



HAL
open science

Genetics of the nitrogen requirement of yeasts and elaboration new tools for the selection of yeast strains

Marie-Charlotte Colosio, Claudie Rouland, Maria Avramova, Bruno Blondin

► To cite this version:

Marie-Charlotte Colosio, Claudie Rouland, Maria Avramova, Bruno Blondin. Genetics of the nitrogen requirement of yeasts and elaboration new tools for the selection of yeast strains. *Innovations Agronomiques*, 2023, 88, pp.47-55. 10.17180/ciag-2023-vol88-art04 . hal-04312379

HAL Id: hal-04312379

<https://hal.inrae.fr/hal-04312379v1>

Submitted on 28 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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

Génétique du besoin en azote des levures en fermentation, élaboration de nouveaux outils pour la sélection des souches

Colosio Marie-Charlotte¹, Rouland Claudie², Avramova Maria³, Blondin, Bruno³

¹ Institut français de la Vigne et du Vin, Château de la Frémoire 44120 Vertou, France

² Station viticole du BNIC, 69 rue de Bellefonds, 16100 Cognac, France

³ UMR Sciences pour l'œnologie, INRAE, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France

Correspondance : Marie-Charlotte.COLOSIO@vignevin.com

Résumé

La capacité des levures *Saccharomyces cerevisiae* à fermenter en présence d'un faible niveau d'azote est un trait important pour la conduite des fermentations alcooliques. Les souches de levures montrent des différences de capacité qui sont encore mal comprises. Nous avons développé une approche de génétique quantitative pour identifier les gènes et allèles impliqués dans les différences de capacité à fermenter en milieu carencé en azote. Des QTL (Quantitative Trait Loci) et régions du génome des souches ont été identifiées pour moduler ce caractère. Toutefois des analyses fonctionnelles des gènes candidats n'ont pas permis de démontrer leur implication suggérant que le caractère est sous un contrôle génétique complexe. Ce projet visait également à développer des conditions de mesure du besoin en azote des levures dans des conditions simplifiées afin de faciliter les évaluations et la sélection des souches. Un milieu synthétique simplifié et des protocoles de mesure ont été mis au point pour conduire des évaluations en conditions technologiques.

Mots clés : Fermentation, microorganismes, vin, azote, pilotage, sélection

Abstract: Genetics of the nitrogen requirement of yeasts and elaboration new tools for the selection of yeast strains

The ability of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to ferment in the presence of a low level of nitrogen is an important trait for the conduct of alcoholic fermentations. Yeast strains show differences in ability that are still poorly understood. We have developed a quantitative genetic approach to identify genes and alleles involved in contrasting abilities to ferment in a nitrogen-deficient environment. QTLs (Quantitative Trait Loci) and regions of the genome of the strains have been identified to modulate this trait. However, functional analyses of candidate genes have not demonstrated their role, suggesting that the trait is under complex genetic control. This project also aimed at developing conditions for measuring the nitrogen requirement of yeasts under simplified conditions in order to facilitate the evaluations and selection of strains. A simplified synthetic medium and measurement protocols have been developed to conduct evaluations under technological conditions.

Keywords: Fermentation, microorganisms, wine, nitrogen, management, sélection

Introduction

La fermentation alcoolique est une étape clé de l'élaboration de l'ensemble des boissons alcoolisées (vins, bières, cidres, spiritueux, eaux de vie), - ainsi que de l'alcool neutre industriel. La maîtrise de son déroulement est un enjeu fort pour la gestion des process industriels et la maîtrise de la qualité des produits. Il est bien établi que les nutriments disponibles dans les jus/moûts influencent fortement le comportement des levures et le déroulement de la fermentation alcoolique (Bely *et al*, 1990 ; Bezenger et Navarro, 1987 ; Bell et Henschke, 2005)). L'azote est reconnu jouer un rôle prépondérant sur ces aspects en agissant sur la croissance et/ou l'activité métabolique des levures. De fait, les moûts avec des niveaux d'azote assimilable faibles sont associés à des fermentations lentes et sont aussi propices à des arrêts de fermentations (Blateyron et Sablayrolles, 2001). De telles situations sont souvent délicates à gérer et peuvent conduire à une dégradation de la qualité des produits. C'est principalement avec le souci d'éviter ces situations que les opérateurs supplémentent les milieux de fermentation avec des sources d'azote de synthèse, principalement sous forme d'azote ammoniacal.

La maîtrise du déroulement des fermentations alcooliques est essentielle pour les acteurs des filières des boissons fermentés et distillées. Les fortes variations des niveaux d'azote des moûts entraînent une forte hétérogénéité des durées de fermentation qui nécessitent alors une surveillance accrue de la cuverie, vu les risques d'arrêts associés aux carences. Ces fermentations difficiles requièrent aussi la gestion d'interventions pour l'apport de nutriments azotés. En l'absence d'intervention appropriée, les producteurs peuvent avoir à faire face à la gestion de fermentations arrêtées dont la relance à l'échelle industrielle est souvent laborieuse mais aussi couteuse, l'apport de nouvelles levures et de nutriments étant indispensable. Les arrêts ou ralentissements peuvent être aussi propices au développement de germes d'altération et donc à la dégradation de la qualité des produits.

Dans une double perspective, à la fois de réduction d'intrants et de fiabilisation des fermentations, nous avons conduit un projet pour élaborer des connaissances et des outils génétiques utilisables pour sélectionner et/ou développer des souches de levures performantes dans des milieux carencés en azote.

Les levures présentent des capacités variables à fermenter dans les milieux pauvres en azote ; toutefois les bases génétiques de ces différences de comportement sont encore méconnues (Brice *et al*, 2014). Les démarches de génétique quantitative permettent d'envisager l'acquisition de connaissances sur les bases génétiques des capacités fermentaires des levures en milieu pauvre en azote. Ces connaissances doivent pouvoir être mobilisées pour la sélection ou l'amélioration des levures par hybridation dirigée (voie non-OGM).

Une première partie du projet visait donc à acquérir des données sur les bases génétiques des performances des levures *Saccharomyces cerevisiae* en milieu carencé en azote. Il s'agissait d'identifier des gènes et allèles qui influencent la capacité des *Saccharomyces cerevisiae* à fermenter en milieu pauvre en azote. Le projet s'appuyait sur une démarche de génétique quantitative (recherche de QTL, Quantitative Trait Loci). La sélection de levures avec faibles besoins en azote à partir d'isolat des milieux de fermentation représente aussi une voie pertinente pour disposer de nouvelles souches performantes dans ces conditions et peut permettre d'enrichir la panoplie d'outils disponibles pour les filières. Une deuxième partie du travail a donc consisté à développer des outils qui facilitent ce travail de sélection. Il s'agissait en particulier de mettre au point des critères simples d'évaluation des besoins en azote des levures sans avoir recours systématiques à des outils de suivi en ligne et des milieux de fermentation synthétiques complexes.

1. Matériel et méthodes

Les travaux de génétique des levures se sont principalement appuyés sur deux souches *Saccharomyces cerevisiae* œnologiques L2868 (très faible besoin en azote issue du CRB de l'IFV), T73 (très fort besoin en azote) et leurs dérivés haploïdes.

Les fermentations ont été réalisées sur un moût synthétique (MS) qui contient les composés majeurs du moût de raisin et présente des propriétés physico-chimiques qui miment celles d'un moût « moyen ». L'utilisation de moût synthétique permet de s'abstenir de la variabilité qui peut exister entre différents lots de moût naturel tout en assurant les conditions et les nutriments nécessaires pour la levure. Le contenu en sucres a été fixé à 200 g/L de mélange glucose et fructose (50/50) et la concentration en azote est de 120 mg/L.

Les fermentations sont réalisées à une température de 28 °C, avec agitation. Un système robotisé pour permettre le suivi de la perte du poids au cours du temps de manière automatique a été utilisé pour le phénotypage des levures en fermentation alcoolique.

Le séquençage individuel des génomes des levures a été effectué par la technique Illumina (2x100 pb, HiSeq2500) à une profondeur de 20-80x. En utilisant les séquences ainsi obtenues, 3 727 marqueurs positionnés à 2000 pb de distance ont été retenus.

La recherche de QTL a été réalisée en s'appuyant sur le R package R/qtl (Broman et al. 2003). R/qtl regroupe des fonctions permettant de faire des analyses statistiques de base nécessaires pour évaluer et mettre en évidence les QTLs (tels que 'interval mapping', régression Haley-Knott, imputation multiple).

2. Résultats

2.1. Recherche de QTL et de gènes impliqués dans le contrôle du besoin en azote

Une démarche de recherche de QTL du besoin en azote des levures, comme présentée dans la Figure 1, a été mise en œuvre afin d'identifier des régions et gènes impliqués. Ces travaux se sont appuyés sur une collection existante de descendants issus d'un croisement entre deux souches de levures avec des besoins contrastés en azote : L2868 à faible besoin (dite LNR pour Low Nitrogen Requirement) et T73 (HNR pour High Nitrogen Requirement). Une population recombinée de 120 clones haploïdes issue du croisement des deux souches a été utilisée. Afin d'augmenter le nombre de marqueurs génétiques et la capacité de détection de QTL, les génomes des 120 ségréants recombinés de la collection ont été séquencés par la technique Illumina (2x100 pb, HiSeq2500) à une profondeur de 20-80x. En utilisant les séquences ainsi obtenues 3727 marqueurs positionnés à 2000 pb de distance environ ont été retenus. Ainsi, une carte génétique très dense et précise a été construite pour chacun des 120 ségréants.

La population de ségréants a été ensuite phénotypée en fermentation afin d'évaluer la performance individuelle des clones dans un milieu carencé en azote, décrit ci-dessus. L'azote est apporté dans ce milieu par un équilibre en acides aminés et azote ammoniacal simulant un moût de raisin. Des paramètres de cinétique de fermentation, vitesse ou quantité de CO₂ formé après une durée définie de fermentation ont été mesurés pour chacun des ségréants. Après analyse des données, 108 ségréants ont été retenus pour réaliser des recherches de QTL.

La recherche de régions QTL a été réalisée en se basant sur les courbes de vitesse de fermentation ou temps de fermentation à temps fixe (89 h) pour les données manuelles. Pour ce faire, le R package R/qtl a été utilisé (Broman *et al.*, 2003).

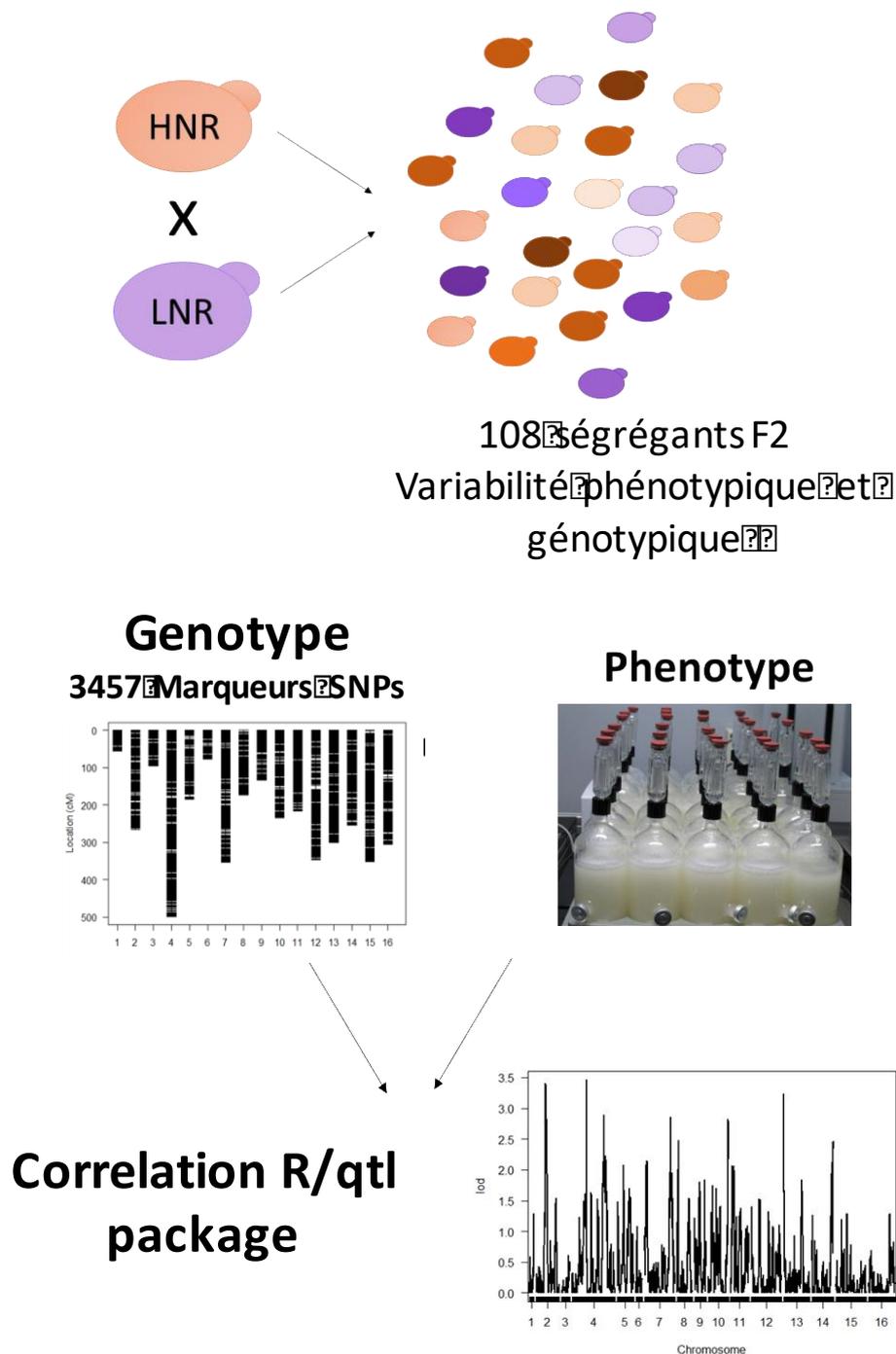


Figure 1 : Schéma de la démarche de recherche de QTL de fermentation

Ces analyses ont permis de mettre en évidence des régions QTL influençant la vitesse de fermentation. Différents « pics » de QTL sont détectés comme présentés dans la Figure 2. Toutefois et malgré une forte héritabilité (96 %), le dispositif est demeuré limité dans sa capacité à identifier des QTLs car la plupart des régions présentent des LOD scores inférieurs au seuil de significativité classiquement visé dans ce type de travaux. Quatre régions QTL ont été retenues pour des analyses approfondies, une région (Chromosome XIII, position 23620) avec un LOD score significatif et trois autres avec des LOD scores légèrement inférieurs au seuil (chromosomes IV - 442558, V - 412969 et VIII - 29809). Un des pics QTL correspondait à une région contenant les gènes MDS3, GCN1 qui ont été montrés impliqués dans le

contrôle de la vitesse de fermentation une étude antérieure avec ces souches (Brice et al 2014). Ceci confirmait la capacité du dispositif à identifier des QTLs pour ce caractère de vitesse.

Par la suite, les gènes candidats des régions QTL ont été priorisés à partir des informations disponibles sur leur fonction et distribution des mutations dans les gènes. Les régions ciblées peuvent être plus ou moins longues (ex. 10-15 kpb, voire plus) en fonction de la résolution de l'analyse de recherche de QTLs. Les régions contiennent donc non pas un, mais plusieurs gènes qui sont potentiellement en lien avec le phénotype étudié. Pour prioriser des gènes candidats parmi ceux qui sont présents dans une région QTL, on s'appuie sur la base de données 'open source' SGD (Saccharomyces Genome Database) qui propose des données sur les fonctions des gènes de la levure, ainsi que des outils pour étudier leurs séquences. Des gènes ayant des fonctions en lien avec le phénotype étudié ont été examinés, la présence de mutations non-synonymes entre les allèles des deux parents à l'origine de la population étudiée a été ensuite prise en compte pour évaluer la pertinence des gènes. Une large base de données de séquences génomiques de souches de *Saccharomyces cerevisiae*, disponible à l'UMR SPO Montpellier, a permis de comparer la présence des différents allèles pour les gènes ciblés et étudier les mutations au sein de la collection.

La région du QTL du chromosome XIII considérée comme la plus pertinente a été analysée selon cette démarche. L'examen de la région (15 500 – 30 000) a conduit à cibler deux gènes comme candidats pertinents selon les critères de fonction et de présence de mutations. Les gènes RSC9 et PGA3 ont été soumis à une analyse fonctionnelle par des tests d'hémizygotie réciproque (diploïde contenant une seule version allélique active). Des clones diploïdes portant l'un ou l'autre des allèles actifs ont été obtenus par interruption génique chez un des parents et croisement avec l'autre souche parentale. Toutefois, l'étude de l'impact des allèles en fermentation n'a pas permis de révéler d'effet des allèles sur la cinétique fermentaire.

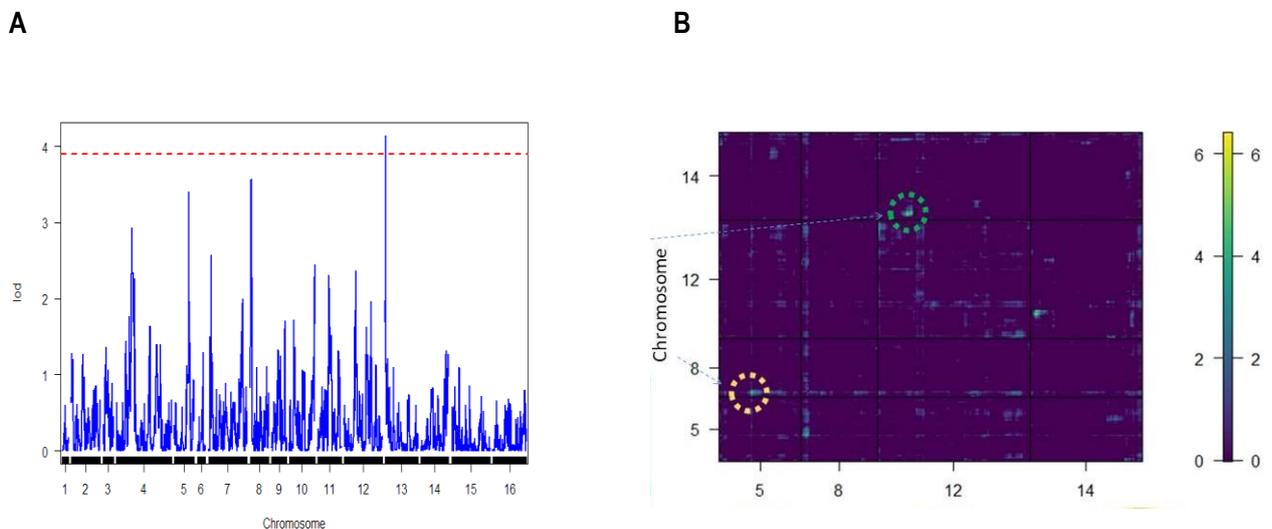


Figure 2 : Graphe des Lod scores sur les chromosomes de la levure pour la vitesse de fermentation par analyse directe (A) ou avec interaction entre les gènes (B).

La détection d'un seul QTL (chromosome XIII) avec un seuil significatif par une analyse de corrélation directe suggérait que le caractère analysé était influencé par des gènes qui ont des effets mineurs et/ou qui par ailleurs pouvaient interagir entre eux. Nous avons donc procédé à une recherche de QTL en interaction selon la méthode décrite par Broman *et al.* (2003). La représentation 2D des régions en interaction a mis en évidence deux couples de régions QTL en interaction dans le contrôle de la vitesse de fermentation. Les régions des chromosomes V (position 220904-234650) et VIII (position 47367-

52112) ainsi que les régions des chromosomes XII (position 228284 - 235697) et XIV (position 149628 - 58313). Ces régions interagissent deux à deux, soit les chromosomes V et VIII et chromosomes XII et XIV.

L'analyse *in silico* des 4 régions QTL a permis d'identifier des gènes candidats potentiels selon les critères énoncés précédemment. Pour les régions QTL contenant plusieurs gènes candidats, une analyse fonctionnelle globale (couvrant la totalité du QTL) des régions a été réalisée. Chaque région chromosomique a été interrompue dans sa totalité pour construire des hémizygotes. Cela a conduit à l'obtention de différentes combinaisons d'allèles parentaux dans un fond diploïde afin de tester les interactions alléliques V - VIII et XII - XIV. L'évaluation des capacités fermentaires des clones en milieu carencé en azote n'a toutefois pas permis de mettre en évidence de différences de comportement entre les combinaisons alléliques étudiées (clones testés sur milieu synthétique avec suivi en ligne des cinétiques fermentaires avec milieu à 120 mg/L d'azote assimilable ainsi que à 70 mg/L). Ceci suggère que les régions concernées n'ont pas d'impact significatif sur le besoin en azote des levures.

2.2. Développement d'outils de mesure simplifiés du besoin en azote

L'objectif de ce projet était pour les partenaires des filières vin et Cognac de caractériser la signification technologique des différences de besoin en azote des souches de *S. cerevisiae* et d'évaluer le potentiel de souches faiblement exigeantes dans le cadre pratique des vinifications (exploration des collections sur la base de tests génétiques et amélioration/sélection de nouvelles souches le cas échéant). Il s'agissait aussi d'adapter les conditions de mesure pour transférer le test phénotypique développé par l'UMR SPO (INRAE-IA Montpellier, Université Montpellier) dans les conditions opérationnelles des laboratoires de l'IFV et du BNIC.

Pour répondre à cet objectif, l'IFV et le BNIC ont travaillé sur la mise au point de tests phénotypiques **simplifiés** permettant d'évaluer le besoin azoté d'une souche de levure. Les travaux réalisés ont consisté à :

- transférer le test phénotypique SPO dans les conditions opérationnelles des laboratoires de l'IFV et du BNIC : sur milieu de culture synthétique simplifié, plus adapté aux contraintes de ces laboratoires, ou sur des moûts naturels ;
- définir les indicateurs de cinétiques fermentaires qualifiant le mieux les besoins en azote des souches ;
- comparer le comportement des souches de référence « forts et faibles besoins en azote » sur les milieux synthétiques et les moûts de raisin.

2.2.1. Mise au point d'un milieu synthétique simplifié

Le milieu synthétique utilisé par l'UMR SPO est complexe et se prête mal à une utilisation en routine par les instituts de recherche appliquée. L'étude de la composition de différentes bases nutritives complexes du commerce ainsi que le dosage des acides aminés dans les moûts d'Ugni blanc (BNIC) ou de moût de Melon et Chardonnay (IFV) a conduit à définir un milieu synthétique se rapprochant de la composition d'un moût naturel, mais beaucoup plus facile à préparer que le milieu synthétique développé par INRAE. Ce milieu a été testé par l'IFV et le BNIC en petits volumes dans les conditions propres à leurs laboratoires (suivi en ligne des fermentations par mesure du dégagement de CO₂, sans agitation et à température ambiante pour l'IFV, suivi quotidien des fermentations sous agitation et à 28°C, par pesée pour le BNIC). Les résultats obtenus pour les deux souches de référence ont montré que le milieu simplifié mis au point répond aux spécifications attendues :

- Il est proche de la composition du milieu SPO de référence mais beaucoup plus simple à préparer ;
- il génère des cinétiques de fermentation proches de celle obtenue avec le milieu SPO et

permet discriminer efficacement les souches de référence à fort (T73) et faible besoins azotés (L2868).

2.2.2. Evaluation des besoins en azote sur moûts

Les souches de référence L2868 (LNR) et T73 (HNR) ont été testées sur 5 moûts d'Ugni blanc présentant des teneurs en azote assimilables (de 83 à 174 mg/L) et en sucres variables (de 151 à 197 g/L). Le suivi des fermentations par pesée (2 pesées par jour) a permis de définir le temps nécessaire à la dégradation de 90 % des sucres. Quel que soit le moût considéré, les souches sont correctement discriminées (durée de la fermentation systématiquement plus courte pour la souche à faible besoin en azote). La discrimination des souches est cependant plus marquée pour les matrices présentant un rapport sucres/azote assimilable élevé (conditions de fermentation plus difficiles).

L'absence d'interaction entre l'effet matrice et l'expression du caractère fort ou faible besoin en azote des souches permet de valider la possibilité de réaliser les tests sur moûts. Pour optimiser la discrimination des souches testées, il convient de choisir un moût présentant un TAV_p (Titre Alcoométrique Volumique potentiel) compris entre 10 et 12 % vol. et des teneurs en azote assimilable de l'ordre de 100 mg/L. De plus, les références L2868 et T73 doivent systématiquement être incluses dans l'essai afin de relativiser les résultats des tests.

2.2.3. Indicateurs de la cinétique fermentaire permettant de discriminer les souches à forts et faibles besoins en azote

Ce travail a été réalisé par l'IFV qui a la capacité de suivre en ligne 20 modalités simultanément grâce à des fermenteurs dont le dégagement de CO₂ est mesuré en temps réel tout au long de la fermentation.

Les deux souches de références L2868 et T73 ont été testées sur le milieu synthétique SPO ajusté à deux teneurs en azote (125 mg/L versus 425 mg/L). Chaque modalité a été répétée 3 fois.

L'analyse statistique des résultats indiquent que 4 descripteurs de fermentation sont pertinents pour discriminer les souches : le CO₂ cumulé à 120h et 150h, la pente après V_{max} sur 48h, et le temps correspondant au V_{max}. Ces descripteurs peuvent caractériser les besoins en azote de la levure sans attendre la fin de la fermentation alcoolique. Il faut 150 heures, soit 6,25 jours, pour déterminer les quatre descripteurs. Il est donc possible de programmer un essai par semaine, ce qui est intéressant pour tester de nombreuses modalités.

2.3. Signification œnologique des besoins en azote des souches de *S. cerevisiae*

Les essais réalisés ont eu pour objectif de qualifier l'intérêt œnologique de souches à faible besoin en azote pour, le cas échéant, valoriser ces souches au niveau de la pratique.

Étude comparative des effets des suppléments azotés et des effets souches

En pratique, pour prévenir les fermentations alcooliques trop lentes ou languissantes (fins de fermentations difficiles) les vinificateurs supplémentent couramment les moûts en azote ammoniacal, sans tenir compte du besoin en azote des souches de levure apportées. L'utilisation d'une souche présentant de faibles besoins en azote pourrait permettre de diminuer les apports d'azote lorsque ceux-ci sont uniquement motivés par la maîtrise des cinétiques de fermentation. Elle pourrait permettre également de mieux contrôler les difficultés de fermentation en conditions difficiles, parfois non

compensées par l'augmentation des doses de compléments azotés.

Les essais ont été réalisés sur un moût d'Ugni blanc dont l'équilibre sucres (TAVp (10.8% vol) / azote assimilable (83 mg/L)) nécessiterait en pratique une complémentation azotée. Les cinétiques fermentaires de 5 souches (dont les 2 souches de référence L2868 et T73) ont été suivies et comparées sur ce moût en absence de complémentation azotée ou additionné de 10, 20 et 30 g/hL de phosphate di-ammonique (DAP). Les durées de fermentation nécessaires à l'achèvement des fermentations ainsi que l'analyse des sucres mesurée pour 90 % de réalisation de la fermentation ont permis de caractériser les effets respectifs des effets souches (besoins en azote) et ajouts de DAP.

Les ajouts à 30g/hL de DAP sont très efficaces pour assurer l'achèvement des fermentations des souches très exigeantes (T73) ou moyennement exigeantes en azote (FC9, 7013). On note cependant que ces ajouts ramènent les performances fermentaires à un niveau comparable, voire légèrement inférieur à celui des souches peu exigeantes en azote (L2868, 4car1), utilisées dans le moût non supplémenté. Ces essais montrent donc l'intérêt œnologique pratique de l'utilisation de souches peu exigeantes pour réduire l'ajout de sels d'ammonium dans les moûts. La relation entre le besoin en azote des souches et la composition analytique des vins a également été étudiée. L'analyse physicochimique des vins et des composés volatils réalisée sur les micro-distillats de vins ne permet pas d'établir de relation entre la performance fermentaire des souches et la synthèse de composés volatils impliqués dans la qualité.

Conclusion et perspectives

Les souches de *S. cerevisiae* présentent une forte diversité dans leur capacité à achever les fermentations dans des milieux pauvres en azote. Mieux comprendre les bases génétiques de ce trait peut faciliter l'amélioration et la sélection des souches. Les démarches de recherche de QTL développées ont permis d'identifier des régions de génome potentiellement impliquées dans ce caractère. Les données suggèrent toutefois qu'il est soumis à un contrôle multigénique voire à des gènes en interaction qui rendent l'identification des gènes clés difficile. Il n'a de fait pas été possible de démontrer l'implication d'un gène avec un impact fonctionnel sur ce caractère. Le dispositif génétique construit dans ce projet sera encore étendu pour améliorer la capacité de résolution pour de nouvelles démarches de recherche de QTL.

La possibilité d'évaluer aisément le besoin en azote dans des conditions proches des situations industrielles est un élément important pour élargir le spectre des souches testées. Les résultats obtenus ont permis de définir des conditions de mesure du besoin en azote utilisables par les acteurs des filières. Par ailleurs, les travaux menés ont montré l'intérêt œnologique des souches faiblement exigeantes en azote. Ces souches (non commerciales) sont en cours d'évaluation à l'échelle pilote au BNIC. La qualité des eaux de vie obtenues à l'issue de ces essais pourra conduire à une production industrielle de ces souches pour une future commercialisation, en relation avec les partenaires du projet l'IFV et INRAE SPO.

Références Bibliographique

- Bell SJ, Henschke PA., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11 (3): 242–295.
- Bely M, Sablayrolles JM, Barre P., 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 70(4): 246-252.
- Bezenger MC, Navarro JM., 1987. Influence de l'azote sur la fermentation alcoolique en milieu modèle simulant les conditions de l'oenologie. *Sci. Alim*. 7: 41–60.
- Blateyron L, Sablayrolles JM., 2001. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *J. Biosci. Bioeng*. 91: 184–189.
- Brice C, Sanchez I, Tesnière C, Blondin B., 2014. Assessing the mechanisms responsible for differences in nitrogen requirements between *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts in alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*. 80: 1330-1339.
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA., 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-890.
- Deutschbauer AM, Davis RW., 2005. Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast. *Nat. Genet*. 37(12): 1333-1340.
- Manginot C, Sablayrolles JM, Roustan JL, Barre P., 1997. Use of constant rate alcoholic fermentations to compare the effectiveness of different nitrogen sources added during the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol*. 20: 373–380.



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

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