

Explorer et exploiter la biodiversité des levures œnologiques : comment optimiser la qualité organoleptique des vins?

Eder M.^{1,2,3}, Noble J.^{1,2,3,4}, Rollero S.^{1,2,3,4}, Steyer D.⁵, Legras J-L.^{1,2,3}, Blondin B.^{1,2,3}, Dequin S.^{1,2,3}

¹ INRA, UMR1083 Sciences pour l'œnologie, 2 Place Viala, F- 34060 Montpellier

² SupAgro, UMR1083 Sciences pour l'œnologie, 2 Place Viala, F- 34060 Montpellier

³ Université de Montpellier, UMR1083 Sciences pour l'œnologie, 2 Place Viala, F- 34060 Montpellier

⁴ Lallemand, SAS, 19 rue des Briquetiers, F- 31700 Blagnac

⁵ Twistaroma, F-68021 Colmar

Correspondance : sylvie.dequin@supagro.inra.fr

Résumé

Aujourd'hui, l'industrie du vin doit faire face à de nombreux défis, liés à l'évolution des pratiques, des modes de consommation, au changement climatique et à la concurrence internationale. Un enjeu important de la filière est le développement de levures présentant des propriétés nouvelles, adaptées à ce contexte. La fermentation alcoolique, bien que faisant appel à une flore microbienne diverse présente dans le moût, est réalisée majoritairement par l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. C'est donc sur cette espèce qu'ont porté la majorité des efforts de recherche. Après la sélection de souches issues de la diversité naturelle, ces dix dernières années ont vu l'essor de techniques de génétique et d'hybridation permettant de combiner les propriétés intéressantes de plusieurs individus, ou la sélection de nouvelles variations en utilisant des approches d'évolution dirigée. Ces approches ont conduit à l'obtention de levures industrielles aux propriétés organoleptiques supérieures. Une autre voie consiste à combiner les propriétés d'espèces *Saccharomyces* par hybridation, ou encore à utiliser des espèces non *Saccharomyces* co-inoculées avec *S. cerevisiae* afin d'obtenir des profils aromatiques plus complexes. Nous présentons ici les avancées récentes dans l'amélioration des levures *S. cerevisiae* et la sélection de levures non conventionnelles pour optimiser la qualité organoleptique des vins.

Mots-clés : Fermentation œnologique, levures, arômes, sulfites, alcool, évolution dirigée, hybridation

Abstract: Exploration and exploitation of the biodiversity of wine yeast: how to optimize the organoleptic quality of wines?

Today, the wine industry is facing many challenges related to the development of new practices, changes in wine consumption, climate change and international competition. An important issue is the development of yeasts with new properties, adapted to this context. Wine fermentation, although involving a diverse microbial flora present in the must, is mainly carried out by the species *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, this species has been the focus of most research efforts. After selecting strains from natural diversity, the last ten years have seen the rise of genetic and hybridization techniques to combine interesting properties of several individuals, and of evolutionary engineering to select new variations. These approaches resulted in the development of several industrial yeasts with superior organoleptic properties. Another strategy is to combine the properties of different *Saccharomyces* species by hybridization, or to use non-*Saccharomyces* species co-inoculated with *S. cerevisiae* in order to obtain more complex flavor profiles. We present recent advances in the improvement of *S. cerevisiae* and in the selection of non-conventional yeasts to optimize the organoleptic quality of the wines.

Keywords: Wine fermentation, yeast, aromas, sulfite, alcohol, adaptive evolution, hybridization

Introduction

Le vin a une longue et riche histoire, datant de plusieurs milliers d'années, étroitement liée à l'histoire de l'agriculture. Des études archéologiques et historiques permettent de penser que le vin est apparu durant la période néolithique (8500–4000 av. J.-C.). La sédentarisation des hommes durant cette période a favorisé, de manière générale, le développement de la transformation et du stockage des aliments (Cavaliere et al., 2003). L'une des premières preuves de la production de vin remonte à 5400–5000 av. J.-C, avec la découverte de la présence de tartrate de calcium dans des jarres datées de cette époque, sur le site néolithique de Hajji Firuz en Iran (McGovern et al., 1996). De là, la vinification s'est étendue à l'Égypte et à la Mésopotamie (~ 3500–3000 av. J.-C.) pour arriver en Crète (~2200 av. J.-C.) avant d'atteindre Europe et, à partir de là, le "nouveau monde" (McGovern, 2003).

La fermentation alcoolique est non seulement une méthode efficace pour la préservation de la qualité et la sécurité des boissons et des aliments, mais le vin est aussi une drogue et un remède largement utilisés dans l'antiquité, en raison de ses propriétés analgésiques, désinfectantes et de conservation. Au fil du temps, le vin a influencé la géographie, l'économie, l'archéologie, l'histoire, les mythologies et les religions, les arts et les traditions, le droit et la médecine. Aujourd'hui, cette boisson a une place unique dans la plupart des sociétés, avec une forte valeur économique et culturelle.

Ce n'est qu'en 1860 que Louis Pasteur a découvert l'origine de la fermentation et l'implication de la levure (Pasteur, 1860). Au début des années 1880, Emile Christian Hansen, du laboratoire Carlsberg au Danemark, a développé la première culture pure de levure et la première inoculation d'un moût de raisin avec une culture de levure pure a été réalisée par Müller-Thurgau en 1890. Cette pratique a commencé à être utilisée en œnologie dans les années 1970. Depuis, elle s'est généralisée et actuellement, la majorité des vins sont élaborés à l'aide de levures sélectionnées appartenant principalement à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Ces pratiques ont permis un meilleur contrôle et fiabilité du processus de fermentation, en limitant les risques d'altérations microbiologiques, et ont largement contribué à l'amélioration de la qualité des vins au cours des dernières décennies.

Aujourd'hui, la filière œnologique doit faire face à de nombreux défis, liés à l'évolution des pratiques, des modes de consommation, au changement climatique et à la concurrence internationale. Ce contexte se traduit par une dépendance accrue à l'égard de l'innovation technologique. La qualité sensorielle est devenue un critère essentiel pour le consommateur, et ce pour de nombreux produits fermentés (Hugenholz, 2013). Le vin n'échappe pas à cette tendance et l'obtention de signatures uniques permettant de distinguer un vin des autres sur le marché est recherchée.

L'arôme du vin se compose d'une grande variété de composés volatils, certains d'entre eux provenant des raisins (arômes variétaux), de produits secondaires synthétisés lors de la fermentation (arômes fermentaires) et générés lors du vieillissement du vin (arômes post-fermentaires).

L'utilisation et le développement de souches et espèces de levures présentant des propriétés nouvelles, adaptées à ce contexte, représentent de ce fait un enjeu important. *S. cerevisiae* reste la principale levure sur laquelle ont été concentrés la plupart des efforts de recherche d'avant-garde en génétique, génomique, physiologie pour l'amélioration des levures de vin. Ces connaissances ont permis de réelles possibilités d'innovation, basées sur une meilleure exploitation de la diversité de cette espèce ou sur le développement de variants présentant de nouvelles capacités. Des stratégies non OGM ont été privilégiées ces dix dernières années, reposant principalement sur (i) des travaux de génétique quantitative qui visent à identifier les bases génétiques des propriétés des souches, de façon à développer de manière rationnelle des levures présentant une combinaison de traits optimaux par hybridation, (ii) des approches d'évolution dirigée, qui sont des stratégies alternatives aux approches basées sur le génie génétique permettant de générer de la diversité. Par ailleurs, les avancées en génomique ont permis ces dernières années l'identification parmi les levures œnologiques de plusieurs hybrides inter-espèces *Saccharomyces*, qui présentent un certain nombre d'avantages par rapport à *S. cerevisiae*. Enfin, les espèces non-*Saccharomyces* présentes dans le moût peuvent contribuer aux

caractéristiques organoleptiques des vins, que ce soit de manière positive ou négative (Fleet, 1993 ; Jolly et al., 2014). Actuellement, une tendance forte est d'exploiter cette diversité d'espèces de façon contrôlée, en utilisant des inoculum mixtes non *Saccharomyces/S. cerevisiae*.

Dans cette revue, nous insisterons plus particulièrement sur les développements récents de levures *S. cerevisiae* en lien avec l'amélioration des qualités organoleptiques du vin, et nous discuterons plus brièvement l'intérêt de levures moins conventionnelles, comme les hybrides *Saccharomyces* inter-espèces et des espèces non *Saccharomyces*.

1. Evolution de la flore pendant la fermentation œnologique

La fermentation des moûts de raisins peut se produire spontanément par l'activité de divers micro-organismes naturellement présents sur les baies de raisin. Plus de 40 espèces de levures ont été identifiées à partir de moût de raisins (Fleet, 1993 ; Jolly et al., 2014). Les genres les plus fréquents sont *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces* et *Dekkera*. Ces espèces sont majoritaires lors des étapes préfermentaires de l'élaboration des vins et en début de fermentation. Une succession séquentielle de ces espèces est observée au cours de la première phase de la fermentation spontanée. La plupart de ces espèces disparaissent rapidement, bien que certaines puissent persister plus longtemps (Fleet, 1993). Ce phénomène peut s'expliquer par leur faible capacité fermentaire, leur faible tolérance à l'anaérobiose et aux concentrations élevées en SO₂ et en éthanol.

La fermentation spontanée est une pratique pouvant conduire à l'obtention de profils aromatiques plus complexes, en raison du répertoire d'espèces et de souches mises en jeu dans le moût. Cependant, le microbiote naturel, qui provient de la flore présente sur les baies et dans les caves, est inconnu et variable d'une année sur l'autre, ce qui en fait une pratique imprévisible et donc risquée. Même dans le cas des fermentations spontanées, la prédominance de *S. cerevisiae* (inoculée ou indigène) dans la fermentation est attendue et désirée. Cette espèce est responsable de la dégradation de la majeure partie des sucres en éthanol et CO₂. Une des caractéristiques les plus remarquables de *S. cerevisiae* et d'autres espèces étroitement apparentées est leur capacité à produire et accumuler l'éthanol, appelé effet Crabtree, même en présence d'oxygène. C'est la combinaison de plusieurs traits « gagnants », comme la dégradation rapide des sucres, la production et l'accumulation d'éthanol associée à la production de chaleur, la tolérance à ce composé et aux fortes températures, et la capacité de croissance en anaérobiose qui fait de *S. cerevisiae* la levure œnologique par excellence.

2. La levure *S. cerevisiae* : rôle et diversité intra espèce

La fermentation œnologique expose les levures à une variété de stress : stress osmotique dû à la forte concentration en sucres du moût de raisin (180-260 g/L), niveaux élevés de sulfite, anaérobiose, stress acide, limitation en éléments nutritifs (azote, lipides et vitamines) et toxicité de l'éthanol. Une fermentation de vin typique comporte une phase de latence, qui dure plusieurs heures, une courte phase de croissance de 24 à 36 heures, suivie d'une phase stationnaire, pendant laquelle la majeure partie du sucre (entre 50 et 80%) est fermentée. Durant cette phase, l'activité des levures diminue constamment, bien que les niveaux de viabilité restent élevés (en général plus de 90%), jusqu'à ce que le sucre soit épuisé.

Dans ce contexte, la levure *S. cerevisiae* joue un rôle majeur. Elle est en effet non seulement responsable de la dégradation des sucres en éthanol et CO₂, mais produit de nombreux sous-produits de fermentation.

Les arômes produits par *S. cerevisiae* comprennent entre autres des aldéhydes, des alcools supérieurs, des acides gras à moyenne et longue chaîne, des acides gras, des esters d'éthyle et des esters d'acétate ainsi que des composés soufrés (Swiegers et al., 2005). Ces composés volatils sont issus de la dégradation des sucres, des acides aminés et des acides gras, et sont formés à travers un processus métabolique complexe et dynamique pendant la fermentation. De nombreux facteurs contrôlent leur production : le cépage, la nature des précurseurs (principalement les acides aminés), la disponibilité en micronutriments et en azote, les traitements du moût et les conditions de fermentation, y compris la température, ainsi que la souche de levure. Ces composés fermentaires jouent un rôle clé dans la qualité sensorielle et la typicité des vins. Par exemple, certains alcools supérieurs, les esters d'éthyle et des esters d'acétate génèrent des notes fruitées et florales (Swiegers et al., 2005). L'acide acétique est un composé clé dont la production doit rester faible, et dont le niveau de production varie très fortement d'une souche à l'autre (Camarasa et al., 2011 ; Marullo et al., 2006 ; Salinas et al., 2012). Des composés cétoniques comme l'acétaldéhyde peuvent également avoir un impact organoleptique en combinant le SO₂. Les composés soufrés comme les sulfites (SO₂) ou le sulfure d'hydrogène (H₂S) affectent négativement les qualités sensorielles d'un vin. La comparaison de 72 souches *S. cerevisiae* d'origines diverses dans des conditions de fermentation œnologique a révélé des variations importantes non seulement dans les propriétés fermentaires mais aussi dans la production de métabolites, en particulier l'acide acétique et les esters (Camarasa et al., 2011). Une autre étude, basée sur un nombre restreint de souches et l'analyse sensorielle, a suggéré que les levures de vin produisent plus d'arômes fruités du vin que les souches provenant d'autres origines (Hyma et al., 2011).

En plus de cette production *de novo* de métabolites secondaires, les levures peuvent également transformer des précurseurs du raisin pour libérer des arômes variétaux (Swiegers et al., 2005 ; Swiegers et Pretorius, 2005). Les levures *Saccharomyces* peuvent par exemple former des thiols comme le 4MMP (4-méthyl-4-mercapto-pentan-2-one), le 3MH (3-mercapto-hexan-1-ol) et son acétate (A3MH) à partir de différents précurseurs. Ces composés, caractéristiques des vins de Sauvignon blanc, apportent des notes aromatiques de fruit de la passion, pamplemousse, citron et buis (Tominaga et al., 2000, Aznar et al., 2001). L'effet de la souche de levure sur la révélation des thiols volatils peut varier d'un facteur 20 (Dubourdieu et al., 2006 ; Swiegers et Pretorius, 2005). D'autres composés, comme les terpénols sont des composés très importants de l'arôme des cépages musqués (muscat, gewurztraminer...). Lors de la fermentation, la levure *S. cerevisiae* agit sur les composés terpéniques en hydrolysant les glycosides, et en isomérisant ou en réduisant les alcools terpéniques libérés comme le géraniol pour donner du citronellol ou du géranyl diol et donner du cis rose oxyde, l'un des composés d'arôme clé du gewurztraminer (Koslitz et al., 2008). Enfin, la souche de levure peut également avoir un impact sur la formation d'autres composés, comme par exemple le sulfure de diméthyle (DMS), un composé soufré léger qui peut contribuer à l'arôme, positivement ou négativement selon sa concentration et la typologie du vin. Différents travaux ont montré que ce composé est un exhausteur des arômes fruités (Segurel et al., 2004 ; Dagan et Schneider, 2012). La S-méthylméthionine (SMM) représente l'essentiel des précurseurs de DMS des raisins et du moût, mais une part importante de ce potentiel aromatique est perdue au cours de la vinification. Les levures ont différentes capacités d'assimilation de ce précurseur pendant la fermentation (Dagan et Schneider, 2012), ce qui ouvre des perspectives pour développer des souches préservant ce potentiel.

Les stratégies mises en œuvre pour développer de nouvelles souches *S. cerevisiae* plus performantes sur le plan organoleptique ainsi que plusieurs exemples illustrant ces recherches seront détaillées ci-après.

3. Amélioration des souches : nouvelles cibles technologiques

3.1 Stratégies non OGM : cartographie de QTL et évolution dirigée

3.1.1 Cartographie de QTL

Les variations du phénotype (par exemple la production de quantité différente d'un métabolite) sont la conséquence de mécanismes génétiques complexes. On définit un QTL (Quantitative Trait Locus) comme une région du génome responsable de ce caractère quantitatif. Le principe de recherche de QTL consiste à établir un lien statistique entre l'hérédité d'un marqueur génétique (le plus souvent un polymorphisme de séquence) et la valeur d'un caractère quantitatif. La recherche de ce lien s'effectue par des approches de cartographie génétique et phénotypiques, qui sont résumées sur la Figure 1. Différents approches de cartographie de QTL ont été menées pour rechercher des gènes impliqués dans des caractères technologiques, comme la production de sulfite ou la production de composés volatils aromatiques.

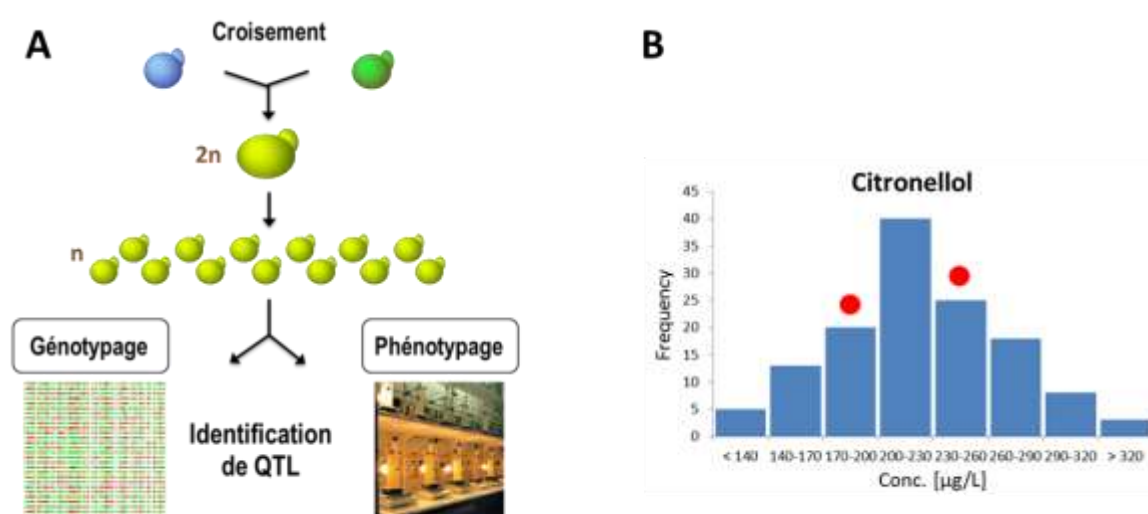


Figure 1 : Démarche de recherche de QTL. (A) Deux souches parentales haploïdes ayant des valeurs phénotypiques différentes sont croisées, générant un individu diploïde hétérozygote. La sporulation de cet individu permet d'obtenir une population de descendants haploïdes ayant subi plusieurs événements de recombinaison lors de la méiose et possédant une distribution aléatoire des différents loci parentaux. Ces descendants sont génotypés (actuellement par séquençage complet de leur génome) afin de localiser ces marqueurs, et phénotypés pour les traits quantitatifs d'intérêt. L'analyse statistique de liaison est la dernière étape qui permet la détection des QTL. Un QTL est identifié lorsqu'il existe une corrélation entre un marqueur et le paramètre quantitatif étudié. (B) Fréquence de la distribution d'un trait (citronellol) dans la population de descendants. La production des 2 parents est indiquée par un rond rouge.

3.1.2 Evolution dirigée

Les approches d'évolution expérimentale, ou évolution adaptative, sont basées sur la culture à long-terme d'un organisme en présence d'une pression de sélection (Figure 2). Ceci favorise l'émergence de variations génétiques, qui peut être suivie par l'évolution adaptative de la population de levure et par la sélection de variants présentant un phénotype souhaité. La caractérisation des souches évoluées et ancestrales par séquençage de leur génome et différentes analyses de génomique fonctionnelle (comme l'étude de l'expression du génome par analyse transcriptomique) est généralement utilisée pour essayer d'identifier les mutations impliquées, ce qui reste un objectif parfois difficile à atteindre. Une fois

identifiées, les mutations peuvent alors être transférées à une autre souche par hybridation. Les approches d'évolution ont été appliquées récemment au développement de souches aromatiques et de souches à faible rendement en alcool. Elles ont pour avantage de pouvoir être utilisées sans connaissance génétique préalable, et de pouvoir être appliquées à n'importe quelle espèce.

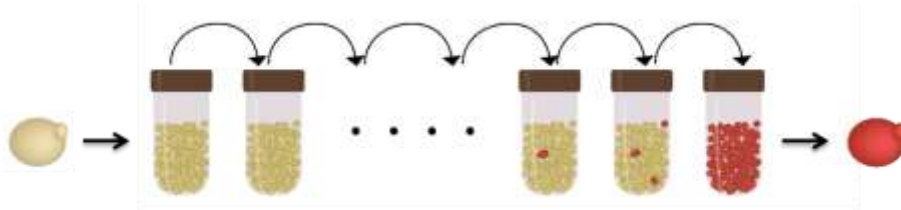


Figure 2 : Principe de l'évolution adaptative. Une culture prolongée est réalisée afin de favoriser l'accumulation de mutations spontanées. L'utilisation de conditions sélectives (présence d'un stress, croissance en présence d'un substrat mal assimilé etc...) permet de sélectionner les souches ayant acquis une mutation qui confère un bénéfice dans ces conditions.

3.2 Exemples de développement de souches *S. cerevisiae*

3.2.1 Levure œnologique faible productrice de sulfites

Les levures œnologiques forment divers composés soufrés en fermentation qui peuvent avoir des impacts négatifs sur la qualité organoleptique, la qualité sanitaire ou la maîtrise des procédés. C'est le cas des sulfites et du H_2S qui sont parfois formés en quantités excessives lors des fermentations alcooliques. Les niveaux de sulfites des vins sont réglementés pour des raisons sanitaires ce qui suppose la maîtrise de leur formation au cours de l'élaboration des vins. Les sulfites sont aussi des inhibiteurs des bactéries lactiques qui réalisent la fermentation malolactique ce qui suppose de maîtriser leur teneur transitoire au cours des procédés.

Il est donc important de maîtriser la formation de ces composés. Des travaux récents de génétique des levures ont permis d'identifier les bases génétiques des variations de formation de composés soufrés. Une démarche de génétique quantitative et de recherche de QTL (quantitative trait locus) a été menée dans deux souches aux comportements contrastés, ce qui a permis d'identifier deux gènes candidats impliqués dans le métabolisme du soufre (*SKP2* et *MET2*) pour lesquels l'impact des variations alléliques sur la formation de SO_2 , de H_2S et d'acétaldéhyde a été démontré.

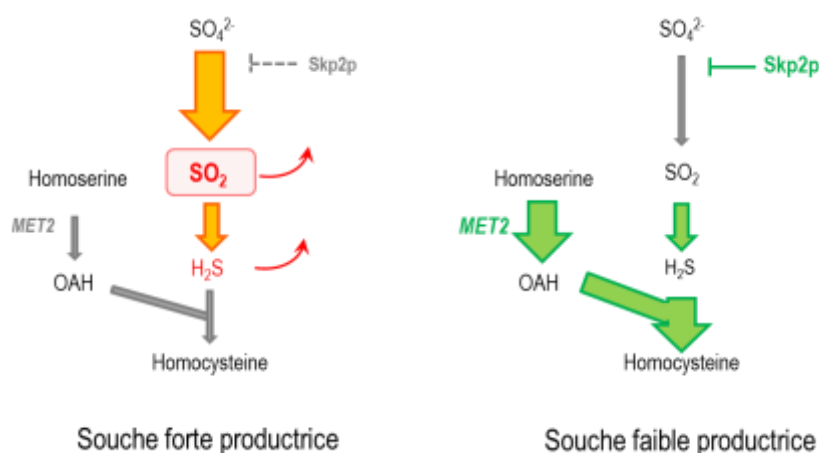


Figure 3 : Allèles impliqués dans la formation de SO_2 , H_2S et acétaldéhyde

Ceci a permis d'expliquer les différences de comportement des souches. En effet, la combinaison des allèles favorables permet, à la fois, de limiter la capacité d'incorporation du sulfate très précocement dans le métabolisme et d'augmenter l'utilisation des formes sulfites et H₂S par l'activité de la voie d'apport des squelettes azotés conduisant à la cystéine. Une fois ces gènes/allèles identifiés, il a été possible de les introduire à façon dans d'autres souches de levures, par des approches d'hybridation, ce qui a permis de générer de nouvelles souches faibles productrices de SO₂, H₂S et acétaldéhyde (Noble et al., 2015).

3.2.2 Levures œnologiques à caractère aromatique

Thiols : Des avancées récentes ont permis d'identifier un des gènes clés impliqués dans la formation d'un des thiols du Sauvignon Blanc. En utilisant une approche de cartographie de QTL, il a été possible d'identifier un allèle du gène *IRC7*, qui code pour une cystéine desulfhydrase impliquée dans la forte production de 4MMP. La plupart des souches de *S. cerevisiae*, y compris la souche de laboratoire de référence, ont une délétion de 38 pb (paires de bases) qui inactive ce gène. La surexpression de l'allèle long identifié dans une levure de vin a permis d'augmenter la production de 4MMP dans un vin Sauvignon Blanc, qui est alors passé d'un niveau indétectable (<10 ng/L) à des concentrations de 1000 ng/L, ainsi que celles de 3MH et A3MH (Roncoroni et al., 2011). L'identification de ce gène a permis par la suite le développement de souches fortes productrices de thiols par des approches d'hybridation (Dufour et al., 2013)

Terpénols : Les terpénols dont fait partie le géraniol sont des composés très importants de l'arôme des cépages musqués (muscat, gewurztraminer...). Différentes approches de recherche de QTL ont permis d'identifier des régions du génome impliquées dans la production de rose oxyde caractéristique du gewurztraminer, à partir du géraniol à l'odeur de rose (Steyer et al., 2012), mais le gène impliqué dans ces différences n'a pas encore été identifié. Ces études ont également éclairé les étapes de la transformation du géraniol. Il est transformé en un autre composé aromatique aux notes citronnées (citronellol) sous l'action du gène *OYE2* et est également transformé en ester durant la fermentation sous l'action du gène *ATF1*, ce pool d'ester de géraniol pouvant ensuite être réhydrolysé par la suite durant la conservation du vin (Steyer et al., 2013). Un des enjeux actuels, poursuivis dans le cadre du projet européen YeastCell (ITN-2013-606795) dont l'INRA est partenaire, est d'identifier d'autres allèles potentiellement impliqués dans la formation de ces composés.

Esters : Récemment une levure aromatique surproductrice d'esters a été obtenue en utilisant une approche d'évolution adaptative. Une souche de levure œnologique commerciale a été cultivée pendant 70 générations sur un milieu contenant du gluconate, un sucre mal assimilé par *S. cerevisiae* et métabolisé au niveau de la voie des pentoses phosphate (VPP). Cette approche a permis de sélectionner un variant présentant une meilleure croissance sur ce substrat (Cadiere et al., 2011 ; Cadiere et al., 2012). Lors de la fermentation du vin, la souche évoluée se caractérise par une forte production d'esters d'acétate, qui participent au caractère fruité du vin, et par une diminution de la production d'acide acétique, composé indésirable à forte concentration. Ces modifications sont dues à un métabolisme fortement remanié, notamment à une amplification de la voie des pentoses phosphates, une synthèse accrue de lipides et des modifications du métabolisme azoté et secondaire. Des vinifications à l'échelle pilote ainsi que des essais en cave ont confirmé le potentiel de cette souche pour la production de vins aromatiques et fruités. Cette souche est commercialisée depuis 2012.

Les effets de différents facteurs environnementaux (azote, phytostérols et température) sur la production des arômes de la souche évoluée et de la souche ancestrale ont été évalués. Une surproduction systématique des alcools supérieurs (à l'exception du propanol) et des esters d'acétate par la souche évoluée a été observée quelles que soient les conditions de fermentation (Figure 4).

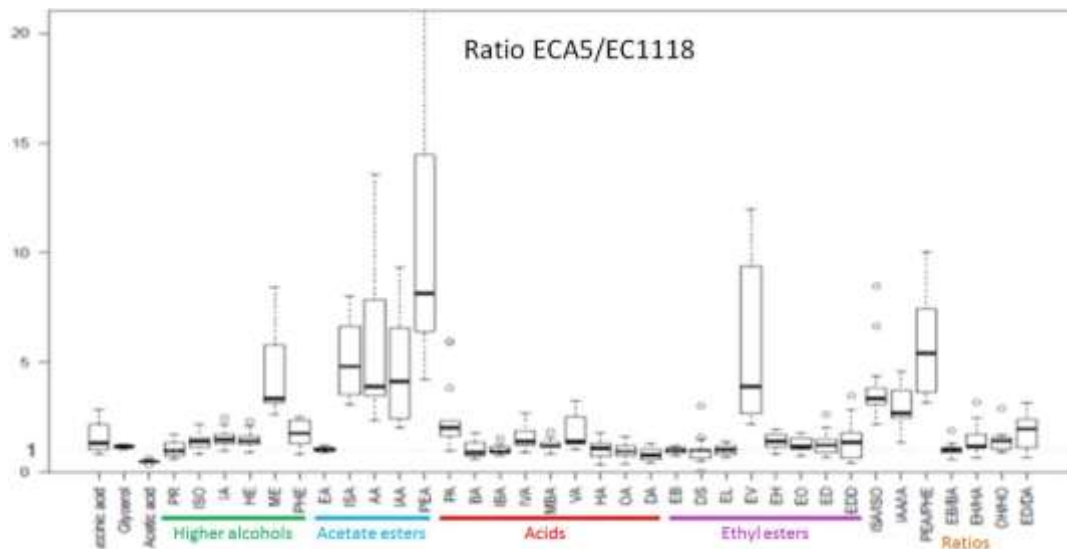


Figure 4 : Caractéristiques aromatiques de la souche évoluée Affinity™ ECA5. Ratios entre les concentrations finales des arômes fermentaires produites par Affinity™ ECA5 (souche évoluée) et Lalvin EC1118® (souche ancestrale).

PR: propanol; ISO: isobutanol; IA: alcool isoamylique; HE: hexanol; ME: méthionol; PHE: 2-phényléthanol; EA: acétate d'éthyle; ISA: acétate d'isobutyle; AA: acétate d'amyle; IAA: acétate d'isoamyle; PEA: 2-phényléthylacetate; PA: acide propanoïque; BA: acide butanoïque; IBA: acide isobutanoïque; IVA: acide isovalérique; MBA: acide 2-méthylbutanoïque; VA: acide valérique; HA: acide hexanoïque; OA: acide octanoïque; DA: acide décanoïque; EB: butanoate d'éthyle; DS: succinate de diéthyle; EL: lactate d'éthyle; EV: valérate d'éthyle; EH: hexanoate d'éthyle; EO: octanoate d'éthyle; ED: décanoate d'éthyle; JED: dodécanoate d'éthyle

Le séquençage complet du génome de plusieurs souches évoluées ainsi obtenues a récemment permis d'identifier la mutation responsable de cette surproduction d'esters, ce qui offre la possibilité de transférer ce caractère à d'autres souches œnologiques. Par ailleurs, d'autres travaux basés sur la recherche de QTL sont actuellement développés par l'INRA dans le cadre du projet européen YeastCell (ITN-2013-606795), afin d'identifier des gènes et allèles impliqués dans la formation des alcools supérieurs et esters.

3.2.3 Souche œnologique faible productrice d'éthanol

L'évolution des pratiques viticoles, la sélection de cépages à fort rendement en sucres et le changement climatique ont conduit ces 30 dernières années à une augmentation de la teneur en alcool des vins de l'ordre de 2% v/v. Cette augmentation a des conséquences à plusieurs niveaux : (i) sur la qualité sensorielle des vins et le déroulement des fermentations, (ii) économique, ainsi (iii) qu'en termes de santé publique. C'est avec l'objectif de réorienter le métabolisme des levures vers la formation de sous-produits ayant un impact favorable sur la qualité du vin, comme le glycérol, au détriment de l'éthanol, que des travaux récents ont été conduits visant à sélectionner des souches par adaptation sur des milieux à forte pression osmotique.

L'obtention de souches à faible rendement en alcool repose sur la modification de leur métabolisme afin de détourner une partie des sucres vers d'autres sous-produits que l'éthanol. Une démarche d'évolution expérimentale a été conduite sur une souche œnologique commerciale, consistant à maintenir en culture les levures pendant plusieurs centaines de générations dans un milieu salin contrôlé (en présence de KCl) imposant un stress osmotique afin de favoriser l'apparition et la sélection de mutations naturelles orientant leur métabolisme vers une surproduction de glycérol. Il a ainsi été possible de dévier le métabolisme des sucres vers la formation de glycérol (qui confère au vin de la rondeur, du moelleux) et de 2,3-butanediol (neutre d'un point de vue sensoriel), sans accumulation de

métabolites indésirables. Une approche génétique basée sur des croisements de descendants méiotiques de la levure évoluée a permis d'obtenir une souche présentant une déviation métabolique plus importante. Une souche finale sélectionnée a été évaluée à l'échelle pilote sur moûts de raisin : les vins obtenus présentent une diminution de la teneur en alcool de l'ordre de 1 % v/v et contiennent très peu d'acidité volatile. Leur acidité totale est par contre plus élevée, ce qui présente un fort intérêt puisque l'augmentation de la teneur en alcool des vins est le plus souvent associée à des pH trop élevés (Tilloy et al., 2014). Ces recherches s'inscrivent dans l'effort actuel des chercheurs de l'INRA au sein du programme LACCAGE (Impacts et adaptations à long terme de la filière viti-vinicole au Changement Climatique) pour mieux cerner les impacts du changement climatique et étudier les stratégies d'adaptation de la filière viticole.

4. Autres espèces *Saccharomyces* et hybrides

En dehors de *S. cerevisiae*, une autre espèce du clade *Saccharomyces*, *Saccharomyces uvarum*, est également capable d'achever la fermentation alcoolique du jus de raisin. On retrouve cette espèce également associée à la fermentation du cidre (Nguyen et al., 2000). Il s'agit d'une espèce plus cryotolérante que *S. cerevisiae* (Belloch et al., 2008), qui confère au vin des notes florales particulières liées notamment à la production de phényl-2-éthanol et de son acétate. Elle produit également peu d'acide acétique et peut produire des terpènes (Masneuf-Pomarede et al., 2010 ; Gamero et al., 2011).

Au cours des dernières décennies, un nombre croissant d'hybrides naturels interspécifiques entre deux ou plusieurs espèces de levure *Saccharomyces* a été identifié dans les procédés fermentaires conduisant à des boissons fermentés. L'exemple le plus connu est la levure de brasserie *S. pastorianus*, qui est un hybride entre *S. cerevisiae* et *S. eubayanus* (Libkind et al., 2011). La caractérisation moléculaire de levures de vin et de cidre a également révélé de nombreux hybrides formés indépendamment entre *S. cerevisiae* / *S. kudriavzevii* (González et al., 2006 ; Erny et al., 2012), *S. cerevisiae* / *S. uvarum* (Masneuf et al., 1998 ; Masneuf et al., 2002 ; Sipiczki, 2008) ou entre *S. cerevisiae* / *S. kudriavzevii* / *S. uvarum* (González et al., 2006).

L'hybridation interspécifique, en fournissant de nouvelles combinaisons de gènes, peut conférer de nouveaux avantages par rapport aux espèces parentales. Ainsi, plusieurs travaux ont révélé une plus grande tolérance des hybrides aux stress ou aux basses températures par rapport à *S. cerevisiae* lors de la fermentation du vin (Belloch et al., 2008 ; González et al., 2007). Par exemple, *S. uvarum* et *S. kudriavzevii* sont mieux adaptées à la croissance à basse température que *S. cerevisiae*, tandis que *S. cerevisiae* est plus tolérante à l'alcool. Ces hybrides peuvent être particulièrement avantageux lors de la fermentation des vins blancs, qui a lieu à basse température (généralement à 10-15° C) afin de réduire la perte de composés volatils aromatiques. Certains hybrides sont également décrits comme forts producteurs d'alcools supérieurs, d'esters et de thiols (González et al., 2007 ; Dubourdieu et al., 2006 ; Swiegers et al., 2009). Les caractéristiques aromatiques de souches de différentes espèces et d'hybrides interspécifiques ont été comparées lors de vinifications sur Gewurztraminer (Figure 5). Cette analyse, bien que portant sur un nombre restreint d'individus de chaque espèce, a permis de différencier les origines génétiques sur la base de la production de certaines familles d'arômes : par exemple, les hybrides *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se caractérisent par une plus forte production de terpénols.

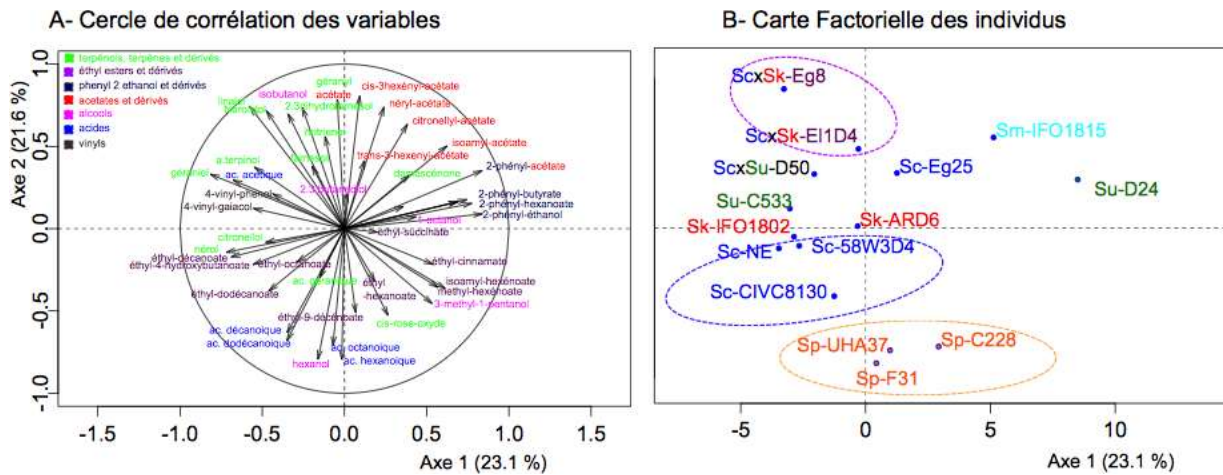


Figure 5 : Analyse en composantes principales (ACP) des concentrations en composés volatils de vins de Gewurztraminer (2008) produits par différentes souches et espèces. Fermentations réalisées à l'échelle de 2 litres en triplicat. A : Cercle de corrélation des variables. B : Carte factorielle des individus. Sp-F31, Sp-UHA37, Sp-C228 : *S. paradoxus* ; Su-D24 : *S. uvarum* ; Sc x Sk-Eg8, Sc x Sk-E1D4 (hybrides *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*), Sc-CIVC8130, Sc-Eg25, Sc-58W3D4 : *S. cerevisiae* ; Sk-IFO1815 : *S. mikatae*, Sk-IFO1802 : *S. kudriavzevii* (ici probablement dominé par *S. cerevisiae*, et Sc-NE : non ensemencé). D'après Steyer et Legras (données non publiées).

5. Espèces non *Saccharomyces*

L'intérêt œnologique des levures non-*Saccharomyces* a connu un regain d'intérêt ces dernières années. Si leur impact a longtemps été jugé comme négatif, plusieurs études récentes ont dévoilé certaines aptitudes technologiques de ces levures, notamment pour leur production d'arômes. D'une manière générale, l'addition des levures non-*Saccharomyces*, en combinaison avec *S. cerevisiae*, pourrait permettre d'accroître la complexité du produit final, tout en évitant les risques liés à la fermentation spontanée. Leur contribution à la production d'arômes fermentaires et leur capacité à excréter des activités enzymatiques d'intérêt sont autant de potentialités qui ont été décrites dans de nombreuses publications (Jolly et al., 2014 ; Sadoudi et al., 2012 ; Dashko et al., 2015 ; Renault et al., 2015). Cela n'exclue pas la production parfois élevée de certains composés indésirables ; comme chez *S. cerevisiae*, il existe une grande diversité phénotypique au sein de chaque espèce, ce qui nécessite de cribler un grand nombre de souches pour obtenir la bonne combinaison de propriétés d'intérêt. Une autre difficulté est l'existence d'interactions complexes et en grande partie inconnues entre levures. Par exemple, des effets synergiques ou au contraire négatifs sur la production de composés aromatiques ont été observés lors de co-cultures de certaines espèces avec *S. cerevisiae* (Sadoudi et al., 2012). Par conséquent, la qualité du vin qui résulte de fermentation après ensemencement avec un mélange de levures est assez imprévisible. Quelques couples mixtes sont actuellement commercialisés, offrant de nouveaux outils pour moduler l'équilibre organoleptique des vins.

Conclusions et perspectives

Plus de 800 composés ont été identifiés comme participant au profil aromatique des vins (Mendes-Pinto, 2009). Certains de ces composés possèdent une contribution individuelle significative, tandis que d'autres vont agir en synergie ou de façon antagoniste. Les arômes peuvent être issus directement du raisin, produits par le métabolisme des micro-organismes, notamment la levure, ou développés au cours du vieillissement du vin (Francis et Newton, 2005).

Aujourd'hui, les propriétés aromatiques et en particulier le caractère fruité des vins sont de plus en plus recherchés. La souche de levure, la composition du moût et le mode de conduite de la fermentation ont un impact majeur sur la production d'arômes au cours de cette étape du procédé de vinification. De ce fait, la production d'arômes fermentaires peut être modulée en jouant sur la souche de levure ou sur les conditions de fermentation (températures, nutriments). Les avancées récentes en matière de développement de nouvelles souches produisant plus d'arômes fermentaires ou capables de convertir de manière plus efficace les précurseurs du moût en arômes variétaux, offrent des perspectives considérables pour orienter le profil aromatique des vins. Ces approches ont déjà abouti à la mise sur le marché de nouvelles souches. Leur poursuite devrait permettre d'identifier les bases génétiques des différences de production d'un plus grand nombre d'arômes, offrant de nouvelles perspectives d'amélioration.

D'autre part, l'utilisation des levures non-*Saccharomyces* a connu un regain d'intérêt ces dernières années. Certaines souches appartenant à ces espèces présentent en effet des potentialités intéressantes, notamment aromatiques. Il existe de ce fait une tendance récente et avérée pour développer des fermentations en culture mixte, combinant une espèce « non conventionnelle » avec une *S. cerevisiae*. Si l'utilisation de ces levains mixtes peut constituer de nouveaux outils pour moduler l'équilibre organoleptique des vins, leur maîtrise nécessite une meilleure connaissance, jusqu'alors fragmentaire, du métabolisme des levures « non conventionnelles » ainsi que des mécanismes d'interactions avec *S. cerevisiae*.

Références bibliographiques

- Aznar M., Lopez R., Cacho J.F., Ferreira V., 2001. Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2924-2929
- Belloch C., Orlic S., Barrio E., Querol A., 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International Journal of Food Microbiology* 122, 188-195.
- Cadiere A., Camarasa C., Julien A., Dequin S., 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metabolic Engineering* 13, 263-271.
- Cadière A., Aguera E., Caillé S., Ortiz-Julien A., Dequin S., 2012. Pilot-scale evaluation the enological traits of a novel, aromatic wine yeast strain obtained by adaptive evolution. *Food Microbiology* 32, 332-337.
- Camarasa C., Sanchez I., Brial P., Bigey F., Dequin S., 2011. Phenotypic landscape of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: evidence for origin-dependent metabolic traits. *PLoS One* 6, e25147.
- Cavaliere D., McGovern P.E., Hartl D.L., Mortimer R., Polsinelli M., 2003. Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *Journal of Molecular Evolution* 57, 226-232.
- Dagan L., Schneider R., 2012. Le sulfure de diméthyle : Quels moyens pour gérer ses teneurs dans les vins en bouteille ? Actes du Colloque Arômes des vins, Toulouse, pp7-10.
- Dashko S., Zhou N., Tinta T., Sivilotti P., Lemut M.S., Trost K., Gamero A., Boekhout T., Butinar L., Vrhovsek U., Piskur J., 2015. Use of non-conventional yeast improves the wine aroma profile of Ribolla Gialla. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Apr 23. DOI 10.1007/s10295-015-1620-y
- Dubourdiou D., Tominaga T., Masneuf I., Peyrot des Gachons C., Murat M.L., 2006. The Role of Yeasts in Grape Flavor Development during Fermentation: The Example of Sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture* 57, 81-88.
- Dufour M., Zimmer A., Thibon C., Marullo P., 2013. Enhancement of volatile thiol release of *Saccharomyces cerevisiae* strains using molecular breeding. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 5893-5905.

- Erny C., Raoult P., Alais A., Butterlin G., Delobel P., Matei-Radoi F., Casaregola S., Legras J.L., 2012. Ecological success of a group of *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces kudriavzevii* hybrids in the northern European wine-making environment. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 3256-65.
- Fleet G.H., 1993. The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 1–25. In Fleet GH (ed.), Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Francis I.L., Newton J.L., 2005. Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 114-126.
- Gamero A., Manzanares P., Querol A., Belloch C., 2011. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. *International Journal of Food Microbiology* 145, 92-97.
- González S.S., Barrio E., Gafner J., Querol A., 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research* 6, 1221–1234.
- González S.S., Gallo L., Climent M.D., Barrio E., Querol A., 2007. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology* 116, 11–18.
- Hughenoltz J., 2013. Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology* 24, 155-159.
- Hyma K.E., Saerens S.M., Verstrepen K.J., Fay J.C., 2011. Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 11, 540-51.
- Jolly N.P., Varela C., Pretorius I.S., 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research* 14, 215–237.
- Koslitz S., Renaud L., Kohler M., Wust M., 2008. Stereoselective formation of the varietal aroma compound rose oxide during alcoholic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56,1371-5.
- Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Goncalves C., Dover J., Johnston M., Goncalves P., Sampaio J.P., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14539-14544.
- Masneuf I., Hansen J., Groth C. Piskur J., 1998. New Hybrids between *Saccharomyces* Sensu Stricto Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3887–3892.
- Masneuf I., Murat M., Naumov G., Tominaga T., Dubourdieu D., 2002. Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* & *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *Vitis vinifera* sauvignon blanc wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 36, 205–212.
- Masneuf-Pomarede I., Bely M., Marullo P., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D., 2010. Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology* 139, 79-86.
- Marullo P., Bely M., Masneuf-Pomarede I., Pons M., Aigle M., Dubourdieu D., 2006. Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. *FEMS Yeast Research* 6, 268-279.
- McGovern P.E., Glusker D.L., Exner L.J., Voigt M.M., 1996. Neolithic resonated wine. *Nature* 381, 480-481.
- McGovern P.E., 2003. *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture*. Princeton Univ. Press, Princeton.
- Mendes-Pinto M.M., 2009. Carotenoid breakdown products - the norisoprenoids - in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483, 236-45.
- Nguyen H.V., Lepingle A., Gaillardin C.A., 2000. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S.*

cerevisiae, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. Systematic and Applied Microbiology 23, 71-85.

Noble J., Sanchez I., Blondin B., 2015. Identification of new *Saccharomyces cerevisiae* variants of the *MET2* and *SKP2* genes controlling the sulfur assimilation pathway and the production of undesirable sulfur compounds during alcoholic fermentation. Microbial Cell Factory 14, 68.

Pasteur, L., 1860. Mémoire sur la fermentation alcoolique. Ann Chim Phys 58: 323-426.

Renault P., Coulon J., de Revel G., Barbe J.C., Bely M., 2015. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. International Journal of Food Microbiology 207, 40-48.

Roncoroni M., Santiago M., Hooks D.O., Moroney S., Harsch M.J., Lee S.A., Richards K.D., Nicolau L., Gardner R.C., 2011. The yeast *IRC7* gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. Food Microbiology 28, 926-35.

Sadoudi M., Tourdot-Maréchal R., Rousseaux S., Steyer D., Gallardo-Chacón J.J., Ballester J., Vichi S., Guérin-Schneider R., Caixach J., Alexandre H., 2012. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. Food Microbiology 32, 243-53.

Salinas F., Cubillos F.A., Soto D., Garcia V., Bergstrom A., Warringer J., Ganga A., Louis E., Liti G., Martinez C., 2012. The genetic basis of natural variation in oenological traits in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One 7: e49640.

Segurel M.A., Razungles A.J., Riou C., Salles M., Baumes R.L., 2004. Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 7084-7093.

Sipiczki M., 2008. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. FEMS Yeast Research 8, 996-1007.

Steyer D., Ambroset C., Brion C., Claudel P., Delobel P., Sanchez I., Erny C., Blondin B., Karst F., Legras J-L., 2012. QTL mapping of the production of wine aroma compounds by yeast. BMC Genomics 13, 573.

Steyer D., Erny C., Claudel P., Riveill G., Karst F., Legras J-L., 2013. Genetic analysis of geraniol metabolism during fermentation. Food Microbiology 33, 228-34.

Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.S., 2005 Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 139-173.

Swiegers J.H., Pretorius I.S., 2005. Yeast modulation of wine flavor. Advances in Applied Microbiology 57, 131-17

Swiegers J.H., Kievit R.L., Siebert T., Lattey K.A., Bramley B.R., Francis I.L., King E.S., Pretorius I.S., 2009. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. Food Microbiology 26, 204-211.

Tilloy V., Ortiz-Julien A., Dequin S., 2014. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. Applied and Environmental Microbiology 80, 2623-32.

Tominaga T., Baltenweck-Guyot R., Peyrot Des Gachons C., Dubourdieu D., 2000. Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. American Journal of Enology and Viticulture 51, 178-181.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)