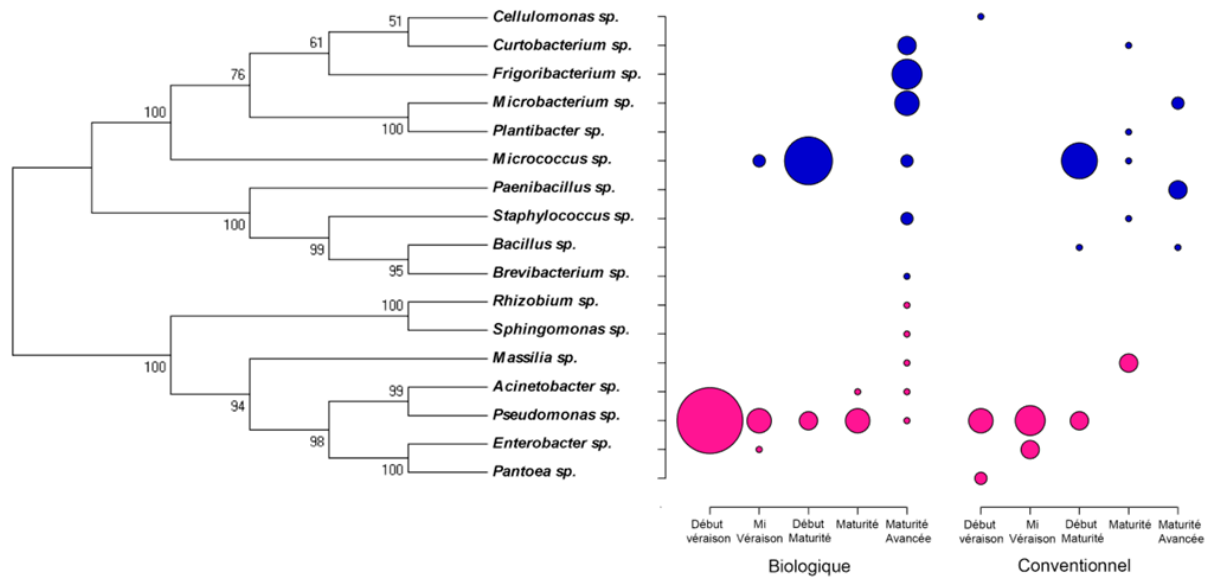


Au total pour Pomerol, 24 espèces ont été identifiées appartenant à 12 genres. Comme observé à Lussac, les genres les plus abondants sont *Pseudomonas*, représentant 48,5 % des isolats et *Micrococcus* avec 15% des isolats.

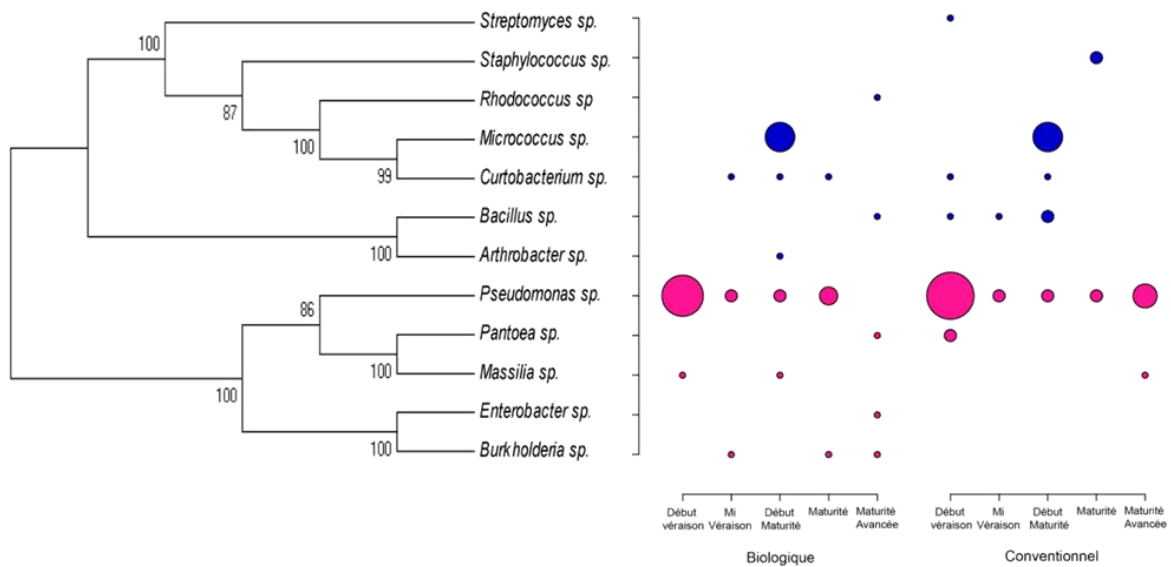
Le genre *Pseudomonas* comprend 5 espèces dont: *P. graminis* (50%), *P. congelans* (25 %), *P. poae* (9 %) et d'autres espèces minoritaires telle que *P. viridiflava*, *P. cannabina*. En ce qui concerne le genre *Micrococcus*, seule l'espèce *M. luteus* est identifiée. D'autres genres et espèces sont retrouvés moins fréquemment tels que *Arthrobacter* (*A. defluvii*); *Bacillus* (*B. altitudinis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*) ; *Burkholderia* (*B. pyrrocinia*) ; *Curtobacterium* (*C. flaccumfaciens*) ; *Enterobacter* (*E. hormaechei*) ; *Massilia* (*M. aurea*) ; *Pantoea* (*P. agglomerans*) ; *Rhodococcus* (*R. erythropolis*) ; *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. hominis*) et *Streptomyces* (*S. fimicarius*) (**Figure 29**).

Les résultats de l'ANOVA à deux facteurs, prenant comme variables indépendantes le stade phénologique et le genre, montre que *Pseudomonas* est significativement plus souvent isolé dans les stades précoces (début et mi-véraison) par rapport aux stades tardifs correspondants à la période de maturation de la baie (début maturité, maturité et maturité avancée). Pour le genre *Micrococcus*, les résultats montrent un comportement inverse, il est plus fréquemment retrouvé pour les stades tardifs ( $p < 0,001$  pour le facteur stade et 0,014 pour le facteur genre; interaction significative entre les deux facteurs  $p < 0,001$ ). Ces résultats, montrant l'influence du stade phénologique sur la diversité de la population bactérienne, ont été mis en évidence pour les deux terroirs Lussac et Pomerol.

L'analyse de la fréquence des bactéries Gram-négatives et des Gram-positives aux différents stades phénologiques, montre une diminution du pourcentage des bactéries Gram-négatives tout au long de la maturation de la baie, et dans le même temps, que le pourcentage de bactéries Gram-positives augmente (**Figure 30 et 31**).



**Figure 30:** Distribution et abondance des genres bactériens à différents stades phénologiques dans le vignoble de Lussac. Les cercles de couleur rose représentent les genres Gram-négatifs et la couleur bleue les genres Gram-positifs. Le diamètre des cercles est proportionnel à l’abondance des populations. L’arbre phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir des souches types d’espèces identifiées parmi les isolats.



**Figure 31:** Distribution et abondance des genres bactériens à différents stades phénologiques dans le vignoble de Pomerol. Les cercles de couleur roses représentent les genres Gram-négatifs et la couleur bleue les genres Gram-positifs. Le diamètre des cercles est proportionnel à l’abondance des populations. L’arbre phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir de souches types d’espèces identifiées parmi les isolats.

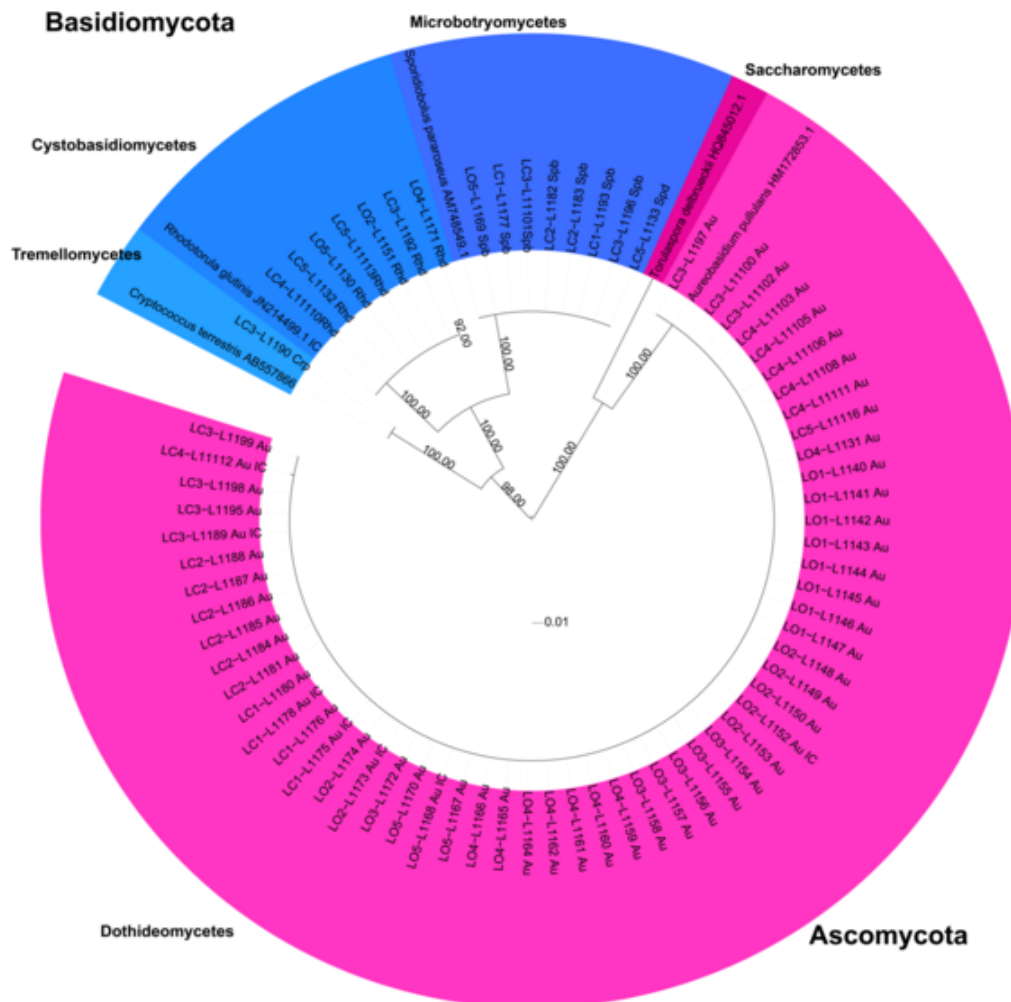
## 2.2 Identification des espèces fongiques

L'identification des espèces fongiques a été réalisée, dans un premier temps, en séquençant les régions ITS1 et ITS2 de la région 5.8S. Par la suite, dans une démarche d'intégration de ces souches dans le Centre de Ressources Biologiques, ces mêmes isolats ont été re-analysés, selon les méthodes détaillées en **Chapitre II : 3.3**, basées sur l'amplification de la région D1/D2 du LSU 26/28S. Par ces deux méthodes, les résultats d'identification taxonomique ont été similaires, la région D1/D2 étant plus informative pour la distinction des espèces au sein d'un même genre. Néanmoins, entre ces deux analyses, nous avons observé une perte de viabilité de certaines souches, pouvant s'expliquer par le fait que les échantillons ont été soumis à une décongélation puis une recongélation. Notamment, après la deuxième analyse, certaines espèces comme *Torulasporea delbrueckii*, *Curvibasidium palleocorallinum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Epicoccum sp.*, et d'autres du genre *Rhodotorula*, *Cryptococcus* et *Sporidiobolus* n'ont pas pu repartir en croissance. Pour cette raison, la phylogénie des espèces isolées, représentée figures 29 et 30 est basée d'une part, sur les séquences des isolats obtenues à partir de l'amplification de LSU 26/28S, et d'autre part, pour les isolats identifiés initialement par ITS1-ITS2, qui n'ont pas pu être re-identifiés, sur les séquences de la région D1/D2 correspondantes trouvées dans la base de données GenBank.

Les fragments obtenus de tailles variant entre 500 et 550 pb, ont été comparés à des séquences enregistrées dans des banques de données. La majorité des séquences obtenues montre un pourcentage homologie supérieur à 99%.

L'analyse des colonies provenant des parcelles de Lussac montre que les 81 isolats identifiés, appartiennent à deux phylums : *Ascomycète* et *Basidiomycète*. Parmi eux, le genre plus fréquent est *Aureobasidium* comprenant 57 d'isolats, dont les espèces *A. pullulans* et *A. proteae*. Les genres *Sporidiobolus* (*Sporidiobolus pararoseus*, *Sporobolomyces sp.*) et *Rhodotorula* (*R. glutinis*) sont également identifiés, représentant 10 et 7 isolats respectivement. Les genres *Cryptococcus* (*C. terrestris*) *Torulasporea* (*T. delbrueckii*) sont présents, mais avec une faible fréquence (4 et 3 isolats) (**Figure 32**). Ces cinq genres

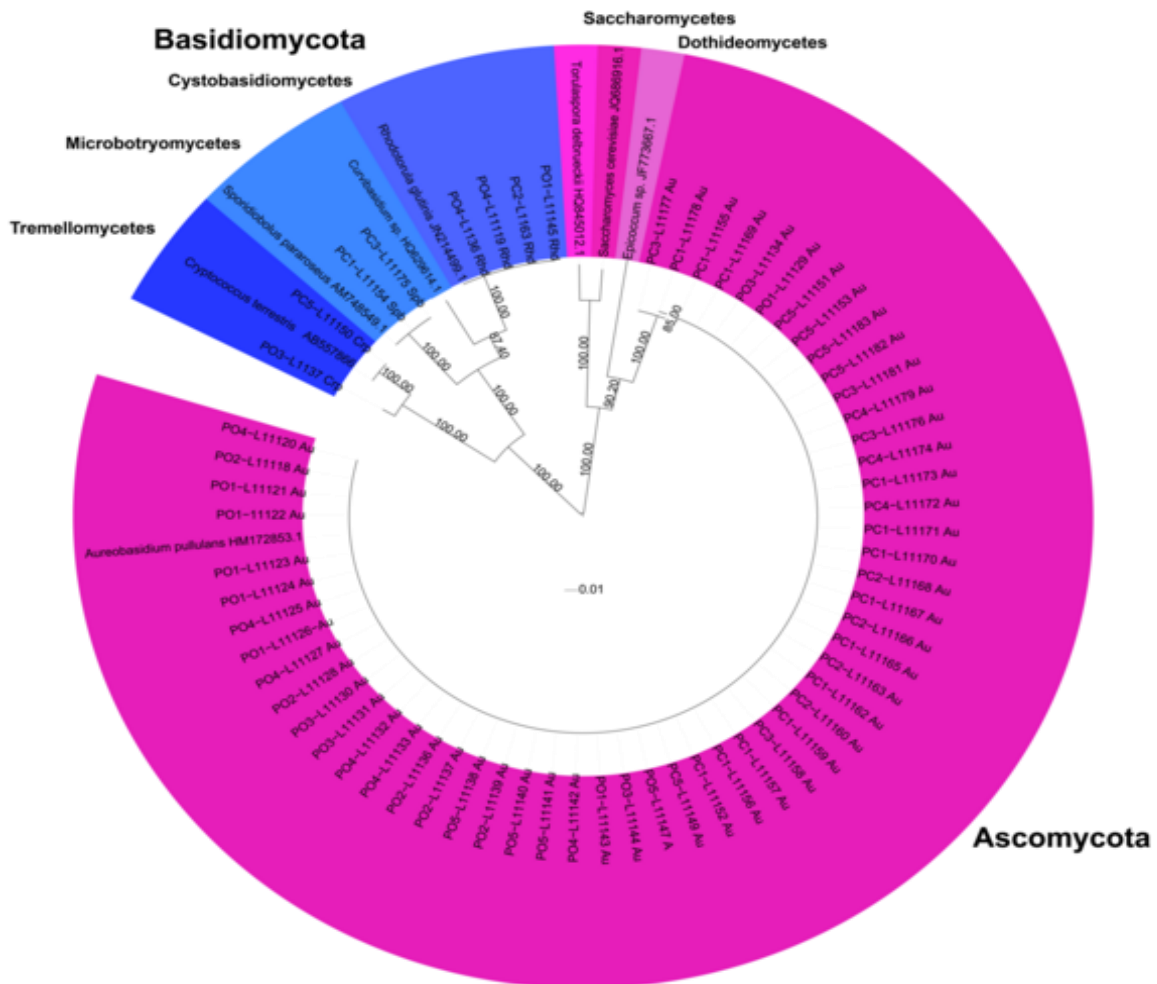
représentent les classes *Dothideomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Tremellomycetes* et *Saccharomycetes* respectivement.



**Figure 32:** Phylogénie moléculaire basée sur l’homologie des séquences partielles de LSU 26/28s, des espèces eucaryotes isolées sur milieu LT provenant de Lussac et de 5 souches types (les numéros d'accension des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite). Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.

Le genre *Aureobasidium* est le plus abondant. Le pourcentage relatif de ces isolats par rapport à l’ensemble des espèces est relativement stable tout au long des différents stades phénologiques, à l’exception du dernier stade où une diminution est observée pour les deux parcelles (**Figures 34** et **35**). À Pomerol, 86 colonies ont été isolées et identifiées. Comme à

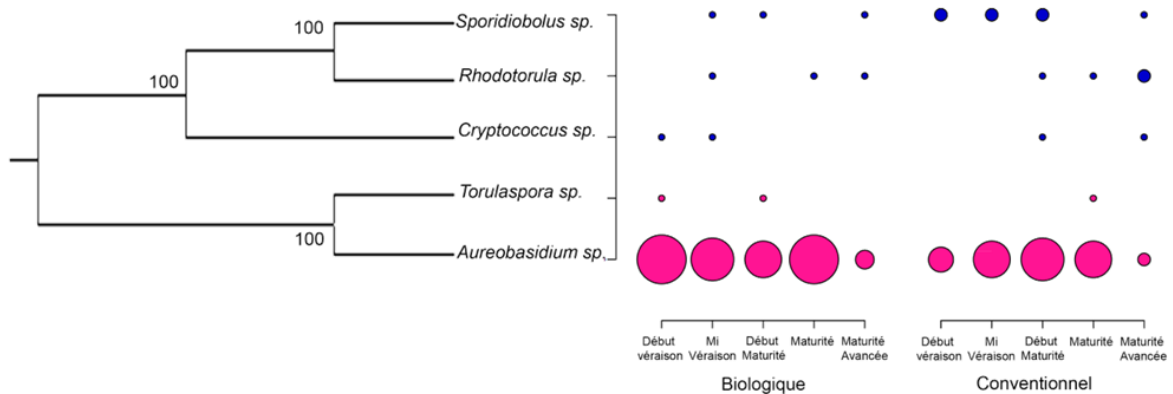
Lussac, les espèces appartiennent aux phylums *Ascomycète* et *Basidiomycète*. La majorité des espèces (55 isolats) appartient au genre *Aureobasidium* comprenant les espèces *A. pullulans* et *A. proteae*.



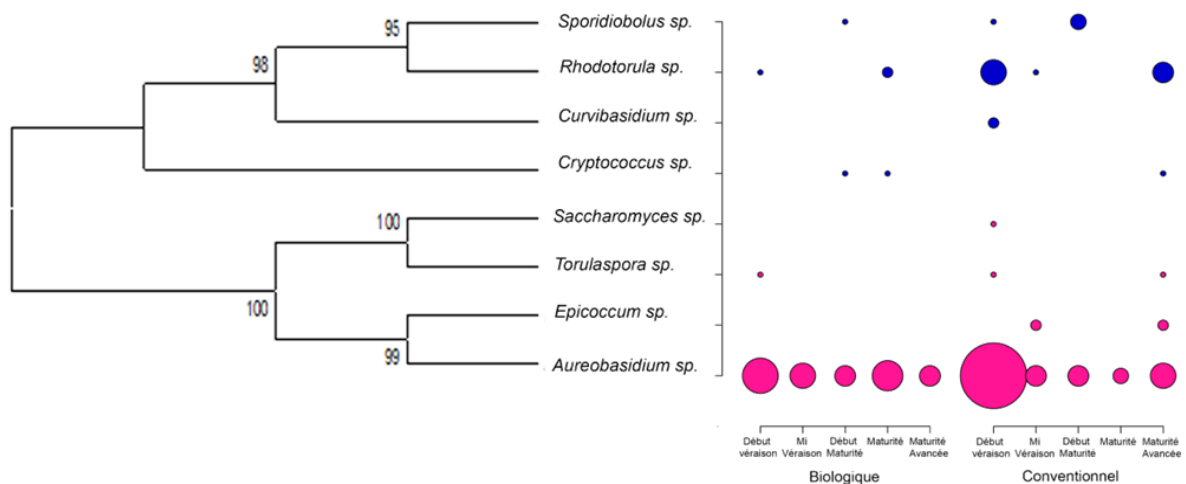
**Figure 33:** Phylogénie moléculaire basée sur l’homologie des séquences partielles de LSU 26/28s, des espèces eucaryotes isolées sur milieu LT provenant de Pomerol et de 7 souches types (les numéros d'accèsion des séquences des souches types sont donnés à l'extrême droite). Arbre établi par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter (bootstrap à 1000 répliques). Les nombres au-dessus des nœuds correspondent aux valeurs de bootstrap.

Le deuxième genre le plus abondant est *Rhodotorula* qui comprend l’espèce *R. glutinis* (13 isolats). Nous avons également isolé *Sporidiobolus* (*Sporidiobolus pararoseus*,

*Sporobolomyces* sp.) (5 isolats) ; *Epicoccum* (4 isolats) ; *Cryptococcus* (3 isolats), dont les espèces *C. flavescens*, *C. laurentii* et *C. terrestris*; *Curvibasidium* et l'espèce *C. paleocorallinum* (2 isolats); *Torulaspota* (*T. delbrueckii*) (3 isolats) et *Saccharomyces* en particulier l'espèce *S. cerevisiae* (1 isolat). Ces huit genres représentent les classes des *Dothideomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Tremellomycetes*, et *Saccharomycètes* (Figures 33).



**Figure 34:** Distribution et abondance des genres de levures à différents stades phénologiques dans le vignoble de Lussac. Les cercles de couleur rose représentent les genres *Ascomycète* et le couleur bleue les genres *Basidiomycète*. Le diamètre des cercles est proportionnel à l'abondance des populations. L'arbre phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir de souches types d'espèces identifiées parmi les isolats.



**Figure 35:** Distribution et abondance des différents genres de levures à différents stades phénologiques dans le vignoble de Pomerol. Les cercles de couleur rose représentent les genres *Ascomycète* et le couleur bleue les genres *Basidiomycète*. Le diamètre des cercles est proportionnel à l'abondance des populations. L'arbre phylogénétique (obtenu par la méthode Neighbor-Joining avec le modèle de correction de Kimura-2-parameter, bootstrap=1000), a été établi à partir de souches types, d'espèces identifiées parmi les isolats.



Comme à Lussac, la présence des espèces du genre *Aureobasidium* est vérifiée dans tous les prélèvements, de façon dominante. (Figures 34 et 35).

### 3. Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel

La détection sur la baie de raisin d'espèces de levures décrites dans le moût aux différents stades de la fermentation alcoolique a été réalisée par PCR en temps réel (Zott et al. 2010). Cette méthode a été choisie pour sa sensibilité, permettant ainsi de détecter des espèces cibles minoritaires (seuil de détection 10 à 100 UFC/ml, Zott et al. 2010). L'analyse est réalisée directement sur la suspension cellulaire de l'eau de lavage des baies. Les premières analyses ont été mises en œuvre dans les échantillons prélevés à Lussac pour les deux parcelles (biologique et conventionnel) lors de la campagne de 2008, du début de maturité jusqu' à maturité avancée. Dans la parcelle en mode de conduite conventionnel, le dernier prélèvement n'a pas été possible par des raisons logistiques.

Les résultats obtenus montrent la présence de toutes les espèces ciblées. *Hanseniaspora* spp. et *Issatchenkia orientalis* sont les plus fréquemment retrouvées (3 prélèvements/7). La fréquence de détection d'espèce d'intérêt œnologique est plus élevée aux stades maturité et maturité avancée (Tableau 16). L'espèce d'altération *Brettanomyces bruxellensis* est détectée à deux reprises, dans les échantillons issus des parcelles en mode biologique à maturité et maturité avancée.

Région viticole	Stades Phén.	Mode cond.	<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>Hanseniaspora</i> spp.	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida zemplinina</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
Lussac	Début de Maturité	Bio	-	-	-	-	-	-	-
		Conv	-	-	-	-	-	-	-
	Début de Maturité II	Bio	-	-	-	-	-	+	-
		Conv	-	+	-	-	-	-	-
	Maturité	Bio	+	+	-	+	+	+	+
		Conv	-	+	-	-	+	-	-
	Maturité Avancée	Bio	+	-	+	+	+	+	+

**Tableau 16:** Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel. Échantillons provenant des vignobles de Lussac, campagne de 2008, à différents stades phénologiques pour les parcelles en mode de conduite biologique (Bio) et Conventionnel (Conv).

En ce qui concerne les échantillons de la campagne de 2009, la quantité limitée de biomasse récupérée à partir de la baie de raisin n’a pas permis l’analyse par PCR en temps réel. L’optimisation du protocole de récupération de biomasse sur la pellicule de la baie de raisin a permis l’analyse des échantillons de la campagne 2010 par PCR en temps réel.

Région viticole	Stades Phén.	Mode Cond.	<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>Hanseniaspora</i> spp.	<i>Metschikowia pulcherrima</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida zemplinina</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	
Pomerol	Début Véraison	Bio	-	+	-	+	+	-	-	
		Conv	-	-	-	+	+	-	-	
	Mi-véraison	Bio	-	-	-	-	+	-	-	
		Conv	-	+	-	+	+	-	-	
	Début de Maturité	Bio	-	-	-	-	+	-	-	
		Conv	-	+	-	+	-	-	-	
	Début de Maturité II	Bio	-	-	-	-	-	-	-	
		Conv	-	-	-	-	-	-	-	
	Maturité	Bio	-	-	-	-	-	-	-	
		Conv	-	-	-	-	-	-	-	
	Maturité Avancée	Bio	-	-	-	-	-	+	-	
		Conv	-	-	-	-	-	-	-	
	Lussac	Début Véraison	Bio	-	-	-	-	-	-	-
			Conv	-	-	-	-	+	-	-
Mi-véraison		Bio	-	-	-	-	+	-	-	
		Conv	-	-	-	-	+	-	-	
Début de Maturité		Bio	-	-	+	-	-	-	-	
		Conv	-	-	-	-	-	-	-	
Début de Maturité II		Bio	-	+	-	-	+	-	-	
		Conv	-	-	-	-	-	-	-	
Maturité		Bio	-	-	-	-	-	+	-	
		Conv	-	-	-	+	+	-	-	
Maturité Avancée		Bio	-	-	-	-	-	+	-	
		Conv	-	-	-	-	-	+	-	
Puisseguin		Début Véraison	Bio	-	+	+	+	+	-	-
			Conv	-	-	-	-	+	-	-
	Mi-véraison	Bio	-	-	-	-	-	-	-	
		Conv	-	-	-	-	+	-	-	
	Début de Maturité	Bio	-	-	-	-	-	-	-	
		Conv	-	+	-	-	-	-	-	
	Début de Maturité II	Bio	-	-	-	-	+	+	-	
		Conv	-	-	-	-	-	-	-	
	Maturité	Bio	-	-	-	-	+	+	-	
		Conv	-	-	-	-	-	-	-	
	Maturité Avancée	Bio	-	-	-	-	-	-	+	
		Conv	-	-	-	-	-	-	+	

**Tableau 17:** Détection d’espèces de levures d’intérêt œnologique par PCR en temps réel. Échantillons provenant des vignobles des Pomerol, Lussac et Puisseguin concernant la campagne de 2010, à différents stades phénologiques pour les parcelles en mode de conduite biologique (Bio) et Conventionnel (Conv).

Les résultats obtenus mettent en évidence que toutes les espèces ciblées, à l'exception de *Brettanomyces bruxellensis* et *Saccharomyces spp.*, sont détectées sur la baie de raisin. La distribution de ces espèces est aléatoire selon le stade phénologique et l'origine.

L'espèce la plus fréquente est *Candida zemplinina*, retrouvée pour 15 échantillons, suivie par *Torulaspora delbrueckii* et *Issatchenkia orientalis* détectées dans 8 échantillons (**Tableau 17**). Dans la parcelle expérimentale INRA – Grande Ferrade, toutes les espèces sont détectées, à l'exception de *Brettanomyces bruxellensis*.

Parcelle	Stades Phén.	<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>Hanseniaspora spp.</i>	<i>Metschikowia pulcherrima</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida zemplinina</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
INRA-Grand Ferrade	Fermeture de la grappe	+	-	-	-	+	-	-
	Début de véraison	+	-	+	-	+	-	-
	Mi-véraison	+	-	-	-	+	-	-
	Début de maturité	+	-	-	-	-	-	-
	Maturité	-	-	-	-	-	-	-
	Maturité I	+	+	-	+	-	+	-
	Maturité avancée II	+	-	-	-	-	+	-

**Tableau 18:** Détection d'espèces de levures d'intérêt œnologique par PCR en temps réel. Échantillons provenant de la parcelle expérimentale INRA–Grande Ferrade concernant la campagne de 2010, à différents stades phénologiques.

Comme dans les parcelles du Libournais, la distribution de ces espèces est aléatoire selon le stade phénologique. Au stade Maturité, aucune espèce n'a été détectée. Ce fait peut être lié à un phénomène de pluviosité, survenu quelques heures précédents le prélèvement, conduisant à un lessivage des micro-organismes de la pellicule de raisin. Le suivi de population cultivable a révélé une diminution des niveaux de population à ce même prélèvement.

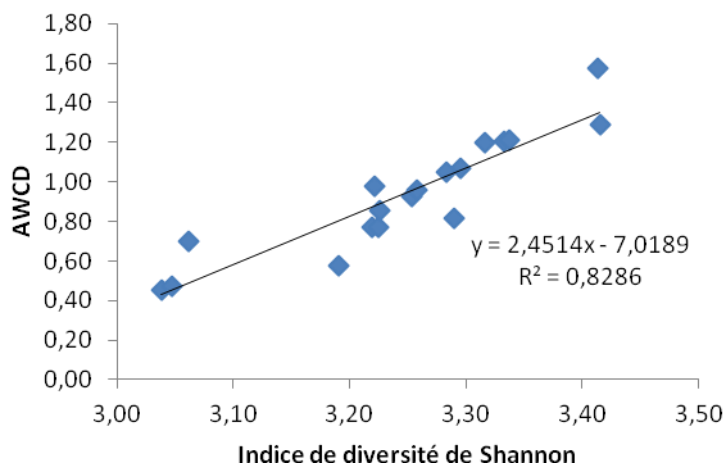
L'espèce la plus fréquemment détectée est *Saccharomyces spp.* qui est présente dans presque la totalité des prélèvements, suivi par l'espèce *Candida zemplinina* (**Tableau 18**).

Des études antérieures ont mis en évidence la présence sur la baie de raisin, de levures fermentaires, en particulier aux stades de maturité et de l'espèce d'altération *Brettanomyces* (Renouf 2006; Barata et al. 2012). Nos résultats concernant la campagne de 2008 vont dans le même sens. Néanmoins, en ce qui concerne les prélèvements du millésime 2010, les résultats ne sont pas concluants concernant l'influence du stade phénologique sur la présence des espèces d'intérêt œnologique.

#### 4. Analyse des profils métaboliques - Impact du stade phénologique

Les profils physiologiques des communautés microbiennes (*Community Level Physiological Profil- CLPP*) ont été déterminés en utilisant les microplaques Biolog® EcoPlate. L'indice de diversité de Shannon et les valeurs d'AWCD, qui représentent l'activité moyenne globale de la communauté microbienne, ont été calculés pour chaque échantillon. Cette étude a été réalisée lors de la campagne de 2010. Pour des raisons de logistique, nous n'avons pas pu analyser la totalité des parcelles. Nous avons donc choisi les parcelles de Puisseguin et Pomerol. Ce choix a été fait car ces deux terroirs présentent les différences climatiques les plus contrastées, permettant ainsi d'étudier l'impact du micro-climat sur les populations microbiennes (**Chapitre V**).

Nos résultats montrent que ces deux variables sont corrélées positivement pour la quasi totalité des prélèvements (**Figure 36**). Ainsi, il existe une corrélation entre l'activité moyenne globale de la communauté microbienne et l'indice de diversité.



**Figure 36:** Corrélation entre les AWCD et les Indices de diversité de Shannon, calculés à partir de substrats dégradés dans les Plaques Biolog® EcoPlate, pour les différents stades et pour parcelles étudiées. Le prélèvement de Puisseguin à maturité, considéré comme *outlier* (indice de Cook =0,11) n’est pas représenté.

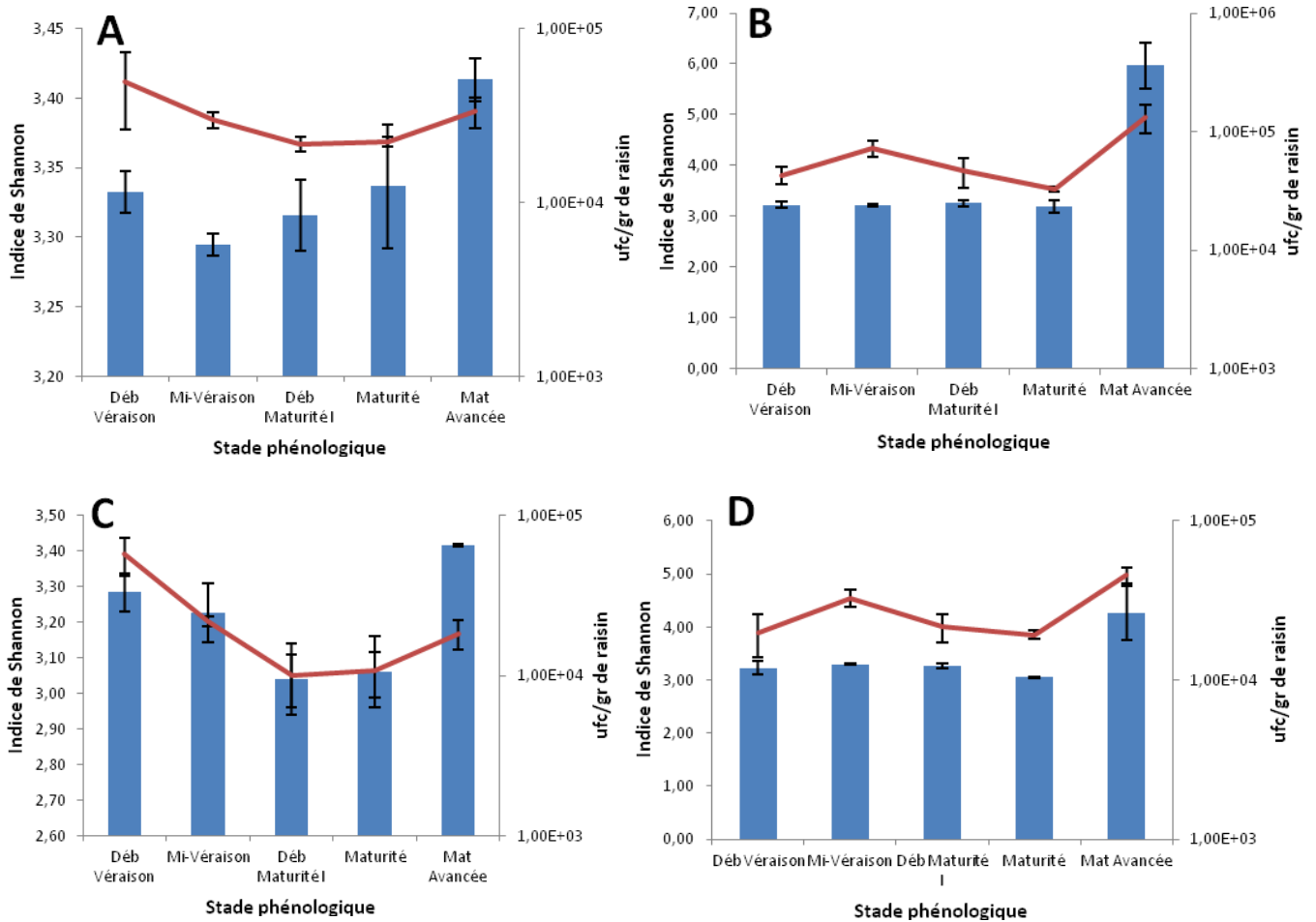
La valeur moyenne des indices de diversité et des valeurs d’AWCD issus des échantillons des parcelles de Pomerol et Puisseguin et des deux modes de conduite, obtenue pour chaque stade phénologique, est présentée dans le **Tableau 19**. Seuls les indices du stade maturité avancée sont significativement différents de ceux obtenus pour les autres stades phénologiques (ANOVA à un facteur «stade phénologique»,  $p < 0,05$ ).

Stade	Indice de Shannon		AWCD	
		Ecartype		Ecartype
(Déb Véraison)	3.27	0.10	1.00	0.25
(Mi - Véraison)	3.26	0.07	0.88	0.21
(Déb Maturité)	3.23	0.15	0.88	0.33
(Maturité)	3.18	0.17	0.74	0.38
(Mat Avancée)	4.12*	1.29	1.18*	0.45

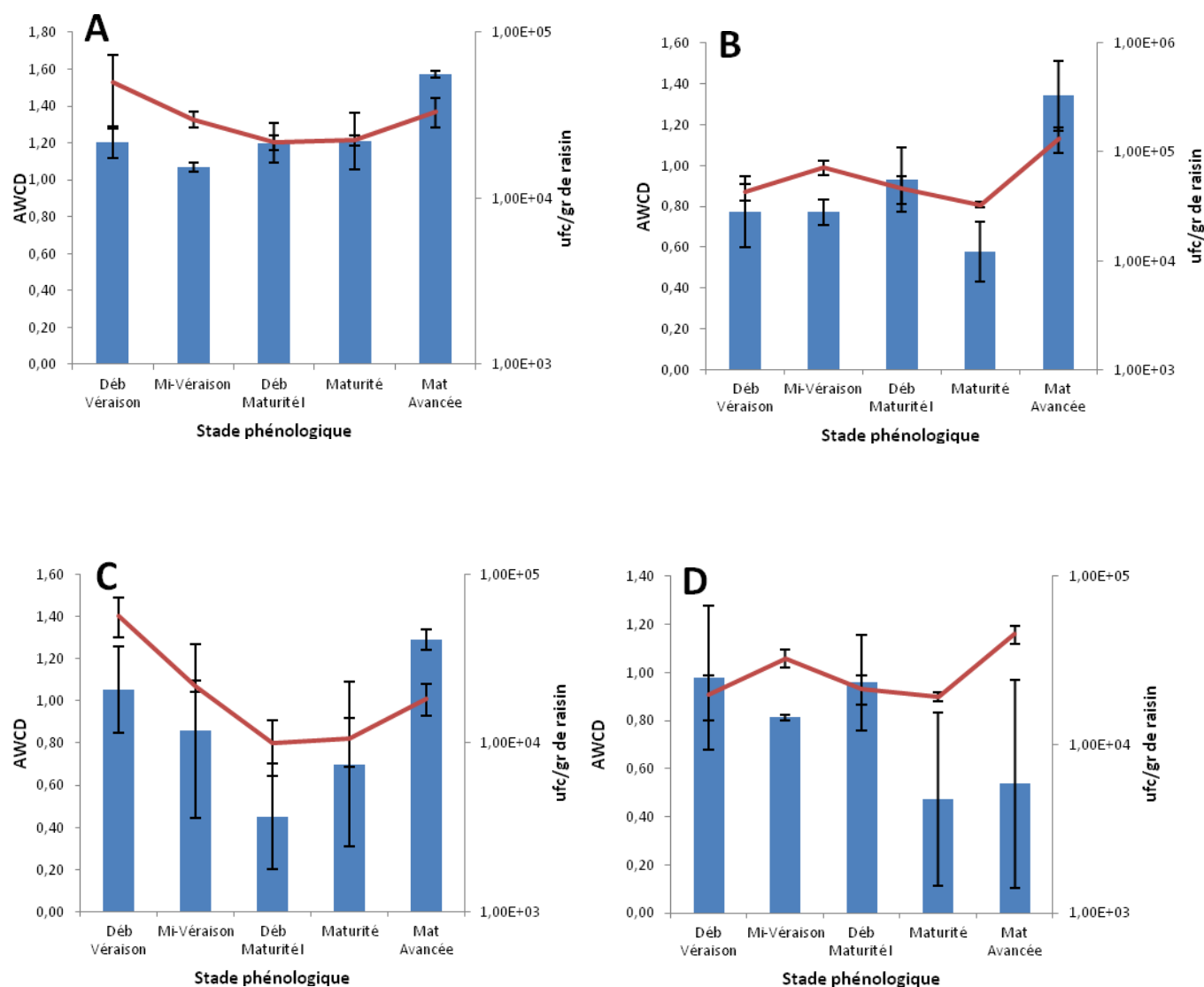
**Tableau 19:** Indice de diversité de Shannon et AWCD calculés à partir des substrats dégradés, Plaque Biolog® EcoPlate, pour les différents stades et les parcelles de Pomerol et Puisseguin en 2010. \* indique des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ANOVA un facteur « stade phénologique ». Les valeurs représentent la moyenne des triplicatas.

Afin d'analyser plus en détail les valeurs de ces indices selon le stade phénologique, nous les avons comparé avec la dynamique de la population cultivable sur milieu LB 1/10 tout au long de la maturation des baies. Des similitudes dans l'évolution de ces trois variables sont observées (**Figures 37 A à D, 38 A à D**).

Dans les parcelles de Pomerol, la baisse de population jusqu'au stade de début maturité et son augmentation aux stades ultérieurs, est corrélée, dans la majorité des prélèvements, avec les variations des indices de diversité et AWCD. Dans les parcelles de Puisseguin, la forte augmentation des indices de diversité et de l'AWCD du stade de maturité au stade de maturité avancée (cas de la parcelle en mode de conduite biologique) s'accompagne d'une augmentation des niveaux de populations cultivables.



**Figure 37:** Indice de diversité ■ et population cultivable sur milieu LB/10 — aux différents stades phénologiques. **A** : parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B** : parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C** : parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D** : parcelle de Puisseguin en mode de conventionnel. Les valeurs d'indice de diversité représentent la moyenne de triplicatas, les valeurs de population cultivable représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.



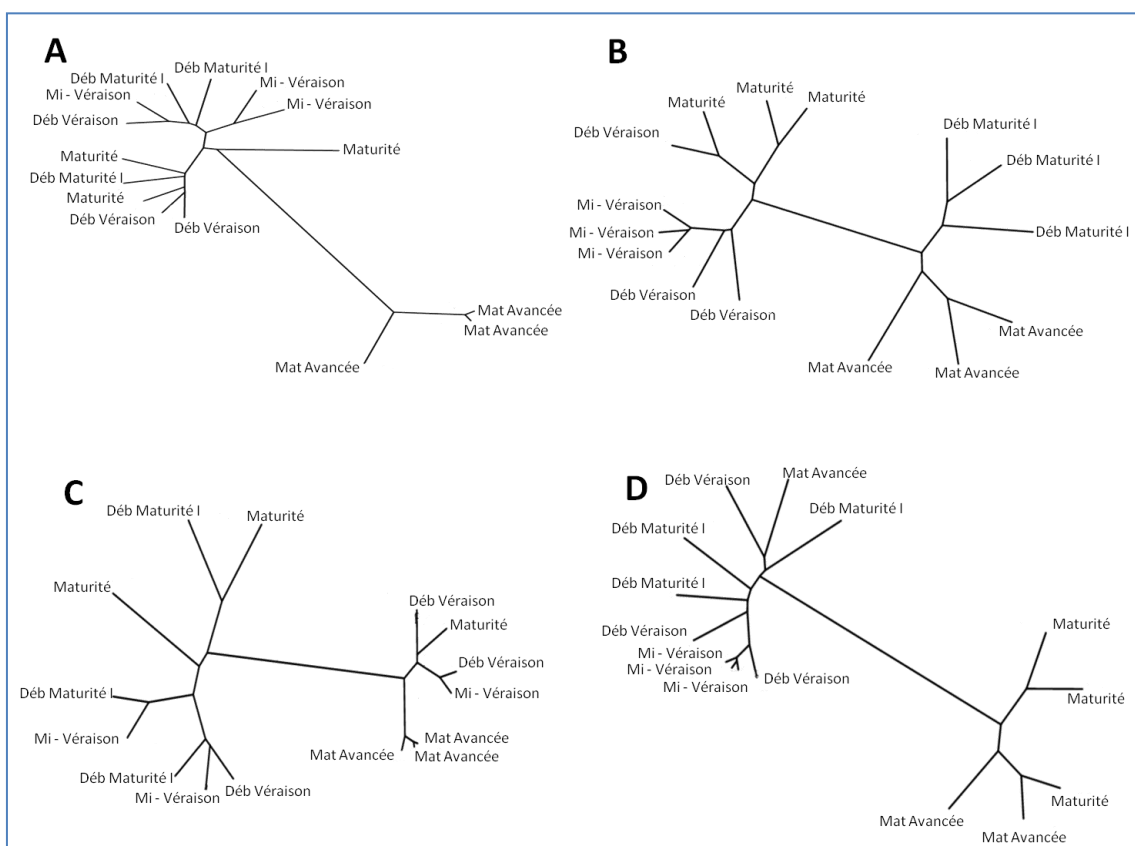
**Figure 38:** AWCD (barres bleues) et population cultivable sur milieu LB/10 (ligne rouge) aux différents stades phénologiques.

**A :** parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B :** parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C :** parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D :** parcelle de Puisseguin en mode de conduite conventionnel. Les valeurs d'AWCD représentent la moyenne de triplicatas, les valeurs de population cultivable représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.



La comparaison des profils métaboliques pour chaque parcelle dans un terroir et mode de conduite donnés, montre que le stade maturité avancée constitue un groupe séparé des autres stades phénologiques. Pour chaque dendrogramme, les profils métaboliques des échantillons au stade de maturité avancée se situent dans un clusters séparé (**Figure 39**).

Dans les deux parcelles de Puisseguin, le stade de mi-véraison est présent dans des branches distinctes (**Figure 39 B et D**).



**Figure 39:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques obtenus à partir des substrats dégradés dans les Plaques Biolog® EcoPlate. **A :** parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B :** parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C :** parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D :** parcelle de Puisseguin en mode de conventionnel.

Ces résultats montrent un effet du stade phénologique sur l'activité et la diversité métabolique des communautés bactériennes indépendamment du terroir étudié et du mode de conduite. Le stade de maturité avancée se distingue des autres stades en termes de diversité et d'activité métabolique. La relation entre les indices de Shannon, l'AWCD et la population cultivable sur milieu LB 1/10 suggère que l'activité, la diversité métabolique et le niveau de population sont positivement corrélés.

## **5. Effet du stade phénologique sur la structure des communautés microbiennes**

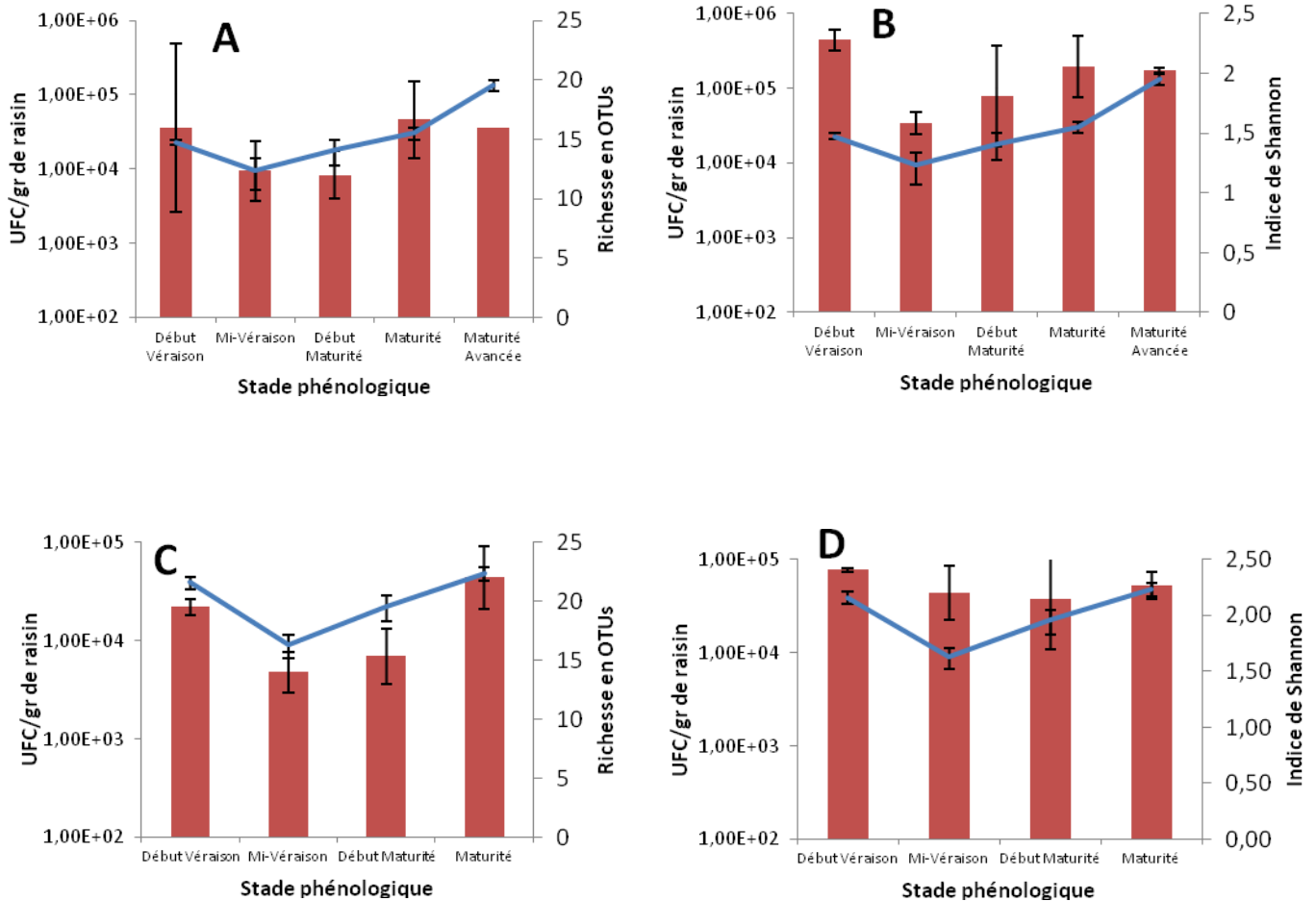
### **5.1 Analyse des populations bactériennes par T-RFLP**

L'analyse par T-RFLP a été réalisée sur l'ADN directement extrait de la solution de lavage des baies, uniquement sur les parcelles de Lussac (mode biologique et mode conventionnel) en 2009 et sur les parcelles des trois terroirs Lussac, Puisseguin et Pomerol (mode biologique et mode conventionnel) en 2010. Si il a été possible d'analyser les triplicatas en 2009, les faibles quantités d'ADN restant à l'issue de l'analyse par PCR en temps réel nous ont contraint à rassembler les triplicatas en un seul échantillon en 2010.

Concernant la campagne de 2009, la richesse en OTUs et l'indice de diversité de Shannon ont été déterminés à partir des profils obtenus en triplicata issus des échantillons de la parcelle de Lussac. L'indice de Shannon a été calculé en considérant le nombre d'OTUs et l'abondance relative de chacun en termes de hauteurs des pics de fluorescence (Kuehe et al. 2005). L'évolution des valeurs de ces indices a été suivie selon les stades de maturation.

La comparaison de la population cultivable sur milieu LB 1/10, de la richesse en OTUs et de l'indice de diversité montre des similitudes dans l'évolution de ces trois variables tout au long des stades phénologiques (**Figure 40 A, B, C et D**). La baisse de population LB 1/10 au stade de mi-véraison et son augmentation aux stades ultérieurs, sont corrélées aux variations des indices de diversité et la richesse en OTUs. Comme pour l'activité

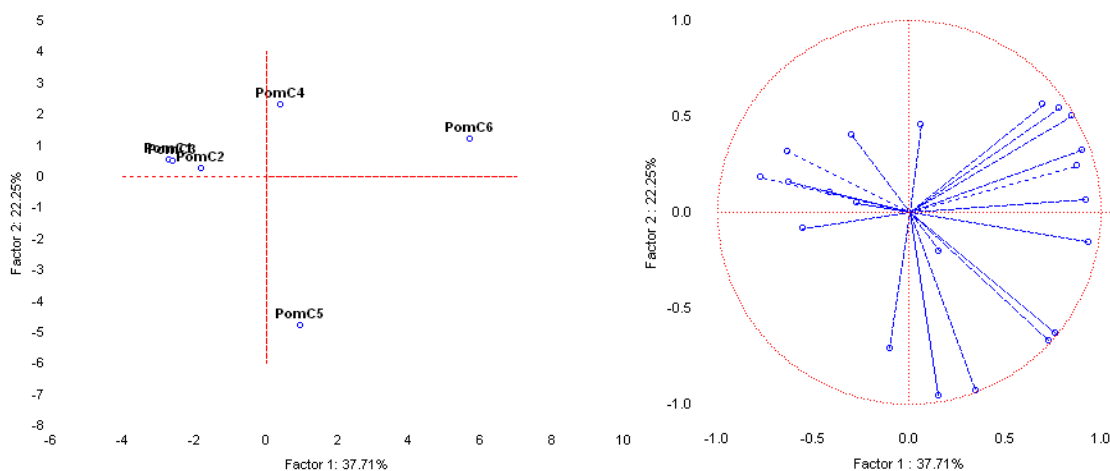
métabolique, cette observation suggère qu'il existe une relation entre la richesse en OTUs, la diversité au sein de la population et le niveau de population cultivable LB 1/10.



**Figure 40:** A : Richesse un OTU's ■ et populations cultivable sur milieu LB 1/10 ■, concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite biologique aux différents stades phénologiques; B : Indice de Shannon ■ et populations cultivable sur milieu LB 1/10 ■, concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite biologique aux différents stades phénologiques, C : Richesse un OTU's ■ et populations cultivable sur milieu LB 1/10 ■, concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite conventionnel aux différents stades phénologiques D : Indice de Shannon ■ et populations cultivables sur milieu LB 1/10 ■, concernant la parcelle de Lussac en mode de conduite Conventionnel aux différents stades phénologiques. Les valeurs de richesse en OTUs et de l'indice de diversité représentent la moyenne de triplicatas, les valeurs de population cultivable représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

En ce qui concerne la campagne de 2010, les parcelles correspondant aux différents terroirs ont été étudiées. La comparaison des profils est réalisée pour chaque parcelle pour un même terroir et mode de conduite. Pour la parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique, les profils issus des échantillons prélevés aux stades plus précoces de début (1) et mi-véraison (2) sont groupés sur la même branche. Pour la parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, les profils des échantillons prélevés aux stades plus tardifs de maturité et maturité avancée sont positionnés sur la même branche. Dans les autres parcelles, nous n'avons pas constaté de similitude de profils entre les stades les plus proches. Cependant, les échantillons du stade de maturité avancée présentent des profils distincts des autres stades (Annexe 1: Figure III).

L'analyse en composantes principales des profils T-RFLP de chaque parcelle montre que, dans la plupart de cas, les échantillons prélevés aux stades de maturité ou maturité avancée sont corrélés avec les axes où le plus grand nombre de variables sont projetées. Un exemple d'analyse est montré pour la parcelle de Pomerol en mode conventionnel **Figure 41**. Nous pouvons observer que les échantillons à maturité (PomC5) et à maturité avancée (PomC6) sont corrélés avec la majorité des variables (partie droite du premier composant principal).



**Figure 41:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Echantillons provenant des parcelles de Pomerol en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2010.

## **5.2 Analyse des populations fongique par CE-SSCP 2010**

L'analyse de la structure des populations fongiques par PCR-CE-SSCP repose également sur l'ADN directement extrait des solutions de lavage des baies. En 2009, l'analyse CE-SSCP n'a pas pu être mise en œuvre sur les échantillons faute de pouvoir disposer de quantité d'ADN suffisante pour l'analyse.

Les résultats présentés ci-dessous sont issus des prélèvements réalisés en 2010.

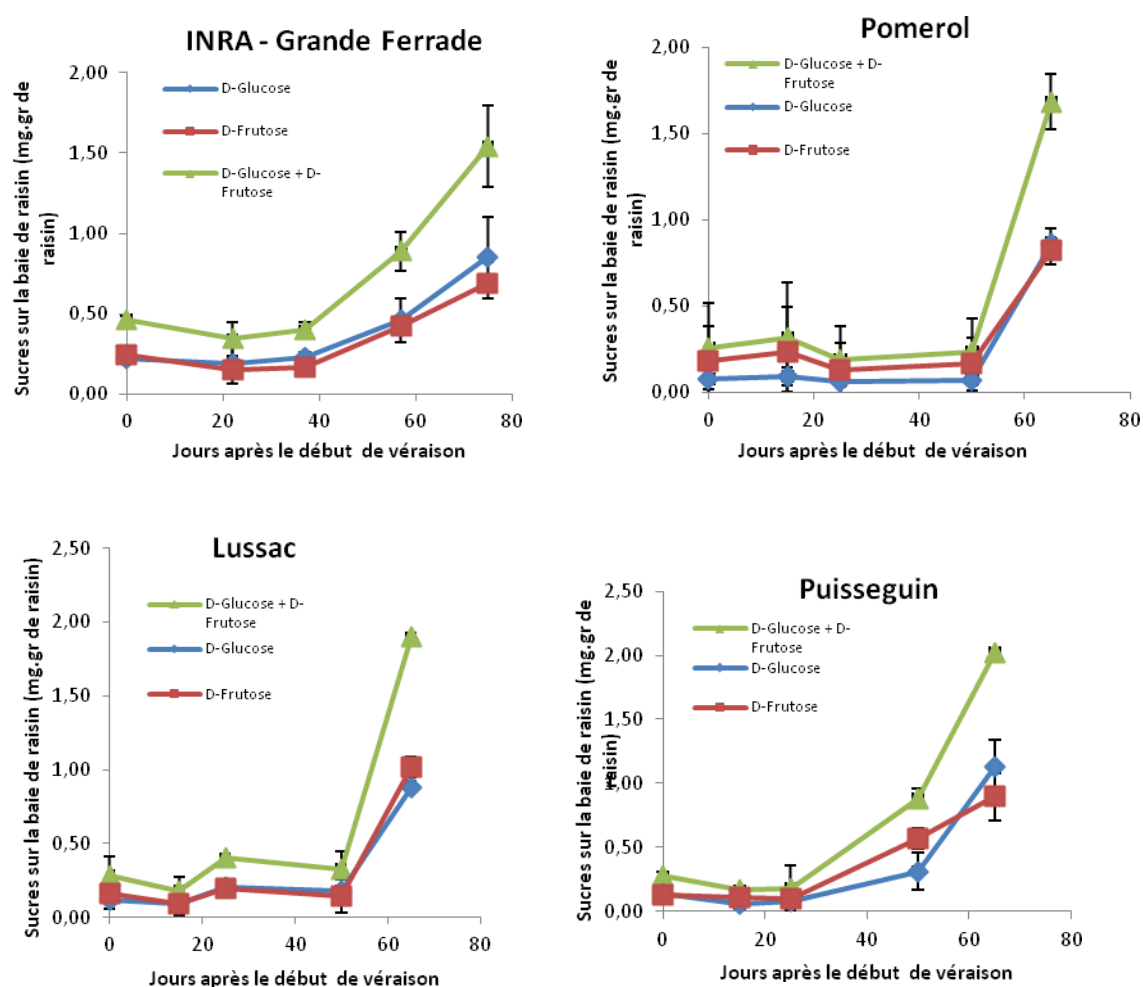
L'analyse par classification hiérarchique ascendante montre que les profils CE-SSCP pour les stades plus précoces (1 à 4) issus des échantillons des parcelles de Pomerol et de Lussac en mode de conduite biologique (Figures A et C, Annexe I, Figure IV) sont clairement séparés de ceux des stades les plus tardifs (5 et 6). Pour la parcelle de Lussac en mode de conduite conventionnel, l'analyse ne montre pas une similitude de profils entre les stades les plus proches. En revanche, pour les deux parcelles de Puisseguin, le classement des profils paraît principalement conditionné par l'effet stade, les dendrogrammes obtenus montrent deux branches qui séparent les stades les plus avancés de ceux les plus précoces.

Les indices de diversité de Shannon ont été calculés à partir des profils CE-SSCP. Les résultats obtenus montrent, pour les parcelles de Pomerol et Lussac en mode de conduite biologique, une augmentation de l'indice tout au long des stades phénologiques (Annexe 1: Figure V A et B). Pour les autres parcelles, les valeurs obtenues sont variables selon les différents stades, sans pouvoir mettre en évidence de tendance d'évolution au cours de la maturation de la baie.

## **6. Détermination de la teneur en sucres des exsudats de la baie de raisin**

Au cours du développement de la baie de raisin, de nombreux solutés tels que les sucres, vont s'accumuler dans la baie. Parmi les différentes substances sur le raisin formées par

exsudation pelliculaire, les sucres dont la glucose et fructose ont été reconnus comme particulièrement important pour le développement microbien (Donèche, 1986; Padgett et Morisson, 1990). Ainsi, nous avons déterminé les quantités de D- glucose et de D-fructose au niveau des exsudats de la baie de raisin. Les dosages ont été réalisés aux différents stades pendant la campagne de 2009. Les résultats montrent une augmentation importante des teneurs de ces deux sucres à partir du début de maturité (parcelles INRA et Puisseguin) et à partir de la maturité (parcelles de Pomerol et Lussac), atteignant logiquement les valeurs les plus élevées au stade de maturité avancée dans toutes les parcelles (**Figure 42**).



**Figure 42:** Evolution de la concentration en D-Glucose et D-Fructose dans les exsudats de la baie de raisin aux différents stades phénologiques pour les trois terroirs en 2009.

Les valeurs minimales de D-Glucose + D-Fructose, correspondant à des concentrations inférieures à 0,30 mg/gr de raisin, ont été enregistrées aux stades de début et mi-véraison. Au stade de maturité avancée, la concentration en sucres atteint des valeurs comprises entre 1,5 et 2,0 mg/gr de raisin.

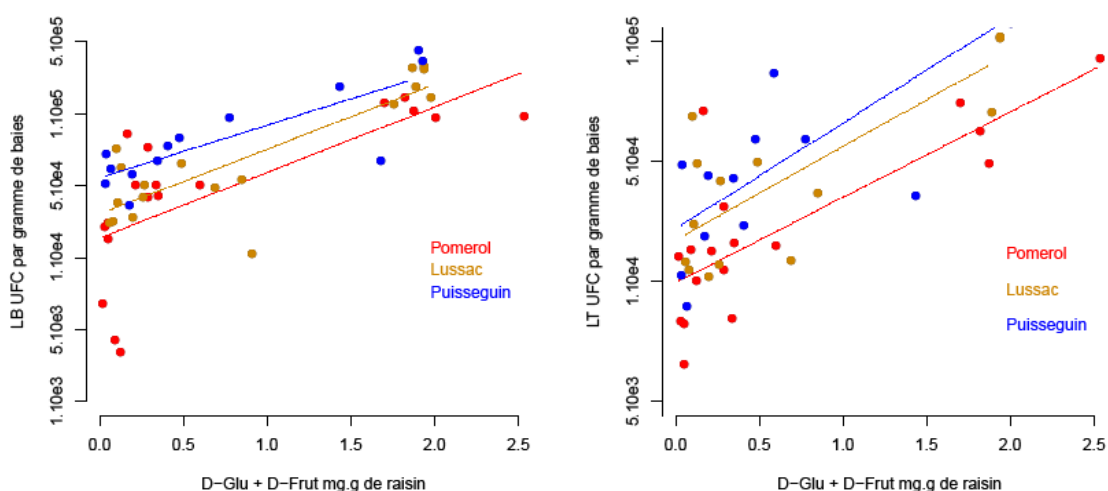
La concentration en sucres dans les exsudats des baies de raisin issues des parcelles en mode de conduite biologique et conventionnel est très similaire dans la majorité des prélèvements, à l'exception de Pomerol, où dans les stades les plus précoces, des quantités supérieures sont détectées dans les exsudats des baies de raisin issues de la parcelle en mode de conduite biologique.

Les sucres étant des substrats importants pour le développement microbien, les concentrations en D-Glucose et D-Fructose des différents prélèvements ont été comparées aux niveaux de populations cultivable sur milieu LT et LB 1/10. L'analyse porte sur les trois derniers prélèvements réalisés pour les terroirs du libournais, puisque c'est à ces stades que des différences significatives des teneurs en sucre des exsudats ont été enregistrées.

Les résultats obtenus montrent une corrélation positive significative (test de Spearman ;  $\rho$  compris entre 0,54 et 0,86 : **Tableau 20 B**) entre population cultivée LT et LB 1/10 et les concentrations en sucre pour toutes les parcelles étudiées, indépendamment du mode de conduite ou du terroir viticole, l'effet sucre expliquant 63,4% et 64,6 % de la variance observées (**Tableau 20 A**) (**Figure 43**). L'augmentation des teneurs en sucres des exsudats de la baie de raisin permet d'expliquer pour partie, les niveaux plus élevés de populations, en particulier au stade de maturité avancée.

<b>A</b> % somme des écarts	LT (UFC)	LB 1/10 (UFC)	<b>B</b> r (coefficient corrélation Spearman)	LT (UFC)	LB 1/10 (UFC)
effet sucre	63,37***	64,59***	<b>Pomerol</b>	0,72***	0,80***
effet terroir	7,33**	5,22*	<b>Lussac</b>	0,66**	0,54*
interaction sucre terroir	8,35***	5,88**	<b>Puisseguin</b>	0,82***	0,86***
<b>Residuelle</b>	20,95	24,31			

**Tableau 20: A** - Somme des écarts carrés obtenus à partir de l'analyse de variance à deux facteurs : Sucres et Terroir. **B** - coefficient de corrélation de Spearman entre les sucres (D-Glucose et D-Fructose) et les niveaux de population cultivable sur milieu LT et LB 1/10. Niveau de significativité : \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,005$ ) \*\*\* ( $p < 0,0001$ ).



**Figure 43:** Corrélation entre les teneurs en sucres des exsudats de la baie de raisin (D-Glucose + D-Fructose) et les niveaux de population cultivable sur milieu LT à droite et sur milieu LB 1/10 à gauche, pour les trois derniers stades, terroir du Libournais, année 2009.

## 7. Discussion

L'analyse quantitative des populations fongiques et bactériennes basée sur des méthodes cultures dépendantes, réalisée sur deux années consécutives, montre une dynamique de ces populations tout au long des stades phénologiques, de la véraison au stade maturité avancée. Une augmentation progressive des niveaux de population est observée à partir des stades de début véraison et début de maturité. Les populations levures et bactéries se situent à des niveaux équivalents, compris entre  $10^4$  UFC/gramme de raisin aux stades véraison, et  $10^6$  UFC/gramme de raisin au stade maturité et maturité avancée. Ainsi, il semble qu'il existe un équilibre entre ces deux populations au niveau du biofilm présent à la surface de la baie de raisin. Dans nos conditions expérimentales, la présence de bactéries lactiques et acétiques n'est mise en évidence que pour les stades de maturité et maturité avancée.

Afin de préciser la nature des genres/espèces présents sur la baie de raisin, nous avons identifié puis mis en collection des isolats. Cette approche pour décrire la diversité de cette



communauté microbienne présente des limites ; le nombre d'isolats étudiés reste faible et nous avons travaillé sur la population cultivable. Néanmoins, nous avons comme objectifs de pouvoir mettre en collection des individus issus de cette communauté microbienne. Par ailleurs, notre approche est originale dans le sens où nous avons travaillé sur les microorganismes présent à la surface de la baie alors que des travaux antérieurs rapportent l'étude de la microflore issue de baies broyées. Dans un travail précédent, Renouf et al. (2007), utilisant l'analyse DGGE sur ADN extrait des eaux de lavage de baies, avait identifié 52 séquences de levures et 40 séquences bactériennes.

Dans ce travail, l'identification des espèces bactériennes cultivées sur milieu LB1/10 en 2009 montre la présence de 44 espèces appartenant à 21 genres. Parmi eux, les genres *Pseudomonas* et *Micrococcus* sont les plus représentés. Nous avons observé que la fréquence d'apparition de *Pseudomonas sp.* est significativement supérieure pour les deux premiers stades de maturation par rapport aux stades de maturité ; la situation inverse est

observée pour *Micrococcus sp.*, qui est majoritaire aux derniers stades de maturation. Les espèces Gram-négatives décroissent au fur et à mesure de l'avancée de la maturation au profit des bactéries Gram-positives, celles-ci étant par la suite majoritaire dans le moût de raisin, puis lors de la transformation en vin. Des travaux similaires menés sur nectarines (Janisiewicz et al. 2010) rapportent également que la proportion de *Pseudomonas spp.* décline lors de la maturation du fruit. Cette espèce, capable de produire des exopolysaccharides, joue probablement un rôle important dans l'installation du biofilm, en favorisant la colonisation de la surface du fruit par d'autres microorganismes (Renouf et al. 2005; Whipps et al. 2008). Le genre *Micrococcus sp* a été précédemment identifié dans des tissus de plantes issus de mode de traitement conventionnel (Grube et al. 2011). *Enterobacter sp.* est présente dans la rhizosphère de la plante (Pawlicki-Jullian et al., 2010) et a été décrite durant la fermentation malolactique de vins vinifiés dans différentes caves en Espagne (Ruiz et al. 2010). Les espèces minoritaires identifiées dans ce travail ont

également été décrites dans différents travaux concernant l'étude de la communauté microbienne de la baie de raisin ou du moût (Sudden et al. 2003; Bae et al. 2006; Verginer et al. 2010; Nisiotou et al. 2011).

Les espèces bactériennes identifiées à la surface de la baie de raisin sont présentes dans d'autres compartiments de la plante, notamment la rhizosphère ou l'endosphère (Compant et al., 2005, 2010). De nombreux travaux rapportent, pour *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Pantoea spp*, leur action bénéfique vis à vis de la plante et leur capacité potentielle à inhiber le développement de *Bortytis cinerea* en particulier par des phénomènes de potentialisation et d'éllicitation.

Dans cette étude, nous avons isolé au cours des trois campagnes de prélèvement, de 2009 à 2011, environ 150 isolats à partir du milieu BA et 122 isolats sur milieu BL. Pour compléter notre travail, Il serait pertinent de pouvoir identifier ces isolats par amplification et séquençage de l'ADNr 16s.

En ce qui concerne la population isolée sur milieu LT, les résultats des identifications montrent une diversité beaucoup plus faible par rapport à celle mise en évidence pour les bactéries cultivées sur milieux LB1/10. Parmi les huit genres identifiés, les espèces appartenant au genre *Aureobasidium* sont les plus abondantes et leur présence est vérifiée pour tous les stades de prélèvements. En particulier, l'espèce *Aureobasidium pullulans* est rapportée comme étant un agent potentiel de biocontrôle vis à vis du développement de pathogènes de la vigne et d'*Aspergillus*, avec pour conséquence, par exemple, une diminution de la production d'ochratoxine A au niveau des baies de raisin (De Felice et al. 2008). Il est possible que la colonisation majoritaire du milieu d'isolement LT par *Aureobasidium* limite la croissance d'autres espèces de levures, expliquant ainsi la faible diversité observée dans nos conditions d'analyses, en particulier par rapport aux résultats antérieurs (Renouf et al. 2007).

Nos travaux confirment que les levures fermentaires sont été très peu représentées à la surface de la baie de raisin (Mortimer et al, 1999). Les résultats de la PCR en temps réel montrent que la distribution de ces espèces est variable et aléatoire selon le stade phénologique, avec néanmoins la présence de certaines espèces dès le stade début de

véraison en accord avec les travaux de Renouf et al. (2005). Seuls les prélèvements issus de la parcelle INRA témoignent de la présence de *Saccharomyces* aux stades précoces de la maturité des baies. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'environnement urbain de cette parcelle de vigne, à proximité de parcelles présentant au sol des fruits en décomposition, source potentielle d'inoculum pour les baies de raisin.

L'étude de l'activité métabolique des communautés microbiennes à l'aide des plaques Biolog® nous a permis de déterminer l'indice de diversité (indice de Shannon) et l'activité moyenne globale (AWCD) de chaque prélèvement. De façon générale, les valeurs d'indices de Shannon et d'AWCD sont significativement plus élevées au stade maturité avancée. Nous avons aussi constaté que les indices de Shannon, l'AWCD et la population cultivable sur milieu LB1/10 évoluent dans le même sens. Pour les stades où les niveaux de population sont plus élevés, la diversité et l'activité métabolique sont également plus importantes. La comparaison des profils métaboliques par CAH met en évidence que le stade maturité avancée constitue un groupe séparé des autres stades phénologiques. Dans certaines parcelles, les stades de mi-véraison début maturité apparaissent également dans des branches distinctes.

L'étude de l'effet du stade phénologique sur la structure des populations a été réalisée en analysant les profils CE-SSCP obtenus pour la communauté fongique et les profils T-RFLP pour la communauté bactérienne.

L'analyse de la structure de la population fongique montre des profils très similaires entre stades phénologiques proches. En ce qui concerne la communauté bactérienne, nous avons constaté que la dynamique de la population cultivable sur milieu LB1/10 tout au long des stades phénologique évolue dans le même sens que les variations des indices de diversité et la richesse en OTUs. En comparant les différents profils, nous avons constaté que ceux obtenus à partir des échantillons prélevés au stade de maturité avancée sont, dans la plupart des cas, très différents de ceux obtenus pour les autres stades. Cette observation est cohérente avec la diversité métabolique ; la communauté bactérienne au stade maturité avancée est significativement différente du point de vue du niveau de sa population, de sa structure et sa diversité métabolique. La détection des populations bactériennes dites

« œnologiques », bactéries lactiques et acétiques, uniquement lors des stades maturité et maturité avancée, peut expliquer en partie cette différenciation.

Ainsi, l'augmentation des populations microbiennes cultivables au cours de la maturation des baies semble liée à l'enrichissement de la communauté par de nouvelles espèces, probablement via le vent, les insectes, des « splash » de pluie, la poussière de sol (Behar et al. 2008; Whipps et al. 2008).

Des études antérieures ont montré une évolution de la population bactérienne et fongique tout au long des stades phénologiques (Renouf et al. 2005; Barata et al 2012). Cependant, les facteurs expliquant ces changements ont été évoqués mais peu étudiés. L'hypothèse de l'incidence de la composition chimique des exsudats, notamment les sucres, sur le développement de la communauté microbienne nous a conduit à déterminer les quantités de D- glucose et D-fructose dans les exsudats de la pellicule des baies de raisin. Comme attendu, nos résultats montrent une augmentation importante des teneurs de ces deux sucres à partir du début de maturité. Les teneurs en sucres sont corrélées positivement avec les niveaux de population cultivée LT et LB 1/10 dans toutes les parcelles. Ainsi, l'évolution de la concentration en sucres dans les exsudats de la baie de raisin constitue une des raisons expliquant la dynamique des populations microbiennes observées, en terme de niveau, de diversité et de structure, tout au long des différents stades et en particulier, les niveaux élevés de populations trouvées au stade de maturité avancée. D'autres paramètres que la composition des exsudats non étudiés ici, tel que l'acidité et le pH, qui évoluent lors de la maturation des baies de raisin dans le sens d'une diminution, pourraient également avoir un impact sur les niveaux de population et l'évolution de la structure de la communauté microbienne.

De nombreux facteurs peuvent influencer la communauté microbienne de la baie de raisin (Pretorius et al. 1999; Barata et al 2012). Les facteurs abiotiques comme le climat et le mode conduite ont été étudiés dans des travaux antérieurs (Rementeria et al. 2003; Comitini et Cianii, 2006; Cadez et al. 2010; Cordero Bueso et al. 2011). Cependant, ces études basées sur l'analyse des populations cultivables, concernent un groupe restreint de la communauté microbienne en particulier les levures de type fermentaire. L'impact de ces facteurs sur les

populations bactériennes et fongiques en terme de structure globale est toujours inconnu. Dans les chapitres suivants, nous présentons les résultats de nos travaux, en utilisant les mêmes approches décrites dans ce chapitre, concernant l'impact de ces facteurs sur la communauté microbienne de la baie de raisin.

## **CHAPITRE V – Impact de facteurs abiotiques sur les communautés microbiennes**

## 1. Les conditions climatologiques et l'effet terroir

Différentes études rapportent que les conditions climatologiques constituent un élément important pouvant influencer les populations microbiennes. Les facteurs tels que l'humidité et la température sont reconnus parmi les plus importants pour le développement des microorganismes. Ainsi, l'analyse de nos données sous l'angle des facteurs climatologiques est essentielle pour comprendre l'influence des conditions environnementales sur les communautés microbiennes. Nous avons étudié trois terroirs représentatifs de microclimats différents : Pomerol, Lussac et Puisseguin.

### 1.1 Suivi des températures et de la pluviométrie pour les 3 zones (2009 – 2010)

Des données climatiques, provenant des stations météorologiques les plus proches des parcelles étudiées, ont été collectées. La température, l'humidité et la pluviométrie de ces trois zones (Pomerol, Lussac, Puisseguin) ont été enregistrées et les valeurs correspondant aux périodes de prélèvements de la campagne de 2009 et 2010 ont été comparées.

Les données obtenues montrent des températures moyennes supérieures à Pomerol, suivi de Lussac et Puisseguin. En ce qui concerne l'humidité relative, Lussac et Puisseguin s'avèrent être des zones plus humides que Pomerol (**Tableaux 21**).

A - Campagne de 2009				B - Campagne de 2010			
	TM	UM	RR		TM	UM	RR
Pomerol	20.06	69.48	80.00	Pomerol	19.36	69.55	74.50
Lussac	18.83	71.72	96.00	Lussac	18.68	74.42	65.50
Puisseguin	18.22	72.37	87.50	Puisseguin	18.03	74.47	76.00

**Tableau 21:** Données climatiques concernant la campagne de 2009 (A) et 2010 (B). TM : température moyenne de l'air sous abri (°C); UM : humidité relative moyenne (%); RR : cumul des précipitations en mm.

Parmi les différents paramètres qui influencent la précocité d'un terroir viticole, le climat et en particulier la température et la pluviométrie jouent un rôle essentiel. Les observations

concernant le cycle de la vigne dans les différentes parcelles montrent que Pomerol constitue le terroir le plus précoce. Les parcelles de Lussac et Puisseguin sont plus tardives, avec un comportement similaire, en ce qui concerne l'avancée des stades phénologiques (Figure 44).

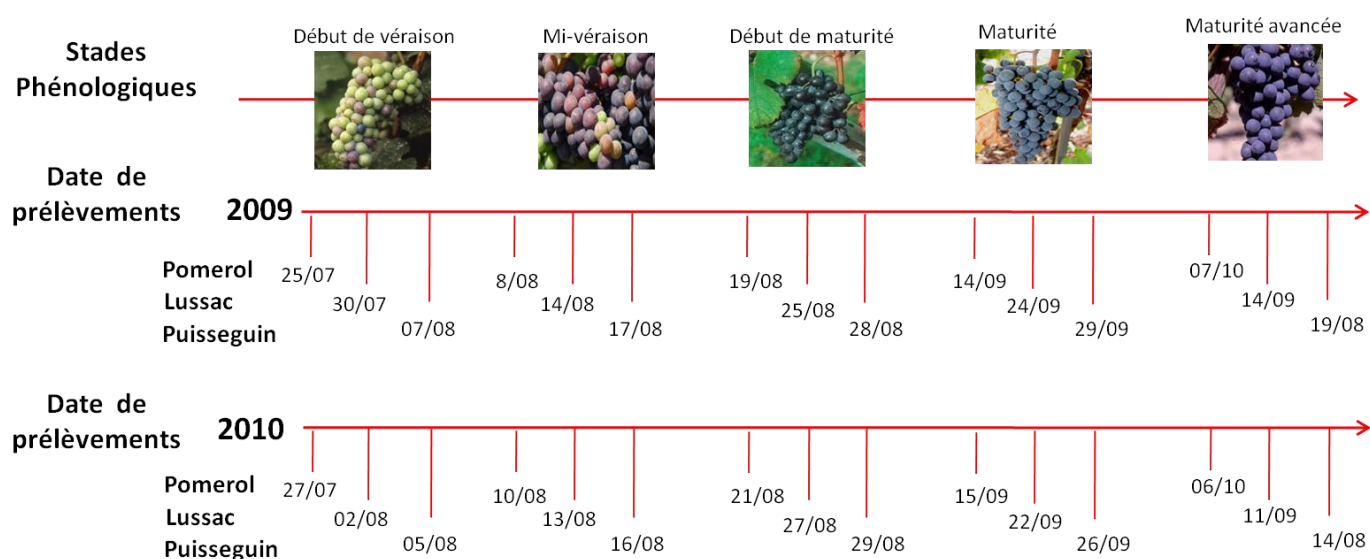


Figure 44: Stades phénologiques et date de prélèvements dans les différents terroirs. Campagne de 2009 et 2010.

## 1.2 Mesure de l'activité de l'eau ( $A_w$ )

L'effet de l'humidité d'un milieu donné, mais surtout la disponibilité de cette eau (activité de l'eau ou  $A_w$ ) constitue un paramètre essentiel pour le développement des micro-organismes. Afin de caractériser finement ce paramètre à l'échelle de la baie, nous avons mesuré l'activité d'eau sur la pellicule des baies de raisin issues des parcelles de Pomerol et Puisseguin au cours de la maturation en 2010. Les valeurs obtenues sont relativement élevées et se situent entre 0,902 et 0,946. Utilisant la même méthodologie, Deytieux-Belleau et al. (2009) rapportent que l' $A_w$  de la baie de raisin diminue au cours de la maturation de la baie, de 0,94 au stade fermeture des grappes à 0,89 à maturité, avec des valeurs faibles de 0,90 à véraison. Des différences significatives entre les parcelles de Pomerol et Puisseguin



aux stades de maturité et maturité avancée sont mises en évidence (**Tableau 22**). On remarque que, pour les parcelles de Pomerol, l'Aw tend à diminuer au cours de la maturation contrairement à Puisseguin, où les valeurs les plus élevées sont mesurées aux stades de maturité et maturité avancée.

Stade	Mode de conduite biologique				Mode de conduite conventionnel			
	Pomerol		Puisseguin		Pomerol		Puisseguin	
	Moyenne (n=3)	Ecartype	Moyenne (n=3)	Ecartype	Moyenne (n=3)	Ecartype	Moyenne (n=3)	Ecartype
<b>Déb Véraison</b>	0,918	0,010	0,902	0,010	0,9125	0,0041	0,912	0,00
<b>Mi-Véraison</b>	0,918	0,003	0,907	0,007	0,9097	0,0068	0,914	0,01
<b>Déb Maturité I</b>	0,911	0,015	0,917	0,002	0,9097	0,0068	0,908	0,01
<b>Maturité</b>	0,912	0,002	0,943 <sup>*</sup>	0,002	0,9061	0,0024	0,946 <sup>*</sup>	0,01
<b>Mat Avancée</b>	0,910	0,004	0,935 <sup>*</sup>	0,008	0,9066	0,0030	0,941 <sup>*</sup>	0,01

**Tableau 22:** Activité de l'eau (Aw) mesurée sur la pellicule des raisins aux différents stades phénologiques pour les parcelles en mode de conduite biologique et en mode de conduite conventionnel de Pomerol et de Puisseguin en 2010. \* indique des différences significatives (ANOVA un facteur « terroir »  $p < 0,05$ ).

### 1.3 Suivi des populations cultivables pendant la campagne de 2009 -2010 pour les trois terroirs

Nous avons analysé les populations cultivables présentes sur la baie de raisin aux différents stades, en comparant pour le même mode de conduite, le niveau des populations dans les trois terroirs.

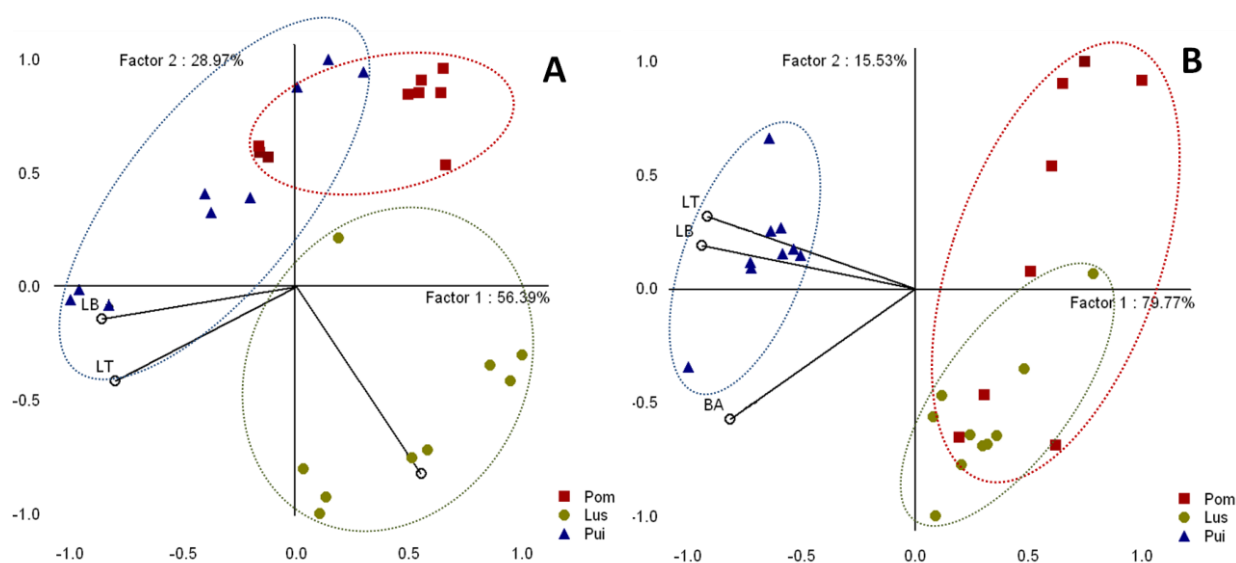
Les résultats de dénombrements sur les différents milieux de culture montrent, dans la majorité des prélèvements, des différences significatives des niveaux de populations microbiennes, selon le terroir d'origine (Annexe 2, tableaux I à IV, analyse de variance, un facteur « terroir »).

Les **Figures 45 à 48** montrent l'analyse en composantes principales des échantillons en prenant comme variables la population cultivable sur les milieux LT, LB 1/10 et BA (Figures

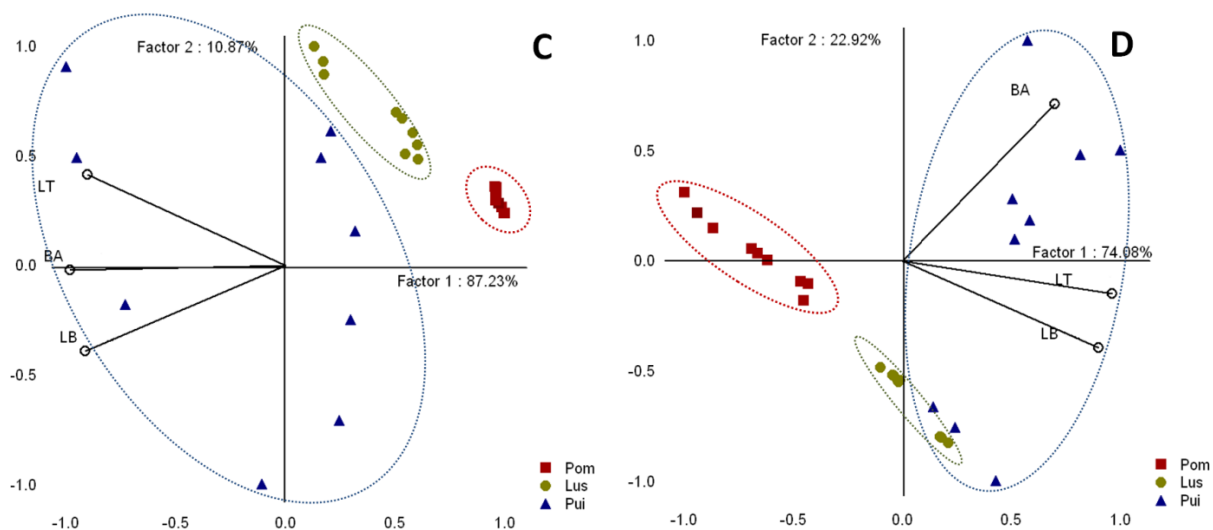
45 et 46, échantillons 2009 ; figure 47 et 48, échantillons 2010). Seuls les stades de maturité et maturité avancée ont été pris en compte dans cette analyse, nos conditions expérimentales nous permettant le dénombrement des bactéries acétiques qu'à ces derniers stades.

La **Figure 45 A**, concernant les parcelles en mode de conduite biologique au stade de maturité, montre que les échantillons provenant de Puisseguin sont les mieux corrélés avec les variables LT et LB1/10. Au stade maturité avancée nous confirmons cette même corrélation mais cette fois ci avec les trois variables (**Figure 45 B**).

En mode de conduite conventionnel, nos résultats sont similaires à ceux obtenus en mode biologique. Les échantillons provenant de Puisseguin sont mieux corrélés avec les variables étudiées. Nous observons également que ces échantillons présentent une dispersion dans le plan plus importante que ceux de Lussac et Pomerol. Il est possible d'observer un regroupement des échantillons selon le terroir (**Figures 46 A et B**).



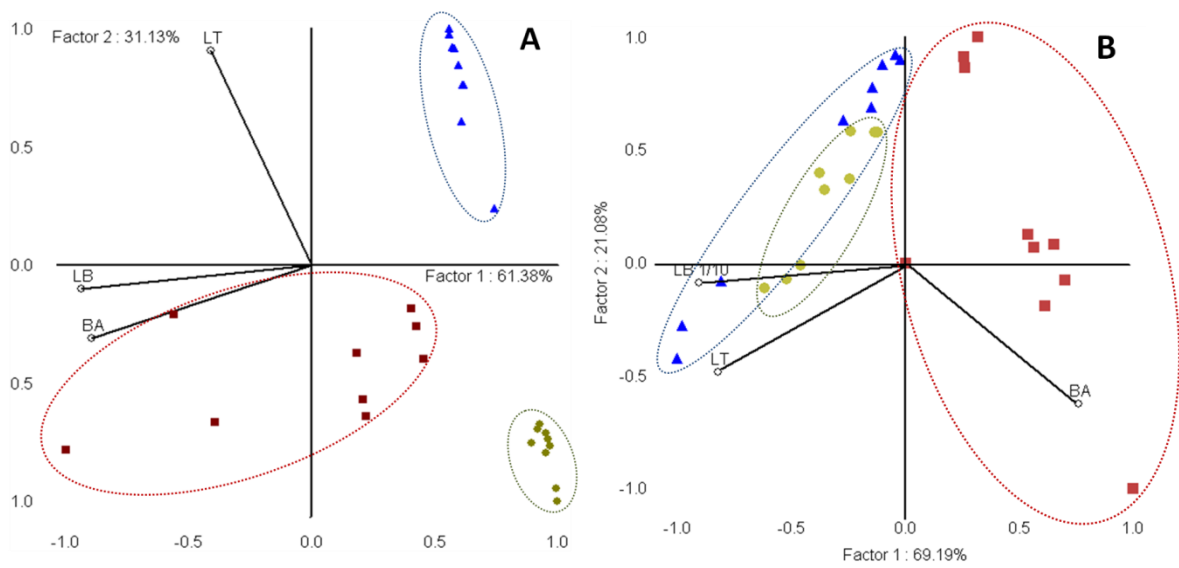
**Figure 45:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (A) et maturité avancée (B) pour les parcelles en mode de conduite biologique. Campagne de 2009. Projection des variables sur les axes 1 et 2. Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.



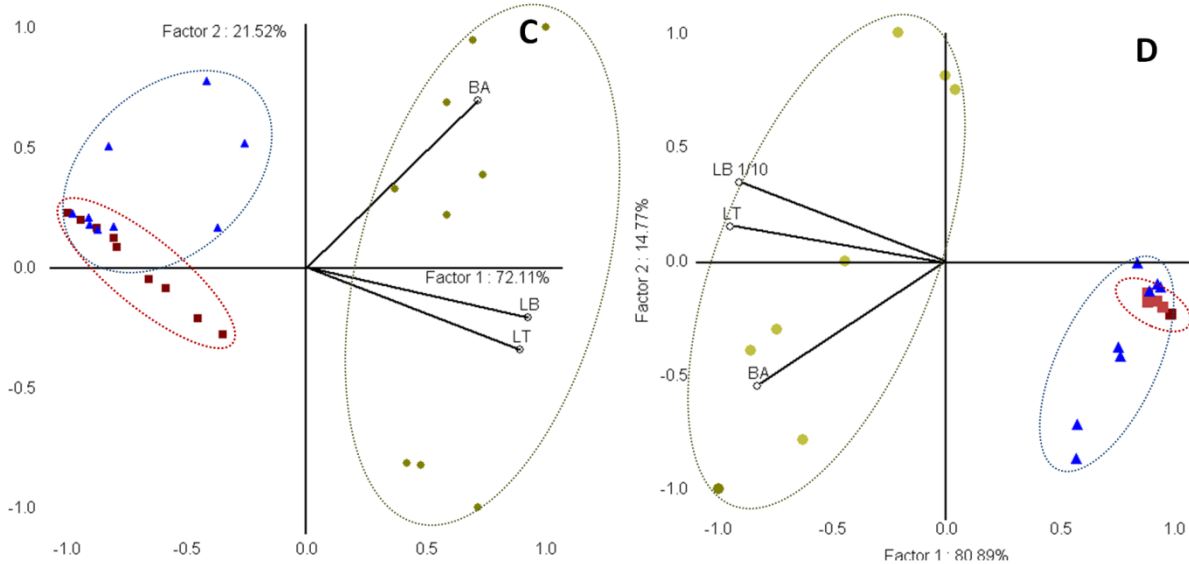
**Figure 46:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (C) et maturité avancée (D) pour les parcelles en mode de conduite conventionnelle. Campagne 2009. Projection des variables sur les axes 1 et 2. Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.

En 2010, les échantillons provenant des trois terroirs à maturité en mode biologique (**Figure 47 A**) sont bien discriminés selon les deux axes (variables LB 1/10, BA d'une part puis LT d'autre part). Les échantillons des parcelles de Lussac et Puisseguin sont regroupés et anticorrélés avec les variables LB 1/10 et BA. A maturité avancée, les échantillons de Lussac et Puisseguin ne sont pas discriminés et sont bien corrélés avec les variables LB et LT.

En mode conventionnel, les échantillons des parcelles issues de Lussac sont bien discriminés par rapport au deux autres terroirs et sont corrélés avec les variables étudiées (**Figure 48**).



**Figure 47:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (A) et maturité avancée (B) pour les parcelles en mode de conduite biologique. Campagne de 2010. Projection des variables sur les axes 1 et 2 Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.



**Figure 48:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité (A) et maturité avancée (B) pour les parcelles en mode de conduite biologique. Campagne de 2010. Projection des variables sur les axes 1 et 2 Pomerol ■, Lussac ●, Puisseguin ▲.

### 1.4 Analyse des profils et activités métaboliques - effet terroir

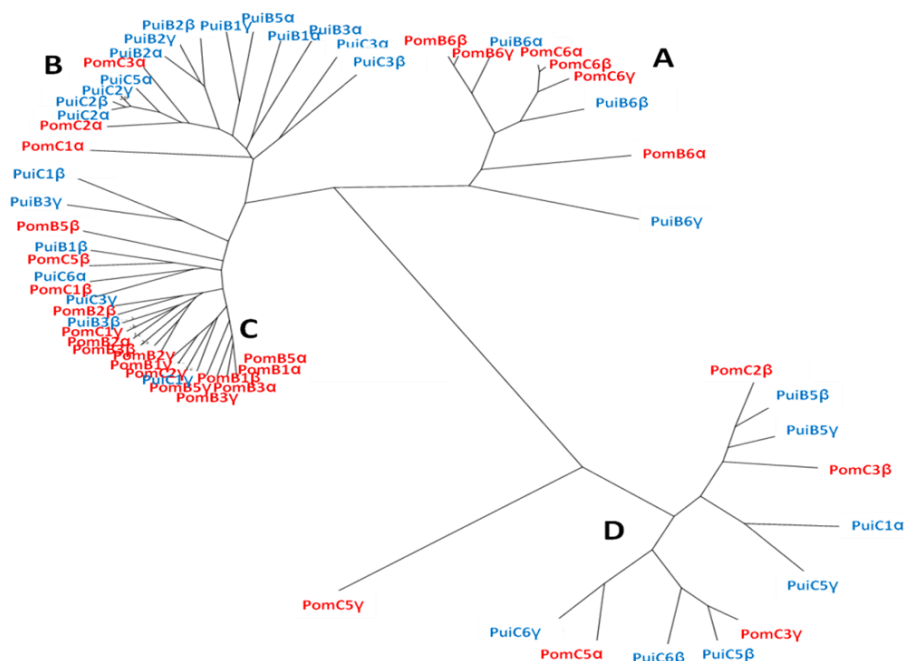
Les valeurs de l'indice de diversité et de l'AWCD obtenues en 2010 sont présentées dans le **Tableau 23**. Les valeurs moyennes pour l'AWCD ne sont pas significativement différentes

selon le terroir (ANOVA, un facteur « terroir »). En revanche, les valeurs moyennes obtenues pour l'indice de diversité de Shannon sont significativement différentes au stade maturité avancée, avec des valeurs plus élevées à Puisseguin par rapport à Pomerol.

Stade	Indice de Diversité de Shannon				Stade	AWCD			
	Pomerol		Puisseguin			Pomerol		Puisseguin	
	Moyenne (n =6)	Ecartype	Moyenne (n =6)	Ecartype		Moyenne (n =6)	Ecartype	Moyenne (n =6)	Ecartype
Déb Véraison	3.31	0.05	3.24	0.13	Déb Véraison	1.13	0.16	0.88	0.28
Mi-Véraison	3.26	0.09	3.26	0.04	Mi-Véraison	0.96	0.28	0.79	0.05
Déb Maturité I	3.18	0.20	3.27	0.06	Déb Maturité I	0.83	0.44	0.94	0.18
Maturité	3.20	0.22	3.18	0.14	Maturité	0.95	0.38	0.61	0.17
Mat Avancée	3.41*	0.01	4.84*	1.50	Mat Avancée	1.43	0.16	0.94	0.53

**Tableau 23:** Indice de diversité de Shannon et AWCD calculés à partir des profils métaboliques plaque Biolog®, concernant les échantillons provenant des parcelles de Pomerol et Puisseguin aux différents stades. \* indique des différences significatives  $p < 0,05$ , ANOVA à un facteur « terroir ».

Les profils métaboliques des différents échantillons ont été analysés par classification ascendante hiérarchique indépendamment du stade phénologique ou du mode de conduite (**Figure 49**). Il est possible de distinguer 4 clusters : une branche où la majorité des échantillons (80%) proviennent de Puisseguin (2), une autre branche où la majorité des échantillons (70 %) est issue de Pomerol (3), et une troisième branche où le pourcentage des échantillons des deux terroirs est identique (4). La quatrième branche de ce dendrogramme rassemble des échantillons des deux terroirs Puisseguin (1). Cependant, ces derniers échantillons ont été isolés au même stade phénologique, le stade de maturité avancée. Il apparaît ainsi que l'effet stade de maturité est prépondérant sur l'effet terroir.

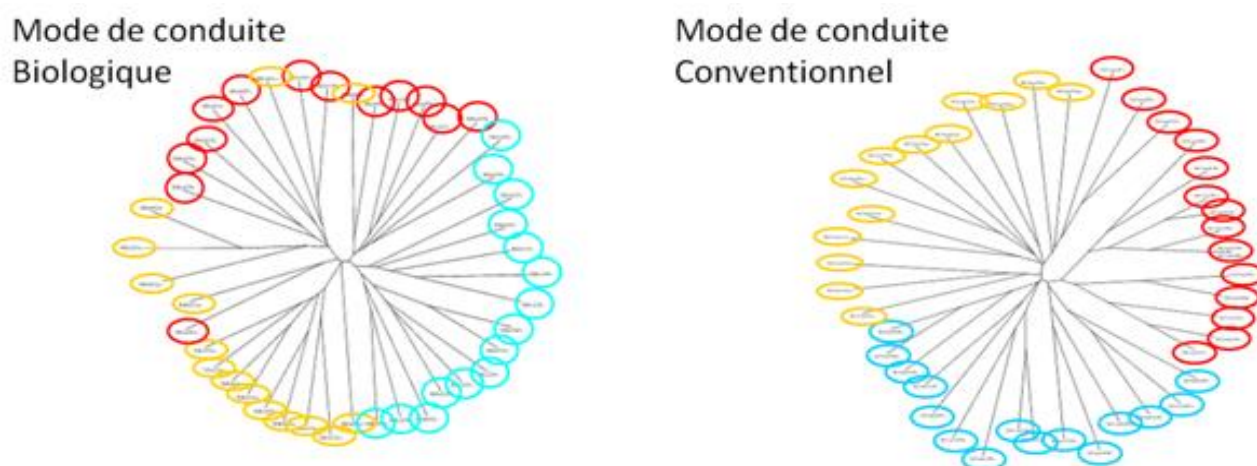


**Figure 49:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques obtenus à l’aide des microplaques Biolog® issus des échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique et conventionnel à Pomerol et Puisseguin. Dendrogramme construit en utilisant la méthode UPGMA à partir d’une matrice de distance euclidienne.

## 1.5 Effet de l’effet terroir sur la structure des communautés microbiennes

### 1.5.1 Analyse de la population bactérienne cultivable par DGGE – Libournais 2009

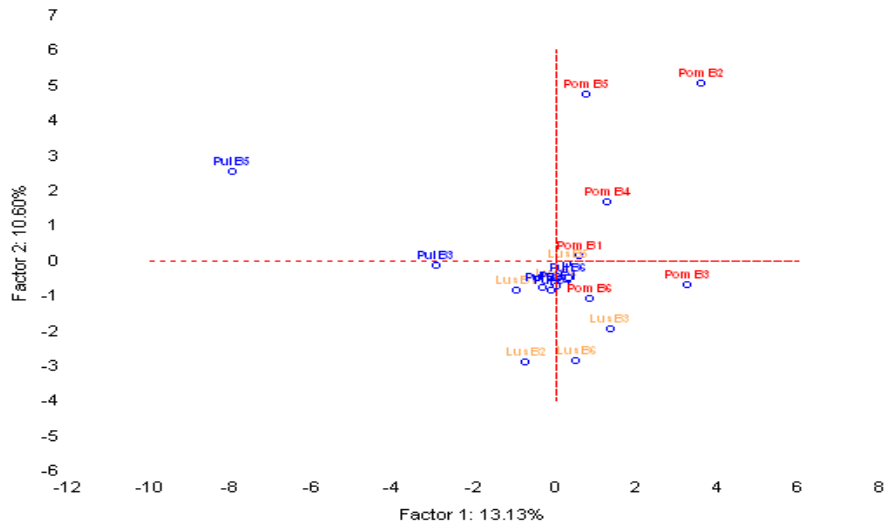
Les profils DGGE des communautés bactériennes cultivables sur milieu LB 1/10 ont été analysés en comparant, pour le même mode de conduite, les échantillons provenant des différentes zones climatiques. L’analyse par CAH indique des différences au niveau de la structure de la communauté cultivable selon les zones climatiques pour les deux modes de conduite du vignoble (**Figure 50**). Les dendrogrammes obtenus montrent des branches qui rassemblent les profils issus des échantillons qui proviennent d’un même terroir.



**Figure 50:** Comparaison de profils moléculaires de la région V3 de l'ADNr 16s des populations cultivables sur milieu LB 1/10. Dendrogramme obtenu en utilisant l'algorithme du *neighbor-joining* à partir d'une matrice de distance euclidienne. Cercles rouges: Pomerol, cercles jaunes: Lussac, cercles bleus: Puisseguin

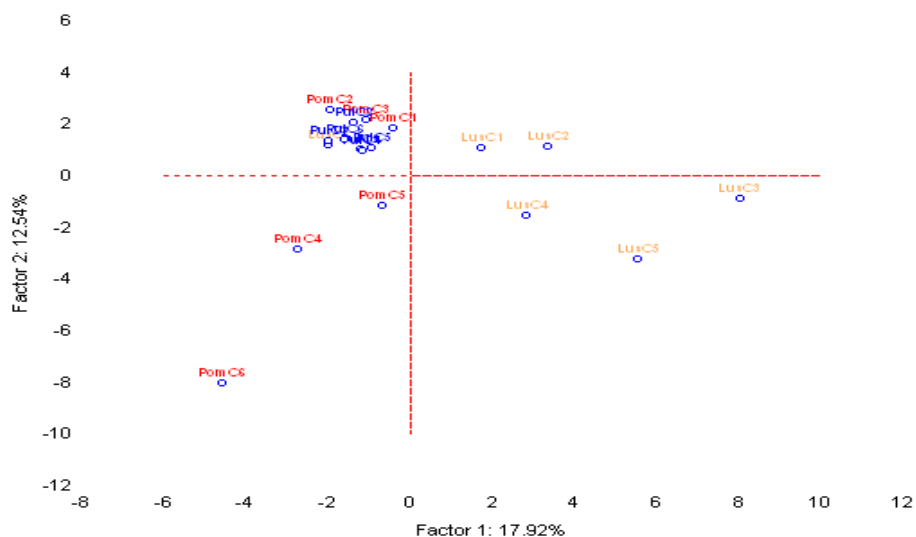
### 1.5.2 Analyse la population bactérienne totale par T-RFLP - Libournais-2010

L'analyse par T-RFLP de la structure de la population bactérienne de la baie de raisin a été réalisée sur l'ADN directement extrait des solutions de lavage, les triplicatas ayant été rassemblés afin d'avoir suffisamment de matériel biologique. Les profils obtenus ont été analysés par l'analyse en composante principale. En ce qui concerne les échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique, une séparation entre le terroir de Pomerol d'une part et ceux de Lussac et Puisseguin d'autre part est mise en évidence (**Figure 51**). La projection des individus sur les plans factoriels montre que la totalité des échantillons de Pomerol sont corrélés positivement avec l'axe 1, tandis que les échantillons de Lussac et Puisseguin sont distribués sur les deux abscisses de cet axe. L'axe 2 tend à opposer les échantillons de Pomerol à ceux des deux autres terroirs. La majorité des profils des échantillons de Pomerol montrent une corrélation positive vis à vis de cet axe alors que les échantillons de Lussac et Puisseguin sont en majorité corrélés négativement.



**Figure 51:** Analyse en composante principale des profils T-RFLP obtenus à partir de l’amplification de l’ADNr 16s (restriction enzymatique par *Hinf*I). Echantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge) Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite biologique. Campagne de 2010.

L’analyse des échantillons des parcelles en mode conduite conventionnel révèle une distinction entre les profils de Pomerol et ceux de Lussac (**Figure 52**). En analysant la distribution des échantillons sur l’axe 1, nous constatons que la totalité des échantillons de Pomerol sont projetés sur l’abscisse négative, contrairement à ceux de Lussac pour lesquels la majorité des échantillons sont placés dans l’abscisse positive.

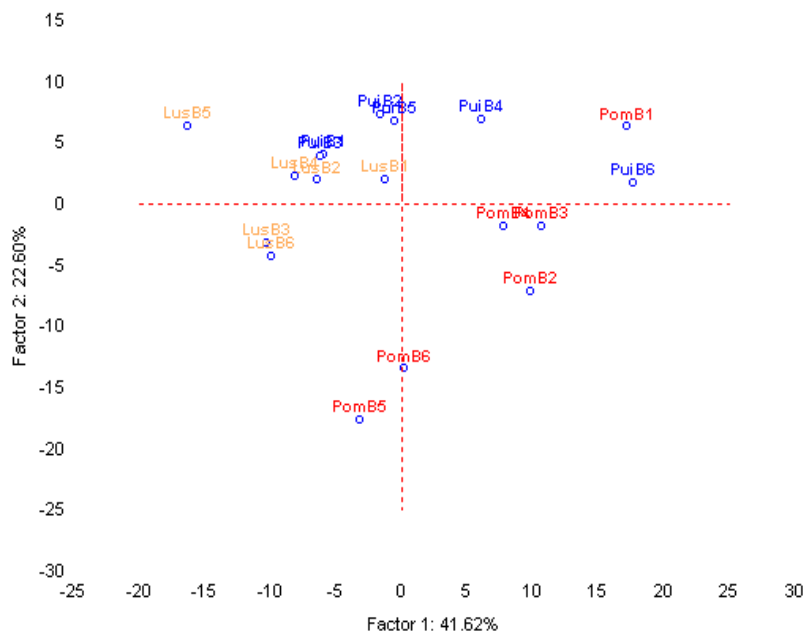


**Figure 52:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l’amplification de l’ADNr 16s (restriction enzymatique par *Hinf*I). Echantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge) Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2010.

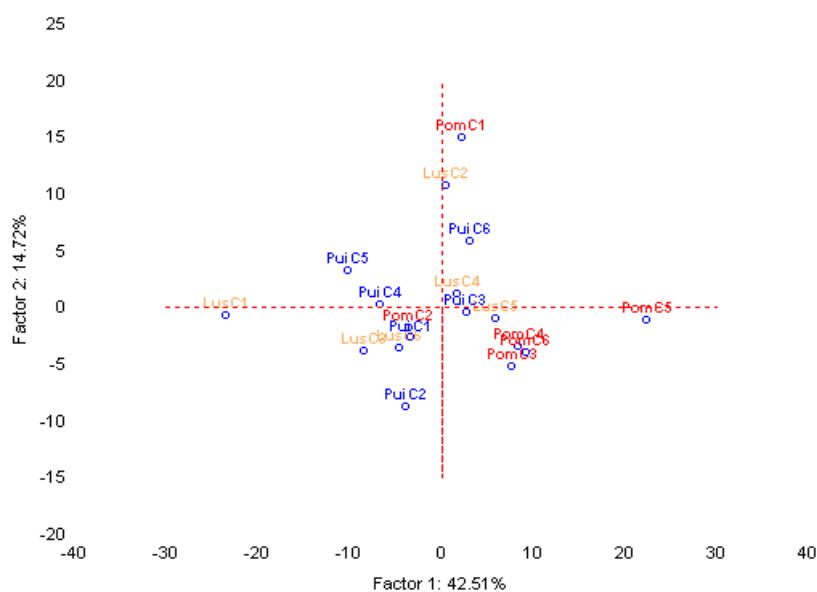


### 1.5.3 Analyse la population fongique par CE-SSCP - Libournais 2010

L'effet du terroir sur la structure des populations fongiques a été analysé par CE-SSCP de la même façon, à partir de l'ADN extrait directement des eaux de lavage de baies. L'ACP établie à partir des profils des échantillons en mode de conduite biologique, montre une séparation entre les individus de Pomerol et ceux de Lussac et Puisseguin (**Figure 53**). Les profils de Pomerol sont en majorité corrélés avec l'axe 1. Les échantillons de Lussac et Puisseguin sont en majorité corrélés avec l'axe 2. Même si certains échantillons de Puisseguin sont très proches les uns des autres, ils ne se distinguent pas des échantillons de Lussac.



**Figure 53:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Échantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge), Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite biologique. Campagne de 2010.



**Figure 54:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Échantillons provenant des parcelles de Pomerol (rouge), Lussac (jaune) et Puisseguin (bleu) en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2010.

L'ACP portant sur les échantillons issus de parcelles en mode de conduite conventionnel (**Figure 54**), ne met pas en évidence de distinction nette entre les profils.

## 1.6 Discussion

Les trois terroirs viticoles étudiés dans ce travail se caractérisent par des microclimats très différents (Bois 2007). Pomerol est un terroir précoce, avec des températures moyennes plus élevées que celles mesurées à Lussac et Puisseguin, terroirs plus tardifs. Par ailleurs, l'humidité relative est plus élevée à Lussac et Puisseguin par rapport à Pomerol.

Nous avons analysé les données concernant les niveaux de populations cultivables obtenues en 2009 et 2010 sous l'angle de l'origine géographique de nos échantillons. Les résultats obtenus montrent, qu'aux différents stades phénologiques, le terroir a un effet significatif sur les niveaux de population cultivable. Les résultats de la campagne de 2009 et de 2010 montrent que les échantillons issus des terroirs plus tardifs de Puisseguin et de Lussac présentent, dans la majorité des cas, des niveaux de populations plus élevés par rapport à ceux de Pomerol.

La comparaison des indices de diversité métabolique montre des différences significatives notamment au stade de maturité avancée. Les indices de diversité des échantillons de Puisseguin sont significativement supérieurs à ceux obtenus pour les échantillons de Pomerol. L'analyse des profils métaboliques des différents échantillons par classification ascendante hiérarchique montre un effet terroir pour certains stades.

En ce qui concerne la structure de population, l'analyse par PCR-DGGE des populations bactériennes cultivables sur milieu LB 1/10 montre une séparation claire entre les profils selon leurs terroirs d'origine. L'analyse de la communauté bactérienne par T-RFLP montre que les profils des échantillons provenant du terroir de Pomerol se distinguent de ceux provenant de Puisseguin en mode de conduite biologique, et de ceux provenant de Lussac en mode de conduite conventionnel.

Les données de DGGE issues des populations cultivables milieu LB 1/10 permettent de distinguer clairement les échantillons selon leurs origines géographiques, contrairement aux données issues de la méthode d'empreinte moléculaire T-RFLP. Cette différence de résultats peut s'expliquer par le fait que l'approche culture-dépendante sélectionne préférentiellement la fraction la plus active des bactéries au sein de cette communauté, elle-même la plus sensible aux stress anthropogéniques (Söderberg et Bååth 1998). Cette observation peut corroborer l'hypothèse d'une réactivité supérieure des populations cultivables aux stress environnementaux (Ellis et al. 2003).

L'analyse des communautés fongiques par PCR-DGGE à partir des populations levures cultivables sur milieu LT n'a pas été possible du fait du nombre de bandes trop faibles obtenues sur gel. Pour les parcelles en mode de conduite biologique, l'analyse de la communauté levure par empreinte moléculaire montre une séparation des profils issus des échantillons de Lussac et de Puisseguin par rapport à ceux de Pomerol. En revanche, la même observation n'est pas reproduite pour les échantillons provenant du mode de conduite conventionnel.

Les terroirs de Puisseguin et Pomerol sont caractérisés par des conditions climatiques différentes, notamment la température et l'hygrométrie. Des conditions d'humidité plus élevées peuvent favoriser le développement des populations et potentialiser la croissance et la diversité microbienne. Pour le développement des micro-organismes, la quantité d'eau qui peut être amenée à un milieu repose sur des principes liés à la disponibilité de cette eau ou activité de l'eau ( $A_w$ ). La détermination de l'activité de l'eau de la pellicule des raisins, pour ces deux terroirs, a été réalisée tout au long de la maturation des baies. Les résultats montrent que, pour les stades de maturité et maturité avancée, des valeurs significativement supérieures ont été enregistrées dans les parcelles de Puisseguin par rapport à Pomerol. Les différences significatives entre terroir concernant les niveaux de populations microbiennes cultivables ont été également observées pour ces deux stades phénologiques, avec des niveaux plus élevés à Puisseguin qu'à Pomerol.

L'impact des conditions climatologiques associé à un terroir ou à une région viticole sur les populations microbiennes de la baie de raisin a été constaté dans un travail précédent (Combina et al. 2005). Cette étude se rapportait aux populations de levures cultivables au stade de maturité. Dans notre travail, nous avons étudié différents paramètres de la population bactérienne et fongique tels que la structure, la densité et l'activité métabolique. Les résultats obtenus pour les différents prélèvements au cours des deux campagnes montrent des différences significatives entre terroirs ; dans la région du Libournais, les zones climatiques plus fraîches et humides, favorisent le développement des micro-organismes. Une activité de l'eau ( $A_w$ ) sur la pellicule de raisin plus élevée pour la zone plus fraîche et humide peut favoriser le développement microbien, et ainsi expliquer les valeurs les plus élevées de populations trouvées à Puisseguin par rapport à celles de Pomerol, terroir plus chaud et sec.

## **2. L'influence du mode de conduite et des pratiques phytosanitaires**

L'étude de l'impact du mode de conduite et des traitements phytosanitaires sur les populations microbiennes de la baie de raisin a récemment fait l'objet de nombreux travaux (Cadez et al. 2010; Cordero Bueso et al. 2011), essentiellement sur les populations de levures cultivables, présentant des aptitudes fermentaires.

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence du mode de conduite dans des propriétés viticoles utilisant différents systèmes de production : agriculture biologique et conventionnel. La production de raisins comprend un certains nombres de pratiques viticoles (gestion de la canopée, entretien du sol, fertilisation, opérations en vert, etc...), mais également l'usage de produits phytosanitaires pour lutter contre les ravageurs de la vigne. Nous avons ciblé notre étude sur l'impact des pratiques phytosanitaires, plus précisément l'usage de traitements cupriques sur la communauté microbienne.

### **2.1 Comparaison des niveaux de populations de cultivables pendant la campagne de 2009 -2010**

Les données concernant les populations cultivables présentes sur la baie de raisin aux différents stades phénologiques, ont été analysées, en comparant pour le même terroir, les niveaux des populations dans les parcelles en mode de conduite biologique et en mode de conduite conventionnel.

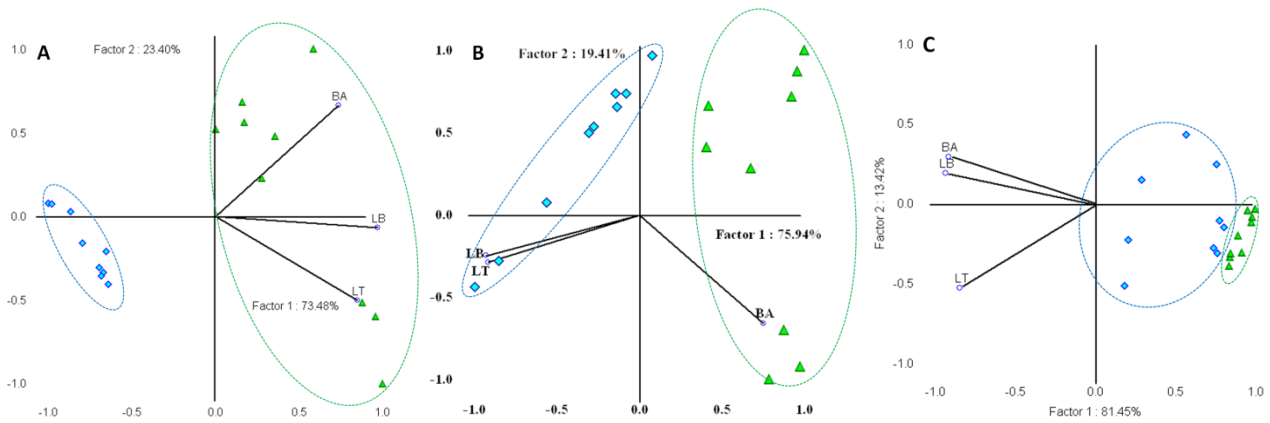
#### **2.1.1 Campagne de 2009**

Des différences significatives entre les deux modes de conduites sont obtenues pour les populations cultivées sur milieux LT et sur milieu LB1/10, pour les différents stades phénologiques (Annexe 2: Tableau I et II, ANOVA à un facteur « mode de conduite »). À Pomerol, la population microbienne cultivée est, pour la majorité des stades, supérieure dans la parcelle en mode de conduite biologique que dans la parcelle en mode de conduite conventionnel. A Lussac, nous avons constaté la tendance inverse, c'est dans la parcelle en mode de conduite conventionnel que les niveaux de population sont plus élevés. A Puisseguin, les niveaux de population sont équivalents pour la majorité des stades selon les

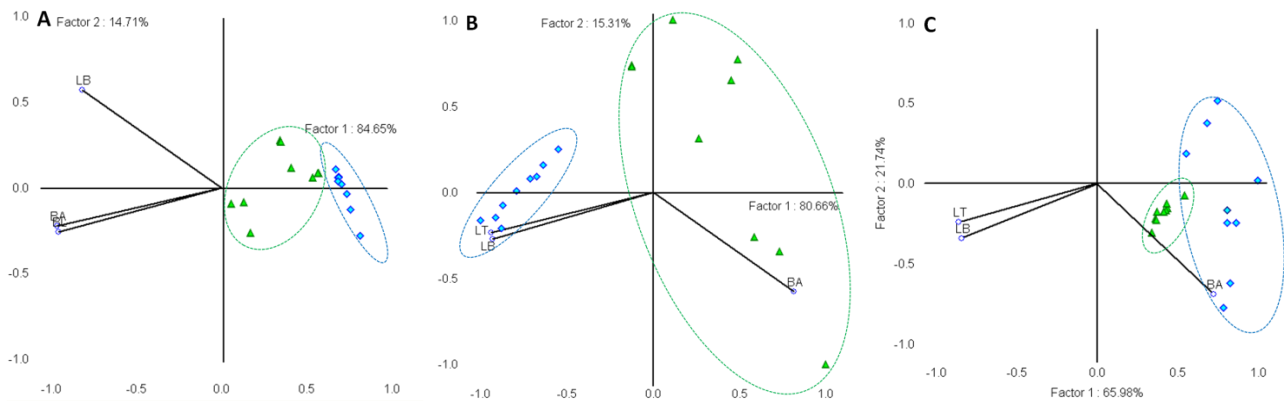
deux modes de conduite, à l'exception du stade de maturité avancée où la parcelle en mode de conduite biologique présente des valeurs plus élevées (Annexe 1: Figure I).

La population cultivable sur milieu BA est plus élevée à Pomerol et à Lussac dans les parcelles en mode de conduite biologique. A Puisseguin, des valeurs significativement plus élevées sont enregistrées pour les échantillons issus de la parcelle en mode conduite conventionnel (Annexe 2: Tableau III). Il a été possible de réaliser les dénombrements sur milieu BL uniquement au stade de maturation avancée. À Pomerol, pour la parcelle en mode de conduite biologique, les niveaux de population BL sont supérieurs à ceux en mode de conduite conventionnel. Au contraire à Lussac, les niveaux de populations sont supérieurs dans les parcelles en mode de conduite conventionnel (Annexe 2: Tableau IV).

En analysant les populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA aux stades de maturité et maturité avancée par ACP, nous constatons que les échantillons de Pomerol sont séparés en fonction du mode de conduite (**Figure 55** et **56 A**). Les individus correspondant au mode de conduite biologique sont mieux corrélés avec les variables LT, LB1/10 et BA. En ce qui concerne les parcelles de Lussac, nous remarquons également une séparation entre échantillons selon le mode de conduite, similaire aux deux stades. L'axe 1 distingue clairement les échantillons. Les individus correspondant au mode de conduite conventionnel sont corrélés avec les variables LT et LB 1/10 (**Figure 55** et **56 B**). Dans la parcelle de Puisseguin, que ce soit au stade de maturité ou au stade de maturité avancée, les individus correspondant au mode de conduite conventionnel présentent une dispersion dans le plan assez importante, contrairement aux échantillons provenant de la parcelle en mode de conduite biologique qui sont regroupés (**Figure 55** et **56 C**). Pour les deux stades, les individus ne sont pas corrélés avec les variables de population LT et LB.



**Figure 55:** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, pour les prélèvements à maturité, parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C: Puisseguin. Campagne 2009. Mode de conduite biologique ▲, mode conduite conventionnel ◆.



**Figure 56:** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, pour les prélèvements à maturité avancée, parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C: Puisseguin. Campagne 2009. Mode de conduite biologique ▲, mode conduite conventionnel ◆.

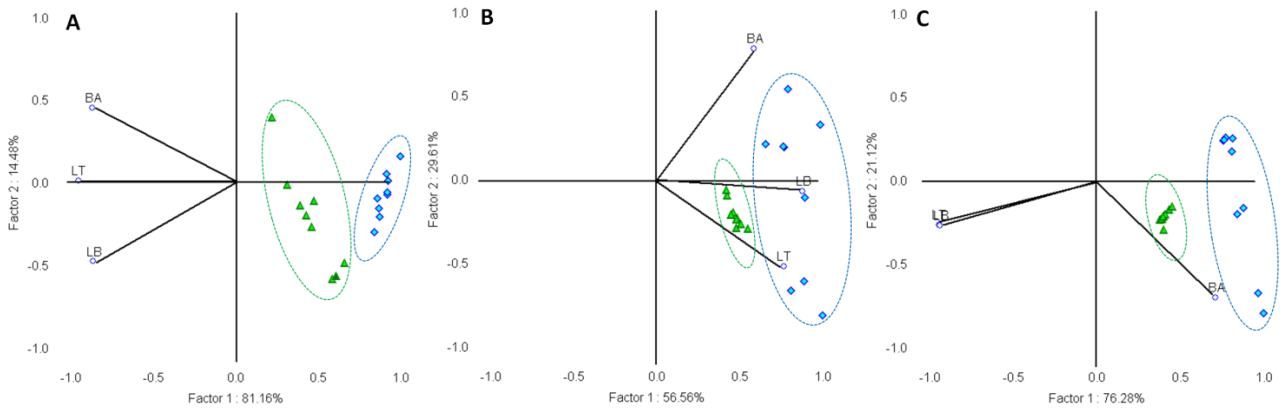
### 2.1.2 Campagne de 2010

Au cours de cette campagne, nous avons constaté que la population de micro-organismes cultivables est, pour la plupart des prélèvements, plus importante dans les parcelles en mode de conduite biologique par rapport à celles en mode de conduite conventionnel

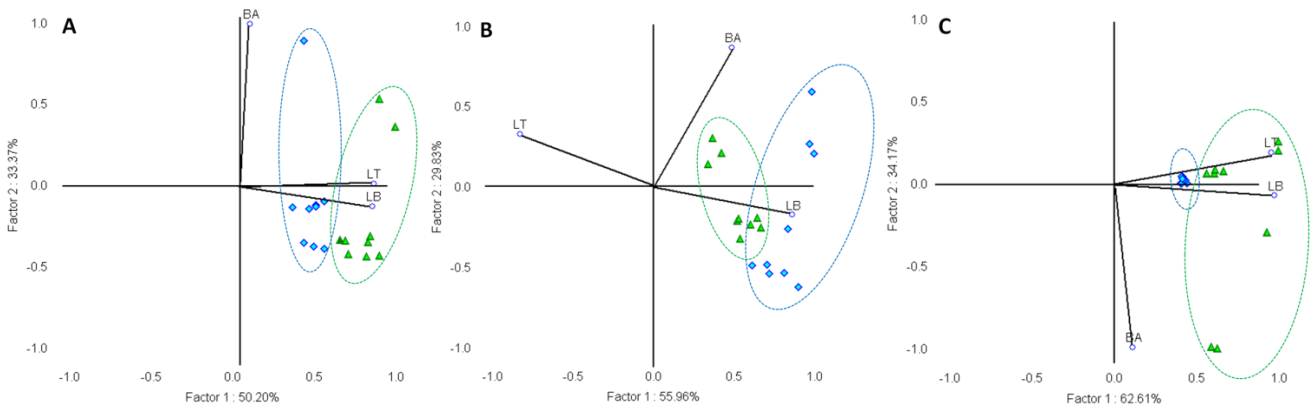
(Annexe 1: Figure 2). Sur milieu LT, les valeurs des dénombrements sont significativement plus élevées dans les parcelles en mode de conduite biologique, à l'exception d'un prélèvement (Lussac au stade de maturité) où des niveaux significativement plus élevés dans les parcelles en mode de conduite conventionnel sont observés (Annexe 2: Tableau V). En ce qui concerne la population cultivable sur milieux LB 1/10, pour les terroirs de Pomerol et Puisseguin, le mode de conduite biologique est celui qui, dans la quasi-totalité des prélèvements, présente des valeurs de populations plus élevées (Annexe 2: Tableau VI). Cependant, dans la majorité des prélèvements à Lussac, les valeurs sont plus élevées dans la parcelle en mode de conduite conventionnel. En ce qui concerne la population cultivable sur BA, les dénombrements montrent, dans la majorité des cas, une population supérieure dans les parcelles en mode de conduite conventionnelle (Annexe 2: Tableau VII).

Les données obtenues aux stades de maturité et maturité avancée ont été analysées par ACP. Pour le terroir de Pomerol, les résultats obtenus montrent une distinction entre les échantillons selon le mode de conduite conventionnel et biologique. Ce dernier est mieux corrélé avec les variables LT et LB 1/10 (**Figure 57 A et 58 A**). A Lussac, au stade de maturité les échantillons de la parcelle en mode de conduite conventionnel se distinguent de ceux en mode de conduite biologique par une corrélation plus importante avec les trois variables (**Figure 57 B**). En revanche, pour le stade maturité avancée, l'effet mode de conduite n'est pas mis en évidence. Curieusement, les populations LT sont anti-corrélées avec les populations LB. A Puisseguin, au stade de maturité, les individus issus des parcelles en mode de conduite biologique sont mieux corrélés avec les variables LT et LB 1/10 par rapport aux individus issus des parcelles en mode de conduite conventionnel. Au stade de maturité avancée, les individus issus des parcelles en mode de conduite biologique présente une corrélation plus importante avec tous les trois variables (LT, LB 1/10 et BA).





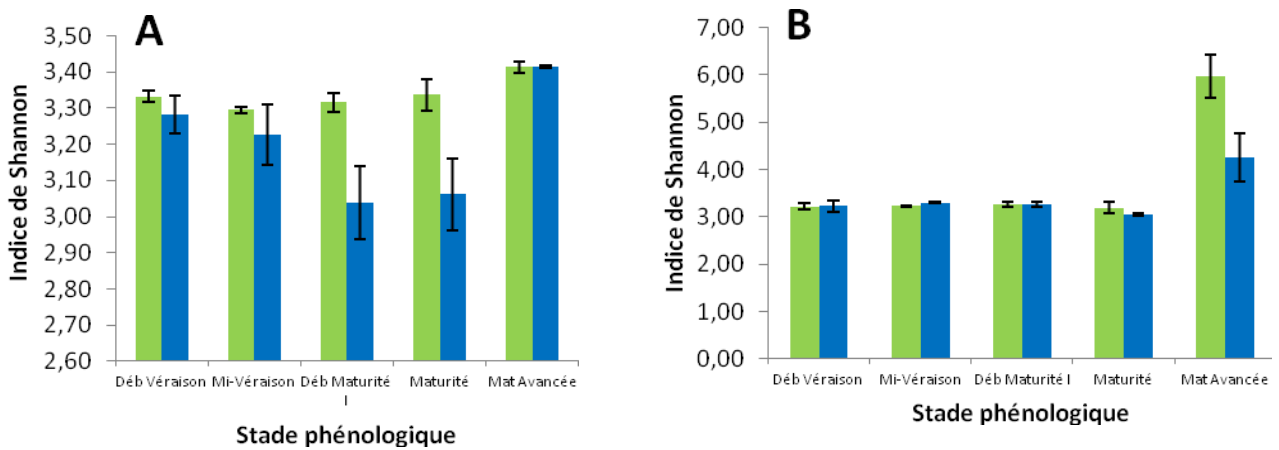
**Figure 57:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité dans les parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C : Puisseguin. Campagne 2010. Mode de conduite biologique ▲ , mode conduite conventionnel ◆ .



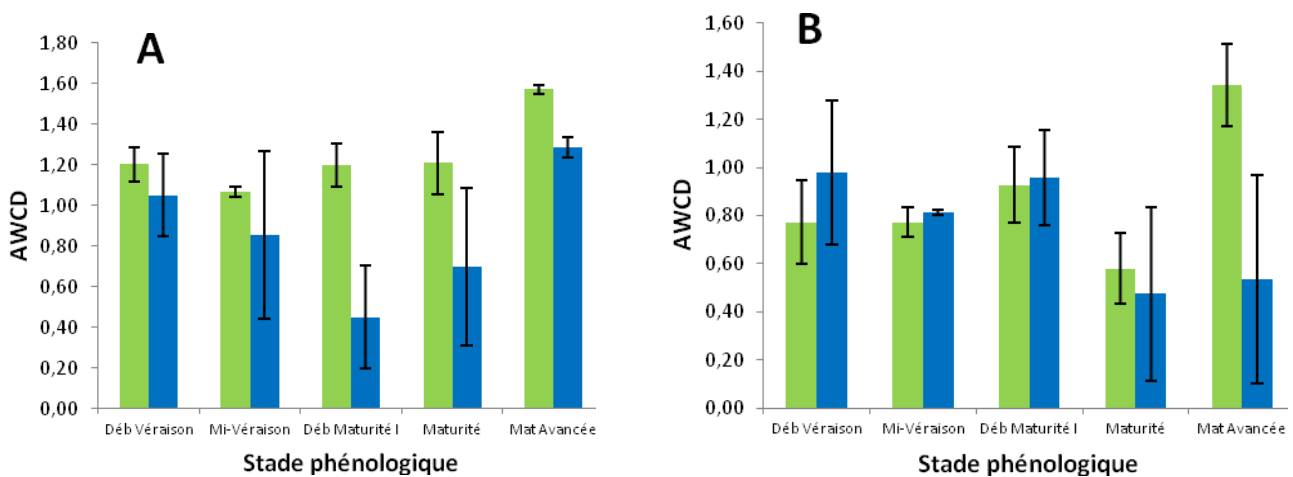
**Figure 58:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10 et BA, sur les prélèvements à maturité avancée dans les parcelles de A: Pomerol, B: Lussac et C : Puisseguin. Campagne 2010. Mode de conduite biologique ▲ , mode conduite conventionnel ◆ .

## 2.2 Analyse des profils et activités métaboliques

Les données des indices de diversité de Shannon et de l'AWCD concernant la campagne de 2010 (Figure 59 et 60) ont été analysées afin d'évaluer l'impact du mode de conduite.



**Figure 59:** Indice de diversité de Shannon calculés à partir des profils métaboliques plaque Biolog® aux différents stades phénologiques, A : Pomerol, B : Puisseguin. Mode de conduite biologique ■, mode de conduite conventionnel ■.

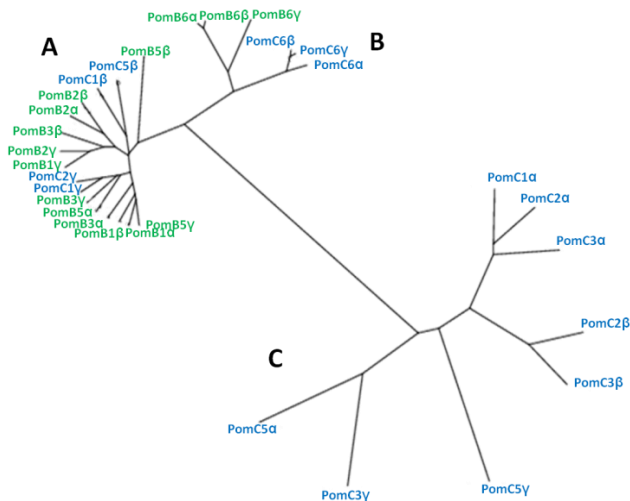


**Figure 60:** AWCD (Average Well Colour Développement) calculés à partir des profils métaboliques plaque Biolog® aux différents stades phénologiques. A : Pomerol, B : Puisseguin. Mode de conduite biologique ■, mode de conduite conventionnel ■.

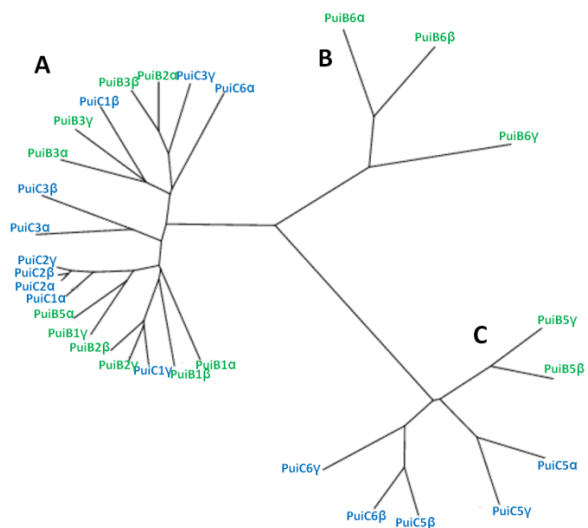
L'indice de diversité est significativement supérieur aux stades de début maturité et maturité (Pomerol) et de maturité avancée (Puisseguin) pour les parcelles en mode conduite biologique (Annexe 2: Tableau VIII). En ce qui concerne l'AWCD, les valeurs sont significativement différentes au stade de maturité avancée pour les deux terroirs, avec des valeurs supérieures dans les parcelles en mode de conduite biologique (Annexe 2: Tableau IX).

L'analyse des profils d'activité métabolique par classification ascendante hiérarchique montre que, pour les parcelles de Pomerol, la plupart des échantillons tendent à ce regrouper selon le mode de conduite. Une branche est constituée exclusivement par les échantillons en mode de conduite conventionnel et une deuxième branche rassemble une majorité d'échantillons issus des parcelles en mode de conduite biologique (**Figure 61**).

L'influence de mode de conduite sur les profils des échantillons issus des parcelles de Puisseguin est beaucoup moins perceptible. La séparation entre échantillons issus des parcelles selon le mode de conduite biologique n'est pas mise en évidence (**Figure 62**).



**Figure 61:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques des échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique ■ et conventionnel ■ à Pomerol. Dendrogramme construite en utilisant la méthode UPGMA à partir d'une matrice de distance euclidienne.



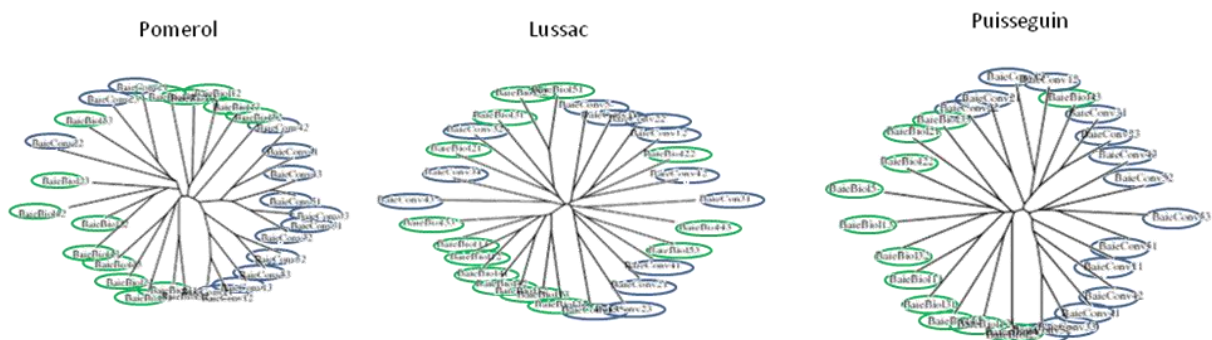
**Figure 62:** Classification ascendante hiérarchique des profils métaboliques des échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique ■ et conventionnel ■ à Puisseguin. Dendrogramme construite en utilisant la méthode UPGMA à partir d'une matrice de distance euclidienne.

## 2.3 Effet du mode conduite sur la structure des communautés microbiennes

### 2.3.1 Analyse la population bactérienne cultivable par DGGE - Lussac 2009

Les données des communautés bactériennes cultivables sur milieu LB 1/10 ont été analysées en comparant, pour le même terroir, les échantillons provenant des deux modes de conduite. Les profils obtenus par amplification de la région V3 de l'ADNr 16s des populations cultivables sur milieu LB 1/10 indiquent des différences au niveau de la structure de la communauté selon le mode de conduite.

Cette différence a été constatée pour les trois terroirs (**Figure 63**). Les dendrogrammes obtenus révèlent, sur certaines branches, la présence exclusive d'échantillons issus d'un mode de conduite donné.



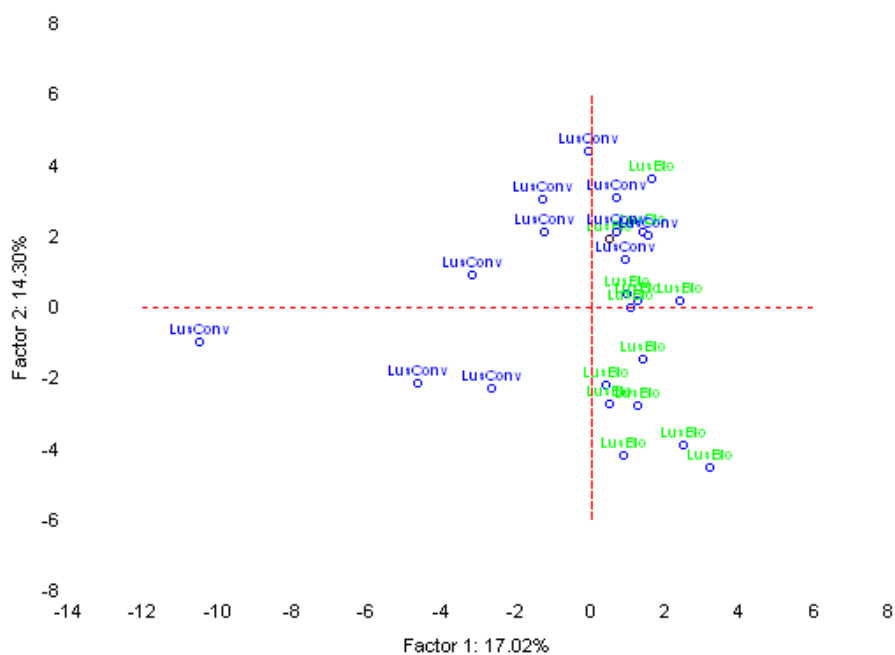
**Figure 63:** Comparaison de profils moléculaires de la région V3 de l'ADNr 16s des populations cultivables sur milieu LB 1/10. Dendrogramme obtenu en utilisant l'algorithme du *neighbor-joining* à partir d'une matrice de distance euclidienne. Les cercles verts représentent les échantillons provenant des parcelles en mode de conduite biologique et les cercles bleus en mode de conduite conventionnel. Campagne de 2009.

### 2.3.2 Analyse la population bactérienne totale par T-RFLP - Lussac 2009

Les profils obtenus pour un même terroir ont été comparés afin d'évaluer l'impact éventuel du mode de conduite sur la structure des populations bactériennes. L'analyse est basée sur l'amplification de l'ADNr 16s suivi de la digestion avec les enzymes *HaeIII* et *HinfI*. Les

données obtenues avec ces deux enzymes de restriction ont permis d’obtenir des résultats similaires.

La **Figure 64** montre l’ACP réalisée en analysant 47 variables (TRF’s). La totalité des profils issus des échantillons provenant de la parcelle en mode de conduite biologique est corrélée positivement avec l’axe 1, tandis que la majorité de ceux provenant de la parcelle en mode de conduite biologique sont plutôt distribués sur l’ordonnée négative.



**Figure 64:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l’amplification de l’ADNr 16s (restriction enzymatique par *Hinf*I). Échantillons provenant des parcelles de Lussac en mode de conduite biologique (couleur vert) et mode de conduite conventionnel (couleur bleu). Campagne de 2009.

Nous avons analysé les TRF’s utilisés en tant que variables qualitatives à l’aide du logiciel T-RFLP PAT+ (Phylogenetic Assignment Tool) et de la base de données Microbial Community Analysis III (Shyu et al. 2007) (**Figure 65**). Les résultats obtenus associe les TRF’s à de genres bactériennes comme *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*. Ceux genres, corresponde au ceux obtenue par l’identification des espèces isolées sur milieu LB 1/10 (**Chapitre IV**).

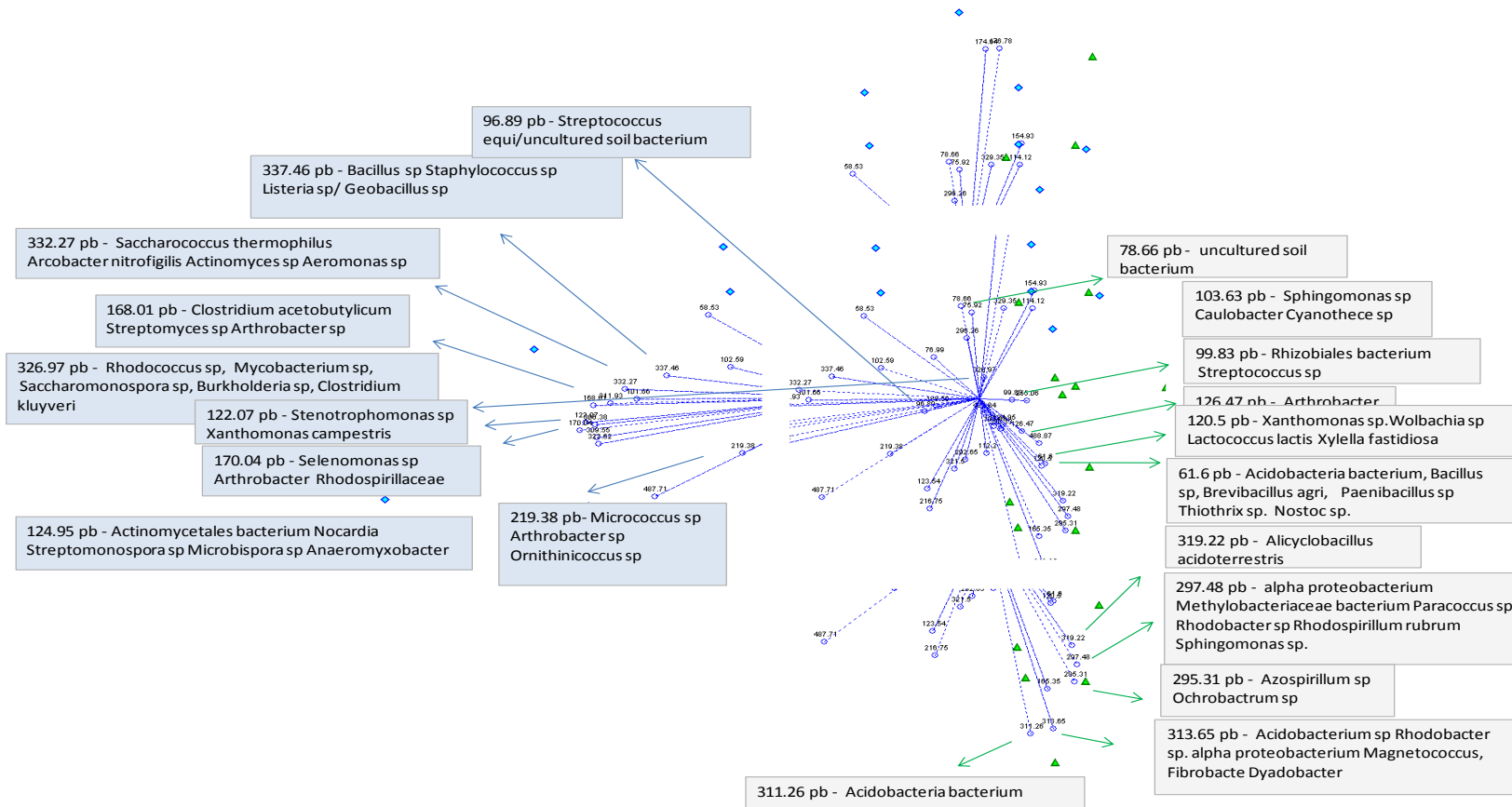
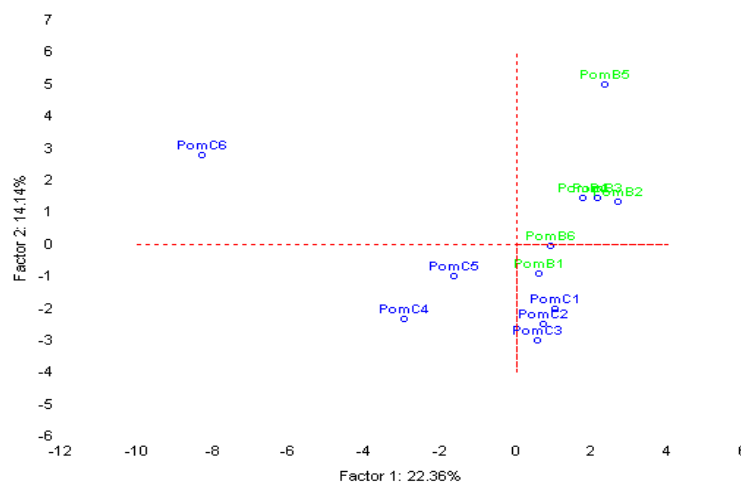


Figure 65: Analyse en composantes principales des profils T-RFLP et identification de TRFs à l'aide du logiciel T-RFLP PAT\* (Phylogenetic Assignment Tool) (Microbial Community Analysis III (Shyuet al., 2007)). Projection des variables sur les axes.

### 2.3.3 Analyse la population bactérienne totale par T-RFLP - Libournais 2010

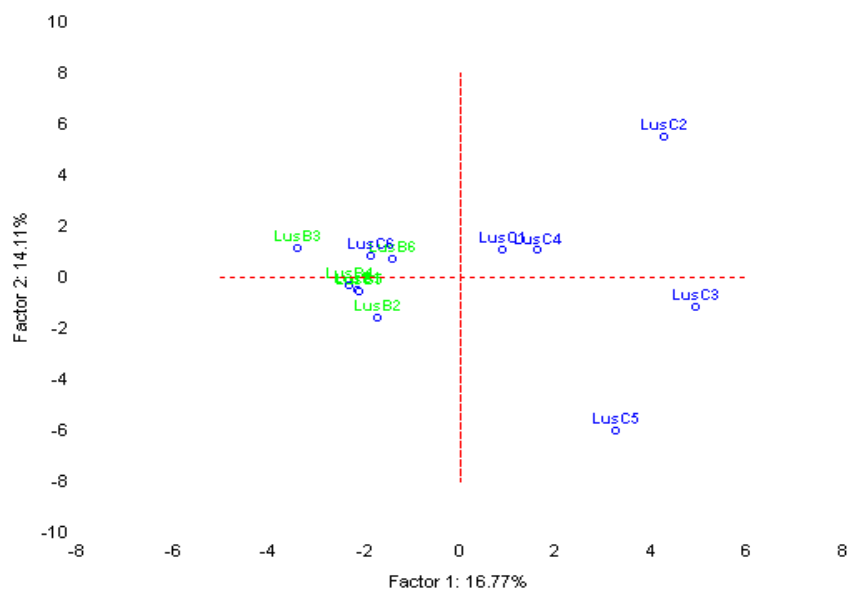
En ce qui concerne les échantillons de la campagne de 2010, l'analyse de la structure de la population bactérienne par T-RFLP a été réalisée comme précédemment décrit. La seule différence réside dans le fait que, pour des raisons de faible quantité d'ADN, les triplicatas de chaque prélèvement ont été rassemblés dans un seul échantillon.

En ce qui concerne la parcelle de Pomerol, l'ACP a été réalisée à partir des profils obtenus des échantillons provenant des deux parcelles, en considérant 42 TRF's comme variables. La **Figure 66** présente la distribution des échantillons sur le plan principal. L'axe 2 tend à séparer les profils des échantillons issus de la parcelle en mode de conduite biologique de ceux en mode de conduite conventionnel. La majorité des profils issus des échantillons de la parcelle en mode biologique sont corrélés positivement avec cet axe, contrairement aux profils issus des échantillons de la parcelle en mode de conduite conventionnel qui présentent une corrélation négative.



**Figure 66:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *Hinf*I). Échantillons provenant des parcelles de Pomerol en mode de conduite biologique (couleur verte) et en mode de conduite conventionnel (couleur bleue). Campagne de 2010.

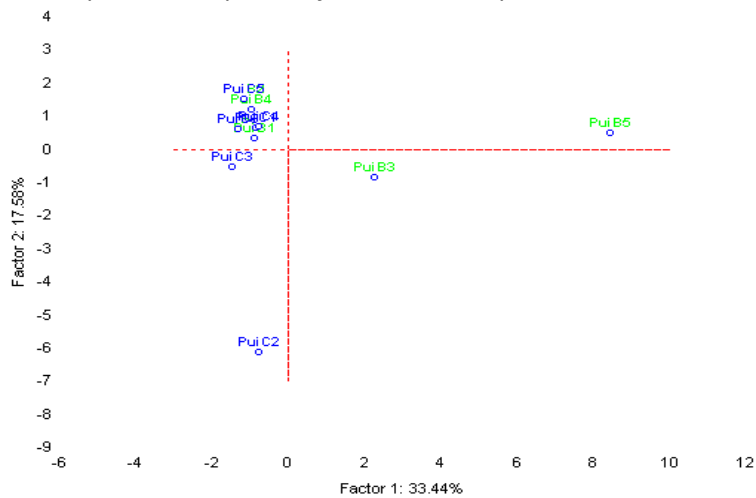
La distribution des échantillons de Lussac, à partir de 49 variables (TRF's), montre que les individus issus des parcelles en mode de conduite biologique sont tous corrélés négativement avec l'axe 1. Au contraire, les échantillons issus de la parcelle en mode de conduite conventionnel se présentent, en majorité, bien corrélés avec l'axe 1 (**Figure 67**). La dispersion des échantillons issus de la parcelle en mode de conduite conventionnel est beaucoup plus importante que ceux issus de la parcelle en mode de conduite biologique.



**Figure 67:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *HinfI*). Échantillons provenant des parcelles de Lussac en mode de conduite biologique (couleur verte) et mode de conduite conventionnel (couleur bleue). Campagne de 2010.

Les résultats de l'ACP pour les échantillons de Puissegui, obtenue à partir de 24 variables (TRF's), ne montre pas une distinction entre profils selon le mode de conduite de la parcelle d'origine (**Figure 68**). La majorité des individus montre une distribution similaire.

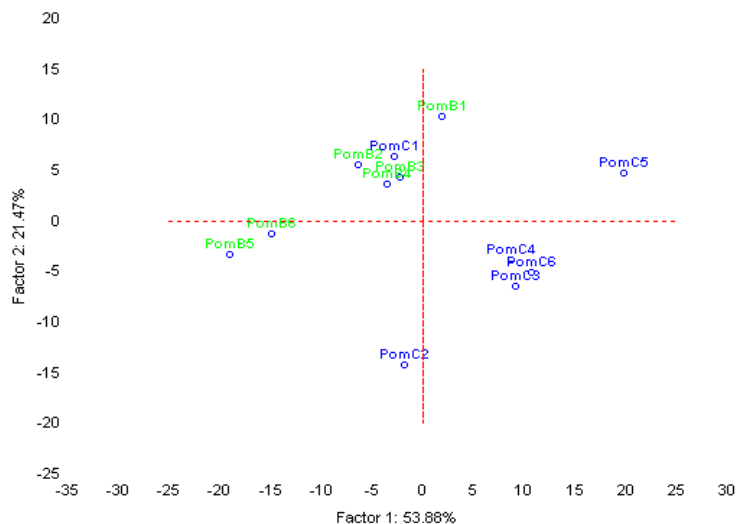




**Figure 68:** Analyse en composantes principales des profils T-RFLP obtenus à partir de l’amplification de l’ADNr 16s (restriction enzymatique par *Hinf*I). Échantillons provenant des parcelles de Puisseguin en mode de conduite biologique (couleur verte) et mode de conduite conventionnel (couleur bleue). Campagne de 2010.

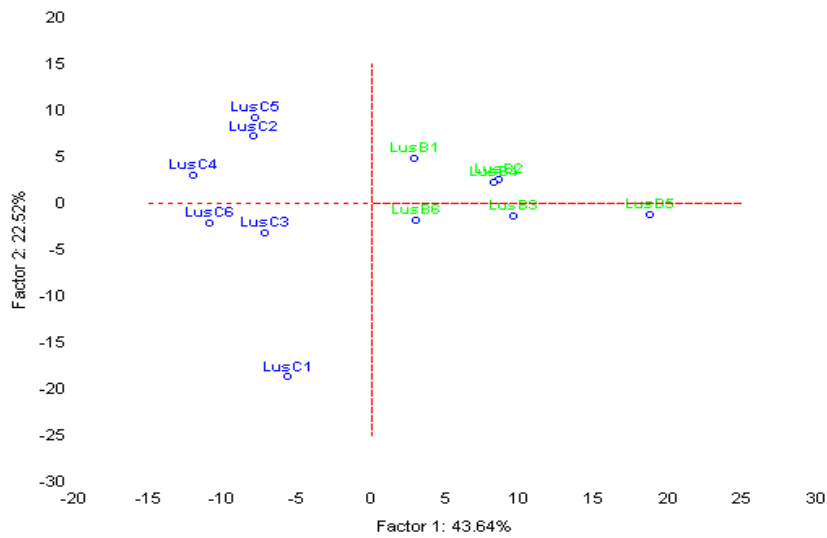
### 2.3.4 Analyse la population fongique par CE-SSCP - Libournais 2010

L’effet du mode de conduite sur la structure des populations fongiques a été étudié par l’analyse en composantes principales des profils obtenus par PCR-CE-SSCP des échantillons selon le mode de conduite pour un même terroir.

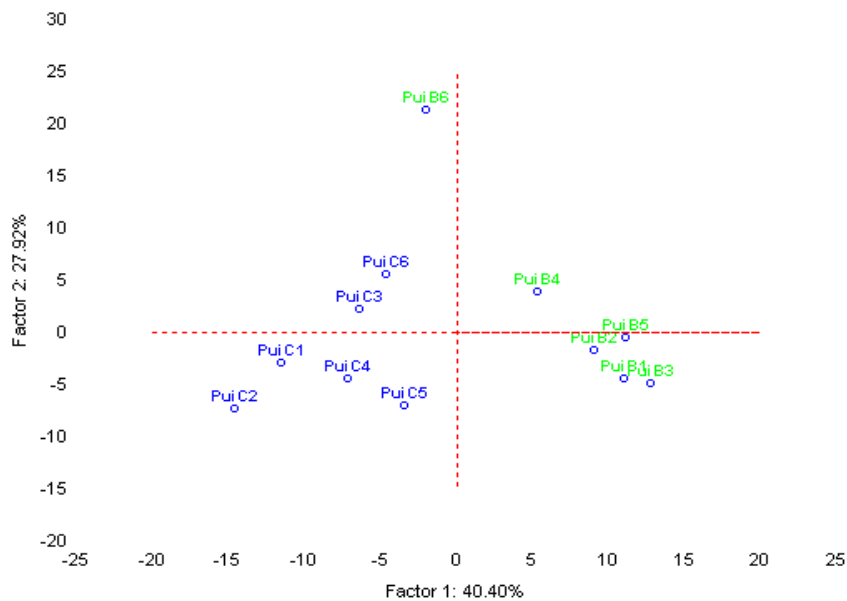


**Figure 69:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l’amplification de l’ADNr 26s. Échantillons provenant des parcelles de Pomerol en mode de conduite biologique (vert) et mode de conduite conventionnel (bleu).

Les **Figures 69, 70 et 71** présentent la distribution, sur le plan principal, des échantillons pour Pomerol, Lussac et Puisseguin respectivement. Nous constatons une distinction claire entre les individus en fonction du mode de conduite selon l'axe 1.



**Figure 70:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Echantillons provenant des parcelles de Lussac en mode de conduite biologique (vert) et mode de conduite conventionnel (bleu).



**Figure 71:** Analyse en composantes principales des profils CE-SSCP, obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 26s. Echantillons provenant des parcelles de Puisseguin en mode de conduite biologique (vert) et mode de conduite conventionnel (bleu).

## 2.4 Dosage du cuivre dans les eaux de lavage de baies ; corrélation avec les niveaux de populations cultivables et les indices de diversité

Les teneurs en cuivre dans les eaux de lavage des baies ont été déterminées pour les échantillons prélevés en 2009 et 2010. Les résultats concernant la campagne de 2009, montre que, à Pomerol, des quantités supérieures de cuivre ont été détectées dans la parcelle en mode de conduite conventionnel par rapport à la parcelle en mode de conduite biologique. Ces différences sont d'un point de vue statistique significatives au stade de mi-véraison ( $p = 0,001$  \*\*), début maturité ( $p = 0,005$ \*\*), maturité ( $P = 0,011$ \*) et maturité avancée ( $P = 0,0006$ \*\*\*) (**Tableau 24**). A Lussac, le phénomène inverse est observé ; des teneurs plus élevées en cuivre sont obtenues dans la parcelle en mode de conduite biologique. Des différences significatives sont constatées au stade de début véraison ( $p = 0,002$ ) et mi-véraison ( $p = 0,0003$ ). Dans les parcelles de Puisseguin nous n'avons pas détecté des différences significatives dans les teneurs en cuivre entre les deux modes de conduite (**Tableau 24**).

Parcelles	[Cuivre] $\mu\text{g}/\text{gr}$ de baie				
	Début Véraison	Mi-Véraison	Début Maturité	Maturité	Maturité Avancée
Pomerol Biologique	0,88 ( $\pm 0,14$ )	0,96 ( $\pm 0,04$ )**	0,78 ( $\pm 0,20$ )**	0,7 ( $\pm 0,18$ )*	0,62 ( $\pm 0,14$ )***
Pomero Conventionnel	2,18 ( $\pm 0,82$ )	5,18 ( $\pm 0,80$ )**	7,52 ( $\pm 2,04$ )**	6,26 ( $\pm 2,16$ )*	4,40 ( $\pm 0,59$ )***
Lussac Biologique	6,84 ( $\pm 0,31$ )**	5,54 ( $\pm 0,60$ )**	4,51 ( $\pm 0,88$ )	2,03 ( $\pm 0,84$ )	0,67 ( $\pm 0,14$ )
Lussac Conventionnel	0,08 ( $\pm 0,14$ )**	0,25 ( $\pm 0,18$ )**	4,06 ( $\pm 0,56$ )	1,37 ( $\pm 0,19$ )	0,43 ( $\pm 0,13$ )
Puisseguin Biologique	2,68 ( $\pm 0,43$ )	1,83 ( $\pm 0,23$ )	2,15 ( $\pm 0,42$ )	2,08 ( $\pm 0,39$ )	1,39 ( $\pm 0,13$ )
Puisseguin Conventionnel	3,11 ( $\pm 0,98$ )	1,22 ( $\pm 0,47$ )	3,16 ( $\pm 0,83$ )	1,3 ( $\pm 0,45$ )	0,42 ( $\pm 0,088$ )

**Tableau 24:** Teneurs en cuivre des eaux de lavage de baies, aux différents stades phénologiques. Valeurs moyennes de trois répétitions. ANOVA à un facteur « mode de conduite ». \*, \*\*, \*\*\* valeurs significatives au seuil  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  et  $p < 0,001$ . Campagne de 2009.

En ce qui concerne la campagne de 2010, les teneurs en cuivre déterminées à Pomerol sont, comme en 2009, plus élevées pour les baies prélevées dans la parcelle en mode conduite conventionnel par rapport à celles prélevées dans la parcelle en mode de conduite

biologique. Les valeurs sont inférieures à celles trouvées en 2010. Ces différences sont significatives aux stades de mi-véraison ( $p= 0,045$ ), début maturité I ( $p= 0,0009$ ), début maturité II ( $p= 0,02$ ) et maturité ( $p=0,032$ ). Dans la parcelle de Lussac, des valeurs significativement supérieures ont été enregistrée dans la parcelle en mode de conduite conventionnel aux stades de début maturité I ( $p=0,013$ ) et début de maturité II ( $p=0,020$ ).

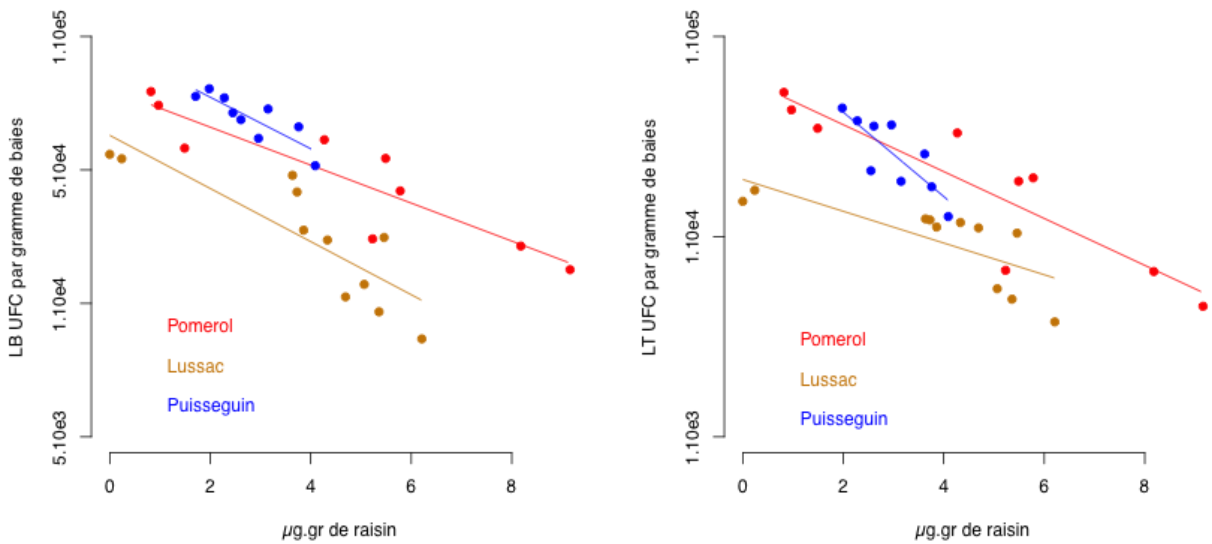
A Puisseguin, nous n’avons pas constaté de différences statistiquement significatives entre les deux modes de conduites (**Tableau 25**).

Parcelles	[Cuivre] $\mu\text{g}/\text{gr}$ de baie				
	Mi-Véraison	Début Maturité I	Début Maturité II	Maturité	Maturité Avancée
Pomerol					
Biologique	0,86 ( $\pm 0,33$ )*	0,32 ( $\pm 0,07$ )***	0,41 ( $\pm 0,17$ )*	0,21 ( $\pm 0,06$ )*	0,05 ( $\pm 0,003$ )
Pomero					
Conventionnel	1,51 ( $\pm 0,19$ )*	1,97 ( $\pm 0,30$ )***	1,89 ( $\pm 0,66$ )*	1,39 ( $\pm 0,62$ )*	0,69 ( $\pm 0,77$ )
Lussac					
Biologique	1,40 ( $\pm 0,49$ )	0,49 ( $\pm 0,09$ )*	0,58 ( $\pm 0,14$ )*	0,60 ( $\pm 0,18$ )	0,43 ( $\pm 0,02$ )
Lussac					
Conventionnel	1,38 ( $\pm 0,56$ )	0,88 ( $\pm 0,12$ )*	1,74 ( $\pm 0,55$ )*	1,05 ( $\pm 0,25$ )	0,41 ( $\pm 0,06$ )
Puisseguin					
Biologique	2,16 ( $\pm 0,90$ )	1,25 ( $\pm$ )	0,75 ( $\pm 0,46$ )	0,96 ( $\pm 0,17$ )	0,72 ( $\pm 0,11$ )
Puisseguin					
Conventionnel	1,18 ( $\pm 0,05$ )	1,34 ( $\pm 0,75$ )	0,83 ( $\pm 0,21$ )	1,78 ( $\pm 0,74$ )	1,78 ( $\pm 0,72$ )

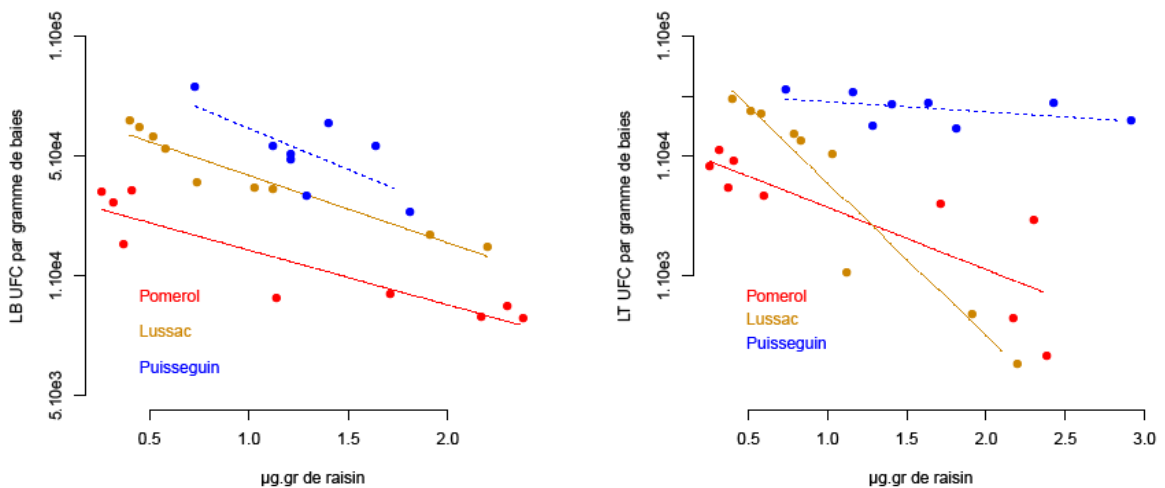
**Tableau 25:** Teneurs en cuivre des eaux de lavage de baies, à partir du stade de mi-véraison. Valeurs moyennes de trois répétitions. \*, \*\*, \*\*\* valeurs significatives au seuil  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$  et  $p < 0,001$ . Campagne de 2010.

Une analyse de corrélation entre les niveaux de population cultivable sur milieu LT et LB 1/10 et la concentration en cuivre des eaux de lavage des baies a été réalisée pour les données de 2009 et de 2010 (**Figures 72 et 73**, test de Spearman). L’analyse met en évidence un effet terroir important, expliquant entre 32 et 71% de la variance observée. En revanche, pour un même terroir, une corrélation négative très significative pour la majorité des échantillons ( $p$  compris entre 0,95 et 0,87) est obtenue à l’exception de Puisseguin en 2010 ( $p$ -value = 0,37,  $\rho = 0,5$  et 0,42 pour les populations LT et LB respectivement). Ces résultats montrent un effet dépressif du cuivre sur les populations cultivables levures et bactéries. Les teneurs en résidus cupriques à la surface de la baie de raisin pourraient ainsi expliquer, pour partie, les différences entre mode de conduite selon la propriété considérée. Par exemple en 2009, à Pomerol, la population microbienne cultivée est, pour la majorité des stades,

supérieure dans la parcelle en mode de conduite biologique par rapport à la parcelle en mode de conduite conventionnel, où des teneurs significativement plus élevées en cuivre ont été trouvées.



**Figure 72:** Corrélation entre la quantité de cuivre présent sur les baies de raisin et la population cultivables sur milieu LT et LB 1/10 pour les différents terroirs. Campagne 2009.



**Figure 73 :** Corrélation entre la quantité de cuivre présent sur les baies de raisin et la population cultivables sur milieu LT et LB 1/10 pour les différents terroirs. Campagne de 2010, aux stades début maturité I et début de maturité II.

A Lussac, nous avons constaté la tendance inverse, c'est dans la parcelle en mode de conduite conventionnel que les niveaux de population sont plus élevés, la parcelle en mode de conduite biologique présentant les niveaux en cuivre plus élevés.

De la même façon, nous avons réalisé une analyse de corrélation entre l'indice de Shannon calculé à partir des profils métaboliques Biolog® (Lussac, 2010, mode biologique et conventionnel, stades début et mi-véraison, début maturité) et les teneurs en cuivre des eaux de lavage des baies (test de Spearman). L'analyse montre une corrélation négative très significative ( $p\text{-value} < 0,0001$  ;  $\rho = 0,90$ ) entre l'indice de diversité et les niveaux de cuivre.

Enfin, nos résultats mettent également en évidence l'impact du cuivre sur la structure de la population bactérienne, en termes de diversité (*nombre d'OTUs et l'abondance relative de chacun*) et de richesse (*nombre d'OTU's*). L'analyse de corrélation entre l'indice de Shannon calculé avec les profils T-RFLP (Lussac, 2009, mode biologique et conventionnel) et les teneurs en cuivre des eaux de lavage, est significative et montre une corrélation négative entre les deux paramètres ( $p\text{-value} < 0,031$  ;  $\rho = 0,51$ ). Cette corrélation est également significative pour l'indice de richesse ( $p\text{-value} < 0,012$  ;  $\rho = 0,58$ ).

## **2.5 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de différents fongicides cupriques**

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée pour plusieurs formulations de cuivre retrouvées dans les programmes de traitement phytosanitaires des parcelles étudiées et où les souches testées ont été isolées.

Il s'agit du ( $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ou du sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ), constituant de la bouillie bordelaise, de l'oxyde de cuivre ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), matière active entrant dans la composition du produit Nordox 74 WG (Nordox, AS - Oslo, Norvège), l'hydroxyde de cuivre ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) matière active entrant dans la composition du produit Champ™Flo (Nufarm, Auckland, Nouvelle Zélande).

92 isolats issus de la campagne de prélèvement 2009 à Lussac ont été utilisés pour cette étude. Les résultats concernant la détermination de la CMI montre que les différentes formulations de cuivre ont un effet inhibiteur variable (**Figure 74**).

Le sulfate de cuivre, pur ou sous forme de bouillie bordelaise, présente l'effet inhibiteur le plus important. Une CMI de 1 mg/mL pour 21 % des isolats, 2 mg/mL pour 71% et 4 mg/ml pour 8 % des isolats testés est obtenue pour le sulfate de cuivre comme substance active (sans excipient). Seul un isolat présente une CMI de 8 mg/ml. En ce qui concerne la bouillie bordelaise, 96 % des isolats possèdent des valeurs de CMI entre 4 et 8 mg/L et un seul isolat dépasse la valeur de 16 mg/L. L'hydroxyde de cuivre présente les propriétés d'inhibition les plus importantes parmi les formulations testées, inhibant la croissance de 48 % des individus avec des concentrations égales ou inférieures à 16 mg/ml. En revanche, l'oxyde de cuivre présente les valeurs de CMI les plus élevées, avec 80 % de résistances à des concentrations supérieures à 32 mg/mL.

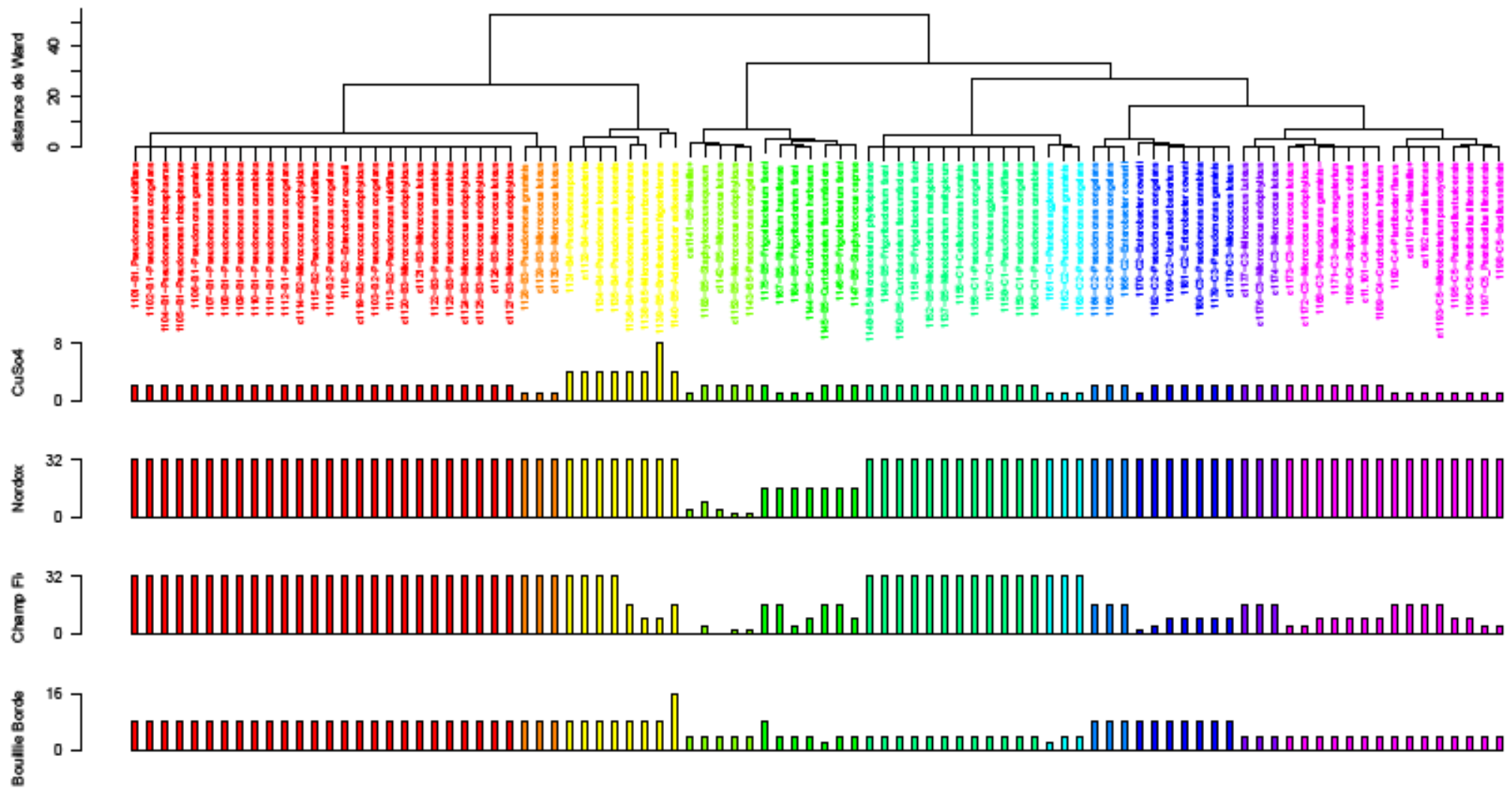
Ces résultats montrent que la concentration en cuivre d'un produit n'est pas reliée directement à son pouvoir bactéricide. La capacité inhibitrice du cuivre vis à vis du développement microbien dépend de son état ionique (Zevenhuizen et al. 1979). La forme

libre d'ions cuivreux ( $\text{Cu}^{2+}$ ) présente cette action inhibitrice vis à vis des micro-organismes. Ces ions électriquement chargés, attirent des particules de polarité opposée, telles que les bactéries, les mycètes, etc., et forment des liaisons électrostatiques avec les membranes cellulaires, modifiant ainsi leur perméabilité et affectant la nutrition des cellules. Ces ions peuvent également se combiner avec divers groupements chimiques de la cellule, induisant des dénaturations de protéines et inhibant des activités enzymatiques. Sachant que c'est le cuivre sous forme libre qui possède une activité vis à vis des micro-organismes, le pouvoir inhibiteur d'une formulation commerciale cuprique dépend alors de cette teneur en cuivre libre quelle peut fournir.

Parmi les isolats testés, les espèces *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cowani*, *Micrococcus endophyticus* et *Pseudomonas graminis* sont les plus résistantes aux différentes formulations de produits cupriques, les espèces *Pseudomonas congelans*, *Frigoribacterium faeni* et *Pseudomonas cannabina* étant les plus sensibles.

En analysant les valeurs des CMI de différents isolats selon leur provenance, nous n'avons pas été en mesure d'établir une corrélation entre sensibilité au cuivre de l'isolat et mode de conduite de la parcelle dont il est issu.





**Figure 74:** Classification ascendante hiérarchique des 92 isolats. Le dendrogramme a été établi à partir des CMI obtenues pour les 4 formulations de cuivre comme variables actives. Les histogrammes représentent la quantité (mg/L) de produits à base de cuivre pour laquelle la croissance est nulle. \* signifie que la CMI est supérieure à 32 mg/L.

## **2.6 Discussion**

Récemment, de nombreux travaux de recherche, portant sur l'étude de l'impact du mode de conduite sur la communauté levure de la baie de raisin (Cadez et al. 2010; Cordero Bueso et al. 2011) et du moût en fermentation (Tello et al. 2012) ont été réalisés. Ces travaux avaient comme objectifs, en particulier, de comparer le mode biologique par rapport à un mode de conduite conventionnel.

Ces travaux de recherche et ceux présentés dans ce chapitre s'inscrivent dans un contexte sociétale et environnemental d'exigence vis à vis de la réduction des intrants phytosanitaires. Actuellement, beaucoup de viticulteurs choisissent des itinéraires techniques alternatifs pour la conduite et la protection du vignoble. En Aquitaine, la viticulture biologique se développe à un rythme exponentiel (+ 30% ces cinq dernières années). Les conséquences de ces changements de pratiques, en matière de protection phytosanitaire, sur les caractéristiques microbiologiques de la baie de raisin doivent être évaluées.

Nous avons constaté un effet significatif du mode de conduite sur le niveau de population cultivable dans les différents milieux de culture. Les conséquences du mode de conduite sur les niveaux de population sont différentes selon la propriété considérée. Ainsi à Pomerol, les parcelles en mode de conduite biologique présentent des niveaux de populations supérieurs à ceux obtenus pour les parcelles en mode de conduite conventionnel. Le résultat inverse est obtenu pour la parcelle de Lussac.

L'étude de la diversité métabolique des communautés bactériennes présentes dans les échantillons d'eau de lavage de baies montre que, lorsque des différences significatives sont mises en évidence, les indicateurs indice de Shannon et AWCD sont plus favorables au mode de conduite biologique par rapport au mode conventionnel. L'analyse des profils par classification hiérarchique ascendante tend à regrouper les profils selon le mode de conduite.

L'analyse de la communauté bactérienne et levure par les méthodes d'empreinte moléculaire (cultivable par DGGE et à partir de l'ADN directement extrait d'eaux de lavage de baies par T-RFLP et par CE-SSCP) montre un effet du mode de conduite sur la structure de la population.

L'utilisation des produits phytosanitaires à base de cuivre est une pratique commune aux différentes parcelles que ce soit en mode de conduite biologique ou en mode de conduite conventionnel. Ainsi, les teneurs en cuivre des eaux de lavage des baies ont été déterminés. Pour un terroir donné, les résultats montrent que, pour certains prélèvements, la concentration en cuivre est supérieure dans les parcelles en mode de conduite biologique alors que pour d'autres prélèvements, les parcelles en mode de conduite conventionnel présentent des niveaux en cuivre plus élevés. Une corrélation négative entre niveaux de population LT et LB 1/10 et concentration en cuivre des eaux de lavage des baies est mise en évidence. Ces résultats permettent ainsi d'expliquer, en partie, les conclusions inverses concernant l'impact du mode de conduite sur les populations LT et LB 1/10 selon l'origine de la parcelle considérée. Ainsi, indépendamment du mode de conduite considéré, des niveaux élevés de résidus cupriques présent sur la baie de raisin peuvent avoir un impact négatif sur les niveaux de population levure et bactérie.

Afin de compléter notre étude, nous avons établi la Concentration Minimale Inhibitrice de différentes formulations de cuivre vis à vis de la croissance d'isolats collectés dans ce travail. Les données obtenues montrent que le sulfate de cuivre est la substance active la plus inhibitrice vis à vis des isolats testés de notre collection alors que l'oxyde de cuivre présentent les valeurs de CMI les plus élevées. Par ailleurs, au sein d'une même espèce, la sensibilité au cuivre est variable selon l'isolat considéré.

Les produits cupriques sont des fongicides très populaires en viticulture. Le cuivre présente une importance prépondérante pour la maîtrise d'un grand nombre de pathogènes par son spectre d'action très large, notamment en agriculture biologique. Outre son action principale contre le mildiou de la vigne, il reste un moyen curatif efficace contre la nécrose bactérienne. Par ailleurs, il ne présente pas de problème de résistance contrairement à d'autres fongicides.

Même si les doses d'utilisation sont de plus en plus réduites, le cuivre s'accumule dans les sols viticoles de façon irréversible, et présente un effet dépressif sur la vie biologique. Ainsi, l'impact du cuivre sur la communauté bactérienne des sols agricoles est bien documenté dans la littérature (Tom-Petersen et al. 2003; Ranjard et al. 2006). Certains auteurs ont montré que le cuivre diminue l'abondance et la diversité des populations de *Pseudomonas* de la rhizosphère (Ellis et al. 2003; Brandt et al. 2006; Brandt et al. 2006). En 2010, Verginer et al. suggèrent qu'une plus faible abondance microbienne dans des échantillons de grappes pourrait s'expliquer par le traitement au  $\text{CuSO}_4$  appliqué sur les vignes.

Nos travaux mettent en évidence, pour la première fois et à l'échelle de la parcelle, l'impact négatif des résidus cupriques de la baie de raisin sur la densité, l'activité et la structure de la communauté microbienne, en particulier dans sa fraction bactérienne. La diversité métabolique et de structure de cette communauté diminue avec l'augmentation du niveau de résidus cupriques de la baie de raisin. Ces résultats confirment que l'usage des produits phytosanitaires cupriques doit être raisonné, indépendamment du système de production ou du mode de conduite. Ils mettent également en évidence l'importance du choix de la formulation du cuivre, vis à vis de son impact sur la communauté bactérienne.

Dans un dispositif expérimental incluant différentes modalités de traitement (fréquence, nature des substances), il serait intéressant de pouvoir comparer l'impact du cuivre sur la communauté microbienne par rapport à différents produits de synthèse.

### **3. Synthèse générale de l'impact des facteurs abiotiques**

Nous avons mis en évidence, au cours de nos travaux, que la communauté microbienne présente sur la baie de raisin est soumise à l'influence des facteurs abiotiques étudiés. Outre l'analyse de l'impact de chaque facteur isolé, il est également important d'évaluer l'influence relative de chacun de ces facteurs pour mieux interpréter les changements observés.

Ainsi, nous avons analysé statistiquement nos données issues de l'analyse des niveaux de populations cultivable, de l'activité métabolique et de la structure de la population, et différents facteurs par un test de comparaisons multiples (MANOVA).

L'analyse sur la population cultivable sur milieux LT et LB 1/10 est réalisée en considérant comme variables indépendantes le terroir, le mode conduite, le stade phénologique et l'année de campagne /millésime.

Nous avons dans un premier temps réalisé l'analyse pour chaque campagne séparément. Les résultats obtenus montrent une influence significative des différents facteurs sur l'ensemble des populations (Tableaux 28 A). Le stade phénologique est le facteur avec la plus forte influence expliquant entre 30 et 60% de la variabilité observée. Le facteur terroir présente également un effet significatif sur les populations LT et LB 1/10 pour les deux campagnes. En ce qui concerne le mode conduite, l'analyse ne met pas en évidence un effet significatif sur les populations pendant la campagne de 2009. Néanmoins pour la campagne de 2010, son effet est statistiquement significatif.

En rassemblant les résultats de 2009 et 2010 (**Tableau 26 B**), on constate que le facteur stade présente à nouveau un effet très significatif dans l'explication de la variabilité, cependant le pourcentage relatif des écarts carrés est considérablement inférieur. Nous constatons également l'effet millésime sur la population LT.

Les niveaux de populations cultivables sur milieux LT et LB 1/10 constituent un jeu de données assez complet, contenant plus de 600 variables par campagne. En analysant sa distribution, nous constatons que les valeurs aux stades de maturité avancée sont celles qui présentent la variabilité la plus importante, contribuant ainsi de façon importante à l'effet du facteur stade. Nous avons donc réalisé la même analyse, cette fois-ci en excluant les

valeurs du stade de maturité avancée (**Tableaux 26 C**). Le pourcentage de la somme des écarts carrés pour l'effet stade baisse alors significativement. L'effet stade est toujours significatif pour les deux millésimes. En 2009, l'effet terroir sur les populations LT et LB 1/10 est important, l'effet mode de conduite n'est pas significatif. En 2010, les trois facteurs présentent un effet significatif, en particulier l'effet stade et mode de conduite sur les populations LT et l'effet stade et terroir sur les populations LB 1/10.

<b>A</b> Facteur	LT - (2009)			LB 1/10 - (2009)			LT - ( 2010)			LB 1/10 - ( 2010)		
	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P
Intercept		1.0	0.00		1.0	0.00		1.0	0.00		1.0	0.00
Terroir	8.9	2.0	0.00	11.0	2.0	0.00	1.9	2.0	0.00	19.5	2.0	0.00
Mode de Conduite	0.2	1.0	0.14	0.0	1.0	0.52	9.5	1.0	0.00	2.5	1.0	0.00
Stade Phénologique	63.9	4.0	0.00	64.2	4.0	0.00	41.4	5.0	0.00	32.2	5.0	0.00
Residuel	26.9	261.0		24.8	262.0		47.2	315.0		45.8	315.0	

<b>B</b> Facteur	LT-(2009 & 2010)			LB 1/10-(2009&2010)		
	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P
Intercept		1.0	0.00		1.0	0.00
millésime	12.2	1.0	0.00	0.1	1.0	0.39
Terroir	5.5	2.0	0.00	9.6	2.0	0.00
Mode de Conduite	3.6	1.0	0.00	0.4	1.0	0.17
Stade Phénologique	7.3	4.0	0.00	6.8	4.0	0.00
Residuel	71.4	422.0		83.1	423.0	

<b>C</b> Facteur	LT - (2009)			LB 1/10 - (2009)			LT - ( 2010)			LB 1/10 - ( 2010)		
	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P
Intercept		1.0	0.00		1.0	0.00		1.0	0.00		1.0	0.00
Terroir	15.5	2.0	0.00	22.8	2.0	0.00	2.6	2.0	0.01	17.7	2.0	0.00
Mode de Conduite	0.0	1.0	0.99	0.2	1.0	0.40	15.4	1.0	0.00	3.3	1.0	0.00
Stade Phénologique	16.0	3.0	0.00	11.1	3.0	0.00	18.0	4.0	0.00	16.3	4.0	0.00
Residuel	68.5	209.0		65.9	209.0		63.9	262.0		62.6	262.0	

**Tableau 26:** Analyse de variance par comparaisons multiples, sur les niveaux de populations LT et LB 1/10. **A** : analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique sur la population de 2009 et 2010 respectivement. **B** : analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime. **C** : analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique sur la population de 2009 et 2010 respectivement, en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. **D** : analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, P= Niveau de significativité.

Les populations cultivables sur les milieux BA et BL ont été analysées, considérant les mêmes facteurs (terroir, mode conduite, stade phénologique et campagne/millésime). Leur isolement sur milieu de culture a été seulement possible au stade de maturité et maturité avancée. Nous avons donc réalisé deux types d'analyse de variance : i) avec tous les facteurs étudié précédemment (**Tableau 27 A**), ii) en excluant le facteur stade phénologique (**Tableau 27 B**).

<b>A</b>	BA - ( 2009 & 2010)			BL- ( 2009 & 2010)		
	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P
Intercept		1.00	0.00		1.0	0.00
millésime	<b>7.27</b>	1.00	0.00	<b>9.1</b>	1.0	0.00
Terroir	<b>7.75</b>	2.00	0.00	<b>3.6</b>	2.0	0.00
Mode de Conduite	<b>2.07</b>	1.00	0.02	<b>0.4</b>	1.0	0.39
Stade Phénologique	<b>3.42</b>	1.00	0.00	<b>9.8</b>	4.0	0.00
Residuel	<b>79.5</b>	209.00		<b>77.1</b>	423.0	

<b>B</b>	BA - ( 2009 & 2010)			BL- ( 2009 & 2010)		
	% SE	DDL	P	% SE	DDL	P
Intercept		1.00	0.00		1.0	0.00
millésime	<b>11.70</b>	1.00	0.00	<b>14.1</b>	1.0	0.00
Terroir	<b>8.75</b>	2.00	0.00	<b>3.6</b>	2.0	0.00
Mode de Conduite	<b>1.07</b>	1.00	0.02	<b>0.3</b>	1.0	0.39
Residuel	<b>74.5</b>	333.00		<b>81.9</b>	231.1	

**Tableau 27:** Analyse de variance par comparaisons multiples sur les niveaux de populations cultivées sur les milieux BA et BL **A** : analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique et millésime. **B** : analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime sur les niveaux de population BA et BL en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, P= Niveau de significativité.

Les résultats des deux analyses montrent que les facteurs millésime et terroir ont un effet significatif sur les niveaux de population, cependant les valeurs de la variance résiduelle aléatoire sont très élevées, montrant ainsi que notre modèle n'explique pas la majorité de la variance observée (**Tableaux 28 A et B**).

<b>A</b>	H - Profils métabolique			<b>B</b>	H - Profils métabolique			
	Facteur	% SE	DDL		P	Facteur	% SE	DDL
Intercept			1.00	0.00	Intercept		1.00	0.00
Terroir	4.40	1.00	0.05	0.02	Terroir	9.55	1.00	0.02
Mode	4.37	1.00	0.05	0.94	Mode	0.01	1.00	0.94
Stade	29.55	5.00	0.00	0.24	Stade	9.72	4.00	0.24
Residuel	61.67	58.00			Residuel	80.72	47.00	

**Tableau 28:** Analyse de variance par comparaisons multiples sur les indices de diversité métabolique **A** : analyse des facteurs terroir, mode conduite et stade phénologique et millésime. **B** : analyse des facteurs terroir, mode conduite, stade phénologique et millésime sur les indices de diversité métabolique en excluant les individus correspondant aux stades de maturité avancée. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, P= Niveau de significativité.

Les données des indices de diversité métabolique ont été également soumises à l'analyse de variance, incluant les facteurs terroir, stade phénologique et mode de conduite. Cette étude a été menée seulement durant la campagne de 2010 donc l'effet millésime n'a pas pu être évalué. Les résultats montrent un effet significatif des trois facteurs, le stade phénologique étant celui qui présente la valeur la plus élevée du pourcentage de la somme des écarts carrés (**Tableau 28 A**). Pour les mêmes raisons précédemment expliquées, nous avons répété l'analyse en enlevant le stade de maturité avancée. Les résultats montrent que le stade phénologique est toujours le facteur important pour expliquer la variabilité ainsi que l'effet terroir (**Tableau 28 B**).

Facteur	H - ProfilsT-RFLP		
	% SE	DDL	P
Intercept		1.00	0.00
Mode	23.70	1.00	0.00
Stade	28.05	4.00	0.04
Residuel	48.24	21.00	

**Tableau 29:** Analyse de variance par comparaisons multiples des indices de diversité calculés à partir des profils T-RFLP. Analyse des facteurs mode conduite et stade phénologique. % SE = Pourcentage de la somme des écarts carrés ; DDL=Degrés de liberté, P= Niveau de significativité.



Finalement, l'influence des facteurs stade et mode de conduite sur la structure des populations bactériennes a été évaluée. Les valeurs des indices de diversité de Shannon calculés à partir des profils T-RFLP des échantillons de Lussac (campagne de 2009), ont été analysées. Les prélèvements n'avaient pas été réalisés à maturité avancée, ainsi ce stade phénologique ne figure pas dans l'analyse. Les résultats montrent que les deux facteurs expliquent plus de 50% de la variabilité. Le pourcentage de la somme des écarts carrés du facteur stade est supérieur à celui du facteur mode conduite (**Tableau 29**).

En conclusion, cette approche statistique révèle que le stade phénologique et le terroir sont des facteurs prépondérants pour expliquer la variabilité observée dans cette étude concernant les niveaux populations cultivables et l'activité métabolique. Le facteur mode de conduite présente également un impact significatif notamment sur la structure des populations bactériennes.

Ces données contribuent à mieux comprendre l'influence des facteurs liés aux changements spatio-temporels et aux activités anthropiques sur les populations microbiennes de la baie de raisin.

**CHAPITRE VI- Influence des facteurs biotiques sur la communauté microbienne – le cas de *Botrytis cinerea*.**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact du développement de *Botrytis* sur la communauté microbienne présente à la surface de la baie de raisin. Pour ce faire, des parcelles expérimentales traitées et non traitées vis à vis de *B. cinerea* ont été suivies sur le site INRA (campagnes de 2010 et 2011) et sur les parcelles d'un Château en Médoc (campagne 2011). Ces parcelles font partie d'un réseau et sont suivies en collaboration avec l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), ce qui permet d'intégrer, aux données microbiologiques, des éléments relatifs au climat et aux traitements phytosanitaires. L'absence de signes épidémiologiques de *B. cinerea* en 2009 sur le site de l'INRA n'a pas permis de mener cette étude durant cette campagne.

En 2011, la communauté microbienne dans les échantillons de moûts et de vins issus des mêmes parcelles a également été étudiée.

Les produits phytosanitaires anti-*Botrytis* appliqués sur la parcelle traitée sont le « Teldor<sup>®</sup> 500 » (Bayer CropScience) ayant comme substance active le fenhexamide et le « Switch<sup>®</sup> » (Syngenta) ayant comme substances actives le cyprodinil et le fludioxonil.

Les échantillons prélevés proviennent de grappes présentant différents pourcentages de baies atteintes par *B. cinerea*. Cependant, nous n'avons analysé que des baies visuellement saines provenant de grappes atteintes par *B. cinerea*. Ces baies saines sont, d'un point de vue appliqué, celles qui sont triées puis sélectionnées par les praticiens pour la vinification. Par ailleurs, des tests préliminaires ont montré que l'isolement et le dénombrement des colonies est quasi impossible à partir de baies pourries car le champignon colonise la totalité de la surface des milieux de culture, malgré la présence d'antibiotique antifongique, limitant ainsi drastiquement la croissance des autres micro-organismes.

## **1. Résultats concernant la campagne 2010**

### **1.1 Analyse de la population microbienne cultivable. Campagne 2010, parcelles INRA**

Dans les parcelles INRA, le développement de *B. cinerea* n'a commencé qu'à partir du stade maturité. Nous présentons donc les résultats concernant trois stades de prélèvements : i)

maturité, ii) maturité avancée (10 jours après maturité), iii) sur-maturité (20 jours après maturité). A chaque stade, 4 types d'échantillons sont prélevés. Sur la parcelle INRA traité (I\_Tr), des raisins visuellement sains sont prélevés ; le développement du pathogène sur cette parcelle est très faible. Dans la zone non traité, trois types d'échantillons sont prélevés: i) des raisins visuellement sains provenant de grappes dont la sévérité\*<sup>1</sup> est de 0, 10 et 15 % selon le stade de maturité (modalité I\_Nt ) ; ii) des raisin visuellement sains, provenant de grappes dont le pourcentage de *B. cinerea* est identique à I\_Nt mais proches du foyer d'infection du pathogène (modalité I\_Ntpbp) ; des raisins visuellement sains provenant de grappes dont le pourcentage de *B. cinerea* est de 7 à 40 % (modalité I\_BP) (**Tableau 30**).

Modalité de parcelle	Echantillon	Sévérité *1		
		5 jours	10 jours	20 jours
Traité	I_Tr	0%	5%	10%
Non traité	I_Nt	0%	10%	15%
	I_Ntpbp	0%	10%	15%
	I_BP	7%	15%	40%

**Tableau 30:** Pourcentage de baies pourries dans les échantillons prélevés 5, 10 et 20 jours après l'apparition des premiers symptômes de pourritures sur grappe ; parcelles de l'INRA.

Les résultats de dénombrements sur milieu LT sont présentés (**Figure 75 A**). Au premier stade de prélèvement, les niveaux de population sont équivalents pour les quatre modalités. Au deuxième stade de prélèvement, nous constatons une augmentation importante de la population pour la parcelle traitée (différences significatives, ANOVA, un facteur « traitement »,  $p=0,021$ ). Au dernier stade de prélèvement, la population LT chute. Les niveaux de population sur milieu LT diminuent avec l'augmentation du pourcentage de baies atteintes par *B. cinerea* ( $p=0,034$ ).

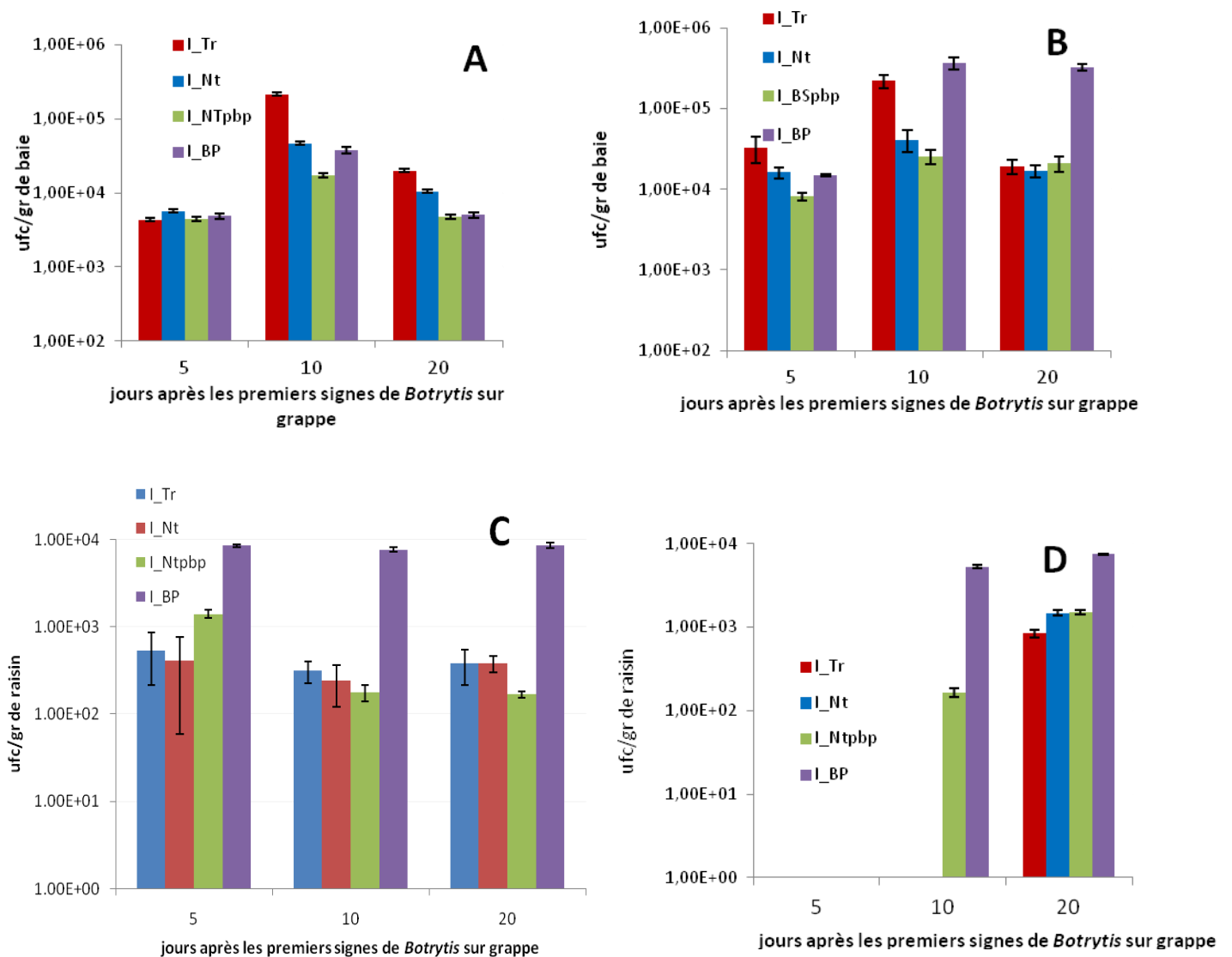
Les populations dénombrées sur milieu LB 1/10 augmentent du stade de maturité au stade de maturité avancée puis chutent jusqu'au stade de sur-maturité (**Figure 75 B**). A maturité, les

différences de niveau de populations, quelque soit le pourcentage de baies atteintes ne sont pas significatives ( $p= 0,091$ ). Aux stades maturité avancée et sur-maturité, les populations sont plus élevées dans l'échantillon présentant un pourcentage de baies atteintes par *B. cinerea* plus élevé ( $p= 0, 002$ ).

---

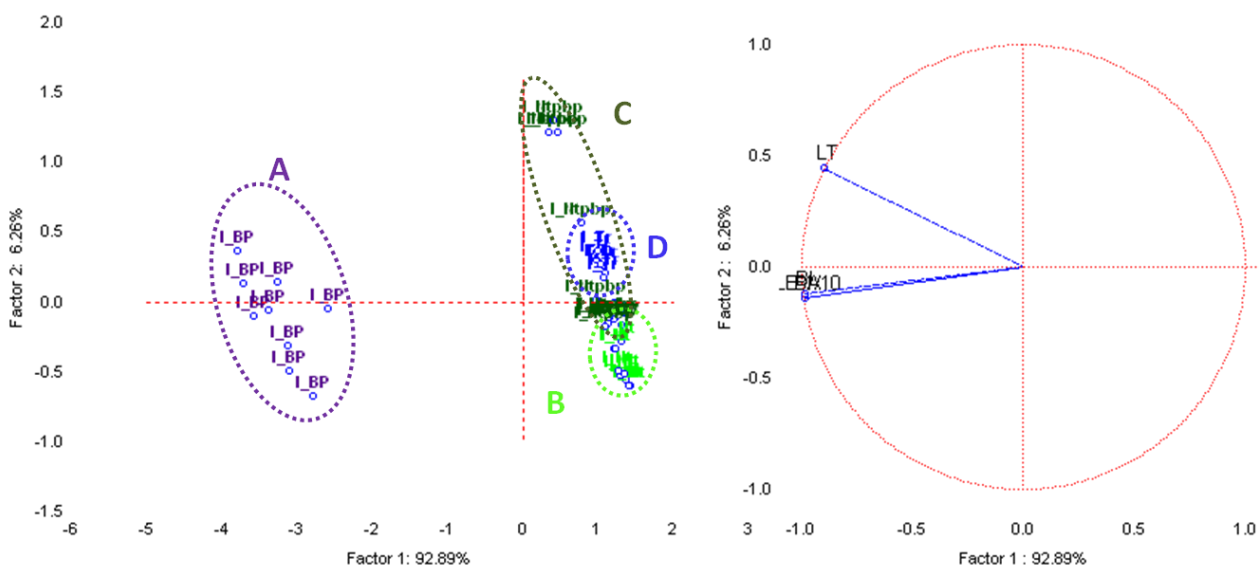
\*<sup>1</sup>Sévérité = pourcentage des baies atteintes par grappe

En ce qui concerne la population cultivable sur milieu BA et BL, nous observons que les niveaux de populations sont significativement plus élevés sur les baies avec des niveaux de *B. cinerea* plus élevés ( $p= 0,022$ ) (Figure 75 C et D).



**Figure 75:** Niveaux de populations dénombrées sur milieu LT (A), LB 1/10 (B), BA (C) et BL (D). Parcelles INRA. . Baies provenant de la parcelle traitée I\_Tr, Baies provenant de la parcelle non traitée I\_Nt, Baies proches des baies pourries provenant de la parcelle traitée I\_NTpbp, Baies provenant de la parcelle non traitée présentant le niveau de sévérité le plus important I\_BP. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements minimum par échantillon.

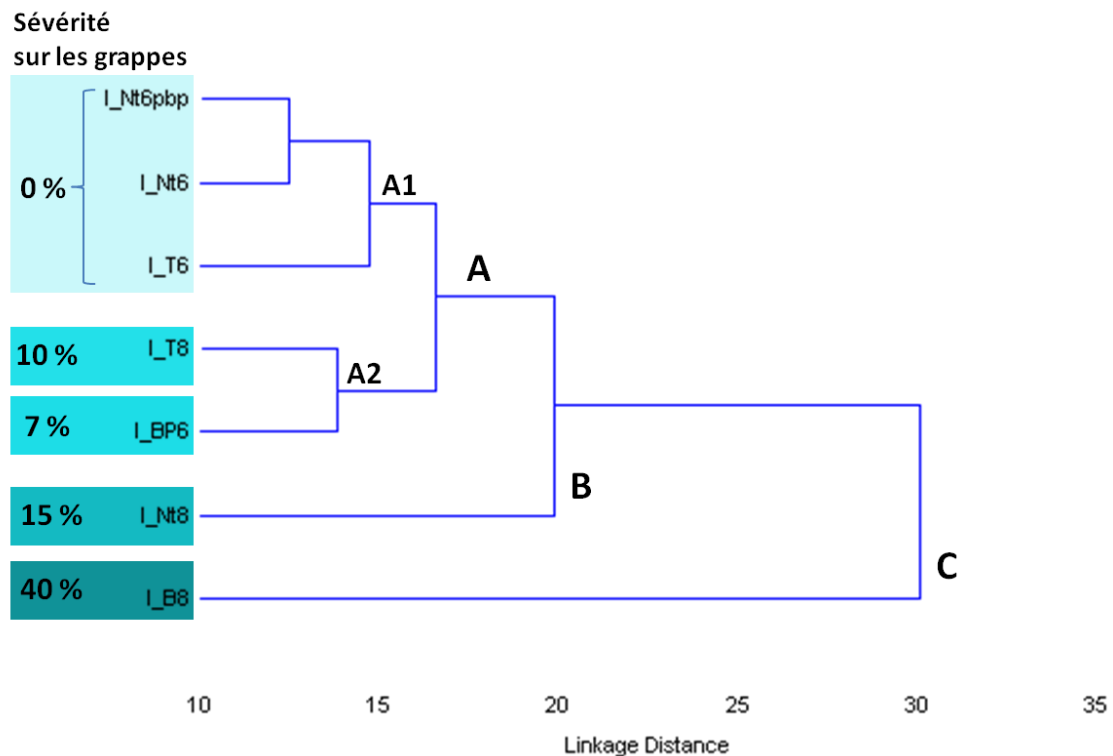
L'analyse en composante principale, présentée dans la **Figure 76**, montre la distribution des échantillons par rapport aux quatre populations cultivables pour le stade sur-maturité. L'analyse met en évidence les regroupements des échantillons en fonction du niveau de sévérité : A parcelle non traitée avec 40 % de sévérité ; B : parcelle non traitée avec 15 % de sévérité, C : parcelle non traitée avec 15% de sévérité (baies proches de baies pourris). Nous constatons que les prélèvements I\_BP forment un groupe fortement corrélé avec les variables LB1/10, BA et BL (groupe A). Par ailleurs, les prélèvements I\_Nt (B) et la majorité des échantillons I\_Ntpbp (C) sont regroupés ensemble. La proximité des baies saines avec le foyer d'infection du pathogène n'a pas d'incidence sur leurs niveaux de populations, dans nos conditions expérimentales.



**Figure 76 :** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10, BA et BL pour les prélèvements au stade surmaturité. Campagne de 2010. Projection des variables sur les axes 1 et 2.

## 1.2 Comparaison de la structure des populations bactériennes des baies saines provenant de grappes atteintes par *Botrytis cinerea*

L'impact du développement de *B. cinerea* sur la structure des populations bactériennes a été évalué à partir des profils T-RFLP ADN 16S des eaux de lavage de baies. Les triplicatas ont été rassemblés afin d'obtenir des quantités suffisantes d'ADN. Les profils des échantillons provenant de grappes avec différents pourcentages de baies pourries, aux stades de maturité et sur-maturité, sont comparés. Le résultat de la CAH (**Figure 77**), montre un groupe (A) qui regroupe les échantillons provenant de grappes ayant des niveaux de sévérité faibles. Ce groupe est lui-même subdivisé en deux sous-groupes : un premier groupe rassemblant les échantillons sans *B. cinerea* (A1) et le deuxième groupe rassemblant les échantillons ayant un pourcentage de *B. cinerea* de 7 et 10 % (A2). Cette analyse montre également que les échantillons avec le niveau d'infection le plus élevé (D) présentent un profil différent des autres.

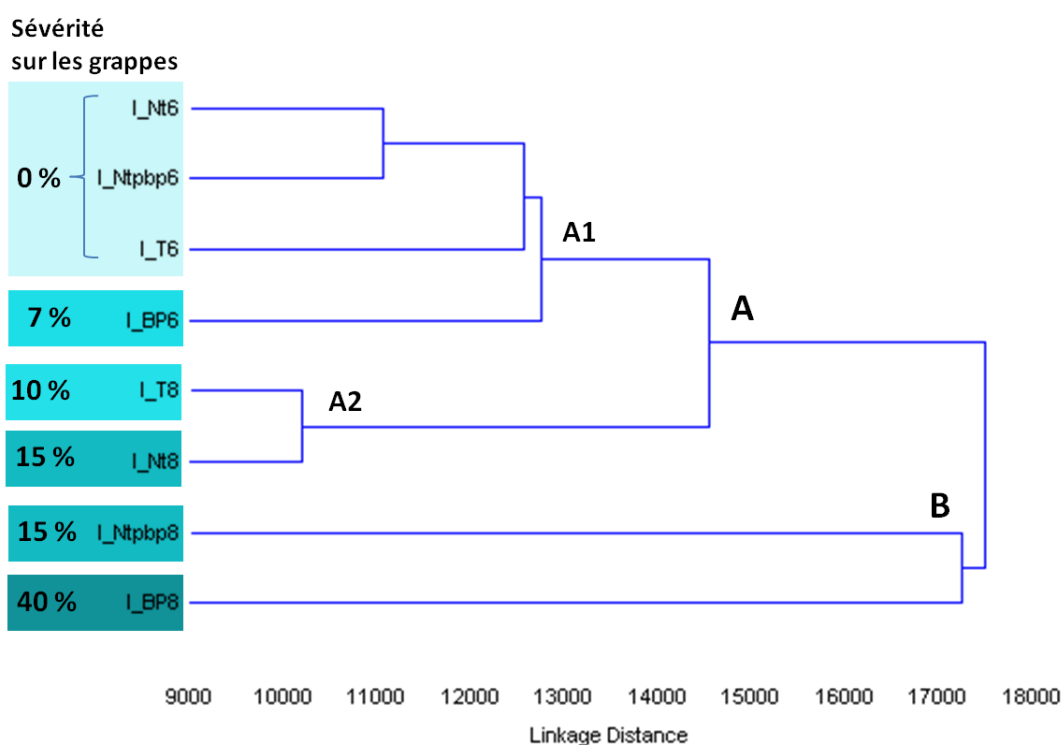


**Figure 77:** Classification ascendante hiérarchique des profils T-RFLP obtenus à partir de l'amplification de l'ADNr 16s (restriction enzymatique par *Hinf*I). Échantillons provenant des parcelles INRA, stades de maturité et sur-maturité. Campagne de 2010.



### 1.3 Comparaison de la structure des populations fongiques des baies saines provenant de grappes atteintes par *Botrytis*

La structure de la population fongique des baies issues des grappes plus ou moins infectées par *B. cinerea* a été analysée. Une comparaison par CAH a été réalisée à partir des profils obtenus par CE-SSCP. Le dendrogramme obtenu est similaire à celui présenté figure 78 pour la communauté bactérienne : les échantillons provenant de grappes avec un pourcentage faible de baies atteintes par *B. cinerea* sont rassemblés dans un même sous-groupe (A1), au sein duquel on remarque une branche qui regroupe les échantillons provenant de grappes non atteintes par *B. cinerea* (Figure 78).



**Figure 78 :** Classification ascendante hiérarchique des profils CE-SSCP. Échantillons provenant des parcelles INRA aux stades de maturité et sur-maturité. Campagne de 2010.

## 2. Résultats concernant la campagne 2011 – Parcelles INRA et Médoc

A partir des résultats obtenus pour la campagne 2010, nous avons décidé de poursuivre l'étude de l'influence de *Botrytis cinerea* sur la communauté microbienne, mais cette fois ci

en adaptant le dispositif expérimental. Les prélèvements sur le site INRA ont été réalisés aux stades de début maturité, maturité et maturité avancée. Étant donné que dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas constaté une influence de la proximité du foyer sur la population microbienne en 2010, la modalité « *baies proches des baies pourries* » (I\_Ntpbp) n'a pas été renouvelée. Deux modalités ont été étudiées : parcelle traitée (I\_Tr) et non traitée (I\_Ntr). Dans la zone traitée, le pourcentage moyen de baies atteintes par grappe est de 0 % en début de maturité, 0% à maturité et 5 % au stade de maturité avancé. Dans la zone non traitée le pourcentage est de 3, 5 et 15 % respectivement.

Dans les parcelles du Médoc, les prélèvements ont été réalisés au stade de maturité et deux modalités ont été étudiées : parcelle traitée (Leo\_Tr) et non traitée (Leo\_Ntr). La sévérité est de 7 % dans la parcelle traitée et 15 % dans la parcelle non traitée.

Au stade de maturité, pour les deux zones géographiques étudiées, les raisins provenant des différentes parcelles ont été pressés et l'analyse de la population microbienne a été réalisée sur les moûts et les vins correspondants.

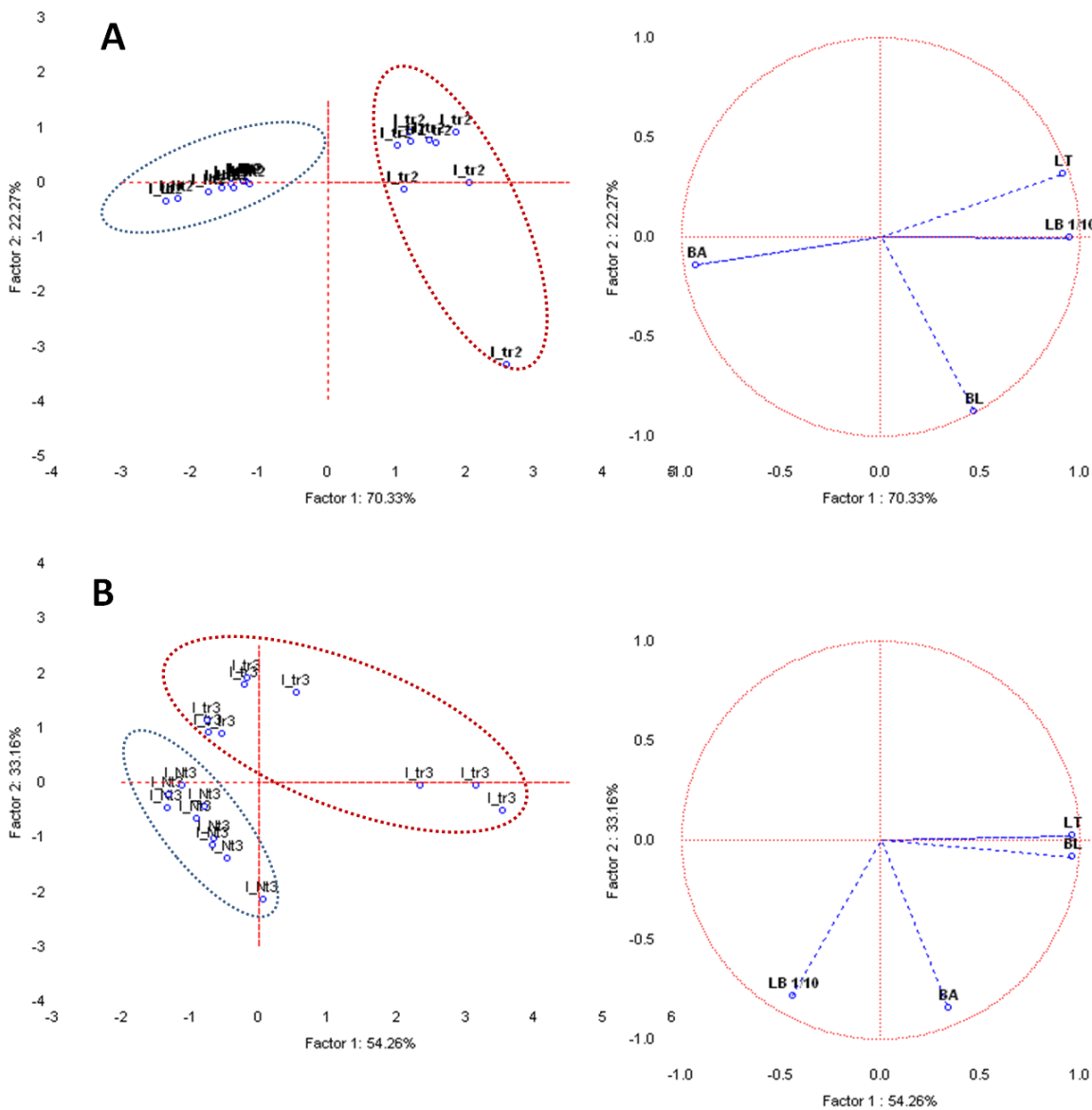
## **2.1 Analyse de la population microbienne cultivables – Campagne de 2011**

### **2.1.1 Parcelles de l'INRA**

Au stade de début maturité, nous n'avons pas détecté de populations cultivables sur les milieux BA et BL. Sur les milieux LT et LB 1/10, aucune différence significative entre les échantillons issus des parcelles traitées et non traitées sont constatées concernant les niveaux de populations. En revanche, aux stades de maturité et maturité avancée, des différences significatives sont observées entre modalités (ANOVA, un facteur « traitement »).

En effet, les échantillons de la parcelle non traitée présentent des niveaux des populations plus élevés sur milieux LB 1/10 au stade de maturité avancée ( $p= 0,031$ ) et sur milieux BA au stade de maturité ( $p= 0,007$ ) et maturité avancée ( $p= 0,0021$ ). Les échantillons de la parcelle traitée, au stade de maturité, présentent des niveaux de population LT supérieurs ( $p= 0,026$ ). En ce qui concerne la population BL, aucune différence statistiquement significative

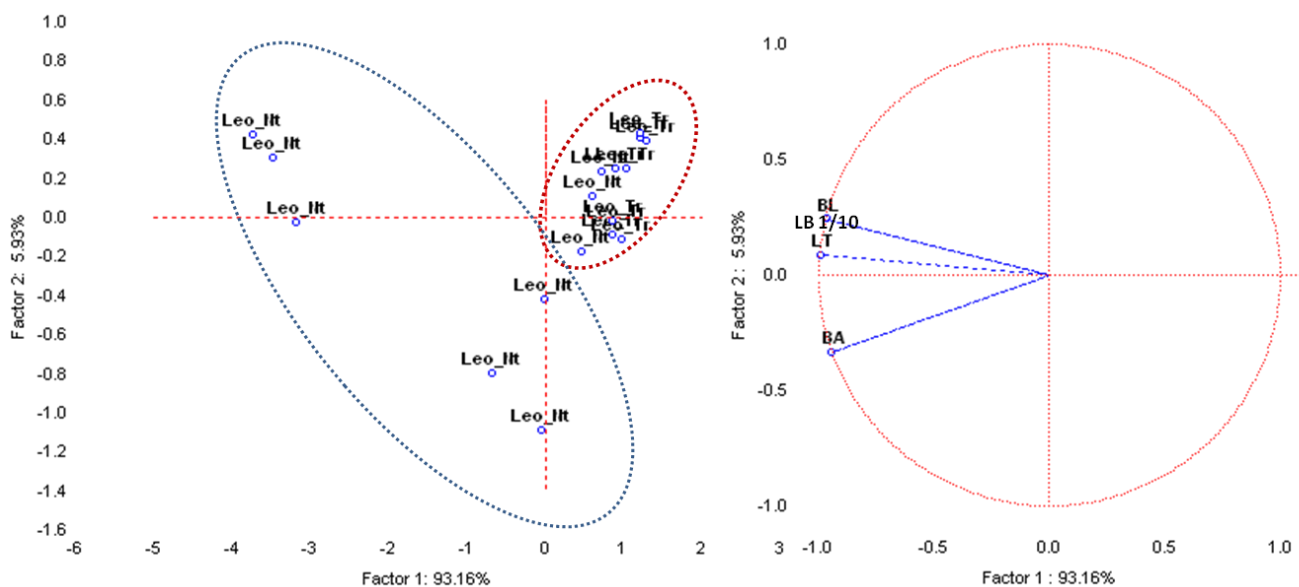
n'est constatée entre modalités. A maturité, l'axe 1 discrimine les échantillons des deux modalités, les échantillons issus de la parcelle traitée sont corrélés aux variables LT et LB 1/10, alors que les échantillons de la parcelle non traitée sont corrélés avec la variable BA (Figure 80 A). A maturité avancée, les deux axes discriminent les échantillons (axe 1, LT et BL et axe 2, BA et LB 1/10), les échantillons issus de la parcelle non traitée étant corrélés avec les variables LB et BA (Figure 79 B).



**Figure 79:** Analyse en composantes principales des populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10, BA et BL sur les prélèvements à surmaturité **A** et maturité avancée **B**. les cercles bleus représentent la modalité non traitée (I\_Nt) et les cercles rouges la modalité traitée. (I\_tr) Parcelles INRA. Campagne de 2011.

### 2.1.2 Parcelles du Médoc

L'ACP portant sur les valeurs de la population cultivable sur les différents milieux, montre que les échantillons de la modalité non traité (Leo\_Ntr) sont corrélés avec les variables de populations LT, LB 1/10, BA et BL (**Figure 80**). L'analyse de variance (un facteur traitement) montre que ces différences sont statistiquement significatives pour les populations cultivables : LT ( $p=0,046$ ), LB 1/10 ( $p=0,006$ ), BA ( $p=0,0012$ ) et BL ( $p=0,0023$ ).



**Figure 80:** Analyse en composantes principales de populations cultivables sur milieu LT, LB 1/10, BA et BL pour les prélèvements à maturité, les cercles bleus représentent la modalité non traitée (Leo\_Nt) et les cercles rouges représentent la modalité traitée (Leo\_tr). Parcelles du médoc. Campagne de 2011.

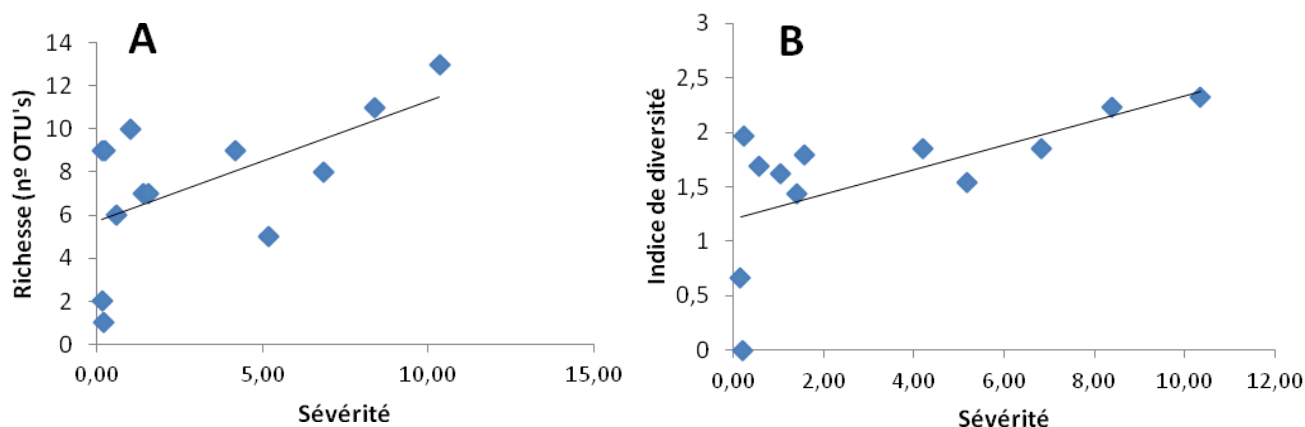
Les différences entre les modalités traitées et non traitées sont similaires pour les deux sites en ce qui concerne les populations cultivables sur les milieux LB 1/10, BA et BL. Les parcelles non traitées (ayant une sévérité plus importante) présentent des niveaux de populations supérieures. En revanche, en ce que concerne la population cultivable sur milieu LT, nous constatons des comportements distincts entre les deux sites.

Sur les parcelles INRA, la population LT est plus élevée pour les échantillons issus de la parcelle traitée, alors que l'observation inverse est réalisée pour les échantillons du Médoc, pour lesquels les populations LT sont plus élevées pour la parcelle non traitée.

## 2.2 Impact de *Botrytis cinerea* sur la structure de la communauté bactérienne

L'impact du développement de *B. cinerea* sur la structure des populations bactériennes a été évalué à partir d'analyse de profils T-RFLP ADN 16S des eaux de lavage de baies. La quantité d'ADN obtenu nous a permis de maintenir les triplicatas séparés, contrairement à la campagne de 2010. Nous avons comparé les profils des échantillons provenant de grappes avec différents pourcentages de baies pourries, aux stades de début maturité, maturité et sur-maturité provenant des parcelles du site INRA et du Médoc.

La richesse en OTU's et l'indice de diversité ont été calculé à partir des profils T-RFLP, ces données ont été comparées avec les valeurs de sévérité (**Tableau 31**, Marc Fermaud, UMR SAVE, communication personnelle). Les résultats montrent une corrélation positive significative (test de Spearman) entre sévérité et indice de richesse ( $p = 0,024$ ,  $\rho = 0,60$ ) et entre sévérité et indices de diversité de Shannon ( $p = 0,019$ ,  $\rho = 0,61$ ) (**Figure 81**).



**Figure 81:** Corrélation entre les variables *Sévérité* et *Richesse* en OTU's (A) *Sévérité* et *Indices de diversité de Shannon* (B). Parcelles INRA. Campagne 2011.

Cette corrélation n'est pas mise en évidence pour le site du Médoc. La propagation des spores de *Botrytis*, favorisée par une vendange tardive et le manque d'efficacité des traitements, peut expliquer la faible différence entre la parcelle traitée et non traitée

concernant l'indice de sévérité, et l'absence de corrélation pour ce site d'étude. Ces résultats mettent en évidence un effet de *B. cinerea* sur la structure de la population bactérienne, qui va dans le sens de l'augmentation des indices de richesse et de diversité.

Origine	Traitement	Stade phénologique	% Sévérité
INRA	Traité	début maturité	0,14
		maturité	0,32
		maturité avancée	1,33
	Non traité	début maturité	2,89
		maturité	12,01
		maturité avancée	5,4

**Tableau 31:** Indices de sévérité de *Botrytis cinerea* sur les parcelles (données Marc Fermaud, 2012, communication personnelle). Les valeurs représentent la moyenne de 3 prélèvements.

### 2.3 Le cas particulier des bactéries acétiques – conséquences œnologiques

Nos résultats précédents mettent en évidence un effet de la proximité de baies botrytisées sur les niveaux de population des baies saines, en particulier sur les niveaux de bactéries acétiques. Enfin d'évaluer les conséquences œnologiques de cette modification, nous avons étudié les populations microbiennes des moûts et des vins issus des raisins provenant des mêmes parcelles d'étude (*ayant des indices de sévérité variable*).

Les baies, prélevées au stade de maturité, sont pressées dans des conditions de stérilité au laboratoire et des micro-vinifications sont réalisées dans un volume de 250 mL. En respectant les conditions œnologiques, de dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) est ajouté à une concentration 50 mg /L. Deux modalités de fermentations sont réalisées : *ensemencée* avec la souche commerciale Zymaflore FX 10 ® (Laffort, France) et *non ensemencée*. Des prélèvements sont réalisés sur moût et en fin fermentation afin de réaliser les dénombrements LT, LB 1/10, BA et BL.

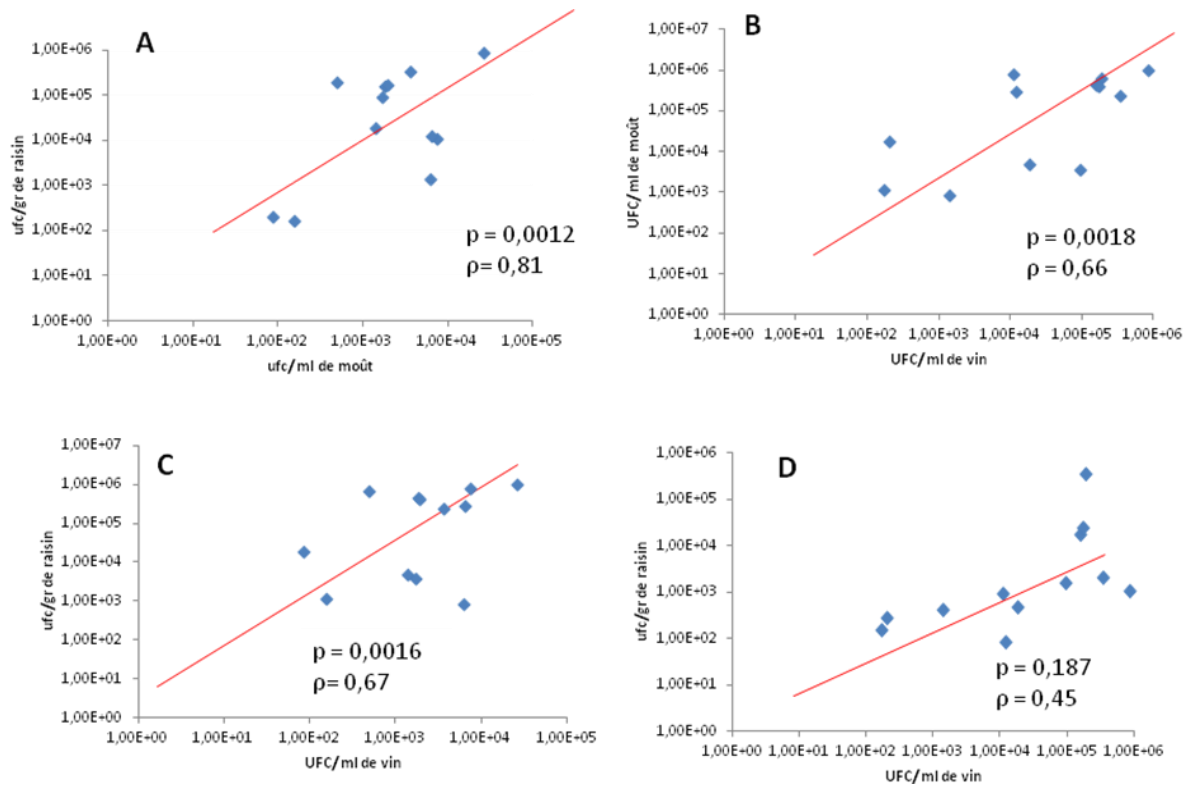
Nous ne présentons ici que les résultats concernant les populations de bactéries acétiques, microorganismes d'altération du vin. Les résultats montrent une relation entre les niveaux

de populations sur la baie de raisin et les niveaux de populations dans le moût et dans le vin (**Figure 82**).

Les niveaux de populations déterminés sur les baies sont corrélés positivement avec ceux du moût (Test de Spearman ;  $p = 0,012$ ,  $\rho = 0,81$ ) (**Figure 82 A**). De même, les niveaux de populations dans le moût sont également corrélés positivement avec ceux du vin (Test de Spearman ;  $p = 0,018$ ,  $\rho = 0,66$ ) (**Figure 82 B**).

En comparant les niveaux de populations sur les baies et ceux retrouvés dans les vins *ensemencés* et dans les vins *non ensemencés*, nous constatons des différences selon la modalité. La population retrouvée dans les vins de la modalité *non ensemencée* est fortement corrélée avec la population dans les baies (Test de Spearman ;  $p = 0,016$ ,  $\rho = 0,67$ ), en revanche pour la modalité *ensemencée*, cette corrélation n'est pas significative (Test de Spearman ;  $p = 0,187$ ,  $\rho = 0,45$ ) (**Figure 82 C et D**). Les concentrations en acide acétique\* et acétate d'éthyle\* présent dans les vins de ces deux modalités ont été déterminées. Les résultats montrent des valeurs beaucoup plus élevées dans la modalité *non ensemencée* (**acide acétique** =  $1,72 \pm 0,4$  g/L ; **acétate d'éthyle** =  $196 \pm 41$  g/L) par rapport à la modalité *ensemencée* (**acide acétique** =  $0,3 \pm 0,11$  g/L ; **acétate d'éthyle** =  $32 \pm 0,24$  g/L).

\*Composés responsables de l'acescence dans le vin aussi appelée piqûre acétique. Seuil de perception acide acétique :  $0,72$  g/L ; seuil de perception acétate d'éthyle :  $120$  mg/L



**Figure 82:** Corrélations entre les niveaux de bactéries acétiques évalués sur les baies et dans le moût (A), dans le moût et dans le vin (B), sur les baies et dans le vin de la modalité *non ensemencée* (D) et sur les baies et dans le vin de la modalité *ensemencée* (D). Parcelles de l'INRA et du Médoc, modalités traitée en non traitée. Campagne 2011.

#### 4. Discussion

Dans le vignoble et sur les diverses plantes hôtes, *Botrytis cinerea* est considéré comme l'agent responsable de la pourriture grise. Ce type de pourriture chez la vigne conduit à des pertes importantes de rendement de la récolte. La présence de *B. cinerea* dans les raisins est souvent associée à des autres micro-organismes d'altérations tels que les levures *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata* spp., les bactéries *Acetobacter* spp. et *Gluconobacter* spp., et des champignons producteurs de mycotoxines comme *Aspergillus carbonarius* (Blancard et al. 2000; Barbe et al. 2001; Dimakopoulou et al. 2008; Meunier et Steel 2009; Nisiotou 2007 et 2011). Les résultats publiés par ces travaux portent essentiellement sur l'étude comparative de l'impact de *Botrytis* sur la communauté levures et bactéries des grappes saines et des



grappes altérées. Notre étude se situe au niveau de la baie de raisin, avec comme objectifs d'évaluer l'impact de la proximité de baies botrytisées sur la communauté microbienne des baies saines, sélectionnées pour la vinification. Les échantillons de baies proviennent des parcelles témoin traitées vis à vis de *Botrytis* et non traitées avec présence de *Botrytis cinerea* selon différents niveaux de contamination ; mais dans les deux cas, seules les baies visuellement saines sont retenues pour l'analyse.

En ce qui concerne la population cultivable, nous avons constaté durant deux années consécutives, que la présence de *B. cinerea* favorise l'augmentation des populations bactériennes, plus précisément celles cultivées sur les milieux LB 1/ 10, BA et BL. En ce qui concerne la population fongique cultivable sur milieu LT, les niveaux observés sont plus élevés pour les échantillons provenant des parcelles traitées de l'INRA. La présence de *B. cinerea* joue un rôle défavorable sur les niveaux de populations LT des baies saines. Dans un contexte de faible niveau de contamination par le pathogène (environ 10% de baies atteintes par grappe), des spores présentes sur les baies altérées peuvent se propager via le vent et les insectes sur les baies saines. Selon les conditions climatiques, ces spores peuvent former des tubes germinatifs, capables de coloniser la surface de la baie de raisin. Des mécanismes de compétition vis à vis des substrats, d'une part et la production de substances d'inhibitrices vis à vis des levures de type hétéropolysaccharides riches en rhamnose et en mannose (Donèche 1993), connues sous le nom de " *botryticine*" (Lafon-Lafourcade 1955) d'autre part, peuvent expliquer ce rôle défavorable sur les niveaux de populations levures. Dans les parcelles du Médoc, dans un contexte de plus forte sévérité de l'épidémie (> 15%), la présence de *Botrytis cinerea* montre un effet positif sur les niveaux de population cultivable LT. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Nisiotou & Nychas 2007, qui suggère que l'augmentation des populations dans les baies infectées par *Botrytis*, peut être liée à une exposition des substrats comme les sucres, plus disponibles pour la communauté microbienne. Dans nos conditions expérimentales, il est probable que les baies atteintes par *Botrytis* en proportion importante vont jouer le rôle d'inoculum des baies saines vis à vis des spores de *Botrytis*, mais également vis à vis des levures et des bactéries via la propagation par le vent et les insectes, ce dernier effet ayant un impact supérieur par rapport à celui lié à la colonisation par les spores.

L'impact du développement de *B. cinerea* sur la structure des populations microbiennes des baies saines a été également étudié. En ce qui concerne la campagne de 2010, l'analyse des profils obtenus par empreintes moléculaires montre que les échantillons provenant de grappes ayant une sévérité plus élevée tendent à se séparer de ceux pour lesquels la sévérité est inférieure. Pendant la campagne de 2011, disposant de triplicatas, nous avons évalué l'effet de *B. cinerea* sur les indicateurs de richesse et diversité de la population bactérienne. Les résultats montrent que la sévérité est significativement corrélée positivement avec la richesse en OTU's et avec l'indice de diversité de Shannon. Ainsi la présence du champignon modifie la communauté bactérienne des baies de raisin sans symptômes visuels : le nombre d'espèce augmente ainsi que leur diversité. La baie de raisin contaminée par *Botrytis* héberge des populations importantes de bactéries, en particulier de bactéries acétiques et lactiques. Comme évoqué précédemment, ces baies atteintes par *Botrytis* vont jouer le rôle d'inoculum des baies saines vis à vis des spores de *Botrytis*, mais également vis à vis de nouvelles espèces bactériennes via la propagation par le vent et les insectes. L'analyse comparative fine des espèces présentes sur baies saines avec différents niveaux de contamination par *Botrytis*, par des méthodes d'isolement ou plus globalement, par une approche de métagénomique monogénique, doit nous permettre de mieux appréhender les changements qui s'opèrent au sein de cette communauté bactérienne.

Notre étude amène également des résultats d'intérêt du point de vue de la pratique œnologique. La proximité des baies saines avec les baies atteintes pour une même grappe ne semble pas modifier leur communauté microbienne en terme de niveau de population, par rapport aux baies distantes du foyer d'infection.

Ainsi la pratique du tri des baies qui consiste à éliminer une partie de la grappe infectée (au lieu de rejeter la totalité de la grappe) lors de la réception de la vendange au chai, devrait être sans conséquences sur les populations microbiennes du moût.

Notre étude montre également, en conditions de laboratoires, que les niveaux de populations de bactéries cultivables sur milieu BA sont fortement corrélés avec les niveaux de populations retrouvés dans le moût, puis dans le vin. En fin de fermentation, l'ensemencement des moûts avec des levains commerciaux permet de limiter les

populations de bactéries acétiques par rapport aux mêmes moûts *nonensemencés* et, par conséquent, les concentrations en acide acétique et en acétate d'éthyle dans les vins. Ce résultat peut guider le praticien dans ses choix techniques afin de maîtriser les fermentations des vendanges à risque.

**CHAPITRE VII – La communauté microbienne de la baie de raisin et l'écosystème viticole - l'hypothèse d'un *continuum* sol, écorces, feuilles et baies**

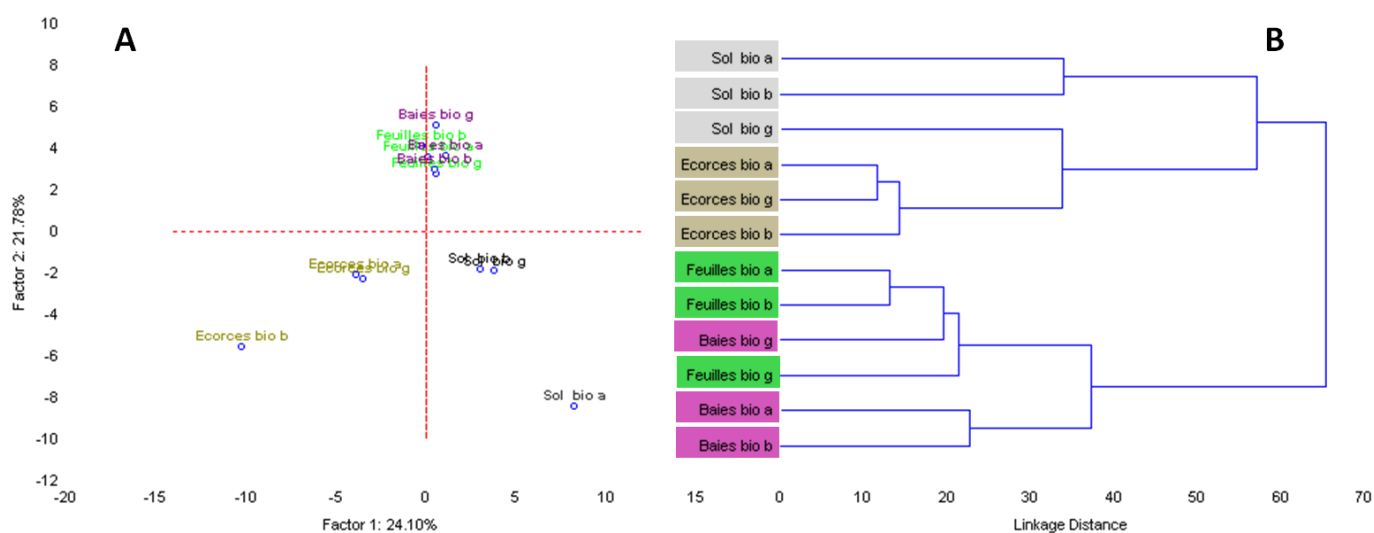
Des travaux antérieurs ont montré que les microorganismes du sol peuvent être présents dans les microenvironnements associés aux plantes et fruits (Rekah et al. 2000). Dans le sol viticole, la présence des espèces d'intérêt œnologique, dont l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Davenport 1973; Sabate et al. 2002; Goddard et al. 2010) et certaines bactéries lactiques et acétiques (Seto et al. 2006; Yanagida et al. 2008) a été décrite. Le sol constitue également un réservoir de micro-organismes pathogènes retrouvés dans les différentes parties aériennes de la vigne comme le tronc et les feuilles (Cortesi et al. 1997; Grove 2004; Kennelly et al. 2007). Il semble donc que les communautés microbiennes du sol pourraient participer activement dans la structuration des communautés microbiennes des parties aériennes de la plante dont la baie de raisin. L'objectif de ce chapitre est d'étudier la structure de la communauté bactérienne de des différents compartiments viticoles (sol, écorces, feuilles et baies) à l'aide d'une méthodologie commune pour chaque compartiment.

## **1. Etude de la population bactérienne**

Pour cette étude, des échantillons de chaque compartiment ont été prélevés pendant la campagne de 2009 au stade de début de véraison sur les deux parcelles de Lussac. Les échantillons de sol ont été prélevés dans l'horizon superficiel (0-5 cm) autour de chaque cep de vigne à 25 cm environ du tronc. Les écorces de vigne, les feuilles et les baies des raisins ont été prélevées sur les mêmes ceps. L'ADN a été extrait à partir de 1 gr de sol (équivalent poids sec), 1 gr d'écorces et 1 gr de feuilles, en utilisant la méthode décrite dans le Chapitre II : 5.13. En ce qui concerne les baies de raisins, la récupération des micro-organismes sur les baies de raisin et l'extraction d'ADN ont été réalisées comme détaillé dans le Chapitre II: 5.1.3. Nous avons ensuite utilisé la méthode d'empreinte moléculaire T-RFLP comme méthode commune d'étude de la structure de la communauté bactérienne (Chapitre II: 6.1)

## 1.1 Analyse la population bactérienne totale des différents compartiments par T-RFLP

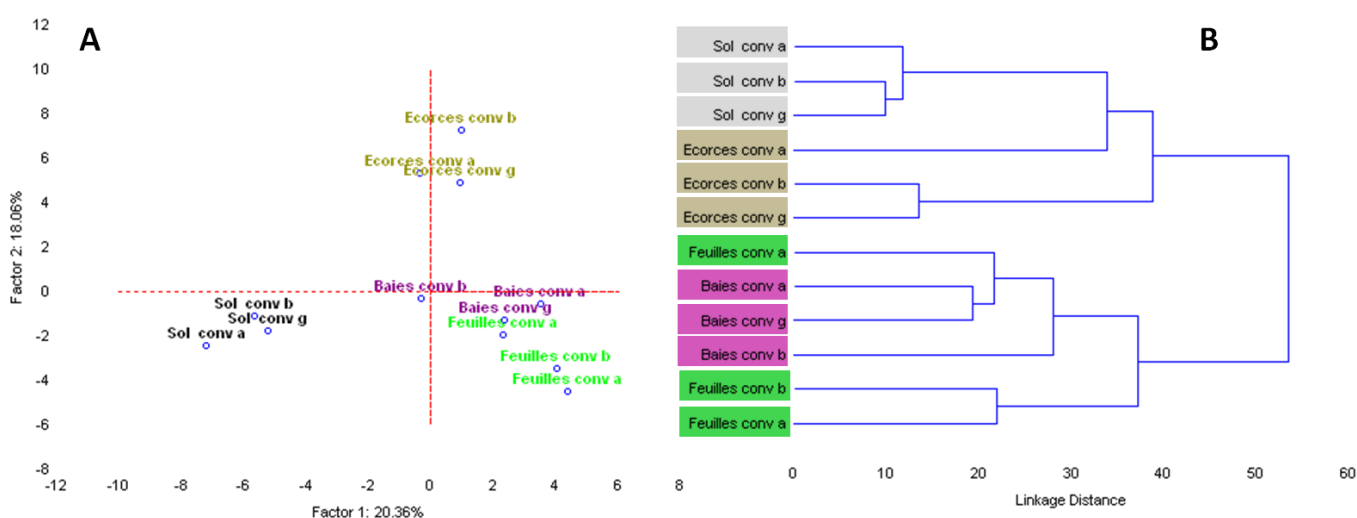
Les profils moléculaires des différents échantillons ont été étudiés par l'analyse en composante principale (ACP) et par classification ascendante hiérarchique (CAH). Le résultat de l'ACP présenté dans la **Figure 83 A**, concernant la parcelle en mode de conduite biologique, montre que les échantillons de sol et des écorces sont séparés des ceux des feuilles et des baies selon l'axe 2. Les individus issus des échantillons de feuilles et de baies sont regroupés dans le plan, rendant ainsi impossible la distinction des profils. L'axe 1 discrimine les profils issus des échantillons d'écorces et de sol. La comparaison des profils par CAH confirme les résultats de l'ACP et révèle deux cluster, le premier constitué des profils obtenus à partir des échantillons d'écorces et de sol, le deuxième constitué des profils provenant des échantillons de feuilles et de baies (**Figure 83 B**).



**Figure 83:** Analyse en composantes principales (**A**) et classifications ascendante hiérarchique (**B**) des profils T-RFLP (digérées par l'enzyme de restriction *Hinf* I) obtenus à partir des échantillons de différentes niches écologiques viticoles : Chaque échantillon est codifié par une couleur de la manière suivante: sol = couleur grise, écorces = couleur marron, feuilles = couleur verte, baies = couleur rose. Echantillons prélevés à Lussac dans la parcelle en mode de conduite biologique au stade de début véraison. Campagne de 2009.

En ce qui concerne la parcelle en mode de conduite conventionnel, nous constatons également que les profils des échantillons de sol et d'écorces sont bien séparés de ceux des échantillons de baies et des feuilles (**Figure 84 A**).

La CAH confirme la similitude des profils entre feuilles et baies d'une part et écorces et sol d'autre part (**Figure 84 B**).



**Figure 84:** Analyse en composantes principales (**A**) et classifications ascendante hiérarchique (**B**) des profils T-RFLP (digérées par l'enzyme de restriction *Hinf* I) obtenus à partir des échantillons de différentes niches écologiques viticoles : Chaque échantillon est codifié par une couleur de la manière suivante: sol = couleur grise, écorces = couleur marron, feuilles = couleur verte, baies = couleur rose. Echantillons prélevés à Lussac dans la parcelle en mode de conduite conventionnel au stade de début véraison. Campagne de 2009.

## 1.2 Analyse de la richesse et de la diversité des communautés bactériennes

Nous avons calculé des indices de richesse et de diversité à partir des profils T-RFLP, en considérant le nombre d'OTUs et l'abondance relative de chacun en termes de hauteur des pics de fluorescence. Les résultats montrent que le sol et les écorces sont les compartiments biologiques avec les indices les plus élevés. Les feuilles et les baies présentent des valeurs

inférieures. Cependant, les baies présentent des indices de richesse et de diversité plus élevés (**Tableau 32**). L'analyse de variance montre que, dans la parcelle en mode de conduite biologique, les valeurs de richesse du sol et des écorces sont significativement plus élevées que celles des baies et des feuilles. Le test de comparaisons multiples (HSD de Tuckey) montre que les échantillons d'écorces et de sol forment un groupe homogène distinct du deuxième groupe constitué par les échantillons de feuilles et de baies. En ce qui concerne l'indice de diversité, les feuilles présentent une variance homogène avec les baies mais différente de celle des écorces et du sol. Néanmoins, les baies forment également un groupe homogène avec les feuilles mais aussi avec le sol.

Dans la parcelle en mode de conduite conventionnel, nous constatons que les échantillons de baies, écorces et sol forment un groupe homogène, et que les feuilles présentent une variance similaire à celle des baies, significativement différente de celle des autres échantillons (**Tableau 33**).

<b>Mode conduite biologique</b>	<b>Richesse spécifique = n° de OTU's</b>	<b>Indice de diversité de Shannon</b>	<b>Mode conduite conventionnel</b>	<b>Richesse spécifique = n° de OTU's</b>	<b>Indice de diversité de Shannon</b>
<b>Sol</b>	27 (+/- 5)	2,21 (+/- 0,10)	<b>Sol</b>	25 (+/- 3)	2,38(+/- 0,14)
<b>Ecorces</b>	28 (+/- 6)	2,59 (+/- 0,02)	<b>Ecorces</b>	23 (+/- 4)	2,41 (+/- 0,22 )
<b>Feuilles</b>	11 (+/- 2.1)	1,59 (+/- 0,46)	<b>Feuilles</b>	14 (+/-2 )	1,77 (+/- 0,45)
<b>Baies</b>	14 (+/- 4)	1,80 (+/- 0,10)	<b>Baies</b>	21 (+/- 2)	2,21 (+/- 0,10 )

**Tableau 32:** Richesse en termes de nombre d'OTU's et indice de diversité de Shannon, calculés à partir des profils T-RFLP des différents échantillons provenant du sol, écorces, feuilles et baies de raisin. Lussac, campagne de 2009.



Groupes homogènes : alpha= 0.05, MS = 19 ,df =8					Groupes homogènes : alpha= 0.05, MS = 46.90,df =7					
<b>A - Richesse</b>		1	2		<b>B - Ind Shannon</b>		1	2	3	
Sol	****				Feuilles	****				
Ecorces	****				Baies	****	****			
Feuilles			****		Sol		****		****	
Baies			****		Ecorces				****	
<b>Probabilités approximatives</b>					<b>Probabilités approximatives</b>					
	Sol	Ecorces	Feuilles	Baies		Sol	Ecorces	Feuilles	Baies	
Sol		0.982648	0.028531	0.038287	Sol		0.627436	0.021128	0.094806	
Ecorces	0.982648		0.019204	0.024380	Ecorces	0.627436		0.006018	0.019745	
Feuilles	0.028531	0.019204		0.927180	Feuilles	0.021128	0.006018		0.497856	
Baies	0.038287	0.024380	0.927180		Baies	0.094806	0.019745	0.497856		

Groupes homogènes : alpha= 0.05, MS = 9.20,df = 8.00					Groupes homogènes : alpha= 0.05, MS = 0.2,df = 8				
<b>C - Richesse</b>		1	2		<b>D - Ind Shannon</b>		1	2	
Feuilles				****	Feuilles				****
Baies	****			****	Baies	****			****
Ecorces	****				Ecorces	****			
Sol	****				Sol	****			
<b>Probabilités approximatives</b>					<b>Probabilités approximatives</b>				
	Sol	Ecorces	Feuilles	Baies		Sol	Ecorces	Feuilles	Baies
Sol		0.784929	0.012347	0.563626	Baies		0.558446	0.050622	0.303704
Ecorces	0.784929		0.044168	0.976434	Ecorces	0.558446		0.011451	0.942664
Feuilles	0.012347	0.044168		0.077869	Feuilles	0.050622	0.011451		0.006607
Baies	0.563626	0.976434	0.077869		Sol	0.303704	0.942664	0.006607	

**Tableau 33:** Résultats de l'ANOVA à un facteur (origine des échantillons en ce qui concerne les compartiments biologiques sol, écorces, feuilles et baies) et test de comparaisons multiple (HSD de Tuckey). **A :** Richesse (nombre d'OTU's) concernant la parcelle en mode de conduite biologique, **B :** Indices de diversité de Shannon concernant la parcelle en mode conduite biologique, **C :** Richesse (nombre d'OTU's) concernant la parcelle en mode de conduite conventionnel, **D :** Indices de diversité de Shannon concernant la parcelle en mode conduite conventionnel.

### 1.3 Comparaison des profils et identification des OTU's communs

Parmi les 86 OTU's obtenus par l'analyse T-RFLP dans cette étude, nous observons, que certains OTU's sont spécifiques d'un type de compartiments biologiques. Cependant, 9 % des OTU's sont présents dans tous les d'échantillons (OTU's correspondent aux TRF's 58,59 pb, 99,74 pb, 114,06 pb, 123,46 pb, 295,21 pb, 297,45 pb, 311,22 pb et 321,52 pb).

#### **1.4. Discussion**

Les résultats de ces travaux montrent que les différents compartiments biologiques de l'environnement viticole présentent des points en commun en ce qui concerne la structure des populations bactériennes. Les communautés bactériennes des compartiments aériens de la plante, la baie de raisin et les feuilles, présentent de similitudes de profils mais restent distants des profils obtenus pour le sol et les écorces. La complexité des communautés bactériennes présentes dans le sol et les écorces est aussi beaucoup plus importante en terme de richesse et de diversité par rapport à celle des baies ou des feuilles. La disponibilité en substrats, variables selon le compartiment étudié, constitue un facteur pouvant expliquer ces différences. Le sol viticole met à disposition de la communauté microbienne d'importantes sources de carbone, provenant des débris végétaux comme les feuilles ou les tissus ligneux tels que les sarments de vigne après la taille. Les écorces de vigne, constituées de cellules mortes riches en cellulose et les exsudats provenant des blessures de taille, fournissent également des éléments nutritifs qui peuvent potentialiser une forte activité microbienne. En revanche, le support épiphytique comme les baies et les feuilles constitue un milieu beaucoup plus pauvre en nutriments. Il contient de composés, notamment les stilbènes (resvératrol et dérivés), qui participent aux défenses de la plante et du fruit, mais qui peuvent inhiber l'activité microbienne (Bavaresco et al. 1997; Harm et al. 2011).

Néanmoins, notre étude montre qu'il existe de caractéristiques communes entre la structure de populations de ces différents groupes. Les empreintes moléculaires obtenues par T-RFLP, révèlent l'existence de plus de 9 % d'unités taxonomiques communes à ces différents compartiments. Il serait intéressant, pour aller plus loin dans cette analyse, d'identifier les TRF's à l'aide du logiciel T-RFLP PAT+ (Phylogenetic Assignment Tool) et de la base de données Microbial Community Analysis III (Shyu et al. 2007). De même, la mise en œuvre d'une approche de type métagénomique serait pertinente afin de décrire de façon globale la communauté bactérienne de chaque compartiment, d'étudier leurs relations et leurs échanges, dans l'hypothèse de l'existence d'un *continuum* microbien entre le sol, la plante et le fruit.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les microorganismes, par leur diversité, leur activité et leur abondance permettent d'assurer la stabilité au sein d'une communauté biologique, jouant ainsi un rôle primordial dans l'équilibre des écosystèmes. D'un point de vue agronomique, les microorganismes de l'écosystème viticole sol, plante, baie contribuent activement à la croissance et à la santé du végétal et jouent un rôle prépondérant dans la transformation du raisin en vin. Ainsi, l'importance de l'activité biologique du consortium microbiologique présent dans le moût sur la qualité du vin est depuis longtemps établie. Si la communauté microbienne fermentaire est désormais bien connue, l'écosystème microbien présent à la surface de la baie de raisin a été beaucoup moins étudié, notamment dans sa double composante, fongique et bactérienne. La connaissance de la microflore du raisin, de son origine ainsi que des facteurs qui la modifient, est donc importante pour la qualité des raisins et la maîtrise des phénomènes fermentaires.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portent sur l'étude des communautés microbiennes de la baie de raisin et l'incidence des facteurs biotiques et abiotiques sur ces communautés.

Cette étude a permis dans un premier temps de mettre au point une technique d'empreinte moléculaire permettant le suivi des communautés fongiques. Nous avons développé la méthode de CE-SSCP afin de l'adapter à notre écosystème. Cette technique à haut débit est rapide permettant une grande résolution et rapidité pour l'interprétation des résultats. En analysant des échantillons environnementaux, cet outil a montré sa fiabilité pour le suivi de la dynamique des populations au cours de la maturation de la baie de raisin.

Les résultats obtenus aux cours des deux campagnes consécutives montrent une dynamique temporelle des populations cultivables, avec une augmentation des niveaux de population à partir des stades de début véraison et début maturité et une diversité de cette communauté plus importante aux stades de maturité et maturité avancée. Cette évolution est probablement liée au changement de la matrice baie de raisin ; nous avons mis en évidence une corrélation positive entre niveaux de population et teneur en sucres des exsudats. Au

cours de la maturation, de nouvelles espèces propagées par le vent, les insectes, des « splash » de pluie, la poussière de sol contribuent à la diversité et à l'enrichissement de cette communauté. Les populations cultivables de levures et de bactéries se situent globalement à des niveaux équivalents, ce qui montre que ces deux communautés se maintiennent en équilibre au sein du biofilm établi à la surface de la baie.

Afin de pouvoir préciser la nature des espèces et de mettre en collection des individus présents dans cette communauté, nous avons identifié des isolats bactériens et levures dont des levures fermentaires. Malgré les limitations des méthodes cultures dépendantes, notamment l'effet sélectif des milieux de culture, nous avons identifié une diversité bactérienne assez importante, révélant la présence de 44 espèces bactériennes appartenant à 21 genres. Les espèces Gram-négatives décroissent au fur et à mesure de l'avancée de la maturation, contrairement aux espèces Gram-positives, celles-ci étant par la suite prédominantes dans le moût et le vin, dans la logique d'un continuum d'espèces du raisin au vin.

Le genre *Pseudomonas* est le plus abondant, ses espèces productrices d'exopolysaccharides jouant probablement un rôle important dans l'établissement de biofilm. D'autres genres tels que *Bacillus* et *Streptomyces sp*, isolés aux cours de nos travaux, peuvent également jouer un rôle important dans la protection de la baie vis-à-vis de pathogènes tel que *Botrytis*.

La diversité des espèces isolées sur milieu LT est beaucoup moins importante par rapport à celle de la communauté bactérienne cultivable. Des huit genres identifiés, nous avons constaté que les espèces les plus abondantes appartenaient au genre *Aureobasidium*. En particulier, l'espèce *Aureobasidium pullulans*, présente dans tous les stades phénologiques, a été décrite comme un agent potentiel de biocontrôle vis-à-vis de champignons producteurs de mycotoxines. En accord avec des travaux antérieurs, l'isolement des espèces fermentaires est beaucoup plus rare. L'analyse par PCR en temps réel a révélé la présence de ce type de levures dès le stade de début de véraison. La présence de *Saccharomyces spp.* est vérifiée dans un seul site de notre dispositif expérimental, la localisation de cette parcelle dans un environnement urbain et proche des fruits en décomposition pouvant jouer le rôle d'inoculum.

Les différentes espèces isolées au cours de nos travaux ont été mises en collection dans les Centre de Ressources Biologiques de la Faculté d'Œnologie, permettant ainsi de compléter la collection avec des isolats issus du vignoble et de mettre à disposition ces souches pour les futurs travaux de recherche scientifique et biotechnologique.

En analysant différents paramètres de la population bactérienne et fongique tels que la structure, la densité et l'activité métabolique, nous montrons que des facteurs environnementaux peuvent avoir un impact sur cette communauté microbienne. Ainsi, les zones climatiques plus fraîches et humides, favorisent le développement des microorganismes. L'humidité relative et la quantité d'eau existant dans le milieu, notamment celle disponible vis à vis des microorganismes ( $A_w$ ), sont des facteurs pouvant expliquer les niveaux de populations plus élevés observés.

Un des objectifs principaux de ces travaux de recherche était d'évaluer l'impact du mode de conduite sur les populations microbiennes. Les premiers résultats nous ont conduit à cibler notre étude sur l'impact des produits phytosanitaires cupriques, antifongiques très utilisés en viticulture. Dans le contexte actuel de la réduction des intrants, l'utilisation de produits inorganiques (à base de cuivre et soufre), constituent les alternatives principales aux produits phytosanitaires de synthèse, agréés en agriculture biologique et en agriculture raisonnée. L'écotoxicité du cuivre sur les populations microbiennes a été constatée pour différents écosystèmes, cependant son impact sur les communautés microbiennes de la baie de raisin n'a jamais été évalué jusqu'à présent. Nos travaux mettent en évidence, à l'échelle de la parcelle, l'impact négatif des résidus cupriques sur la densité, l'activité et la structure de la communauté microbienne, en particulier dans sa fraction bactérienne. La diversité métabolique et de structure de cette communauté diminue avec l'augmentation du niveau de résidus cupriques de la baie de raisin. Ces résultats confirment que l'usage des produits phytosanitaires cupriques doit être raisonné. Ils apportent des éléments de réponses concernant les différents choix techniques qui s'offrent aux viticulteurs dans leur stratégie de lutte contre les maladies.

D'un point de vue environnemental, Les plaques Biolog™ constituent un indicateur microbien simple et rapide à mettre en œuvre au laboratoire à destination des praticiens,

permettant d'évaluer l'impact des pratiques viticoles sur la diversité de la communauté microbienne de la baie de raisin, par exemple dans le cas d'une reconversion en agriculture biologique.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### Articles dans de journaux internationaux à comité de lecture

**G. Martins**, C. Miot-Sertier, B. Lauga, O. Claisse, A. Lonvaud, G. Soulas, I. Masneuf-Pomarède (2011). Influence of the farming system on the microbial ecosystem associate with grape berries. *Oeno 2011*. Dunod Eds., Paris, 2012, 353-357.

**G. Martins**, C. Miot-Sertier, B. Lauga, O. Claisse, A. Lonvaud, G. Soulas, I. Masneuf-Pomarède (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 158, 93-100.

### Communication orale

**G. Martins**, C. Miot-Sertier, B. Lauga, O. Claisse, A. Lonvaud, G. Soulas, I. Masneuf-Pomarède (2011). Influence of the farming system on the microbial ecosystem associate with grape berries. *Symposium International d'œnologie de Bordeaux*, 2011.

### Communications Affichées

**G. Martins**, C. Miot-Sertier, G. Soulas, I. Masneuf-Pomarède. L'écosystème microbien de la baie de raisin, incidence des facteurs climatiques. 10<sup>ème</sup> Journée scientifique de l'Ecole doctorale science de la vie et de la santé, Arcachon, 2010.

**G. Martins**, C. Miot-Sertier, G. Soulas, I. Masneuf-Pomarède. L'écosystème microbien de la baie de raisin, incidence des facteurs abiotiques, 2<sup>ème</sup> Journée scientifique de l'ISVV, Villenave d'Ornon, 2010.

**G. Martins**, C. Miot-Sertier, B. Lauga, O. Claisse, A. Lonvaud, G. Soulas, I. Masneuf-Pomarède. Influence of the farming system on the microbial ecosystem associated with grape berries. 11<sup>ème</sup> Journée scientifique de l'Ecole doctorale science de la vie et de la santé, Arcachon, 2011.

**G. Martins**, C. Miot-Sertier, B. Lauga, O. Claisse, A. Lonvaud, G. Soulas, I. Masneuf-Pomarède. Influence of the farming system on the microbial ecosystem associate with grape berries. *Symposium International d'œnologie de Bordeaux*, 2011.

A. Mercier, C. Miot-Sertier, **G. Martins**, M.L. Soulas, I. Masneuf-Pomarède, A. Lonvaud, G. Soulas. L'écosystème microbien des sols vityicoles ; incidence des pratiques culturales. 5<sup>ème</sup> Journée de microbiologistes de l'INRA, Bordeaux, 2010.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aballay E, Mårtensson A & Persson P (2011) Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xiphinema index* Thorne & Allen on in vitro grape plants. *Plant and Soil* 347: 313–325.

Abrunhosa L, Paterson RRM, Kozakiewicz Z, Lima N & Venancio A (2001) Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 32: 240–242

Adachi M, Sake Y & Ishida Y (1996) Analysis of *Alexandrium* (dinophyceae) Species Using Sequences of the 5.8s Ribosomal Dna and Internal Transcribed Spacer Regions1. *Journal of Phycology* 32: 424–432.

Ait Barka E, Gognies S, Nowak J, Audran J-C & Belarbi A (2002) Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological Control* 24: 135–142.

Alcamo EI (1984) Fundamentals of Microbiology. *Fundamentals of Microbiology*, pp. 310–341. Addison-Wesley publishing company, London.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.

Amann RI, Ludwig W & Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143–169.

Anderson IC & Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 6: 769–779.

de Andrade ER (1995) Occurrence of *Fusarium* species in grapevine (*Vitis* spp.) in Santa Catarina. *Fitopatologia Brasileira* 18: 502–505.

Andrews JH (1992) Biological Control in the Phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603–635.

Atlas RM, Saylor G, Burlage RS & Bej AK (1992) Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms. *BioTechniques* 12: 706–717.

Avaniss-Aghajani E, Jones K, Chapman D & Brunk C (1994) A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences. *BioTechniques* 17: 144–146, 148–149.

Bae S, Fleet GH & Heard GM (2006) Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J Appl Microbiol* 100: 712–727.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S & Vivanco JM (2006) The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 233–266.

- Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Zea-Bonilla T, Pérez-Jiménez RM, Martín M & Rivilla R (2011) *Pseudomonas fluorescens* F113 Mutant with Enhanced Competitive Colonization Ability and Improved Biocontrol Activity against Fungal Root Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5412–5419.
- Barata A, Malfeito-Ferreira M & Loureiro V (2012) The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 153: 243–259.
- Barata A, Seborro F, Belloch C, Malfeito-Ferreira M & Loureiro V (2008). Ascomycetous yeast species recovered from grapes damaged by honeydew and sour rot. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1182–1191.
- Barbe J-C, de Revel G, Joyeux A, Bertrand A & Lonvaud-Funel A (2001) Role of botrytized grape micro-organisms in SO<sub>2</sub> binding phenomena. *Journal of Applied Microbiology* 90: 34–42.
- Barka EA, Belarbi A, Hachet C, Nowak J & Audran J (2000) Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 186: 91–95.
- Barnett JA, Winch B, Delaney MA, Magson AB, Jones E (1972) Numbers of yeasts associated with wine grapes of Bordeaux. *Archiv fur Mikrobiologie Arch Mikrobiol*, 83 (1), pp. 52–55
- Barreiros L, Nogales B, Manaia CM, Ferreira ACS, Pieper DH, Reis MA & Nunes OC (2003) A novel pathway for mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial mixed culture. *Environmental Microbiology* 5: 944–953.
- Battaglia R, Hatzold T & Kroes R (1996) Conclusions from the Workshop on Ochratoxin in Food, organized by ILSI Europe in Aix-en-Provence (10-12 January 1996). *Food Addit Contam* 13 Suppl: 1–3.
- Bau M, Bragulat MR, Abarca ML, Minguez S & Cabañes FJ (2005) Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 98: 125–130.
- Bavaresco L, Petegolli D, Cantü E, Fregoni M, Chiusa G & Trevisan M (1997) Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 36: 77–83.
- Begon M, Harper JL & Townsend CR (1996) *Ecology: individuals, populations and communities*. Blackwell Scientific Publications.
- Behar A, Jurkevitch E & Yuval B, (2008) Bringing back the fruit into fruit fly–bacteria interactions. *Molecular Ecology* 17, 1375–1386.
- Belin JM (1981) *Biologie de levures liées a la vigne et au vin*. Université de Bordeaux II, Bordeaux.
- Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG & Chan JWYF (1995) Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 46–53.

Bell CW, Acosta-Martinez V, McIntyre NE, Cox S, Tissue DT & Zak JC (2009) Linking Microbial Community Structure and Function to Seasonal Differences in Soil Moisture and Temperature in a Chihuahuan Desert Grassland. *Microbial Ecology* 58: 827–842.

Benson DA (2006) GenBank. *Nucleic Acids Research* 34: D16–D20.

Bent SJ & Forney Larry J (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* 2: 689–695.

Bertilsson S, Eiler A, Nordqvist A & Jorgensen NOG (2007) Links between bacterial production, amino-acid utilization and community composition in productive lakes. *ISME J* 1: 532–544.

Bien E, Lorenz D, Eichhorn K & Plapp R (1990) Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* from the German vine region Rheinpfalz. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 97: 313–322.

Blackwood CB, Marsh Terry, Kim S-H & Paul EA (2003) Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Appl Environ Microbiol* 69: 926–932.

Blancard D, Gravot E, Jailloux E & Fermaud M (2000) Etiology of sour rot in vineyards located in South-West of France. *IOBC/wprs Bulletin "Integrated Control in Viticulture"* 51–54.

Bloemberg GV & Lugtenberg BJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 343–350.

Bochner BR (1989) Sleuthing out bacterial identities. *Nature* 339: 157–158.

Bois B (2007) Cartography of agroclimatic indices at mesoscale level - Methodology and case study of Bordeaux winegrowing area. Implications on vine development and fruit ripening. Université Bordeaux 1, Talence.

Brandt KK, Petersen A, Holm PE & Nybroe O (2006) Decreased abundance and diversity of culturable *Pseudomonas* spp. populations with increasing copper exposure in the sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 281–291.

Brock TD (1966) *Principles of microbial ecology*. Prentice-Hall.

Broome J (1995) Development of an Infection Model for Botrytis Bunch Rot of Grapes Based on Wetness Duration and Temperature. *Phytopathology* 85: 97.

Bruns A, Cypionka H & Overmann J (2002) Cyclic AMP and Acyl Homoserine Lactones Increase the Cultivation Efficiency of Heterotrophic Bacteria from the Central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3978–3987.

Bulgari D, Casati P, Brusetti L, Quaglino F, Brasca M, Daffonchio D & Bianco PA (2009) Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. *J. Microbiol* 47: 393–401.

- Burr TJ (1983) Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* Biovar 3 from Grapevine Galls and Sap, and from Vineyard Soil. *Phytopathology* 73: 163.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169–193.
- Butenschoen O, Scheu S & Eisenhauer N (2011) Interactive effects of warming, soil humidity and plant diversity on litter decomposition and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 1902–1907.
- Čadež N, Zupan J & Raspor P (2010) The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research* 10: 619–630.
- Callon C, Delbes C, Duthoit F, Montel MC (2006) Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol* 29: 172–180
- Chamel A, Pineri M & Escoubes M (1991) Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant, Cell & Environment* 14: 87–95.
- Chamier A-C (1987) Effect of pH on microbial degradation of leaf litter in seven streams of the English Lake District. *Oecologia* 71: 491–500.
- Chatelet DS, Matthews M A & Rost TL (2006) Xylem Structure and Connectivity in Grapevine (*Vitis vinifera*) Shoots Provides a Passive Mechanism for the Spread of Bacteria in Grape Plants. *Ann Bot* 98: 483–494.
- Chavan P, Mane S, Kulkarni G, Shaikh S, Ghormade V, Nerkar DP, Shouche Y & Deshpande MV (2009) Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology* 26: 801–808.
- Chelius MK & Triplett EW (2001) The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. *Microb. Ecol.* 41: 252–263.
- Cho JC & Giovannoni J (2004) Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 432–440.
- Cho JC & Tiedje JM (2001) Bacterial species determination from DNA–DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3677–3682
- Choi KH & Dobbs FC (1999) Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 36: 203–213.
- Christian J (1980) Reduced water activity. *Microbial ecology of foods*. Academic Press, London.

- Clayton RA, Sutton G, Hinkle PS, Bult C & Fields C (1995) Intraspecific Variation in Small-Subunit rRNA Sequences in GenBank: Why Single Sequences May Not Adequately Represent Prokaryotic Taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 595–599.
- Clement BG, Kehl LE, DeBord KL & Kitts CL (1998) Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* 31: 135–142.
- Cocolin L, Innocente N, Biasutti M & Comi G (2004) The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* 90: 83–91.
- Cole JR et al. (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37: D141–145.
- Combina M, Mercado L, Borgo P, Elia A, Jofré V, Ganga A, Martinez C & Catania C (2005) Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1055–1061.
- Comitini F & Ciani M (2008) Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Ann. Microbiol.* 58: 489–493.
- Compant S, Kaplan H, Sessitsch A, Nowak J, Ait Barka E & Clément C (2008) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by Burkholderia phytofirmans strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiology Ecology* 63: 84–93.
- Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H & Sessitsch A (2011) Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol* 62: 188–197.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C & Ait Barka E (2005) Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium Burkholderia sp. Strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1685–1693.
- Connon SA & Giovannoni SJ (2002) High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3878–3885.
- Coombe BG (1995) Growth Stages of the Grapevine: Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 104–110.
- Coombe BG & McCarthy MG (2000) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 131–135.
- Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A, Tello J, Aporta I, Vélez MD & Valero E (2011) Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 145: 132–139.

- Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A & Valero E (2011) Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiology Ecology* 77: 429–437.
- Cortesi P, Bisiach M, Ricciolini M & Gadoury DM (1997) Cleistothecia of *Uncinula necator* —An Additional Source of Inoculum in Italian Vineyards. *Plant Disease* 81: 922–926.
- Coton E, Coton M, Levert D, Casaregola S & Sohier D (2006) Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108: 130–135.
- Curtis TP, Sloan WT & Scannell JW (2002) Estimating Prokaryotic Diversity and Its Limits. *PNAS* 99: 10494–10499.
- Dahllöf I, Baillie H & Kjelleberg S (2000) rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3376–3380.
- Darrah PR (1993) The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 155-156: 1–20.
- Darriet P, Pons M, Henry R, Dumont O, Findeling V, Cartolaro P, Calon nec A & Dubourdieu D (2002) Impact Odorants Contributing to the Fungus Type Aroma from Grape Berries Contaminated by Powdery Mildew (*Uncinula necator*); Incidence of Enzymatic Activities of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3277–3282.
- Davenport RR (1973) Vineyard yeasts - an environmental study. *Sampling - Microbiological Monitoring of Environments*. Academic Press, London.
- Davis KER, Joseph SJ & Janssen PH (2005) Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 826–834.
- De Felice DV, Solfrizzo M, De Curtis F, Lima G, Visconti A & Castoria R (2008) Strains of *Aureobasidium pullulans* Can Lower Ochratoxin A Contamination in Wine Grapes. *Phytopathology* 98, 1261–1270
- Delaherche A, Claisse O & Lonvaud-Funel A (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97: 910–915.
- Dellinger B, Graça M, Casal M & Schuller D (2006) Identification of wine related yeast species by capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism analysis (CE-SSCP) of the 26S rRNA. *Communication affichée lors du "15th National Congress of Biochemistry"*, Aveiro, 8-10, 2006. <http://rapositorium.sdum.uminho.pt>.
- DeLong EF et al. (2006) Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. *Science* 311: 496–503.

Deytieux-Belleau C, Geny L, Roudet J, Mayet V, Donèche B & Fermaud M (2009) Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 125: 551–563.

Diguta CF, Rousseaux S, Weidmann S, Bretin N, Vincent B, Guilloux-Benatier M & Alexandre H (2010) Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. *FEMS Microbiology Letters* 313: 81–87.

Diguta CF, Vincent B, Guilloux-Benatier M, Alexandre H, & Rousseaux S (2011) PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, 28, 1145-1154.

Dimakopoulou M, Tjamos SE, Antoniou PP, Pietri A, Battilani P, Avramidis N, Markakis EA & Tjamos EC (2008) Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control* 46: 158–165.

Doaré-Lebrun E, El Arbi A, Charlet M, Guérin L, Pernelle J-J, Ogier J-C & Bouix M (2006) Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis – potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1340–1350.

Donèche B (1993) Botrytized Wines. *Wine Microbiology and Biotechnology*, pp. 327–351. Harwood Academic Publishers, Grey, Switzerland.

Donèche B (1986) La nature des exsudats de raisins et leur rôle dans la germination des conidies de *Botrytis cinerea*. *Agronomie* 6: 7.

Dorigo U, Volatier L & Humbert J-F (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.* 39: 2207–2218.

Duhail C (1999) La pourriture du raisin: facteurs de selection des micro-organismes dominantes et incidences oenologiques. Université de Bordeaux II, France.

Dunbar J, Ticknor LO & Kuske CR (2001) Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 190–197.

Efron B (1979) Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *Ann. Statist.* 7: 1–26.

Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ & Fry JC (2003) Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3223–3230.

Falk S (1996) *Fusarium proliferatum* as a Biocontrol Agent Against Grape Downy Mildew. *Phytopathology* 86: 1010.



- Findlay S & Sinsabaugh RL (2006) Large-Scale Variation in Subsurface Stream Biofilms: A Cross-Regional Comparison of Metabolic Function and Community Similarity. *Microbial Ecology* 52: 491–500.
- Fleet GH, Prakitchaiwattana C, Beh AL & Heard G (2002) The yeast ecology of wine grapes, p. 1–17. In M. Ciani (ed.), *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts*. Research Signpost, Kerala, India.
- Flemming CA, Ferris FG, Beveridge TJ & Bailey GW (1990) Remobilization of toxic heavy metals adsorbed to bacterial wall-clay composites. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3191–3203.
- Fox GE, Pechman KR & Woese Carl R. (1977) Comparative Cataloging of 16S Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Prokaryotic Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27: 44–57.
- Francesca N, Chiurazzi M, Romano R, Aponte M, Settanni L & Moschetti G (2009) Indigenous yeast communities in the environment of “Rovello bianco” grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 337–351.
- Frey JC, Angert ER & Pell AN (2006) Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. *Journal of Microbiological Methods* 67: 9–19.
- Frias-Lopez J, Shi Y, Tyson GW, Coleman ML, Schuster SC, Chisholm SW & DeLong EF (2008) Microbial community gene expression in ocean surface waters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 3805–3810.
- Fritze H, Perkiömäki J, Saarela U, Katainen R, Tikka P, Yrjälä K, Karp M, Haimi J & Romantschuk M (2006) Effect of Cd-containing wood ash on the microflora of coniferous forest humus. *FEMS Microbiology Ecology* 32: 43–51.
- Gadoury DM, Seem RC, Wilcox WF, Henick-Kling T, Conterno L, Day A & Ficke A (2007) Effects of Diffuse Colonization of Grape Berries by *Uncinula necator* on Bunch Rots, Berry Microflora, and Juice and Wine Quality. *Phytopathology* 97: 1356–1365.
- Galet P (2000) *Dictionnaire encyclopédique des cépages*. Hachette Pratique, Paris.
- García-Martínez J, Acinas SG, Antón AI & Rodríguez-Valera F (1999) Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods* 36: 55–64.
- Garland JL & Mills AL (1991) Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl Environ Microbiol* 57: 2351–2359.

- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G & van Elsas JD (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 38: 1–15.
- Gibson UE, Heid CA & Williams PM (1996) A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6: 995–1001.
- Gill SR et al. (2006) Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312: 1355–1359.
- Giovannoni S J, Britschgi TB, Moyer CL & Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60–63.
- Girbau T, Stummer BE, Pocock KF, Baldock GA, Scott ES & Waters EJ (2004) The effect of *Uncinula necator* (powdery mildew) and *Botrytis cinerea* infection of grapes on the levels of haze-forming pathogenesis-related proteins in grape juice and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 125–133.
- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21: 383–393.
- Goddard MR, Anfang N, Tang R, Gardner RC & Jun C (2010) A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology* 12: 63–73.
- González Á, Hierro N, Poblet M, Mas A & Guillamón JM (2005) Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology* 102: 295–304.
- Grayston SJ, Wang S, Campbell CD & Edwards AC (1998) Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 369–378.
- Grove GG (2004) Perennation of *Uncinula necator* in Vineyards of Eastern Washington. *Plant Disease* 88: 242–247.
- Grube M, Schmid F & Berg G (2011) Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology* 115: 978–986.
- Gubler WD, Baumgartner K, Browne GT, Eskalen A, Latham SR, Petit E & Bayramian LA (2004) Root diseases of grapevines in California and their control. *Austral. Plant Pathol.* 33: 157–165.
- La Guerche S, Senneville L, Blancard Dominique & Darriet P (2007) Impact of the *Botrytis cinerea* strain and metabolism on (-)-geosmin production by *Penicillium expansum* in grape juice. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 331–341.
- Guérin L, Guyot F, Vincent B & Lempereur V (2007) Epidémiologie des moisissures responsables des goûts moisi-terreux. Symposium de Bordeaux Juin 2007. (Publication dans les actes du colloque, Vigne et Vin Publications Internationales éditeur, Juillet 2010, pp 76-78).

- Guerra E, Sordi G, Mannazzu IM, Clementi F & Fatichenti F (1999) Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. *Italian Journal of Food Science* 11: 221–230.
- Guerrero R (2002) Microbial ecology comes of age. *International Microbiology* 5: 157–159.
- Guerzoni E & Marchetti R (1987) Analysis of Yeast Flora Associated with Grape Sour Rot and of the Chemical Disease Markers. *Appl Environ Microbiol* 53: 571–576.
- Gutell RR, Larsen N & Woese CR (1994) Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev* 58: 10–26.
- Haas D & Défago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307–319.
- Hall EK, Neuhauser C & Cotner JB (2008) Toward a mechanistic understanding of how natural bacterial communities respond to changes in temperature in aquatic ecosystems. *ISME J* 2: 471–481.
- Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Halleen F, Schroers H-J, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H & Crous PW (2006) *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines. *Stud Mycol* 55: 227–234.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF & Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895–914.
- Hammes WP, Brandt MJ, Francis KL, Rosenheim J, Seitter MFH & Vogelmann SA (2005) Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology* 16: 4–11.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J & Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5: R245–R249.
- Hardie WJ, O'Brien TP & Jaudzems VG (1996) Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2: 97–142.
- Harkins T & Jarvie T (2007) Metagenomics analysis using the Genome Sequencer™ FLX system. *Nature Methods* 4. h.
- Harm A, Kassemeyer H-H, Seibicke T & Regner F (2011) Evaluation of Chemical and Natural Resistance Inducers Against Downy Mildew (*Plasmopara Viticola*) in Grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* 62: 184–192.
- Hayashi K (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 1: 34–38.

- Head IM, Saunders JR & Pickup RW (1998) Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microbial Ecology* 35: 1–21.
- Hernán-Gómez S, Espinosa JC & Ubeda JF (2000) Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiology Letters* 193: 45–50.
- Hierro N, Esteve-Zarzoso B, Mas A & Guillamón JM (2007) Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Research* 7: 1340–1349.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993) Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology* 11: 1026–1030.
- Hill GT, Mitkowski NA, Aldrich-Wolfe L, Emele LR, Jurkonie DD, Ficke A., Maldonado-Ramirez S, Lynch ST & Nelson EB (2000) Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15: 25–36.
- Hillis DM & Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol* 66: 411–453.
- Högberg M, Högberg P & Myrold D (2007) Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia* 150: 590–601.
- Holland MA (1997) Occam's Razor Applied to Hormonology (Are Cytokinins Produced by Plants?). *Plant Physiol* 115: 865–868.
- Holloway PJ & Baker EA (1970) The cuticles of some Angiosperm leaves and fruits. *Annals of Applied Biology* 66: 145–154.
- Hong H, Pruden A & Reardon KF (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J. Microbiol. Methods* 69: 52–64.
- Hood IA (1991) Armillaria Root Disease. *Agriculture Handbook*, pp. 122–149. United States Department of Agriculture Forest Service, Washington, D.C.
- Horz H-P, Barbrook A, Field CB & Bohannan BJM (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15136–15141.
- Hudson A, Ahmad NH, Van Buren R & Savka MA (2010) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Mendez-Vilas. Formatex Research Center, Spain.
- Hugenholtz P (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol* 3:1–8.
- Hugenholtz P & Tyson GW (2008) Metagenomics. *Nature*, 455: 481–483
- Huglin P & Scheneider C (1998) *Biologie et écologie de la vigne*. Lavoisier Tec et Doc. Paris.

- Hurst CJ (2002) *Manual of Environmental Microbiology, second edition*. Wash DC: ASM press.
- Insam H (1997) A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: Insam, H, and Ragger A. (eds.) *Microbial communities: functional versus structural approaches*. pp 259-260
- Janisiewicz WJ, Kurtzman CP & Buyer JS (2010) Yeasts associated with nectarines and their potential for biological control of brown rot. *Yeast*, 27(7): 389-98
- Joyeux A, Lafon-Lafourcade S & Ribéreau-Gayon P (1984) Evolution of Acetic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Wine. *Appl Environ Microbiol* 48: 153–156.
- Kaeberlein T, Lewis K & Epstein SS (2002) Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* 296: 1127–1129.
- Kakimoto T (1998) Genes involved in cytokinin signal transduction. *Journal of Plant Research* 111: 261–265.
- Kennelly MM, Gadoury DM, Wilcox WF, Magarey PA & Seem RC (2007) Primary Infection, Lesion Productivity, and Survival of Sporangia in the Grapevine Downy Mildew Pathogen *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 97: 512–522.
- Kerstiens G (1996) Cuticular water permeability and its physiological significance. *J. Exp. Bot.* 47: 1813–1832.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- King S, McCord BR & Riefler RG (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *J. Microbiol. Methods* 60: 83–92.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H & Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58: 169-188.
- Köpke B, Wilms R, Engelen B, Cypionka H & Sass H (2005) Microbial Diversity in Coastal Subsurface Sediments: a Cultivation Approach Using Various Electron Acceptors and Substrate Gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7819–7830.
- Kowalchuk GA & Stephen JR (2001) *Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology*.
- Kuehl CJ, Wood HD, Marsh TL, Schmidt TM & Young VB (2005) Colonization of the cecal mucosa by *Helicobacter hepaticus* impacts the diversity of the indigenous microbiota *Infect. Immun.*, 73 (2005), pp. 6952–6961
- Kulikova T et al. (2007) EMBL Nucleotide Sequence Database in 2006. *Nucleic Acids Research* 35: D16–D20.

- Kurokawa K et al. (2007) Comparative Metagenomics Revealed Commonly Enriched Gene Sets in Human Gut Microbiomes. *DNA Research* 14: 169–181.
- Kurtzman CP (1993) DNA-DNA hybridization approaches to species identification in small genome organisms. *Meth. Enzymol.* 224: 335–348.
- Kurtzman CP & Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 331–371.
- Kurtzman CP & Robnett CJ (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 35: 1216–1223.
- De La Torre MJ, Millan MC, Perez-Juan P, Morales J & Ortega JM (1999) Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. *Microbios* 100: 27–40.
- Lafon-Lafourcade S (1955) Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisins. Université Bordeaux, France.
- Lafon-Lafourcade S, Carre E & Ribéreau-Gayon P (1983) Occurrence of Lactic Acid Bacteria During the Different Stages of Vinification and Conservation of Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 874–880.
- Laforgue R, Guérin L, Pernelle JJ, Monnet C, Dupont J & Bouix M (2009) Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1208–1218.
- LaJeunesse TC (2001) Investigating the Biodiversity, Ecology, and Phylogeny of Endosymbiotic Dinoflagellates in the Genus *Symbiodinium* Using the *Its* Region: In Search of a “species” Level Marker. *Journal of Phycology* 37: 866–880.
- Lalancette N (1988) Development of an Infection Efficiency Model for *Plasmopara viticola* on American Grape Based on Temperature and Duration of Leaf Wetness. *Phytopathology* 78: 794.
- Landa BB, Navas-Cortés JA & Jiménez-Díaz RM (2004) Influence of temperature on plant–rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of fusarium wilt of chickpea. *Plant Pathology* 53: 341–352.
- Lecroq B, Lejzerowicz F, Bachar D, Christen R, Esling P, Baerlocher L, Østerås M, Farinelli L & Pawlowski J (2011) Ultra-deep sequencing of foraminiferal microbarcodes unveils hidden richness of early monothalamous lineages in deep-sea sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 13177–13182.
- Lee DH, Zo YG & Kim SJ (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 62: 3112–3120.

- Lehman RM, Colwell FS, Ringelberg DB & White DC (1995) Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *Journal of Microbiological Methods* 22: 263–281.
- Leistner L (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55: 181–186.
- Lemanceau P (1992) Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie* 12: 25.
- Letunic I & Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23: 127–128.
- Leveau JHJ & Tech JJ (2011) *Grapevine microbiomics: Bacterial diversity on grape leaves and berries revealed by high-throughput sequence analysis of 16S rRNA amplicons.*
- Ley RE, Peterson DA & Gordon JI (2006) Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 124: 837–848.
- Leyden JJ, McGinley KJ, Nordstrom KM & Webster GF (1987) Skin microflora. *J. Invest. Dermatol.* 88: 65s–72s.
- Li SS, Cheng C, Li Z, Chen JY, Yan B, Han BZ, Reeves M (2010) Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 138, pp. 85–90
- Linn DM & Doran JW (1982) Effect of Water-Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Nontilled Soils 1. *Soil Science Society of America Journal* 48: 1267–1272.
- Liu WT, Marsh T L, Cheng H & Forney L J (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63: 4516–4522.
- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD & Knight R (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* 35: e120.
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès J-P & Godon J-J (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8: 720–731.
- Lonvaud-Funel A (1999) Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 317–331.
- Lonvaud-Funel A (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199: 9–13.
- Lonvaud-Funel A (1995) Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters* 126: 209–214.

- Loqman S, Barka EA, Clément C & Ouhdouch Y (2008) Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 81–91.
- Loureiro V & Malfeito-Ferreira M (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 86: 23–50.
- Ludwig Wolfgang et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32: 1363–1371.
- Magyar D, Shoemaker RA, Bobvos J, Crous PW & Groenewald JZ (2010) *Pyrigemmula*, a novel hyphomycete genus on grapevine and tree bark. *Mycological Progress* 10: 307–314.
- Marais PG (1980) Fungi associated with decline and death of nursery grapevines in the Western Cape. *Phytophylactica* 12: 9–13.
- Margulies M et al. (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Martini A, Ciani M & Scorzetti G (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 435– 440.
- Martini M, Musetti R, Grisan S, Polizzotto R, Borselli S, Pavan F & Osler R (2009) DNA-Dependent Detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease* 93: 993–998.
- Martorell P, Querol A & Fernández-Espinar MT (2005) Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 71: 6823–6830.
- Mazzola M (2002) Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 557–564.
- Meunier M & Steel C (2009) Effect of *Colletotrichum acutatum* ripe rot on the composition and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes and wine. *Aust. J. Grape Wine Res* 15:223-227.
- Micheland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L & Cauquil L (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9: 1359–1363.
- Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer Gerard, Winter C & Herndl GJ (1999) Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65: 3518–3525.
- Montel MC, Masson F & Talon R (1998) Bacterial role in flavour development. *Meat Science* 49, Supplement 1: S111–S123.



Morrison TB, Weis JJ & Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-8.

Mortimer R & Polsinelli M (1999) On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 150: 199–204.

Mukherjee P & Raghu K (1997) Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of shape *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*. *Mycopathologia* 139: 151–155.

Munkvold GP (1993) Efficacy of Natural Epiphytes and Colonizers of Grapevine Pruning Wounds for Biological Control of *Eutypa Dieback*. *Phytopathology* 83: 624.

Murphy CD (2010) Biodegradation and biotransformation of organofluorine compounds. *Biotechnol. Lett.* 32: 351–359.

Musetti R, Vecchione A, Stringher L, Borselli S, Zulini L, Marzani C, D'Ambrosio M, di Toppi LS & Pertot I (2006) Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology* 96: 689–698.

Muyzer G (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 317–322.

Muyzer G, de Waal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695–700.

Myers RM, Fischer SG, Lerman LS & Maniatis T (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 13: 3131–3145.

Nedwell DB (1999) Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 101–111.

Neeley ET, Phister TG & Mills DA (2005) Differential Real-Time PCR Assay for Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Wine. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8954–8957.

Nehl DB, Allen SJ & Brown JF (1997) Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology* 5: 1–20.

Newman KL, Almeida RPP, Purcell AH & Lindow SE (2003) Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7319–7327.

Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23: 375–396.

Nichols D (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 351–357.

Nisiotou AA & Nychas G-J (2007) Yeast Populations Residing on Healthy or Botrytis-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2765–2768.

Nisiotou AA, Rantsiou K, Iliopoulos V, Cocolin L & Nychas G-J (2011) Bacterial species associated with sound and Botrytis-infected grapes from a Greek vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 145: 432–436.

Nisiotou AA, Spiropoulos AE & Nychas G-J (2007) Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and Botrytis-Affected Grape Must Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6705–6713.

Noss RF (1990) Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach. *Conservation Biology* 4: 355–364.

Ojeda, Deloire A, Carbonneau A, Ageorges A & Romieu C (1999) Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* 38: 145–150.

Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillere JP & Moing A (2002) Grape berry development: a review, Revue bibliographique: développement de la baie de raisin. *International Journal of Vine and Wine Sciences* v. 36(3) p. 109-131.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K & Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2766–2770.

Ovreas L & Torsvik V (1998) Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities. *Microbial Ecology* 36: 303–315.

Padgett M & Morrison JC (1990) Changes in Grape Berry Exudates during Fruit Development and Their Effect on Mycelial Growth of Botrytis cinerea. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 269–273.

Parle JN & Di Menna ME (1966) The source of yeast in New Zealand wines. *J. Agr Res* 9: 98-107

Pawlicki-Jullian N, Courtois B, Pillon M, Lesur D, Le Flèche-Mateos A, Laberche J-C, Goncharova, N & Courtois J (2010) Exopolysaccharide production by nitrogen-fixing bacteria within nodules of Medicago plants exposed to chronic radiation in the Chernobyl exclusion zone. *Research in Microbiology* 161, 101-108.

Pertot I, Gobbin D, De Luca F & Prodorutti D (2008) Methods of assessing the incidence of Armillaria root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy. *Crop Protection* 27: 1061–1070.

Pettersson M & Baath E (2003) Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiology Ecology* 45: 13–21.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45–e45.

Phister TG & Mills DA (2003) Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Appl Environ Microbiol* 69: 7430–7434.

Plante D, Bélanger G, Leblanc D, Ward P, Houde A & Trottier Y -L (2011) The use of bovine serum albumin to improve the RT-qPCR detection of foodborne viruses rinsed from vegetable surfaces. *Letters in Applied Microbiology* 52: 239–244.

Polz MF & Cavanaugh CM (1998) Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3724–3730.

Pomeroy LR & Wiebe WJ (2001) Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat Microb Ecol* 23: 187–204.

Pommier T, Pinhassi J & Hagström Å (2005) Biogeographic analysis of ribosomal RNA clusters from marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology* 41: 79–89.

Possner DRE & Kliewer WM The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* 24: 229–240.

Prakitchaiwattana C, Fleet G & Heard G (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research* 4: 865–877.

Pretorius I, Van Der Westhuizen T, Augustyn O (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South-African wine industry. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20, 61-69.

Price CW, Fuson GB & Phaff HJ (1978) Genome comparison in yeast systematics: delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiol Rev* 42: 161–193.

Prieto C, Jara C, Mas A & Romero J (2007) Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International Journal of Food Microbiology* 115: 348–355.

Pringault O, Viret H & Duran R (2010) Influence of microorganisms on the removal of nickel in tropical marine sediments (New Caledonia). *Marine Pollution Bulletin* 61: 530–541.

Qin J et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464: 59–65.

Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C & Moënne-Loccoz Y (2008) The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321: 341–361.

Ranjard L, Lignier L & Chaussod R (2006) Cumulative Effects of Short-Term Polymetal Contamination on Soil Bacterial Community Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1684–1687.

- Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni C, Cattaneo P, Comi G & Cocolin L (2005) Culture-Dependent and -Independent Methods To Investigate the Microbial Ecology of Italian Fermented Sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1977–1986.
- Raspor P, Milek DM, Polanc J, Smole Mozina S & Cadez N (2006) Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology* 109: 97–102.
- Rekah Y, Shtienberg D & Katan J (2000) Disease Development Following Infection of Tomato and Basil Foliage by Airborne Conidia of the Soilborne Pathogens *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *basilici*. *Phytopathology* 90: 1322–1329.
- Rementeria A, Rodriguez JA, Cadaval A, Amenabar R, Muguruza JR, Hernando FL & Sevilla MJ (2003) Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology* 86: 201–207.
- Renault P, Miot-Sertier C, Marullo P, Hernández-Orte P, Lagarrigue L, Lonvaud-Funel Aline & Bely M (2009) Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology* 134: 201–210.
- Renouf V, Claisse O & Lonvaud-Funel A (2007) Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 149–164.
- Renouf V, Claisse O & Lonvaud-Funel A (2005) Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 316–327.
- Renouf V & Lonvaud-Funel A (2007) Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research* 162: 154–167.
- Richardson A, Barea J-M, McNeill A & Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305–339.
- Rillig MC & Mummey DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist* 171: 41–53.
- Ritz K (2007) The Plate Debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 358–362.
- Rosso L, Lobry JR, Bajard S & Flandrois JP (1995) Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 610–616.

Rousk J, Baath E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R & Fierer N (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* 4: 1340–1351.

Rousseau S & Doneche B (2001) Effects of water activity (aw) on the growth of some epiphytic micro-organisms isolated from grape berry. *Vitis* 40: 75–78.

Ruiz P, Seseña S, Izquierdo PM & Palop ML (2010) Bacterial biodiversity and dynamics during malolactic fermentation of Tempranillo wines as determined by a culture-independent method (PCR-DGGE). *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 1555-1562.

Giller PS, Hillebrand H, Berninger U-G, Gessner MO, Hawkins S, Inchausti P, Inglis C, Leslie H, Malmqvist B, Monaghan M, Morin P J & O'Mullan G (2004) Biodiversity effects on ecosystem functioning: emerging issues and their experimental test in aquatic environments. *Oikos* 104, 423–431.

Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B & Guillamón JM (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research* 157: 267–274.

Sage L, Garon D & Seigle-Murandi F (2004) Fungal Microflora and Ochratoxin A Risk in French Vineyards. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5764–5768.

Sall M (1980) Epidemiology of grape powdery mildew: a model. *Phytopathology* 70: 338–342.

Schmid F, Moser G, Müller H & Berg G (2011) Functional and Structural Microbial Diversity in Organic and Conventional Viticulture: Organic Farming Benefits Natural Biocontrol Agents. *Appl Environ Microbiol* 77: 2188–2191.

Schütte UME, Abdo Z, Bent SJ, Shyu C, Williams CJ, Pierson JD & Forney Larry J (2008) Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 365–380.

Schwieger F & Tebbe CC (1998) A New Approach To Utilize PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Appl Environ Microbiol* 64: 4870–4876.

Scott WJ (1953) Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 degrees C. *Aust. J. Biol. Sci.* 6: 549–564.

Selvakumar N, Ding BC & Wilson SM (1997) Separation of DNA strands facilitates detection of point mutations by PCR-SSCP. *BioTechniques* 22: 604–606.

Serra R, Braga A & Venâncio A (2005) Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology* 156: 515–521.

Seto A, Saito Y, Matsushige M, Kobayashi H, Sasaki Y, Tonouchi N, Tsuchida T, Yoshinaga F. et al. (2006) Effective cellulose production by a coculture of *Gluconacetobacter xylinus* and *Lactobacillus mali*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 915–921.

Shannon C (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech* 27: 379–423.

Shendure J & Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135–1145.

Shyu C, Soule T, Bent S, Foster J & Forney L (2007) MiCA: A Web-Based Tool for the Analysis of Microbial Communities Based on Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms of 16S and 18S rRNA Genes. *Microbial Ecology* 53: 562–570.

Sieiro C, Cansado J, Agrelo D, Velásquez JB & Villa TG (1990) Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol* 56: 2936–2938.

Smit E, Leeflang P, Glandorf B, van Elsas J & Wernars K (1999) Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2614 – 2621.

Smith CJ, Danilowicz BS, Clear AK, Costello FJ, Wilson B & Meijer WG (2005) T-Align, a web-based tool for comparison of multiple terminal restriction fragment length polymorphism profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 375–380.

Smith SE & Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.

Sneath PHA & Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman. San Francisco 230–234

Söderberg KH & Bååth E (1998) Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1259–1268.

Spiegelman D, Whissell G & Greer CW (2005) A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can. J. Microbiol.* 51: 355–386.

Spies CFJ, Mazzola M & McLeod A (2011) Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 131: 103–119.

Stackebrandt et al. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1043 –1047.

Staley JT & Konopka A (1985) Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review of Microbiology* 39: 321–346.

- Staudt G, Schneider W & Leidel J (1986) Phases of berry growth in *Vitis vinifera*. *Annals of Botany* 58: 789–800.
- Stephan A, Meyer AH & Schmid B (2001) Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. *Journal of Ecology* 88: 988–998.
- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM & Breznak JA (2004) New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4748–4755.
- Stummer BE, Francis IL, Zanker T, Lattey KA & Scott ES (2005) Effects of powdery mildew on the sensory properties and composition of Chardonnay juice and wine when grape sugar ripeness is standardised. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 66–76.
- Sturz A & Christie B (2003) Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil and Tillage Research* 72: 107–123.
- Subden R, Husnik J, Van Twest R, Van Der Merwe G & Van Vuuren H (2003) Autochthonous microbial population in a Niagara Peninsula icewine must. *Food Res Int* 36, 747–751.
- Surico G (2001) Towards Commonly Agreed Answers to Some Basic Questions on Esca. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 487–490.
- Svercel M, Christen D, Moëne-Loccoz Y, Duffy B & Défago G (2009) Effect of long-term vineyard monoculture on rhizosphere populations of pseudomonads carrying the antimicrobial biosynthetic genes *phlD* and/or *hcnAB*. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 25–36.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Tello J, Cordero-Bueso G, Aporta I, Cabellos JM & Arroyo T (2012) Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* 112: 302–315.
- Tessonnière H, Vidal S, Barnavon L, Alexandre H & Remize F (2009) Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology* 129: 237–243.
- Thibon C, Dubourdieu D, Darriet P & Tominaga T (2009) Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexanol content in *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon blanc and Semillon grape juice. *Food Chemistry* 114: 1359–1364.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.

Thorne ET, Young BM, Young GM, Stevenson JF, Labavitch JM, Matthews Mark A & Rost TL (2006) The structure of xylem vessels in grapevine (Vitaceae) and a possible passive mechanism for the systemic spread of bacterial disease. *American Journal of Botany* 93: 497–504.

Tom-Petersen A, Leser TD, Marsh Terence L & Nybroe O (2003) Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiology Ecology* 46: 53–62.

Venter JC et al. (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304: 66–74.

Vercesi A & Locci R (1989) Probabilistic identification of yeasts colonizing the grapevine carposphere. International symposium on yeasts. 7 (1988) 1989, vol. 5, no. spec., pp. 473-477

Verdier-Metz I, Michel V, Delbès C & Montel M-C (2009) Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiol.* 26: 305–310.

Verginer M, Leitner E & Berg G (2010) Production of Volatile Metabolites by Grape-Associated Microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8344–8350.

Viviani-Nauer A, Hoffmann-Boller P, Basler P & Gafner J (1995) Wild yeast flora on grapes of fungi disease resistant cultivars and their dynamics during fermentation. *Schweizerische Zeitschrift fuer Obst-und Weinbau* 390–393.

Voight K, Cigelnic E, O'Donnell K, (1999) Phylogeny and PCR Identification of Clinically Important Zygomycetes Based on Nuclear Ribosomal-DNA Sequence Data. *J of Clin Microbiol* 37, 3957-3964.

de Vos CR, Lubberding HJ & Bienfait HF (1986) Rhizosphere Acidification as a Response to Iron Deficiency in Bean Plants. *Plant Physiol* 81: 842–846.

Wang Q-M, Li Juan, Wang S-A & Bai F-Y (2008) Rapid Differentiation of Phenotypically Similar Yeast Species by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2604–2611.

Wayne LG et al. (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37: 463–464.

Wei G (1996) Induced Systemic Resistance to Cucumber Diseases and Increased Plant Growth by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Field Conditions. *Phytopathology* 86: 221.

Weller DM (1988) Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379–407.

Weller D M, Landa BB, Mavrodi OV, Schroeder KL, De La Fuente L, Blouin-Bankhead S, Allende-Molar R, Bonsall RF, Mavrodi DV, & Thomashow LS (2007) Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in plant defense. *Plant Biol.* 9:4–20.



- West ER, Cother EJ, Steel CC & Ash GJ (2010) The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can. J. Microbiol.* 56: 209–216.
- Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487–511.
- Whitelaw-Weckert MA, Rahman L, Hutton RJ & Coombes N (2007) Permanent swards increase soil microbial counts in two Australian vineyards. *Applied Soil Ecology* 36: 224–232.
- Whitelaw-Weckert MA, Whitelaw ES, Rogiers SY, Quirk L, Clark AC & Huang CX (2011) Bacterial inflorescence rot of grapevine caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathology* 60: 325–337.
- Whittaker RH (1962) Classification of Natural Communities. *Botanical Review* 28: 1–239.
- Wintzingerode F, Göbel UB & Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 213–229.
- Woese C R (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221–271.
- Woese C R, Kandler O & Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576–4579.
- Wu Y, Stulp RP, Elfferich P, Osinga J, Buys CH & Hofstra RM (1999) Improved mutation detection in GC-rich DNA fragments by combined DGGE and CDGE. *Nucleic Acids Res* 27: e9.
- Yanagida F, Sriannual S & Chen Y-S (2008) Isolation and characteristics of lactic acid bacteria from *koshu* vineyards in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 47: 134–139.
- Yang C-H & Crowley DE (2000) Rhizosphere Microbial Community Structure in Relation to Root Location and Plant Iron Nutritional Status. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 345 – 351.
- Yannarell AC & Triplett W (2005) Geographic and Environmental Sources of Variation in Lake Bacterial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 227 –239.
- Zahavi T, Droby S, Cohen L, Weiss B & Ben-Arie R (2002) Characterization of the yeast flora on the surface of grape berries in Israel. *Vitis* 41: 203–208.
- Zamora MC, Chirife J & Roldán D (2006) On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey. *Food Control* 17: 642–647.
- Zehr EI (1996) Bacterial Spot of Peach as Influenced by Water Congestion, Leaf Wetness Duration, and Temperature. *Plant Disease* 80: 339.
- Zevenhuizen LPTM, Dolging J, Eshuis EJ & Scholter IJ (1979) Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microb Ecol* 5:139–146.

Zimmerli B & Dick R (1996) Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit Contam* 13: 655–668.

Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P & Geremia RA (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb. Ecol.* 54: 203–216.

Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A & Masneuf-Pomarede I (2008) Dynamics and diversity of non-Saccharomyces yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125: 197–203.

Zott K, Claisse O, Lucas P, Coulon J, Lonvaud-Funel A & Masneuf-Pomarede I (2010) Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology* 27: 559–567.

## ANNEXES

## ANNEXE 1

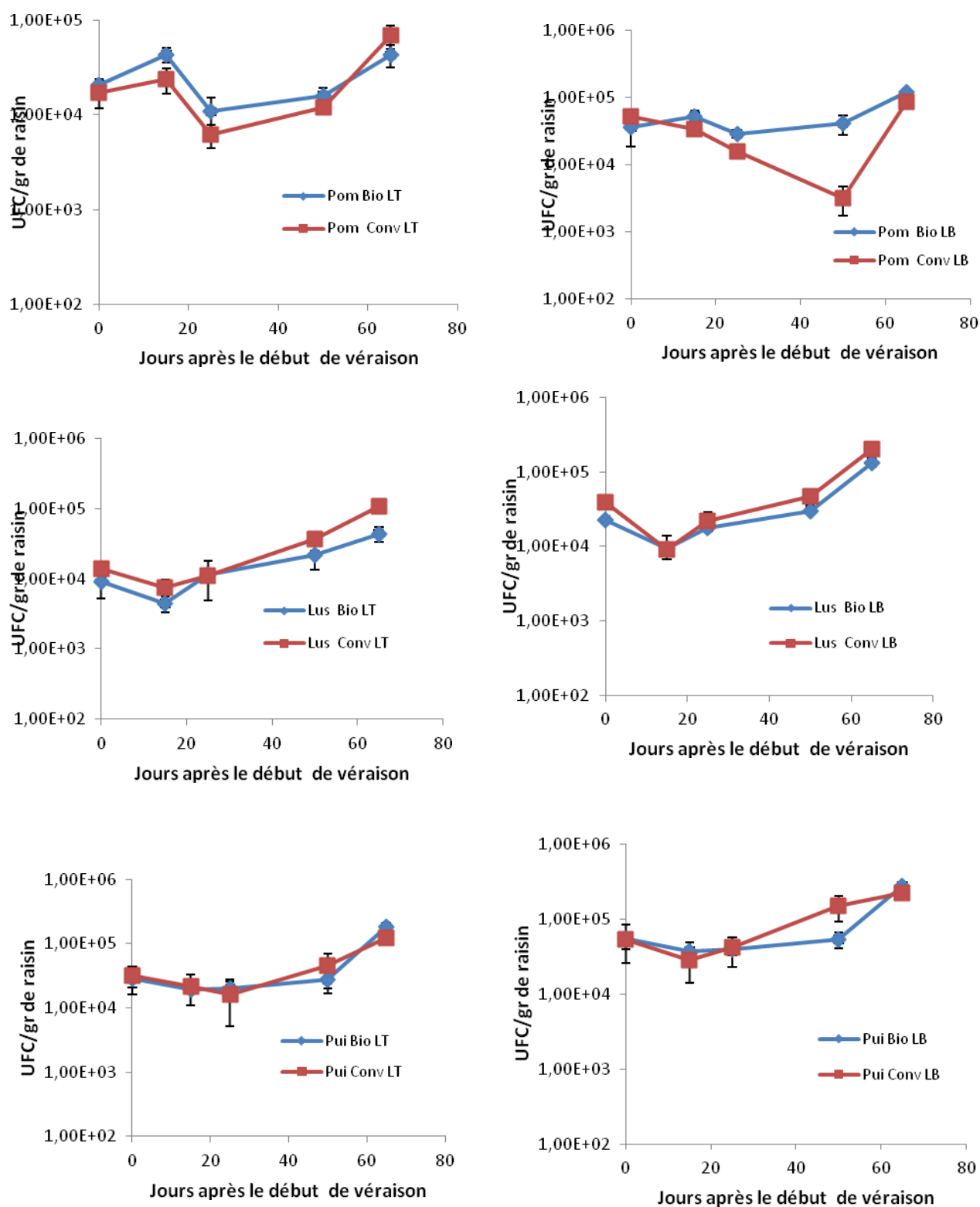
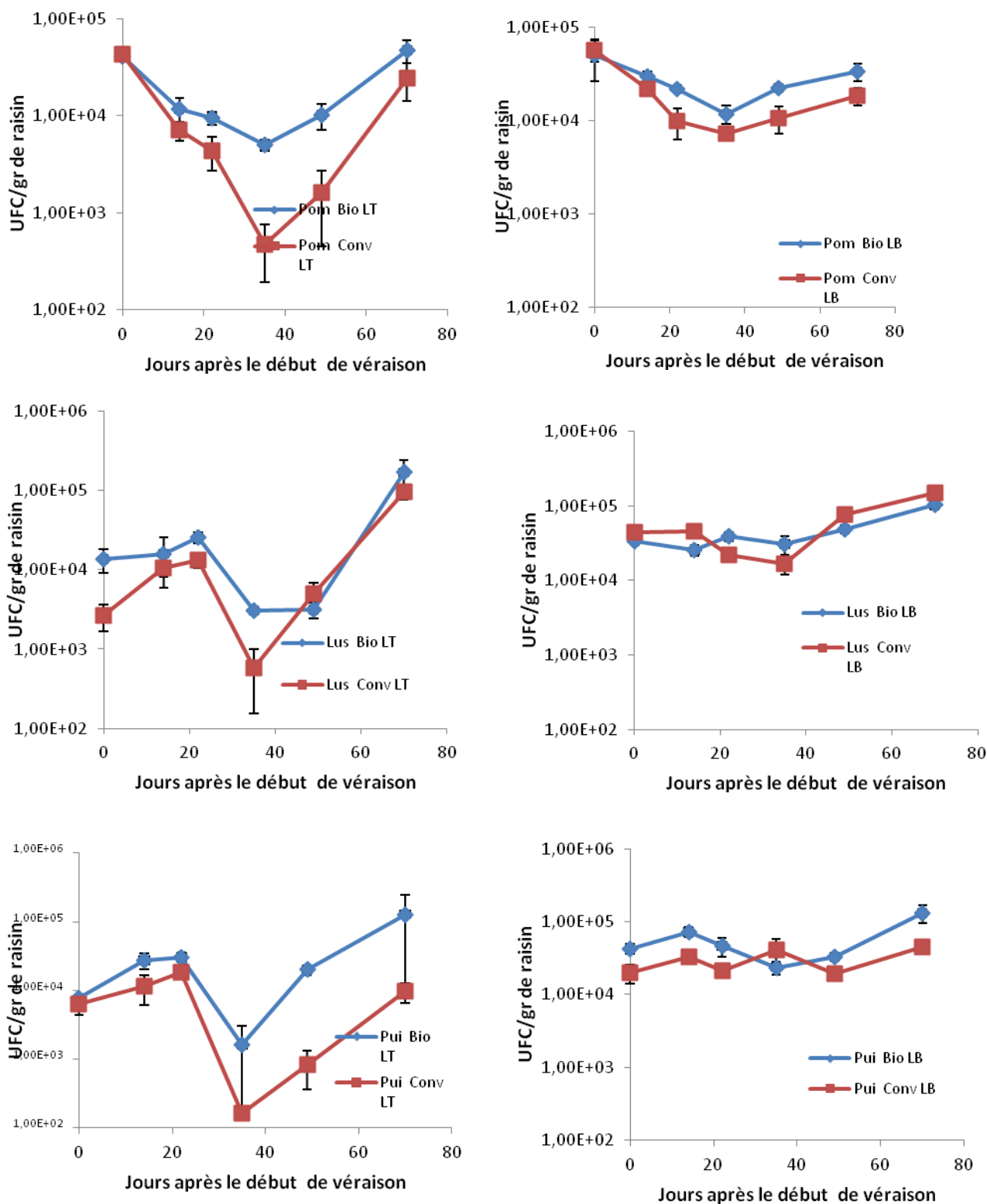
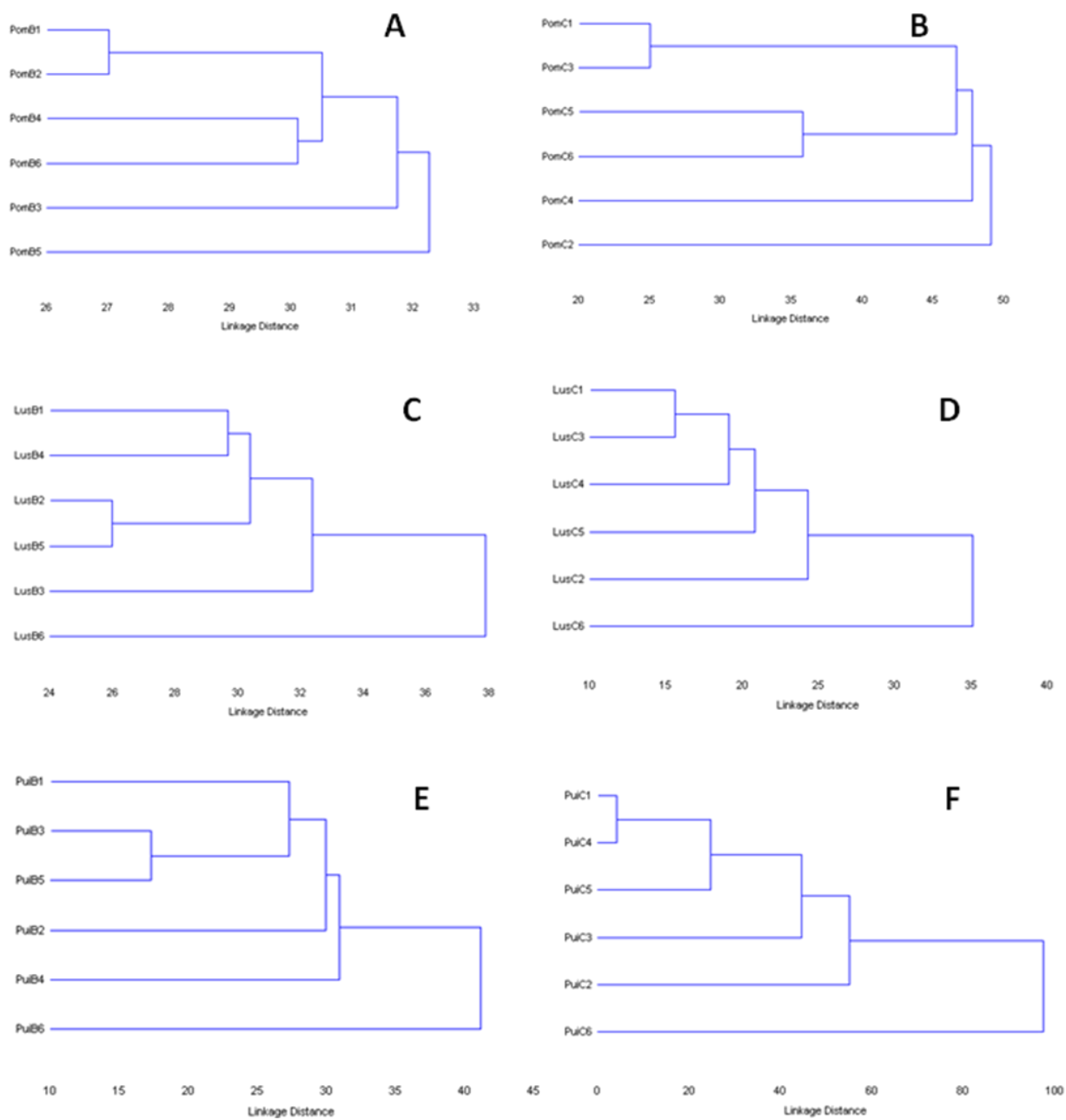


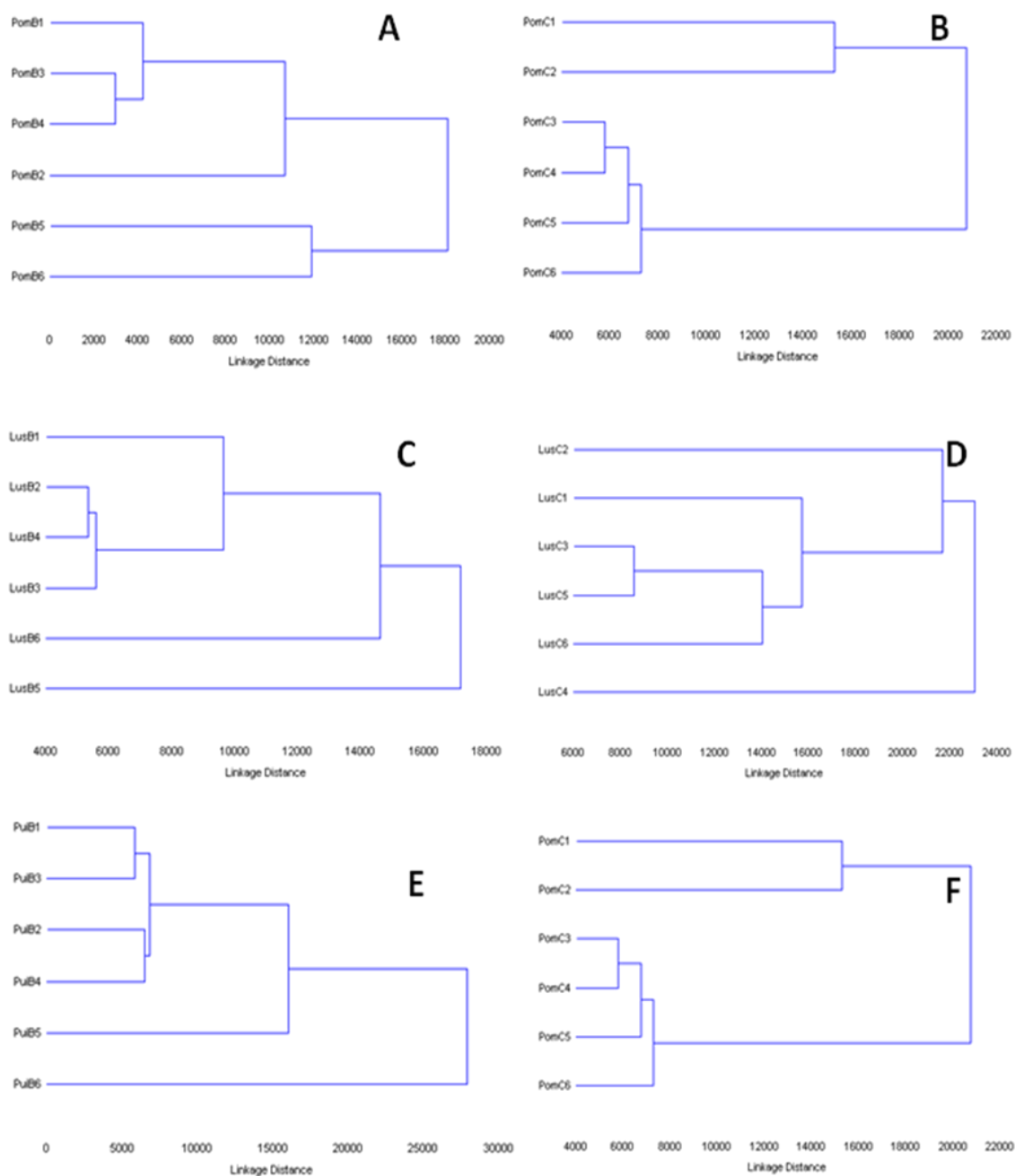
Figure I: Évolution des populations cultivables sur milieu LT et LB<sup>1/10</sup> pour chaque terroir de la région du Libournais en 2009. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.



**Figure II:** Evolution des populations cultivables sur milieu LT et LB 1/10 pour chaque de terroir de la région du Libournais en 20120. Les valeurs représentent la moyenne de 9 dénombrements maximum par échantillons.

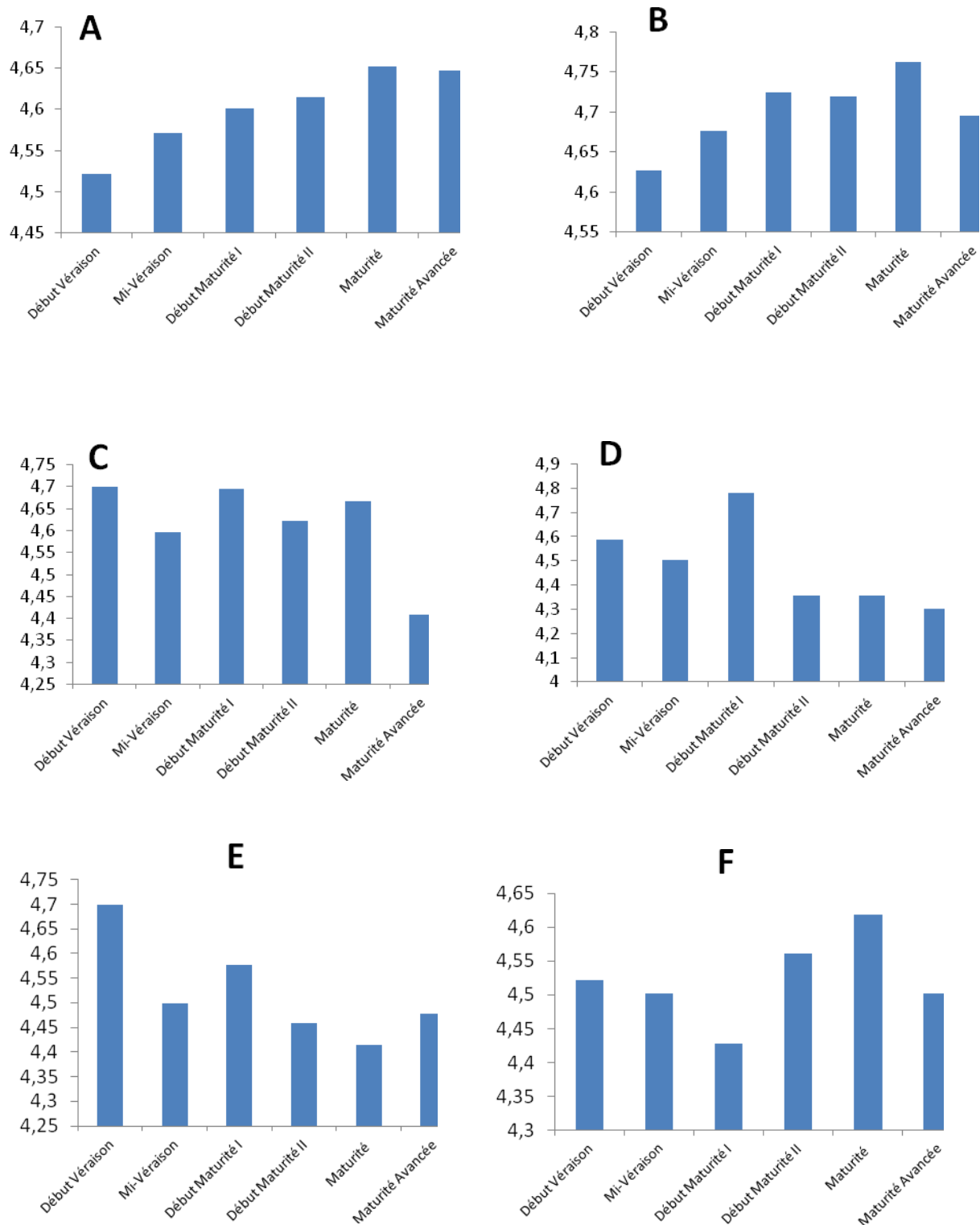


**Figure III :** Classification ascendante hiérarchique des profils T-RFLP des échantillons provenant des parcelles selon le stade phénologique (1=début véraison à 6=maturité avancée) : A=Pomerol mode conduite biologique, B= Pomerol mode de conduite conventionnel. C=Lussac mode de conduite biologique, D=Lussac mode de conduite conventionnel, E=Puisseguin mode de conduite biologique, F= Puisseguin mode de conduite conventionnel. Dendrogramme construit en utilisant la méthode UPGMA à partir d'une matrice de distance euclidienne. Campagne de 2010.



**Figure IV:** Classification ascendante hiérarchique des profils CE-SSCP des échantillons provenant des parcelles, selon le stade phénologique (1=début véraison à 6=maturité avancée) : A=Pomerol mode conduite biologique, B= Pomerol mode de conduite conventionnel. C=Lussac mode de conduite biologique, D=Lussac mode de conduite conventionnel, E=Puisseguin mode de conduite biologique, F= Puisseguin mode de conduite conventionnel. Dendrogramme construit en utilisant la méthode UPGMA à partir d'une matrice de distance euclidienne. Campagne de 2010.





**Figure V:** Indice de biodiversité de Shannon, calculé à partir des profils CE-SSCP des échantillons provenant des parcelles, aux différents stades phénologiques : A=Pomerol mode conduite biologique, B= Lussac mode de conduite biologique. C= Puisseguin mode de conduite biologique, D= Pomerol mode de conduite conventionnel, E= Lussac mode de conduite conventionnel, F= Puisseguin mode de conduite conventionnel. Campagne de 2010

## ANOVA – Effet stade phénologique

## Populations cultivables sur les différents milieux de culture : Campagne 2009

<b>A - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 506.44, df = 40.00				
Phénologiques raisin	1	2	3	4
Déb Véraison	4.17	****		
Déb Maturité	3.81		****	
Mi Véraison	4.45	****		
Maturité	4.54	****		
Mat. Avancé	5.22			****
Probabilités approximatives				
	Déb Véraison	Mi Véraison	Déb Maturité	Maturité
Déb Véraison		0.00012	0.00316	0.00012
Mi Véraison	0.00012		0.00125	0.35620
Déb Maturité	0.00316	0.00125		0.00013
Maturité	0.00012	0.35620	0.00013	
Mat. Avancé	0.00012	0.00012	0.00012	0.00012

<b>B - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 12283.10, df = 40.00				
Phénologiques raisin	1	2	3	
Déb Véraison	4.11	****		
Déb Maturité	4.49	****	****	
Maturité	4.86	****		
Mi Véraison	4.79	****		
Mat. Avancé	6.13			****
Probabilités approximatives				
	Déb Véraison	Mi Véraison	Déb Maturité	Maturité
Déb Véraison		0.016645	0.245359	0.039966
Mi Véraison	0.016645		0.194213	0.708827
Déb Maturité	0.245359	0.194213		0.350697
Maturité	0.039966	0.708827	0.350697	
Mat. Avancé	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

<b>C - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 2563.40, df = 26100				
Phénologiques raisin	1	2	3	
Déb Maturité	4.11	****		
Mi Véraison	4.30	****	****	
Déb Véraison	4.31	****		
Maturité	4.43	****		
Mat. Avancé	4.98			****
Probabilités approximatives				
	Déb Véraison	Mi Véraison	Déb Maturité	Maturité
Déb Véraison		0.97963	0.03086	0.30412
Mi Véraison	0.97963		0.13485	0.09216
Déb Maturité	0.03086	0.13485		0.00003
Maturité	0.30412	0.09216	0.00003	
Mat. Avancé	0.00002	0.00002	0.00002	0.00002

<b>D - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 4587.90, df = 260.00				
Phénologiques raisin	1	2	3	
Déb Maturité	4.44	****		
Mi Véraison	4.46	****		
Déb Véraison	4.63		****	
Maturité	4.72		****	
Mat. Avancé	5.24			****
Probabilités approximatives				
	Déb Véraison	Mi Véraison	Déb Maturité	Maturité
Déb Véraison		0.01576	0.01497	0.99909
Mi Véraison	0.01576		1.00000	0.00711
Déb Maturité	0.01497	1.00000		0.00675
Maturité	0.99909	0.00711	0.00675	
Mat. Avancé	0.00002	0.00002	0.00002	0.00002

**Tableau I:** Effet du stade de phénologique sur la population cultivable sur milieu LT (A) et sur milieu LB (B), pour parcelle INRA-Grande Ferrade. Campagne 2009.

<b>A - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 878.40, df = 16.00		
Phénologiques raisin	1	2
Maturité	3.94	****
Mat. avancée	4.26	****
Probabilités approximatives		
	Maturité	Mat. avancée
Maturité		0.000125
Mat. avancée	0.000125	

<b>B - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 55.55, df = 16.00		
Phénologiques raisin	1	2
Maturité	2.24	****
Mat. avancée	2.97	****
Probabilités approximatives		
	Maturité	Mat. avancée
Maturité		0.000488
Mat. avancée	0.000488	

**Tableau II:** Effet du stade de phénologique sur la population cultivable sur milieu LT (C) et sur milieu LB (D), pour les parcelles du Libournais. Campagne 2009.

<b>C - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 76.45, df = 105.00		
Phénologiques raisin	1	2
Maturité	2.21	****
Mat. avancée	2.56	****
Probabilités approximatives		
	Maturité	Mat. avancée
Maturité		0.002429
Mat. avancée	0.002429	

<b>D - Stades</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes : alpha=0.05, MS = 64.90, df = 105.00		
Phénologiques raisin	1	2
Maturité	1.26	****
Mat. avancée	2.43	****
Probabilités approximatives		
	Maturité	Mat. avancée
Maturité		0.000109
Mat. avancée	0.000109	

**Tableau III:** Populations sur milieu BA (A) et BL (B) aux stades de maturité+e et maturité avancée dans la parcelle INRA et sur milieu BA (C) et BL (D) pour les parcelles du Libournais Campagne 2009.

## Populations cultivables sur les différents milieux de culture : Campagne 2010

A - Stades		Groupes homogènes :alpha=0.05, MS = 174.57, df = 64.00				
Phénologiques	log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin	1	2	3	4	5
Déb Véraison	3.60	****				
Déb Maturité II	3.60	****				
Maturité	3.78	****		****		
Ferm. grappe	3.94		****	****		
Mi Véraison	3.99		****			
Mat. Avancé II	4.01		****			
Déb Maturité I	4.18				****	
Mat. Avancé I	4.70					****

Probabilités approximatives								
	Ferm grappe	Déb Véraison	Mi Véraison	Déb Maturité I	Déb Maturité II	Maturité	Mat. Avancé I	Mat. Avancé II
Ferm grappe		0.0004	0.9830	0.0008	0.0004	0.1747	0.0001	0.9120
Déb Véraison	0.0004		0.0001	0.0001	1.0000	0.3624	0.0001	0.0001
Mi Véraison	0.9830	0.0001		0.0135	0.0001	0.0172	0.0001	1.0000
Déb Maturité I	0.0008	0.0001	0.0135		0.0001	0.0001	0.0001	0.0348
Déb Maturité II	0.0004	1.0000	0.0001	0.0001		0.3841	0.0001	0.0001
Maturité	0.1747	0.3624	0.0172	0.0001	0.3841		0.0001	0.0063
Mat. Avancé I	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001
Mat. Avancé II	0.9120	0.0001	1.0000	0.0348	0.0001	0.0063	0.0001	

B - Stades		Groupes homogènes :alpha=0.05, MS =590.05, df = 64.00			
Phénologiques	log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin	1	2	3	4
Déb Véraison	4.27	****			
Déb Maturité II	4.39	****	****		
Maturité	4.21	****	****	****	
Ferm. grappe	4.14	****	****	****	
Mi Véraison	4.43	****	****	****	
Mat. Avancé II	4.23		****	****	
Déb Maturité I	4.26			****	****
Mat. Avancé I	4.60				****

Probabilités approximatives								
	Ferm grappe	Déb Véraison	Mi Véraison	Déb Maturité I	Déb Maturité II	Maturité	Mat. Avancé I	Mat. Avancé II
Ferm grappe		0.6569	0.0029	0.9549	0.0240	0.9779	0.0001	0.9015
Déb Véraison	0.6569		0.2812	0.9980	0.7139	0.9935	0.0002	0.9998
Mi Véraison	0.0029	0.2812		0.0695	0.9968	0.0494	0.0659	0.1085
Déb Maturité I	0.9549	0.9980	0.0695		0.3065	1.0000	0.0001	1.0000
Déb Maturité II	0.0240	0.7139	0.9968	0.3065		0.2404	0.0094	0.4134
Maturité	0.9779	0.9935	0.0494	1.0000	0.2404		0.0001	1.0000
Mat. Avancé I	0.0001	0.0002	0.0659	0.0001	0.0094	0.0001		0.0001
Mat. Avancé II	0.9015	0.9998	0.1085	1.0000	0.4134	1.0000	0.0001	

C - Stades		Groupes homogènes :alpha=0.05, MS = 4264.80, df = 313.00		
Phénologiques	log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin	1	2	3
Déb. Maturité II	3.29		****	
Maturité	3.84		****	
Mi Véraison	4.15	****		
Déb Véraison	4.28	****		
Déb. Maturité I	4.23	****		
Mat. Avancé	4.90			****

Probabilités approximatives						
	Déb Véraison	Mi Véraison	Début Maturité I	Début Maturité II	Maturité	Mat. Avancée
Début Véraison		0.96530	1.00000	0.00002	0.00071	0.00002
Mi-Véraison	0.96530		0.95820	0.00002	0.01461	0.00002
Début Maturité I	1.00000	0.95820		0.00002	0.00061	0.00002
Début Maturité II	0.00002	0.00002	0.00002		0.09025	0.00002
Maturité	0.00071	0.01461	0.00061	0.09025		0.00002
Mat. Avancée	0.00002	0.00002	0.00002	0.00002	0.00002	

D - Stades		Groupes homogènes :alpha=0.05, MS = 3356.80, df = 313.00			
Phénologiques	log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin	1	2	3	4
Déb. Maturité II	4.34			****	
Déb Maturité I	4.43	****		****	
Maturité	4.55	****	****		
Mi Véraison	4.58	****	****		
Déb Véraison	4.59		****		
Mat. Avancé	4.91				****

Probabilités approximatives						
	Déb Véraison	Mi Véraison	Début Maturité I	Début Maturité II	Maturité	Mat. Avancée
Début Véraison		0.99922	0.01941	0.00005	0.71816	0.00002
Mi-Véraison	0.99922		0.05667	0.00017	0.89878	0.00002
Déb. Maturité I	0.01941	0.05667		0.59795	0.49898	0.00002
Déb. Maturité II	0.00005	0.00017	0.59795		0.01049	0.00002
Maturité	0.71816	0.89878	0.49898	0.01049		0.00002
Mat. Avancée	0.00002	0.00002	0.00002	0.00002	0.00002	

Tableau IV: Effet du stade de phénologique sur la population cultivable sur milieu LT (A) et sur milieu LB (B), pour la parcelle INRA. Campagne 2010.

Tableau V: Effet du stade de phénologique sur la population cultivable sur milieu LT (C) et sur milieu LB (D), pour les parcelles du Libournais. Campagne 2010.

A - Stades		Groupes homogènes :alpha=0.05, MS = 25.90, df = 24.00	
Phénologiques	log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin	1	
Maturité	2.62	****	
Mat. Avancée I	2.38	****	
Mat. Avancée II	2.51	****	
Probabilités approximatives			
	Maturité	Mat. Avancée I	Mat. Avancée II
Maturité		0.296	0.861
Mat. Avancée I	0.296		0.581
Mat. Avancée II	0.861	0.581	

B - Stades		Groupes homogènes :alpha=0.05, MS = 42.10, df = 76.00	
Phénologiques	log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin	1	
Maturité	2.03	****	
Mat. avancée	2.18	****	
Probabilités approximatives			
	Maturité	Mat. avancée	
Maturité		0.923968	
Mat. avancée	0.923968		

Tableaux VI: Effet du stade de phénologique sur la population cultivable sur milieu BA pour la parcelle INRA (A) et pour les parcelles et pour les six parcelles de la région de Libournais. Campagne 2010.

## Indices de biodiversité de Shannon et AWCD

<b>A - Stades</b> moyenne des Groupes homogènes :alpha=0.05, M S =.001, df = 10.0						<b>B - Stades</b> moyenne des Groupes homogènes :alpha=0.05, M S =.013, df = 10.0					
Phénologiques		prélèvement		1	2	Phénologiques		prélèvement		1	2
Mi-Véraison	3.29			****		Déb Maturité I	3.03			****	
Déb Maturité I	3.32			****		Maturité	3.10			****	****
Déb Véraison	3.33			****	****	Mi-Véraison	3.23			****	****
Maturité	3.34			****	****	Déb Véraison	3.28			****	****
Mat Avancée	3.41				****	Mat Avancée	3.42				****
Probabilités approximatives						Probabilités approximatives					
	Déb Véraison	Mi Véraison	Maturité	Mat. Avancé	Déb Maturité I		Déb Véraison	Mi-Véraison	Maturité	Mat Avancée	Déb Maturité I
Déb Véraison		0.660805	0.999863	0.087310	0.971170	Déb Véraison		0.985265	0.525638	0.769158	0.239326
Mi Véraison	0.660805		0.574797	0.010765	0.936340	Mi-Véraison	0.985265		0.801345	0.491296	0.453251
Maturité	0.999863	0.574797		0.110065	0.937345	Maturité	0.525638	0.801345		0.110973	0.965000
Mat. Avancé	0.087310	0.010765	0.110065		0.034316	Mat Avancée	0.769158	0.491296	0.110973		0.041556
Déb Maturité I	0.971170	0.936340	0.937345	0.034316		Déb Maturité I	0.239326	0.453251	0.965000	0.041556	

<b>C - Stades</b> moyenne des Groupes homogènes :alpha=0.05, M S =0.07, df = 10.0						<b>D - Stades</b> moyenne des Groupes homogènes :alpha=0.05, M S =0.09, df = 10.0					
Phénologiques		prélèvement		1	2	Phénologiques		prélèvement		1	2
Maturité	3.19			****		Maturité	3.05			****	
Déb Véraison	3.22			****		Déb Maturité I	3.26			****	
Mi-Véraison	3.22			****		Mi-Véraison	3.29			****	
Déb Maturité I	3.33			****		Déb Véraison	3.30			****	
Mat Avancée	5.97				****	Mat Avancée	4.26				****
Probabilités approximatives						Probabilités approximatives					
	Déb Véraison	Mi Véraison	Déb Maturité I	Maturité	Mat Avancé		Déb Véraison	Mi-Véraison	Maturité	Mat Avancée	Déb Maturité I
Déb Véraison		1.000000	0.999943	0.000176	0.986427	Déb Véraison		0.999999	0.835646	0.019313	0.999780
Mi-Véraison	1.000000		0.999881	0.000176	0.988819	Mi-Véraison	0.999999		0.855020	0.018076	0.999931
Maturité	0.999943	0.999881		0.000176	0.969635	Maturité	0.835646	0.855020		0.004237	0.905199
Mat Avancée	0.000176	0.000176	0.000176		0.000176	Mat Avancée	0.019313	0.018076	0.004237		0.014888
Déb Maturité I	0.986427	0.988819	0.969635	0.000176		Déb Maturité I	0.999780	0.999931	0.905199	0.014888	

**Tableaux VII:** Effet du stade de phénologique sur les indices de biodiversité de Shannon. **A** : parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B** : parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C** : parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D** : parcelle de Puisseguin en mode de conventionnel. Campagne 2010

<b>A - Stades</b> moyenne des Groupes homogènes :alpha= 0.05, M S =.008 , df = 10.0			<b>B - Stades</b> moyenne des Groupes homogènes :alpha= 0.05, M S =0.08 , df = 10.0				
Phénologiques	prélèvement	1	2	Phénologiques	prélèvement	1	2
Mi-Véraison	1.07	****		Déb Maturité I	0.45	****	
Déb Maturité I	1.20	****		Maturité	0.70	****	****
Déb Véraison	1.20	****		Mi-Véraison	0.86	****	****
Maturité	1.21	****		Déb Véraison	1.05	****	****
Mat Avancée	1.57		****	Mat Avancée	1.29		****
Probabilités approximatives							
	Déb Véraison	Mi-Véraison	Déb Maturité I	Maturité	Mat Avancée		
Déb Véraison		0.431560	0.999999	0.999982	0.004628		
Mi-Véraison	0.431560		0.453802	0.387124	0.000541		
Déb Maturité I	0.999999	0.453802		0.999915	0.004355		
Maturité	0.999982	0.387124	0.999915		0.005272		
Mat Avancée	0.004628	0.000541	0.004355	0.005272			
Probabilités approximatives							
	Déb Véraison	Mi-Véraison	Déb Maturité I	Maturité	Mat Avancée		
Déb Véraison		0.919778	0.163479	0.598375	0.855995		
Mi-Véraison	0.919778		0.476968	0.960847	0.423139		
Déb Maturité I	0.163479	0.476968		0.833013	0.036345		
Maturité	0.598375	0.960847	0.833013		0.176181		
Mat Avancée	0.855995	0.423139	0.036345	0.176181			
C - Stades moyenne des Groupes homogènes :alpha= 0.05, M S =0.02 , df = 10.0							
Phénologiques	prélèvement	1	2	Phénologiques	prélèvement	1	2
Maturité	0.58	****		Maturité	0.47	****	
Mi-Véraison	0.77	****		Mat Avancée	0.54	****	
Déb Véraison	0.77	****		Mi-Véraison	0.81	****	
Déb Maturité I	0.94	****		Déb Maturité I	0.96	****	
Mat Avancée	1.34		****	Déb Véraison	0.98	****	
Probabilités approximatives							
	Déb Véraison	Mi-Véraison	Déb Maturité I	Maturité	Mat Avancée		
Déb Véraison		1.000000	0.653042	0.519769	0.005863		
Mi-Véraison	1.000000		0.643825	0.528694	0.005725		
Déb Maturité I	0.653042	0.643825		0.079006	0.046915		
Maturité	0.519769	0.528694	0.079006		0.000754		
Mat Avancée	0.005863	0.005725	0.046915	0.000754			
Probabilités approximatives							
	Déb Véraison	Mi-Véraison	Déb Maturité I	Maturité	Mat Avancée		
Déb Véraison		0.943269	0.999976	0.241030	0.347835		
Mi-Véraison	0.943269		0.965483	0.581901	0.736906		
Déb Maturité I	0.999976	0.965483		0.275635	0.392842		
Maturité	0.241030	0.581901	0.275635		0.998509		
Mat Avancée	0.347835	0.736906	0.392842	0.998509			
D - Stades moyenne des Groupes homogènes :alpha= 0.05, M S = 0.09 , df = 10.0							
Phénologiques	prélèvement	1	2	Phénologiques	prélèvement	1	2

**Tableaux VIII** : Effet du stade de phénologique sur les AWCD. **A** : parcelle de Pomerol en mode de conduite biologique ; **B** : parcelle de Puisseguin en mode de conduite biologique, **C** : parcelle de Pomerol en mode de conduite conventionnel, **D** : parcelle de Puisseguin en mode de conventionnel. Campagne 2010.

## ANNEXE 2

## Populations cultivables sur les différents milieux de culture- effet mode de conduite

## Campagne 2009

A- Début			B- Début			C - Début		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 1714.5 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 40.77 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 684.49 , df = 16		
Véraison			Véraison			Véraison		
1			1			1		
Conventionnel	4.32	****	Biologique	3.97	****	Conventionnel	4.51	****
Biologique	4.24	****	Conventionnel	4.15	****	Biologique	4.45	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique		0.109713	Biologique		0.0002	Biologique		0.795
Conventionnel		0.109713	Conventionnel		0.0002	Conventionnel		0.795
Mi-Véraison			Mi-Véraison			Mi-Véraison		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =428.85 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 42.68 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS= 902.25 , df = 16		
1			1			1		
2			2			1		
Conventionnel	4.64	****	Biologique	3.65	****	Biologique	4.29	****
Biologique	4.38	****	Conventionnel	3.87	****	Conventionnel	4.34	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique		0.000	Biologique		0.0002	Biologique		0.661
Conventionnel		0.0002	Conventionnel		0.0002	Conventionnel		0.661
Début Maturité			Début Maturité			Début Maturité		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =199.95 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =250.68 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS= 1050.2, df = 16		
1			1			1		
2			2			1		
Conventionnel	4.04	****	Conventionnel	4.05	****	Conventionnel	4.22	****
Biologique	3.79	****	Biologique	4.07	****	Biologique	4.30	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique		0.002	Biologique		0.4224	Biologique		0.254
Conventionnel		0.002	Conventionnel		0.4224	Conventionnel		0.254
Maturité			Maturité			Maturité		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =124.73 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =346.05 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS= 2144.7, df = 16		
1			1			1		
2			2			1		
Conventionnel	4.20	****	Biologique	4.35	****	Biologique	4.44	****
Biologique	4.08	****	Conventionnel	4.57	****	Conventionnel	4.65	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique		0.008	Biologique		0.0003	Biologique		0.069
Conventionnel		0.008	Conventionnel		0.0003	Conventionnel		0.069
Maturité Avancée			Maturité Avancée			Maturité Avancée		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 1714.5 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =19.01 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 337.55 , df = 16		
1			1			1		
2			2			1		
Biologique	4.63	****	Biologique	4.64	****	Conventionnel	5.09	****
Conventionnel	4.84	****	Conventionnel	5.04	****	Biologique	5.26	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique		0.196	Biologique		0.0002	Biologique		0.0002
Conventionnel		0.196	Conventionnel		0.0002	Conventionnel		0.0002

Tableaux I: ANOVA, effet mode de conduite sur la population cultivable sur milieu LT concernant les parcelles de Pomerol (A), Lussac (B) et Puisseguin (c) au cours des différents stades. Campagne 2009.

<b>A- Début</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =1107.1 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>B- Début</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =118.13 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>C - Début</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =962.25 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>					
<b>Véraison</b>		1		2		1		1		1			
Biologique	4.55	****				Biologique	4.36	****			Biologique	4.73	****
Conventionnel	4.72		****			Conventionnel	4.59		****		Conventionnel	4.75	****
<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>					
		<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>				<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>			
Biologique			0.013			Biologique			0.0002		Biologique		0.795
Conventionnel			0.013			Conventionnel			0.0002		Conventionnel		0.795
<b>Mi-Véraison</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS = 469.64 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Mi-Véraison</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =53.763 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Mi-Véraison</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS=684.49 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>					
<b>Conventionnel</b>		1		2		1		2		1			
Conventionnel	4.53	****				Conventionnel	3.95	****			Conventionnel	4.45	****
Biologique	4.71		****			Biologique	3.98		****		Biologique	4.58	****
<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>					
		<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>				<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>			
Biologique			0.0008			Biologique			0.0006		Biologique		0.6608
Conventionnel			0.0008			Conventionnel			0.0006		Conventionnel		0.6608
<b>Début Maturité</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =88,798 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Début Maturité</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =561.85 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Début Maturité</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS=1050.2 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>					
<b>Conventionnel</b>		1		2		1		2		1			
Conventionnel	4.20	****				Conventionnel	4.26	****			Conventionnel	4.60	****
Biologique	4.46		****			Biologique	4.35		****		Biologique	4.62	****
<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>					
		<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>				<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>			
Biologique			0.0002			Biologique			0.172		Biologique		0.254
Conventionnel			0.0002			Conventionnel			0.172		Conventionnel		0.254
<b>Maturité</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =588.88 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Maturité</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS = 281.25 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Maturité</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS=2144.7 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>					
<b>Conventionnel</b>		1		2		1		2		1			
Conventionnel	3.51	****				Conventionnel	4.48	****			Conventionnel	4.73	****
Biologique	4.61		****			Biologique	4.68		****		Conventionnel	5.18	****
<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>					
		<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>				<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>			
Biologique			0.0002			Biologique			0.0002		Biologique		0.069
Conventionnel			0.0002			Conventionnel			0.0002		Conventionnel		0.069
<b>Maturité Avancée</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS =443.50 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Maturité Avancée</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS = 765.92 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>				<b>Maturité Avancée</b> <small>log<sub>10</sub> ufc.gr de raisin MS = 337.55 , df = 16</small> <small>Groupes homogènes :alpha= 0.05,</small>					
<b>Conventionnel</b>		1		2		1		2		1			
Conventionnel	4.94	****				Conventionnel	5.12	****			Conventionnel	5.35	****
Biologique	5.07		****			Biologique	5.31		****		Biologique	5.44	****
<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>				<b>Probabilités approximatives</b>					
		<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>				<b>Biologique</b>		<b>Conventionnel</b>			
Biologique			0.0003			Biologique			0.0002		Biologique		0.0002
Conventionnel			0.0003			Conventionnel			0.0002		Conventionnel		0.0002

**Tableaux II:** ANOVA, effet mode de conduite sur la population cultivable sur milieu LB1/10 concernant les parcelles de Pomerol (A), Lussac (B) et Puisseguin (c) au cours des différents stades. Campagne 2009.



<b>A-Maturité</b>			<b>B-Maturité</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 3.8 , df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 18.81 , df = 16		
	1	2		1	2
Conventionnel	1.19	****	Conventionnel	1.77	****
Biologique	2.34	****	Biologique	2.73	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel		Biologique	Conventionnel
Biologique		0.0002	Biologique		0.0002
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0002	

<b>Maturité Avancée</b>			<b>Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =13.6, df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =14.75, df = 16		
	1	2		1	2
Conventionnel	1.69	****	Conventionnel	1.60	****
Biologique	2.56	****	Biologique	2.66	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel		Biologique	Conventionnel
Conventionnel		0.0002	Biologique		0.0002
Biologique	0.0002		Conventionnel	0.0002	

<b>C-Maturité</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS 6.31 = , df = 16		
	1	2
Biologique	1.66	****
Conventionnel	2.08	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Biologique		0.003
Conventionnel	0.003	

<b>Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS=141.33 , df = 16		
	1	
Biologique	2.48	****
Conventionnel	2.97	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Biologique		0.1079
Conventionnel	0.1079	

**Tableaux III:** ANOVA, effet mode de conduite sur la population cultivable sur milieu BA concernant les parcelles de Pomerol (A), Lussac (B) et Puisseguin (c) au cours des différents stades. Campagne 2009.

<b>A-Maturité Avancée</b>			<b>B-Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin			log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =30.78, df = 16			Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =3.14, df = 16		
	1	2		1	2
Conventionnel	1.14	****	Conventionnel	1.78	****
Biologique	2.24	****	Conventionnel	2.03	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel		Biologique	Conventionnel
Conventionnel		0.013	Biologique		0.003
Biologique	0.013		Conventionnel	0.003	

**Tableaux IV:** ANOVA, effet mode de conduite sur la population cultivable sur milieu BL concernant les parcelles de Pomerol (A), Lussac (B) au stade de maturité avancée. Campagne 2009.

## Campagne 2010

A- Début			Début Maturité II		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 22.5, df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 29.16 , df = 16		
1 2			1 2		
Véraison		1	Conventionnel	2.67	****
Biologique	4.62	****	Biologique	3.70	****
Conventionnel	4.63	****	Probabilités approximatives		
Probabilités approximatives			Biologique Conventionnel		
Biologique Conventionnel			Biologique Conventionnel		
Biologique 0.131			Biologique 0.0002		
Conventionnel 0.131			Conventionnel 0.0002		
Mi-Véraison			Maturité		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 165.5, df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =205.6 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	3.85	****	Conventionnel	3.20	****
Biologique	4.07	****	Biologique	4.01	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique Conventionnel			Biologique Conventionnel		
Biologique 0.0017			Biologique 0.0002		
Conventionnel 0.0017			Conventionnel 0.0002		
Début Maturité I			Maturité Avancée		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =103.1 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =865.5 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	3.64	****	Conventionnel	4.39	****
Biologique	3.98	****	Biologique	4.67	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique Conventionnel			Biologique onventionnel		
Biologique 0.002			Biologique 0.001		
Conventionnel 0.002			Conventionnel 0.001		

B- Début			Début Maturité II		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 274.66 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =40.68 , df = 16		
1 2			1 2		
Véraison		1 2	Conventionnel	2.76	****
Conventionnel	3.42	****	Biologique	3.49	****
Biologique	4.14	****	Probabilités approximatives		
Probabilités approximatives			Biologique Conventionnel		
Biologique Conventionnel			Biologique Conventionnel		
Biologique 0.0002			Biologique 0.0016		
Conventionnel 0.0002			Conventionnel 0.0016		
Mi-Véraison			Maturité		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =888.81 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =114.02 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.03	****	Biologique	3.50	****
Biologique	4.20	****	Conventionnel	3.69	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique Conventionnel			Biologique Conventionnel		
Biologique 0.211			Biologique 0.0175		
Conventionnel 0.2106			Conventionnel 0.0175		
Début Maturité I			Maturité Avancée		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 142.6, df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =3987.1 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.12	****	Conventionnel	4.99	****
Biologique	4.41	****	Biologique	5.23	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique Conventionnel			Biologique onventionnel		
Biologique 0.0002			Biologique 0.006		
Conventionnel 0.0002			Conventionnel 0.006		

<b>C- Début</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =101.12 , df = 16			<b>Début Maturité II</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS 197.49= , df = 16		
Véraison 1 2			1 2		
Conventionnel	3.81	****	Conventionnel	2.21	****
Biologique	3.89	****	Biologique	3.21	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.071		Biologique	0.0250	
Conventionnel	0.071		Conventionnel	0.0250	
<b>Mi-Véraison</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 532.16 , df = 16			<b>Maturité</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =12856 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.06	****	Conventionnel	2.93	****
Biologique	4.44	****	Biologique	4.30	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.000		Biologique	0.0002	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0002	
<b>Début Maturité I</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =138.73 , df = 16			<b>Maturité Avancée</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =12856 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.27	****	Conventionnel	3.99	****
Biologique	4.48	****	Biologique	5.11	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.000		Biologique	0.001	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.001	

**Tableaux V:** ANOVA, effet mode de conduite sur la population cultivable sur milieu LT concernant les parcelles de Pomerol (A), Lussac (B) et Puisseguin (c) au cours des différents stades. Campagne 2010.

<b>A- Début</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 634.39 , df = 16			<b>Début Maturité II</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =89.799 , df = 16		
Véraison 1 2			1 2		
Biologique	4.70	****	Conventionnel	3.86	****
Conventionnel	4.76	****	Biologique	4.07	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.001		Biologique	0.0002	
Conventionnel	0.001		Conventionnel	0.0002	
<b>Mi-Véraison</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =59.13 , df = 16			<b>Maturité</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =161.02 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.34	****	Conventionnel	4.03	****
Biologique	4.48	****	Biologique	4.35	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.0002		Biologique	0.0002	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0002	
<b>Début Maturité I</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =189.45 , df = 16			<b>Maturité Avancée</b> log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin de Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 264.21, df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.00	****	Conventionnel	4.26	****
Biologique	4.34	****	Biologique	4.52	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.0002		Biologique	0.0002	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0002	

<b>B- Début</b>			<b>Début Maturité II</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 296.42 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =491.38 , df = 16		
1 2			1 2		
Biologique	4.53	****	Conventionnel	4.23	****
Conventionnel	4.65	****	Biologique	4.49	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.003		Biologique	0.0007	
Conventionnel	0.003		Conventionnel	0.0007	
<b>Mi-Véraison</b>			<b>Maturité</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =144.49 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =340.41 , df = 16		
1 2			1 2		
Biologique	4.40	****	Biologique	4.69	****
Conventionnel	4.65	****	Conventionnel	4.89	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.0002		Biologique	0.0002	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0002	
<b>Début Maturité I</b>			<b>Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =128.55 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 472.01 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.35	****	Biologique	5.01	****
Biologique	4.59	****	Conventionnel	5.18	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.000		Biologique	0.000	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0002	

<b>C- Début</b>			<b>Début Maturité II</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =390.78 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =1119.8 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.30	****	Biologique	4.37	****
Biologique	4.63	****	Conventionnel	4.61	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.0002		Biologique	0.0125	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0125	
<b>Mi-Véraison</b>			<b>Maturité</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =259.5 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS = 22.927 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.51	****	Conventionnel	4.28	****
Biologique	4.86	****	Biologique	4.52	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.0016		Biologique	0.0002	
Conventionnel	0.0016		Conventionnel	0.0002	
<b>Début Maturité I</b>			<b>Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =591.57 , df = 16			log <sub>10</sub> ufc.gr de Groupes homogènes :alpha= 0.05, raisin MS =1150.9 , df = 16		
1 2			1 2		
Conventionnel	4.33	****	Conventionnel	4.66	****
Biologique	4.67	****	Biologique	5.12	****
Probabilités approximatives			Probabilités approximatives		
Biologique		Conventionnel	Biologique		Conventionnel
Biologique	0.000		Biologique	0.0002	
Conventionnel	0.0002		Conventionnel	0.0002	

**Tableaux VI:** ANOVA, effet mode de conduite sur la population cultivable sur milieu LB1/10 concernant les parcelles de Pomerol (A), Lussac (B) et Puisseguin (c) au cours des différents stades. Campagne 2010

<b>A-Maturité</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 19.78 , df = 16		
	1	2
Conventionnel	1.28	****
Biologique	2.25	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Biologique		0.0025
Conventionnel		0.0025

<b>Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.49, df = 16		
	1	
Biologique	1.29	****
Conventionnel	1.30	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Conventionnel		0.8726
Biologique		0.8726

<b>B-Maturité</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =39.419 , df = 16		
	1	2
Biologique	1.33	****
Conventionnel	2.49	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Biologique		0.0020
Conventionnel		0.0020

<b>Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =37.021, df = 16		
	1	
Biologique	2.55	****
Conventionnel	2.67	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Conventionnel		0.6473
Biologique		0.6473

<b>C-Maturité</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =13.20 , df = 16		
	1	2
Biologique	1.26	****
Conventionnel	2.01	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Biologique		0.0016
Conventionnel		0.0016

<b>Maturité Avancée</b>		
log <sub>10</sub> ufc.gr de raisin		
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.884, df = 16		
	1	
Conventionnel	1.27	****
Biologique	1.41	****
Probabilités approximatives		
	Biologique	Conventionnel
Conventionnel		0.1833
Biologique		0.1833

**Tableaux VII:** ANOVA, effet mode de conduite sur la population cultivable sur milieu BA concernant les parcelles de Pomerol (A), Lussac (B) et Puisseguin (c) aux stades de maturité et maturité avancée. Campagne 2010.

## ANOVA – Effet mode de conduite

## Indices de biodiversité de Shannon et AWCD

<b>A</b> -Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.02 , df = 4 Probabilités approximatives = 0.293		<b>B</b> -Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.004 , df = 4 Probabilités approximatives =0.196	
<b>Déb Véraison</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Déb Véraison</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	3.28 ****	Puisseguin Biologique	3.22 ****
Pomerol Biologique	3.33 ****	Puisseguin Conventionnel	3.30 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 0.08, df = 4 Probabilités approximatives =0.398		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.001 , df = 4 Probabilités approximatives =0.034	
<b>Mi-Véraison</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Mi-Véraison</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	3.23 ****	Puisseguin Biologique	3.22 ****
Pomerol Biologique	3.29 ****	Puisseguin Conventionnel	3.29 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.02 , df = 4 Probabilités approximatives =0.024		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.003 , df = 4 Probabilités approximatives = 0.173	
<b>Déb Maturité I</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Déb Maturité I</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	2.92 ****	Puisseguin Conventionnel	3.26 ****
Pomerol Biologique	3.32 ****	Puisseguin Biologique	3.33 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.004 , df = 4 Probabilités approximatives =0.001		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = , df = 4 Probabilités approximatives =0.209	
<b>Maturité</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Maturité</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	2.91 ****	Puisseguin Conventionnel	3.05 ****
Pomerol Biologique	3.34 ****	Puisseguin Biologique	3.19 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.002, df = 4 Probabilités approximatives =0.870		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.3, df = 4 Probabilités approximatives =0.029	
<b>Mat Avancée</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Mat Avancée</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	3.41 ****	Puisseguin Conventionnel	4.26 ****
Pomerol Biologique	3.42 ****	Puisseguin Biologique	5.97 ****

**Tableaux VIII:** ANOVA, effet mode de conduite sur les indices de biodiversité de Shannon concernant les parcelles de Pomerol (A) et Puisseguin (B) au cours des différents stades. Campagne 2010.

<b>A</b> -Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.02 , df = 4 Probabilités approximatives =0.307		<b>B</b> -Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.02 , df = 4 Probabilités approximatives =0.773	
<b>Déb Véraison</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Déb Véraison</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	1.05 ****	Puisseguin Biologique	0.77 ****
Pomerol Biologique	1.20 ****	Puisseguin Conventionnel	0.98 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.08 , df = 4 Probabilités approximatives =0.427		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.002 , df = 4 Probabilités approximatives =0.301	
<b>Mi-Véraison</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Mi-Véraison</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	0.86 ****	Puisseguin Biologique	0.77 ****
Pomerol Biologique	1.07 ****	Puisseguin Conventionnel	0.81 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.03 , df = 4 Probabilités approximatives =0.009		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.04 , df = 4 Probabilités approximatives =0.915	
<b>Déb Maturité I</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Déb Maturité I</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	0.45 ****	Puisseguin Biologique	0.94 ****
Pomerol Biologique	1.20 ****	Puisseguin Conventionnel	0.96 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.08 , df = 4 Probabilités approximatives =0.102335071462737		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS = 0.08, df = 4 Probabilités approximatives =0.66	
<b>Maturité</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Maturité</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	0.70 ****	Puisseguin Conventionnel	0.47 ****
Pomerol Biologique	1.21 ****	Puisseguin Biologique	0.57 ****
Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.001 , df = 4 Probabilités approximatives =0.0009		Groupes homogènes :alpha= 0.05, MS =0.10 , df = 4 Probabilités approximatives =0.040	
<b>Mat Avancée</b>	Moyenne des prélèvements	<b>Mat Avancée</b>	Moyenne des prélèvements
Pomerol Conventionnel	1.29 ****	Puisseguin Conventionnel	0.53 ****
Pomerol Biologique	1.57 ****	Puisseguin Biologique	1.34 ****

**Tableaux IX:** ANOVA, effet mode de conduite sur l'AWCD concernant les parcelles de Pomerol (A) et Puisseguin (B) au cours des différents stades. Campagne 2010

## ANNEXE 3

## **Collection de souches mise en collection aux cours de notre étude**

Les centres de ressources biologiques (CRB) assurent de nombreuses fonctions, dont la conservation de la biodiversité et la mise à disposition de ses ressources à la recherche et développement dans les domaines agricoles, industriels, environnementaux, médicaux, etc.

Nous avons isolé et identifié aux cours de notre travail plusieurs colonies des bactéries et de champignons (sous forme filamenteuses soit sous forme des levures). Les séquences des régions de l'ADNr, utilisées dans la procédure d'identification ont été déposées dans les banques de données EMBL (European Molecular Biology Laboratory) et les microorganismes ont intégré la collection Centre de Ressources Biologiques Œnologie.

Dans cette annexe, nous présentons les différentes espèces isolées au cours de notre étude et les informations concernant leur origine, leur code de collection et leur numéro d'accèsion respective. Les espèces présentées dans cet inventaire sont disponibles sur commande ([www.crboeno.univ-bordeauxsegalen.fr](http://www.crboeno.univ-bordeauxsegalen.fr)). Le numéro d'accèsion permet également à l'utilisateur d'avoir des informations moléculaires sur ces espèces.

### **Collection de souches bactériennes**

Cette collection comprend 152 souches, représentant 46 espèces appartenant à 22 genres. Les microorganismes ont été isolés à différents stades phénologiques pendant la campagne de 2009. *Pseudomonas* est le genre le plus représenté (41 % des isolats) suivi par *Micrococcus* (18 %). Les genres *Bacillus* et *Curtobacterium* représentent 5 % de la collection. Les autres genres représentent chacun moins de 4 % des isolats (**Figure I**).



## Collection de souches bactériennes - répartition par genre

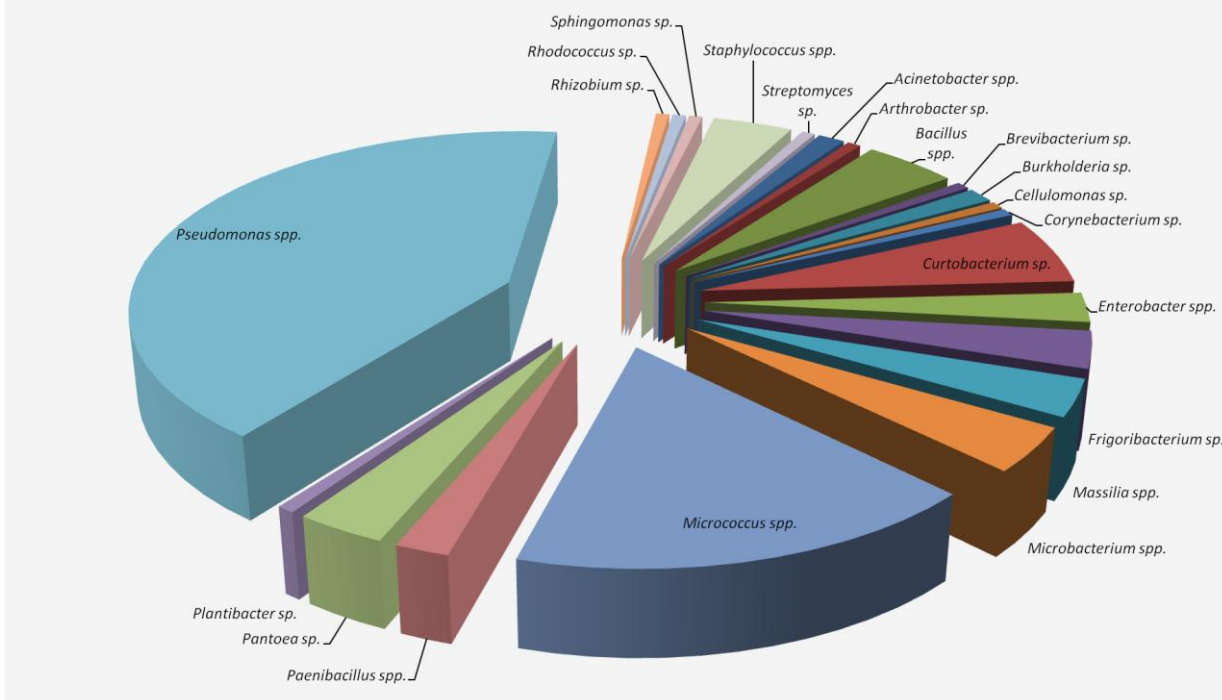


Figure 1 : Répartitions par genre des différentes souches bactériennes mises en collection durant nos travaux.

## Inventaire de souches bactériennes mise en collection :

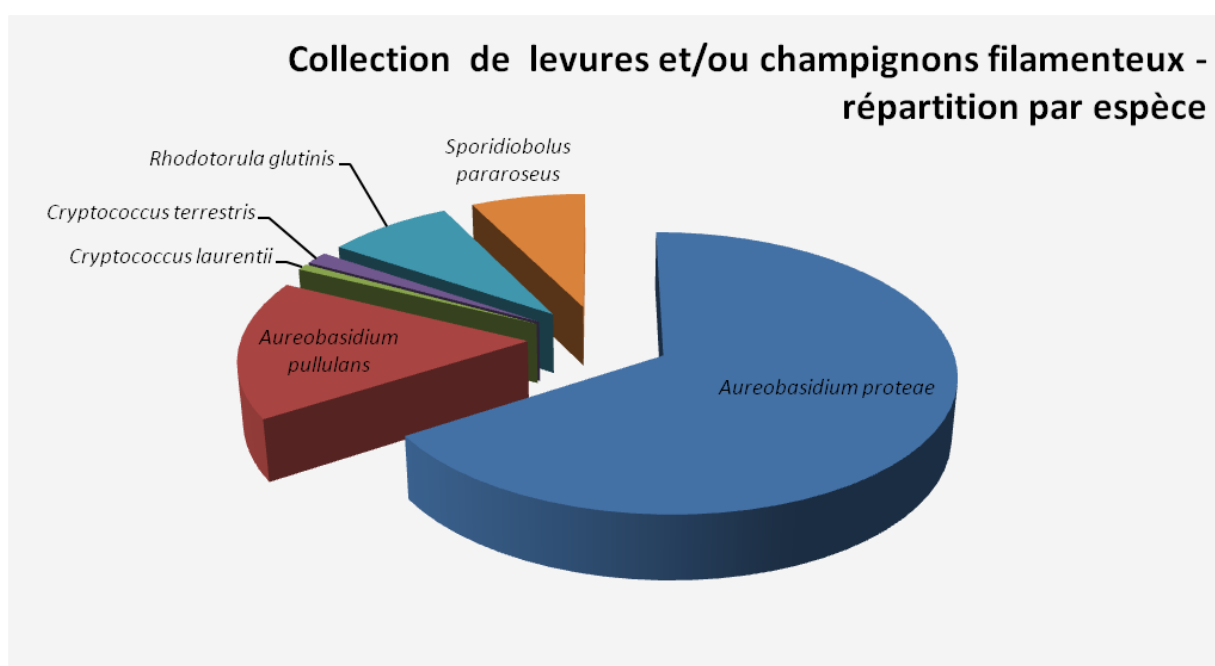
Espèce	Origine géographique	Stade phénologique	Millésime	Code souche	Code CRB	N° d'accession
<b>Acinetobacter spp.</b>						
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1140	1140	HE588004
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Lussac	Maturité	2009	O4 1133	1133	HE588005
<b>Arthrobacter sp.</b>						
<i>Arthrobacter defluvii</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 1186	1186	HE648108
<b>Bacillus spp.</b>						
<i>Bacillus altitudinis</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11158	11158	HE648109
<i>Bacillus megaterium</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1171	1171	HE587986
<i>Bacillus megaterium</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11151	11151	HE648110
<i>Bacillus mycoides</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11146	11146	HE648111
<i>Bacillus safensis</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	C5 1198	1198	HE587988
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	C2 11149	11149	HE648112
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	O5 11104	11104	HE648113
<b>Brevibacterium sp.</b>						
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1139	1139	HE587987
<b>Burkholderia sp.</b>						
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	O2 11118	11118	HE648114
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	Pomerol	Maturité	2009	O4 11129	11129	HE648115
<b>Cellulomonas sp.</b>						
<i>Cellulomonas hominis</i>	Lussac	Début de véraison	2009	C1 1155	1155	HE587954
<b>Corynebacterium sp.</b>						
<i>Corynebacterium flavescens</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	C5 1199	1199	HE587952
<b>Curtobacterium sp.</b>						
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1150	1150	HE587963
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1145	1145	HE587964
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	O2 11110	11110	HE648116
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11114	11114	HE648117
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Pomerol	Maturité	2009	O4 11122	11122	HE648118
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11143	11143	HE648119
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 1115b	1115	HE648120
<i>Curtobacterium herbarum</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1144	1144	HE587961
<i>Curtobacterium herbarum</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1189	1189	HE587962
<b>Enterobacter spp.</b>						
<i>Enterobacter cowanii</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1166	1166	HE587998
<i>Enterobacter cowanii</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1181	1181	HE587999
<i>Enterobacter cowanii</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1170	1170	HE588000
<i>Enterobacter cowanii</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	O2 1118	1118	HE588001
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	O5 11103	11103	HE648121
<b>Frigoribacterium sp.</b>						
<i>Frigoribacterium faeni</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1184	1184	HE587956
<i>Frigoribacterium faeni</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1175	1175	HE587959
<i>Frigoribacterium faeni</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1151	1151	HE587955
<i>Frigoribacterium faeni</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1149	1149	HE587957
<i>Frigoribacterium faeni</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1146	1146	HE587958
<b>Massilia spp.</b>						
<i>Massilia aurea</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1141	1141	HE587995
<i>Massilia aurea</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11113	11113	HE648122
<i>Massilia aurea</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	C5 11167	11167	HE648123
<i>Massilia timonae</i>	Lussac	Maturité	2009	C4 1191	1191	HE587996
<i>Massilia timonae</i>	Lussac	Maturité	2009	C4 1192	1192	HE587997
<b>Microbacterium spp.</b>						
<i>Microbacterium arborescens</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1138	1138	HE587951
<i>Microbacterium maritipicum</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1152	1152	HE587947
<i>Microbacterium maritipicum</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1137	1137	HE587948
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	C5 1193	1193	HE587949
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	C5 1193b	1193	HE587953
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1148	1148	HE587950

Espèce	Origine géographique	Stade phénologique	Millésime	Code souche	Code CRB	N° d'accession
<b>Micrococcus spp.</b>						
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1176	1176	HE587965
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1125	1125	HE587966
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	O2 1119	1119	HE587967
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	O2 1114	1114	HE587968
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1172	1172	HE587969
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1127	1127	HE587979
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1120	1120	HE587980
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1124	1124	HE587981
<i>Micrococcus endophyticus</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1153	1153	HE587982
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1177	1177	HE587970
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1130	1130	HE587971
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1129	1129	HE587972
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1174	1174	HE587973
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1142	1142	HE587974
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1173	1173	HE587975
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1126	1126	HE587976
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Maturité	2009	C4 11.101	11.101	HE587977
<i>Micrococcus luteus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1121	1121	HE587978
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11115	11115	HE648124
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11132	11132	HE648125
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11152	11152	HE648126
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11154	11154	HE648127
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11155	11155	HE648128
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11157	11157	HE648129
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11130	11130	HE648130
<i>Micrococcus luteus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11128	11128	HE648131
<b>Paenibacillus spp.</b>						
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	C5 1196	1196	HE587984
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	C5 1197	1197	HE587985
<i>Paenibacillus turicensis</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	C5 1195	1195	HE587983
<b>Pantoea sp.</b>						
<i>Pantoea agglomerans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	C1 1161	1161	HE588002
<i>Pantoea agglomerans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	C1 1157	1157	HE588003
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11137	11137	HE648132
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	O5 11106	11106	HE648133
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11138	11138	HE648134
<b>Plantibacter sp.</b>						
<i>Plantibacter flavus</i>	Lussac	Maturité	2009	C4 1190	1190	HE587960
<b>Pseudomonas spp.</b>						
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1109	1109	HE588031
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	O2 1103	1103	HE588032
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1108	1108	HE588033
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1123	1123	HE588034
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de véraison	2009	C1 1160	1160	HE588035
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1180	1180	HE588036
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1122	1122	HE588037
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1107	1107	HE588038
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1111	1111	HE588039
<i>Pseudomonas cannabina</i>	Pomerol	Maturité	2009	C4 11162	11162	HE648135
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	O2 1116	1116	HE588021
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1163	1163	HE588022
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1112	1112	HE588023
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1165	1165	HE588024
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1143	1143	HE588025
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1182	1182	HE588026
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1102	1102	HE588027

Espèce	Origine géographique	Stade phénologique	Millésime	Code souche	Code CRB	N° d'accession
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>						
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1164	1164	HE588028
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	C1 1156	1156	HE588029
<i>Pseudomonas congelans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	C1 1159	1159	HE588030
<i>Pseudomonas congelans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	O1 11125	11125	HE648136
<i>Pseudomonas congelans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	O1 11120	11120	HE648137
<i>Pseudomonas congelans</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11119	11119	HE648138
<i>Pseudomonas congelans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11142	11142	HE648139
<i>Pseudomonas congelans</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	C2 11150	11150	HE648140
<i>Pseudomonas congelans</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11153	11153	HE648141
<i>Pseudomonas congelans</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	C3 11156	11156	HE648142
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	O1 11123	11123	HE648143
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	O1 11126	11126	HE648144
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	O1 11124	11124	HE648145
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	O2 11117	11117	HE648146
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11134	111134	HE648147
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11135	11135	HE648148
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11141	11141	HE648149
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11140	11140	HE648150
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	C2 11148	11148	HE648151
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Maturité	2009	C4 11163	11163	HE648152
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	C5 11165	11165	HE648153
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	C5 11168	11168	HE648154
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	C5 11169	11169	HE648155
<i>Pseudomonas graminis</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	C5 11166	11166	HE648156
<i>Pseudomonas graminis</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1179	1179	HE588006
<i>Pseudomonas graminis</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1106	1106	HE588007
<i>Pseudomonas graminis</i>	Lussac	Début de maturité	2009	C3 1168	1168	HE588008
<i>Pseudomonas graminis</i>	Lussac	Début de maturité	2009	O3 1128	1128	HE588009
<i>Pseudomonas graminis</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1162	1162	HE588010
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Lussac	Maturité	2009	O4 1134	1134	HE588014
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Lussac	Maturité	2009	O4 1135	1135	HE588015
<i>Pseudomonas poae</i>	Lussac	Maturité	2009	O4 1131	1131	HE588019
<i>Pseudomonas poae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11144	11144	HE648157
<i>Pseudomonas poae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11136	11136	HE648158
<i>Pseudomonas poae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11139	11139	HE648159
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	Lussac	Maturité	2009	O4 1136	1136	HE588011
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1105	1105	HE588012
<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1104	1104	HE588013
<i>Pseudomonas sp.</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	O2 11112	11112	HE648160
<i>Pseudomonas sp.</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	O3 11111	11111	HE648161
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	O2 1115	1115	HE588016
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Lussac	Début de véraison	2009	C1 1158	1158	HE588017
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	O2 1113	1113	HE588018
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Lussac	Début de véraison	2009	O1 1110	1110	HE588020
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Pomerol	Maturité	2009	O4 11108	11108	HE648162
<b><i>Rhizobium sp.</i></b>						
<i>Rhizobium huautlense</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1167	1167	HE587993
<b><i>Rhodococcus sp.</i></b>						
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	O5 11109	11109	HE648163
<b><i>Sphingomonas sp.</i></b>						
<i>Sphingomonas aurantiaca</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1154	1154	HE587994
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>						
<i>Staphylococcus caprae</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1147	1147	HE587989
<i>Staphylococcus cohnii</i>	Lussac	Maturité	2009	C4 1188	1188	HE587990
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pomerol	Maturité	2009	C4 11164	11164	HE648164
<i>Staphylococcus equorum</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	O5 1183	1183	HE587992
<i>Staphylococcus hominis</i>	Pomerol	Maturité	2009	C4 11161	11161	HE648165
<i>Staphylococcus sp.</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	C2 1169	1169	HE587991
<b><i>Streptomyces sp.</i></b>						
<i>Streptomyces fomicarius</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	C1 11145	11145	HE648166

### Collection des souches des levures et champignons filamenteux

En ce qui concerne la collection des espèces eucaryotes, 135 souches ont été isolées. Parmi elles, le genre le plus représenté est *Aureobasidium*, comprenant les espèces *Aureobasidium proteae* (66 % des isolats) et *Aureobasidium pullulans* (16 %). Les espèces *Rhodotorula glutinis* et *Sporidiobolus pararoseus* représentent respectivement 8 % et 7% du total des isolats. Les espèces *Cryptococcus terrestris* et *laurentii* 3 % (**Figure II**).



**Figure II** : Répartitions par espèce des différentes souches des levures et champignon filamenteux mise en collection pendant notre travaux.

## Inventaire de souches levures et champignon filamenteux mise en collection :

Espèce	Origine géographique	Stade phénologique	Millésime	Code souche	Code CRB	N° d'accession
<b>Aureobasidium spp.</b>						
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11100	L11100	HE802288
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11102	L11102	HE802289
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LC4L11103	L11103	HE802290
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LC4L11106	L11106	HE802292
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LC4L11108	L11108	HE802293
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LC4L11111	L11111	HE802294
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LC5L11116	L11116	HE802296
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11131	L1131	HE802297
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11140	L1140	HE802298
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11141	L1141	HE802299
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11142	L1142	HE802300
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11143	L1143	HE802301
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11144	L1144	HE802302
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11145	L1145	HE802303
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11146	L1146	HE802304
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LO1L11147	L1147	HE802305
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L11148	L1148	HE802306
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L11150	L1150	HE802307
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L11153	L1153	HE802308
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LO3L11158	L1158	HE802313
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11159	L1159	HE802314
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11160	L1160	HE802315
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11161	L1161	HE802316
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11162	L1162	HE802317
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11164	L1164	HE802318
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11165	L1165	HE802319
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L11166	L1166	HE802320
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LO5L11167	L1167	HE802321
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LO5L11170	L1170	HE802323
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LO3L11172	L1172	HE802324
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L11174	L1174	HE802326
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LC1L11176	L1176	HE802328
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LC1L11180	L1180	HE802329
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L11181	L1181	HE802330
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L11184	L1184	HE802331
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L11185	L1185	HE802332
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L11188	L1188	HE802335
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11189	L1189	HE802336
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11195	L1195	HE802337
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11197	L1197	HE802338
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11198	L1198	HE802339
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11199	L1199	HE802340
<i>Aureobasidium proteae</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L11149	L1149	HE802341
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PO2-L11118	L11118	HE802360
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L11120	L11120	HE802361
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11121	L11121	HE802362
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11122	L11122	HE802363
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11123	L11123	HE802364
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11124	L11124	HE802365
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L11125	L11125	HE802366
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11126	L11126	HE802367
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L11127	L11127	HE802368
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PO2-L11128	L11128	HE802369
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PO3-L11130	L11130	HE802370
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PO3-L11131	L11131	HE802371
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L11132	L11132	HE802372
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L11133	L11133	HE802373
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PO2-L11136	L11136	HE802374
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PO2-L11137	L11137	HE802375

Espèce	Origine géographique	Stade phénologique	Millésime	Code souche	Code CRB	N° d'accession
<b><i>Aureobasidium</i> spp.</b>						
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PO5-L11138	L11138	HE802376
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PO2-L11139	L11139	HE802377
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PO5-L11140	L11140	HE802378
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PO5-L11141	L11141	HE802379
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L11142	L11142	HE802380
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11143	L11143	HE802381
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PO3-L11144	L11144	HE802382
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PC5-L11149	L11149	HE802384
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11156	L11156	HE802386
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11157	L11157	HE802387
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PC3-L11158	L11158	HE802388
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11159	L11159	HE802389
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PC2-L11160	L11160	HE802390
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11162	L11162	HE802391
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PC2-L11163	L11163	HE802392
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11165	L11165	HE802393
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11167	L11167	HE802395
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PC2-L11168	L11168	HE802396
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11170	L11170	HE802397
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PC4-L11172	L11172	HE802399
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11173	L11173	HE802400
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PC4-L11174	L11174	HE802401
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité	2009	PC4-L11179	L11179	HE802403
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PC5-L11182	L11182	HE802405
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PC5-L11183	L11183	HE802406
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PC5-L11153	L11153	HE802407
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PC5-L11151	L11151	HE802408
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11129	L11129	HE802409
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PO3-L11134	L11134	HE802410
<i>Aureobasidium proteae</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11178	L11178	HE802414
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Maturité	2009	LC4L11105	L11105	HE802291
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Maturité	2009	LC4L11112	L11112	HE802295
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LO3L1154	L1154	HE802309
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LO3L1155	L1155	HE802310
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LO3L1156	L1156	HE802311
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LO3L1157	L1157	HE802312
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LO5L1168	L1168	HE802322
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L1173	L1173	HE802325
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LC1L1175	L1175	HE802327
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L1186	L1186	HE802333
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L1187	L1187	HE802334
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L1152	L1152	HE802342
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LC1L1178	L1178	HE802343
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Maturité avancé	2009	PO5-L11147	L11147	HE802383
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11152	L11152	HE802385
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PC2-L11166	L11166	HE802394
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11171	L11171	HE802398
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PC3-L11176	L11176	HE802402
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PC3-L11181	L11181	HE802404
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11169	L11169	HE802411
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PC3-L11177	L11177	HE802412
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11155	L11155	HE802413
<b><i>Cryptococcus</i> spp.</b>						
<i>Cryptococcus laurentii</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PO3-L11137	L1137	HE802415
<i>Cryptococcus terrestris</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L1190	L1190	HE802344
<i>Cryptococcus terrestris</i>	Pomerol	Maturité	2009	PC5-L11150	L11150	HE802416

Espèce	Origine géographique	Stade phénologique	Millésime	Code souche	Code CRB	N° d'accession
<b><i>Rhodotorula sp.</i></b>						
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L1192	L1192	HE802345
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LO5L1130	L1130	HE802346
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LC5L1132	L1132	HE802347
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LO2L1151	L1151	HE802348
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lussac	Maturité	2009	LO4L1171	L1171	HE802349
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lussac	Maturité	2009	LC4L11110	L11110	HE802350
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LC5L11113	L11113	HE802351
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L1136	L1136	HE802417
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pomerol	Maturité	2009	PO4-L11119	L11119	HE802418
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pomerol	Mi-véraison	2009	PC2-L1163	L1163	HE802419
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PO1-L11145	L11145	HE802420
<b><i>Sporidiobolus sp.</i></b>						
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LC5L1133	L1133	HE802352
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L11101	L11101	HE802353
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Maturité avancé	2009	LO5L1169	L1169	HE802354
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LC1L1177	L1177	HE802355
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L1182	L1182	HE802356
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Mi-véraison	2009	LC2L1183	L1183	HE802357
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Début de véraison	2009	LC1L1193	L1193	HE802358
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Lussac	Début de maturité	2009	LC3L1196	L1196	HE802359
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Pomerol	Début de véraison	2009	PC1-L11154	L11154	HE802421
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Pomerol	Début de maturité	2009	PC3-L11175	L11175	HE802422





## Résumé

L'étude des communautés microbiennes de la baie de raisin dans des conditions de production à l'échelle de la parcelle montre une dynamique temporelle des populations cultivables, qui se traduit par une augmentation des niveaux de population à partir des stades de début véraison et début maturité. Concernant la communauté bactérienne cultivable, 44 espèces appartenant à 21 genres ont été identifiées. Parmi les huit genres identifiés pour la population fongique, les espèces appartenant au genre *Aureobasidium* sont les plus abondantes, contrairement aux espèces fermentaires qui restent minoritaires. L'incidence des facteurs biotiques et abiotiques sur différents paramètres de population microbienne tels que la structure, la densité et l'activité métabolique a été analysée. Nous avons observé que les zones climatiques plus fraîches et humides, favorisent le développement des microorganismes. Ces travaux mettent en évidence l'impact écotoxique du cuivre sur la communauté microbienne, en particulier dans sa fraction bactérienne. Le développement de *Botrytis cinerea* sur la grappe modifie la communauté microbienne des baies de raisin sain : le nombre d'espèces bactériennes augmente ainsi que leur diversité. La communauté bactérienne de la baie de raisin est proche de celle des feuilles d'un point de vue de sa structure, et mais éloignée de celles des écorces et du sol, avec des indices de diversité et de richesse plus faibles.

**Mots clés :** Baies de raisin, population microbienne, stade phénologique, cuivre, micro-climat, *Botrytis*, CE-SSCP, T-RFLP

## Abstract

The study of microbial communities associated with wine grapes under field conditions revealed changes in the size and structure during the berry ripening process, with levels rising gradually and reaching their highest value when the berries were over ripe. During this work several bacteria and fungi species, including fermentative yeast, have been isolated and identified. From cultured bacteria, over 44 species were identified from 21 genera. Concerning fungi population, among eight genera identified, the genus *Aureobasidium* was the most abundant. Our study reveals the impact of different abiotic and biotic factors over microbial community structure, density and metabolic activity. Comparing different vineyards in the same region, we observed that areas presenting more humid and colder climate favor the growth of microorganisms. Our results also show that the farming system has a clear impact on the microbial community, especially in the bacterial fraction. One of the reasons is the inhibiting effect of copper-based fungicides, frequently used in both organic and conventional farming systems. The presence of *Botrytis cinerea* in grape berries without visual symptoms of infection can change the microbial community of the grapes, increasing bacterial population density and diversity.

**Keywords:** grape berries, microbial population, grapevine growth stages, copper, climate, *Botrytis cinerea*, CE-SSCP, T-RFLP.