

**CARACTERISATION DE LA FLORE INDIGENE
ET PHENOTYPE KILLER
DANS LES MOUITS EN FERMENTATION
SPONTANEE DU CEPAGE VERMENTINU BLANC**

Nathalie Uscidda

1994

CARACTERISATION DE LA FLORE INDIGENE ET PHENOTYPE KILLER DANS LES MOUTS EN FERMENTATION SPONTANEE DU CEPAGE VERMENTINU BLANC

RESUME

Réalisé par le C.I.V.A.M. de la Région CORSE, avec le concours des Centres I.T.V. de Tours et Nantes, ce travail se présente en deux parties : dans un premier temps, il propose une caractérisation par analyse de caryotypes en champ pulsé de la microflore indigène du cépage insulaire Vermentinu. Par la suite, les espèces levuriennes isolées ont été testées selon leur phénotype Killer, sensible ou neutre.

Afin que les résultats soient les plus conformes possibles avec la situation fermentaire réelle, cette prospection a été réalisée sur 14 sites (ensemble des 8 terroirs A.O.C. de Corse) par prélèvement et étude de moût en fermentation spontanée. Elle fut également associée à une étude de la cinétique des biomasses levuriennes au cours de la vinification (début, milieu et fin de fermentation).

Comme dans la plupart des régions viticoles françaises et étrangères, l'espèce fermentaire prépondérante en Corse est *Saccharomyces cerevisiae* et, quelquefois, les genres *Kloeckera* et *Hanseniaspora* participent aux premiers stades fermentaires.

La diversité naturelle et clonale paraît très réduite : d'un site géographique à l'autre, il existe de nombreuses similitudes entre individus. Il y a toujours identité des souches sur les deux derniers stades fermentaires et parfois même sur les premiers et seconds, il n'y aurait au plus que 3 types d'individus différents parmi les levures majoritairement présentes par biomasse.

Ce peu de variabilité inter et intra site trouve une application directe dans l'action de sélection d'une souche de levure, issue de Vermentinu, engagée par le C.I.V.A.M. Il permet un tri des biomasses support des travaux d'isolement des souches potentiellement candidates à la sélection et une réduction du nombre de souches isolées par biomasse.

Sur les 85 individus retenus et représentatifs de l'ensemble du territoire corse, aucune levure sensible n'a été recensée, et les souches présentent majoritairement (55,3%) le phénotype Killer. Il est observé, quasisystématiquement, une fréquence de levures Killer plus élevée dans les derniers stades de la fermentation que dans les premiers.

La nature de la microflore fermentaire est étroitement liée aux conditions spécifiques d'un millésime donné. Ces résultats, qui ne concernent que les vendanges 1991, peuvent donc présenter des fluctuations d'une année sur l'autre.

MOTS CLEFS : levures, souches indigènes, caryotype, biomasses, Killer.

**CARACTERISATION DE LA FLORE INDIGENE
ET PHENOTYPE KILLER
DANS LES MOUTS EN FERMENTATION
SPONTANEE DU CEPAGE VERMENTINU BLANC**

SOMMAIRE

RESUME - MOTS CLEFS	P.2
REMERCIEMENTS	P.5
LISTE DES ABREVIATIONS	P.5

**ETUDE DE LA MICROFLORE FERMENTAIRE SPONTANEE DES
MOUTS DU CEPAGE VERMENTINU BLANC**

I - MOTIVATIONS.....	P.7
II - OBJECTIFS	P.8
III - MISE EN OEUVRE	P.8
IV - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	P.9
1- Les levures	
11) Systématique et taxonomie	
12) Les levures de vinification	
a) les levures apiculées non sporogènes	
b) les levures fermentaires	
c) les levures oxydatives des vins	
2- Le levurage	
3- La sélection de levure	
4- Les nouvelles techniques de caractérisation des souches de levures	
a) Analyse de l'ADN mitochondrial	
b) Analyse de l'ADN nucléaire	
c) Applications pratiques de ces méthodes	
V - PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	P.18
1- Méthodologie	
2- Définition des sites géographiques	

3- Collecte des moûts	
4- Suivi de la fermentation alcoolique et définition des stades de prélèvement des biomasses	
5- Récupération des biomasses levuriennes	
6- Analyse des biomasses	
VI- PRESENTATION DES RESULTATS	P.21
VII - DISCUSSION	P.23
1- Les levures fermentaires dominantes en Corse	
2- Variabilité intra et inter sites	
VIII - CONCLUSION	P.24

PHENOTYPE KILLER DANS LES MOUTS DU CEPAGE VERMENTINU BLANC

I - MOTIVATIONS ET OBJECTIFS	P.26
II - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	P.26
1- Théorie de l'effet Killer	
2- Génétique et activité du système Killer K_1	
III - PROTOCOLE EXPERIMENTAL	P.28
IV - PRESENTATION DES RESULTATS	P.29
V - DISCUSSION P.30	
VI - CONCLUSION P.31	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	P.32
ANNEXES	P.35

REMERCIEMENTS

Le C.I.V.A.M. de la Région CORSE tient à exprimer sa profonde gratitude à l'ensemble des vignerons corses qui, par leur sérieux, leur disponibilité et la motivation dont ils ont fait preuve à un moment aussi délicat que les vendanges, ont permis la réalisation de ce travail.

Il tient également à adresser sa reconnaissance aux équipes de recherche de l'I.T.V. de Tours (MM. CUINIER Claude, POUPAULT Pascal et Mme GUYOT Fabienne) et de Nantes (MM. POULARD Alain et COARER Morvan) pour leur efficace collaboration.

LISTE DES ABREVIATIONS

L.S.A.	Levures sèches actives
A.D.N.	Acide désoxyribonucléique
A.R.N.	Acide ribonucléique
A.T.P.	Adénosine triphosphate
I.T.V.	Institut Technique de la Vigne et du Vin
I.C.V.	Institut Coopératif du Vin
A.O.C.	Appellation d'Origine Contrôlée

**ETUDE DE LA MICROFLORE
FERMENTAIRE SPONTANEE
DES MOUITS DU CEPAGE VERMENTINU
BLANC**

ETUDE DE LA MICROFLORE FERMENTAIRE SPONTANEE DES MOUTS DU CEPAGE VERMENTINU BLANC

I - MOTIVATIONS

Il n'existe pas de référence bibliographique sur l'écologie levurienne corse. Il faut attendre 1990 pour qu'une prospection dans ce sens soit amorcée. En effet, dans le cadre d'un programme de sélection de levure désacidifiante par le Centre I.T.V. du pays Nantais, le C.I.V.A.M. fut sollicité (comme la plupart des Centres de recherche nationaux) pour la fourniture de moûts fermentés par des souches indigènes.

Il s'agissait de recueillir des échantillons de baies de raisin représentatifs de l'ensemble des terroirs viticoles corses, de les pressurer manuellement au laboratoire et d'attendre que le moût obtenu ait terminé sa fermentation pour être envoyé et analysé à Nantes. Environ une vingtaine de prélèvements furent réalisés, puis transmis, et il fut isolé et identifié sur chacun 10 souches de levures.

Il apparut (1) une assez forte proportion de l'espèce Zygosaccharomyces Bailii sur l'ensemble des échantillons et ce, quelque soit la variété (Niellucciu, Sciaccarellu ou Vermentinu) ou l'origine géographique (Ajaccio, Patrimonio, Calvi, Plaine Orientale).

Sur les échantillons issus de baies de Vermentino B. (Vermentinu) il fut enregistré une très nette dominance de cette espèce puisqu'elle représentait plus de 50% de la population levurienne. Les autres souches étaient en majorité, des Saccharomyces cerevisiae, variété cerevisiae ou variété bayanus universellement connues comme responsables des processus de fermentations viniques (2).

Des levures du genre Zygosaccharomyces avaient été isolées en Sardaigne sur du moût de Vermentinu (3) mais elles n'étaient pas présentes dans de telles proportions et simplement occasionnelles. Cet état de fait présentait d'ailleurs un caractère peu banal car il n'avait jamais été enregistré dans la plupart des investigations écologiques réalisées à ce jour (2).

Parallèlement aux travaux réalisés par l'I.T.V. du pays Nantais, le C.I.V.A.M. de la Région Corse intégra à ses programmes de recherche une démarche de sélection levurienne. Compte tenu des caractéristiques de nos vins blancs secs aromatiques, issus à 100% du cépage Vermentinu, cette étude s'orienta naturellement vers la sélection d'un levain plus particulièrement adapté à ce type de produit.

Il s'agit d'isoler de la flore indigène une ou plusieurs levures insulaires en vue de leur exploitation sous forme de L.S.A. (en souche pure ou levain mixte).

Les premières conclusions obtenues par l'I.T.V. ont aiguisé notre appétit de connaissance en matière d'écologie levurienne, ces résultats sont des paramètres importants à prendre en compte dans l'élaboration de la procédure de sélection. Il est primordial d'aboutir lors de cette prospection à une collection de levures respectant la typicité du Vermentinu, et représentative de la microflore indigène des terroirs corses.

II - OBJECTIFS

Pour ébaucher ces travaux de sélection il nous sembla donc pertinent d'apporter quelques éléments de réponse à un certain nombre de questions. En

particulier, quels sont les types de souches qui participent majoritairement à la fermentation alcoolique en Corse? Existe-t-il une souche du terroir? la fermentation alcoolique est-elle réalisée par une espèce de levure dominante, un petit nombre ou, au contraire, un grand nombre d'espèces? Y a-t-il une succession de souches pendant la phase fermentaire, et si oui, y a-t-il une souche qui s'autosélectionne?

Les objectifs s'articulent donc sur deux niveaux de réflexions :

- * un objectif au sens écologie représenté par la détermination de la flore indigène du vignoble corse,
- * un objectif au sens sélection, car la réalisation d'une procédure de sélection doit être cohérente avec la situation fermentaire réelle.

III - MISE EN OEUVRE

Afin que la caractérisation de la flore indigène soit la plus complète possible, mais également pour n'occulter aucune souche potentiellement candidate à la sélection, on utilise :

- * la variabilité naturelle du milieu et la variabilité clonale, en pratiquant des prélèvements sur moûts en fermentation spontanée dans toutes les microrégions viticoles corses, et en prélevant les biomasses levuriennes sur plusieurs stades de la fermentation alcoolique (début, milieu, fin de fermentation).

La collection de levures indigènes support des travaux de sélection, est constituée à partir de souches ayant d'abord été caractérisées dans des moûts en fermentation alcoolique spontanée de Vermentinu.

Cette démarche présente un double avantage, elle permet bien sûr aux souches testées pour la création d'un levain d'être représentatives de l'écologie insulaire, mais aussi de ne pas travailler sur les levures qui se sont avérées inintéressantes lors de la détermination de la flore indigène.

Ces souches qui augmentent inutilement le coût des travaux de sélection peuvent être de plusieurs types :

- * celles qui sont connues pour ne pas participer à la fermentation alcoolique ou dont le pouvoir fermentaire est minime,
- * celles qui ont un caractère désacidifiant augmentant alors le déficit d'acidité déjà enregistré sur les vins issus de Vermentinu (4),
- * les espèces ne présentant pas de caractéristiques favorables en vue de leur sélection (levures responsables d'accidents du vin),
- * les clones levuriens identiques,

- * mais également, des levures déjà sélectionnées sous forme de L.S.A. car, certains des viticulteurs pratiquant le levurage, nous ne sommes pas à l'abri d'une contamination d'un moût en fermentation spontanée.

Le C.I.V.A.M. s'est associé pour ce travail avec les Centres I.T.V. de Tours et de Nantes et, il a été décidé d'utiliser pour la caractérisation de la flore indigène, une méthode d'identification faisant appel à la dotation génomique des levures. Cette technique, dont de nombreux travaux ont déjà montré la fécondité en matière d'écologie levurienne (5)(6)(7) et de contrôle de levurage (8), est l'identification des caryotypes obtenus par électrophorèse en champ pulsé.

IV - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

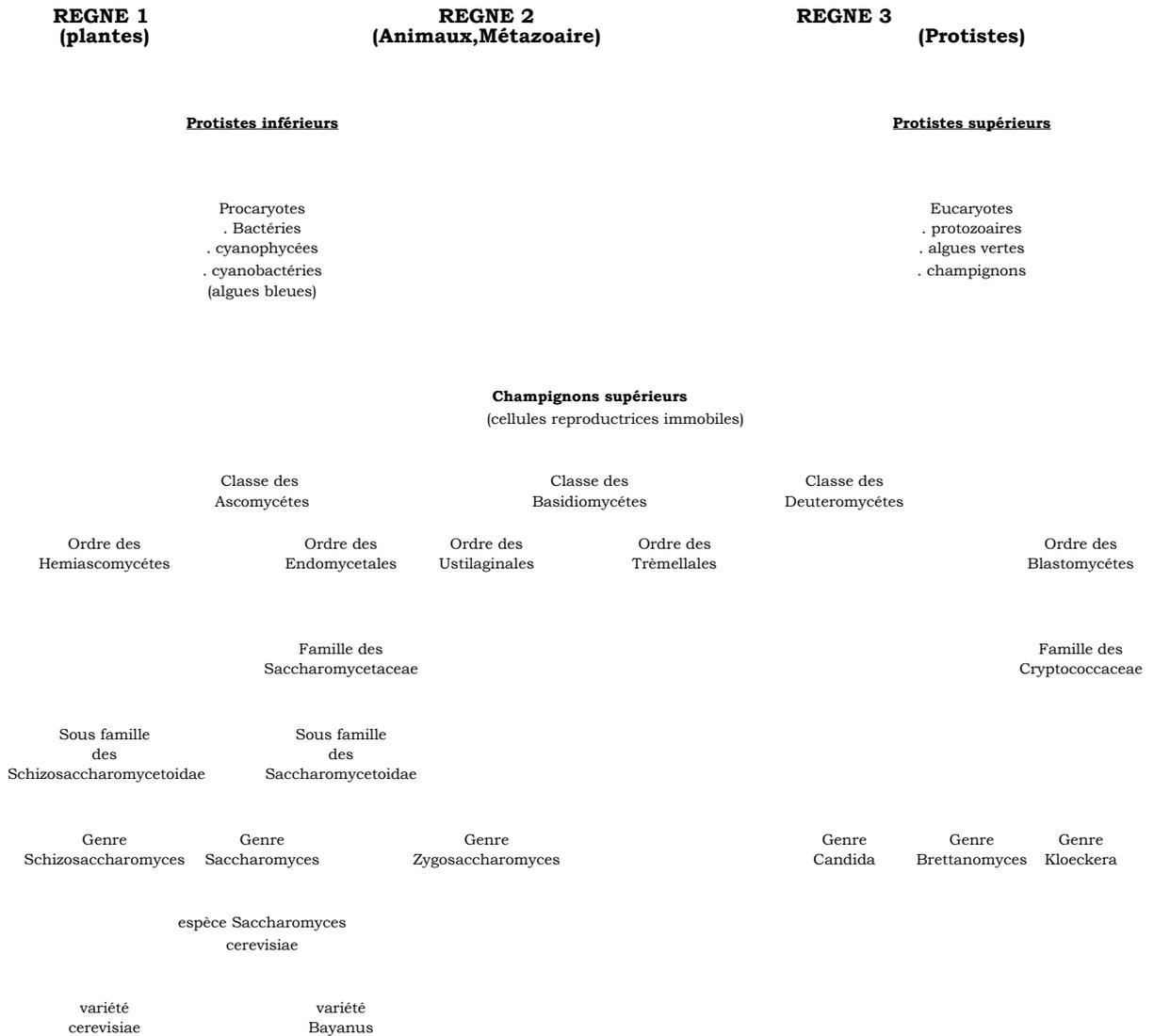
1 - LES LEVURES

Les levures sont classiquement définies comme étant des champignons unicellulaires immobiles (9). Le terme levure, qui vient du verbe "lever" comme "levain", n'a pas de sens botanique strict, il désigne un groupe disparate de microorganismes répartis dans plusieurs familles de champignons.

Les levures puisent leur énergie par dégradation de substances organiques variées comme par exemple la fermentation des sucres. Ce sont des organismes chimiohétérotrophes. La figure 1 page suivante indique leur place dans le monde vivant.

FIGURE 1

**PLACE DES MICROORGANISMES DANS LE MONDE VIVANT
ET DE QUELQUES ESPECES DE LEVURES RENCONTREES EN VINIFICATION**



11 - SYSTEMATIQUE ET TAXONOMIE

Le classement des levures en genres et espèces comprend forcément une part de convention, de ce fait leur classification se trouve en perpétuelle évolution. C'est en 1880 que MEYEN leur donna pour la première fois un nom. Celui-ci était complètement arbitraire et dépendait simplement de l'origine de leur isolement :

- * Saccharomyces cerevisiae pour celles rencontrées dans la bière,
- * Saccharomyces Vini pour celles rencontrées dans le raisin,
- * Saccharomyces Pomorum pour celles rencontrées dans le jus de pomme.

Par la suite, GUILLERMOND en 1912, mais surtout LODDER en 1952 et en 1971, établirent grâce au développement des techniques d'analyse une classification basée sur les critères suivants (10) :

- * morphologiques (forme et taille des cellules en milieu liquide et solide ; reproduction végétative : scissiparité ou bourgeonnement; formation de mycélium ou pseudo mycélium),
- * culturels (aspect des cultures en milieux solides et liquides),
- * sexuels (type de reproduction sexuée ou non),
- * physiologiques (fermentation de composés sucrés, assimilation de composés carbonés et azotés).

L'isolement de nouvelles souches, ainsi que l'avènement des biotechnologies permirent par la suite à KREGGER VAN RIJ en 1984 de réactualiser cette classification. Outre les critères cités plus haut, elle repose aussi sur l'étude de certains organites :

- * le noyau : séquençage de l'A.D.N. et pourcentage de bases cytosine et guanine,
- * le cytoplasme : analyse du coenzyme Q,
- * et la paroi cellulaire : ultrastructure de la membrane.

La modification la plus importante concerne le genre Saccharomyces. En effet, celui-ci comprenait 41 espèces en 1971 et il n'en reste maintenant que 7. Seize espèces ont été regroupées dans l'espèce Saccharomyces cerevisiae, en particulier, chevalieri, italicus et uvarum.

Le tableau 1, page suivante, donne la classification de KREGGER VAN RIJ (11).

TABLEAU 1

CLASSIFICATION DE KREGER VAN RIJ (1984)

CLASSIFICATION OF THE YEASTS IN THE EUMYCOTA

Ascomycotina	Hemiascomycetes	Endomycetales	Spermophthoraceae	Saccharomycetaceae
Basidiomycotina	Filobasidiaceae	Ustilaginales	Teliosporeforming yeasts	
	Tremellales	Sirobasidiaceae	Tremellaceae	
Deuteromycotina	Blastomycetes	Cryptococcaceae	Sporobolomycetaceae	

CLASSIFICATION OF THE ASCOSPOROGENOUS YEASTS

Spermophthoraceae	Coccidiascus	Metschnikowia	Nematospora
Saccharomycetaceae	Schizosaccharomycetoideae	Schizosaccharomyces	
	Nadsonioideae	Hanseniaspora	Nadsonia
			Saccharomycodes
			Wickerhamia
Lipomycetoideae	Lipomyces		
Saccharomycetoideae	Ambrosiozyma	Pachysolen	
		Arthroascus	Pachytichospora
		Citeromyces	Pichia
		Clavispora	Saccharomyces
		Cyniclomyces	Saccharomycopsis
		Debaryomyces	Schwanniomyces
		Dekkera	Sporopachydermia
		Guilliermondella	Stephanoascus
		Hansenula	Torulaspora
		Issatchenkia	Wickerhamiella
		Kluyveromyces	Wingea
		Lodderomyces	Zygosaccharomyces

CLASSIFICATION OF THE BASIDIOSPOROGENOUS YEASTS

Filobasidiaceae	Chionosphaera	Filobasidiella	Filobasidium
Teliosporeforming yeasts	Leucosporidium	Rhodosporeidium	Sporidiobolus
Sirobasidiaceae	Fibulobasidium	Sirobasidium	
Tremellaceae	Holtermannia	Tremella	

CLASSIFICATION OF THE IMPERFECT YEASTS

Cryptococcaceae	Aciculoconidium	Rhodotorula	Brettanomyces	Sarcinosporon
			Candida	Schizoblastosporion
			Cryptococcus	Sterigmatomyces
			Kloeckera	Symptodiomyces
			Malassezia	Trichosporon
			Oosporidium	Trigonopsis
			Phaffia	
Sporobolomycetaceae	Bullera	Sporobolomyces		

12 - LES LEVURES DE VINIFICATION

Il est certain que l'origine du vin comme celle de la bière remonte à plusieurs millénaires avant Jésus Christ, il est même très probable que les premiers vins provenaient de divers fruits, dont le raisin, contaminés par différents microorganismes, dont les levures, entraînant une fermentation alcoolique.

Si CAGNARD LATOUR, SCHAWNN et KUTZING firent les premiers la relation entre les levures et la fermentation alcoolique en 1837, c'est PASTEUR en 1866 qui apporta la preuve formelle que la fermentation était provoquée par des cellules vivantes (9).

Dans le sens strict du terme, une levure de vinification est une souche capable de mener une fermentation alcoolique jusqu'à l'épuisement des sucres du moût de raisin. Celle-ci est essentiellement assurée par l'espèce Saccharomyces cerevisiae mais la présence d'autres espèces n'est pas exclue. Leur rôle est soit mal connu, soit nuisible. D'une manière générale, il y aurait une action successive des souches. Jusqu'à 3 ou 5 degrés d'alcool la fermentation serait assurée par des levures apiculées appartenant aux genres Kloeckera, Hansenula ou Hanseniaspora. Ensuite et jusqu'à 8 ou même 16 degrés d'alcool l'espèce Saccharomyces cerevisiae prendrait le relais. Parmi celle-ci, la variété bayanus est dite "finisseuse" de la fermentation alcoolique car surtout présente dans les derniers stades de cette réaction. Elle résisterait mieux à l'alcool et elle est très souvent plus alcoologène (2).

a) - Les levures apiculées asporogènes

Faiblement fermentaires, elles peuvent être dangereuses en début de vendange, où elles sont en général majoritaires. Certaines sont capables de produire des défauts comme l'acescence. Présentes sur le matériel de récolte et de cave et dans le jus de raisin, elles sont cependant très sensibles au SO₂.

* exemple : Kloeckera apiculata.

b) - Les levures fermentaires

Le nombre de colonies de levures fermentaires obtenues à partir de baies de raisin est assez faible et surtout irrégulier. Si l'on recueille quelques grappes saines et qu'on les écrase dans des conditions strictes d'asepsie, il peut arriver que la fermentation ne se déclare pas. Malgré tout, les levures fermentaires se multiplient rapidement sur le matériel de récolte et du chai. Des appareils comme le fouloir ou le pressoir, recouverts de moût largement exposé à l'air (permettant ainsi une prolifération rapide des souches), jouent alors le rôle "d'ensemencement".

c) - Les levures oxydatives des vins

Présentes la plupart de l'année sur le matériel de la cave, ces levures peuvent se développer après la fermentation alcoolique en recontaminant les vins lors de leur conservation pendant les opérations de soutirage ou ouillage. On peut citer pour exemple le genre Brettanomyces souvent responsable du goût de "souris" perçue en fin de dégustation de vins vinifiés dans de mauvaises conditions d'hygiène et le genre Candida provoquant la formation de voile ou "fleur" des vins s'ils sont laissés au contact de l'air (2).

2 - LE LEVURAGE

Le levurage consiste à ajouter à la cuve des levures sélectionnées, ou non, et en pleine activité, afin que celles-ci se multiplient dans la masse du moût et provoquent avec les levures indigènes la fermentation alcoolique. En pratique, c'est une méthode employée depuis longtemps par les viticulteurs sous le nom de "pied de cuve" : elle consiste à ensemencer une cuve à partir d'un moût en fermentation. En effet, les premières cuves de vinification ont toujours une population levurienne inférieure aux dernières ce qui fait que la fermentation spontanée s'y réalise plus lentement. Cette méthode n'agit cependant que sur le démarrage de la fermentation et donne des résultats qualitatifs aléatoires. L'objectif premier du levurage est de fiabiliser la phase fermentaire en la rendant régulière et complète, ce faisant il pallie à un certain nombre de déviations dont, notamment (12) :

- * des mises en fermentation lentes qui peuvent entraîner des contaminations microbiennes ou l'oxydation du moût non protégé par le CO₂ produit par les levures,
- * des déroulements perturbés de la fermentation comme la production anormale d'écume ou des phases fermentaires languissantes compromettant l'utilisation maximale de la cuverie,
- * des arrêts de fermentation avec risque de piqûre acétique ou des départs en fermentation malolactique sur des vins où celle-ci n'est pas désirée,.....

Outre cette maîtrise globale de la fermentation, le levurage peut être utilisé dans le but d'exploiter une caractéristique levurienne peu courante. L'I.C.V. Montpellier a isolé une souche de Schizosaccharomyces pombe dont l'aptitude à la démalication permet d'éliminer l'acidité excessive de certains vins (13). Mais la mode est surtout aujourd'hui aux levures exaltant des arômes spécifiques.

Après avoir utilisé des levains liquides, des crèmes de levures et des levures lyophilisées, c'est sous forme de L.S.A. que la pratique du levurage est devenue la forme d'utilisation la plus commode pour le viticulteur. Apparue en 1964, cette présentation des souches permet une conservation facile et une mise en oeuvre très simple des levains (14).

3 - LA SÉLECTION DE LEVURE

Depuis qu'il sait que la fermentation alcoolique n'est pas une réaction purement chimique, mais le résultat de l'activité de levures, l'oenologue est tenté de sélectionner des souches et de les apporter dans le moût de raisins avec l'espoir d'obtenir une amélioration par rapport à la fermentation spontanée. La sélection de levure consiste à choisir parmi la flore indigène une ou plusieurs souches présentant les performances oenologiques les plus intéressantes. Les critères de choix doivent être adaptés aux conditions de la matière première et aux conditions de la technologie. La souche sélectionnée doit être conforme aux objectifs du vin produit du point de vue analytique et organoleptique. Il y a très peu de modélisation, chaque cas de procédure de sélection est un cas particulier pour lequel une démarche spécifique doit être adoptée. L'échantillon initial de souche est constitué de cellules puisées de la façon la plus exhaustive possible dans la flore indigène. Il sera réduit en imposant une hiérarchie entre les caractéristiques oenologiques demandées aux levures. A chaque critère de sélection est associé un degré d'importance qui détermine son ordre d'apparition dans la stratégie de tri.

A titre d'exemple, le tableau 2, page suivante, donne les grandes étapes de la sélection de levures en Côtes du Rhône et les caractéristiques oenologiques de la souche retenue (L2056).

Il faut cependant garder à l'esprit une notion essentielle : la qualité des vins est principalement liée au cépage, au terroir, au millésime, et aux pratiques viticoles et oenologiques. Les techniques de vinification permettent de conserver, d'exprimer, voir de valoriser, le potentiel qualitatif acquis au moment des vendanges. Le rôle de la fermentation alcoolique est essentiel, mais l'incidence de la ou des souches responsables sur la qualité des vins peut être diversement appréciée (14).

TABLEAU N°2

**STRATEGIE DE SELECTION DE LEVURES EN COTES DU RHONE
ET CARACTERISTIQUES OENOLOGIQUES DE LA SOUCHE RETENUE (14)**

NOMBRE DE SOUCHES	ETAPES DE LA SELECTION DES LEVURES DES COTES DU RHONE
	Levures des Côtes du Rhône
1.500	Isolement de 47 fermentations spontanées en 1980 et 1981
1.200	Levures neutres ou Killer
132	Levures d'espèces réputées alcoogènes, représentatives de chaque fermentation
26	Pouvoir alcoogène supérieur à 14%
15	Caractéristiques oenologiques favorables
15	Vinification en 20 litres sur moût Côtes du Rhône 198283
5	Vinification en vraie grandeur en Côtes du Rhône avec 5 L.S.A. (198384)
1	Souche retenue pour levurage des moûts L.2056

**L. 2056 SACCHAROMYCES CEREVISIAE
POUR LE LEVURAGE DES MOUTS**

	Levure sélectionnée pour son aptitude à fermenter les vins des Côtes du Rhône, même à très forte teneur en alcool et à exalter leurs arômes spécifiques.
* PROPRIETES	
	- Assure un démarrage rapide de la fermentation,
	- Evite les fins de fermentations languissantes,
	- Températures de fermentation favorables : 15 à 28°C,
	- Alcool produit : jusqu'à 16%,
	- Rendement sucréalcool : 16,5 à 17 g/l de sucre pour 1%
d'alcool,	
	- Souche Killer,
	- Formation d'écume : faible,
	- Tolérante au SO ₂ ,
	- Produit peu d'acidité volatile, de SO ₂ et de composés combinant le SO ₂ (acide pyruvique et acétaldéhyde),
	- Dégrade peu l'acide malique,
	- N'entrave pas le déroulement de la fermentation malolactique,
	- Permet de mettre en évidence dans les vins les caractéristiques typiques des Côtes du Rhône.

4- LES NOUVELLES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE SOUCHES DE LEVURES

Les techniques classiques de microbiologie basées sur des tests biochimiques de fermentation et d'assimilation des sucres ont été couramment utilisées par les taxonomistes et le sont toujours pour caractériser le genre, l'espèce et la variété des souches.

Cependant, elles demandent du temps (environ trois semaines) et surtout elles ne permettent pas l'identification de deux clones spécifiques appartenant à la même variété.

Afin de pallier à cette insuffisance, des méthodes basées sur l'analyse des produits du métabolisme ont été proposées. En 1981, BOUIX (15) étudia par analyse chimique et électrophorétique l'ensemble des composés macromoléculaires que les levures excrètent dans le milieu de culture au cours de leur croissance. Par comparaison, elle distingua ainsi des souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae* et effectua un contrôle de levurage.

Théoriquement fiables, ces investigations sont longues, trop sensibles à l'état physiologique de la cellule levurienne car étroitement liées aux conditions de culture, et donc, insuffisantes pour être utilisées seules.

Ces dernières années, l'étude du matériel génétique s'est avérée comme un des moyens les plus sûrs et les plus répétitifs de détection de l'identité intraspécifique des levures. Ces techniques peuvent porter sur l'A.D.N. mitochondrial ou sur l'A.D.N. nucléaire. Elles sont utilisées en routine à l'I.T.V. et au laboratoire de cytophysiologie végétale de l'Université de Nantes (5)(8)(17).

a - ANALYSE DE L'A.D.N. MITOCHONDRIAL

Chronologiquement apparue la première, cette méthode permet d'affirmer que deux souches sont génétiquement différentes. En effet, les mitochondries des levures possèdent une molécule d'A.D.N. circulaire de petite taille et présente en plusieurs copies. Cette molécule est extraite, coupée en des sites spécifiques par des enzymes de restriction et les fragments ainsi générés sont séparés selon leur taille sur un gel d'agarose. L'A.D.N. mitochondrial présente, d'une souche à une autre, un tel polymorphisme au niveau des sites reconnus par les enzymes, que la taille et le nombre des fragments obtenus seront caractéristiques d'une levure donnée.

L'observation sous ultra violets du gel électrophorétique après coloration de l'A.D.N. au bromure d'éthidium va permettre de comparer directement plusieurs souches de levures entre elles. L'ensemble constitue une manipulation qui s'étend sur 4 à 5 jours environ.

b - ANALYSE DE L'A.D.N. NUCLEAIRE

Cette méthode repose sur l'obtention de caryotypes puisqu'elle propose la séparation par électrophorèse en champ pulsé des différents chromosomes levuriens. Leur nombre est très variable d'un genre à un autre (il peut atteindre 17 chez *Saccharomyces*) et leur taille est entre 3 et 20 fois plus grande que la molécule d'A.D.N. mitochondrial.

La différence principale entre les deux techniques (outre la non utilisation ici d'enzyme de restriction) provient de l'appareil électrophorétique employé.

Il s'agit de faire migrer dans un gel des chromosomes entiers, or les méthodes classiques d'électrophorèse ne permettent pas la séparation d'organites dont la taille est trop importante.

On utilise donc un procédé ayant recours à deux champs électriques d'orientations différentes, dont l'application alternative crée des phénomènes de réorientation des molécules. Parmi les différents appareillages proposés, l'I.T.V. de Nantes a retenu le système TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis), l'A.D.N. migre alors en zig zag dans l'épaisseur d'un gel dont la position est verticale par rapport au plan de travail.

La figure 2 présente un schéma du système TAFE et les profils électrophorétiques obtenus en champ pulsé de différents genres de levures oenologiques (17).

FIGURE 2**SYSTEME TAFE ET ELECTROPHOREGRAMMES
DE QUELQUES GENRES DE LEVURE (17)**

A partir de la piste de gauche : Saccharomyces cerevisiae L 311, Torulopsis spelata MK 311, Zygosacchomyces baïlli 5770, Pichia stipitis 3322, Torulaspora delbrucki L 509, Kloeckera spelata MK 322, Saccharomyces cerevisiae variété uvarum L 2898.

Lors d'obtention d'électrophorégrammes de chromosomes levuriens tous les acides nucléiques peuvent être visualisés, c'est ce qui explique la présence d'A.R.N. et d'A.D.N. mitochondrial au fond du gel.

Cette méthode d'analyse requiert environ une semaine.

c - APPLICATIONS PRATIQUES DE CES METHODES

A tout moment, on peut reconnaître de façon formelle une souche de levure par l'analyse du profil électrophorétique de l'A.D.N. mitochondrial et nucléaire. Du point de vue taxonomique, ces outils sont des instruments indispensables, puisqu'il est possible de caractériser les genres (17) et de différencier deux individus appartenant à la même variété (16). Ils contribuent d'ailleurs actuellement à la constitution à l'Université de Nantes d'une "levurothèque" qui, à partir d'une banque de données de profils électrophorétiques (de souche de levures commerciales et naturelles), gère et compare grâce à un logiciel approprié, toutes nouvelles analyses de ce type réalisées.

Dans le domaine oenologique, les applications sont extrêmement intéressantes et variées. Ces techniques permettent par exemple :

- * à l'industriel ou au distributeur, de vérifier que la L.S.A. qu'il vend est conforme au produit d'origine.
- * à l'utilisateur, de contrôler que la L.S.A. qu'il emploie est bien la souche annoncée, mais également et surtout qu'elle s'est correctement implantée lors du levurage (si une souche est présente dans le moût à plus de 20%, son profil électrophorétique peut être identifié).
- * au microbiologiste, de connaître le caractère mono ou polyclonal levurien d'une fermentation ou de repérer une éventuelle contamination dans certaines anomalies fermentaires.

V - PROTOCOLE EXPERIMENTAL (13)

1 - METHODOLOGIE

Il s'agissait de prélever 25 litres de moût issu à 100% de Vermentinu dans plusieurs terroirs viticoles corses. Ces 25 litres de moût furent transportés à la Station d'expérimentation vitivinicole du C.I.V.A.M. à San Giuliano où l'on effectua un suivi de la fermentation alcoolique thermorégulée à 18 - 20°C.

A différents stades de la fermentation spontanée, on pratiqua un prélèvement de moût dont on a isolé la population, ou biomasse, levurienne. Cette biomasse permet une caractérisation de la flore indigène par caryotype en électrophorèse en champ pulsé.

2 - DEFINITION DES SITES GEOGRAPHIQUES

La pluralité de ces sites permet l'augmentation de la variabilité naturelle des souches levuriennes du milieu corse. Il a été déterminé 14 sites de prélèvement de moût sur les 8 microrégions A.O.C. insulaires. Chaque site est doté d'un matricule constitué d'une lettre et d'un chiffre qui indique son origine. Le tableau 3 en donne une liste.

TABLEAU 3

LISTE DES SITES DE PRELEVEMENT

MICROREGION VITICOLE	N° du site	Matricule
A.O.C. VIN DE CORSE PORTO - VECCHIO	1	V ₁
A.O.C. VIN DE CORSE FIGARI	2	F ₁
A.O.C. VIN DE CORSE SARTENE	3	S ₁
A.O.C. VIN DE CORSE CALVI	4	C ₁
		5 ₁
		A ₁

A.O.C. AJACCIO	6	A ₂
		7
		A ₃
		P ₃
		8
		1

A.O.C. PATRIMONIO	9	P ₂
		2

A.O.C. VIN DE CORSE	11	R ₃
		P ₃
		10
		R ₁
		11
		1

A.O.C. VIN DE CORSE	13	O ₂
		O ₁
		12
		R ₂
		1

(Côte Orientale)	14	O ₂

3 - COLLECTE DES MOUTS

Le prélèvement n'est pas effectué sur le premier lot de vendange pressurée mais sur le deuxième ou le troisième car la contamination en levures fermentaires y est plus importante.

Pour cette même raison, le moût est collecté après un circuit dans les pompes et tuyaux de la cave.

Afin d'éviter tout départ en fermentation durant le transport au C.I.V.A.M., le moût est prélevé en début de débouillage (en principe refroidi) et réajusté à 7 g/hl de SO₂. Il est demandé au viticulteur de ne pas utiliser avant le prélèvement d'enzymes pectolytiques.

Le matériel de vinification en contact avec le moût ne doit pas avoir été, au moins pour les vendanges 1991, mis en présence de L.S.A. Si la cave a déjà réceptionné une vendange issue d'un autre cépage que le Vermentinu, elle doit avoir été bien désinfectée. La bonbonne de 25 litres est transportée avec ménagement au C.I.V.A.M., le moût est débouillé 18 heures à 18°C. Le lendemain, il est analysé (AT, SO₂T, pH, richesse en sucre) et corrigé pour obtenir environ :

- * AT (acidité totale).....4,15 g/l H₂SO₄,
- * SO₂T (anhydride sulfureux total).....7 g/hl,
- * titré alcoométrique probable.....12% vol.

4- SUIVI DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE ET DEFINITION DES STADES DE PRELEVEMENT DES BIOMASSES

Il importe de ne pas contaminer les 14 bonbonnes entre elles, aussi les densités de fermentation sont prises dans des conditions d'asepsie.

L'air ambiant est désinfecté au moment de la mesure avec un chalumeau et tout le matériel en contact avec le moût est débarrassé des contaminants grâce à un rinçage avec une solution à 1% de SO₂.

Les biomasses sont prélevées à quatre stades de la fermentation alcoolique, à savoir :

- * **Stade 1** : début de la fermentation alcoolique.
- * **Stade 2** : deux jours après le début de la fermentation alcoolique. Une aération du moût est alors réalisée.
- * **Stade 3** : lorsque la densité est de l'ordre de 1030.
- * **Stade 4** : en fin de fermentation alcoolique après épuisement des sucres ([sucres] < 2 g/l)

Lorsque la densité est de l'ordre de 1010, le moût est sorti à température ambiante pour permettre une fin de fermentation plus aisée.

En annexes 1 et 2 figure, à titre d'exemple, le suivi du site A₁.

5 - RECUPERATION DES BIOMASSES LEVURIENNES

50 ml de moût sont prélevés de façon aseptique (flacon et pipette stérile) et centrifugés 5 mn à 6300 tr/mn (centrifugeuse Laborotechnich T51). Avant centrifugation le moût est dégazé au TopMix.

Le culot recueilli est suspendu dans 15 ml de milieu de "conservation - congélation" (voir sa composition en annexe 3), homogénéisé et distribué à raison de 1 ml dans les cryotubes.

Les suspensions levuriennes sont alors placées dans une boîte de congélation progressive de 1°C par minute (Cryofreeze Polylabo), mise pour l'opération dans un congélateur à - 80°C. Après le temps requis de congélation, les cryotubes peuvent être retirés de la boîte et rangés définitivement dans l'armoire à - 80°C°.

6 - ANALYSES DES BIOMASSES

Les quatre biomasses levuriennes de chaque site (56 biomasses au total) sont envoyées dans de la carboglace à l'I.T.V. de Nantes pour analyse des biomasses par électrophorèse en champ pulsé.

L'étude des souches individuelles isolées de chaque biomasse s'avérant longue et onéreuse, nous avons préféré qu'il soit réalisé un profil de l'A.D.N. nucléaire global de la biomasse entière. Ceci nous a permis de présumer de la présence de tel ou tel genre et de conclure à l'identification très probable de certaines espèces (17).

VI - PRESENTATION DES RESULTATS

Pour chaque biomasse il est obtenu une photographie du gel électrophorétique conforme dans le concept à celle présentée page 17.

La photographie, ci-dessous, concerne les électrophorègrammes des sites A3 et O1 et les biomasses correspondant aux stades fermentaires 1,2,3, et 4.

TABLEAU 4
PRINCIPAUX GENRES ET ESPECES DE LEVURES CARACTERISES DANS LES BIOMASSES DES QUATRE
STADES FERMENTAIRES DES DIFFERENTS SITES GEOGRAPHIQUES ETUDIES

Sites géographiques	Stades	Dénomination fermentaires	Genres ou de la biomasse	espèces présumés
A1	1	A11	Scç à 100%	
	2	A12	= A11	
	3	A13	= A11	
	4	A14	= A11	
A2	1	A21	= A11	
	2	A22	= A11	
	3	A23	= A11	
	4	A24	= A11	
A3	1	A31	Scç à 100%	
	2	A32	= A31	
	3	A33	= A31	
	4	A34	= A31	
P1	1	P11	Scç à 100%	
	2	P12	= P11	
	3	P13	= P11	
	4	P14	= P11	
P2	1	P21	Klo ou Hans (>80)+Scç	
	2	P22	Klo ou Hans (>80)+Scç	
	3	P23	Scç (>80)	
	4	P24	= P23	
P3	1	P31	= P23	
	2	P32	= P23	
	3	P33	= P23	
	4	P34	= P23	
R1	1	R11	Klo ou Hans (>60)+Scç	
	2	R12	Scç à 100%	
	3	R13	= R12	
	4	R14	= R12	
R2	1	R21	Scç à 100%	
	2	R22	= R21	
	3	R23	= R21	
	4	R24	= R21	
O1	1	O11	Klo ou Hans (>70)+Scç	
	2	O12	Scç à 100%	
	3	O13	= O12	
	4	O14	= O12	
O2	1	O21	= O 12	
	2	O22	= O 12	
	3	O23	= O 12	
	4	O24	= O 12	
C1	1	C11	= O12 + x	
	2	C12	= O12 + x	
	3	C13	= O12 + x	
	4	C14	= O12 + x	
V1	1	V11	Klo ou Hans (>70)+Scç	
	2	V12	Klo ou Hans (>60)+Scç	
	3	V13	Scç à 100%	
	4	V14	= V 13	
F1	1	F11	= R 21	
	2	F12	= R 21	
	3	F13	= R 21	
	4	F14	= R 21	
S1	1	S11	Scç à 100%	
	2	S12	= S 11	
	3	S13	= S 11	
	4	S14	= S 11	

* **Commentaires :**

Scç = espèce *Saccharomyces cerevisiae*,

Klo = genre *Kloeckera*, Hans = genre *Hanseniaspora*,

= : identité des individus,

= : individus présentant de fortes similitudes,

x : individus présentant une variation génétique.

Au maximum, il y aurait trois individus (souches) différents majoritairement dans chaque biomasse.

VII - DISCUSSION

1 - LES LEVURES FERMENTAIRES DOMINANTES EN CORSE

En 1991, seuls l'espèce Saccharomyces cerevisiae et les genres Kloeckera ou Hanseniaspora ont été caractérisés comme prédominants dans la microflore indigène Corse (le genre Hanseniaspora correspond à la forme ascosporegène du genre Kloeckera. Ces deux genres sont dissociables biochimiquement, test de sporulation, mais non caryotypiquement).

Il n'a pas été retrouvé le genre Zygosaccharomyces qui pourtant, était le plus présent lors des prospections écologiques de 1990. Ceci peut trouver une explication dans le fait que le support de recherche ne fut pas le même. L'ITV a réalisé ses investigations sur des flacons de jus de raisin obtenus à partir de baies collectées dans le vignoble, alors que les prélèvements de 1991 concernaient du moût récupéré directement dans les chais. D'autre part, selon le millésime on sait que la flore indigène peut présenter des fluctuations.

La prépondérance de l'espèce Saccharomyces cerevisiae et des genres Kloeckera ou Hanseniaspora n'est pas surprenante mais conforme aux études réalisées dans des milieux aussi proches de la Corse que la Sardaigne (3) ou dans la plupart des régions viticoles françaises et étrangères (2).

Au sein de l'espèce dominante, Saccharomyces cerevisiae, les travaux de sélection menés par la suite par le C.I.V.A.M. et l'I.T.V. (résultats à paraître), à travers des caryotypes de souches individuelles, laissent présumer une très forte proportion de la variété cerevisiae. Cette présomption doit être vérifiée par tests biochimiques.

2 - VARIABILITE INTRA ET INTER SITES

La diversité géographique et clonale semble très réduite. A l'intérieur d'un même site, d'un stade à l'autre de la fermentation, il n'y a pas ou peu de relais d'espèces. 10 sites sur 14 (A1, A2, A3, P1, P3, R2, O2, C1, F1, et S1) ont une phase fermentaire assurée du début jusqu'à la fin par l'espèce Saccharomyces cerevisiae.

La fermentation alcoolique semble présenter une caractéristique polyclonale très réduite : il y a toujours identité des individus sur les deux derniers stades et quelques fois même sur les premiers et deuxièmes, il n'y aurait qu'un faible nombre de souches "dominantes", au plus 3 types différents par biomasse.

P2, R1, O1 et V1 sont les seuls sites où des Kloeckera ou Hanseniaspora sont présentes en début de fermentation alcoolique (% > 60), dès le deuxième stade leur pourcentage de présence diminue et c'est Saccharomyces cerevisiae qui assure majoritairement la suite et la fin de la F.A. (% = 100).

Entre les sites il existe de nombreuses similitudes, les flores indigènes de A1 et A2 d'une part et celles de F1 et R2 d'autre part sont complètement identiques. P2 et P3 semblent très proches, O1, O2 et C1 également. S'il est peu surprenant de retrouver la même microflore fermentaire dans des moûts issus de caves d'une même microrégion A.O.C., la similitude totale entre des sites aussi éloignés que R2 et F1 laisse perplexe. Cette identité de la flore levurienne est, soit une distribution naturelle des individus, soit, peut-être, l'influence d'autres facteurs (même origine du matériel végétal entre les deux sites,.....).

VIII - CONCLUSION

Cette caractérisation de la flore indigène, outre son apport culturel et scientifique, trouve une application directe dans les travaux de sélection amorcés par la suite.

La visualisation concrète de la situation fermentaire du Vermentinu en Corse, en 1991, a permis de cibler directement les biomasses à partir desquelles furent isolées les souches candidates à la sélection.

Le peu de variabilité naturelle a permis de réduire le nombre de biomasses, support des travaux de sélection, à 17. Le peu de variabilité clonale (au plus 3 types d'individus) nous a incités à n'isoler que 5 souches par biomasse choisie.

Le tri des biomasses a été effectué en fonction de leur identité:

- intra sites (sur quatre biomasses similaires, une seule est conservée).
- inter sites (les biomasses du site A2 homologues de celles du site A1 n'ont pas été choisies).

On notera également qu'aucune L.S.A. n'a été caractérisée au sein de ces biomasses.

Bien évidemment il a été tenu compte, lors de ce screening (tri), du suivi fermentaire et des résultats analytiques de la vinification des moûts de chaque site. Une étude ultérieure, spécifique des travaux de sélection entrepris, dévoilera la totalité des conditions qui ont permis de cibler les biomasses et la stratégie engagée.

**PHENOTYPE KILLER DANS LES MOUTS
DU CEPAGE VERMENTINU BLANC**

**PHENOTYPE KILLER DANS LES MOUTS
DU CEPAGE VERMENTINU BLANC**

I - MOTIVATIONS ET OBJECTIFS

BEVAN et MAKOVER en 1963 furent les premiers à constater que certaines souches de Saccharomyces cerevisiae pouvaient tuer d'autres levures de la même espèce. Ils supposèrent que ces levures "tueuses" ou "Killer" émettaient une toxine entraînant la mort des souches y étant sensibles et déterminèrent ainsi trois phénotypes pour un système "Killer".

- * Killer (K) : la souche produit la toxine et y est résistante.
- * Neutre (N): la souche ne produit pas la toxine et y est résistante.
- * Sensible (S): la souche ne produit pas la toxine et y est sensible.

Le facteur Killer revêt un caractère particulier en oenologie car il a été établi par BARRE en 1981 (19) qu'il intervient dans la concurrence entre les levures lors de la fermentation alcoolique.

L'intérêt de la recherche du phénotype Killer semble donc important pour la sélection d'une souche, dans la mesure où l'on veut implanter une levure donnée, dans un milieu où la flore indigène est constituée par plusieurs centaines de milliers de cellules par millilitre de moût. Ainsi, il paraît indispensable que la souche sélectionnée possède le caractère neutre sinon Killer.

Ce travail concerne la détermination du phénotype Killer des souches isolées à partir des biomasses levuriennes support de la caractérisation de la flore indigène. Ses objectifs sont :

- connaître le ou les phénotypes de la microflore fermentaire du Vermentinu des principales micro régions AOC Corses en 1991.
- éliminer les souches sensibles, s'il y en a, car elles ne présentent pas une caractéristique favorable en vue de leur sélection.

II - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES (20)

1 - THEORIE DE L'EFFET KILLER

On rencontre des souches Killer dans plusieurs genres de levures (Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Mansenula, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces et Torulopsis) et il y a indubitablement différents systèmes Killer. A l'heure actuelle on distingue deux groupes.

* Les "vrais Killer"

Ce sont les levures qui produisent les facteurs Killer létaux pour les cellules sensibles. Cette classe peut être divisée en "non Saccharomyces" et "Saccharomyces".

Ces souches ont été classées en groupes Killer (K1, K2,....., jusqu'à K10) sur la base de leurs réactions croisées, les unes sur les autres. Les souches "vrais Killer" Saccharomyces appartiennent aux groupes K1, K2 et K3. Les souches "vrais Killer" K4 à K10 sont des non Saccharomyces. Le système K1 a été le premier découvert, par la suite et jusqu'à maintenant ce fût le plus étudié. Ce sont les souches Killer K2 qui servent de référence partout dans les laboratoires.

* les facteurs Killer inhibiteurs de la croissance cellulaire

Ici le facteur Killer n'est pas capable de tuer d'autres levures mais simplement d'en empêcher la croissance.

Une seule souche de Kluyveromyces (IFO 1267) appartient à cette classe. Le facteur IFO 1267 est produit par de l'ADN plasmidique, les molécules actives sont des protéines de très haut poids moléculaire qui inhibent l'activité ATP-asique des membranes des cellules sensibles à ces toxines.

2 - GENETIQUE ET ACTIVITE DU SYSTEME KILLER K1

Le système Killer K1 serait sous le contrôle génétique de déterminants cytoplasmiques (les particules virales Scv1 et Scvm) et de gènes nucléaires. Ces particules virales (appelées mycovirus) sont entourées tel un virus, d'un polypeptide capsidique qui renferme un ARN bicaténaire. La taille de cet ARN permet de distinguer les deux types de particules, les Scv1 sont les plus grosses, les Scvm les plus petites.

L'ARN de Scvm code pour la toxine mais également pour une protéine ce qui rend les levures productrices du facteur K1 immunes vis à vis de leur propre toxine. Cette toxine est une glycoprotéine thermolabile et stable pour une température de 22°C. Son activité in vitro est comprise dans une zone de pH allant de 4,2 à 4,8. La régulation de la transcription de l'ARN de Scvm serait sous le contrôle de gènes nucléaires dit MAK (Maintenance of Killer) et de gènes dits "L" contenus dans les Scv1. Le gène codant pour l'expression de la toxine "Killer" K1 et la protéine de résistance est dit M. Les gènes "L" coderaient pour une ARN polymérase et un polypeptide capsidique permettant la réplication et l'encapsidation de l'ARN de Scvm. Les différents phénotypes sont conditionnés par la présence des gènes L et M :

- phénotype Killer : les souches possèdent L et M,
- phénotype Neutre: les souches possèdent L et M modifié qui code toujours pour la protéine de résistance et ne code plus pour la toxine,
- phénotype sensible : les souches possèdent L et non M.

L'activité du facteur Killer se manifeste par l'altération de l'intégrité des membranes cellulaires des souches sensibles. Il est également possible que dans certains cas il inhibe la synthèse des acides nucléiques.

Beaucoup de questions restent encore ouvertes sur la théorie, les mécanismes génétiques et les spectres d'activité des différents systèmes Killer.

III - PROTOCOLE EXPERIMENTAL (18)

Le mode opératoire se présente en 2 parties; dans un premier temps, il concerne l'obtention de souches pures à partir des biomasses prélevées lors de la caractérisation de la flore indigène. Par la suite, il donne la marche à suivre pour tester les levures selon leur phénotype Killer. Toutes les manipulations se font en atmosphère stérile près du bec Bunsen.

Un schéma récapitulatif de ces étapes peut être visualisé cidessous.

Le détail de ce protocole d'isolement et de purification des levures à partir des biomasses congelées est fourni en annexe 4.

FIGURE 2

Etapes de l'obtention de souches en culture pure, à partir des biomasses recueillies lors de la caractérisation de la microflore fermentaire du Vermentinu.

Boîte de pétriensemencées avec une biomasse diluée et incubée 48h à 28°C. Choix de 5 colonies .
Isolement : -étalement en stries d'une colonie, -incubation 48h à 28°C
Purification : (idem 2 ^{ème} étape mais incubation 72h à 28°C)
1ère multiplication des colonies purifiées dans 5 ml de milieu Y PD. Incubation: 48h à 28°C.
2ème multiplication des colonies purifiées dans 5 ml de milieu Y PD. Incubation 48h à 28°C.
Centrifugation 5 mn à 4.700 tr/mn Suspension dans 2 ml de milieu de conservation congélation.
Distribution dans cryotubes + Stockage par congélation à -80°C

La recherche des phénotypes Killer sensibles ou neutres s'effectue grâce à des expériences de réaction croisées entre les souches à tester et des souches de référence :

- la souche Killer K2 n°738 dans la collection de Mr BARRE,
- la souche sensible n°1006 dans la collection de Mr.BARRE.

Les 85 souches pures retenues dans les étapes précédentes ont été testées.

Le détail du protocole de détermination du caractère Killer est fourni en annexe 5.

IV - PRESENTATION DES RESULTATS

Le tableau 5 donne le détail des résultats des tests Killer des 85 souches issues des 17 biomasses choisies lors de la caractérisation de la flore indigène.

Tableau 5

Recensement des souches Killer isolées et purifiées des biomasses.

Dénomination de la biomasse		nombre de souches Killer	nombre de souches neutres
souches sensibles			
A14	4	1	0
A34	0	5	0
P14	3	2	0
P22	0	5	0
P24	3	2	0
P34	3	2	0
R11	2	3	0
R14	3	2	0
R24	5	0	0
O11	3	2	0
O14	5	0	0
O24	3	2	0
C14	1	4	0
V12	3	2	0
V14	1	4	0
S14	3	2	0
F14	5	0	0
TOTAL	47	38	0

Le tableau 4, page 22, donne la correspondance entre les biomasses citées ici et les stades fermentaires. En fonction de ceux ci, on peut également avoir une idée de l'évolution du pourcentage des souches présentant le phénotype Killer durant la fermentation.

Tableau 6**Pourcentage des souches présentant le phénotype Killer en fonction du stade fermentaire du moût de Vermentinu dont elles sont issues.**

	DEBUT DE FERMENTATION (STADE 1 OU 2)		FIN DE FERMENTATION (stade 4)	
	NOMBRE DE SOUCHES TESTEES	POURCENTAGE DE SOUCHES KILLER	NOMBRE DE SOUCHES TESTEES	POURCENTAGE DE SOUCHES KILLER
SITE P2	5	0%	5	60%
SITE R1	5	40%	5	60%
SITE O1	5	60%	5	100%
SITE V1	5	60%	5	20%
TOTAL	20	40%	20	60%

Commentaire : Sur les 13 biomasses issues de la fin de fermentation desquelles ont été isolées au total 65 souches (A14, A34, P14, P24, P34, R14, R24, O14, O24, V14, C14, S14, et F14). Le pourcentage de levures à phénotype Killer est de 60%.

* * *

V - DISCUSSION

Le résultat le plus flagrant est l'absence de levure présentant le phénotype sensible dans la microflore fermentaire spontanée du Vermentinu en 1991, et dans les conditions d'expérimentations choisies. Au niveau des travaux de sélection, ceci implique qu'aucune souche sur les 85 testées n'est éliminée pour la suite du programme. Au niveau écologique ce n'est que très peu surprenant dans la mesure où l'on sait qu'en zone méridionale la fréquence des souches sensibles est très faible, mais à notre connaissance l'absence totale des souches sensibles n'a pas encore été enregistrée ailleurs.

La microflore indigène est en majorité Killer avec 55,3% des souches étudiées. Ce résultats peut être considéré comme fiable dans la mesure où les biomasses, d'où sont isolés les individus testés, ont été choisies pour être les plus représentatives possibles de la population fermentaire. Ainsi les sites F1 et R2, qui étaient apparus complètement identiques lors de l'analyse du caryotype de leur biomasse (tableau 4, page 22), ont exactement, au niveau du stade 4 de leur fermentation, le même nombre de souches Killer.

Dans la population fermentaire des stades 1 ou 2, il y a généralement moins de souches à caractère Killer que dans le stade 4 (tableau 6, page précédente), restriction faite du site V1. Cette observation est quasi systématique, la fréquence des levures Killer est naturellement plus élevée en fin de fermentation (21). D'ailleurs, l'application concrète de ce phénomène est visualisée par l'augmentation du pourcentage de levures Killer sur l'ensemble des sites, dès que l'on ne tiend plus compte des souches issues des premiers stades fermentaires (le pourcentage passe alors de 55,3 à 60%).

* * *

VI - CONCLUSION

La nature de la microflore fermentaire et donc la prédominance ici du phénotype Killer sont étroitement liées aux conditions spécifiques d'un millésime donné. Il est donc tout à fait possible que ces résultats présentent des fluctuations d'une année sur l'autre. Cependant, en ce qui concerne la campagne de vendange 1991, on peut estimer que la procédure choisie pour la caractérisation de la flore indigène a préservé la situation fermentaire réelle du Vermentinu.

Celui ci serait donc essentiellement vinifié de façon spontanée par des levures de l'espèce Saccharomyces cerevisiae et du genre Kloeckera ou Hanseniaspora. Sur l'ensemble des sites étudiés, et dans les conditions d'expérimentations choisies, aucune de ces souches ne présente le phénotype sensible mais sont majoritairement de type Killer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 **POULARD P., DANIEL P. et COARER M., 1991.**
Communication personnelle.

- 2 **RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBEREAU-GAYON P. et SUDRAUD P.,** 1975. Sciences et techniques du vin, DUNOD. Tome II, **5**, 206-228.
- 3 **FATCHIENTI F.,** 1969. I Lieviti della fermentazione vinaria del moscato e del vermentino di gallura, Annali della facolta di agraria, vol 17, fasc.1.
- 4 **CIVAM de la Région CORSE,**1988. Essais de vinification 1986/1987-vins blancs, **9**, 71.
- 5 **POULARD A. et Daniel P.,** 1989. Nouvelles techniques fines de caractérisation des souches de levures en oenologie, Vignes et Vins spécial sitevi, 71-73.
- 6 **BLONDIN B. et VEZINHET F.,**1988. Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus en electrophorèse en champ pulsé. R. F. OE., **115**, 7-11.
- 7 **FREZIER V., DESPAGNE F. ET DUBOURDIEU D.,** 1989. Application de l'électrophorèse en champ pulsé à l'étude de l'écologie des levures en fermentation spontanée, Rapport des activités de recherches 1988-1990,Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II, 43-46.
- 8 **POULARD P., DANIEL P. et COARER M.,** 1989, Utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé pour le contrôle d'efficacité du levurage., Compte rendu, I.T.V oenologie 1989, 129-130.
- 9 **LARPENT J.P.,** 1991 Biotechnologie des levures. Masson. Paris.
- 10 **GENTY. F.,** 1985. Identification et sélection de levures en oenologie (application à la réduction du taux de SO₂); DUT Biologie Appliquée; Université de Tours.
- 11 **KREGER-VAN-RIJ N.J.W.,** 1984. The yeast a tascomic study. Elsevier science publishers. B.V.Amsterdam.
- 12 **DELTEIL D. ,** 1990. Le levurage en oenologie. Cevilar
- 13 **TAILLANDIER P.,** 1990. Désacidification des moûts par Schizosaccharomyces. Analyse cinétique et métabolique., R.F.OE., **126**,29-33.
- 14 **CUINIER C.,** 1988. Mise en oeuvre des levures sèches actives, intérêt et perspectives, I.T.V. Tours., 1-30.
- 15 **BOUIX M., LEVEAU J.Y et CUINIER C. ,** 1981. Reconnaissance de souches de levures de même espèce ; Colloque soc. Fr. Microbiologie, Reims, 235-249.
- 16 **HALLET J.N., CRANEGUY B., ZUCCA J. et POULARD A.,** 1988, Caractérisation de différentes souches industrielles de levures oenologiques par les profils de restriction de leur ADN MITOCHONDRIAL; Progrès agricole et viticole, **105**, 13-14,328-333.
- 17 **COARER M., POULARD A. et DANIEL P. ,** 1990. Caractérisation des genres et espèces de levures oenologiques par la méthode des caryotypes en champ pulsé, Compte rendu I.T.V oenologie 1990; 165-166.
- 18 **CUINIER C. , GUYOT F. , POULARD A. et COARER M. ,** 1991. Communication personnelle.

- 19** **BARRE P.** , 1981. Intervention du mécanisme "Killer" dans la concurrence entre les souches de levures en oenologie. Colloque SOC. Fr. Microbiologie. ,Reims, 109-124.
- 20** **YOUNG TW.**, 1989. Aspects fondamentaux du phénomène Killer.,Résumé de la présentation donnée aux "rencontres oenologiques LALVIN" TOULOUSE, R.F. OE., **121**,27-28.
- 21** **CUINIER C. et POUPAULT P** ., 1991. Répartition du phénotype Killer dans les moûts de Chenin en Tourraine, Compte rendu I.T.V 1991, 155-156.

ANNEXES**ANNEXES****ANNEXE N°1****SUIVI ANALYTIQUE DU PRELEVEMENT A1**

* Date prélèvement11/10/91, débouillage 18 heures à 18°C jusqu'au 12/10/91.

* Circuit du moûtconquet + foulo pompe + tuyaux + pressoir + cuve ciment affranchi.

- * Lot de vendange.....3ème.
- * Etat vendange5% pourriture.
- * Sulfitage7g/hl par le CIVAM lors de la collecte
- * Enzymage.....non
- * Caractéristiques du moût après débouillage :12/10/91

degré probable au refractomètre = 10,6
 AT = 5,95 g/l
 pH = 3,1 à 22,2°C
 SO₂T = 7,04 g/hl
 d = 1082 à 19°C
Corrections : chaptalisation à 12 degrés.

- * Suivi de la fermentation : Aucun arrêt.

14/10/91 : d = 1087 à 19°C, prélèvement stade 1 biomasse,
 16/10/91 : d = 1048 à 20°C, aération + prélèvement stade 2 biomasse,
 17/10/91 : d = 1035 à 20°C, prélèvement stade 3 biomasse,
 20/10/91 : d = 1010 à 19°C, sortie à température ambiante,
 22/10/91 : d = 1000 à 18°C, sucres = 14,5 g/l,
 24/10/91 : d = 995 à 19°C, sucres = 6,3 g/l. ,
 25/10/91 : d = 994 à 18°C, sucres = 3,69 g/l, AVB = 0,28,
 28/10/91 : d = 991 à 19°C, sucres = 1,63 g/l, prélèvement stade 4

biomasse,

- * Caractéristiques du vin après FA :

% volumique = 12,9	SO ₂ l = 6,4 mg/l	<u>Traitement</u>
4g/hl,		Soutirage, ajustement en SO ₂ à
AT = 5,58	SO ₂ T = 64 mg/l	ouillage, stockage
pH = 3,19 à 20,5°C		
AVB = 0,28		
AVC = 0,206		

AVBacidité volatile brute
 AVCacidité volatile corrigée
 FA.....fermentation alcoolique
 ddensité
 SO₂ l ...anhydride sulfureux libre

ANNEXE N°3

COMPOSITION DU MILIEU
DE CONSERVATION CONGELATION

CONSTITUANTS VENDEUR		REFERENCE	POIDS OU
VOLUME			
Yeast extract	OSI	A5O 112705	10g
Peptone indole free	PROLABO	262082920g	
D glucose	PROLABO	24370	20g
Glycérol	PROLABO	24388	250ml
H ₂ O			Réajuster à 1 litre

Autoclave : 20mm à 120°C

ANNEXE N°4

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES LEVURES A PARTIR DES BIOMASSES CONGELEES

Le but de cette manipulation est d'individualiser les souches différentes, contenues dans le mélange levurien, que constituent les biomasses recueillies. On doit obtenir des cellules en culture pure qui seront conservées en cryotubes à -80°C.

a) Dilution et ensemencement des biomasses sur boîtes de pétri (BP)

Les biomasses stockées dans les cryotubes sont décongelées sans choc thermique et diluées en cascade dans 9ml d'eau distillée (stérilisée par passage à l'autoclave 30mn à 120°C) jusqu'à obtention de la dilution 10^{-6} . 0,5ml des suspensions 10^{-6} à 10^{-8} sont étalées sur BP contenant le milieu YM gélifié (Yeast extract-Malt-AGAR) acidifié avec une solution d'acide tartrique. Les 17 biomasses furent diluées et ensemencées, puis incubées 48h à 28°C.

b) Isolement des colonies levuriennes

A partir des BP de l'étape a), qui contiennent entre 10 et 100 colonies bien différenciées, on prélève à l'anse de platine une colonie que l'on repique en stries serrées selon la méthode des quadrants sur une BP contenant également le milieu YM gélifié acidifié. On incube 48h à 28°C. Cette manipulation est effectuée pour 5 colonies de la même biomasse.

c) Multiplication des colonies purifiées

Le délai de culture observé, on prélève une colonie bien différenciée dont on note la description (aspect, forme, couleur) que l'on ensemence dans un tube de 5 ml de milieu YPD (Yeast extract, Dextrose, Peptone). On incube 48h à 28°C.

La durée d'incubation acquise, on homogénéise au Top Mix la culture levurienne contenue dans le tube d'YPD et on en distribue une goutte (à l'aide d'une pipette Pasteur) dans 6 tubes d'YPD à nouveau.

d) Centrifugation des cultures et conservation par congélation des souches pures

Dans chaque tube d'YPD, la culture levurienne est remise en suspension par homogénéisation au Top Mix. Les 5 ml de milieu sont centrifugés 5 mn à 4700 tr/mm. (Voir référence centrifugeuse page 20). Le culot est récupéré et suspendu dans 2 ml de milieu de conservation congélation. Le protocole suivi pour obtenir une souche pure dans un cryotube à -80°C est le même que celui préconisé pour les biomasses pages 20 et 21.

Cette technique permet d'obtenir 10 cryotubes de la même souche pure, au total, 85 souches ont été récupérées.

COMPOSITION DU MILIEU YM GELOSE

CONSTITUANTS	VENDEUR	REFERENCES	POIDS OU VOLUME
YM selon WICKERAMM	OSI	071201841g	
Agar granulé	BIOMERIEUX	53041	10g
H ₂ O		Ajuster à 1 litre	

Autoclave : 15mm à 120°C

COMPOSITION DE LA SOLUTION D'ACIDE TARTIQUE

CONSTITUANTS	VENDEUR	REFERENCES	POIDS OU VOLUME
Acide Tartique	PROLABO	20718290	100g
H ₂ O		Ajuster à 1 litre	

Autoclave : 20mm à 120°C

COMPOSITION DU MILIEU YPD

CONSTITUANTS	VENDEUR	REFERENCES	POIDS OU VOLUME
Yeast Extract	OSI	ASO112705	10g
Peptone Indole free	PROLABO	262082910g	
D glucose	PROLABO	24370	20g
H ₂ O		Ajuster à 1 litre	

Autoclave : 20mm à 120°C. Tubes bouchés coton.

ANNEXE N°5

DETERMINATION DU CARACTERE KILLER
--

a) Réactivation des souches de référence et des souches à tester

Les souches de référence et les souches à tester stockées dans des cryotubes à -80°C sont décongelées sans choc thermique. 0,3 ml de la suspension levurienne sont étalés sur une BP contenant le milieu YM gélosé acidifié. On incube 48h à 28°C.

b) Multiplication des souches sur extrait de Malt gélosé

La culture précédente est ensemencée en bandes puis en stries dans un tube de milieu Malt gélosé incliné. On incube 72h à 28°C.

c) Préparation des souches à tester et des souches de référence en vue de l'obtention de tapis levurien ou de stries de culture

Chaque souche à tester de la culture précédente est repiquée sur 1 tube d'YM gélosé pH 5,4 et 1 tube d'YM liquide pH 5,4.

La souche de référence Killer (738) est repiquée sur un tube d'YM gélosé pH 5,4.

La souche de référence sensible (1006) est repiquée sur un tube d'YM liquide pH 5,4.

On incube 24 h à 28°C.

d) Constitution de tapis levurien

Les cultures sur milieu YM liquide pH 5,4 des souches à tester d'une part, et de la souche de référence sensible (L1006) d'autre part, sont diluées 10 fois dans de l'eau distillée stérile.

0,15 ml de la suspension diluée est encemencé dans la masse d'un milieu YM gélosé pH 4,2 dans une BP. Le pH est déterminant pour un spectre d'activité maximum de la toxine Killer.

e) Constitution de stries de culture

Les cultures des souches à tester d'une part et de la souche de référence Killer (L738) sur milieu YM gélosé pH 5,4 d'autre part, sont encemencées par stries sur les tapis levuriens obtenus à l'étape d). La souche de référence Killer (L738) est déposée en stries sur le tapis levurien des souches à tester. Les souches à tester sont déposées en stries sur le tapis levurien de la souche de référence sensible (L1006). On incube 48h à 20°C.

f) Lectures

Autour de l'étalement en stries on détecte la présence ou non d'une zone d'inhibition. Cette technique a été proposée par BARRE, voici pour 3 souches ABC le modèle de détermination du caractère Killer.

* Souche A : Pas d'inhibition vis à vis de la souche L 1006. Pas sensible à la souche L 738 = phénotype neutre.

* Souche B : Inhibe la souche L 1006. Pas sensible à la souche L 738 = phénotype Killer.

* Souche C : Pas d'inhibition vis à vis de la souche L 1006. Sensible à la souche L 738 = phénotype sensible.

ETAPES DE LA DETERMINATION DU CARACTERE KILLER

- 1 Réactivation des souches de référence (L 1006 + L 738)
Réactivation des souches à tester 48h à 28°C.
- 2 Multipliation des souches sur extrait de malt gelosé (72h à 28°C)
- 3 Repiquage
 - . Souches à tester + L 738 sur YM gelosé pH 5,4
 - . Souches à tester + L 1006 sur YM liquide pH 5,4 (24h à 28°C).
- 4 Dilution
 - . Souches à tester + L 1006 au 1 / 10 (à partir YM liquide)
- 5 Constitution de tapis
 - . Souches à tester + L 1006 sur YM gelosé pH 4,2
- 6 Ensemencement par stries
 - . L 738 sur tapis souches à tester (48h à 28°C)
 - . Souches à tester sur tapis L 1006
- 7 Lectures

COMPOSITION DU MILIEU AU MALT GELOSE

CONSTITUANTS	VENDEUR	REFERENCES	POIDS OU VOLUME
Cristomalt	DIFAL 3262	20g	
Agar	BIOMERIEUX	53041	15g
H ₂ O		Ajuster à 1 litre	

Autoclave : 20 mn à 120°C suivi d'une filtration sur papier puis d'un deuxième autoclavage 45 minutes à 115°C.
 Les tubes sont bouchés coton et inclinés dès leur sortie de l'autoclave.

COMPOSITION DU MILIEU YM GELOSE, pH 5,4.

CONSTITUANTS	VENDEUR	REFERENCES	POIDS OU VOLUME
YM selon	Wickeram	OSI 071201841g	
AGAR	BIOMERIEUX	5304	10g
H ₂ O		Ajuster à 1 litre	
HCL deci	Molaire	quelques gouttes jusqu'à pH = 5,4	

Autoclave : 15mn à 120°C.
 Les tubes sont bouchés coton et inclinés dès leur sortie de l'autoclave.

COMPOSITION DU MILIEU YM GELOSE, pH 5,4.

Mêmes constituants et même protocole que le milieu YM pH 5,4 mais on règle le pH à 4,2 avec de l'acide citrique à 300 g/l.

Autoclave : 15mm à 105°C.

COMPOSITION DU MILIEU YM LIQUIDE, pH 5,4

CONSTITUANTS		VENDEUR	REFERENCES	POIDS OU VOLUME
Yeast extract	OSI	012705	3g	
Peptone indole free	PROLABO	26208295g		
D glucose	PROLABO	24370	10g	
Malt. Extract	OSI	01860153g		
H ₂ O			ajuster à 1 litre	
HCl			quelques gouttes jusqu'à	
			pH 5,4	

Autoclave : 20mm à 120°C.
