

Dissémination des levures œnologiques dans le vignoble

Eva Valero⁽¹⁾, Dorit Schuller⁽²⁾, Brigitte Cambon⁽¹⁾, Margarida Casal⁽²⁾ et Sylvie Dequin⁽¹⁾

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

⁽²⁾ Centro de Ciências do Ambiente, Departamento de Biologia, Universidade do Minho, 4710-057 Braga, Portugal

Introduction

Depuis une quinzaine d'années des efforts considérables ont été réalisés dans le domaine de l'amélioration des levures œnologiques par ingénierie génétique. L'utilisation future de ces souches est prévisible et doit s'accompagner d'une évaluation des risques potentiellement associés à l'introduction de ces nouvelles technologies dans la filière œnologie. Dans ce contexte, une question essentielle concerne l'impact de l'utilisation de ces souches sur l'environnement.

Les levures sèches actives (LSA) sont classiquement utilisées en cave en milieu ouvert, et peuvent être disséminées dans le vignoble en même temps que différents effluents et sous-produits. D'un point de vue écologique, ces souches, essentiellement des *S. cerevisiae*, pourraient être annuellement réintroduites dans l'écosystème. Leur devenir dans l'environnement est pratiquement inconnu ainsi que leur impact sur la microflore. Un faible nombre de données sont disponibles pour évaluer l'importance de la dissémination des levures dans le vignoble, ainsi que leur rémanence d'une année sur l'autre (Frezier et Doubordieu, 1992; Vezinhet *et al.*, 1992; Guillamón *et al.*, 1996). Récemment, une étude visant à évaluer la diversité des levures dans le vignoble Sud-Africain a été conduite pendant quatre ans. Sur treize lieux de prélèvement correspondant à différentes régions viticoles, des levures commerciales ont pu être retrouvées dans trois échantillons (van der Westhuizen *et al.*, 2000a et 2000b). Ces travaux ont fait apparaître la nécessité de réaliser ce type d'étude à plus large échelle, de manière à augmenter statistiquement la signification des données obtenues.

Afin d'évaluer les risques potentiels associés à l'utilisation de souches de levures œnologiques génétiquement modifiées, un large plan d'échantillonnage a été défini afin de déterminer l'importance de la dissémination et la capacité de survie dans le vignoble de levures commerciales utilisées comme modèles.

Méthodologie

Le plan d'échantillonnage inclut 36 lieux de prélèvements répartis sur 6 vignobles (3 en France, 3 au Portugal), sur une durée de 3 années (2001-2003). Cette étude a été réalisée conjointement par l'INRA de Montpellier (UMR SPO) en collaboration avec l'ICV Montpellier, et par l'Université do Minho à Braga, Portugal.

Trois sites viticoles de la région Languedoc et trois sites de la région du Minho au Portugal, utilisant différentes souches de levure commerciales dont une même LSA depuis plus de cinq années, ont été choisis. Les baies de raisin ont été collectées sur 6 lieux de prélèvement, correspondant à trois différentes distances de la cave (dans une fourchette de 20

à 1000 m) et à deux orientations opposées en fonction du vent dominant. Ces prélèvements ont été effectués sur une durée de trois années, avant et après les vendanges, afin d'évaluer d'une part la rémanence des souches et d'autre part la dissémination immédiate. Des fermentations à échelle laboratoire (0.25 l) ont été réalisées à partir du jus extrait des baies récoltées. Les levures ont été isolées à partir des moûts présentant une fermentation significative – fixée à 70 g/l de CO₂ dégagé, correspondant environ aux deux tiers des sucres dégradés. Pour chaque fermentation, 30 colonies choisies au hasard ont été identifiées. Après élimination des non-*Saccharomyces*, les souches restantes ont été analysées par électrophorèse en champ pulsé et techniques moléculaires, ADN mitochondrial ou basées sur l'utilisation de la PCR (séquences delta, microsatellites).

Résultats

Au total, 126 moûts sur 198 (64%) ont donné lieu à une fermentation spontanée. Ces chiffres recouvrent des situations similaires en France et au Portugal, avec un taux de fermentation spontanée très proche pour les 2 pays.

Des différences importantes sont par contre observées au niveau de la proportion de *Saccharomyces* isolées après fermentation (70g/l CO₂ dégagés). Au Portugal, toutes les colonies isolées après fermentation sont des *Saccharomyces*, alors qu'en France, une très forte proportion de non-*Saccharomyces* est trouvée. Ces non-*Saccharomyces* représentent 66 % des colonies isolées sur l'ensemble des 3 années. Notons que l'année 2002 a été atypique, avec très peu de *Saccharomyces* isolées. Cette année se distingue par une forte pluviosité avant et pendant les vendanges.

La Table 1 montre la distribution des levures commerciales dans chaque vignoble.

Table 1. LSA retrouvées dans chaque vignoble au cours de trois années. Au total 296 souches sur 2355 *Saccharomyces* ont un profil identique à celui d'une souche commerciale.

Vineyards	A	B	C	D	E	F	Total
Isolates	570	720	870	480	690	450	3780
Commercial yeasts strains	0	15*	1	206	54+18*	2	296
% Commercial yeast/Initial flora	0	2	0.1	43	10	0.5	7.8

Levures commerciales isolées dans la même région. Vignobles français: A, B et C. Vignobles portugais: D, E et F.

Selon le vignoble de situations très différentes sont observées, dans 4 vignobles sur 6 (vignoble F au Portugal et les trois vignobles français, A, B, C) où les baies sont prélevées à plus de 100 m de la cave, seulement 0 à 2% de la microflore isolée après la fermentation présente un profil génétique identique à celui d'une souche commerciale. En France, le profil génétique de 16 souches parmi les 735 *S. cerevisiae* isolées (2%) s'est révélé identique à celui d'une levure commerciale. Ces souches correspondent à 0.8% de la microflore capable de fermenter. Elles ont pour une large majorité (15 souches) été retrouvées sur un même site (B), lors de prélèvements réalisés en 2001 avant vendange à mi-distance ou à distance la plus éloignée de la cave. Le profil de ces souches est identique à celui de la souche ICV D254, qui est une souche initialement isolée dans la région. Ces données pourraient indiquer une dissémination antérieure, mais il n'est pas possible de conclure sur ce point. Une colonie,

isolée en 2003 sur le vignoble C, a un profil identique à la souche K1M-ICV INRA, utilisée dans les 3 vignobles français depuis 5 à 10 ans. On peut à ce propos noter que cette levure, pourtant utilisée massivement depuis longtemps, n'a jamais, à cette exception près, été retrouvée dans le vignoble. Dans le vignoble portugais F, seulement 2 isolées sont retrouvées avec un profil génétique identique à celui de la souche Zymaflore VL1, utilisée pendant plus de 5 ans. Dans les 2 autres vignobles portugais (D et E) où l'échantillonnage a été réalisé à proximité immédiate des caves, 278 sur un total de 296 levures type souche commerciale ont été retrouvées, ce qui augmente la proportion jusqu'à 10-43% de la flore fermentaire. Il faut noter, de plus, dans ces 2 sites la présence des effluents liquides, qui constitue un vecteur de dissémination important, à proximité des lieux de prélèvement.

Sur l'ensemble de l'étude, 94% des souches de profil souche commerciale sont retrouvées à moins de 200 m des caves (Figure 1) et une large majorité (78%) sont retrouvées à proximité immédiate (moins de 50 m). Ces levures ont principalement été isolées dans les vignobles portugais de D et E.

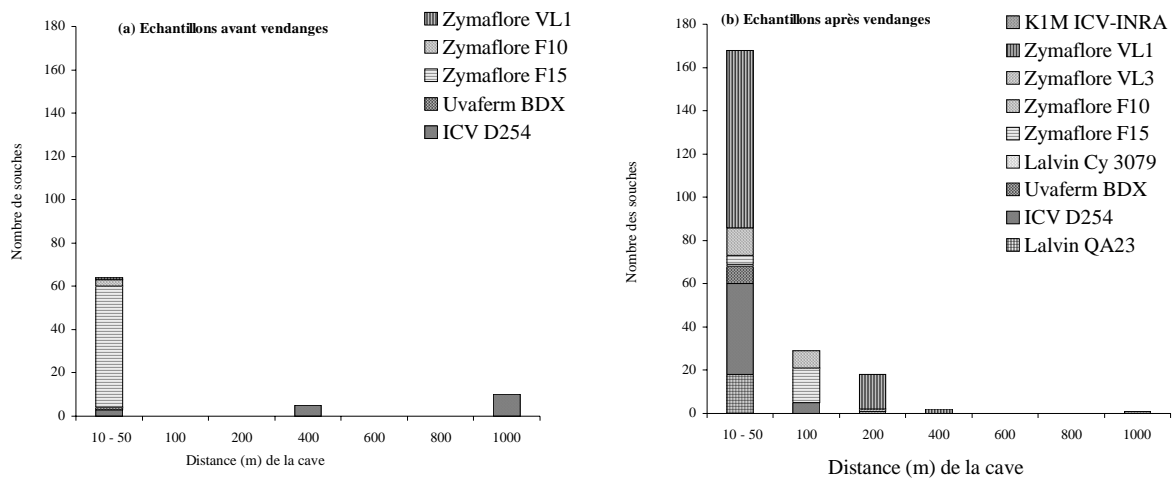


Figure 1. Distribution des 296 souches de profil type souche commerciale, en fonction de la distance par rapport à la cave.

L'ensemble des données obtenues sont résumées sur la Figure 2. Pour une large part, les souches de profil souche commerciale sont retrouvées dans les échantillons collectés après vendange, ce qui reflète une dissémination immédiate. Seulement 9 des 34 souches utilisées dans les 6 caves sont retrouvées dans le vignoble. Plusieurs souches très utilisées au cours des années de l'étude sont retrouvées, mais il ne s'agit pas d'une corrélation stricte. Par exemple, la souche K1M-ICV INRA, massivement utilisée dans les 3 vignobles français, est très peu retrouvée (1 souche sur 2160 isolées).

On peut observer que d'une année sur l'autre, ces souches ne sont pas systématiquement retrouvées sur le même site ou lieu de prélèvement, mais plutôt subissent des fluctuations naturelles d'apparition/disparition périodique, au même titre que les souches autochtones (Figure 2). Il est particulièrement intéressant de noter que les 2 souches utilisées massivement pendant 10-15 ans dans les caves françaises et portugaises n'ont été retrouvées qu'occasionnellement et n'ont en aucun cas montré une capacité à dominer la microflore naturelle.

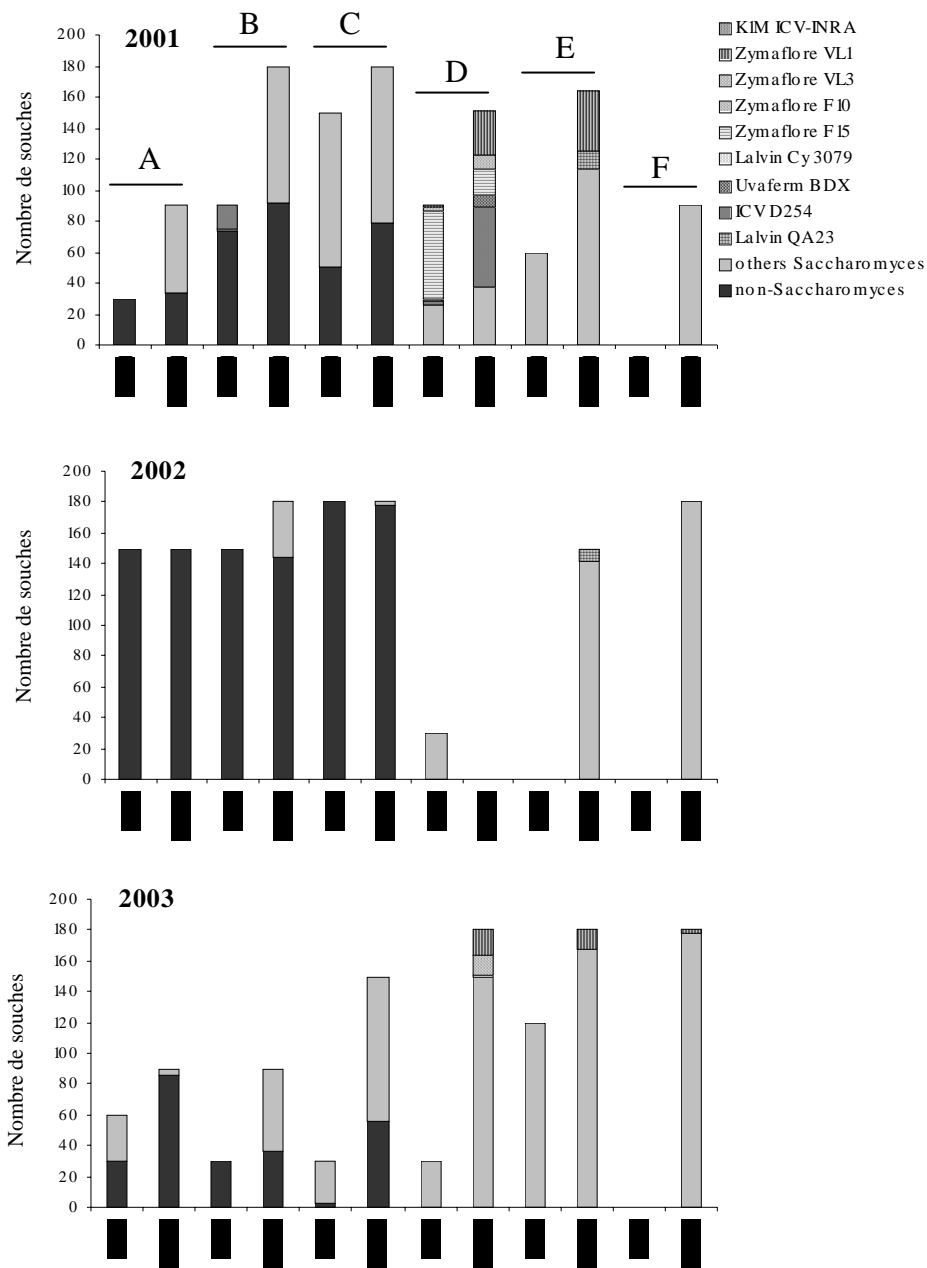


Figure 2. Evolution de la flore fermentaire isolée au cours des 3 années. Echantillons collectés avant (Pre-H) et après (Post-H) vendanges. A, B, C: vignobles français; D, E, F: vignobles portugais. En noir: non-*Saccharomyces*; symboles: *Saccharomyces* ayant un profil identique à celui d'une souche commerciale; en gris: autres *Saccharomyces*.

Conclusion

L'analyse globale des résultats montre que la dissémination des levures commerciales dans le vignoble est limitée dans l'espace et dans le temps. Une large majorité des souches de profils souche commerciales sont retrouvées à proximité immédiate des caves (78% à moins de 50 m; 94% à moins de 200 m) et cette dissémination est largement favorisée par la présence d'effluents liquides. Nous n'avons pas systématiquement retrouvé les mêmes souches d'une année sur l'autre. Si certaines de ces souches peuvent survivre dans l'écosystème, comme le suggère la présence de souches commerciales avant levurage en 2001 au Portugal, elles ne s'implantent pas de manière systématique dans l'écosystème, et ne sont pas capables de dominer la flore naturelle.

Remerciements

Nous remercions les personnels et œnologues des caves françaises et portugaises, et en particulier à Dominique Delteil et aux œnologues-conseils de l'ICV Montpellier, pour leur aide dans la sélection des sites et au cours des compagnes.

Bibliographie

- Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H., Khan, W. and Pretorius, I.S. 2000a. Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21(1), 10-16.
- Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H., and Pretorius, I.S. 2000b. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the Coastal Regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21(1), 3-9.
- Vezhinet, F., Hallet, J-N., Valade, M., Poulard, A. 1992. Ecological survey of yeast strains by molecular methods of identification. *Am J. Enol. Vitic.* 43(1), 1992, p.83-86.
- Guillamón, J.M., Bairro, E. and Querol, A. 1996. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers; relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *System. Appl. Microbiol.* 19, p. 122-132.
- Frezier, V. and Dubourdieu, D. 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43(4), p. 375-380.