



**HAL**  
open science

## Des outils pour fiabiliser les fermentations des vins et cidres biologiques en utilisant les levures et bactéries indigènes

Patrick Lucas, Isabelle Masneuf, Jean-Luc Legras, Marina Bely, Cécile Miot-Sertier, Mariette El Khoury, Hugo Campbell-Sills, Marine Börlin, Julie Maupeu, Amélie Vallet-Courbin, et al.

### ► To cite this version:

Patrick Lucas, Isabelle Masneuf, Jean-Luc Legras, Marina Bely, Cécile Miot-Sertier, et al.. Des outils pour fiabiliser les fermentations des vins et cidres biologiques en utilisant les levures et bactéries indigènes. *Innovations Agronomiques*, 2018, 63, pp.279-291. 10.15454/1.5191176806543086E12 . hal-01836004

**HAL Id: hal-01836004**

**<https://hal.science/hal-01836004>**

Submitted on 11 Jul 2018

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## Des outils pour fiabiliser les fermentations des vins et cidres biologiques en utilisant les levures et bactéries indigènes

Lucas P.<sup>1</sup>, Masneuf I.<sup>1</sup>, Legras J.L.<sup>2</sup>, Bely M.<sup>1</sup>, Miot-Sertier C.<sup>1</sup>, Claisse O.<sup>1</sup>, El Khoury M.<sup>1</sup>, Campbell-Sills H.<sup>1</sup>, Börlin M.<sup>1</sup>, Maupeu J.<sup>3</sup>, Vallet-Courbin A.<sup>3</sup>, Pladeau V.<sup>4</sup>, Becquet S.<sup>5,6</sup>, Chovelon M.<sup>6</sup>, Bauduin R.<sup>7</sup>, Cottereau P.<sup>8</sup>, Coarer M.<sup>8</sup>, Vinsonneau E.<sup>8</sup>, Colosio M.-C.<sup>8</sup>

<sup>1</sup> ISVV, Université de Bordeaux, Bordeaux Science Agro, INRA, 210 chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon

<sup>2</sup> SPO, INRA, SupAgro, Université de Montpellier, 2 place Pierre Viala, F-34060 Montpellier

<sup>3</sup> Microflora, ISVV, 210 chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon

<sup>4</sup> SudVinBio, rue Simone Signoret, F-34070 Montpellier

<sup>5</sup> SVBNA, 7 le grand Barrail, F-33570 Montagne

<sup>6</sup> ITAB, 149, rue de Bercy, F-75595 Paris

<sup>7</sup> IFPC, la Rangée Chesnel, F-61500 Sees

<sup>8</sup> IFV, Pôle Val-de-Loire, Pôle Bordeaux-Aquitaine, Pôle Rhône Méditerranée, Domaine de l'Espiguette - F-30240, Le Grau du Roi

**Correspondance** : [patrick.lucas@u-bordeaux.fr](mailto:patrick.lucas@u-bordeaux.fr)

### Résumé

Avec le développement des vins et cidres bio, on observe une vraie tendance à la réalisation de fermentations spontanées, en laissant se développer les levures et bactéries indigènes. En effet, ces microorganismes sont parfois considérés comme des éléments du terroir qui participent à la typicité des vins et des cidres. Pourtant, aucune connaissance scientifique ne permet d'affirmer une telle spécificité, alors que la non-maîtrise de ces microorganismes peut conduire à des difficultés de fermentation, des déviations aromatiques ou des altérations. Le projet Casdar Levains Bio s'est appuyé sur un réseau de laboratoires, instituts techniques et associations de producteurs bio pour apporter les connaissances nécessaires et des solutions pratiques pour réaliser des fermentations indigènes avec un bon niveau de maîtrise. Il a été montré qu'il existe une grande diversité de souches de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et de la bactérie lactique *Oenococcus oeni*, que des souches sont génétiquement adaptées à certains produits, mais pas à des régions ou à des sites de production. Des protocoles ont été mis au point pour permettre de sélectionner des souches issues des exploitations ou pour réaliser des pieds de cuve de microorganismes indigènes. Certaines des solutions ont été transférées avec succès auprès des producteurs.

**Mots-clés** : Bio, fermentation alcoolique, fermentation malolactique, microorganismes indigènes, sélection, pied-de-cuve

### Abstract: Tools to improve the fermentations of biological wines and ciders using indigenous yeasts and bacteria

With the development of organic wines and ciders, there is a real tendency to carry out spontaneous fermentations, which involve the development of indigenous yeasts and bacteria. Indeed, these microorganisms are sometimes considered as components of the terroir that participate in the typicity of wines and ciders. However, no scientific knowledge allows us to assert such a specificity, while the lack

of control of these microorganisms can lead to difficulties of fermentation, aromatic deviations or alterations. The project CASDAR Levains Bio relied on a network of laboratories, technical institutes and associations of organic producers to provide the necessary knowledge and practical solutions for carrying out indigenous fermentations with a good level of control. It has been shown that there is a wide diversity of strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*, that strains are genetically adapted to certain products, but not to regions or production sites. Protocols have been developed to allow for the selection of strains from farms or for the production of "pieds de cuve". Some of the solutions have been successfully transferred to producers.

**Keywords:** Organic, alcoholic fermentation, malolactic fermentation, indigenous microorganisms, selection, pied-de-cuve

## Introduction

Des levures et bactéries lactiques indigènes sont naturellement présentes sur les fruits, dans les vignobles, les vergers et dans les chais de production de tous les vins et cidres. Certaines d'entre-elles se développent spontanément dans les produits jusqu'à devenir très abondantes ; elles réalisent alors la fermentation alcoolique (FA), et parfois la fermentation malolactique (FML), qui sont indispensables dans ces productions. Néanmoins, ces fermentations « indigènes » sont aléatoires, tant au niveau de leur déclenchement, que de leur durée ou de leur impact sur la qualité des produits. En effet, elles dépendent des espèces et souches de levures et de bactéries qui se développent spontanément, or elles ne sont pas toutes capables de mener les fermentations à bon terme, et certaines peuvent avoir des conséquences négatives sur la qualité organoleptique et hygiénique des produits.

En 1888, Hansen et Müller-Thurgau réalisèrent les premiers ensemencements de levains qu'ils avaient eux-mêmes sélectionnés. Les levures issues de vins présentant de bons profils fermentaires étaient récupérées et ajoutées aux moûts frais. A partir des années 60, la sélection s'est faite sur d'autres critères que l'arôme des vins fins, avec notamment l'introduction de leur capacité à produire du SO<sub>2</sub>. En 2015, on compte plus de 200 souches de levures sélectionnées (« Levures Sèches Actives » ou LSA) pour mieux gérer les fermentations. Il s'agit de souches sélectionnées pour leurs bonnes capacités fermentaires, leur bon impact aromatique et leur incapacité à causer des déviations aromatiques. Aujourd'hui, leur utilisation s'est largement répandue en œnologie. Néanmoins, une partie des producteurs de vins et cidres bio préfèrent avoir recours aux microorganismes indigènes, malgré les risques encourus (Enquête ITAB, 2015). Cette pratique est en forte progression et elle intéresse également les producteurs de vins conventionnels. Une raison évoquée est la possible standardisation de la qualité des produits fermentés avec des souches commerciales (Capozzi et Spano, 2011) ; la diversité des microorganismes indigènes pourrait garantir une plus grande complexité et diversité des produits (Capozzi *et al.*, 2015). Pourtant la relation directe entre diversité des microorganismes et complexité des vins n'a, jusqu'à présent, pas reçu de réelle démonstration scientifique et doit être considérée avec prudence. De plus, les producteurs ont tendance à considérer que les microorganismes indigènes sont différents dans chaque exploitation et qu'ils apportent une certaine spécificité à leurs produits. D'un point de vue scientifique, il est probable que des souches de levures et de bactéries soient effectivement mieux adaptées que d'autres pour fermenter certains vins ou cidres régionaux. Elles peuvent avoir été « sélectionnées » inconsciemment en reproduisant les mêmes procédés de production pendant des dizaines ou centaines d'années, au point de devenir « spécifiques » de certains produits (Capozzi *et al.*, 2015). Récemment, il a été suggéré que les microorganismes indigènes sont une composante du terroir des différentes régions vitivinicoles et qu'ils contribuent à la qualité organoleptique spécifique des vins régionaux (Bokulich *et al.*, 2014 ; Gilbert *et al.*, 2014 ; Zorraonandia *et al.*, 2015 ; Bokulich *et al.*, 2016). Il y a donc un intérêt grandissant pour ces

microorganismes indigènes et pour leur utilisation dans des productions régionales (Tristezza *et al.*, 2011 ; Garofalo *et al.*, 2015 ; Petruzzi *et al.*, 2017).

Le projet Casdar LevainsBio avait été mis en place en 2011 pour apporter, d'une part, des connaissances scientifiques sur la diversité des levures et bactéries lactiques indigènes réalisant les FA et FML dans les régions vitivinicoles et cidricoles françaises, et d'autre part, des solutions pratiques permettant aux producteurs d'utiliser ces microorganismes indigènes tout en fiabilisant les fermentations. Il a reposé sur un partenariat entre des associations de producteurs de vins et cidres bio présents dans toutes les régions impliquées (SudVinBio, SVBNA, CAB Pays de la Loire, SEDARB, UNICID), des instituts techniques des secteurs du cidre, du vin et de l'agriculture biologique (ITAB, IFV, IFPC) et des laboratoires de recherche (Microflora, ISVV-Université de Bordeaux). Le projet a été réalisé en se focalisant sur les espèces de levures et bactéries lactiques responsables de la FA et de la FML, respectivement : *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni*. Les objectifs ont été :

1. Analyser la diversité des souches indigènes de *S. cerevisiae* et *O. oeni* pour déterminer s'il existe des souches « spécifiques » de certains produits, régions ou exploitations
2. Développer des protocoles permettant aux producteurs d'utiliser les microorganismes indigènes tout en fiabilisant les fermentations.
  - a. Des protocoles de sélection et de micro-production de souches indigènes pour une utilisation à l'échelle d'une exploitation
  - b. Des protocoles de préparation de « pieds de cuve » de levures ou bactéries indigènes

## 1. Diversité et mise en œuvre des souches indigènes de la levure *S. cerevisiae*

### 1.1 Biodiversité de *S. cerevisiae* au niveau des appellations et exploitations

De nombreux travaux ont été réalisés précédemment pour évaluer la diversité des levures dans les exploitations vitivinicoles et cidricoles. Le récent projet Casdar AP06-6010 (2006-2010) a permis de bien actualiser les connaissances sur les levures du cidre (Bauduin *et al.*, 2012), par conséquent elles n'ont pas été étudiées de nouveau. La biodiversité des espèces de levures œnologiques a été étudiée dans les différentes régions vitivinicoles par des approches classiques, mais surtout, la diversité des souches de *S. cerevisiae* a été analysée plus précisément en Aquitaine dans l'objectif de déterminer s'il existerait des souches « spécifiques » des exploitations ou des appellations.

#### 1.1.1 Les souches de levures œnologiques sont très diverses et peu spécifiques des appellations

Au cours des fermentations indigènes, 75% des levures appartiennent à l'espèce *S. cerevisiae*, 5% à d'autres levures du genre *Saccharomyces* et 20% à des espèces non-*Saccharomyces*. Un nombre variable (1 à 25) de génotypes de *S. cerevisiae* a été détecté dans chacune des 29 cuves analysées, avec une moyenne de 16 en Languedoc, 12 en Val de Loire et 6,5 en Bourgogne. Ces résultats sont en accord avec les études antérieures. Ils confirment qu'il existe une grande diversité de levures lors de la FA - *S. cerevisiae* étant l'espèce majoritaire – et que plusieurs souches de *S. cerevisiae* sont généralement présentes. Néanmoins, il a été nécessaire d'analyser ces souches au niveau génétique pour évaluer leur diversité et leur distribution dans les exploitations et pour éventuellement déterminer si elles sont génétiquement spécifiques des exploitations, des régions ou des appellations.

Les souches de *S. cerevisiae* ont été analysées plus précisément dans le vignoble Aquitain. Leur diversité a été évaluée au niveau de la région, des appellations et des exploitations, au vignoble et au chai et en fonction des modes de conduite du vignoble (conventionnel ou bio). Les isolats de *S. cerevisiae* provenaient de prélèvements de raisins (1374 isolats) et de cuves en fermentation spontanées (330 isolats) des millésimes 2012 et 2013. L'analyse de 17 marqueurs microsatellites pour

chaque isolat a permis de différencier plus de 600 souches (Tableau 1) et d'étudier la structure de la population de *S. cerevisiae* dans cette région (Börlin, 2015).

**Tableau 1** : Souches de *S. cerevisiae* isolées et analysées en région Aquitaine

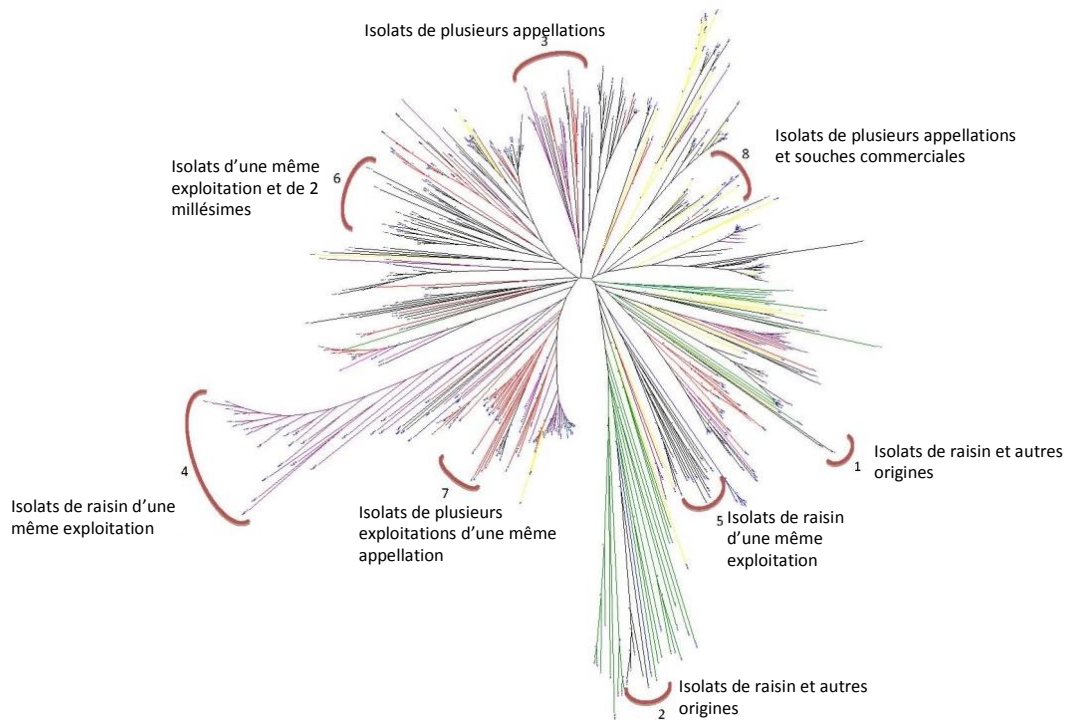
Appellation	Mode de conduite	Nombre d'exploitations	Souches de raisins. 2012	Souches de raisins. 2013	Souches de moût. 2012	Souches de moût. 2013
Bergerac	bio	3	16	18	54	0
Medoc	bio	1	12	0	0	0
	conventionnel	3	13	31	0	0
Pessac-Léognan	bio	3	61	0	17	0
	conventionnel	4	76	81	0	0
Entre-deux-mers	bio	1	2	0	37	26
	conventionnel	1	5	0	0	0
Saint-Emilion	bio	4	4	6	74	23
	conventionnel	6	27	40	0	0
<i>Total</i>		26	216	176	182	49

Les résultats montrent une très grande diversité génétique de l'espèce. Une projection des données suggère qu'il y aurait plus de 6000 souches dans les exploitations en conventionnel sur toute la région et 3600 dans celles en bio, ce qui est nettement supérieur à la population de 1700 souches qui a été estimée récemment pour tout le vignoble Néo-Zélandais (Knight et Goddard, 2015). Les indices de diversité calculés sur la base du nombre de génotypes différents sont également plus élevés en mode conventionnel par rapport au mode biologique (Tableau 2). En général, des souches génétiquement proches sont présentes dans plusieurs exploitations ou plusieurs appellations, ce qui suggère qu'il n'y a pas de souches spécifiques des terroirs (Figure 1). Néanmoins, certaines lignées de souches sont retrouvées dans une seule exploitation ou appellation et parfois pendant les 2 millésimes consécutifs. Par conséquent, elles peuvent persister dans l'environnement du chai.

**Tableau 2** : Indices de diversité en fonction du mode de conduite

	Bio	Conventionnel
<b>Nombre d'individus</b>	340	662
<b>H' (Indice de Shannon)</b>	4,09	4,86
<b>J' (Indice d'équitabilité)</b>	0,68	0,80
<b>1/D (Indice de Simpson)</b>	32,47	66,83
<b>1-D (Complément de l'indice de Simpson)</b>	0,97	0,99

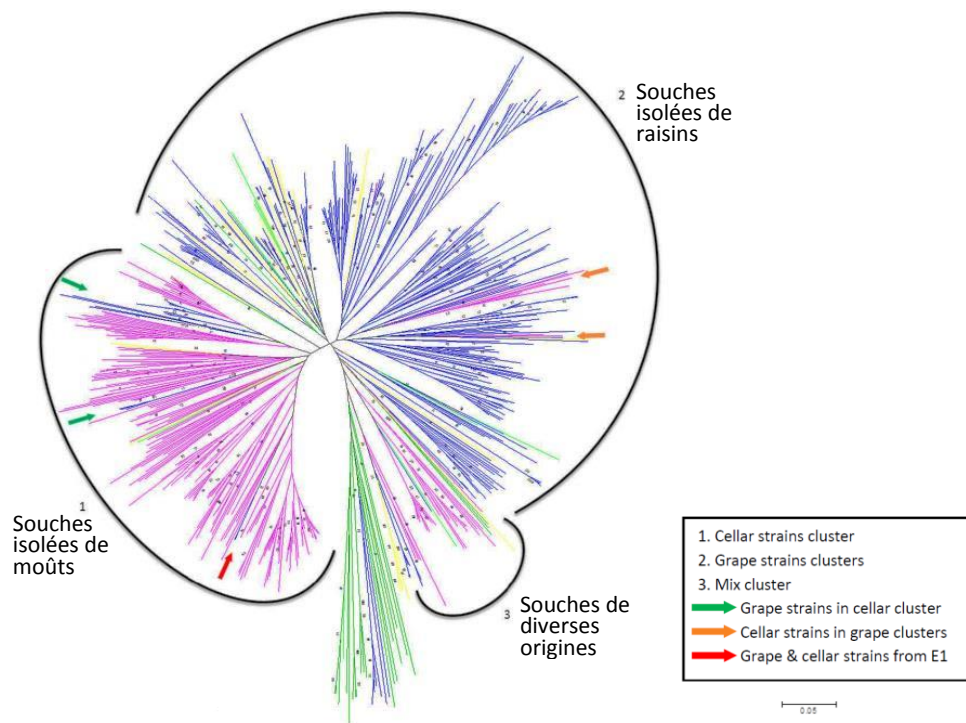
Les indices de Shannon (H') et de Simpson (1/D) ont été calculés à partir d'un échantillon de 1374 souches de *S. cerevisiae*



**Figure 1** : Diversité des souches de *S. cerevisiae* isolées de raisins en Aquitaine. Arbre de proximité génétique construit à partir des données de typage par microsatellites des souches isolées de raisin dans les exploitations et appellations du Bordelais en 2012 et 2013 (méthode Neighbor-joining).

### 1.1.2 Divergence et échanges génétiques entre les souches de *S. cerevisiae* au vignoble et au chai

En analysant l'ensemble des souches collectées, nous avons observé que les isolats issus d'une même exploitation sont séparés dans deux groupes, selon qu'elles proviennent du vignoble ou du chai de l'exploitation (Figure 2). Néanmoins, dans certains cas, des souches appartenant au même groupe génétique sont présentes dans les deux compartiments. Il a été possible de mesurer d'importants flux de gènes entre ces deux compartiments. En particulier, 25% des souches du vignoble sont apparentées à des souches commerciales (plus de 75% de marqueurs génétiques en commun) ce qui serait lié à leur utilisation depuis plus de 40 ans dans cette région. Ces isolats ont été collectés sur une distance maximale de 400 mètres d'un chai de vinification montrant ainsi une dissémination des souches du chai dans l'environnement sur une distance limitée, en accord avec les précédents travaux (Valero et al., 2007). Cette étude montre la possibilité d'un retour jusqu'alors sous-estimé des souches du chai vers le vignoble. En conclusion, il ne semble pas exister de souches qui soient génétiquement adaptées aux exploitations, appellations ou régions. Certaines souches sont bien différentes d'un site à un autre, mais il est peu probable qu'elles soient génétiquement adaptées à ces sites (Börlin, 2015). Elles peuvent persister pendant deux à trois millésimes consécutifs dans une même exploitation, néanmoins la différenciation génétique des populations de levures est plus importante sur une période d'observation plus longue (plus de 20 ans). Ces résultats suggèrent que le facteur temps explique en partie la différenciation des populations de levure au sein d'un même cru (Börlin, 2015). Par conséquent, l'utilisation des souches indigènes de *S. cerevisiae* peut être justifiée par la diversité des souches au vignoble et dans le chai et par la persistance de certaines souches dans les sites sur période limitée.



**Figure 2** : Diversité des souches de *S. cerevisiae* isolées dans les vignobles et dans les chais en Aquitaine. Arbre de proximité génétique construit à partir des données de typage par microsatellites des souches isolées de raisin (bleu) et de moût (rose) dans les exploitations et appellations du Bordelais en 2012 et 2013 et des souches commerciales (jaune) et d'autres origines (vert) (méthode Bruvo's distance).

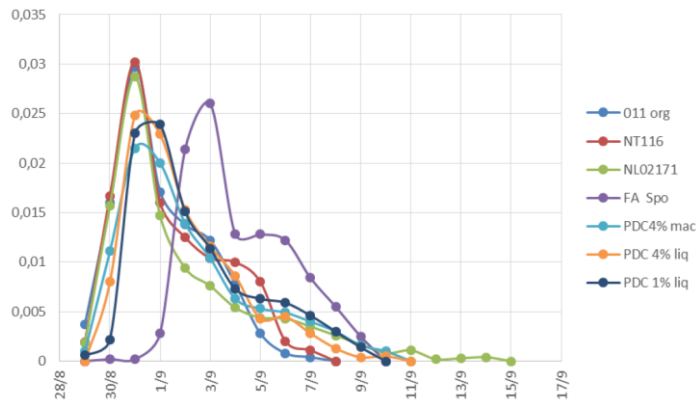
## 1.2 Mise en œuvre des souches indigènes de *S. cerevisiae*

### 1.2.1 Utilisation de souches sélectionnées

Des protocoles ont été mis en place et diffusés auprès des professionnels pour permettre à ceux qui le souhaitent de réaliser la FA à l'aide de souches de *S. cerevisiae* sélectionnées dans leurs exploitations (Becquet, 2015c). La sélection se fait sur une durée d'au moins 2 ans, incluant une première année d'isolement et de sélection des souches en laboratoire et une deuxième année de tests en conditions réelles d'utilisation. Le protocole de sélection est simple et accessible aux laboratoires équipés pour réaliser des analyses microbiologiques des vins. Il inclut des tests génétiques qui sont nécessaires pour génotyper la (ou les) souche choisie et s'assurer qu'il ne s'agit pas d'une souche commerciale, et des tests phénotypiques et sensoriels pour tester ses capacités fermentaires, son caractère « killer » et sa production de composés indésirables. La production des souches sélectionnées ne peut pas se faire sous la forme traditionnelle de « Levure Sèche Active » (car c'est un processus complexe qui n'est pas dimensionné pour des petites productions), mais sous la forme de « crème », qui est une alternative nettement plus économique et réalisable par tous les laboratoires. L'inconvénient majeur de cette approche est qu'il serait trop coûteux de produire la levure sélectionnée en quantité suffisante pour inoculer l'ensemble de la cuverie d'une exploitation. Par conséquent, pour utiliser une souche sélectionnée sur un site de production, elle est produite en quantité minimale pour inoculer quelques hectolitres de moût qui serviront de « pied de cuve », permettant ainsi de multiplier la levure et d'inoculer le reste de la cuverie. Au cours du projet, plusieurs souches ont été sélectionnées et utilisées avec succès dans les exploitations. Dans la plupart des cas, les souches ont réalisé la FA au moins aussi rapidement que des souches commerciales et plus vite que des FA indigènes (Figure 3). Les



utilisateurs ont été satisfaits par l'utilisation de ces souches et les produits obtenus ont été bien appréciés. Cette approche peut donc être mise en œuvre par les professionnels qui désirent utiliser des souches sélectionnées issues de leurs exploitations. Néanmoins, elle présente deux inconvénients : les coûts non négligeables de la sélection et de la production annuelle de la levure par un laboratoire et le travail nécessaire chaque année pour multiplier la souche sélectionnée en réalisant un pied de cuve.



**Figure 3.** Exemple de cinétique de FA réalisée par des levures sélectionnées dans une exploitation. La figure montre les cinétiques de FA d'un même moût inoculée avec des souches sélectionnées selon le protocole mis en place lors du projet (011 org, NT116, NL02171), une FA indigène (FA Spo) et l'utilisation de pieds de cuve (PDC 4% mac 4% liq et 1% liq). Les courbes représentent les vitesses de dégagement de CO<sub>2</sub>.

### **1.2.2 Protocoles de préparation et utilisation de pieds de cuve**

La réalisation de pieds de cuve de FA est une solution alternative pour mettre en œuvre des levures indigènes issues du vignoble et fiabiliser la FA. Les protocoles empiriques utilisés dans certaines exploitations ont été optimisés en testant plusieurs facteurs, comme l'incidence du profil de la vendange utilisée (cépage, maturité), l'état du pied de cuve (phase solide ou liquide), l'incidence du sulfitage, de la température, de la nutrition azotée ou de l'aération. Les résultats montrent un effet sensible du sulfitage sur la préservation des populations de *S. cerevisiae*, la diversité des souches pouvant rester importante. La température de fermentation doit être maintenue au minimum à 22-24°C et il faut éviter un choc thermique lors de l'incorporation dans la cuve. L'aération ne semble pas avoir d'effet. L'incorporation de la préparation dans la cuve à fermenter doit se faire lorsque le pied de cuve a atteint 50 à 75% de la FA (1,050-1,020 de densité) en respectant un écart de température de 5°C maximum entre les moûts du pied de cuve et de la cuve finale. Dans tous les essais réalisés, l'utilisation de ces pieds de cuve a permis de réaliser des FA plus rapidement qu'en conditions spontanées et sans production anormale d'acidité volatile (Figure 3). Les essais de terrain réalisés ont également été très satisfaisants pour les préparations réalisées en vins rouges. Les modalités « pieds de cuve » ont toujours réalisé la FA au moins aussi efficacement que les souches commerciales et les vins obtenus ont été bien notés lors de leur dégustation et parfois préférés aux modalités avec utilisation de levure commerciale. Néanmoins, des résultats plus mitigés ont été obtenus pour les préparations en vins blancs, avec parfois des arrêts de FA. Des travaux complémentaires devront être réalisés pour ce type de produit. Les résultats ont été diffusés auprès des professionnels sous la forme de fiches protocoles (Pladeau et Cottreau, 2014 ; Becquet, 2015b) et d'un article technique (Vinsonneau *et al.*, 2016). Il est à noter qu'une enquête du SVBA auprès des pratiques des vignerons bio montre que de 2012 à 2015 l'utilisation des pieds de cuve en vinification en rouge est passée de 7 à 31% des cuvées, ce qui pourrait être attribué à la diffusion des résultats du projet (S. Becquet, conférence Vinitech 2016).



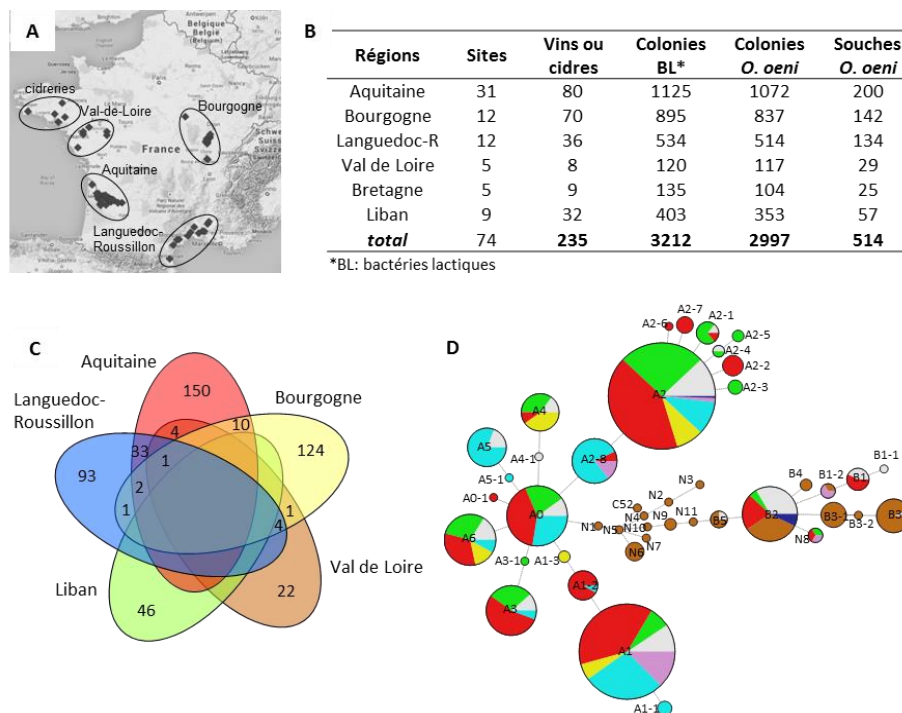
## 2. Diversité et mise en œuvre des souches indigènes de la bactérie *O. oeni*

### 2.1 Biodiversité de l'espèce *O. oeni* dans les vins et les cidres

De nombreuses études ont été réalisées précédemment pour isoler des souches d'*O. oeni* d'une ou plusieurs régions et étudier leur distribution. Mais dans la plupart des cas, peu de souches ont été isolées et leur proximité génétique a très rarement été analysée, ce qui est pourtant indispensable pour déterminer s'il existe des souches « génétiquement » spécifiques de différentes régions, exploitations ou types des vins ou cidres. Nous avons donc réalisé un nouvel inventaire, en isolant plusieurs milliers de clones bactériens de vins et de cidres et en utilisant des méthodes d'analyse phylogénétique pour répondre à ces questions.

#### 2.1.1 Les souches d'*O. oeni* ne sont pas spécifiques des régions ou des exploitations

La biodiversité des souches d'*O. oeni* a été étudiée dans les vins et les cidres en cours de FML dans différentes régions françaises, ainsi qu'au Liban, afin de comparer une région très éloignée. Plus de 200 vins et cidres ont été collectés dans 74 exploitations de Bourgogne, Val-de-Loire, Aquitaine et Languedoc-Roussillon, ainsi que dans des cidreries Bretonnes, ce qui a permis d'isoler près de 3000 colonies d'*O. oeni* et de différencier 514 souches de cette espèce (Figure 4A et 4B).



**Figure 4 :** Diversité des souches d'*O. oeni* dans les régions vitivinicoles et cidricoles. **A.** Localisation des exploitations où ont été prélevés les vins et cidres analysés. **B.** Nombres de régions, produits, bactéries lactiques, isolats d'*O. oeni* et souches d'*O. oeni* analysés dans chaque région. **C.** Diagramme de Venn représentant la distribution des souches d'*O. oeni* dans les différentes régions. **D.** Minimum spanning tree dans lequel chaque cercle correspond à un groupe de souches d'*O. oeni* génétiquement proches. Plus le cercle est important, plus il contient un nombre de souches important. Les couleurs correspondent aux souches de chaque région : rouge/Aquitaine, bleu/Bourgogne, vert/Languedoc-Roussillon, rose/Val-de-Loire, brun/cidre (Bretagne), jaune/Liban.

Leur analyse montre qu'il y a une importante diversité de souches dans chaque région. De plus, les souches isolées dans une région sont rarement détectées dans une autre région. Par exemple, sur les 200 souches isolées en Aquitaine, 150 n'ont été détectées qu'en Aquitaine, mais 33 étaient également présentes en Languedoc-Roussillon et 13 en Bourgogne (Figure 4C). La même situation a été observée

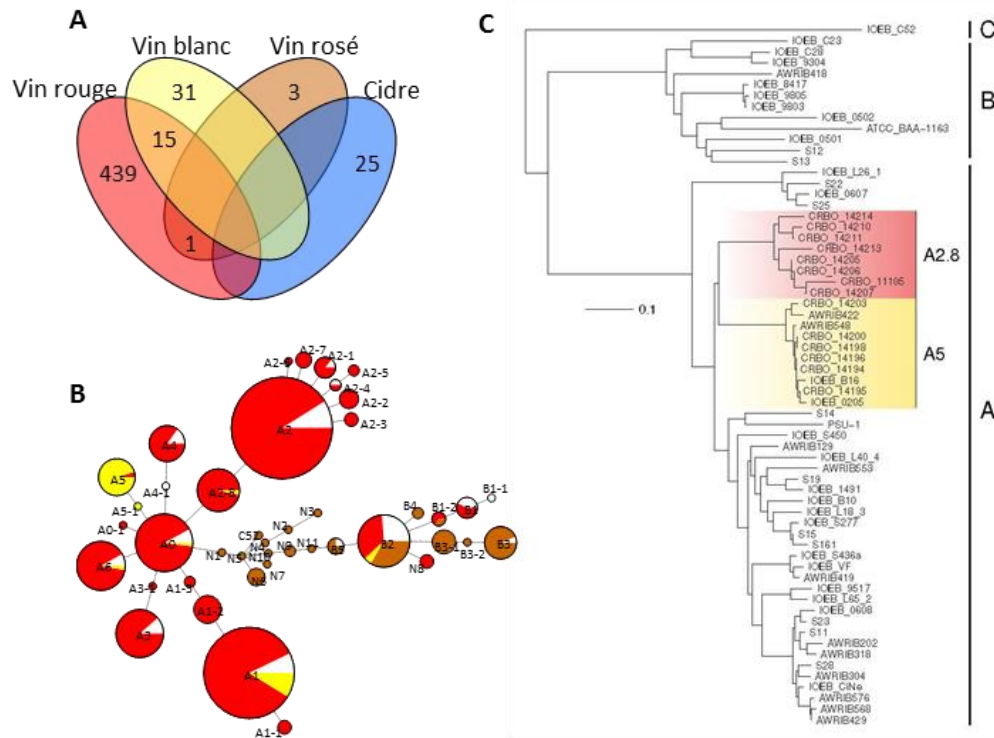
au niveau des exploitations : elles contiennent une grande diversité de souches, mais certaines souches peuvent être retrouvées dans d'autres exploitations proches ou très distantes. Une analyse génétique des souches a été réalisée afin de les grouper selon leur proximité phylogénétique. Celle-ci a confirmé que les souches ne sont pas spécifiques des régions. En effet, chaque groupe génétique contient des souches provenant de plusieurs régions, y compris du Liban (Figure 4D). Ces résultats montrent donc qu'il existe une très grande diversité de souches d'*O. oeni*, mais qu'elles ne sont pas génétiquement adaptées à des régions ou à des exploitations. Il est probable que les nouvelles souches apparaissent dans une exploitation ou une région et y persistent plus ou moins longtemps, mais elles peuvent aussi se disséminer sur de longues distances et se retrouver dans les vins produits dans d'autres régions (El Khoury, 2014 ; El Khoury *et al.*, 2017).

### **2.1.2 Certaines souches d'*O. oeni* sont adaptées à certains types de produits**

Pour déterminer si les souches d'*O. oeni* sont adaptées à certains produits, nous avons tout d'abord analysé la distribution des 514 souches décrites ci-dessus. Elles avaient été isolées de vins rouges, vins blancs, vins rosés et cidres. Certaines souches ont été détectées dans des vins très différents. Par exemple 1/3 de celles issues de vin blanc ont également été isolées dans des vins rouges (Figure 5A). Cependant, d'autres souches semblent plus spécifiques de l'un ou de l'autre type de vins. Mais surtout, il y a une distinction très nette entre les souches de vin et celles de cidre (Figure 5A). L'analyse des groupes génétiques de souches confirme ces résultats (Figure 5B). En effet, la plupart des groupes génétiques contiennent des souches provenant soit du vin, soit cidre, mais presque jamais des deux.

Au cours du projet les génomes de plus d'une centaine de souches ont été produits afin d'analyser plus précisément leur distribution phylogénétique. A partir des séquences de ces génomes, des analyses phylogénomiques ont confirmé que les souches d'*O. oeni* se répartissent dans 3 grands groupes génétiques nommés A, B et C (Figure 5C) (Campbell-Sills *et al.*, 2015). Le groupe A contient exclusivement des souches de vin. Les groupes B et C contiennent des souches de vin et de cidre. Néanmoins, dans ces 2 derniers groupes, les souches de vin et de cidre forment bien des lignées distinctes (Campbell-Sills, 2015). Les souches du groupe A sont aujourd'hui les plus abondantes dans les vins et probablement les mieux adaptées. Il est d'ailleurs remarquable que la quasi-totalité des levains commerciaux appartiennent à ce groupe (Campbell-Sills, 2015). Nous avons également identifié deux lignées de souches qui proviennent majoritairement soit des vins blancs de Bourgogne, soit des vins rouges de cette région (Figure 5C) (Campbell-Sills *et al.*, 2017). La lignée « vin blanc » contient aussi les souches des vins de Champagne. Les souches de ces deux lignées ont donc des caractéristiques génomiques spécifiques, mais elles ont aussi des propriétés phénotypiques spécifiques, qui leur permettent de mieux se développer, soit dans les vins blancs, soit dans les rouges (El Khoury, 2014). De plus, lorsqu'elles sont utilisées pour réaliser la FML, la fraction volatile des vins obtenus est différente selon la lignée à laquelle appartient la souche utilisée (Campbell-Sills *et al.*, 2017). Il s'agit donc de souches adaptées à certains types de vins.

Ces travaux ont permis de bien progresser dans la connaissance de la biodiversité de l'espèce *O. oeni*. Ils ont montré qu'il n'existe pas de souches qui soient génétiquement adaptées à une exploitation ou une région. Cependant, il existe bien des souches adaptées à certains produits. De plus, la diversité des souches est très importante, si bien que la plupart d'entre-elles ne sont détectées que dans une seule région et souvent dans une seule exploitation. Par conséquent, l'utilisation de ces souches peut avoir une signification pour les producteurs qui le souhaitent.



**Figure 5** : Distribution phylogénétique des souches d'*O. oeni* dans les vins et les cidres. **A.** Diagramme de Venn représentant la distribution des souches d'*O. oeni* dans les différents types de vins et dans le cidre. **B.** Minimum spanning tree représentant les groupes de souches d'*O. oeni* génétiquement proches. Les groupes ont été colorisés en fonction du type de produit dont sont issues les souches : rouge : vin rouge, jaune : vin blanc, brun : cidre. **C.** Distribution phylogénomique des souches d'*O. oeni* d'après l'analyse des séquences de leurs génomes. L'arbre a été construit par la méthode Neighbour Joining d'après les distances calculées avec l'algorithme ANIm. Les cadres rouges et jaunes indiquent 2 groupes de souches isolées de vins rouges et blancs, respectivement.

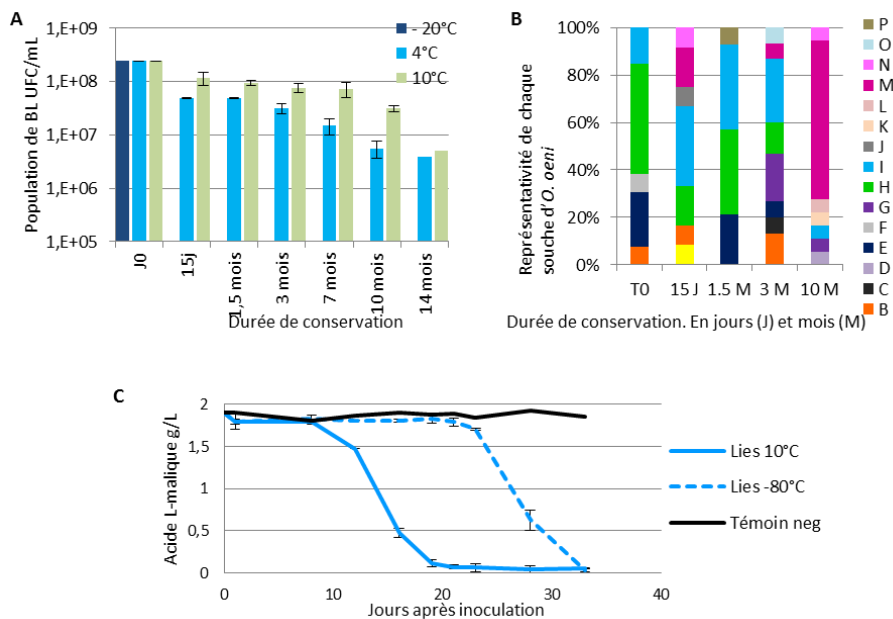
## 2.2 Mise en œuvre des souches indigènes d'*O. oeni*

### 2.2.1 Utilisation de souches sélectionnées

Bien que l'intérêt de sélectionner des souches d'*O. oeni* dans les exploitations soit limité, comme expliqué précédemment, il est possible que certaines souches ne soient présentes que dans une seule exploitation, ce qui peut justifier leur sélection. Par ailleurs, nous avons pu constater que certaines souches persistent dans les chais pendant plusieurs années, ce qui est en accord avec des résultats précédents (Reguant et Bordons, 2003). Nous avons donc mis en place un protocole de sélection, conservation et mise en œuvre de souches d'*O. oeni* à l'échelle des exploitations. Il nécessite l'identification des souches majoritaires, l'exclusion de celles qui pourraient produire des altérations (ex. amines biogènes) et l'évaluation des capacités fermentaires des souches dans des essais en laboratoire. Cependant, des essais terrain sont également indispensables car nous avons observé que des souches ayant de bonnes capacités fermentaires dans des essais réalisés au laboratoire, ne sont pas toujours satisfaisantes en conditions réelles d'utilisation. De plus, la production de ces souches sélectionnées pour inoculer la totalité de la cuverie d'une exploitation représente un coût important. Pour réduire ce coût de production, une alternative consistant à multiplier la bactérie sur le site de production a été testée. Elle nécessite une petite quantité initiale de bactéries produites en laboratoire, qui est inoculée pour réaliser la FML dans quelques hectolitres de vins et se propager simultanément. Cette préparation est ensuite utilisée pour inoculer le reste de la cuverie de l'exploitation. Néanmoins, ce procédé est contraignant à mettre en œuvre et il doit être réalisé avec des souches dont les performances fermentaires ont été validées.

## 2.2.2 Conservation et utilisation de lies ou des terres de filtrations pour réaliser la FML

Lorsque la FML ne démarre pas spontanément dans une cuve, il est courant d'incorporer les lies fines issues d'une autre cuve ayant achevé sa FML. Ces lies sont riches en bactéries ayant une bonne activité malolactique, ce qui permet de lancer rapidement la fermentation. Néanmoins, cette pratique nécessite d'avoir à disposition au moins une cuve dans laquelle la FML s'est bien déroulée. Dans le cadre du projet Casdar Levains Bio, nous avons testé la possibilité de conserver des lies d'un millésime à l'autre et de les utiliser pour lancer la FML dès la première cuve. Nous avons testé différentes températures de conservation (-80°C, -20°C, +4°C, +10°C) et observé que des températures de +4 à +10°C assurent une bonne survie bactérienne pendant plus de 10 mois, ce qui permet d'envisager une conservation des lies dans un réfrigérateur ménager (Figure 6A). Nous avons analysé les populations des souches d'*O. oeni* pendant toute la période de conservation, ce qui a montré que les souches majoritaires en début de conservation ne sont pas toujours celles qui sont retrouvées après 10 mois (Figure 6B). Enfin, lorsque ces lies sont inoculées (à 1% v/v) dans un vin pour réaliser la FML, elles permettent d'achever la FML dans un délai très court (Figure 6B). Tous les essais réalisés en laboratoire ont été concluants. Nous avons observé que ces lies apportent non seulement des bactéries ayant une bonne activité malolactique, mais aussi des nutriments ou d'autres facteurs qui améliorent la dégradation de l'acide malique (El Khoury, 2014). Un protocole de conservation des lies pour une utilisation en pied de cuve a été proposé par le SVBA (Becquet, 2015a). Des lies post-FML non sulfitées peuvent être conservées en bidon de 5 à 10 litres dans un réfrigérateur à 4-6°C et réutilisées au millésime suivant. En les inoculant à 1%, il est possible de démarrer un pied de cuve de 10 hl avec un bidon de 10 litres, pied de cuve qui pourra être utilisé par la suite pour inoculer d'autres cuves. Ce protocole est assez simple à mettre en œuvre et surtout peu coûteux pour le vigneron qui conserve lui-même ses lies. Néanmoins, il est nécessaire de réaliser un contrôle microbiologique des lies avant leur utilisation pour s'assurer qu'elles ne contiennent pas de levures *Brettanomyces bruxellensis*.



**Figure 6** : Conservation et utilisation de lies de FML. **A**. Suivi des populations de bactéries lactiques de lies de FML conservées à différentes températures. **B**. Suivi des populations des souches d'*O. oeni* lors de la conservation de lies à +10°C. Les bactéries lactiques ont été isolées sur boîte de Petri et 15 colonies par échantillons ont été typées par la méthode MLVA-VNTR. **C**. Suivi de la dégradation de l'acide malique après inoculation de lies (1% v/v, conservées à -10°C ou -80°C) dans un vin ayant achevé la FA.

Une alternative aux lies de FML est l'utilisation des terres de filtrations riches en bactéries. Un essai réalisé en Languedoc-Roussillon a montré la possibilité d'utilisation des terres de filtration ou des rétentats de microfiltration tangentielle (MFT) pour ensemençer un vin en bactéries lactiques indigènes.

La microfiltration a été réalisée avec un appareil pilote ayant un volume mort important par rapport au volume de vin traité, il est donc raisonnable de penser qu'une concentration plus importante en bactéries aurait été obtenue dans des conditions de traitement classique. L'examen des souches a montré que les bactéries qui ont réalisé les FML sont celles qui étaient présentes dans le produit utilisé pour l'ensemencement.

## En conclusion

Le projet a tout d'abord permis d'apporter des connaissances scientifiques nouvelles sur la diversité des souches de la levure *S. cerevisiae* et de la bactérie lactique *O. oeni*. Il a montré que les souches de ces deux espèces ne sont pas génétiquement adaptées à des régions ou des exploitations, ce qui va à l'encontre de la notion de souches « de terroir ». Il a aussi montré qu'il existe une très grande diversité de souches et que les mêmes souches peuvent persister pendant plusieurs années dans un même chai. Ces informations étaient nécessaires pour rationaliser l'utilisation des souches indigènes. Le projet a également permis de progresser dans les méthodes de mise en œuvre des souches indigènes. Des protocoles de sélection, production et utilisation de souches issues des exploitations ont été proposés, ainsi que des protocoles de préparation de pied de cuve de levures indigènes ou de conservation des lies riches en bactéries lactiques. La réalisation de pieds de cuve de levures s'est avérée être une solution particulièrement appréciée par les professionnels. Son utilisation est maintenant en progression, notamment en vinification en rouge, pour laquelle de bons résultats sont obtenus. Les autres protocoles n'ont pas pu être totalement éprouvés pendant la durée du projet, notamment l'utilisation des lies de bactéries lactiques, mais ce sont des approches qui ont été testées avec succès.

## Références bibliographiques

- Bauduin S., Gilles Y., Guichard H., Poupard P., 2012. Les arômes des cidres. Le Cahier Technique de l'IFPC n°31, p15-17
- Becquet S., 2015a. Protocole de conservation de lies pour une utilisation comme pied de cuve fml. In Syndicat des Vignerons Bio de Nouvelle Aquitaine <http://www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr/>
- Becquet S., 2015b. Réalisation d'un pied de cuve. In Syndicat des Vignerons Bio de Nouvelle Aquitaine <http://www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr/>
- Becquet S., 2015c. Sélection de levures indigènes: Processus et étapes clés. In Syndicat des Vignerons Bio de Nouvelle Aquitaine <http://www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr/>,
- Bokulich N.A., Collins T.S., Masarweh C., Allen G., Heymann H., Ebeler S.E., Mills D.A., 2016. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio* 7
- Bokulich N.A., Thorngate J.H., Richardson P.M., Mills D.A., 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E139-48
- Börlin M., 2015. Diversité et structure de population des levures *Saccharomyces cerevisiae* à l'échelle du vignoble bordelais : Impact de différents facteurs sur la diversité In p 188. Université de Bordeaux, Bordeaux, France
- Campbell-Sills H., 2015. Phylogenomic structure of *Oenococcus oeni* and its adaptation to different products unveiled by comparative genomics and metabolomics. In Thèse de doctorat, p 171. Université de Bordeaux, Bordeaux, France
- Campbell-Sills H., El Khoury M., Favier M., Romano A., Biasioli F., Spano G., Sherman D.J., Bouchez O., Coton E., Coton M., Okada S., Tanaka N., Dols-Lafargue M., Lucas P.M., 2015. Phylogenomic analysis of *Oenococcus oeni* reveals specific domestication of strains to cider and wines. *Genome biology and evolution* 7: 1506-18
- Campbell-Sills H., El Khoury M., Gammacurta M., Miot Sertier C., Dutilh L., Vestner J., Capozzi V., Sherman D., Hubert C., Claisse O., Spano G., De Revel G., Lucas P., 2017. Two different

*Oenococcus oeni* lineages are associated to either red or white wines in burgundy: Genomics and metabolomics insights. *OENO One* 51: 309-322

Capozzi V., Garofalo C., Chiriatti M.A., Grieco F., Spano G., 2015. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol Res* 181: 75-83

Capozzi V., Spano G., 2011. Food microbial biodiversity and "microbes of protected origin". *Front Microbiol* 2: 237

El Khoury M., 2014. Etude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitiviniholes. In p 149. Université de Bordeaux, Bordeaux, France

El Khoury M., Campbell-Sills H., Salin F., Guichoux E., Claisse O., Lucas P.M., 2017. Biogeography of *Oenococcus oeni* reveals distinctive but nonspecific populations in wine-producing regions. *Appl Environ Microbiol* 83 : e02322-16

Garofalo C., El Khoury M., Lucas P., Bely M., Russo P., Spano G., Capozzi V., 2015. Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *J Appl Microbiol* 118: 1395-408

Gilbert J.A., van der Lelie D., Zorraonandia I., 2014. Microbial terroir for wine grapes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 5-6

ITAB, 2015. Enquête nationale sur les pratiques et les besoins œnologiques en 2015. Site web : <http://www.vigneronsbionouvelleaquitaine.fr/wp-content/uploads/2017/04/Enquete-Oeno-ITAB-2016.pdf>

Knight S., Goddard M.R., 2015. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. *ISME J* 9: 361-70

Petruzzi L., Capozzi V., Berbegal C., Corbo M.R., Bevilacqua A., Spano G., Sinigaglia M., 2017. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Front Microbiol* 8: 995

Pladeau V., Cottureau P., 2014. Protocole de mise en œuvre de pieds de cuve (PDC) Indigènes. In *SudVinBio*, <https://www.sudvinbio-conseil.com>.

Reguant C., Bordons A., 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *J Appl Microbiol* 95: 344-53

Tristezza M., Vetrano C., Bleve G., Grieco F., Tufariello M., Quarta A., Mita G., Spano G., 2011. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39: 81-92.

Valero E., Schuller D., Cambon B., Casal M., Dequin S., 2005. Dissemination and Survival of Commercial Wine Yeast in the Vineyard: A Large-Scale, Three-Years Study. *FEMS Yeast Research* 5 (10): 959–69.

Vinsonneau E., Colosio M.-C., Coarer M., Cottureau M., Bely M., Masneuf I., Miot Sertier C., Maupeu J., Vallet-Courbin A., Becquet S., Pladeau V., 2016. Fermentation indigène et pied de cuve: Résultats du projet casdar "levains bio". *Revue des œnologues*, pp 25-27.

Zorraonandia I., Owens S.M., Weisenhorn P., West K., Hampton-Marcell J., Lax S., Bokulich N.A., Mills D.A., Martin G., Taghavi S., van der Lelie D., Gilbert J.A., 2015. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* 6

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)