

## UTILISATION DE LEVURES SÉLECTIONNÉES ET BIODIVERSITÉ

Eva VALERO<sup>1</sup>, Dorit SCHULLER<sup>2</sup>, Brigitte CAMBON<sup>1</sup>, Margarida CASAL<sup>2</sup> et Sylvie DEQUIN<sup>1</sup> ([dequin@ensam.inra.fr](mailto:dequin@ensam.inra.fr))

(1) Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Sciences pour l'Oenologie, 2, Place Viala, 34060 Montpellier, France

(2) Centro de Biologia, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

### Introduction

Depuis le début des années 1980, l'utilisation des levures sèches actives *S. cerevisiae* s'est considérablement généralisée. Actuellement, la majeure partie de la production vinicole est basée sur l'utilisation de ces levures, qui garantissent des fermentations rapides et sûres et réduisent les risques de fermentations languissantes, d'arrêts de fermentation ou encore de contaminations microbiennes. La plupart des levures œnologiques commerciales ont été sélectionnées dans les vignobles pour leurs caractéristiques œnologiques, telles que leur capacité fermentaire, leur tolérance à l'éthanol, l'absence de production de mauvais goûts et odeurs et la production de métabolites souhaités. Ceci, en plus d'autres progrès technologiques, a contribué à l'amélioration de la qualité du vin et a aidé les producteurs à mieux contrôler le processus fermentaire et à atteindre leurs objectifs.

Les levures commerciales sont généralement utilisées en vinification sans aucune restriction particulière : tous les ans, de grandes quantités sont libérées autour de la cave, par le biais des effluents et résidus solides provenant de la vinification. Le comportement de ces levures dans l'écosystème des vignobles ainsi que leur impact potentiel sur la microflore naturelle sont totalement inconnus. Plus précisément, l'on ignore si les levures commerciales sont capables de survivre dans la nature et devenir partie intégrante de la microflore du vignoble. On ne dispose que de peu de données permettant d'évaluer l'importance de la propagation des levures starters et la durée de leur survie dans le vignoble (Frezier et Dubourdieu, 1992 ; Vezinhet *et al.*, 1992 ; Guillamón *et al.*, 1996). Récemment, une étude biogéographique à grande échelle a été menée dans des vignobles d'Afrique du Sud, situés dans cinq zones de la Coastal Region du Cap-Occidental. Parmi les 13 échantillons prélevés, 3 contenaient des levures commerciales (Van der Westhuizen *et al.*, 2000a et 2000b).

La présente étude, menée à grande échelle dans différents lieux en France et au Portugal, vise à évaluer la capacité des levures starters industrielles à se répandre et à survivre dans la nature. Les résultats de l'étude serviront de base solide pour évaluer la capacité des souchesensemencées à intégrer la microflore naturelle et ainsi affecter la biodiversité, et à éventuellement influencer les fermentations des années suivantes, notamment celles menées selon des pratiques traditionnelles reposant sur la fermentation spontanée. Ces données serviront également de base fiable pour l'évaluation des risques potentiels associés à l'utilisation des levures génétiquement modifiées (OGM).

### Méthodologie

Le protocole d'échantillonnage comprenait 36 sites répartis sur 6 vignobles, dont 3 situés dans le Sud de la France (dans le Languedoc) et 3 dans le Nord du Portugal (Região Demarcada dos Vinhos Verdes). La durée totale de cette étude a été de 3 ans (2001-2003). Les caves choisies ont utilisé, de façon consécutive, une ou plusieurs souches de levure commerciale durant les 5 années précédentes. Les trois caves portugaises ont eu recours essentiellement à la Levure A, une souche sélectionnée à l'origine en France ; alors que les trois caves françaises ont utilisé majoritairement la Levure B. Au total, 34 souches de levure oenologique commerciales ont été utilisées dans six caves au cours des trois années de l'étude.

Dans chaque vignoble, six lieux d'échantillonnage ont été définis en fonction des conditions propres à l'endroit (taille et orientation du vignoble, direction du vent dominant). La distance entre la cave et les sites d'échantillonnage a varié entre 20 et 1000 m. Afin d'évaluer la rémanence des levures commerciales d'une année sur l'autre, une première campagne d'échantillonnage a été menée avant que la cave ne commence à produire du vin avec des souches de levure commerciales (échantillons de pré – vendanges). Dans un deuxième temps, l'on a procédé à une campagne d'échantillonnage post – vendanges : les raisins ont été ramassés après que la cave n'ait commencé la production du vin afin d'évaluer la dissémination immédiate des levures commerciales depuis la cave. Au cours de ce projet expérimental, 72 échantillons de raisin ont été ramassés chaque année. Sur chacun des sites d'échantillonnage, environ 2 kg de raisins ont été ramassés en conditions stériles, et le jus extrait a été fermenté dans des contenants à volume réduit (200 – 500 ml), avec agitation mécanique et température maintenue à 20°C. Des mesures de poids quotidiennes ont permis de contrôler l'évolution de la fermentation. La flore levurienne a été analysée quand le poids du moût a été réduit à 70 g/l, ce qui correspond à la consommation d'environ les 2/3 des sucres. La plupart des échantillons ont été dilués et étalés sur des plaques de culture avec un milieu YPD (extrait de levure, 1% (poids/volume), glucose 2% (poids/volume)). Après deux jours d'incubation, 30 colonies de chaque fermentation spontanée ont été prélevées au hasard. La sélection des souches *Saccharomyces* a d'abord été réalisée sur milieu sélectif, dont la L-Lysine était l'unique source d'azote. Les *Saccharomyces* incapables de se développer dans un milieu de L-Lysine ont été soumises à une identification moléculaire basée sur l'analyse de restriction de l'ADN mitochondrial [Querol *et al.*, 1992], le génotypage par marqueurs microsatellites utilisant six loci (ScAAT1-ScAAT6) [Pérez *et al.*, 2001], l'analyse de des souches par électrophorèse sur gel en champs pulsés (PFGE) [Blondin et Vezinhet, 1988] et l'analyse séquentielle interdelta optimisée [Ness *et al.*, 1993 ; Legras et Karst, 2003]. Avant de commencer l'étude, nous avons évalué le pouvoir discriminant des différentes méthodes de typage sur un total de 23 souches de levure commerciale utilisées dans les caves des deux pays. Parmi les 23 souches de levure commerciale analysées, 22 typages différents ont été obtenus en utilisant l'analyse du caryotype et 21 en utilisant les trois autres méthodes (Schuller *et al.*, 2004). Étant donnée la similarité avérée du pouvoir discriminant de ces méthodes, il est possible d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre dans notre étude, les résultats obtenus seront comparables.

## Résultats

Un total de 198 échantillons a été prélevé lors de trois campagnes consécutives (2001-2003). Parmi ces échantillons 108 ont été prélevés en France et 90 au Portugal (Tableau 1)

Total	2001		2002		2003		France
	France	Portugal	France	Portugal	France	Portugal	
Échantillons	36	36	36	18	36	36	198
Fermentations spontanées	24	19		33	12		15
126							23
Isolats	720	570	990	360	450	690	3780
Souches <i>Saccharomyces</i>	406	570		120	360		209
2355							690

Tableau 1: Répartition des données par pays et année

Parmi les 198 échantillons, 126 moûts (64%) ont conduit leur fermentation spontanément, 20% provenant des campagnes pré – vendanges et 44% des campagnes post – vendanges respectivement. Les proportions de fermentations spontanées sont similaires dans les deux pays : 66% en France et 60% au Portugal. Au total, 3 780 colonies ont été isolées, dont 2355 ont été identifiées comme souches *Saccharomyces*.

Vignobles		A	B	C	D	E
F	Total					
Fermentations spontanées		19	24	29	16	23
15	126					
Fermentations spontanées avec $\geq 1$ de souches de levure commerciale		0	2	1	11	9
2	25					
Isolats		570	720	870	480	690
450	3780					
Souches de levure commerciale		0	15*	1	206	54+18*
2	296					
% levure commerciale / nb. d'isolats		0	2	0.1	43	10
0.5	7.8					

Tableau 2: Les souches de levure commerciale prélevées dans chaque vignoble au cours des 3 années

\* souches originaires de la même zone

La caractérisation moléculaire des 2 355 isolats de *Saccharomyces* a permis d'identifier 296 souches présentant un profil génétique semblable à celui des levures commerciales (Tableau 2). Ces souches représentent 7,8% de la population des levures de fermentation et la majorité (5,8%) a été collectée lors des campagnes de post – vendanges. Il est à noter qu'étant donné que la fermentation est un environnement de développement très favorable aux *Saccharomyces*, les résultats actuels ne permettent pas d'établir des conclusions sur le nombre de souches présentes à la surface des baies de raisin, qui est en réalité très faible. Toutefois, le nombre de fermentations avec au moins une souche de levure commerciale donne un meilleur aperçu de la situation telle qu'elle se présente dans les vignobles ; des souches de levure commerciale ont été retrouvées dans 12% des échantillons.

Les données globales reflètent des situations très différentes. Dans les quatre vignobles où les sites de prélèvement étaient placés à une distance plus importante de la cave, c'est-à-dire le vignoble F au Portugal et les trois vignobles français (A, B, C), la présence des levures commerciales était très faible, ne représentant que 0 à 2% des populations fermentaires, ces souches ayant été isolées à partir de cinq échantillons seulement (Tableau 2). En France, le profil génétique de 16 clones parmi 735 isolats de *Saccharomyces* (2%), correspondant à 0,8% des souches de levure isolées après la fermentation, était identique à celui des levures commerciales. A une exception près, ces souches (15 isolats) avaient un profil identique à celui des souches autochtones Levure C, et ont toutes été retrouvées sur le même site (cave B), dans des échantillons de pré – vendanges prélevés en 2001. Ceci pourrait indiquer une dissémination antérieure, mais cela ne peut être affirmé puisque la souche de levure commerciale C a été initialement isolée dans la même région du Sud de la France que celle où l'étude a été menée. Une colonie ayant le même profil que la Levure B utilisée dans les trois caves françaises depuis 5 à 15 ans a été isolée en 2003 dans la cave C. Il est à noter que cette levure, qui a été massivement utilisée sur une longue période, n'a jamais été retrouvée dans le vignoble, excepté dans ce cas précis. Dans la cave portugaise F, seulement deux isolats ayant le même profil que la levure commerciale très utilisée pendant cinq ans, la Levure A, ont été relevés. Les résultats étaient très différents dans les caves portugaises D et E, dans lesquelles un grand nombre de souches commerciales a été isolé et s'élevant respectivement à 43 et à 10% de la population des levures de fermentation.

Une vue d'ensemble de la dissémination des souches commerciales selon la distance les séparant de la cave est présentée dans la Figure 2. Quatre-vingt-quatorze pour cent des souches commerciales ont été retrouvés dans un rayon de 10-200 m de la cave et une grande majorité (78%) a été retrouvée dans des sites à proximité immédiate (10-50 m) des caves (vignobles D et E). Une proportion importante (73%) a été prélevée lors des campagnes post-vendanges, ce qui indique une dissémination immédiate.

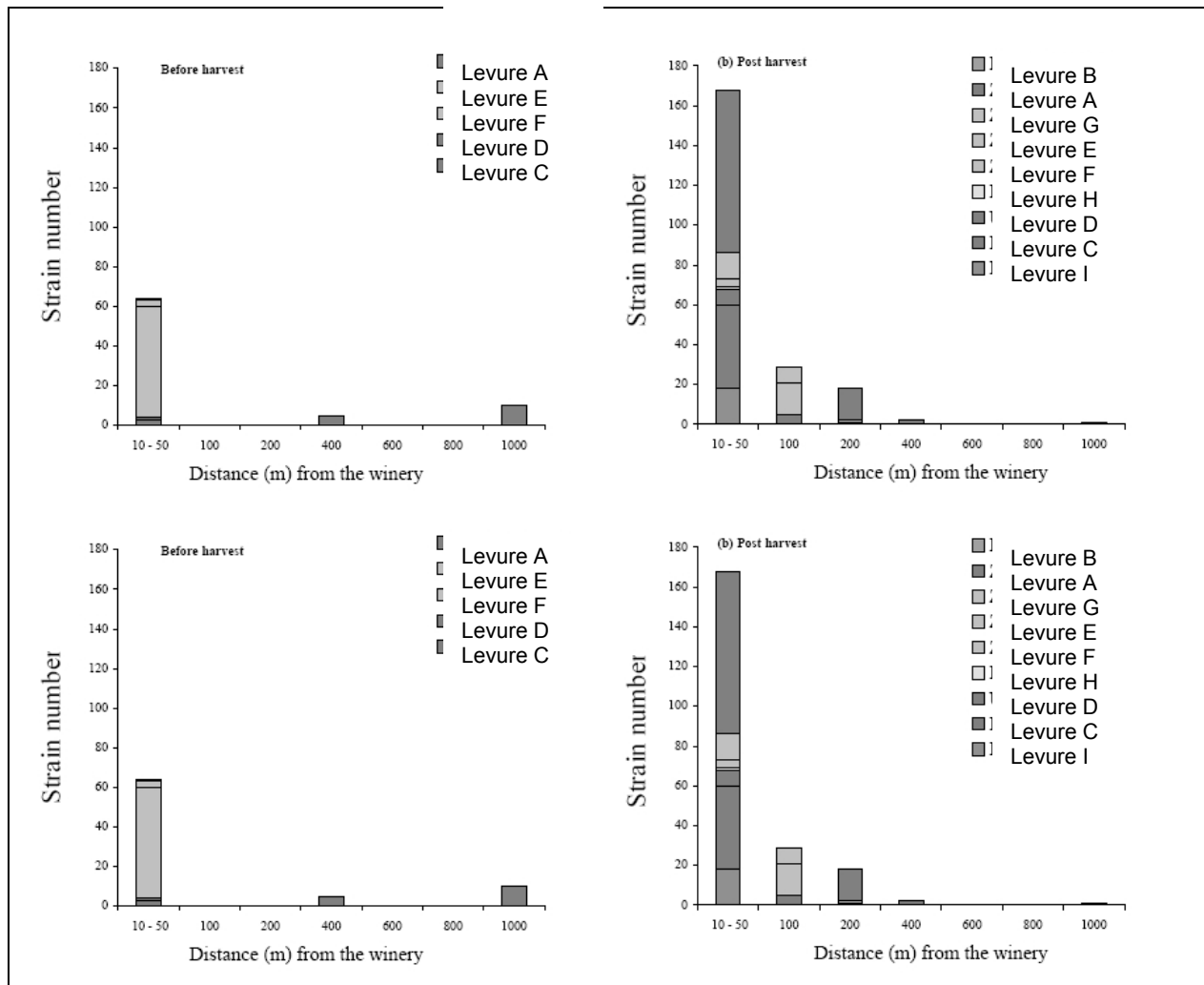


Fig. 1. Distribution totale (sur trois ans) des souches de levure commerciale selon la distance des caves au cours des campagnes de pré – vendanges et de post – vendanges.

L'évolution de la population totale des levures isolées après la fermentation dans les différentes caves en France et au Portugal, durant les trois années de l'étude, est présentée dans la Figure 2. Les souches commerciales ont été retrouvées, en grande partie, dans les échantillons de post – vendanges indiquant une dissémination immédiate (montrée également dans le Figure 1). Les 296 souches collectées avaient un profil génétique identique à seulement 9 des 34 souches de levure commerciale utilisées dans les 6 caves. Bien que les souches industrielles les plus couramment utilisées dans les caves aient été le plus souvent collectées en grande quantité dans les vignobles, il n'a pas pu être démontré qu'il existe une corrélation directe entre le niveau d'utilisation et la fréquence de dissémination. Par exemple, la souche de Levure B a été la souche la plus massivement utilisée dans les trois caves françaises, et pourtant un seul isolat parmi les 2 160 relevés en France a présenté un profil génétique identique à cette souche.

En résumé, l'évolution des populations de levures de fermentation au cours des trois années de l'étude a montré que les mêmes souches n'ont pas été retrouvées dans les mêmes sites d'une

année sur l'autre. Ceci indique que si quelques unes de ces souches sont capables de survivre dans l'écosystème, comme le montre la présence de levures commerciales dans les échantillons pré – vendanges prélevés en 2001 au Portugal, elles ne sont pas capables de dominer la population de levure indigène du vignoble. Par exemple, cinq souches différentes de levure commerciale ont été retrouvées durant la campagne de pré – vendanges de la cave D en 2001. Entre 1998-2000, ces souches étaient celles utilisées majoritairement par la cave, à savoir les Levures A, E et F ainsi que les Levures D et C utilisées dans des proportions beaucoup plus faibles. Ceci démontre qu'elles sont effectivement capables de survivre dans le vignoble d'une année à l'autre mais que leur survie est limitée étant donné qu'elles n'ont été retrouvées qu'en 2001.

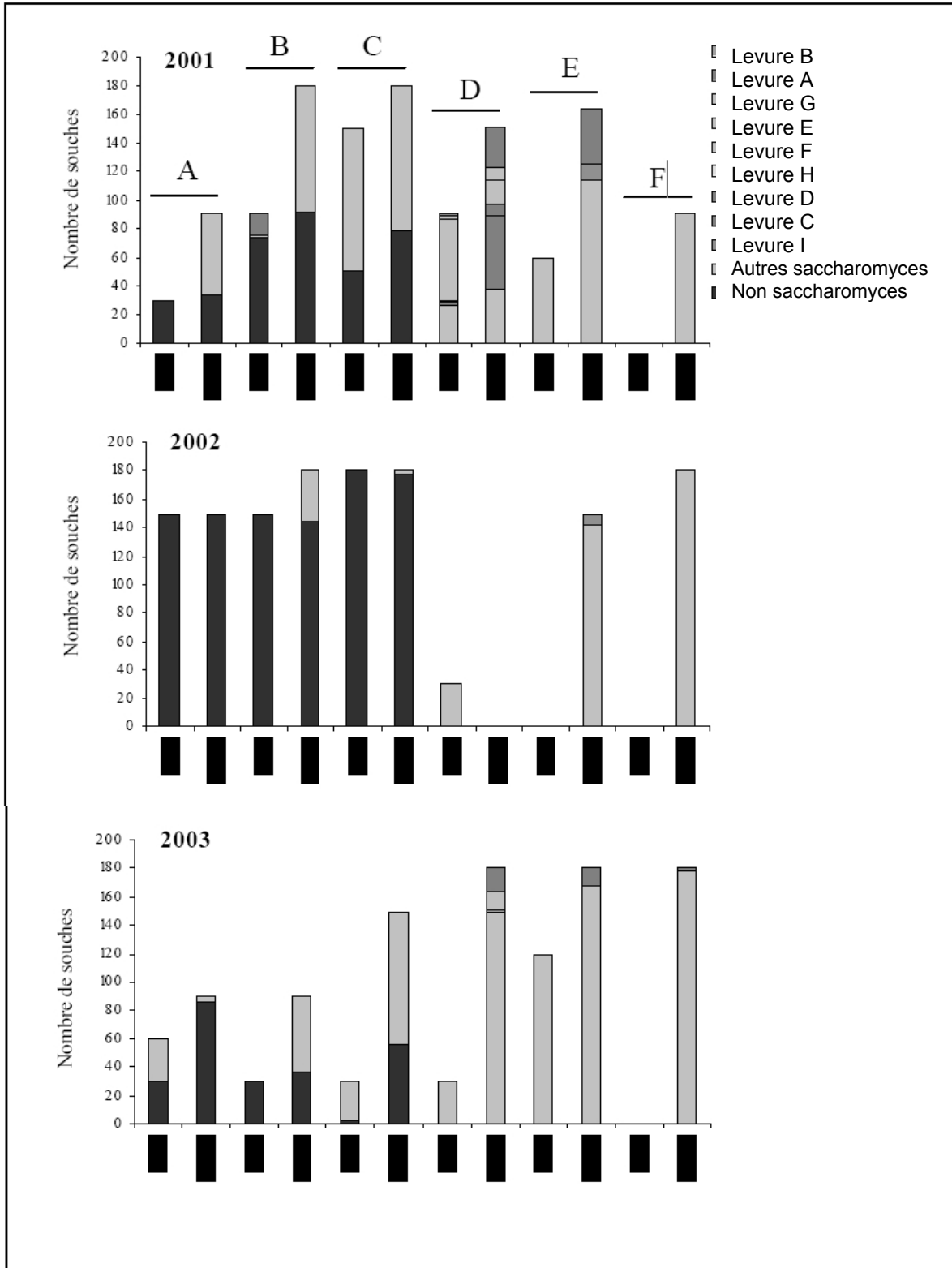


Fig. 2. Évolution de l'ensemble des populations de levures de fermentation de chacune des caves (A, B, C, D, E, F) au cours les trois années de l'étude, lors des campagnes pré – vendanges et post – vendanges.

## Conclusion

Cette étude systématique a permis d'apporter des informations sur l'impact qu'ont les levures commerciales sur les populations des levures de fermentation présentes dans les vignobles. La méthodologie utilisée, basée sur l'analyse de la population de levures après la fermentation spontanée, a permis l'isolation d'un très grand nombre de levures oenologiques *Saccharomyces*, présentes en faible quantité sur les raisins. Il est important de mentionner que parmi les 30 colonies analysées par fermentation, le nombre de profils génétiques différents a varié entre 1 à 21, avec une moyenne d'environ 5 biotypes différents de *Saccharomyces* par échantillon (Schuller *et al.*, 2005 ; données non publiées). Cela indique que le nombre de colonies analysées par échantillon était assez élevé pour représenter la biodiversité initiale.

A partir de ces données, nous concluons que la propagation des levures commerciales dans les vignobles est limitée dans l'espace et dans le temps. Plus de 90% des levures commerciales ont été retrouvées dans un rayon de 10 à 200 m de la cave et ne se sont pas implantées dans l'écosystème d'une manière systématique. La dispersion des souches commerciales semble être rendue possible essentiellement par le ruissellement des eaux et par les pellicules macérées entreposées dans les sites de stockage des marcs. Étant donné qu'elles sont utilisées en grandes quantités dans les caves, les souches commerciales tendent à y dominer les souches autochtones à l'intérieur des caves (Beltran *et al.*, 2002). Elles ne semblent cependant pas s'installer dans le vignoble. Leurs apparitions et disparitions semblent fluctuer naturellement de façon périodique, comme c'est le cas pour les souches autochtones. Les souches de levure commerciale étant considérées comme un modèle approprié pour les souches de levure génétiquement modifiées, les données que nous présentons contribuent également à estimer en profondeur les risques pour l'environnement liés à l'utilisation de telles souches dans l'industrie vitivinicole.

## Remerciements

Cet article a été adapté d'une récente publication, Valero *et al.*, *FEMS Yeast Research*, 2005, *in press*. Cette étude a été soutenue financièrement par la subvention n° 657 C2 de l'accord de coopération entre l'Institut Portugais de la Coopération Scientifique et Technologique (ICCTI) et l'ambassade Française à Lisbonne ainsi que la bourse de recherche Marie Curie du programme de la Communauté Européenne « Qualité de vie et gestion des ressources du vivant », dont le n° de contrat est le QLK4-CT-2001-51873. Les auteurs souhaitent remercier D. Delteil de l'ICV de Montpellier pour l'aide qu'il nous a apportée dans la sélection des sites d'échantillonnage en France, les œnologues des caves Portugaises (R. Cunha, A. Mendes, E. Rodrigues et J. Domingues) et également les œnologues (B Agay, E. Feneuil et E. Bru) et directeurs (J. L. Refle, J. Combette et R. Bruno) des caves Françaises, qui ont facilité les campagnes d'échantillonnage dans les vignobles.

## Bibliographie

Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., Rozes, N. and Mas, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year followup study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287-293.

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

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



- Gallego, F.J., Perez, M.A., Martinez, I. and Hidalgo, P. 1998. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:350-351.
- González Techera, A., Jubany, S., Carrau, F.M., and Gaggero, C. 2001. Differentiation of industrial yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33:71-75.
- Guillamón, J.M., Bairro, E. and Querol, A. 1996. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers; relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *System. Appl. Microbiol.* 19:122-132.
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G., Nguyen, H.V., Gaillardin, C. and Dujon, B. 2001. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39:551-559.
- Legras, J.L. and Karst, F. (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:249-255.
- López, V., Querol, A., Ramón, D. and Fernández-Espinar, M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68:75-81.
- Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., and L. Dulau. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62: 89-94.
- Pérez, M.A., Gallego, F.J., Martinez, I. and Hidalgo, P. 2001. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 461-466.
- Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231:19-26.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S. and Casal, M. (2005) Ecological survey of *Saccharomyces* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51:167-177.
- Valero, E., Schuller, D., Cambon, B., Casal, M and Dequin, S. (2005) Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large scale, three years study. *FEMS Yeast research. In press.*
- Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H., Khan, W. and Pretorius, I.S. 2000a. Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:10-16.
- Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H., and Pretorius, I.S. 2000b. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the Coastal Regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21:3-9.
- Vezhinet, F., Hallet, J-N., Valade, M., Poulard, A. (1992): Ecological survey of yeast strains by molecular methods of identification. *Am J. Enol. Vitic.* 43:83-86.