

GRAND PRIX 2012

Guillaume Antalick

Bilan biochimique et
sensoriel des modifications
de la note fruitée des
vins rouges lors de la
fermentation malolactique

Rôle particulier des esters

PREFACE

Le Groupe Amorim, né du liège en 1870 au Portugal, a fondé les bases de son développement sur cette extraordinaire matière première, à travers la production de cet humble mais inséparable compagnon du Vin : le bouchon de liège.

Notre volonté de servir la cause du vin s'est toujours exprimée dans la recherche technologique sur la filière liège, base de notre activité.

En 1992, nous avons souhaité aller plus loin et nous engager davantage aux côtés des chercheurs en œnologie en créant l'Académie Amorim, un lieu de rencontre et d'échange entre œnologues, ingénieurs, professeurs, sommeliers, auteurs, artistes... tous animés d'une même passion du Vin.

Chaque année, notre Académie encourage et soutient la recherche en œnologie par la remise d'un Prix à un chercheur ou à une équipe de chercheurs ayant fait paraître des travaux significatifs qui concourent à la défense et à la promotion de la qualité du Vin. Que soient ici saluées les personnalités, membres de cette Académie, qui contribuent si généreusement à cette mission. Je formule le vœux que cette collection, dédiée aux Lauréats du Grand Prix de l'Académie, devienne, au fil des ans, une référence et la mémoire vivante des efforts et des travaux engagés dans le monde entier pour servir la noble cause du Vin.

Americo Ferreira de AMORIM

Président du Groupe Amorim

Grand Prix 2011 – Axel MARCHAL
Recherches sur les bases moléculaires de la saveur sucrée des vins secs

Grand Prix 2010 – Caroline LE GOFFIC
La protection des indications géographiques en France, dans la Communauté européenne et aux Etats-Unis

Grand Prix 2009 - Katharina ZOTT
Les levures non-Saccharomyces : dynamique, caractérisation et interaction avec Saccharomyces durant les étapes pré-fermentaires et la fermentation alcoolique

Grand Prix 2008 – Elise SARRAZIN
Recherches sur l'arôme des vins liquoreux de pourriture noble issus des cépages Sémillon et Sauvignon blanc
Caractérisation de composés clés et étude de leur genèse

Grand Prix 2007 – Alexandre PONS
Recherche sur l'arôme de vieillissement prématuré des vins blancs secs

Grand Prix 2006 - Paulo LOPEZ
Etude des phénomènes oxydatifs pendant le vieillissement des vins en bouteille. Rôle de l'obturateur

Grand Prix 2005 - Stéphane LA GUERCHE
Les défauts moisis terreux des vins : la géosmine identifiée comme principale responsable

Grand Prix 2004 - Michael JOURDES
Réactivité, synthèse, couleur et activité biologique d'Ellagitannins C-Glycosidique et Flavano-Ellagi tannins

Grand Prix 2003 Dominique ROUJOU DE BOUBEE
Recherches sur la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine dans les raisins et dans les vins

Grand Prix 2002 - Catherine PEYROT DES GACHONS
Recherches sur le potentiel aromatique des raisins de Vitis vinifera L.cv Sauvignon

Grand Prix 2001 - René SIRET
Etude du polymorphisme génétique de la vigne cultivée (Vitis vinifera L.) à l'aide de marqueurs microsatellites : application à la caractérisation des cépages dans les vins

Grand Prix 2000 - Takatoshi TOMINAGA
Recherches sur l'arôme variétal des vins de Vitis vinifera L. cv. sauvignon blanc et sa genèse à partir de précurseurs inodores du raisin

Grand Prix 1999 - Isabelle CUTZACH-BILLARD
Etude sur l'arôme des vins doux naturels non muscatés au cours de leur élevage et de leur vieillissement. Son origine. Sa formation

Grand Prix 1998 - Virginie MOINE-LEDOUX
Recherches sur le rôle des Mannoprotéines de levure vis à vis de la stabilité protéique et tartrique des vins

Grand Prix 1997 - Valérie LAVIGNE-CRUEGE
Recherche sur les composés soufrés formés par la levure au cours de la vinification et l'élevage des vins blancs secs

Grand Prix 1996 - Sylvie BIAU
Etude de la matière colorante des vins blancs de Bordeaux

Grand Prix 1995 - Samuel LUBBERS
Etude des interactions entre les macromolécules d'origine levurienne du vin et les composés d'arôme

Grand Prix 1994 - Ziya GÜNATA
Etude et exploitation par voie enzymatique des précurseurs d'arôme du raisin, de nature glycosidique

Grand Prix 1993 - Pierre-Louis TEISSEDRE
Le plomb, du raisin au vin

Grand Prix 1992 - Pascal CHATONNET
Incidence du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins, applications technologiques

« Comme ce vin est fruité ! » Voilà une petite phrase qui accompagne souvent la mine réjouie du dégustateur. L'arôme fruité, marqueur de la qualité des vins, est aujourd'hui devenu un enjeu commercial pour le producteur dans un contexte concurrentiel fort marqué par une demande croissante des consommateurs pour des vins fruités.

Si l'influence de la fermentation malolactique sur le profil aromatique des vins est bien documentée, l'impact des bactéries lactiques sur le l'arôme fruité des vins rouges est beaucoup plus controversé. Pour faire la lumière sur cette question et aboutir à un consensus, notre lauréat a développé quatre méthodes d'analyse complétées par un bilan sensoriel : de tous les marqueurs aromatiques suivis, les esters représentent la famille de composés la plus impliquée dans les modifications de l'arôme fruité au cours de la fermentation malolactique. Un bilan analytique de l'impact de la fermentation malolactique sur 70 marqueurs aromatiques réalisé sur une cinquantaine de vins rouges, dans des conditions de vinification différentes, a permis la mise en évidence de nouvelles données sur le métabolisme des esters chez les bactéries lactiques du vin.

Bravo à Guillaume Antalick : ses travaux apportent un éclairage inédit sur la problématique des modifications bactériennes de l'arôme fruité des vins en soulignant notamment le rôle clé des interactions entre levures et bactéries dans ces modifications aromatiques.

Voilà que s'ouvrent de nouvelles perspectives, qui, nous l'espérons, pourront trouver une application pratique dans la filière vitivinicole.... Sans doute cela fera-t-il l'objet d'une prochaine étude !

Robert Tinlot

Président de l'Académie Amorim

Bilan biochimique et sensoriel des modifications de la note fruitée des vins rouges lors de la fermentation malolactique

Rôle particulier des esters

Guillaume ANTALICK

THÈSE pour le doctorat en science de l'Université Bordeaux Ségalen
Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2010

DIRECTEUR DE THÈSE

Monsieur **Gilles de Revel**
Professeur de l'Université Bordeaux Ségalen

MEMBRES DU JURY

Madame **Aline LONVAUD** (Présidente)
Professeur de l'Université Bordeaux Ségalen

Monsieur **Alain RAZUNGLES** (Rapporteur)
Professeur de l'école Montpellier SUPAGRO

Monsieur **Henry-Eric SPINNLER** (Rapporteur)
Professeur de l'école AgroParisTech

Monsieur **Serge HAUTIER** (Examinateur)
Professeur de l'école d'ingénieur de CHANGINS

INTRODUCTION

La préservation de l'arôme fruité des vins est devenue aujourd'hui un enjeu majeur pour la qualité des vins et leur acceptation par les consommateurs. Son expression est façonnée au cours du procédé de vinification par l'activité des levures et celle des bactéries lactiques (BL), principaux microorganismes du vin.

Si la littérature est riche en données portant sur la modulation de la note fruitée des vins au cours de la fermentation alcoolique (FA) menée par les levures, elle est en revanche beaucoup moins documentée et surtout bien plus controversée lorsqu'il s'agit de la fermentation malolactique (FML), assurée par les BL, étape essentielle dans l'élaboration des vins rouges.

La FML permet non seulement un assouplissement du vin en abaissant l'acidité par transformation de l'acide malique en acide lactique, mais elle modifie également significativement la composition des vins et donc son profil aromatique¹. Empiriquement, la FML est souvent associée à une diminution de la note fruitée, dont le développement de la note lactique en serait la cause principale par un effet de «masque» aromatique. Cependant, la littérature est beaucoup moins catégorique et les BL pourraient être capables soit de diminuer, soit d'augmenter l'intensité du caractère fruité des vins rouges².

L'absence de données fondamentales sur les marqueurs de l'arôme des vins rouges est sans doute une raison majeure de cette difficulté de consensus. De même, il existe très peu de données sur les métabolismes des BL pouvant être impliqués dans ces variations. Enfin, le manque d'études biochimiques, analytiques et sensorielles concomitantes pour aborder ce sujet empêche d'enrichir le débat sur cette question. Toutes ces divergences montrent la complexité du problème et la nécessité de travaux supplémentaires.

Pour tenter de progresser sur ces questions œnologiques importantes, il a été choisi d'établir un bilan analytique et sensoriel de l'impact de l'activité des BL sur la composition en marqueurs aromatiques potentiellement impliqués dans la perception de la note fruitée des vins rouges.

Devant la multitude des paramètres œnologiques pouvant influencer l'arôme des vins et dans le but de mettre en évidence des tendances pertinentes, il s'est avéré indispensable de varier autant que possible les conditions expérimentales des vins étudiés. Ainsi, quarante-huit vins rouges (**Tableau 1**) avec FML réalisée en chais ou laboratoire (micro-vinification) ont été prélevés avant et après FML pour étudier les modifications bactériennes de 70 marqueurs aromatiques. Un tel travail a été rendu possible notamment grâce au développement de 4 méthodes d'analyses performantes et facilement automatisables. Dans certains cas le bilan analytique a été complété par un bilan sensoriel grâce à l'établissement de profils aromatiques comparés.

Après avoir vérifié la pertinence de l'existence d'un masque lactique sur l'arôme fruité des vins rouges, le bilan analytique a permis de mettre en évidence certaines familles de composés aromatiques plus impliqués dans les modulations bactériennes de ce caractère fruité des vins rouges. Ainsi le rôle central des esters dans ces modifications aromatiques a pu être révélé tout comme de nouvelles hypothèses sur le métabolisme de ces composés chez les bactéries lactiques du vin. Enfin l'importance des interactions levures/bactéries a pu être mise en évidence notamment grâce à l'étude de l'influence de la co-inoculation levures/BL sur le profil biochimique et aromatique des vins rouges.

Tableau 1 : caractéristiques des vins étudiés

Vins	Origines	Cépages	Millésime	Couples levures/BL	Moment d'inoculation avec les BL
M1a	Suisse	Merlot	2008	U/F	24h après les levures
M1b	Suisse	Merlot	2008	U/F+P1+P2	24h après les levures
PN	Allemagne	Pinot Noir	2008	V/G	24h après les levures
M2	Bordeaux	Merlot	2009	W/F	2/3 FA

I. Modification bactérienne du profil aromatique des vins rouges

L'établissement de profils comparés réalisés sur 7 vins prélevés avant et après FML (5 avec FML « labo » et 2 avec FML « chai ») sur des descripteurs simples (fruité, lactique, fumé/grillé, végétal) et de façon orthonasale (uniquement au nez), a permis d'évaluer les modifications aromatiques engendrées par la FML. Le panel était constitué de 11 à 16 dégustateurs, selon les sessions, venant de la Faculté d'œnologie et familiers à l'évaluation sensorielle.

Dans un premier temps, il a été montré que le caractère fruité est la note aromatique qui varie le plus au cours de la FML (**Figure 1**). Contrairement aux idées reçues, l'activité des BL ne diminue pas systématiquement l'arôme fruité des vins rouges. Il existe une grande variabilité dans l'impact des BL sur ce caractère aromatique. L'intensité de la note fruitée peut être soit diminuée, soit augmentée et même, ne pas être affectée par la FML. Cette réalité contraire aux discours généralistes, caractérise l'absence de consensus trouvée dans la littérature.

L'impact d'un masque lactique n'a pas été démontré et de façon surprenante cette note aromatique connue pour caractériser la FML, n'a finalement été que très peu affectée par l'activité des BL (**Figure 1**). La production de diacétyl, en grande partie issu du catabolisme bactérien de l'acide citrique et principal responsable de la note beurrée des vins, n'est pas remise en cause. Les variations mesurées pour ce composé sont en effet confirmées (4 mg/L en moyenne)³.

En revanche, très peu de liens ont pu être établis dans nos conditions entre la synthèse bactérienne du diacétyle et l'apparition de la note lactique. La principale cause de cette absence de corrélation a été attribuée à la difficulté de percevoir précocement le diacétyle dans les vins rouges très jeunes. Ce composé est alors en grande majorité complexé de façon réversible par le SO_2 ⁴. Une évaluation plus tardive pourrait permettre de mieux juger l'impact d'un éventuel masque lactique sur l'arôme fruité des vins rouges. Par ailleurs ce constat confirme les observations empiriques faites sur les vins dits « sans soufre » qui ont très souvent un caractère lactique plus précocement marqué que les vins traditionnels.

Cette note lactique n'est donc finalement que très peu impliquée dans les modulations de l'arôme fruité des vins rouges très jeunes. En revanche, un autre effet de masque a été mis en évidence. Quand elle est présente après FML, la note « fumé/grillé » masque clairement la note fruitée des vins rouges. Des vins, dont la teneur en marqueurs fruités augmente au cours de la FML, sont perçus significativement moins fruités suite au développement de cette note aromatique particulière. L'apparition de notes « fumé/grillé » au cours de la FML a déjà été observée, notamment dans les vins de Merlot⁵. Cependant, c'est la première fois qu'un tel effet de masque est aussi clairement évoqué. Malgré la difficulté de consensus sur cette note aromatique, un effet de réduction apporté par la FML et confirmé par les études récentes, pourrait en être la cause^{6,7}. Mais les composés soufrés volatiles recherchés n'ont pas permis d'identifier les marqueurs moléculaires. Des études complémentaires pourraient préciser la réalité de cette note qualifiée dans ce travail de « fumé/grillé ». Enfin, la diminution du caractère végétal observée confirme certaines données déjà connues^{2,8}. Toutefois, les variations d'intensité restent faibles et aucun lien avec la note fruitée n'a pu être établi.

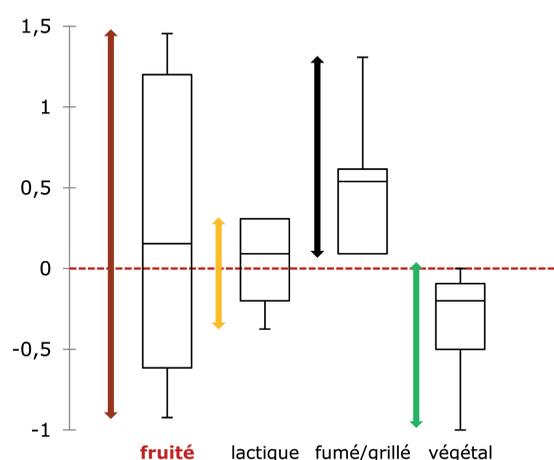


Figure 1 : Représentation des variations de l'intensité des notes aromatiques au cours de la FML évaluées par le panel (n = 7)

II. Effet de l'activité des BL sur la composition des vins rouges en marqueurs de l'arôme fruité

Les effets de masque aromatique sont loin d'expliquer toutes les variations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML. L'implication de la dégradation ou de la synthèse de marqueurs de l'arôme fruité par les BL est donc très probable.

A ce jour, contrairement aux cépages blancs dits "aromatiques", aucune expression variétale fruitée n'a véritablement pu être mise en évidence à partir de cépages noirs. L'existence même d'une expression fruitée propre aux vins rouges n'a été montrée que récemment par l'intermédiaire de dégustations affranchies de toute subjectivité liée à la couleur des vins⁹. Pendant des années, de nombreux travaux ont essayé de mettre en évidence l'existence de molécules aromatiques "clés" pouvant être responsables de la typicité de la note fruitée des vins rouges, sans grand succès. Il n'est pas exclu que ce type de marqueur puisse effectivement être présent dans les vins rouges. Cependant, plusieurs travaux récents convergent vers le constat que l'arôme fruité des vins rouges serait en grande partie le reflet d'interactions perceptives entre différents composés aromatiques du vin, même présents à des teneurs largement inférieures à leur seuil de perception^{9,10}.

Ainsi, nous avons tenté d'évaluer de la façon la plus exhaustive possible l'impact de l'activité des BL sur la composition des vins rouges en ces métabolites impliqués dans la perception de l'arôme fruité. Certains de ces composés sont plutôt d'origine variétale comme les C13-norisoprenoïdes, les lactones et le 3-sulfanylhexanol, d'autres plutôt fermentaire comme d'autres composés soufrés ainsi que les esters qui semblent jouer un rôle central dans ces interactions perceptives.

I-Incidence sur la composition en certains aglycones et en lactones

Certains composés aromatiques d'origine variétale dérivés de glycosides sont impliqués dans les effets synergiques à la base de la perception de l'arôme fruité des vins rouges^{10,11}. Initialement présents sous forme de précurseurs inodores, ils sont libérés majoritairement au cours du processus fermentaire par l'activité β -glycosidase des levures. Les bactéries lactiques possèdent elles aussi ce genre d'activité enzymatique et nous avons voulu vérifier si elles pouvaient aussi induire une libération de ces composés.

C'est notamment le cas de certains C13-norisoprenoïdes comme le β -damascénone, la β -ionone et l' α -ionone. Le linalol dérive également de tels précurseurs et si son implication dans l'arôme fruité des vins rouges est d'un intérêt mineur, sa quantification reste toutefois intéressante car il s'agit d'un bon modèle pour l'étude des activités β -glycosidases des microorganismes du vin. L'origine des γ -lactones et des δ -lactones semble également être variétale mais leur voie de libération dans les vins est beaucoup moins connue. Six lactones ont ainsi été suivies (γ -octalactone, γ -nonalactone, γ -decalactone, γ -undecalactone, γ -dodecalactone, δ -decalactone).

Le linalol a été analysé par extraction liquide-liquide (liq/liq) au dichlorométhane couplée à la GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) tandis que les C13-norisoprenoïdes et les lactones ont été quantifiés par SBSE-GC/MS (Stir Bar Sorptive Extraction-GC/MS). Les deux méthodes ont été développées et validées au cours de ces travaux.

La quantification de ces marqueurs aromatiques montre que finalement les activités β -glycosidases sont peu impliquées dans les variations bactériennes de l'arôme fruité des vins rouges. Seule une libération significative (Test Student : $p < 0.05$) du linalol est mise en évidence et confirme la présence d'activités β -glycosidases chez les BL du vin. Mais les cépages noirs bordelais étant pauvres en précurseurs de terpénols, la teneur en linalol libérée au cours de la FML est généralement trop faible pour influencer l'arôme des vins de Merlot et de Cabernet-Sauvignon (**Tableau 2**).

Les C13-norisoprenoïdes ne sont que peu affectés par la FML et les niveaux de variations mesurés (**Tableau 2**) semblent trop faibles pour avoir un impact réel sur l'arôme des vins rouges¹². La capacité des BL du vin à hydrolyser les précurseurs glycosylés des C13-norisoprenoïdes est connue dans la littérature¹³. L'absence de variations constatée dans notre étude pourrait venir de phénomènes d'adsorption causés par des polysaccharides produits par les BL¹³. En outre, une compétition entre activité glycosidase libératrice et activité réductase réductrice de ces composés carbonylés ne peut être exclue, même si la spécificité des activités réductases bactériennes envers les C13-norisoprenoïdes n'a jamais encore été montrée. De même une possibilité d'interactions physico-chimiques avec le SO_2 comme pour le diacétyle ne peut être écartée¹⁴.

Les bactéries lactiques semblent également avoir peu d'influence sur la composition des vins rouges en lactones participant à l'arôme fruité (**Tableau 2**). Au regard du seuil de perception de la γ -nonalactone ($30 \mu\text{g/L}$)¹⁵, principale lactone impliquée dans l'arôme fruité des vins, cette famille de molécules ne semble pas participer à la modification de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML.

Cependant, ces lactones présentent une certaine tendance à se former au cours du vieillissement du vin probablement par lactonisation d'acides gras ou d'esters d'acides gras hydroxylés¹⁶. Ces précurseurs pourraient être libérés par les bactéries lactiques soit par activité β -glycosidase à partir de glycosides¹⁷ soit par activité oxydase à partir d'acides gras insaturés¹⁸. Ces précurseurs n'ont pas pu être directement quantifiés au cours de ces travaux mais une synthèse significative ($p < 0.001$) d'esters éthyliques d'acides gras hydroxylés (6-hydroxyhexanoate et 3-hydroxyhexanoate d'éthyle) a pu être mesurée.

Ces observations vont dans le sens de l'existence potentielle d'une capacité bactérienne à produire des précurseurs de lactones. Si tel était le cas, la FML pourrait alors contribuer au développement plus tardif de certaines notes fruitées des vins rouges en favorisant la synthèse de lactones au cours du vieillissement. Cependant, seule une étude complémentaire spécifique aux précurseurs de ces lactones pourra le confirmer.

Tableau 2 : Concentrations moyennes (μ g/L) des vins avant et après FML en linalol, C13-norisoprenoides et lactones (Ecart-types) et distribution des variations de concentrations mesurées au cours de la FML (μ g/L) (n = 36).

Composés	Concentration moyenne après FA	Concentration moyenne après FML	Variation minimum	1 ^{er} quartile des variations	Variation médiane	3 ^{ème} quartile des variations	Variation maximale
Linalol	4,8 ± 2,5	6,3 ± 4,4	-0,9	0,2	0,5	1,1	10,9
β -damascénone	1,99 ± 0,68	1,87 ± 0,63	-0,76	-0,17	-0,07	0,006	0,28
β -ionone	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	-0,03	-0,007	-0,004	0,000	0,011
α -ionone	0,101 ± 0,05	0,092 ± 0,04	-0,110	-0,024	-0,005	0,012	0,049
γ -octalactone	1,3 ± 0,50	1,3 ± 0,57	-0,51	-0,049	0,02	0,093	0,846
γ -nonalactone	11,4 ± 7,08	11,4 ± 7,01	-2,03	-0,44	-0,11	0,32	2,29
γ -déalactone	0,82 ± 0,29	0,82 ± 0,31	-0,2	-0,07	-0,01	0,04	0,78
γ -undéalactone	0,11 ± 0,05	0,10 ± 0,03	-0,08	-0,01	0	0,01	0,03
γ -dodéalactone	0,12 ± 0,04	0,12 ± 0,03	-0,058	-0,01	0	0,01	0,07
δ -déalactone	3,6 ± 1,11	3,4 ± 1,02	-1,07	-0,48	-0,21	-0,04	0,42

2- Implication de composés soufrés

Un simple ajout d'une petite quantité de cuivre dans un verre de vin rouge suffit à décomplexer et diminuer significativement son caractère fruité. Cette simple expérience pratiquée depuis longtemps suffit à comprendre le rôle joué par certains thiols dans la perception de l'arôme fruité des vins rouges. En effet, le cuivre dissout complexe les thiols, ce qui diminue leur volatilité et réduit ainsi leur participation au bouquet du vin. Parmi ces métabolites, le 3-sulfanylhexanol (3SH) semble particulièrement impliqué¹⁹. D'autres comme le 2-sulfanylpropionate (2spe) et 3-sulfanylpropionate (3spe) d'éthyle ont beaucoup moins été étudiés mais pourraient potentiellement participer à l'expression fruitée des vins rouges^{20,21}.

La quantification des thiols dans les vins rouges n'étant pas aisée, seulement 20 vins ont été analysés par SPE-SBSE-GC/MS (Solid Phase Extraction-SBSE-GC/MS), méthode développée au cours de ces travaux. Les 2spe et 3spe ont seulement été analysés par semi-quantification tandis que le 3SH a pu être quantifié.

Le sulfure de diméthyle (DMS) est un autre composé soufré connu pour être impliqué dans la perception de la note fruitée des vins rouges^{22,23}. Il a pu être quantifié dans les 48 vins par HS-GC/FPD²² (Head Space-GC/Flame Photometric Detector).

Si aucune tendance particulière n'a pu être mise en évidence et donc aucune conclusion n'a pu être tirée de l'analyse semi-quantitative du 2spe, nous montrons en revanche pour la première fois la capacité des BL du vin à synthétiser son isomère 3spe (**Figure 2A**). L'étude étant semi-quantitative aucune conclusion par rapport à un impact aromatique ne peut être tirée. Toutefois, nous observons une augmentation de la teneur en 3spe dans pratiquement trois quarts des échantillons analysés. Cette capacité des bactéries lactiques à synthétiser le 3spe a déjà été montrée dans le fromage à partir du catabolisme de l'homocystéine²⁴. Une telle voie métabolique est envisageable pour *Oenococcus oeni*, principale espèce de BL du vin, d'autant plus que la présence d'homocystéine dans le vin a déjà été démontrée²⁵.

En revanche, la FML tend à diminuer la teneur des vins rouges en 3SH (2/3 des cas) (**Figure 2B**). Quelques rares études ont effectivement montré la capacité des BL du vin à réduire la teneur en 3SH sans pour autant en évoquer l'origine^{26,27}. Le catabolisme du 3SH par les BL du vin n'étant pas encore connu, cette tendance pourrait venir de phénomène d'adsorption de thiols sur la membrane cellulaire bactérienne. Ce phénomène a déjà été observé pour le 3SH chez les levures²⁰ et évoqué de façon plus générale pour les composés aromatiques par d'autres auteurs chez les BL du vin²⁸.

D'un autre côté, nous montrons pour la première fois la capacité des BL du vin à libérer du 3SH (**Figure 2B**). Ce composé est connu pour être d'origine variétale en partie issu de précurseurs cystéinylés et libérés au cours de la FA sous l'action non spécifique de l'activité β -cystathionine-lyase des levures^{29,30}.

Une telle voie métabolique est envisageable chez les BL du vin car cette activité enzymatique vient d'être caractérisée chez *Oenococcus oeni*³¹. L'aspect limité de cette libération, observée que dans 30 % des cas, pourrait venir du manque d'affinité de cette enzyme, spécifique à la cystathionine, envers le 3SH cystéinylé.

Ce mode d'action a déjà été observé pour la β -cystathionine-lyase dans le cas du métabolisme de la méthionine chez des bactéries lactiques du fromage³².

Par ailleurs, il est intéressant de constater que ces variations bactériennes en 3SH peuvent atteindre des niveaux (quelques μ g/L) ayant potentiellement un impact aromatique. Dans un cas, il a d'ailleurs pu être établie une liaison entre l'augmentation de la teneur en 3SH et l'intensification de la note fruitée du vin rouge étudié au cours de la FML.

En outre, ces travaux permettent de mettre en évidence pour la première fois une tendance nette à la synthèse de DMS par les BL du vin (75 % des cas) (**Figure 2C**). Les niveaux restent toutefois relativement faibles mais en certaines occasions un impact aromatique ne peut être exclu¹⁰. Un lien a en effet pu être établi dans un cas entre la production de DMS et l'augmentation du caractère fruité.

Le métabolisme du DMS chez les BL du vin n'a jamais été étudié. Ce composé est principalement formé au cours du vieillissement du vin par dégradation de la S-méthylméthionine³³. Il est également synthétisé par les levures soit par catabolisme d'acides aminés³⁴ soit par réduction du sulfure de diméthylsulfoxyde (DMSO)²². Une voie de synthèse comparable peut être possible chez les BL du vin qui sont non seulement capables de cataboliser les acides aminés⁶ mais possèdent aussi des activités réductases³⁵.

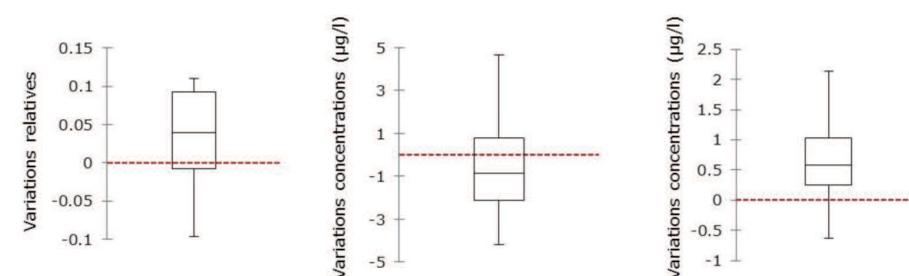


Figure 2: Distribution des variations mesurées au cours des FML étudiées pour le 3spe (n = 20), le 3SH (n = 20) et le DMS (n = 48).

3-Modification de la composition des vins rouges en esters par les BL

Les esters représentent un des principaux groupes de composés aromatiques des vins. Ils ont toujours été considérés comme la principale famille marquant l'arôme fruité des vins jeunes, en particulier les esters éthyliques d'acides gras (EEAG) et les acétates d'alcools (AAS) supérieurs. Ils se retrouvent dans beaucoup de produits fermentés et possèdent en grande majorité des odeurs fruitées bien marquées mais souvent beaucoup moins typiques que certains marqueurs variétaux des vins. C'est pourquoi pendant des années la recherche sur la typicité de l'arôme fruité des vins rouges s'est acharnée à trouver des marqueurs plus spécifiques. Mais l'implication des esters dans cette typicité a été récemment réhabilitée par différentes études montrant qu'ils sont au centre d'interactions perceptives complexes à la base de cette expression aromatique malgré leur présence à des niveaux bien inférieurs à leur seuil de perception^{9,10,36}. Il est d'ailleurs intéressant de constater qu'il est connu depuis longtemps que l'arôme des fruits rouges et fruits noirs, souvent utilisés comme descripteurs de l'arôme des vins rouges, est principalement composé des mêmes molécules, dont beaucoup d'esters. Leurs arômes ne se distinguent généralement que grâce à des effets synergiques basés sur des compositions relatives différentes en esters³⁷. Or, tous les vins sont à peu près composés des mêmes esters mais leur proportion varie très fortement d'un vin à l'autre³⁸.

Tableau 3 : Liste des esters quantifiés

CLASSE D'ESTERS	ESTERS
Esters éthyliques d'acides gras (EEAG)	propionate, butyrate, valérate, hexanoate, heptanoate, octanoate, nonanoate, décanoate, dodécanoate d'éthyle
Esters éthyliques d'acides branchés (EEAB)	Isobutyrate, 2-méthylbutyrate, Isovalérate, phénylacetate d'éthyle
Acétates d'alcools supérieurs (AAS)	Acétate d'éthyle *, de propyle, d'isoamyle, d'isobutyle, d'hexyle, d'octyle, de 2-phényléthyle
Esters isoamyliques	Butyrate, Hexanoate, Octanoate d'isoamyle
Esters méthyliques	Butyrate, Hexanoate, Octanoate, Décanoate de méthyle
Cinnamates	dihydrocinnamate et cinnamate d'éthyle
Autres	Trans-2-hexénoate d'éthyle, Hexanoate d'isobutyle, Trans-géranate de méthyle
Esters polaires	Lactate d'éthyle, succinate de diéthyle, succinate d'éthyle, 3-hydroxybutyrate d'éthyle, lévulinatate d'éthyle, 3-hydroxyhexanoate d'éthyle, 6-hydroxyhexanoate d'éthyle

Plus d'une centaine d'esters sont présents dans les vins à des niveaux de concentration très différents. Nous en avons quantifié 40 d'entre eux en les choisissant par rapport à leur pertinence dans leur impact aromatique et dans leur voie de biosynthèse. Deux méthodes développées et validées au cours de ces travaux ont permis cette analyse.

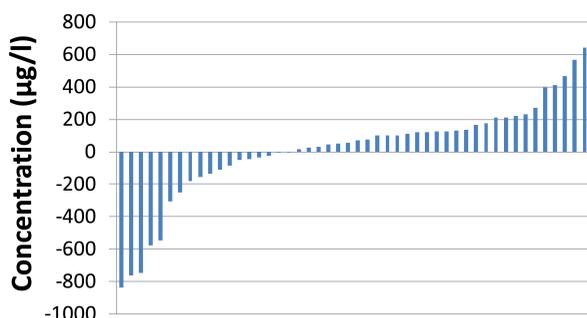
La première par GC/MS après extraction liquide/liquide au dichlorométhane a permis la quantification de 8 esters polaires (**Tableau 3**).

La plupart des esters odorants du vin sont apolaires et 32 d'entre eux ont été analysés par HS-SPME-GC/MS (Head Space-Solid Phase Microextraction-GC/MS)³⁹ (**Tableau 3**).

Cette méthode a été conçue pour être un outil particulièrement adapté à l'étude approfondie des phénomènes biochimiques responsables de la grande variabilité de la composition des vins en esters. Une mise à jour de certaines données œnologiques réalisée grâce à l'établissement d'une base de données « esters » construite sur l'analyse de 200 vins français (rouges, blancs, rosés) s'est révélée très utile pour interpréter les modifications bactériennes en esters.

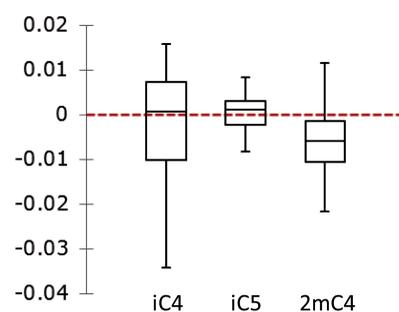
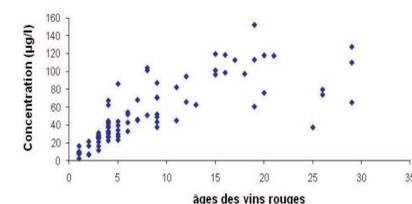
Les esters les plus affectés par les BL sont le lactate d'éthyle, le succinate de diéthyle et le succinate d'éthyle, leurs concentrations augmentant significativement après FML ($p < 0.001$). Toutefois, leurs seuils de perception sont élevés et une implication dans les modulations bactériennes de l'arôme fruité est peu probable. Par ailleurs, dans notre étude, les niveaux d'acétate d'éthyle, qui confère au vin des notes d'ascence, n'ont pas beaucoup varié et sont restés bien inférieurs à son seuil de perception (150 mg/L).

En revanche, l'ensemble des autres esters est beaucoup plus impliqué dans les modifications de l'arôme fruité au cours de la FML. Aucune tendance ne peut être distinguée et au contraire il existe une grande variabilité dans l'impact bactérien sur la teneur globale en esters odorants (de -750 μ g/L à + 650 μ g/L). Ces mesures sont en accord sensoriellement avec la variabilité constatée pour la note fruitée des vins (**Figure 3**). De plus, il peut exister une variabilité d'impact selon les familles d'esters (ex : EEAG et AAS) et même au sein d'une même famille (ex : EEAG). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature⁴⁰. A la lumière des récents travaux sur les interactions perceptives, de tels niveaux de variations peuvent avoir un impact aromatique⁹. Ainsi, l'activité estérase qui gère la synthèse et l'hydrolyse des esters est certainement l'activité enzymatique des BL la plus impliquée dans les modulations de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML.

**Figure 3** : Variations de la concentration totale en esters au cours de la FML (excepté le lactate d'éthyle, le succinate de diéthyle, le succinate d'éthyle et l'acétate d'éthyle)

Toutes les familles d'esters n'ont cependant pas le même niveau d'implication dans la note fruitée des vins rouges. Trois catégories d'esters ont ainsi été mises en évidence selon leur niveau de variation : les esters éthyliques d'acides branchés, les esters éthyliques d'acides gras et les acétates d'alcools supérieurs.

Les esters éthyliques d'acides branchés présentent des variations potentiellement perceptibles lors de certaines FML mais leur impact le plus pertinent est probablement perceptible à plus long terme après quelques années de vieillissement (3-4 ans). En effet, ces composés se forment principalement au cours du vieillissement par estérification des acides branchés correspondants issus du catabolisme d'acides aminés tels que la valine, la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine⁴¹. Or, la quantification de ces acides (liq/liq-GC/MS) montre pour la première fois que les BL ont tendance à les synthétiser, notamment l'acide 2-méthylbutyrique pour qui cette synthèse est significative ($p < 0.05$). Ceci a pour effet de déplacer l'équilibre ester/acide en diminuant ce rapport, ce qui d'après la loi d'action de masse favorise la synthèse plus tardive des esters éthyliques correspondants, principalement le 2-méthylbutyrate d'éthyle (**Figure 4**). L'établissement de la base de données « esters » a permis de confirmer cette synthèse au cours du vieillissement du vin et d'estimer la vitesse d'estérification du 2-méthylbutyrate d'éthyle dans les vins rouges durant les 15 premières années à 6 μ g/L par an (**Figure 5**). Pineau et al.⁹ avaient montré précédemment qu'une variation de quelques microgrammes par litre de cet ester était perceptible dans un vin désaromatisé et qu'il était plutôt impliqué dans la note « fruit noir » des vins rouges. Ainsi, la FML semble pouvoir favoriser le développement tardif de certaines notes fruitées au cours du vieillissement des vins rouges.

**Figure 4** : Distribution des variations mesurées au cours des FML étudiées des rapports de concentration EEAB/acides branchés. iC4: isobutyrate, iC5: isovalérate, 2mC4: 2-méthylbutyrate.**Figure 5** : Evolution des teneurs en 2-méthylbutyrate d'éthyle dans 86 vins rouges français en fonction de l'âge (N = 87) (base de données "esters").

Si certains auteurs ont plutôt observé une diminution de la teneur en acétates d'alcools supérieurs au cours de la FML^{42,43} notre étude n'a pas réellement permis de le confirmer. La composition en AAS est bien affectée par l'activité des BL mais sans tendance particulière excepté lorsque la teneur post FA en AAS atteint un niveau élevé. Dans ce cas, nous notons une tendance à l'hydrolyse des acétates par les BL (**Tableau 4**) (pente négative et coefficient de corrélation élevé). Les vins blancs étant beaucoup plus riches en AAS que les vins rouges, un impact aromatique de la modulation bactérienne en AAS semble être plus pertinent dans les vins blancs ou des diminutions du caractère fruité après FML ont déjà été observées^{2,44}. Au regard des variations mesurées pour les AAS au cours de nos travaux (entre -700 μ g/L et + 200 μ g/L), un impact aromatique peut être possible dans certains cas. Cependant, la modification de la composition des vins rouges en esters éthyliques d'acides gras semble plus impliquée dans les variations aromatiques de la note fruitée des vins rouges au cours de la FML.

En effet, dans certains cas des intensifications significatives ($p < 0.05$) du caractère fruité ont pu être liées à des augmentations de teneur en EEAG ($200 \mu\text{g/L}$) associées à des augmentations du niveau de DMS ou de 3-sulfanylhexanol et à des diminutions en AAS (jusqu'à $-300 \mu\text{g/L}$).

Les FML pratiquées au cours de ces travaux ont également abouti à toutes les tendances dans les variations de la teneur des vins rouges en EEAG. Toutefois, nous montrons que ces variations bactériennes sont non seulement étroitement liées à la nature de l'acide gras correspondant mais aussi à sa longueur de chaîne carbonée. Il existe une tendance nette à la synthèse d'EEAG de longueur de chaîne moyenne (C7, C8, C9, C10) comparée aux esters aux chaînes carbonées plus courtes (C3, C4, C6) dont la teneur semble être moins affectée par l'activité des BL (**Figure 6**). Ces résultats sont plutôt en accord avec ceux trouvés récemment par d'autres équipes de recherche^{42,43}. En revanche, ils sont plutôt en contradiction avec d'autres données de la littérature montrant que chez les bactéries lactiques les activités estérases qui gèrent la synthèse et l'hydrolyse des esters présentent une plus forte spécificité pour les substrats à courtes chaînes carbonées (C2-C4)^{45,46}.

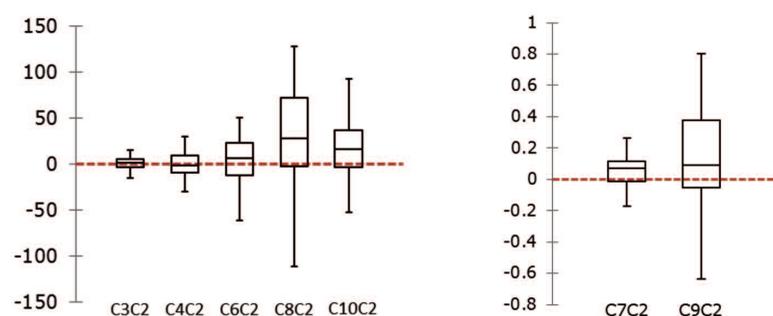


Figure 6 : Distribution des variations mesurées au cours des FML étudiées des concentrations en esters éthyliques d'acides gras (EEAG) ($\mu\text{g/L}$). C3C2: Propionate d'éthyle, C4C2: Butyrate d'éthyle, C6C2: hexanoate d'éthyle, C7C2: heptanoate d'éthyle, C8C2: octanoate d'éthyle, C9C2: nonanoate d'éthyle, C10C2: décanoate d'éthyle.

Très peu de données sur le métabolisme des esters chez les BL du vin sont disponibles dans la littérature comparées aux autres bactéries lactiques des produits alimentaires. Une activité estérase a bien été caractérisée chez *Oenococcus oeni* mais seulement de façon très récente⁴⁷. Chez les BL fromagères, il est connu que la synthèse d'esters soit généralement gérée par alcoololyse via une activité transférase sans cofacteurs à partir de glycérides monomériques et non d'acides gras simples⁴⁸. D'autres auteurs ont suggéré cette voie de synthèse dans le vin car elle est favorisée en milieu aqueux et par une grande disponibilité en éthanol⁴⁵.

Bien que nous n'ayons pas pu le confirmer par une approche enzymatique, notre étude analytique confirme pour la première fois cette hypothèse simplement suggérée dans la littérature. Comme chez la levure, l'hydrolyse et la synthèse d'EEAG chez les BL sont gérées avec une spécificité équivalente par les mêmes enzymes et le facteur limitant de la synthèse d'esters est probablement la disponibilité en substrats^{48,49}. La synthèse et l'hydrolyse des esters chez les BL dépendent donc principalement de l'équilibre esters/substrats acides. La tendance à la synthèse bactérienne du décanoate d'éthyle comparée à celle en hexanoate d'éthyle indique une plus grande disponibilité de substrats acides en C10 (**Figure 6**). En effet, dans les vins jeunes les rapports esters/acides gras sont généralement plus faibles pour les substrats en C6 que ceux en C10⁵⁰, ce qui tendrait à favoriser la synthèse de l'hexanoate d'éthyle et non du décanoate d'éthyle, d'autant plus que les estérases bactériennes ont plus d'affinité pour les substrats en C6 qu'en C10⁴⁶. Or, nous observons l'inverse et les vins sont plus riches en acide hexanoïque qu'en acide décanoïque⁵⁰. Ceci montre bien que la synthèse bactérienne d'EEAG ne se fait probablement pas à partir d'acides gras simples, renforçant ainsi l'hypothèse des glycérides. En outre, les vins sont plus riches en glycérides à plus grande longueur de chaîne⁵¹.

Nous observons par ailleurs une légère tendance à l'hydrolyse des EEAG à plus courte longueur de chaîne lorsque leur teneur post FA augmente, tendance devenant bien plus marquée lorsqu'il s'agit des acétates d'alcools supérieurs (substrats en C2) (**Tableau 4**). Ce constat est probablement le reflet d'une plus faible disponibilité des substrats acides à plus courtes chaînes et semble correspondre avec la composition des vins en glycérides.

Pour les AAS, l'hypothèse des glycérides est peu probable car les glycérides en C2 (acétine) sont des composés artificiels. Une synthèse par activité transférase non spécifique à partir d'acétylCoA pourrait être envisagée comme cela est connu chez les levures⁵². Une plus faible affinité de l'activité transférase envers l'acétylCoA comparée aux glycérides pourrait expliquer la tendance nette à l'hydrolyse des AAS lorsque leurs teneurs dans les vins post FA sont plus élevées.

Bien que ces hypothèses ne pourront être validées que par une étude enzymatique, notre approche analytique a toutefois permis de mettre en évidence pour la première fois dans le vin l'existence probable de telles voies de synthèse bactérienne d'esters. Cela ouvre des perspectives de recherches fondamentales sur le métabolisme des BL du vin encore peu abordées et présentant un intérêt majeur par rapport à la préservation de l'expression fruitée des vins au cours de la FML.

Tableau 4 : Paramètres des droites de régression linéaire calculées à partir de l'évolution de la teneur en EEAG et AAS ($\mu\text{g/l}$) au cours des FML étudiées en fonction de leurs concentrations initiales après FA ($\mu\text{g/l}$).

Compounds	Pente	R ²
Acétate de propyle	-0,2362	0,4596
Acétate d'isobutyle	-0,3211	0,5068
Acétate d'isoamyle	-0,2715	0,7233
Acétate d'hexyle	-0,2813	0,7759
Acétate de 2-phényléthyle	-0,3572	0,9057
Butyrate d'éthyle	-0,2699	0,2606
Hexanoate d'éthyle	-0,1244	0,0526
Octanoate d'éthyle	0,0201	0,0008
Décanoate d'éthyle	0,0947	0,0126

Les glycérides du vin ont principalement deux origines. Ils peuvent provenir de la baie de raisin ou alors être libérés par les levures au cours de leur autolyse. Par ailleurs, la composition des vins post FA en esters dépend des levures présentes dans le milieu mais également de la composition chimique initiale du moût. Ainsi, la composition des vins avant FML en substrats va avoir un rôle majeur dans les modifications bactériennes des teneurs en esters. Bien que les souches de BL présentes dans le milieu influencent la composition des vins post FML en esters, ces travaux montrent pour la première fois que la composition de la matrice avant FML a beaucoup plus d'impact (**Figure 7**). En effet, les variations mesurées au cours de 3 études portant sur l'impact de la souche (inoculation d'un même vin avec différentes souches de BL) sont bien plus faibles que celles mesurées au cours de 2 études de l'effet « matrice vin » (inoculation de vins différents avec la même souche de BL). Ces nouvelles données sont totalement en accord avec la grande variabilité d'impact de la FML sur la composition des vins rouges en esters ainsi que sur leur expression fruitée. En outre cela met particulièrement en évidence l'importance des interactions entre les levures et les bactéries lactiques sur ces modifications biochimiques et aromatiques.

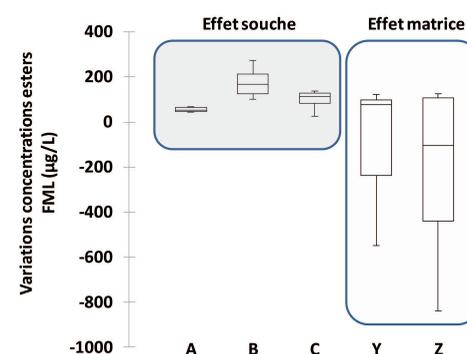


Figure 7 : Comparaison des variations des concentrations totales en esters (lactate, succinates et acétate d'éthyle exceptés) mesurées au cours des FML concernées par les études de l'effet souche (A, B, C) et de l'effet matrice (Y, Z). A: n = 6; B: n = 5; C: n = 6; Y: n = 3; Z: n = 4.

III- Influence des interactions levures/BL : étude de l'impact biochimique et aromatique de la co-inoculation levures/BL.

La co-inoculation levures/BL est une pratique connue depuis longtemps qui consiste à inoculer le vin avec un levain malolactique en même temps que les levures ou au début de FA. Dans ces cas de figure, les effets antagonistes ou synergiques des interactions entre les levures et les bactéries lactiques se trouvent exacerbés.

Cette pratique longtemps délaissée revient à la mode aujourd'hui. Il est en effet maintenant clairement démontré que si la co-inoculation est réalisée de façon maîtrisée (compatibilité du couple levure/BL, prise en compte de la composition du moût), les risques de production massive d'acidité volatile, due à la présence de bactéries hétérofermentaires dans un milieu riche en sucres, sont très limités^{53,54}. En revanche, en début de FA les conditions sont plus favorables à la croissance bactérienne (nutriments plus abondants, faible niveau d'éthanol, de SO₂ et d'acides gras). De plus, la co-inoculation permet de réduire significativement le temps total de fermentation limitant ainsi les risques de développement de microorganismes d'altération ainsi que les coûts énergétiques. D'un autre côté, cette réduction a pour conséquence de limiter le temps au cours duquel le vin est sous l'influence de l'activité des microorganismes, source de réduction du milieu et donc de préservation des arômes contre l'oxydation. Toutefois jusqu'à présent, très peu d'études ont évalué réellement l'impact de la co-inoculation sur le profil aromatique et biochimique des vins. Ainsi, ces travaux constituent la première étude à le faire à l'échelle « chai » et de façon concomitante d'un point de vue analytique et sensoriel.

Sept essais (sans réplicat) réalisés en chai sur 6 vins rouges différents et avec des couples levures/BL différents, permettent de comparer la composition en marqueurs des notes fruitées et lactiques d'un même vin ayant réalisé la FML en co-inoculation et en inoculation séquentielle (Tableau 5). Une comparaison des profils aromatiques de vins de co-inoculation et d'inoculation séquentielle réalisée sur 3 essais complète l'étude.

Tableau 5: Caractéristiques des essais de co-inoculation

Vins	Origines	Cépages	Millésime	Couples levures/BL	Moment d'inoculation avec les BL
M1a	Suisse	Merlot	2008	U/F	24h après les levures
M1b	Suisse	Merlot	2008	U/F+P1+P2	24h après les levures
PN	Allemagne	Pinot Noir	2008	V/G	24h après les levures
M2	Bordeaux	Merlot	2009	W/F	2/3 FA
M3	Bordeaux	Merlot	2009	X/B	24h après les levures
M4	Bordeaux	Merlot	2009	Y/B	24h après les levures
M5	Bordeaux	Merlot	2009	Z/I	24h après les levures

I- Modification du profil biochimique des vins rouges en co-inoculation

Les marqueurs de l'arôme fruité dérivés de précurseurs glycosylés ne sont que très peu influencés par le moment d'inoculation des BL. Ceci implique que les interactions levures/BL modifient peu les activités β -glycosidases de ces microorganismes. En revanche, les composés d'origines fermentaires sont bien plus influencés par ces interactions microbiologiques. Une nouvelle fois, de tous les composés d'origine levurienne, les esters sont les métabolites les plus soumis aux interactions entre les microorganismes du vin. La composition en esters des vins rouges réalisés en co-inoculation est ainsi généralement différente de celles des vins réalisés par inoculation séquentielle.

La teneur globale en esters peut subir tous types de variations qui dépendent aussi de la classe d'esters considérée (Figure 8). Si aucune tendance n'est observée pour les AAS, en revanche il semblerait que la co-inoculation tende à favoriser des plus hautes teneurs en EEAG (Figure 8). Toutefois ces augmentations ne sont pas toujours liées à des intensifications de la note fruitée car d'autres modifications biochimiques peuvent intervenir et engendrer des effets de masque aromatique comme c'est le cas pour le vin M1a (masque grillé/fumé sur l'arôme fruité) (Figure 9). D'un autre côté, à plus long terme la co-inoculation semble favoriser la synthèse d'EEAB en diminuant le rapport acide/ester (Figure 8).

Quoiqu'il en soit, toutes ces modifications biochimiques reflètent l'impact des BL sur le métabolisme levurien en co-inoculation. L'activité bactérienne peut ainsi probablement modifier le métabolome levurien en agissant directement sur les métabolites libérés par les levures. Une modification du transcriptome des levures par action directe des BL sur l'expression des gènes codant les activités enzymatiques responsables de la production d'arôme est également possible⁵⁵.

La composition des vins en marqueurs aromatiques majoritairement d'origine bactérienne, comme le diacétyle, est également fortement modifiée par le mode d'inoculation des BL (Figure 8). Contrairement aux idées reçues la co-inoculation ne réduit pas forcément la teneur en diacétyle par la présence simultanée en masse des populations levuriennes et bactériennes à forte activité réductrice. Dans 4 cas sur 7 la co-inoculation mène à une teneur plus élevée en diacétyle alors que certaines FML ont été réalisées simultanément à la FA. Ces observations montrent la capacité des levures à influencer le métabolisme bactérien de la même façon que les BL agissent sur le métabolisme des levures.

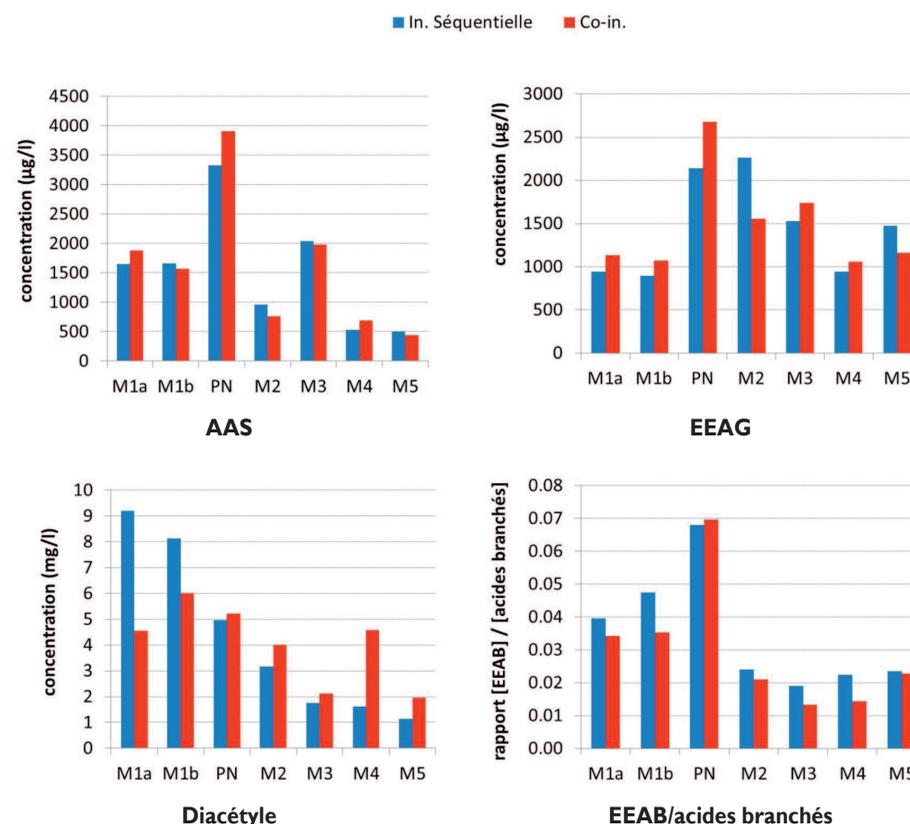


Figure 8 : Comparaison des concentrations en AAS, EEAG, diacétyle ainsi que des rapports de concentrations EEAB/acides branchés dans les vins réalisés en co-inoculation levures/BL et en inoculation séquentielle.

2- Modification du profil aromatique des vins rouges en co-inoculation

L'évaluation sensorielle réalisée olfactivement sur le descripteur fruité, lactique, fumé/grillé et végétal montre des modifications importantes des profils aromatiques selon le mode d'inoculation (**Figure 9**). Tous les descripteurs évalués sont influencés mais le plus affecté est encore une fois le caractère fruité. La co-inoculation n'augmente pas forcément le caractère fruité des vins rouges qui peut aussi bien augmenter que diminuer par rapport à l'inoculation séquentielle. De même, la co-inoculation ne diminue pas systématiquement la note lactique qui peut être plus intense y compris dans le cas de FML simultanée (M2). Ces données sensorielles sont en relation avec les données analytiques évoquées pour les esters et le diacétyl. En revanche, elle semble contrarier les idées véhiculées chez les viticulteurs comme quoi la co-inoculation préserve l'arôme fruité par diminution de la note lactique. Si ces phénomènes sont possibles, nous montrons que l'inverse l'est également.

La composition du vin après FA est un élément essentiel pour expliquer les modulations aromatiques engendrées par la FML. Or celle-ci est intimement liée aux métabolites produits par les levures au cours de la FA mais aussi plus tard lors de leur autolyse. S'il est connu depuis longtemps que les levures influencent grandement la viabilité des BL, elles interfèrent aussi sur les modifications apportées à la note fruitée des vins rouges par la FML. Les essais réalisés en co-inoculation montrent que ces interactions entre les microorganismes sont à l'origine de la perte de l'arôme fruité aussi bien par masquage aromatique que par dégradation directe des marqueurs fruités. D'un autre côté, elles induisent également des intensifications de la note fruitée, en étant responsable de la production plus importante de ces mêmes marqueurs, aussi bien à court terme qu'au bout de quelques années de vieillissement. Les esters sont au cœur de toutes ces interactions et, de par leur rôle central dans la perception de la note fruitée des vins rouges, ils constituent les marqueurs les plus fidèles de la modification de l'arôme fruité des vins rouges apportée par la FML.

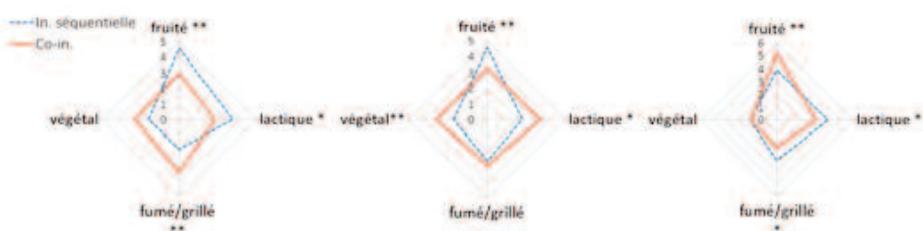


Figure 9 : Profil comparé réalisé sur M1a, PN et M2 entre les vins réalisés en co-inoculation levures/BL et les mêmes avec une FML séquentielle (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

CONCLUSION

L'expression fruitée représente un paramètre essentiel de la qualité aromatique des vins rouges. Sa préservation au cours de tout le processus d'élaboration du vin, de la vigne à la mise en bouteille, est donc d'une importance majeure pour les viticulteurs.

Il est connu depuis longtemps que la fermentation malolactique menée par les bactéries lactiques puisse modifier le caractère fruité des vins rouges sans qu'il n'y ait toutefois de consensus sur la question. Ce manque de clarté est le reflet d'un manque cruel de données chimiques, biochimiques et sensorielles aussi bien fondamentales qu'appliquées.

L'établissement d'un bilan analytique portant sur 70 molécules et réalisé dans une centaine de vins, complété par des expériences d'analyse sensorielle, ont permis d'aboutir à l'identification des composés majoritairement impliqués dans les variations de la note fruitée des vins rouges engendrées par la FML. Le développement préalable des techniques d'analyses rapides et de haute performance s'est révélé être un outil précieux à la réalisation de ce projet.

Finalement, les modifications des teneurs en esters, majoritairement d'origine levurienne, sont démontrées comme un processus majeur de la balance de la note fruitée au cours de la FML. Elle permet à court terme, aussi bien la synthèse que l'hydrolyse des esters grâce aux activités estérasiques des BL et, à plus long terme, la formation tardive d'esters éthyliques d'acides branchés issus du catabolisme de certains acides aminés. Les variations de la teneur en esters au cours de la FML résultent d'un équilibre entre les activités hydrolytiques des esters, et celles d'estérifications des acides gras, vraisemblablement plus par alcoololyse de glycérides que par estérifications des acides gras simples correspondants. La spécificité des estérasiques vis-à-vis de la nature et de la longueur de la chaîne carbonée des esters est mise en évidence, ainsi que l'importance de la disponibilité des substrats, liée en partie à l'activité des levures.

Si la souche de BL est un facteur à prendre en compte, la composition du vin en substrats est certainement encore plus importante. L'étude de l'influence des interactions entre les levures et les BL sur les modulations de la note fruitée a montré à quel point les processus microbiologiques fermentaires étaient complexes. Effectivement, la souche de BL et le moment d'inoculation influencent grandement le profil aromatique et biochimique des vins. Mais, ces variations sont propres à chaque couple levures/BL pour un milieu donné. Ainsi, les phénomènes à la base de la grande variabilité d'impact de la FML sur la note fruitée des vins rouges sont plus complexes qu'un simple effet souche. Ces variations sont le reflet d'un triptyque bactéries-levures-vin dont chaque composante a son importance.

La composition chimique initiale du moût, dépendant en grande partie des pratiques viticoles et du « terroir », est un paramètre essentiel pour la composition finale des vins en marqueurs aromatiques fermentaires comme les esters, et donc pour son expression fruitée également. Pour préserver cette expression aromatique au cours de la FML, l'œnologue devra vraisemblablement plus travailler avec un couple levures/BL donné plutôt qu'une souche particulière de bactéries. En effet, l'utilisation d'une souche de BL ne peut assurer l'expression de la note fruitée des vins rouges. En revanche, l'étude des interactions levures-BL sur la production d'esters pourrait permettre de mettre en valeur certains couples potentiellement plus intéressants que les seules souches de bactéries.

Ces travaux permettent finalement d'éclairer sous un angle nouveau la problématique des modifications bactériennes de l'arôme fruité des vins en apportant des éléments de réponses inédits. D'un point de vue fondamental, ils permettent d'ouvrir des perspectives d'études sur le métabolisme des BL du vin ainsi que sur les interactions levures/BL qui pourraient rapidement aboutir à des applications œnologiques servant la profession. Ceci est d'autant plus envisageable que ce travail a dans le même temps permis la mise en place des outils analytiques indispensables à l'étude approfondie des phénomènes biochimiques responsables de la grande variabilité de la composition aromatique des vins.

Bibliographie

1. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. *Traité d'oenologie. Tome I. Microbiologie du vin, Vinification. Dunod: Paris, 1998.*
2. Laurent, A., Hening-Kling, T., Acree, T.E. *Changes in the aroma and odour of chardonnay wine due to malolactic fermentation. Vitic. Enol. Sciences. 1994, 49, 3-10.*
3. de Revel, G., Pipris-Nicolau, L., Barbe, J.C., Bertrand, A. The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *J. Sci. Food Agric. 2000, 80, 102-108.*
4. Bartowsky, E. J., Henschke, P.A. The buttery attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol. 2004, 96, 235-252.*
5. Keim, H., de Revel, G., Bertrand, A. Instrumental and sensory evaluation of malolactic fermentation wine. 10th Weurman, Beaune, France, **2002.**
6. Pripis-Nicolau, L., de Revel, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol. 2004, 96, 1176-1184.*
7. Vallet, A., Lucas, P., Lonvaud-Funel, de Revel, G. Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol. 2008, 104, 1833-1840.*
8. Henick-Kling, T., Acree, T.E., Krieger S., Laurent, A., Edinger W.D. Modification of wine flavor by malolactic fermentation. *Wine east. 1994, 4, 8-15 and 29-30.*
9. Pineau, B., Barbe, J.C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific "Red-and-Black-berry" Aromas in Red Wines. *J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 3702-3708.*
10. Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., Ferreira, V. Analytical Characterization of the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 4501-4510.*
11. Pineau, B., J. C. Barbe, Cornelis Van Leeuwen, and Denis Dubourdieu. Which Impact for Beta-Damascenone on Red Wines Aroma? *J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 4103-4108.*
12. Kotseridis, Y. Etude de l'arôme des vins de Merlot et Cabernet-Sauvignon de la région bordelaise. Thèse n° 652, Université Bordeaux II, **1999.**
13. Boido, E., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E. Effect of B-Glycosidase Activity of *Oenococcus oeni* on the Glycosylated Flavor Precursors of Tannat Wine during Malolactic Fermentation. *J. Agric. Food. Chem. 2002, 50, 2344-2349.*
14. Daniel, M.A, Elsey, G.M., Capone, D.L., Perkins, M.V., Sefton, M.A. Fate of damascenone in wine: the role of SO₂. *J. Agric. Food. Chem. 2004, 52, 8127-8131.*
15. Nakamura, S., Crowell, E.A, Ough, C.S., Totsuka, A. Quantitative analysis of γ -nonalactone in wines and its threshold determination. *Food Sci. 1988, 53, 1243-1244.*
16. López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J., Ferreira, V. Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. **2004, 88, 95-103.**
17. Segurel, M.A., Baumes, R., Langlois, D., Riou, C., Razungles, A. Role of glycosidic aroma precursors on the odorant profiles of Grenache noir and Syrah wines from the Rhone valley. Part 2: characterisation of derived compounds. *J. Int. Sci. Vigne Vin. 2009, 43, 213-223.*
18. Wanikawa, A., Hosoi, K., Kato, T. Conversion of unsaturated fatty acids to precursors of gamma-lactones by lactic acid bacteria during the production of malt whisky. *J. Am. Soc. Brew. Chem. 2000, 58, 51-56.*
19. Bouchilloux, P., Darriet, P., Henry, R., Lavigne-Cruège, V., Dubourdieu, D. Identification of Volatile and Powerful Odorous Thiols in Bordeaux Red Wine Varieties. *J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 3095-3099.*
20. Blanchard, L. Recherche sur la contribution de certains thiols volatils à l'arôme des vins rouges. Etude de leur genèse et de leur stabilité. Thèse, Université Bordeaux II. **2000.**
21. Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D. A new type of flavor precursors in vitis vinifera L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 5215-5219.*
22. Anocibar Beloqui, A., Kotseridis, Y., Bertrand, A. Détermination de la teneur en sulfure de diméthyle dans quelques vins rouges. *J. Int. Sci. Vigne et du Vin. 1996, 30, 167-170.*
23. Segurel, M. A., Razungles, A., Riou, C., Salles, M., Baumes, R. Contribution of Dimethyl Sulfide to the Aroma of Syrah and Grenache Noir Wines and Estimation of Its Potential in Grapes of These Varieties. *J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 7084-7093.*
24. Sourabié, A. M., Spinnler, H.E., Bonnarne, P., Saint-Eve, A., Landaud, S. Identification of a Powerful Aroma Compound in Munster and Camembert Cheeses: Ethyl 3-Mercaptopropionate. *J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 4674-4680.*
25. Benkova, B., Lozano, V., Ivanov, I.P., Kalenderova, S., Stoev, G., Yordanova, N., Milchova, M., Mitev, V. Quantitation of the homocysteine content in wine. *Eur. Food Res. Tech. 2009, 230, 361-365.*
26. Murat, M. L. Recherches sur la vinification des vins Rosés et Clairets de Bordeaux, Université Bordeaux II. **2001.**
27. de Revel, G. Les composés aromatiques produits par les bactéries lactiques: impact sur l'arôme des vins. Journées techniques du CIVB. Saint-Germain-de-la rivièrre, France. **2005.**
28. Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. and Pretorius, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research. 2005, 11, 139-173.*
29. Tominaga, T., Peyrot des Gachons, C., Dubourdieu, D. A new type of flavor precursors in vitis vinifera L. cv. Sauvignon Blanc: S-Cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 5215-5219.*
30. Thibon, C., Marullo, P., Claisse, O., Cullin, C., Dubourdieu, D., Tominaga, T. Nitrogen catabolic repression controls the release of volatile thiols by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *FEMS Yeast Res. 2008, 8, 1076-1086.*
31. Knoll, C., Du Toit, M., Schnell, S., Rauhut, D., Irmmler, S. Cloning and characterisation of a cystathionine β/γ -lyase from two *Oenococcus oeni* oenological strains. *Appl. Microbiol. Biotech. 2011, 89, 1051-1060.*

32. Alting, A.C., Engels, W.J.M., van Schalkwijk, S., Exterkate, F.A. Purification and characterization of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. *Appl. Env. Microbiol.* **1995**, 61, 4037-4042.
33. Segurel, M. A., Razungles, A., Riou, C., Salles, M., Baumes, R. Ability of possible DMS precursors to release DMS during wine aging and in the conditions of heat-alkaline treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 2637-2645.
34. de Mora, S. J., Eschenbruch, R., Knowles, S.J., Spedding, D.J. The formation of dimethyl sulphide during fermentation using a wine yeast. *Food Microbiol.* **1986**, 3, 27-32.
35. de Revel, G. Le diacétyl, les composés dicarbonylés et leurs produits de réactions dans les vins." Thèse de doctorat n° 190, Université Victor Segalen Bordeaux II. **1992**.
36. San Juan, F., Ferreira, V., Cacho, J., Escudero, A. Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 7916-7924.
37. Rowe, D. and Tangel, B. Aroma chemicals for the sweet field. *Perfumer and Flavorist.* **1999**, 24, 36-44.
38. López, R., Ferreira, V., Hernandez, P., Cacho, J. Identification of impact odorants of young red wines made with Merlot, Cabernet Sauvignon and Grenache grape varieties: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1999**, 79, 1461-1467.
39. Antalick, G., Perello, M.C., de Revel, G., 2010, Development, validation and application of a specific method for the quantitative determination of wine esters by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **2010**, 121, 1236-1245.
40. Sumbly, K. M., Grbin, P.R., Jiranek, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chem.* **2010**, 121, 1-16.
41. Diaz-Maroto, M. C., Schneider, R., Baumes, R. Formation pathways of ethyl esters of branched short-chain fatty acids during wine aging. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 3503-3509.
42. Bartowsky, E.J., Costello, P.J., McCarthy, J. MLF-adding an 'extra dimension' to wine flavour and quality. *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, **2008**, 533a, 60-65.
43. Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Rauhut, D., Du Toit, M. Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT- Food Sci. Tech.* **2011**, 44, 2077-2086.
44. Sauvageot, F., Vivier, P. Effects of Malolactic Fermentation on Sensory Properties of Four Burgundy Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, 48, 187-192.
45. Holland, R., Liu, S.Q., Crow, V.L., Delabre, M.L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J.* **2005**, 15, 711-718.
46. Matthews, A., Grbin, P.R., Jiranek, V. Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2007**, 77, 329-337.
47. Sumbly, K. M., Matthews, A. H., Grbin, P. R. and Jiranek, V. Cloning and characterization of an intracellular esterase from the wine-associated lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 6729-6735.
48. Liu, S.Q., Holland, R., Crow, V. Ester synthesis in an aqueous environment by *Streptococcus thermophilus* and other dairy lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2003**, 63, 81-88.
49. Saerens, S. M. G., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Voet, A.R.D., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, M. The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J. Bio. Chem.* **2006**, 281, 4446-4456.
50. Torres-Allegre V.M. Formation des acides gras et autres produits secondaires au cours de la vinification : interprétation statistique des résultats, Thèse, Université Bordeaux II, **1982**.
51. Trotton, D., Charpentier, M., Robillard, B., Calvayrac, R., Duteurtre, B. Evolution of the lipid contents of Champagne wine during the second fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, 40, 175-182.
52. Liu, S.-Q., Holland, R. and Crow, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: A review. *International Dairy Journal*, **2004**, 14, 923-945.
53. Jussier, D., Morneau, A.D. and de Orduna, R.M. Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 221-227.
54. Massera, A., Soria, A., Catania, C., Krieger, S., Combina, M. Simultaneous inoculation of Malbec (*Vitis vinifera*) musts with yeast and bacteria: Effects on fermentation performance, sensory and sanitary attributes of wines. *Food Tech. Biotech.* **2009**, 47, 192-201.
55. Rossouw, D., du Toit, M., Bauer, F. The impact of co-inoculation with *Oenococcus oeni* on the transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae* and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must. *Food Microbiol.* **2012**, 29, 121-131.



17, rue de Javel - 75015 Paris - France
Tel : +33 (0)1 44 37 22 17 - Fax : +33 (0)1 44 37 22 00
Email : contact@academie-amorim.com
www.academie-amorim.com