N° Ordre : …..

Année 2006

Thèse

Présentée pour obtenir

Le Titre de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Ecole doctorale : ***Transferts, Dynamique des Fluides, Energétique et Procédés***
Spécialité : ***Génie des Procédés et de l'Environnement***

Par **Pascal BARBIN**

CONTRÔLE ET ELEMENTS DE MAITRISE DE LA CONTAMINATION PAR LA LEVURE *BRETTANOMYCES* AU COURS DU PROCEDE DE VINIFICATION EN ROUGE.

Soutenance le 24 Novembre 2006, devant le jury composé de :

Prof. STREHAIANO Pierre	Président
Prof. LONVAUD-FUNEL Aline	Rapporteur
Prof. BLONDIN Bruno	Rapporteur
M. GILIS Jean-François	Examinateur
M. DUCOURNAU Patrick	Membre invité
M. PHILIPPE Pierre	Membre invité
Mme TAILLANDIER Patricia	Directrice de thèse

RESUME

Les levures du genre *Dekkera/Brettanomyces* sont reconnues comme les agents de contamination des vins rouges responsables des défauts phénolés et animaux. Une procédure complète de dépistage et d'isolement a été développée en associant plusieurs critères discriminants. Elle a permis de confirmer la présence du contaminant tout au long du procédé, de la matière première (raisins sur pieds), au produit fini (vin en bouteilles). Des études de terrain, en amont du procédé de vinification ont mis en avant l'existence de profils hétérogènes de présence sur les parcelles de vigne du fait de paramètres environnementaux. Des facteurs à la vigne, tels que l'humidité, influent sur la présence du contaminant sur les baies de raisin. Des études en laboratoire sur des souches isolées de *Brettanomyces bruxellensis*, ont révélé une très grande diversité au sein de l'espèce. Cette variabilité intra-spécifique s'exprime à différents niveaux : génétique, phénotypique et physiologiques. Les profils de croissance, la consommation des substrats (carboné et azoté), la production de 4-éthyl-phénol et d'acide acétique ont constitué autant d'éléments de différenciation entre les souches étudiées. Nous avons par ailleurs montré que l'emploi d'adjuvants œnologiques n'est pas sans conséquence sur le développement de la levure et son activité contaminante. Ainsi la thiamine (à raison de 6 mg/hL), l'azote ajouté sous forme de sulfate d'ammonium, ou encore les tanins œnologiques (de raisin et de bois) favorisent dans une certaine mesure le développement de *Brettanomyces*. Pour chacun de ces adjuvants les effets sur la croissance et la production d'éthyl-phénol sont différents.

Mots-clé : *Dekkera*/*Brettanomyces* ; environnements vitivinicoles ; dépistage ; diversité ; croissance ; 4-éthyl-phénols ; adjuvants œnologiques.

ABSTRACT

Yeast Dekkera/*Brettanomyces* is a contaminant responsible for red wine spoilage implying the development of animal and phenolic off-odours. A complete procedure, using a combination of simple discriminating criteria, has been developped to detect and isolate the contaminant. Results proved the presence of the contaminant from various winemaking environments from grape berries to bottled wines. We also showed that environmental factors, such as humidity, play an important role on the presence of the contaminant on berries surface. Moreover, a huge diversity was described among the *Brettanomyces bruxellensis* species : from genetical level to physicological and phenotypical aspects. Growth profiles, susbtrates consumption, volatiles phenol and acetic acid productions varied significantly from one isolated strain to another. Our studies revealed that the use af complement during the winemaking process also has an influence on the contaminant developpement. Thiamin (at 0,6 mg/L), nitrogen (from $(NH_4)_2SO_4$) and tannins powder modified both growth and volatile phenols in different ways and levels.

Keywords : *Dekkera/Brettanomyces ;* wine-making environments ; detection ; diversity ; growth ; 4-ethyl-phenol ; enolocigal complements.

ॐ मणि पद्मे हूँ

L'éveil réside en tout.

A ma famille
A Math'

R E M E R C I E M E N T S

Une thèse est rarement le fruit d'un parcours en solo, mais bel et bien le résultat d'une multitude de rencontres, de volontés encouragées et encourageantes, d'efforts communs, de réflexions, de soutiens, d'interrogations, de réponses partagées.

Mon travail n'a pas échappé pas à cette règle. A ce titre je voudrais remercier l'ensemble des personnes qui de prés ou de loin ont permis l'avancée et l'aboutissement de mes travaux mais également mon épanouissement personnel.

En premier lieu, je remercie l'ensemble du Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse, et plus particulièrement le Professeur Pierre STREHAIANO, pour son accueil au sein du Département de recherche « Bioprocédés et Systémes Microbiens ».

Je tiens tout également à remercier mes partenaires industriels, La Cave des Vignerons de Buzet (en les personnes de Pierre PHILIPPE et Pascal LAMOTHE) et la société Oenodev (en la personne de Patrick DUCOURNAU), qui m'ont fait confiance pendant ces 3 dernières années et m'ont ainsi permis de mener à ma manière un épisode de la bataille Anti-Brett.

J'exprime toute ma gratitude aux professeurs Aline LONVAUD-FUNET et Bruno BLONDIN pour avoir accepté de juger mon travail et d'en être ainsi rapporteurs.

Une pensée chaleureuse pour Patricia TAILLANDIER qui bien plus qu'une directrice de thèse a été pour moi une source de motivation, de courage, d'ambition et bien souvent de sur-passement. « La vie d'un thésard n'est pas toujours rose, même à Toulouse … mais lorsqu'on a comme moi la chance de vivre cette expérience avec une chef à ton image, on ne peut que retrouver la confiance en soi, l'envie d'avancer et les ressources nécessaires pour accompagner cette volonté de faire encore mieux. Chaque jour passé, pour tes de bons conseils et es encouragements généreusement offerts avec le sourire et la bonne humeur … MERCI PAT ! »

Je suis reconnaissant à Jean-François GILIS, … pour son encadrement, ses bonnes idées, et sa complicité … tel a été le cocktail efficace qui a alimenté notre relation pendant ces 3 ans, au détour d'une conversation téléphonique sans fin, ou d'une journée harassante passée dans les vignes.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux personnes travaillant à La Cave de Buzet, qui me voyant débarquer en blouse blanche au pied des cuves ont su immédiatement m'apporter leur aide précieuse si minime puissent ils penser qu'elle ait été.

A toute l' « équipe bio » merci pour m'avoir fourni un environnement de travail scientifiquement et par-dessus tout humainement riche.

A mes collègues et compagnons de fortune mais aussi d'infortune dans notre quotidien de thésard ou assimilé, je souhaite exprimer ma sincère amitié en remerciement à vos sourires, vos encouragements, votre soutien, vos délires, votre joie partagée, et votre solidarité.
… Et vous, plus particulièrement les habitués de la Kfèt : qui est partant pour une nouvelle partie ?

Je m'en voudrais d'oublier de remercier les personnes du service STMV de l'ENFA pour leur accueil formidable. Tout particulièrement, merci Olivine et merci Nathalie pour votre générosité, votre disponibilité constante et vos sourires à chacun de mes trop brefs passages.

Je ne peux évidemment pas oublier mes professeurs et mes collègues de promo du Diplôme National d'Oenologue de Toulouse. Merci le DNO2006 pour ses bons moments de professionnalisme hédoniste partagés lors de mes présences parfois furtives.

Enfin, les remerciements particuliers et spéciaux.
(je plaide coupable pour ce favoritisme dicté par le cœur… …mais qui m'en blâmera ?)

UN IMMENSE MERCI A MA MERE, MON PERE ET MON FRERE : si aujourd'hui je suis là, c'est grâce à vous et à votre soutien en toute circonstance.

MATHIEU, MALLORIE, NATHALIE, MERCI du fond du cœur pour tout ce que vous m'avez si généreusement apporté. Vous m'avez simplement permis d'avancer chaque jour un peu plus. MERCI D'AVOIR ETE ET D'ÊTRE A MES COTES !!!

- Tables des Matières -

SOMMAIRE

- INTRODUCTION GENERALE - ***1***

- CHAPITRE 1 - CONTEXTE ET PARTENAIRES ***5***

1 – Contexte. **7**
2 – La Cave des Vignerons de Buzet. **7**
2.1 – Présentation générale de la Cave de Buzet. *7*
2.1.1 – Vignoble de Buzet. 8
2.1.2 – Bref historique 8
2.1.3 – Production. 8
2.1.4 – Gamme de produits. 9
2.1.5 – Le marché. 9
2.1.6 – Ressources humaines. 9
2.2 – Les structures de Production. *9*
2.2.1 – Caves de vinification. 9
2.2.2 – Chais à barriques. 10
2.2.3 – Chaînes d'embouteillage. 10
2.3.1 – Gestion des apports. 10
2.3.2 – Principaux choix dans la conduite des vinifications. 10
2.3.2.1 – Ensemencements. 10
2.3.2.2 – Enzymage. 11
2.3.2.3 – Compléments azotés. 11
2.3.2.4 – Sulfitages. 11
2.3.2.5 – Températures de fermentation. 11
2.3.2.6 – Aération. 11
2.3.2.7 – Fermentation malo-lactique 12
2.3.2.8 – Elevage. 12
2.3.3 – Exemple de Vinification des Premium. 12
3 – OENODEV. **16**
3.1 – La création *16*
3.2 – La société : complémentarité entre Recherche et Pratique *16*

- CHAPITRE 2 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ***19***

1 – *Brettanomyces* ... une levure à plusieurs facettes. **21**
1.1 – Taxonomie. *21*
1.2 – Un brin d'histoire *21*
1.3 – Alors, amie ou ennemie ? … question de point de vue ! *23*
1.3.1 – Traditions et potentialités : Brett, je ne te hais point. 23
1.3.2 – Le revers de médaille : un sérieux agent de contamination. 24
2 – Caractérisations phénotypiques et physiologiques. **25**
2.1 - Une levure polymorphe. *25*
2.2 – Un métabolisme surprenant *25*
2.2.1 – Sources carbonées et azotées, besoins nutritionnels. 25
2.2.1.1 – Les sucres. 25
2.2.1.2 – L'éthanol. 26
2.2.1.3 – L'acide acétique. 27
2.2.1.4 – Autres substrats carbonés ? 27
2.2.1.5 – Formes azotées. 27
2.2.1.6 – Vitamines 28
2.2.1.7 – En résumé : … des besoins simples. 28

2.2.2 – Effet Custer et effets de l'oxygéne. 28
2.2.3 – Résistance à la cycloheximide (actidione). 32

3 – *Brettanomyces* dans le secteur viti-vinicole. 32
3.1 - Les vins animaux. *32*
3.1.1 – Les phénols volatiles. 32
3.1.1.1 – Les molécules mal-odorantes 32
3.1.1.2 – Faites entrer l'accusé. 33
3.1.1.3 – Biosynthèse des Phénols Volatils (par *Brettanomyces*). 34
3.1.2 - Les tétrahydropyridines. 36
3.1.3 – Les autres défauts organoleptiques imputables à *Brettanomyces.* 37
3.1.3.1 – Détérioration prématurée des caractères fruités. 37
3.1.3.2 – Les acides organiques. 37
3.1.4 – Un défaut encore difficilement cerné. 37
3.2 – Origines et foyers de contamination : *38*
3.2.1 – *Brettanomyces* sur le raisin. 38
3.2.2 – *Brettanomyces* dans les chais. 38
3.2.3 – *Brettanomyces* dans les moûts. 39
3.2.4 – *Brettanomyces* dans les barriques. 39
3.2.5 – Vecteurs de propagation. 40
3.3 – Dépistage de Brettanomyces. *41*
3.3.1 – Milieux sélectifs. 41
3.3.2 – Profils d'acides gras. 43
3.3.3 – Suivi des éthyl-phénols. 43
3.3.4 – Galeries d'identification. 44
3.3.5 – Méthodes génétiques. 44
3.3.5.1 – Sondes Nucléiques – PNA (Peptide Nucleic Acid). 45
3.3.5.2 – PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne). 45
3.3.6 – Moyens de lutte. 46
3.3.6.1 – Sulfitage. 46
3.3.6.2 – Traitements mécaniques/physiques. 47
3.3.6.3 – Traitements « chimiques ». 48
Conclusion de l'analyse bibliographique 49

- CHAPITRE 3 - MATERIELS ET METHODES *53*

1 – Milieux de culture. 55
1.1 – Conservation. *55*
1.2 – Milieux sélectifs de dépistage et d'isolement de Brettanomyces. *55*
1.2.1 – Milieux d'Enrichissement en Phase Liquide (MEPL) 55
1.2.1.1 – Echantillons « non sucrés » mais contenant de l'alcool 55
1.2.1.2 – Echantillons « non sucrés » mais ne contenant pas d'alcool 55
1.2.1.3 – Echantillons « sucrés » 56
1.2.2 – Milieu Solide BiTest (MSBT) 56
1.2.3 – Milieu Solide pour Numération (MSN) 56
1.3 – Milieux sélectifs de dépistage et d'isolement d'autres micro-organismes. *56*
1.3.1 – Milieu solide pour numération de bactéries. 56
1.3.2 – Milieux solides pour dépistage et isolement des champignons filamenteux. 57
1.4 – Milieux pour fermentation. *57*
1.4.1 – Pré levain et Levain. 57
1.4.2 – Milieu synthétique de base, type vin (SMW : Synthetic Wine Medium) 58
1.4.3 – Milieu synthétique, avec modifications. 58
1.4.3.1 – SWM avec Azote assimilable réduit à 50 mg/L 58
1.4.3.2 – SWM avec Thiamine. 58

1.4.3.3 – SWM avec Poudre de tanins de raisin.... 58
1.4.3.4 – SWM, sans acide para-coumarique.... 59
1.4.3.5 – SWM, avec acide gluconique.... 59
1.4.3.6 – SWMcoum0, avec acide gluconique.... 59
1.4.4 – Milieux Vin Corrigé. 59
1.4.4.1 – Milieu de base : Vin Corrigé MVC.... 59
1.4.4.2 – Milieux Vin Corrigé complétés en poudre de tanins.... 60
1.4.4.3 – Milieu Vin Corrigé et Traité au PVP. 60
2 – Cultures en Erlenmeyer. 60
2.1 – Pré-cultures. 60
2.2 – Culture principale. 61
3 – Etapes du dépistage *Brettanomyces* dans l'environnement viti-vinicole. 61
3.1 – Echantillonnage. 61
3.1.1 – Echantillons de raisin. 61
3.1.2 – Moût et Vin encuvés.... 62
3.1.3 – Vins embouteillés. 62
3.1.4 – Résidus, dépôts et échantillons solides.... 62
3.1.5 – Echantillons de surfaces. 62
3.1.6 – Echantillons liquides divers, eaux de rinçage, eaux résiduaires. 63
3.2 – Traitement des échantillons et mise en enrichissement. 63
3.2.1 – Echantillons de raisin. 63
3.2.2 – Moût et Vin encuvés et vins finis.... 64
3.2.3 – Echantillons solides et de surface.... 64
3.2.4 – Echantillons liquides divers (eaux résiduaires, de rinçage, …) 64
3.3 – Contrôle du développement microbien après la phase d'enrichissement.... 64
3.4 – Test sur milieu solide.... 65
3.5 – Identifications génétiques.... 66
3.5.1 – Identification de l'espèce.... 66
3.5.2 – Typage intra-spécifique des *Brettanomyces bruxellensis* par Restriction Enzymatique et Electrophorèse en Champ Pulsé. 66
4 – Dépistage d'autres micro-organismes ; champignons filamenteux : *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* et bactéries acétiques. 67
5 – Matériel biologique : Souches employées dans les études. 67
6 – Techniques et Méthodes analytiques. 68
6.1 – Evaluation de la biomasse.... 68
6.1.1 – Méthode gravimétrique : détermination du Poids Sec. 68
6.1.2 – Densité Optique.... 68
6.1.3 – Numération cellulaire. 69
6.1.3.1 – Population totale.... 69
6.1.3.2 – Population viable.... 69
6.1.4 – Numération sur boites.... 70
6.1.5 – Observation et Photographies. 70
6.2 – Dosages. 71
6.2.1 – Sucres.... 71
6.2.1.1 – Sucres réducteurs totaux : DNS.... 71
6.2.1.2 – Glucose : analyseur biochimique.... 72
6.2.2 – Azote assimilable. 72
6.2.2.1 – Titrage au formol.... 72
6.2.2.2 – Dosages à l'aide de l'analyseur multi-paramétrique sélectif.... 73
6.2.3 – Ethanol, acide acétique et glycérol.... 74
6.2.4 – 4-éthyl-phénol. 75
6.2.4.1 – Principe général du dosage par MEPS/CPG.... 75
6.2.4.2 – Application au dosage du 4-éthyl-phénol.... 76
6.2.5 – Acide para-coumarique.... 77

6.3 – Mesure d'Oxygène dissous. *77*
7 –Traitements de données **78**
7.1 – Bilans Carbone et Azote. *78*
7.2 – Calculs des rendements. *80*
7.3 – Lissage des données expérimentales. *80*
7.4 – Traitements statistiques : Comparaison de proportions - Test de χ^2 ..... *81*

- CHAPITRE 4 – RESULTATS ET DISCUSSIONS ***83***

MODULE A. Dépistages et Isolements ***85***

1 – Procédure de dépistage et d'isolement. **87**
1.1 – Mise en place de la méthode *87*
1.1.1 – Les critères discriminatoires retenus pour cibler *Brettanomyces*. 89
1.1.2 – Les étapes de la méthode. 89
1.1.3 – Une méthode non quantitative. 90
1.2 – Efficacité de la méthode. *92*
1.3 – Appui de l'outil génétique. *93*
2 – Influence de la durée de la première étape : activation et enrichissement. **94**
2.1 – Description générale de l'expérimentation. *95*
2.2 – Echantillons de baies de raisin. *96*
2.3 – Echantillons de vin en cours d'élaboration, post fermentation alcoolique *97*
2.3.1 – Echantillons "frais", prélevés et traités dans un laps de temps réduit. 97
2.3.2 – Echantillons "vieux", traitement longtemps après le prélèvement. 98
2.4 – Echantillons de vins finis et embouteillés *99*
2.5 – Echantillons « solides ou assimilés» *100*
3 – Résultats globaux. **100**
3.1 – Dépistages. *100*
3.2 – Isolements. *101*
Résumé du module **103**

MODULE B. Etudes à la vigne ***105***

1 – Avant – propos : Présence confirmée de *Brettanomyces* sur le raisin. **107**
1.1 – Point de départ : les premières études réalisées par Œnodev … *107*
1.2 – … le point d'arrivée : Bilan général des dépistages lors des études à Buzet *108*
2 – Etude d'une parcelle en l'état : Parcelle X. Profil de présence de la levure. **108**
2.1 – Présentation de l'étude et particularités de la parcelle. *108*
2.2 – Échantillonnages sur la parcelle. *109*
2.3 – Résultats des dépistages Brettanomyces. *110*
2.3.1 – Année 2004. 110
2.3.2 – Année 2005. 111
2.3.2.1 – Dépistage du 12 Septembre 2005 (18 jours avant vendange). 111
2.3.2.2 – Dépistage du 29 Septembre 2005 (2 jours avant vendange). 112
2.4 – Observations et études complémentaires. *113*
2.4.1 – Zones d'ombre. 113
2.4.1.1 – Observation, caractérisation. 113
2.4.1.2 – Lien avec *Brettanomyces* ? 115
2.4.2 – Présence de baies abîmées. 116
2.4.2.1 – Observation. 116
2.4.2.2 – Présence de *Brettanomyces*. 117
2.4.3 – Microflore « annexe » 118

2.4.3.1 – Champignons filamenteux. 118
2.4.3.2 – Bactéries acétiques. 120
2.4.3 – Vendange et vinification de la parcelle X, en 2005. 121
3 – Parcelles expérimentales : étude de paramètres à la vigne sur la présence de *Brettanomyces* sur le raisin. 121
3.1 – Pré-étude de 2004. 121
3.1.1 – Présentation de l'expérimentation. 121
3.1.2 – Réalisations pratiques des rangs expérimentaux. 122
3.1.3 – Echantillonnages. 124
3.1.4 – Echantillons supplémentaires. 124
3.1.4.1 – Série λ 124
3.1.4.2 – Série γ 125
3.1.6 – Auto-critiques sur la pré-étude 126
3.2 – Etude 2005. Parcelle pilote. 127
3.2.1 - Modalités et réalisations pratiques. 127
3.2.1.1 – La parcelle 127
3.2.1.2 – Les arrosages 128
3.2.1.3 – Utilisation de traitement antiBotrytis. 133
3.2.1.4 – Le rang « Frappé ». 134
3.2.1.5 – Récapitulatif des modalités. 135
3.2.2 – Echantillonnages et dépistages 135
3.2.2.1 – Recherche de *Brettanomyces* 135
3.2.2.2 – Recherche de champignons filamenteux. 135
3.2.2.3 – Recherche de *Botrytis cinerea*. 135
3.2.3 – Résultats 136
3.2.3.1 – Prélèvements du 16 Septembre 2005 136
3.2.3.2 – Prélèvements du 26 Septembre 2005. 137
3.2.4 – Vinification. 142
Résumé du module 145

MODULE C. Problémes de quantification en laboratoire 147

1 – Avant – propos. 149
2 – Numération avec cellule de Thomas et mesure de la Densité Optique. 149
3 – Numération sur boites. 152
4 – Problèmes de détermination de la Viabilité. 154
4.1 – Exemple de la Souche B. 154
4.2 – Exemple de la Souche Q. 158
Résumé du module 161

MODULE D. Diversité au sein de l'espèce B. bruxellensis. 163

1 – Diversité génétique. 165
2 – Diversité phénotypique. 168
2.1 – Avant propos : Diversité morphologique. 168
2.2 – Fermentations sur milieu synthétique vin 169
2.2.1 – Les sucres. 169
2.2.1.1 – Profils de consommation 169
2.2.1.2 – Consommation simultanée des deux sucres : Glucose et Fructose. 171
2.2.2 – Croissance. 173
2.2.2.1 – Les profils de croissance. 173
2.2.2.2 – La biomasse finale. 175
2.2.2.3 – Latence apparente et phases stationnaires. 176
2.2.2.4 – Discussion et considérations diverses sur les profils de croissances. 180
3 – Azote assimilable. 189

4 – Production de 4-Ethyl-Phénol. 192
4.1 – Production globale et cinétique de production. 192
4.2 – Lien avec la croissance ? 194
5 – Récapitulatif des différences intra-spécifiques : Diversités. 198
Résumé du module 201

MODULE E. Etudes et Implications en Œnologie 205

1 – Cultures en milieux vin. 207
1.1 – Fermentations en Milieu Vin Corrigé. 207
1.1.1 – Croissance. 207
1.1.2 – 4-éthyl-phénol. 210
1.1.3 – SWM, un milieu de culture complet mais un modèle incomplet du vin. 211
1.2 – Milieu Vin Corrigé « partiellement dé-phénolisé ». 211
1.2.1 – Avant-propos : préparation du milieu. 211
1.2.2 – Croissance. 212
1.2.3 – 4-éthyl-phénol. 215
2 – Effet d'adjuvants œnologiques. 215
2.1 – Avant propos. 215
2.2 – Influence de l'azote assimilable, apporté sous forme de $(NH_4)_2SO_4$. 216
2.3 – Influence de la Thiamine. 219
2.3.1 – Avant propos. 219
2.3.2 – Croissance. 220
2.3.3 – 4-éthyl-phénol. 222
2.4 – Influence des tanins œnologiques. 222
2.4.1 – Avant propos. 222
2.4.2 – Croissance. 224
2.4.3 – 4-Ethyl-phénol. 226
2.4.4 – Synthèse. 227
3 – Influence de la teneur en Acide Gluconique. 227
3.1 – Avant-propos. 227
3.2 – Cultures en présence d'acide para-coumarique. 228
3.2.1 – Croissance. 228
3.2.2 – 4-Ethyl-phénol. 230
3.3 – Cultures en absence d'acide para-coumarique. 230
3.4 – Synthèse. 232
Résumé du module 233

- CONCLUSION GENERALE - 235

- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES - 243

- ANNEXES - 257

Liste des Figures

Figure 01-1. Logo de la Cave des Vignerons de Buzet. *7*

Figure 01-2. Schéma de vinification : vins Premium. *15*

Figure 01-3. Logo de la société Oenodev. *16*

Figure 01-4. Rayonnement international de la société Oenodev. *17*

Figure 01-5. Oenodev, un ensemble d'activités de conseils. *18*

Figure 02-1. Balances oxydatives du NAD chez les levures. *31*

Figure 02-2. Réduction de l'acétoïne : régénération du cofacteur NAD^+. *31*

Figure 02-3. Réactions de biosynthèse des éthyl-phénols par Brettanomyces. *35*

Figure 02-4. Acides phénols du vin. *35*

Figure 02-5. Exemples de tétrahydropyridines : l'odeur de souris dans le vin. *36*

Figure 02-6. Formule du DMDC. *49*

Figure 03-1. Echantillonnage de Raisin. *61*

Figure 03-2. Corrélation Volume de moût obtenu = f(Masse de raisin écrasé). *63*

Figure 03-3. Observations au microscope d'échantillons après enrichissement. *65*

Figure 03-4. Schéma d'une cellule de THOMA. *69*

Figure 03-5. Réaction du DNS avec un sucre réducteur. *71*

Figure 03-6. Méthode MEPS : montage pour la phase d'adsorption. *76*

Figure 03-7. Principe de la mesure d'oxygène par capteur LDO. *78*

Figure 04A-1. Sélections successives. *88*

Figure 04A-2. Procédure de dépistage et d'isolement. *91*

Figure 04B-1. Parcelle X : mise en avant du relief marqué de la parcelle. *109*

Figure 04B-2.Parcelle X : les trois frontières et topographie générale. *109*

Figure 04B-3. Parcelle X en 2004, veille de vendange: présence de Brettanomyces. *110*

Figure 04B-4. Parcelle X en 2005,12 septembre 2005: présence de Brettanomyces. *111*

Figure 04B-5. Parcelle X en 2005, avant veille de vendange, 29 septembre 2005: présence de Brettanomyces. *112*

Figure 04B-6. Parcelle X. Présence d'une zone d'ombre matinale. *114*

Figure 04B-7. Localisation des baies abîmées sur la parcelle X, septembre 2005. *116*

Figure 04B-8. Parcelle X, 2005, baies abîmées. *117*

Figures 04B-9. Parcelle X, 12 septembre 2005. Profil de présence de Penicillium et d'Aspergillus. *119*

Figures 04B-10. Parcelle X, 29 septembre 2005. Profil de présence de Penicillium et d'Aspergillus *119*

Figures 04B-11. Parcelle X, Profil de présence de Bactéries acétiques. *120*

Figure 04B-12. Organisation type des rangs expérimentaux, 2004. *123*

Figure 04B-13. Répartition des points d'échantillonnage sur les rangs expérimentaux lors de la recherche de Brettanomyces. *124*

Figure 04B-14. Utilisation de la Parcelle de Merlot pour mise en place d'une parcelle Pilote. *127*

Figure 04B-15. Ligne d'arrosage mise en place sur la parcelle pilote. *128*

Figure 04B-16. Champ d'action d'un élément d'arrosage {canne + sprinkler}. *129*

Figure 04B-17. Schéma du bâchage de rang. *130*

Figure 04B-18. Condensation sous les bâches. *131*

Figures 04B-19. Montages pour les différents niveaux d'humidité sur la parcelle pilote. *131*

Figure 04B-20. Mesure de l'humidité et de la température dans l'environnement des grappes. *132*

Figure 04B-21. Grappe de raisins du rang « Frappé » . *134*

Figure 04B-22. Parcelle pilote, disposition des différentes modalités. *135*

Figure 04B-23. Photographies de grappes botrytisées sur les rangs arrosés de la parcelle pilote. *140*

Figure 04B-24. Parcelle pilote. Concentration en potassium des différents moûts. *144*

Figure 04C-1. Souche B. Suivi par comptage avec la cellule de Thoma. *150*

Figure 04C-2. Souche B. Suivi par mesure de DO_{620}. *150*

Figure 04C-3. Souche B. Comparaison Numération sur cellule de Thoma et mesure de DO_{620}. *151*

Figure 04C-4. Souche B. Evolution morphologique en cours de culture sur milieu synthétique. *152*

Figure 04C-5. Souche B. Comparaison Numération sur cellule de Thomas et étalement sur gélose. *153*

Figure 04C-6. Coloration au bleu de méthylène chez Saccharomyces cerevisiae. Test de Viabilité. *154*
Figure 04C-7. Souche B. Différentes couleurs obtenues lors d'une coloration au bleu de méthylène. *155*
Figure 04C-8. Souche B. Evolution des populations totale et viables. Plusieurs hypothèses. *155*
Figure 04C-9. Souche B. Evolution des trois classes de couleur lors d'un test au bleu de méthylène. *156*
Figure 04C-10. Souche B. Comparaison entre populations viables et dénombrement sur boite. *156*
Figure 04C-11. Souche B. Seconde fermentation, suivis des différentes populations. *157*
Figure 04C-12. Souche Q. Evolution des populations totale et viables. *159*
Figure 04C-13. Souche Q. Evolution de la viabilité en cours de fermentation sur milieu SWM. *160*

Figure 04D-1. Profils ECP-RE des souches A à Z. *166*
Figure 04D-2. Comparaison morphologique entre 12 souches de B. bruxellensis. *168*
Figure 04D-3. Consommation des sucres totaux par 9 souches de B. bruxellensis. *170*
Figure 04D-4. Consommation du glucose et du fructose par 3 souches de B. bruxellensis. *172*
Figure 04D-5. Profils de croissance sur milieu SWM de 9 souches de B. bruxellensis. *173*
Figure 04D-6. 3 exemples de souches définissant les profils type de croissance. *174*
Figure 04D-7. Souche B. Influence de l'inoculum sur le profil de croissance. *177*
Figure 04D-8. Souche B. Début de culture pour des ensemencements très faibles. *179*
Figure 04D-9. Consommation de l'éthanol par 9 souches de B. bruxellensis. *182*
Figure 04D-10. Production d'acide acétique par 9 souches de B. bruxellensis. *184*
Figure 04D-11. Evolution de l'oxygène dissous (pO_2) en cours de culture pour 3 souches de B. bruxellensis. *187*
Figure 04D-12. Production de 4-éthyl-phénol par 9 souches de B .bruxellensis. *194*
Figure 04D-13. Comparaison entre production de 4-éthyl-phénol et croissance chez 9 souches de B. bruxellensis. *196*

Figure 04E-1. Croissance comparée pour 3 souches de B. bruxellensis : milieu synthétique SWM et Milieu Vin Corrigé. *208*

Figure 04E-2. Vitesses spécifiques de croissance comparées pour 3 souches de B. bruxellensis : milieu synthétique SWM et Milieu Vin Corrigé (MVC). *210*

Figure 04E-3.Croissance de 3 souches de B. bruxellensis sur Milieu Vin Corrigé et Dé-phénolisé partiellement. *214*

Figure 04E-4. Croissance comparée pour 3 souches de B. bruxellensis : milieux synthétiques SWM et SWM-Azote50. *217*

Figure 04E-5. Formule développée de la Thiamine. *220*

Figure 04E-6. Comparaison des profils de croissance pour la souche B, dans différents milieux : SWM, SWM-thiamine et MVC. *220*

Figure 04E-7. Vitesses spécifiques de croissance comparées pour une souche de B. bruxellensis dans 3 milieux : SWM-Thiamine, SWM et MVC. *221*

Figure 04E -8. Croissance comparée pour une souche de B. bruxellensis dans des milieux complétés en tanins œnologiques. *224*

Figure 04/E-9. Formule de l'acide gluconique. *228*

Figure 04E-10. Croissance comparée pour une souche de B. bruxellensis, influence de la concentration en acide gluconique dans le milieu SWM. *229*

Figure 04E-11. Comparaison pour une souche de B. bruxellensis entre milieux SWM et SWMcoum0 avec différentes concentrations en acide gluconique. *231*

Liste des Taleaux

Tableau 04A-1. Démarche de validation. Echantillons fictifs. 92
Tableau 04A-2. Démarche de validation. Résultats des dépistages. 93
Tableau 04A-3. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons de baies de raisin. 96
Tableau 04A-4. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons frais de vins en cours d'élaboration. 97
Tableau 04A-5. Influence de la durée d'enrichissement pour des vieux échantillons de vins prélevés en cours d'élaboration. 98
Tableau 04A-6. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons de vins embouteillés. 99
Tableau 04A-7. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons « solides ou assimilés ». 100
Tableau 04A-8. Résultats globaux des dépistages effectués entre 2003 et 2006. 102

Tableau 04B-1. Résultats d'études préliminaires menées par Œnodev : présence de Brettanomyces sur le raisin. 107
Tableau 04B-2. Température et hygrométrie au niveau des grappes, 27 septembre 2005, 11h00 : comparatif ente zone ombragée et zone éclairée. 115
Tableau 04B-3. Parcelle X, 29 septembre 2005. Comparaison entre grappes abîmée et saine lors du dépistage de Brettanomyces. 117
Tableau 04B-4. Modalités expérimentales lors de la pré-études2004, Gueyze. 122
Tableau 04B-5. Calendrier des récoltes et des modalités. 123
Tableau 04B-6. Dépistages de Brettanomyces sur raisin, pré étude 2004. 125
Tableau 04B-7. Parcelle pilote. Relevé d'hygrométrie au niveau des grappes. 133
Tableau 04B-8. Récapitulatif des modalités sur la parcelle pilote. 134
Tableau 04B-9. Parcelle pilote. Dépistage de Brettanomyces, 16 Septembre 2005. 136
Tableau 04B-10. Parcelle pilote. Relevé des champignons filamenteux, 16 Septembre 2005. 137
Tableau 04B-11. Parcelle pilote. Dépistage de Brettanomyces, 26 Septembre 2005. 138
Tableau 04B-12. Botrytis sur la parcelle pilote. 140
Tableau 04B-13. Nombre d'échantillons positifs. Relation avec le Botrytis. 141

Tableau 04B-14. Résultat du test de comparaison des proportions : grappes saines et botrytisées. *141*
Tableau 04B-15. Vinifications des lots de la parcelle pilote. Suivis de population de Brettanomyces. *143*

Tableau 04C-1. Souche B. Bilan de population lors de la seconde fermentation. *158*

Tableau 04D-1. Origines et années d'isolement des souches de travail. *165*
Tableau 04D-2. Groupements génétiques établis à partir des profils ECP-RE. *167*
Tableau 04D-3. Biomasse et population finale après 1400 heures de culture sur milieu synthétique pour 9 souches B. bruxellensis. *175*
Tableau 04D-4. Rendement et fraction massique de carbone provenant du sucre transformée en biomasse. *176*
Tableau 04D-5. Dosage final et variation globale en azote assimilable au cours de la culture. *189*
Tableau 04D-6. Pourcentage théorique d'azote dans la biomasse. *191*
Tableau 04D-7. Fraction massique d'azote assimilée dans la biomasse et masse théorique d'azote dans la biomasse. *191*
Tableau 04D-8 – Concentration maximale en 4-éthyl-phénol ; temps de culture et population correspondants et taux de conversion molaire théorique de l'acide para-coumarique. *192*
Tableau 04D-9. Récapitulatif des différents comportements de 9 souches de B bruxellensis pendant la fermentation sur milieu synthétique. (1/2) *199*
Tableau 04D-9. Récapitulatif des différents comportements de 9 souches de B bruxellensis pendant la fermentation sur milieu synthétique. (2/2) *200*

Tableau 04E-1. Production maximale de 4-éthyl-phénol par 3 souches de B. bruxellensis (400 ± 12 heures) en Milieu Vin Corrigé et milieu synthétique SWM. *211*
Tableau 04E-2. μ_{max} pour 3 souches de B. bruxellensis mises en culture dans 3 milieux différents MVC et MVC-phénol(-) et SWM. *212*
Tableau 04E-3. Production maximale de 4-éthyl-phénol par 3 souches de B. bruxellensis, au bout de 350 heures lors de cultures en Milieu Vin Corrigé et partiellement dé-phénolisé. *215*

Tableau 04E-4. Azote assimilable résiduel, au bout de 450 heures de cultures dans le milieu SWM-Azote50. *218*
Tableau 04E-5. Production de 4éthyl-phénol par 3 souches de B. bruxellensis dans 2 milieux synthétiques : SWM et SWM-Azote50. *219*
Tableau 04E-6. Teneur finale en 4-éthyl-phénol pour une souche de B. bruxellensis dans des milieux complétés en tanins œnologiques. *226*
Tableau 04E-7. Concentration finale en 4-éthyl-phénol : Influence de la teneur en acide gluconique dans le milieu SWM. *230*

- INTRODUCTION GENERALE -

La levure du genre *Dekkera/Brettanomyces* est désormais reconnue comme un contaminant du procédé de vinification entraînant des conséquences sérieuses dans le monde vinicole. Responsable de déviations organoleptiques marquées lors de son développement sur des vins rouges en cours d'élaboration ou des vins finis, cette levure engendre une diminution non négligeable de la qualité des produits et des pertes économiques conséquentes. Vins phénolés, animaux, médicaux et pharmaceutiques, tels sont les termes peu flatteurs qui sont associés à sa présence.

Pour cette raison, de nombreux microbiologistes effectuent bon nombre d'études de par le monde pour comprendre le fonctionnement de cette levure souvent crainte par les œnologues.

Pourtant, malgré cette armada de travaux et d'efforts menés conjointement sur les fronts pratique, scientifique et théorique, un nombre certain d'interrogations continue de planer encore autour de ce micro-organisme.

Le premier et pourtant point primordial à la compréhension des épisodes de développement redouté : l'origine même du contaminant. D'ailleurs, doit on nécessairement parler d'« origine » au singulier ? Les chercheurs ne s'accordaient pas forcément au démarrage de nos recherches sur le ou les foyers potentiels conduisant à la présence du contaminant à un moment donné dans le schéma d'élaboration du vin.

Les raisons de son développement n'étaient pas plus claires. Nul ne sait aujourd'hui exactement le potentiel des moûts et le risque associé aux itinéraires d'élaboration. Qu'en est il alors des raisons qui aboutiront à un produit dégradé? Quels sont les facteurs de croissance, les facteurs déclenchants ou plus simplement les facteurs aggravants qu'il est bon de connaître pour éviter, ou du moins limiter, la contamination sur un site donné ?

Le métabolisme même de cette levure est aussi mal connu. Apparaissant souvent comme une super levure capable de se développer dans le moindre recoin d'une cave, « Brett » comme la surnomment les œnologues, s'installe, tire profit des substrats présents, s'adapte aux conditions, résiste et fatalement, pollue. Elle produit des molécules diverses dont les plus emblématiques sont sans conteste les phénols volatils responsables de l' « animalisation » du vin. Comment tout cela est-il possible, dans quels buts, quels enjeux métaboliques et énergétiques sont alors impliqués dans cette activité contaminante ? En plus du caractère phénolé associé à cette conversion des acides cinnamique la contamination par *Brettanomyces* entraîne bien d'autres désagréments pour la qualité du vin, tels que la dégradation des arômes de fruits.

Les moyens de lutte à disposition des acteurs viti-vinicoles, premiers concernés par la problématique, ne sont encore, force est de le constater, pas toujours maîtrisés. Qu'ils s'agissent de dépistage, nécessaire à une réactivité salvatrice, ou encore de remèdes curatifs, pour ne pas dire palliatifs dans nombre de cas, on se rend compte qu'ils sont encore mal adaptés (parfois

surdimensionnés, au nom du principe de sécurité) en raison d'un manque de connaissances de fond sur la levure.

Notre revue bibliographique nous permettra très rapidement de nous rendre compte que les réponses ou tentatives de réponses apportées à ces différentes questions font de *Brettanomyces* une levure très originale. Mieux encore, l'absence parfois évidente de cohésion dans les résultats la présentera comme une levure de polémique. Ce point est exacerbé par le fait que les travaux menés sont parfois, pour ne pas dire souvent, inscrits dans un contexte éloigné de l'œnologie, il devient alors difficile d'extrapoler les résultats.

Nous tenterons alors dans nos travaux, fruit d'un partenariat entre la Cave des Vignerons de Buzet, la société Oenodev et le Laboratoire de Génie Chimique, d'apporter modestement quelques éléments supplémentaires à la résolution, ou du moins la compréhension, de cette problématique « Brett ».

La démarche choisie a été de nous intéresser à plusieurs phases du procédé de vinification. Dans la mesure du possible nous avons également essayé de cerner à la fois les cinétiques et les niveaux de développement de la levure, mais aussi l'activité de conversion de l'acide para-coumarique en éthyl-phénol.

Nous nous préoccuperons donc dans un premier temps de la détection de cette levure, plus particlièrement de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*, directement dans les environnements viti-vinicoles, avec la mise en place d'une procédure simple mais complète.

Armé de cet outil, nous irons sur le terrain et tenterons d'identifier une des origines possibles du contaminant. Notre attention se portera en amont du procédé même de vinification, sur le raisin. Nous nous intéresserons alors plus particulièrement à l'identification de facteurs pouvant influer sur cette présence du contaminant à ce stade.

Nous nous intéressons ensuite à une des raisons probables de la grande variabilité dans les résultats des travaux effectués de par le monde en mettant l'accent sur ce qui apparaîtra au fil des expériences comme une impressionnante diversité au sein de l'espèce *B. bruxellensis*.

Enfin, nous tenterons de cerner les conséquences de quelques choix dans les itinéraires de vinification, notamment l'emploi d'adjuvants œnologiques.

- CHAPITRE 1 -

CONTEXTE ET PARTENAIRES

1 – Contexte.

En 2001, afin de mieux comprendre les problèmes liés aux contaminations des vins par la levure du genre *Brettanomyces*, la société Oenodev organise un réseau de recherche réunissant 7 caves de France et d'Amérique du sud, parmi lesquelles, la Cave Coopérative des Vignerons de Buzet (France, 47).

Après deux années (2001 et 2002) de suivi de populations de *Brettanomyces* dans les vins de la cave de Buzet, il est constaté des niveaux de contamination anormalement élevés et préoccupants. Ainsi en 2002, il est possible de détecter la présence de la levure contaminante dans 100 % des cuves à l'écoulage et plus de 20 % présentent des défauts directement imputables à *Brettanomyces.*

Il s'avère difficile de définir les origines et causes précises de cette contamination qui apparaissait alors comme la somme de plusieurs facteurs qu'il est impératif de corriger : hygiène, pratiques œnologiques, gestion des ensemencements.

La volonté est alors émise de comprendre au mieux la contamination sur ce site, son/ses origine/s, les facteurs aggravants et les solutions envisageables pour lutter efficacement contre les *Brettanomyces.*

C'est dans ce contexte que s'établit le partenariat tri-partite entre La Cave des Vignerons de Buzet, Oenodev et le département Bioprocédés et Génie des Systèmes Microbiens du laboratoire de Génie Chimique de Toulouse, dans le cadre d'une thèse de doctorat.

2 – La Cave des Vignerons de Buzet.

(Figure 01-1)

2.1 – Présentation générale de la Cave de Buzet.

LES VIGNERONS
DE BUZET

Figure 01-1. Logo de la Cave des Vignerons de Buzet.

2.1.1 – Vignoble de Buzet.

Au coeur du Sud-Ouest et de la vallée de la Garonne, le vignoble de Buzet délimité aujourd'hui d'une part par la Garonne et d'autre part par la forêt des Landes, s'étend sur pratiquement 2000 hectares en production, et est situé sur 40 kilomètres de coteaux entre Agen et Marmande.

95 % de cette superficie totale sont dédiés aux cépages rouges. Les 3 cépages, dits cépages nobles Bordelais représentent la quasi-totalité du plantier : 48 % en Merlot, 28 % en Cabernet Franc, 23 % en Cabernet Sauvignon. A ceux-là se rajoute très anecdotiquement le Malbec (moins de 1 %). La petite fraction restante du vignoble (5 % de la superficie totale) est consacrée aux cépages blancs, répartis entre Sauvignon Blanc (~30 %) et Sémillon (~70 %) (On compte moins de 1 % de Muscadelle).

2.1.2 – Bref historique.

En 1911, un décret réserve l'appellation Bordeaux aux seules vignes du département de la Gironde. Comme Buzet se situe administrativement dans celui du Lot-et-Garonne ... « Le vin de Buzet » qui n'entre pas dans cette appellation s'engage lentement dans une certaine agonie. Ce ne sont pas deux guerres mondiales successives, ni la morne période les séparant, qui arrangent les choses. Quarante années durant, le Buzet reste dans ce coma jusqu'à ce que quelques-uns de ses fidèles vignerons décident de le réanimer. En 1946, un comité de défense des vins de Buzet est créé. Il se bat et, première victoire, en 1953, huit communes de bon terroir reçoivent le label V.D.Q.S., Vin Délimité de Qualité Supérieure, et le nom de Côtes de Buzet (Buzet, depuis 1985) pour peu que les vignes soient dignes et les cépages nobles. Créée en 1955, la cave des Vignerons de Buzet émane alors de cette volonté des viticulteurs- vignerons de redonner le lustre des siècles passés à leur vin. Ils se dotent alors d'une structure qui leur permet d'élever eux mêmes leur vin et de procéder à la commercialisation, qui est d'ailleurs pleinement assumée par la cave dès 1967. Buzet accède en 1973, à l'Appellation Contrôlée**.**

L'article 1er-1 du décret du 19 avril 1973 relatif à l'Appellation d'Origine Contrôlée Buzet désigne 27 communes du Lot-et-Garonne qui constituent l'aire géographique de production.

2.1.3 – Production.

Avec plus de 95 % de la production des vins de Buzet, la cave produit actuellement par an 110 000 hectolitres de vin en AOC. La répartition Blanc, Rosé, Rouge, est globalement de 5%, 20% et 75%. Un total de 120 Millions de bouteilles sont alors produites par an et 10 000 hL sont écoulés en vrac. A cela se rajoute 4000 hL de Vins de pays.

2.1.4 – Gamme de produits.

En AOC la classification principale est établie selon le schéma :

- ***Basic*** (10 à 15% du volume)
- ***Standard*** (la majorité du volume), considéré comme vin sans ou de moyenne garde.
- ***Premium***, regroupant « Châteaux » et « Barons » (15 à 20% du volume) correspondent majoritairement à des vins de garde qui sont mis sur le marché entre 2 et 3 ans après l'entrée en cuve.

Pas moins de 30 produits sont alors proposés en rouge, dont une quinzaine de châteaux, alors que la gamme des rosés est limitée à 3 produits, de même que la gamme des blancs. L'annexe 01 présente la gamme des produits disponible à la cave, en rouge, rosé et blanc, hors commande spéciale et vrac. A cette gamme classique, ce rajoute le trio de vins dits de printemps mis sur le marché 6 mois à peine après le début des vendanges et qui se consomment dans l'année même.

2.1.5 – Le marché.

Le circuit traditionnel « Cavistes Hôtellerie Restaurants » et négociants couvre à lui seul 40 % des ventes. La vente en Grandes et Moyennes Surfaces représente 30 % du marché. 30 % des ventes sont alors réalisés à l'étranger dans plus de 30 pays (Depuis longtemps les Belges, les Hollandais, les Québécois, les Anglais et les Scandinaves ont été séduits, et aujourd'hui, c'est en Russie, au Japon ou en Chine que les vins de Buzet trouvent de nouveaux adeptes).

2.1.6 – Ressources humaines.

La cave compte actuellement 300 adhérents viticulteurs.

Environ 100 personnes travaillent de manière permanente, en postes de production et administratifs, auxquelles s'ajoute un nombre variable de saisonniers.

2.2 – Les structures de Production.

2.2.1 – Caves de vinification.

Toute la production est gérée entre les 3 sites de production de la Cave.

L'ancienne (première historiquement) cave – B1 – est constituée quasi exclusivement de cuves en béton revêtu (peinture époxy) et possède un volume total utile de 40 000 hL. La nouvelle cave – B2 – (voisine de l'ancienne cave) construite en 1986 possède un structure technique moderne indépendante de la première et abrite 40 cuves inox thermo-régulées de 450 hL auxquelles s'ajoutent 46 cuves d'écoulage en béton revêtu (peinture époxy) (soit un volume total de 50 000 hL). Enfin, la troisième cave de vinification, implantée à quelques 15 Km de Buzet-sur-baïse même, à Espiens – Esp

– a été construite en 1976 pour des raisons pratiques dans le traitement des vendanges. Au total, la cuverie de la Cave représente 250 000 hL disponibles en vinification et élevage. Chacune de ces sous-unités est équipée à la réception de poste de sélections permettant d'orienter les vendanges en cuve, en fonction de leur origine et de leur qualité.

2.2.2 – Chais à barriques.

4000 barriques en bois de chênes de l'Allier et de la Nièvre (réparties sur les différents sites) sont utilisées à la cave pour le vieillissement des vins. L'âge maximum des barriques est de 3 ans. Ces dernières sont fabriquées sur place par les 2 maîtres tonneliers (900 barriques neuves à l'année).

2.2.3 – Chaînes d'embouteillage.

En 1972 une chaîne d'embouteillage automatique d'une capacité de 5 000 bouteilles par heure est construite à la cave. Cet ensemble est totalement modernisé depuis 1988 avec la construction d'un nouveau bâtiment, où est installée une nouvelle ligne moderne d'une cadence de 10 000 bouteilles par heure et des unités de conditionnement. L'ancienne ligne a été conservée et est utilisée pour les embouteillages spéciaux et les petites séries.

2.3 – Vinifications.

N'est ici abordé que le schéma de vinification en rouge qui représente la très grande majorité de la production à la Cave.

2.3.1 – Gestion des apports.

La gestion des apports occupe une place très importante à la Cave. Une classification par « tickets de couleur » conditionne le sort des vendanges en cave. L'aiguillage et le remplissage des cuves grâce à ce planning d'apport permettent alors de gérer au mieux le volume important tout en maîtrisant les lots et leur intégrité qualitative.

2.3.2 – Principaux choix dans la conduite des vinifications.

2.3.2.1 – Ensemencements.

Pour les Fermentations Alcooliques, la cave a quasi-systématiquement recours aux Levures Sèches Actives.

Quant aux Fermentation Malo-Lactiques, les départs en fermentation se font de manière spontanée, rares sont les cas où l'inoculation en bactéries est réalisée.

2.3.2.2 – Enzymage.

Depuis 2003, l'emploi d'enzyme d'extraction a été complètement arrêté.

2.3.2.3 – Compléments azotés.

Seul l'ajout de sulfate d'ammonium est réalisé au moment du remplissage des cuves pour compléter les moûts en azote. La dose maximale employée est alors de 30 g/hL.

2.3.2.4 – Sulfitages.

Elément indispensable à la bonne conduite de la vinification en y assurant la stabilité chimique et microbiologique du vin, 2 grands épisodes de sulfitage sont réalisés au cours du schéma de vinification adopté à Buzet : un sulfitage au quai, à raison de 6 à 8 g/hL et en fin de FML avec une dose de 6 g/hL. On s'assure alors que le taux de SO_2 libre se maintient aux environs de 25 mg/L après la FML.

2.3.2.5 – Températures de fermentation.

La globalité des vinifications est conduite suivant un même schéma de température. En début de fermentation, les thermorégulations permettent de maintenir les cuves à 23 °C pour allonger la durée de la première phase de fermentation alcoolique en vue d'une bonne extraction et d'une bonne récupération aromatique variétale. Lorsque la densité a diminué de au moins 30 points, la température est augmentée et régulée à 27-30 °C pour terminer la fermentation dans les meilleures conditions.

2.3.2.6 – Aération.

a – Remontages.

Afin de favoriser une extraction et une diffusion rapide et importante de la couleur et des tanins peu agressifs, l'aération est réalisée relativement tôt alors que la teneur en alcool est encore « faible » Ainsi dès le début de la fermentation, les remontages se font fréquemment et de manière très cadencée : entre 4 à 6 fois par jour sur un volume restreint (avec au total un volume remonté sur une journée inférieur au volume de la cuve). Ces remontages à l'air permettent par ailleurs un apport d'oxygène pour les levures pendant la phase de croissance.

Lorsque l'alcool devient important (vers 1060 de densité), les remontages sont moins marqués pour éviter l'extraction exacerbée des tanins secs (tanin de pépin) par l'éthanol.

b – Micro-oxygénation.

Suite à la fermentation alcoolique, une micro-oxygénation sous marc est réalisée pendant 15 à 20 jours. Les débits (de l'ordre du ml/l/mois) sont pilotés par dégustation et appréciation de la formation ou non d'éthanal.

2.3.2.7 – Fermentation malo-lactique.

Cette fermentation, spontanée, est quasi systématiquement menée pour les vins rouges à la cave.

2.3.2.8 – Elevage.

L'élevage en cuve (de lots isolés ou d'assemblage) de la totalité des vins Standard et une partie des Premium est réalisé à une température inférieure à 16 °C de décembre à mai au minimum (avant soutirage pour assemblage complémentaire).

Environ 30 à 40 % du volume de vin Premium (en lot isolé ou déjà assemblé) connaissent un épisode d'élevage en barrique. La durée de cet élevage varie de 9 à 12 mois avant soutirage et éventuellement assemblage. Les Premium sont également affinés en bouteille pendant 1 à 3 ans avant mise sur le marché.

2.3.3 – Exemple de Vinification des Premium.

Nous ne donnerons dans ce présent document qu'un exemple de vinification : celle retenue pour les vins Premium. Celui-ci est le plus complet des schémas d'élaboration adoptés à la Cave de Buzet. Les vins Standards sont élaborés à partir d'une stratégie comptant moins d'opération qualitative visant à la structuration du vin. Quant au vin de printemps le « lys rouge », son profil frais et variétal est obtenu par une gestion des températures beaucoup plus basses et une absence totale d'élevage et de maturation.

La Figure 01-2 présente donc le schéma général d'élaboration adoptée pour les vins Premium. Il va s'en dire qu'il s'agit d'un schéma soumis à des adaptations au cas par cas en fonction de l'évolution de la matière.

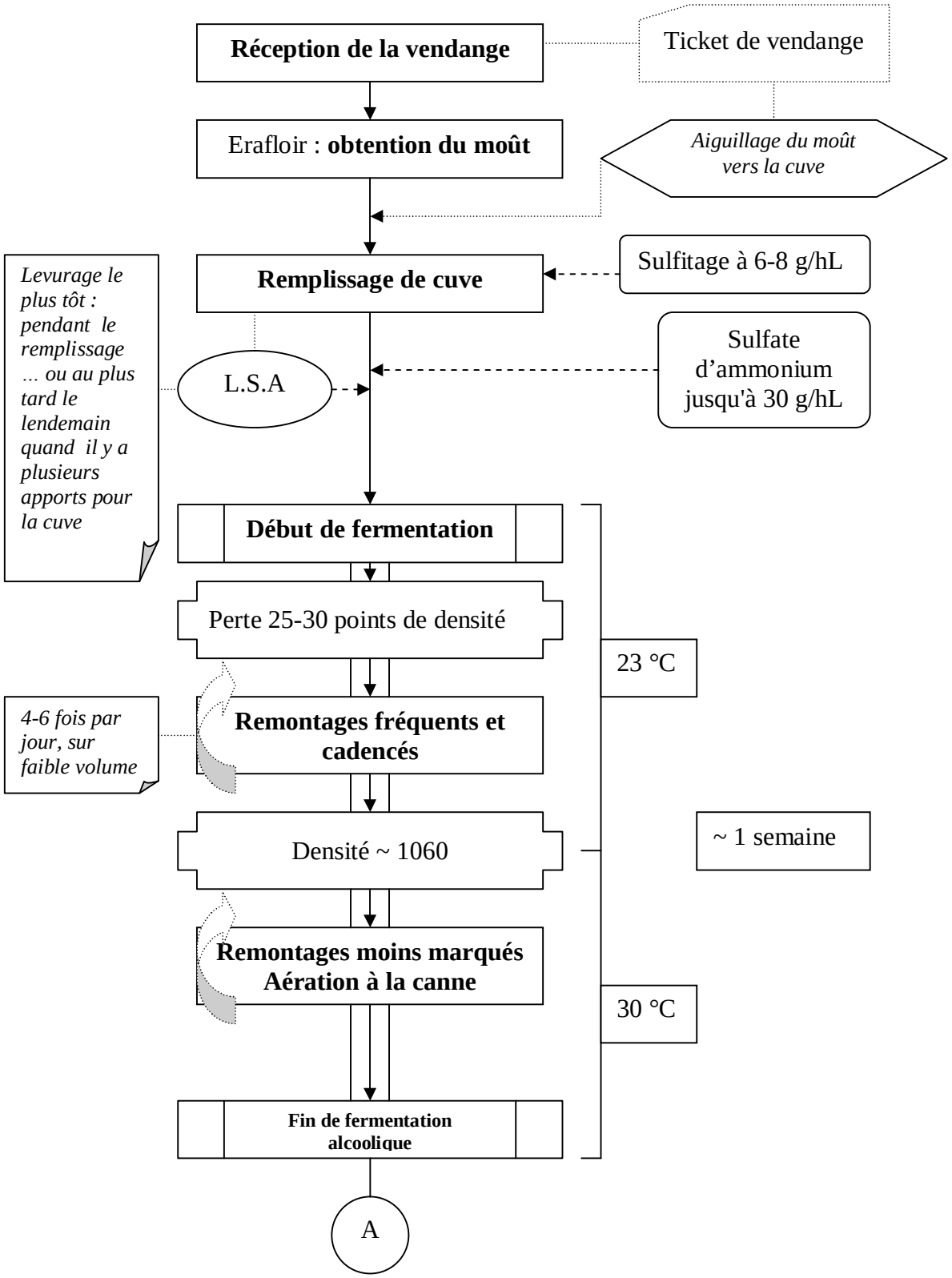

Réception de la vendange
Ticket de vendange
Erafloir : obtention du moût
Aiguillage du moût vers la cuve
Remplissage de cuve
Sulfitage à 6-8 g/hL
Levurage le plus tôt : pendant le remplissage … ou au plus tard le lendemain quand il y a plusieurs apports pour la cuve
L.S.A
Sulfate d'ammonium jusqu'à 30 g/hL
Début de fermentation
Perte 25-30 points de densité
23 °C
4-6 fois par jour, sur faible volume
Remontages fréquents et cadencés
Densité ~ 1060
~ 1 semaine
Remontages moins marqués Aération à la canne
30 °C
Fin de fermentation alcoolique
A

Figure 01-2a

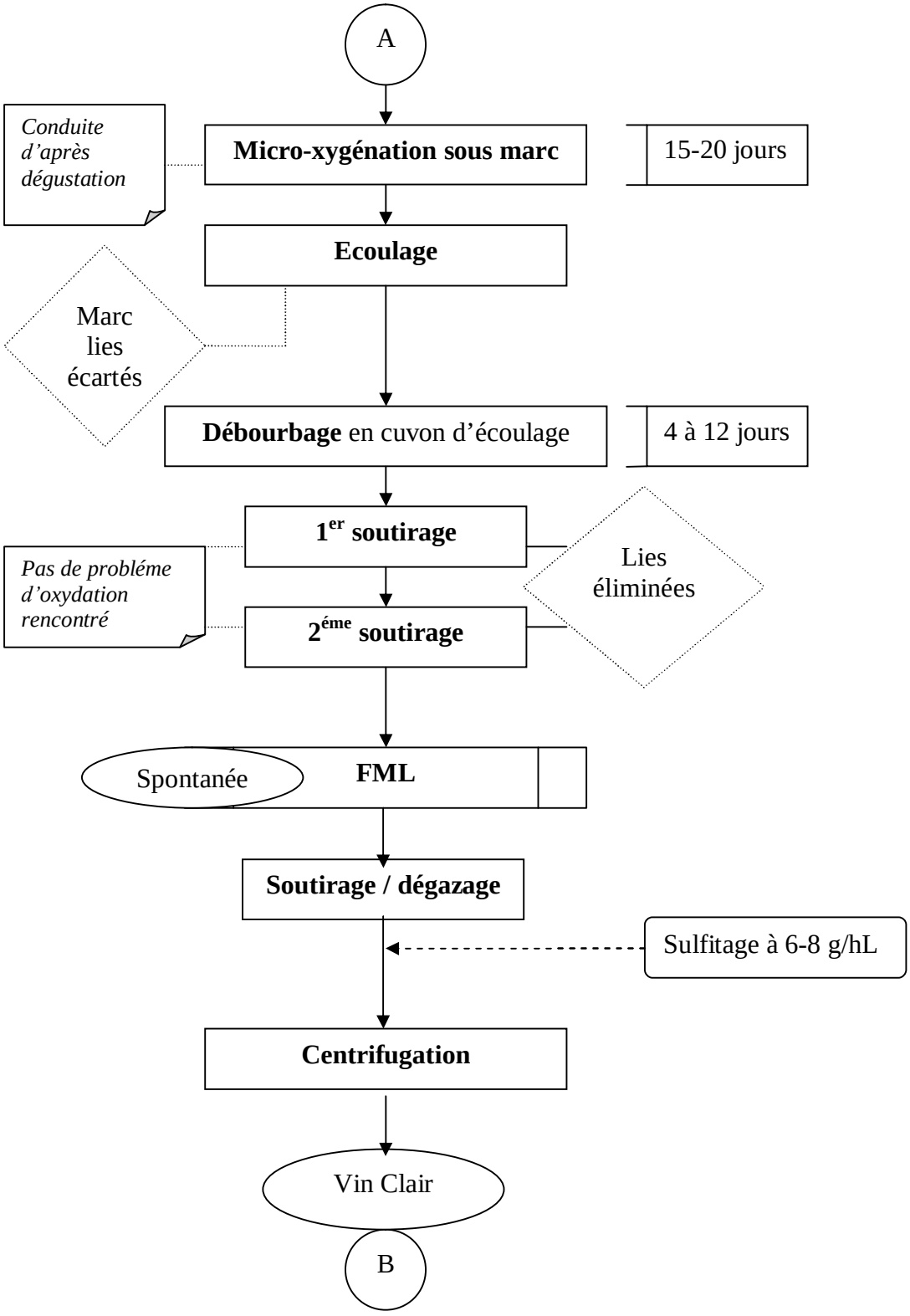

A
Conduite d'après dégustation
Micro-xygénation sous marc
15-20 jours
Ecoulage
Marc lies écartés
Débourbage en cuvon d'écoulage
4 à 12 jours
1er soutirage
Lies éliminées
Pas de probléme d'oxydation rencontré
2éme soutirage
Spontanée
FML
Soutirage / dégazage
Sulfitage à 6-8 g/hL
Centrifugation
Vin Clair
B

Figure 01-2b

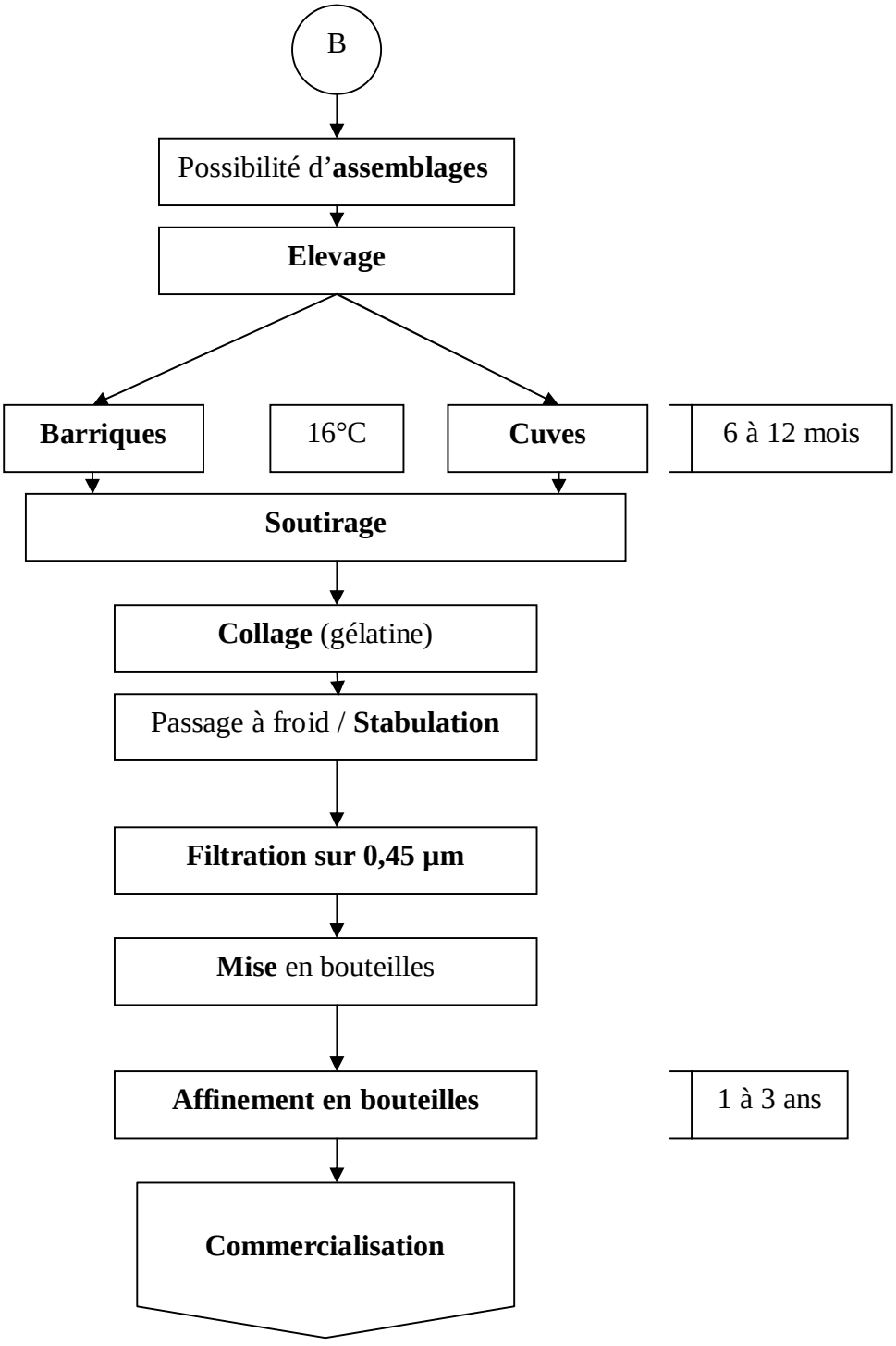


Figure 01-2-c

Figure 01-2. Schéma de vinification : vins Premium.

3 – OEnodev.

(Figure 01-3)

Figure 01-3. Logo de la société Oenodev.

3.1 – La création.

Après plusieurs années de recherche Patrick Ducournau et la famille Laplace, vignerons de la région de Madiran, mettent au point une technique novatrice d'élevage maîtrisé des vins: la Micro-Oxygénation.

Autour de ce procédé, toute une structure de fabrication, de commercialisation et de conseil se met en place et aboutit à la création de la Société Oenodev en 1993.

Avec le soutien scientifique de l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) de Montpellier, et le soutien financier de l'ANVAR (Association Nationale de la Valorisation de la Recherche) Oenodev continue à développer ses connaissances et son savoir faire sur les techniques d'élevage des vins, aussi bien en cuves inox qu'en barrique.

Dès 1996, Oenodev est complétée par la création d'une société assurant la production et la commercialisation d'éclats de bois de chêne à usage œnologique : Boisé France.

A ce jour, devenu leaders en matière de conseil en élevage des vins, la société poursuit son développement à l'international en valorisant son savoir-faire chez le particulier comme dans les plus grosses structures.

3.2 – La société : complémentarité entre Recherche et Pratique.

Désormais présent au niveau international (Amériques du Nord et Sud, Europe, Chine, Australie …, Figure 01-4), la société s'appuie sur une force humaine constituée de :

- 17 œnologues de terrain chargés de la vente de produits et de services
- une équipe de production (Boisé France) de 6 personnes
- un service de R&D en charge de mener la recherche appliquée, du développement nouveaux de produits et méthodes (4 chercheurs, 1 oenologue, 1 technicien + personnel temporaire - contractuels, stagiaires, thésards) et du transfert technologique.
- un pool administratif de 5 personnes.

Figure 01-4. Rayonnement international de la société Oenodev.

Doté de chais expérimentaux, de nombreux outils analytiques et d'un ensemble de rattachements avec différents laboratoires, notamment à l'Université Paul Sabatier de Toulouse et le Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse, Oenodev développe désormais un ensemble de compétences scientifiques et pratiques : génie œnologique, analyse sensorielle, génie des procédés, chimie des composés du raisin et du vin (composés phénoliques, composés volatiles du bois, ...), microbiologie, biochimie, biologie moléculaire, chimie analytique (électrochimie, chromatographies, spectrométrie).

Les thématiques actuelles en R&D s'articulent principalement autour de :

- Pilotage de l'élevage (nouveaux équipements) : gestion des élevages sur lies (bâtonneurs, fractionnement), micro-oxygénation (phénomènes de transferts)
- Pilotage de la maturation des vins : échantillonneurs, sondes et mesures en ligne, modèles prédictifs
- Contrôle des phénomènes d'hyper oxygénation des moûts de blancs (modèles de consommation d'oxygène)
- Production des copeaux de bois : études comparatives, essais, validation des nouveaux produits, contrôle Qualité
- Maîtrise des risques microbiologiques : optimisation des fermentations, détection et prévention des contaminations (*Brettanomyces)*.

Se positionnant sur le marché des produits d'élevage et des éclats de bois, Oenodev propose également ses compétences sous forme de conseils techniques et organisationnels, de la réalisation d'audit au conseil en gestion d'information (Figure 01-5).

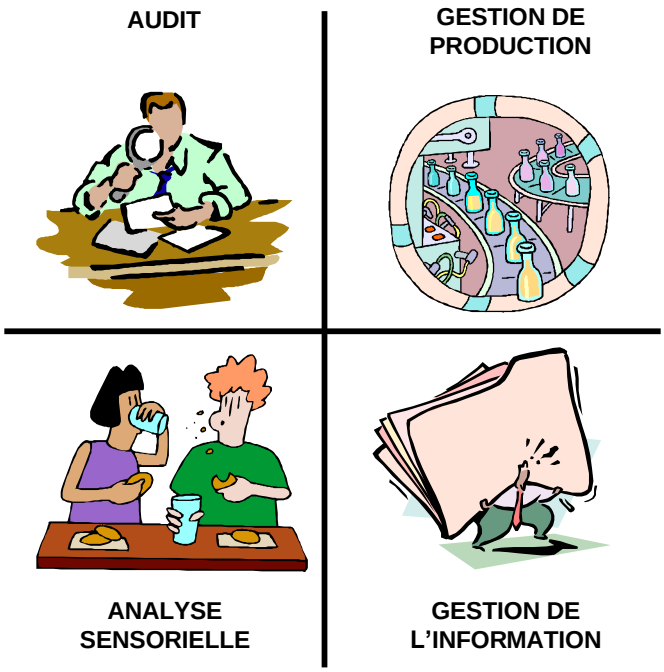


Figure 01-5. Oenodev, un ensemble d'activités de conseils.

- CHAPITRE 2 -

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 – *Brettanomyces* ... une levure à plusieurs facettes.

1.1 – Taxonomie.

Selon « The National Center for Biotechnology Information – 2002 », *Brettanomyces sp*. est répertoriée comme suit :

- *Eucarya* – Cellules nuclées, *Fungi* – Champignon, *Eumycota* – Reproduction sexuée par ascospore, *Ascomycotina* – ascospores intracellulaires.
- Classe: *Hemiascomycetes* (levures, sans ascocarpes) ; ordre: *Endomycetales* (pas de vrais mycéliums, reproduction végétative par bourgeons qui peuvent devenir des asques) ; famille: *Saccharomycetaceae* (ascospores de formes variées) ; genre: *Brettanomyces* (*Dekkera*)

Lorsque la levure se rencontre sous sa forme sporulante, le genre est alors baptisé : *Dekkera (Shung-Chang et al., 1985).*

Cinq espèces appartenant au genre Dekkera/*Brettanomyces* sont actuellement reconnues, mais l'usage veut que des synonymes soient encore fréquemment employés, le plus souvent selon le contexte où on les rencontre (Barnett et al, 1990) :

- *B. bruxellensis*

  (*connu également comme B. intermedia / intermedius / abstinens / custersii / lambica / lambicus / patavinus / schanderlii / vini* id. *Mycotorula intermedia* et *Torulopsis cylindrica*)
- *B. anomalus*

  (*connu également comme B. anomala / cidri / clausenii / dublinensis* id. *Oospora vinii* et *Monilia vini*)
- *B. custersianus*

  (*connu également comme B. custersiana*)
- *B. naardenensis*
- *B. nanus* (id. *Eeniella nana*)

1.2 – Un brin d'histoire.

Les levures du genre *Brettanomyces* sont mises en avant grâce aux travaux de Claussen qui signale dès le début du XX siècle la présence dans des moûts de brasserie d'une levure baptisée en premier lieu « La Levure Britanique » (Claussen, 1905). Un brevet est même déposé pour la préparation de bière au caractère vinique marqué (« English Character Beer ») à partir de moût inoculé en cours de fermentation par des souches de *Brettanomyces sp*. Mais la maîtrise du procédé reste problématique (mauvais inoculum, aération insuffisante) et il en résulte souvent des bières troubles et insipides. A cela se rajoute la chute du marché vis-à-vis de la bière au début XX siècle. Le procédé tombe dès lors dans les méandres du désintérêt, entraînant avec lui *Brettanomyces* dans l'oubli.

Ce n'est sans compter sur Kufferath, qui en 1921 remet en avant le nom de *Brettanomyces* en évoquant une levure acidifiante de croissance lente pouvant être sporadiquement rencontrée sur quelques fruits et dans des boissons fermentées telles que la bière, le vin, et le cidre.

Custer, lors de ses travaux de prospection des microflores fermentaires, parvient en 1940 à isoler plusieurs souches. Son travail porte alors sur la caractérisation morphologique et physiologique de 17 souches obtenues majoritairement à partir de bière en fermentation. La seule souche étudiée d'origine autre que la brasserie est isolée à partir d'un moût de raisin français en fermentation. L'étude de ce genre levurien, plus particulièrement de la forme sporulante *Dekkera*, en devient la problématique de sa thèse de doctorat : la première véritable étude systémique sur *Dekkera/Brettanomyces*. Custer montre que toutes les souches présentent des propriétés caractéristiques communes. Il les décrit alors comme des levures le plus souvent de forme ogivale, présentant une durée de vie relativement longue et ce même dans des conditions de carence poussée, possédant une croissance généralement lente et des particularités physiologiques telles que production d'une grande quantité d'acide acétique en aérobiose ou encore l'inhibition de la fermentation alcoolique en anaérobiose. Ses travaux, en plus de permettre la mise en avant de plusieurs caractéristiques physiologiques, décrivent pour la première fois un effet *Pasteur – Négatif*, désormais connu sous le nom d'effet Custer (que nous décrirons ultérieurement dans le paragraphe 2.2.2).

Ce n'est véritablement qu'après la seconde guerre mondiale, alors que les travaux de recherches sur les boissons alcoolisées se généralisent que l'on se rend compte de la véritable présence de *Brettanomyces* dans différentes industries des boissons fermentées : des vins sous voiles italiens (Agostini, 1950) aux vins secs de Russie (Tonchev et Bambalov, 1968), en passant bien évidemment par les vins français (Barret et al., 1955) et Italiens (Castelli, 1971).

A la fin des années 1980, *Brettanomyces* est surtout montrée du doigt comme un agent contaminant des fermentations alcooliques de sous produits de l'industrie sucrière (de Miniac 1989). A cette même période, on se rend réellement compte que les *Brettanomyces* sont largement répandues dans différents secteurs des industries des boissons fermentées obtenues à partir des jus sucriers, des moûts de malts et tout particulièrement l'industrie du vin (Froudière et Larue, 1988) ; qu'il s'agisse des vins italiens élevés sous voile, des vins mousseux allemands, des vins jaunes du Jura, des vins secs russes … Aucune région dans le monde ne semble alors échapper à la présence de *Brettanomyces*.

A ce jour, de plus en plus de thématiques de recherche s'articulent autour de *Brettanomyces sp.* , en particulier dans le contexte œnologique où leur présence en tant que contaminant est responsable de pertes économiques importantes (Fugelsang, 1997) : il est question de comprendre leur métabolisme, de comprendre leur mode d'implantation lors de contamination et de préciser les effets négatifs ou positifs qui résultent de leur présence et activité.

1.3 – Alors, amie ou ennemie ? … question de point de vue !

1.3.1 – Traditions et potentialités : Brett, je ne te hais point.

Malgré la connotation négative qui règne généralement autour de *Brettanomyces sp.* force est de constater que cette levure peut dans certaines situations s'avérer utile et désirée.

Ainsi les productions de bières type lambic ou gueuse font appel par exemple à *B. lambicus* comme agent de transformation lors de fermentations spontanées de moût de malt ou en deuxième fermentation (Verachtert et al., 1990 ; Larue et al., 1991). Elles y développent en effet des changements aromatiques importants, notamment grâce à leur activité estérase (Spaepen et Verachtert, 1982) et contribuent à l'élaboration d'une typicité acide, aboutissant alors à une bière au caractère marqué et complexe (Spaepen et al., 1978 ; Nedervelde et Debourg, 1995).

Lachance (1995) montre par ailleurs que dans l'élaboration traditionnelle de la tequila, *Brettanomyces anomala* se développe spontanément et fortement au cours de la première fermentation du moût d'agave avant de laisser progressivement la place à *B. bruxellensis* lorsque le degré en alcool devient important. Ces deux espèces qui se retrouvent en fin de fermentation dans le milieu font naturellement partie de la flore présente sur les racines de l'agave utilisé (*Agave tequilana weber).*

En Orient, dans la confection du « Haïpao » (boisson fermentée obtenue à partir de thé noir sucré), *Brettanomyces* intervient dans la formation du « nata », un biofilm cellulosique apparaissant à la surface du thé en fermentation au bout d'une semaine. Ce biofilm est le résultat d'une véritable symbiose très stable entre *Brettanomyces sp.* et *Acetobacter sp.* (Liu et al., 1996). Les bactéries profitent de la capacité qu'ont ces levures à produire de l'éthanol. En contrepartie l'acidification réalisée par les bactéries inhibe la croissance des autres micro-organismes concurrents.

Des travaux ont également été menés et appliqués industriellement dans le domaine de l'environnement. En effet, possédant une aptitude à métaboliser la cellobiose (Blondin et al., 1982 et 1983 ; Parekh et al., 1988) grâce à leur activité cellulase ou β-glucosidase, certaines espèces de *Dekkera*/*Brettanomyces* ont été étudiées comme potentiels agents de dégradation des déchets de l'industrie du papier (Jian et Ju, 1998). Mais l'utilisation de ces levures dans une optique de valorisation de ce type de déchets cellulosiques reste problématique en ce sens où la température optimale de l'enzyme mise en jeu (45 °C) est incompatible avec la relative faible résistance de la levure à ces températures «élevées» (Spindler et al., 1989 et 1992).

Dans la production industrielle d'acide acétique, une pré-fermentation acétique des moûts par des levures semble stimuler les bactéries acétiques qui interviennent comme agents principaux de transformation, permettant au final des meilleurs rendements et conversions. Les essais avec *Brettanomyces* se sont révélés extrêmement prometteurs. Ces dernières pouvant produire jusqu'à 24 g/L d'acide acétique à partir de différents substrats (Freer, 2002).

En bio-énergie, *B. intermedius* permet en culture mixte avec *Pichia stipitis* une production d'alcool à partir de sciure de bois pré-hydrolysée par sulfitage et saccharifiée par un mélange de cellulases et d'hémicellulases (Wayman et al., 1987). Une souche mutante, thermo-tolérante, a pu produire à partir de ce substrat de l'alcool avec un rendement en éthanol s'élevant à 75 % du rendement théorique possible pour un mélange direct de glucose et de cellobiose à 40 °C (Park et al. 1999).

1.3.2 – Le revers de médaille : un sérieux agent de contamination.

Sorti des cadres précédemment décrits, pour la majorité ramenés à des échelles relativement locales ou encore expérimentales, le portrait généralement dépeint de *Brettanomyces* dans les études qui lui sont consacrées n'est pas des plus flatteurs, à l'image des dégâts qu'on lui reproche.

Dès 1989 des cas de contaminations de fermentations alcooliques industrielles de sous-produits de l'industrie sucrière par *Brettanomyces* sont décrits et étudiés. Ainsi montre-t'on pour la première fois que les levures *Brettanomyces* sont responsables de la chute du rendement en éthanol mais également de l'augmentation des teneurs en acide acétique (de Miniac, 1989). L'implantation de *Brettanomyces* au cours de la fermentation se fait alors au détriment de *Saccharomyces cerevisiae* considérée comme agent de bio-conversion des substrats sucrés en alcool. D'autres travaux sont alors menés pour mieux comprendre cette contamination. On s'intéresse notamment aux comportements de *Brettanomyces* vis-à-vis de souches de *Saccharomyces* utilisées pour produire de l'éthanol à partir de mélasses, de sirops ou de jus sucrés (Powchinda, 1994 ; Delia et al., 1997 ; Gilis, 1999). Mais à ce jour, les causes exactes de la bascule de population entre *Saccharomyces* et *Brettanomyces* lors de telles contaminations ne sont pas totalement expliquées. La seule action de l'acide acétique produite par *Brettanomcyes* ne suffit pas à l'expliquer, le milieu tampon que représentent les mélasses réduisant fortement l'action inhibitrice de croissance de ce composé (Rasmussen et al., 1995 ; Taherzadeh et al., 1997).

Rencontrées également dans les boissons fermentées comme les vins, qu'ils soient rouges, blancs, mousseux, …, (Heresztyn, 1986 ; Chatonnet et al, 1995 ; Baumes, 1998 ; Günata, 1998) et le cidre entre autres, ces levures sont impliquées dans des contaminations induisant des défauts analytiques et sensoriels. Cette contamination induit alors une forte détérioration de la qualité du produit, soldée par sa dévaluation, voire sa perte (la seule solution étant souvent la destruction des produits devenus impropres pour les marchés).

En œnologie par exemple, *Brettanomyces*, est responsable de la synthèse de tétrahydropyridine et de phénols volatils tels que le 4-vinyl-phénol, le 4-vinyl-gaïacol, le 4-éthyl-phénol, et le 4-éthyl-gaïacol qui à des concentrations relativement faibles suffisent à transformer une séance de dégustation en cauchemar (Chatonnet et al., 1992a et 1997 ; Licker et al., 1997, Chatonnet et Dubourdieu, 1999(a) ; Collard, 1999). Des cas de voile de surface sur des vins contaminés par *Brettanomyces* sont

rapportés par Galzy et Rioux (1955), décrivant également une production importante d'acidité. Il semblerait par ailleurs que tous les vins peuvent d'une façon ou d'une autre être concernés par la présence de *Brettanomyces* (Bioteau, 2000). Cette contamination dans le contexte oenologique sera plus amplement développée dans la suite de ce manuscrit.

2 – Caractérisations phénotypiques et physiologiques.

2.1 – Une levure polymorphe.

Observées au microscope, les *Brettanomyces* se présentent généralement sous forme de petites cellules ogivales, plus ou moins allongées, à bourgeonnement multipolaire (Van der Walt, 1970). Mais on remarque, comme le soulignent plusieurs auteurs, que la morphologie de ces micro-organismes est sujette à des variations prononcées en fonction des conditions de culture passant de la forme ogivale à cylindrique, ellipsoïdale, ou allongée voire même sphérique. On rencontre parfois même une forme rappelant une petite cuillère (Aguilar-Uscanga, 1998 ; Aguilar-Uscanga et al., 1999 ; Medawar, 2003). On peut les trouver sous forme de petites cellules isolées de (2,0-4,5 ; 2,0-7,0) x (3,5-18,0 ; 4,0-22,0) µm, en paire ou formant de petites chaînes adoptant parfois même une forme de pseudo-mycélium non septé (Smith et Van Grinsven, 1984 ; Shung-Chang et al., 1985). Ce polymorphisme contribue à rendre difficile leur dépistage et leur identification par simple observation au microscopique.

Dans des conditions stressantes, une partie de cette flore peut prendre une forme résistante très petite et capable de passer à travers des membranes de seuil de coupure de 0,45 µm. Dans ce cas elle se trouve généralement sous forme Viable mais Non Cultivable. Une culture d'enrichissement peut leur permettre de reprendre une croissance normale (Millet et Lonvaud-Funel, 2000).

En culture sur malt-agar ou extrait de malt ou milieu minimum, leur croissance est lente et les colonies, aux bords lisses, présentent une couleur crème brillant. Des colonies vieillissantes se teintent parfois en brun (Medawar, 2003).

2.2 – Un métabolisme surprenant.

2.2.1 – Sources carbonées et azotées, besoins nutritionnels.

2.2.1.1 – Les sucres.

Brettanomyces sp. possèdent une activité glucosidase (α et β-glucosidases) relativement importante qui leur permet de métaboliser un grand nombre de sucres : glucose, fructose, galactose, mannose, saccharose, tréhalose, ainsi que de nombreux autres oligosaccharides de degré de polymérisation allant de 2 à 9 (Freer, 1991; Chatonnet et al., 1999).

En revanche, on note dans la bibliographie la relative absence de renseignements concernant une éventuelle consommation par *Brettanomyces* des pentoses, sucres résiduels dans les vins. Certaines souches de *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *B. custeriensis* parviennent à croître sur, et à fermenter, le ribose et le xylose au contraire des souches de *B. naardenensis* qui sont incapables d'utiliser le xylose comme seule source de carbone (Barnett et al., 1990).

Certaines souches de *Brettanomyces* sp. sont également capables de se développer avec le cellobiose comme unique source de carbone (Blondin et al,. 1982 ; Bynum et al., 1987). L'activité β-glucosidase nécessaire au métabolisme de ce substrat est induite par ce sucre, mais est réprimée par le glucose et le fructose (Blondin et al. 1983).

Par ailleurs, il semble exister une compétition entre le fructose et le glucose pour un même transporteur avec une préférence pour le glucose (Gilis, 1999 ; Gilis et al., 1999), expliquant la consommation plus rapide du glucose lors d'un mélange de ces deux dimères.

Dans le cas d'un mélange de glucose et de saccharose, ce même auteur observe une croissance diauxique chez *B. bruxellensis*. La levure commence en effet sa croissance sur glucose et voit cette dernière ralentir lorsque ce substrat disparaît. Une nouvelle phase de croissance plus lente est alors observée avec consommation de saccharose. Une telle diauxie a également été décrite sur des mélanges glucose-cellobiose (Gondé et al., 1982 ; Blondin et al., 1983 ; Bynum et al., 1987 ; Parekh et al., 1988). Ces observations montrent que le glucose exerce une répression ou inhibition des systèmes d'assimilation des autres sucres. Ainsi, dans un mélange glucose-cellodextrines diverses, on s'attend à une consommation préférentielle du glucose.

De plus, des concentrations en glucose de l'ordre de 1 g/L sont suffisantes pour obtenir une croissance élevée de *B. bruxellensis* avec une concentration cellulaire finale proche de 300.10^6 cell/mL (Gilis, 1999). Certains auteurs concluent d'ailleurs que ces levures peuvent se multiplier en fermentant des teneurs en sucres simples (glucose, fructose) très faibles, de l'ordre de 200 à 300 mg/L seulement (Chatonnet et al., 1995). Ces observations rejoignent parfaitement ce qui est remarqué parfois en cave où des populations importantes de *Brettanomyces* sont dépistées sur des vins finis et considérés comme secs.

2.2.1.2 – L'éthanol.

Brettanomyces sp. peuvent, en anaérobiose, croître sur un milieu contenant de l'éthanol comme seule source de carbone (Rodiguez et al., 2001 ; Silva et al., 2004). Cette aptitude explique la possibilité qu'ont ces micro-organismes à se développer sur des vins secs exempts de sucres résiduels (Geros et al., 2000). Mais l'assimilation de l'éthanol n'est pas directe. Elle passe par une première étape au cours de laquelle l'éthanol est transformé en acétate qui est alors utilisé comme substrat de croissance (Gilis, 1999).

Medawar et al. (2003) montrent cependant qu'en milieu synthétique simple une teneur en éthanol supérieure à 13% peut être inhibitrice de croissance chez certaines souches de *B. bruxellensis.*

Dans le vin, *B. bruxellensis* présente une sensibilité moins importante à l'alcool que *Saccharomyces cerevisiae*, suggérant une capacité plus grande à survivre dans ce milieu (Silva et al,. 2004).

2.2.1.3 – L'acide acétique.

L'acide acétique peut également être utilisé comme source unique de carbone par *Brettanomyces sp*., et ce jusqu'à une concentration de 3 % v/v pour une gamme de pH allant de 3 à 6 (Geros et al., 2000) sur milieu synthétique. Ces conditions sont moins stressantes que celles rencontrées dans le vin. Ainsi, l'acide acétique, tout comme l'éthanol peut être à la fois produit et substrat, s'inscrivant dans une séquence du type : glucose → éthanol → acide acétique, puis consommation finale de l'acide acétique pour former de la biomasse (Gilis, 1999 ; Gilis, communication personnelle).

De plus, pour assurer le pH intracellulaire tamponné entre 7 et 7,2 *Brettanomyces* est capable d'excréter l'acide acétique indissocié (Phowchinda et al., 1995). Ainsi, par acidification du cytosol, l'acide acétique peut devenir un inhibiteur de croissance, si le flux par diffusion d'acide acétique non dissocié provenant du milieu dépasse les capacités d'excrétion comme cela est observable chez *S. cerevisiae* (Pampulha et Loureiro Diaz, 1990). Le transfert de l'ion acétate de part et d'autre des membranes cellulaires est en revanche inhibé par le glucose, le fructose et des fortes concentrations en acide acétique.

2.2.1.4 – Autres substrats carbonés ?

Si on s'intéresse à d'autres substrats carbonés éventuels, notamment les acides organiques (tartrate, malate, lactate, succinate …) ou le glycérol, présents dans le vin, on ne relève rien de significatif à dans la bibliographie.

2.2.1.5 – Formes azotées.

De nombreuses souches de *Brettanomyces*, appartenant en particulier aux espèces *B. bruxellensis* et *B. anomalus*, sont capables d'assimiler les nitrates et les nitrites comme seule source d'azote (Galzy et Rioux, 1955 ; Peynaud et Domecq, 1956 ; Barnett et al., 1990). Cette capacité est due à leur bagage enzymatique qui comporte des nitrate et nitrite-réductases. Ces enzymes sont cependant inhibées par un excès d'ammonium, phénomène qui aura pour conséquence de favoriser l'assimilation préférentielle des sources azotées organiques.

En culture aérée sur milieu synthétique minimum, Aguilar-Uscanga et al. (1999) notent l'influence sur une souche de *B. bruxellensis* d'une carence en extrait de levure et/ou ammonium par rapport à un milieu témoin. Cette carence se traduit par une production accrue d'acide acétique, un arrêt de la consommation du glucose et une diminution du rendement en éthanol. Un effet inhibiteur est par ailleurs observé par ces mêmes auteurs lors d'ajout à raison de 2 g/L de sulfate d'ammonium pour une souche de *B. bruxellensis* et à raison de 5,5 g/L pour une souche de *B. intermedius*.

2.2.1.6 – Vitamines.

Peu d'études sont menées sur les besoins de *Brettanomyces sp*. en vitamines. Barnett (1990) observe la croissance de souches de B. *bruxellensis* et *B. anomala* même en absence de *myo*-Inositol, de panthothenane, de pyridoxine et de niacine (B3). En revanche ces souches sont incapables de croître en absence de biotine (B8) et de thiamine (B1). Aguilar-Uscanda (1998) montre par ailleurs une absence d'effet significatif sur la croissance d'une souche de *B. bruxellensis* en milieu aéré lors d'un pulse de vitamine B6 (pyridoxine) à hauteur de 0,1 et 0,2 mg/L. Ce résultat semble être en contradiction avec des premiers essais effectués par Rose en Harrison (1971).

2.2.1.7 – En résumé : … des besoins simples.

D'une manière générale, on retient que *Brettanomyces* est une levure ayant des besoins nutritifs très simples, ce qui explique sa facilité à croître sur des milieux de synthèse minimaux (Aguilar Uscanga, 1998 et 1999), mais qu'elle sait tirer grand avantage des enrichissements éventuels par des facteurs de croissance ou des sources secondaires de carbone, d'azote et d'énergie.

2.2.2 – Effet Custer et effets de l'oxygéne.

Custer observe lors de ses travaux sur une souche de *B. clausenii* que la fermentation du glucose est inhibée en conditions d'anaérobiose. Ainsi il observe que l'oxygène a la particularité de stimuler la fermentation alcoolique et acétique du glucose chez *B. bruxellensis*, et ne canalise pas le flux de carbone dans les voies respiratoires. Ce comportement est a priori totalement opposé à celui si bien décrit pour *Saccharomyces* par Pasteur. A ce titre Custer baptise cet effet d'inhibition : l'effet « Pasteur Négatif » (Custer, 1940).

En 1961, Wiken généralise ce propos au genre *Brettanomyces* et présente dès lors l'Effet Pasteur Négatif comme une caractéristique de toutes les levures de ce genre à l'exception de l'espéce *B. custersianus*. Pour éviter toute conclusion, il rebaptise ce phénomène : « l'effet Custer ». Depuis, les auteurs et chercheurs s'accordent sur la définition de l'effet Custer comme étant une « inhibition de la fermentation alcoolique lors d'un passage d'aérobiose à des conditions d'anaérobiose ».

Wiken et al. (1962) mettent en avant l'influence de la concentration en ions K^+, ou du ratio K^+/Na^+ sur cette inhibition. Ainsi une augmentation de la teneur en K^+ (ou une diminution de Na+, à concentration cationique constante) provoque une augmentation de l'effet Custer.

Dès 1966, les travaux de Scheffers présente l'effet Custer comme une déficience métabolique. Dans la glycolyse, les transporteurs de protons réduits par la fermentation acétique sont oxydés d'une part par la respiration (régénération du cofacteur par les mitochondries) et d'autre part par la fermentation alcoolique qui est ainsi stimulée. Le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose entraîne ainsi une accumulation brutale de $NADH_2^+$, car la chaîne respiratoire ne fonctionne plus provoquant le blocage de la glycolyse au niveau du complexe G-3-P déshydrogénase (Scheffers et Nanninga, 1977).

Contrairement à *Saccharomyces* qui trouve dans la synthèse du glycérol un moyen de compenser ce déséquilibre, *Brettanomyces* semble être caractérisée par une déficience de cette voie métabolique de synthèse du glycérol (Scheffers,1966 ; Van Dijken et Scheffers, 1986). Néanmoins, le blocage des activités fermentaires est transitoire. Après élimination de l'excès de $NADH_2^+$ par un nouvel amorçage de la voie de synthèse de l'éthanol (mise en place d'un système de transport du glucose indépendant de l'oxygène, Wijsman et al., 1984), la fermentation alcoolique reprend exclusivement, mais avec une vitesse beaucoup plus faible qu'en aérobiose (Figure 02-1). Effet Pasteur et effet Custer relèvent donc de mécanismes différents et peuvent même intervenir simultanément pendant la fermentation alcoolique chez de nombreuses levures du genre *Brettanomyces*.

De plus, l'ajout supplémentaire d'oxygène ou d'un accepteur d'hydrogène organique (acétaldéhyde, acétone, acétoïne, acide pyruvique) s'accompagne d'un redémarrage de la fermentation alcoolique avec une activité et des performances normales (Scheffers, 1966 ; Wiken, 1967) après une bascule du mode aérobie à l'anaérobie, car ces accepteurs permettent une régénération de cofacteur (Figure 02-2). Pour la première fois en 1999, Gilis met en avant un effet similaire avec les nitrates. La reprise et l'accélération de la fermentation anaérobie sont même meilleures que celles obtenues avec l'acétoïne.

Le métabolisme chez *B. abstinens* de l'acétaldéhyde en acide acétique renforce par ailleurs l'hypothèse selon laquelle l'effet Custer serait lié à la réduction du cofacteur NAD^+ (Carrascosas et al., 1981). Ces mêmes auteurs montrent alors que l'effet Custer diminue lorsque la concentration en glucose augmente dans le milieu. Dès lors ils suggèrent qu'une enzyme liée au NAD^+ impliquée dans la production d'acide acétique est inhibée par le glucose, et qu'une autre enzyme, liée au $NADH_2^+$, est quant à elle constitutive.

Blondin et al. (1984) précise que la chaîne respiratoire chez *Brettanomyces sp*. est insensible à l'antimycine A, au cyanide et à l'azide, inhibiteurs des voies respiratoires chez les levures. Ils montrent ainsi l'existence d'une voie alternative de la respiration ne produisant pas d'ATP. Cette voie alternative maintiendrait donc le potentiel redox suffisamment élevé pour la ré-oxydation du cofacteur $NADH_2^+$. Cette voie métabolique pourrait être impliquée dans le mécanisme de l'effet Custer, mais à ce jour, aucune étude n'a été menée pour répondre plus précisément à la question.

Bien qu'il s'agisse d'une phénomène encore mal connu, on se rend compte lors d'une revue bibliographique que les études ne sont guère menées après les années 1980 pour en donner toutes les clés. Les flux métaboliques impliqués ne sont alors que partiellement identifiés. L'effet Custer, considéré comme un critère d'identification du genre *Brettanomyces/Dekkera* (Scheffers et Wiken, 1969) reste donc cependant teinté d'interrogations.

De plus, les levures du genre *Brettanomyces* sont Crabtree positive (Gilis, 1999). Ainsi, en conditions d'aérobiose lorsque le substrat carboné est le glucose, on assiste à une bascule du mode respiratoire au mode fermentaire alcoolique à partir d'une certaine concentration en sucre.

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, chez *Brettanomyces sp*., l'oxygène stimule la fermentation alcoolique mais aussi la fermentation acétique du glucose : il y a alors production d'éthanol, de CO_2 et d'acide acétique. Seuls les deux premiers composés précédemment cités sont produits en anaérobiose stricte (Ciani et Ferraro, 1997 ; Aguilar-Uscanga, 1998 ; Gilis, 1999 ; Freer, 2002). En comparaison à des conditions de culture en aérobie, le passage à des conditions de semi anaérobie entraîne une augmentation de la production en acétaldéhyde et acétate d'éthyle (Ciani et al., 2003) qui affectent les profils de fermentation.

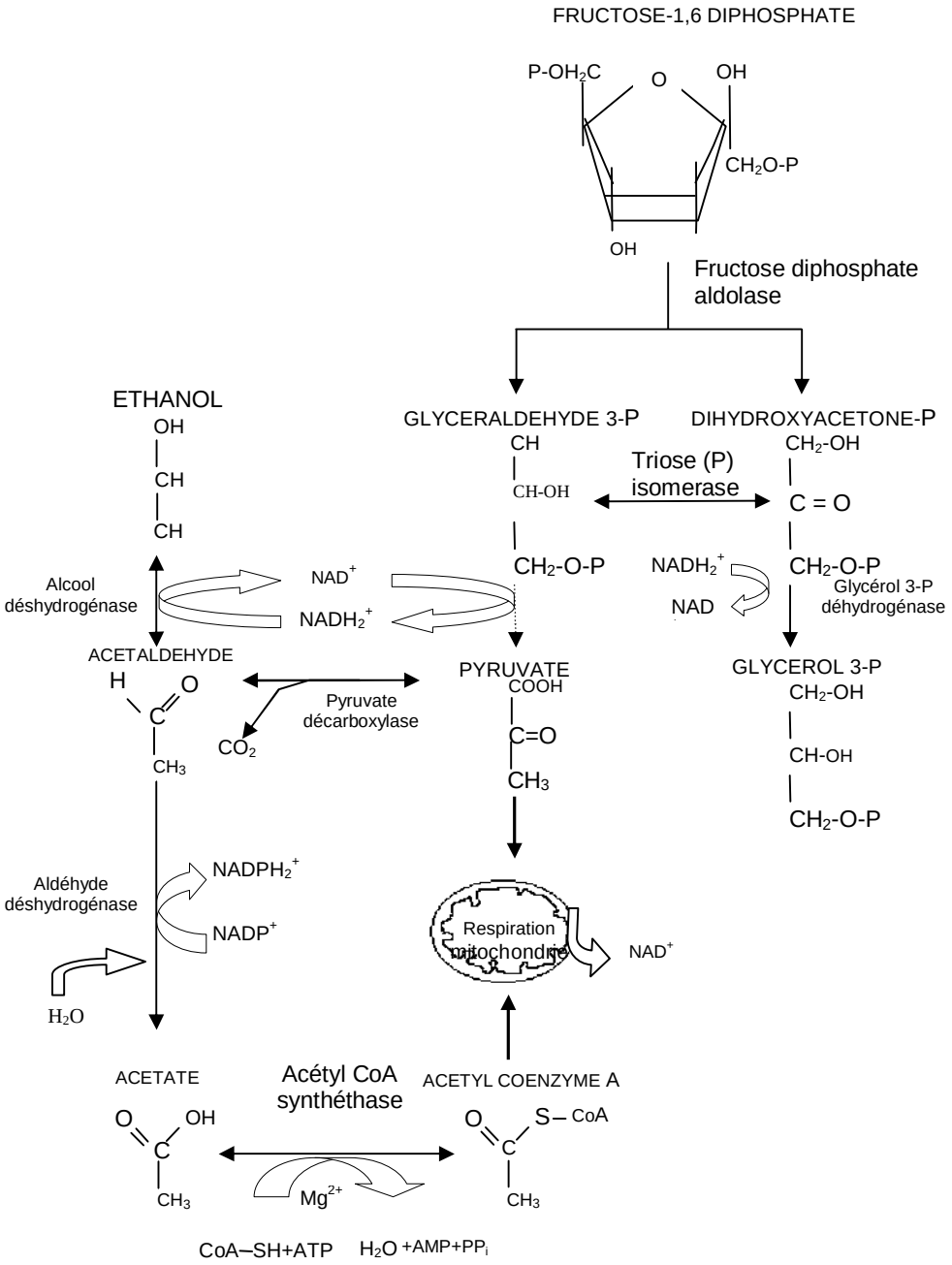
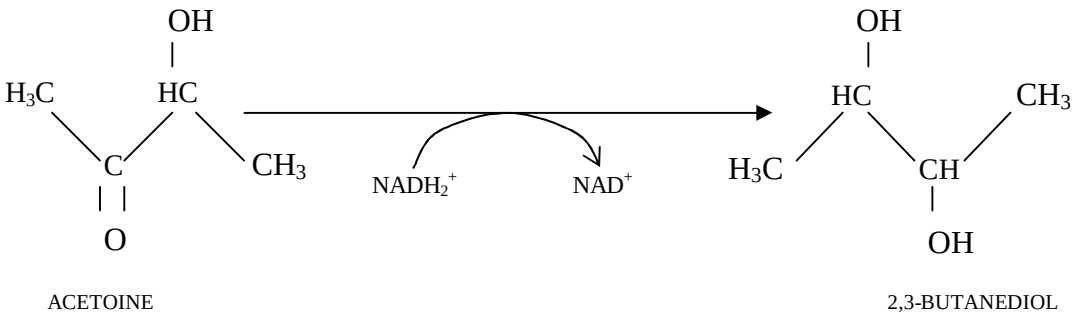


Figure 02-1. Balances oxydatives du NAD chez les levures.



ACETOINE 2,3-BUTANEDIOL

Figure 02-2. Réduction de l'acétoïne : régénération du cofacteur NAD^+.

2.2.3 – Résistance à la cycloheximide (actidione).

Les levures du genre *Brettanomyces* présentent une bonne résistance à la cycloheximide (actidione). Ce composé a en revanche une action fongistatique sur *Saccharomyces*, par inhibition de la protéosynthése (Barnett et al., 1990). Certaines souches mutantes spontanées de *Saccharomyces cerevisiae* sont résistantes à la cycloheximide (Perez et al., 2000). Cependant des cultures répétées sur milieu contenant de l'actidione sont susceptibles d'entraîner des modifications physiologiques sur *B. bruxellensis*, comme une perte des aptitudes à fermenter certains sucres (Delia et Gilis, communications personnelles).

3 – *Brettanomyces* dans le secteur viti-vinicole.

Les problèmes liés à la présence et au développement de *Brettanomyces* dans les vins sont principalement d'ordre organoleptiques. Contrairement aux contaminations qui ont lieu dans des unités de production d'alcool où on observe des pertes de rendement du fait de conversions plus faibles par *Saccharomyces*; en cours de vinification, le développement de *Brettanomyces* ne prévient pas la conversion des sucres initiaux des moûts en alcool par les levures fermentaires (Loureiro, 2003). D'ailleurs, il a été principalement montré que ces levures se développent dans des vins finissant leur fermentation alcoolique, ou déjà en cours d'élevage (Foudrière et Larue, 1988 ; Larue et al., 1991), en vieillissement en barriques ou en bouteilles alors que les sucres résiduels sont à des concentrations faibles et la teneur en alcool déjà à son niveau désiré dans la produit.

Les *Brettanomyce*s les plus souvent rencontrées dans l'environnement vinicoles appartiennent à l'espèce *B. bruxellensis*. C'est d'ailleurs cette espèce que l'on dépiste quasi exclusivement dans les vins contaminés (Chatonnet et Dubourdieu, 1999 ; Mitrakul et al., 1999 ; Stender et al., 2001 ; Egli et Henick Kling, 2001 ; Dias et al., 2003(a)).

3.1 – Les vins animaux.

La contamination par *Brettanomyces* se traduit par des défauts qualifiés d'animaux, de phénolés, de pharmaceutiques, …, dus à la présence de composés volatiles malodorants.

3.1.1 – Les phénols volatiles.

3.1.1.1 – Les molécules mal-odorantes.

Le défaut des vins rouges caractérisés de « phénolés » et « animaux » est directement lié à la présence d'une quantité non négligeable de phénols volatils. Il s'agit en particulier d'éthyl-4-phénol et

d'éthyl-4-gaïacol (Figure 02-3). A ceux là, s'ajoutent les vinyls phénols associés (vinyl-phénol et vinyl-gaïacol).

La présence de vinyl-phénols provoque des odeurs de vanille, d'épices lourdes et grillées, de fumet animal, de sparadrap® et de métal. Les éthyls-phénols sont quant à eux associés à des odeurs d'œillet fané, de cuir, de sueur de cheval, d'écurie, de sparadrap® , de plastique, de fourrure mouillée, de viande crue, de feutre et de gouache (Licker et al., 1997).

Les éthyl-4-phénol et éthyl-4-gaïacol provoquent la dérive organoleptique du vin lorsqu'ils atteignent des concentrations supérieures à leur seuil de détection dans le vin à savoir 450 µg/l dans des proportions respectives de 8:1 (Chatonnet et al., 1990 et 1992(a); Dubois, 1993 et 1994).

Remarques :

On rappelle que le seuil de détection (SD50) est la teneur minimale pour laquelle 50 % d'un panel de dégustateurs peuvent distinguer la matrice sans le composé, de la matrice contenant le composé dissous.

Les vinyl-phénols perçus négativement d'une manière générale dans les vins rouges peuvent apporter une touche appréciée dans les vins blancs d'Alsace, notamment des Gervurztraminer (Grando et al., 1993). Le vinyl-gaïacol est même de nos jours employé en parfumerie.

3.1.1.2 – Faites entrer l'accusé.

Dès 1986, *Brettanomyces sp.* sont mis en cause dans l'origine de ces défauts aromatiques (Heresztyn, 1986). Elles sont alors formellement accusées par Chatonnet et al. (1992a et 1992b). En effet, de part leur bagage enzymatique particulièrement adapté, les levures du genre *Brettanomyces/Dekkera* (particulièrement *B. bruxellensis*) sont quasiment les seules de la flore des vins rouges à être capables de former des quantités importantes d'éthyl-phénols à partir des précurseurs présents dans le vin, les acides hydroxycinnamiques. Certaines bactéries lactiques (dont *Oenococcus oeni*) sont également certes capables de synthétiser ces phénols volatils, mais les quantités résultantes sont largement inférieures aux teneurs nécessaires à l'apparition des odeurs désagréables (Cavin et al., 1993 ; Chatonnet et al., 1995 ; Chatonnet et Dubourdieu, 1999). En effet Shinohara et al. (2001) confirment ce point en montrant que *O. oeni* ne peut produire des quantités de phénols volatils perceptibles que lorsque la concentration en précurseurs dans le milieu est supérieure à 1 g/L, teneur largement supérieure à celle rencontrées dans les vins finis ou en cours de vinification.

Dias et al. (2003b) montrent cependant qu'il existe quelques souches de *Pichia guillermundii* capables de synthétiser des quantités d'éthyl-4-phénol équivalentes à celles produites par *Brettanomyces*. Bien que présente dans l'environnement viti-vinicole, cette levure ne résiste pas à l'éthanol dans les concentrations obtenues au cours de la fermentation alcoolique et très rapidement n'appartient plus à la microflore présente en cours de vinification. Les dégâts qui lui sont alors imputables dans la pratique semblent donc soit minimes par rapport à ceux associés à *Brettanomyces*,

soit équivalent voire largement aggravante si son activité contaminante (production de 4-éthyl-phénol) a lieu avant le début de la fermentation alcoolique. Barata et al. (2006) mettent alors en avant l'intérêt d'une bonne gestion des inocula de Fermenation Alcoolique. Toutes ces souches de *P. guillermundii* ne semblent cependant pas égales quant à leur capacité de production d'éthyl-4-phénol (Martorell et al., 2006).

Il a été montré en revanche que dans un contexte œnologique, les *Saccharomyces* sont à exclure du groupe des coupables synthétiseurs d'éthyl-phénol (Chatonnet et al., 1997). Ces dernières, ne possédant qu'une des deux enzymes nécessaires à la bio-synthése des molécules incriminées ne peuvent produire les phénol-volatils, d'autant qu'il existe une inhibition de cette activité enzymatique par le milieu (Cf paragraphe suivant).

3.1.1.3 – Biosynthèse des Phénols Volatils (par *Brettanomyces*).

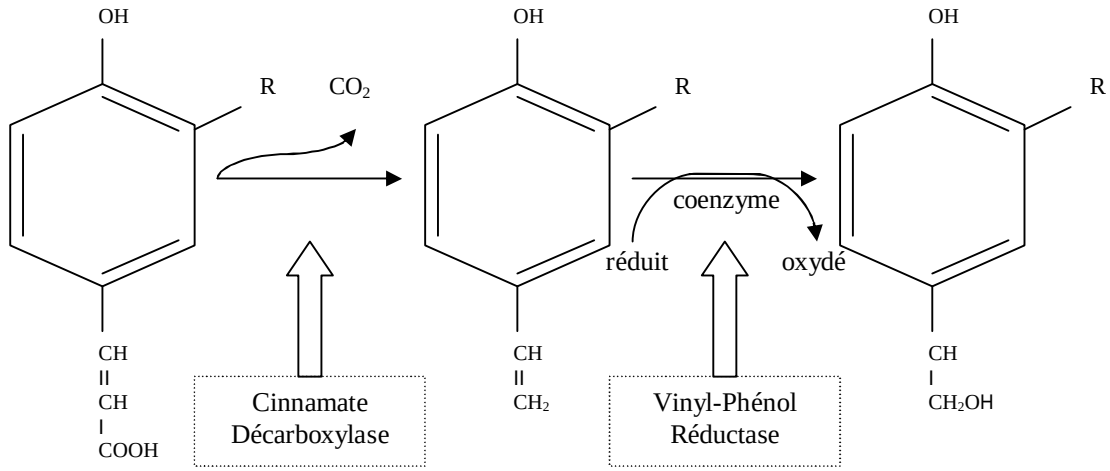
Les précurseurs de synthèse des deux principaux phénols volatiles incriminés sont des acides hydroxy-cinnamiques : respectivement pour l'éthyl-4-phénol et l'éthyl-4-gaïacol, l'acide para-coumarique et l'acide férulique, présents tous deux dans les moûts de raisin initialement sous formes estérifiées avec l'acide tartrique (tartarate de coumaroyl et tartarate de feruloyl). Pour indication, dans le moût de raisin en début de fermentation, l'acide para-coumarique peut atteindre après hydrolyse de l'ester associé une concentration de 60 mg/L (Chatonnet et al., 1992a) et dépasse rarement les 8 mg/L dans les vins finis après clarification (Goldberg et al., 1998). De nombreux micro-organismes, dont *Brettanomyces*, peuvent hydrolyser les esters du vin pour libérer ainsi ces acides cinnamiques précurseurs grâce à une activité enzymatique cynamyl estérase (O'Neill et al., 1996).

La biosynthèse des phénols volatils à partir des acides cinnamique fait intervenir deux activités enzymatiques. La première enzyme mise en jeu, une cinnamate décarboxylase (CD) transforme les acides cinnamiques en vinyl-phénols correspondants. C'est ensuite l'action d'une vinyl-phénol réductase (VPR) qui permet au micro-organisme de synthétiser les éthyl-phénols associés aux acides initiaux (Chatonnet et al., 1995, Edlin et al., 1995).

La CD est une enzyme cytoplasmique constitutive chez les levures, et membranaire inductible chez les bactéries. Aussi bien présente chez *Brettanomyces* que *Saccharomyces*, elle possède cependant des caractéristiques différentes chez ces deux genres. En effet, chez certaines espèces de *Brettanomyces*, elle permet également de décarboxyler d'autres acides phénols du vin (Figure 02-4), tels que les acides sinapique et hydroxy-4-diméthoxy-3,5-cinnamique aboutissant en autre à la formation de vinyl- puis éthyl-4-syringol, qui complète dès lors le caractère phénolé (Heresztin, 1986 ; Edlin et al., 1998). La spécificité de la cinnamate décarboxylase varie d'une espèce à l'autre au sein du genre *Brettanomyces* (Edlin et al., 1995).

Chez *Saccharomyces*, la CD est fortement inhibée par des composés poly-phénoliques (procyanidine, catéchine) du vin rouge, ce qui explique l'incapacité de ce genre à produire au final des

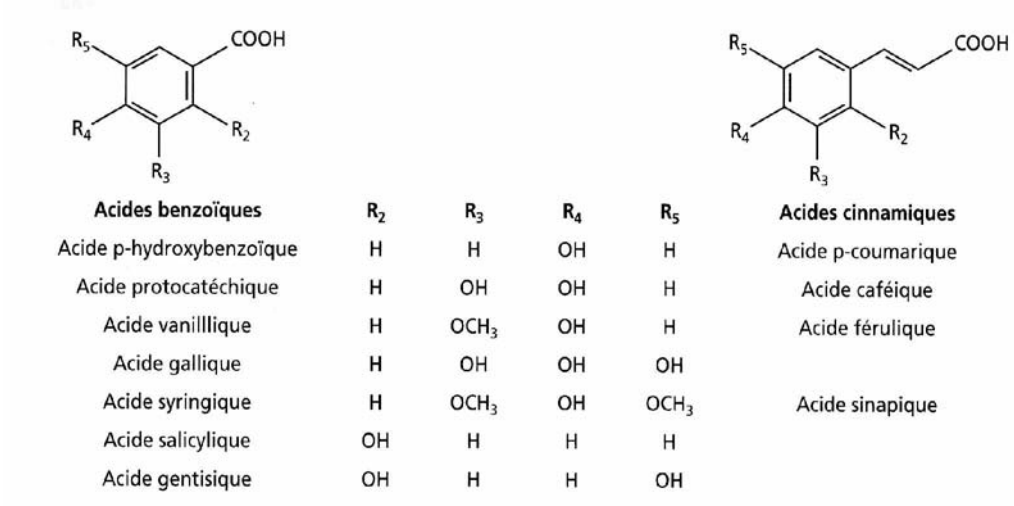
éthyl-phénols (Chatonnet, 1992a). L'activité VPR est en revanche absente des levures de la flore de vinification autre que *Brettanomyces* et *P. guillermondii.*



Acide cinnamique Vinyl-phénol Ethyl-phénol

R = - H : acide p-coumarique → vinyl-4-phénol → éthyl-4-phénol
R = - OCH3 : acide férulique → vinyl-4-gaiacol → éthyl-4-gaiacol

Figure 02-3. Réactions de biosynthèse des éthyl-phénols par Brettanomyces.



Acides benzoïques	R_2	R_3	R_4	R_5	Acides cinnamiques
Acide p-hydroxybenzoïque	H	H	OH	H	Acide p-coumarique
Acide protocatéchique	H	OH	OH	H	Acide caféique
Acide vanillique	H	OCH_3	OH	H	Acide férulique
Acide gallique	H	OH	OH	OH	
Acide syringique	H	OCH_3	OH	OCH_3	Acide sinapique
Acide salicylique	OH	H	H	H	
Acide gentisique	OH	H	H	OH	

Figure 02-4. Acides phénols du vin.

Dias et al. (2003a) montrent que *B. bruxellensis* n'est pas capable de transformer l'acide para-coumarique en éthyl-4-phénol lorsque le milieu est totalement exempt de source de carbone et d'énergie. En revanche, en présence de telles sources, la synthèse du composé phénolé s'effectue sans

que l'on connaisse le bénéfice tiré par la levure. Pour une souche de *B. bruxellensis*, Dias détermine ainsi des taux de conversion de 90 % lorsque la source carbonée utilisée est du glucose (20 g/L), proche de 80 % pour l'éthanol comme source de carbone, et au mieux 10 % en présence de tréhalose (20 g/L) ou d'acide acétique (1 g/L), avec une teneur en acide para-coumarique de 100 mg/L.

Les observations divergent néanmoins entre divers auteurs quant au stade de la croissance où a lieu cette synthèse. Ainsi Zoecklein (2000) affirme que pour *B. intermedius*, l'enrichissement du milieu en éthyl-phénol a lieu en majeure partie après l'arrêt de croissance c'est-à-dire pendant la phase stationnaire voire de déclin ; alors que Medawar (2003) met en avant une production de ces mêmes composés dès l'amorce voire le milieu de la phase exponentielle de croissance avec une vitesse de production beaucoup plus élevée que pendant la phase stationnaire.

Selon Baranowky et al. (1980), les acides cinnamiques sont des inhibiteurs de croissance des levures du genre *Saccharomyces*. Leur transformation en composés moins toxiques (vinyl- puis éthyl-phénols) est un moyen de défense du micro-organisme. Ce phénomène ne semble pas exister chez *Brettanomyces*, sans que l'on sache à ce jour le rôle de cette réaction métabolique.

Les macérations carboniques ont tendance à enrichir les vins en acides cinnamiques, ce qui expliquerait la prédisposition des vins rouges ainsi obtenus à ce type de contamination (Etievan et al., 1989).

3.1.2 – Les tétrahydropyridines.

La seconde catégorie de composés responsables eux aussi d'un défaut du type animal sont les tétrahydropyridines substitués (Figure 02-5), principalement les deux isomères que sont la 2-acétyl-3,4,5,6-tétrahydropyridine et la 2-acétyl-3,4,5,6-tetrahydropyrodine, auxquels s'ajoutent également l'éthyl-tetrahydropyridine et le 2-acétyl-1-pyrroline (Herderich et al., 1995). En faible concentration, ces molécules s'associent à une odeur de panification, de pop-corn ou de biscuit. Mais à des concentrations plus élevées, l'arôme perçu devient fortement désagréable : odeurs de souris ou de nid de souris (Grbin et Henschke, 2000). Là encore les *Brettanomyces* sont en ligne de mire des accusations car elles peuvent les produire à partir de la lysine (par condensation avec l'éthanol), acide aminé naturellement présent dans le vin (Grbin et al., 1999). Certaines bactéries lactiques du genre *Lactobacillus (brevis, hilgardii, ...)* en sont elles aussi potentiellement productrices, en métabolisant l'éthanol (Heresztyn, 1986).

R = - CH_2CH_3 : 2-éthyl-3,4,5,6-tétrahydropyridine

R = - $CO(CH_3)$: 2-acétyl-3,4,5,6-tétrahydropyridine

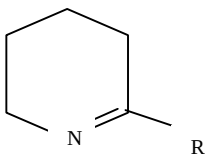


Figure 02-5. Exemples de tétrahydropyridines : l'odeur de souris dans le vin.

3.1.3 – Les autres défauts organoleptiques imputables à *Brettanomyces*.

3.1.3.1 – Détérioration prématurée des caractères fruités.

Les esters jouent un rôle important dans le bouquet aromatique des vins rouges. En effet, ils sont responsables des touches fruitées. La plupart de ces esters sont produits en cours de fermentation par *Saccharomyces* et sont lentement dégradés par hydrolyse au cours du vieillissement. Or les *Brettanomyces sp.* possèdent une activité estérase et aldéhyde deshydrogénase relativement forte (Spaepen et Verachtert., 1982) et peuvent par conséquent accélérer ce phénomène. Il en résulte alors une perte prématurée de certains arômes fruités, notamment ceux des fruits rouges. Le vin devient alors non appréciable qualitativement, avant de se fermer (Oenodev, communications personnelles).

3.1.3.2 – Les acides organiques.

La présence de *Brettanomyces* dans un moût de fermentation ou un vin peut également s'accompagner de la production d'acidité volatile affectant la qualité du produit final. On recense entre autres les acides isovalérique, isobutyrique et méthyl-2-butyrique (Van Wyk, 1973 ; Henick-Kling et al., 2000). Mais l'acide produit par *Brettanomyces* le plus facilement détectable en dégustation reste l'acide acétique. En présence d'oxygène, même sous forme de trace, les *Brettanomyces sp.* sont capables de produire de l'acide acétique (activité alcool déshydrogénase) en quantité suffisante pour marquer le vin. Nous retenons de plusieurs communications personnelles avec Oenodev (expériences sur le terrain), que lors de vin flashé, même avec micro-oxygénation, il n'y a pas formation d'acide acétique, sauf dans le cas de développement simultané de bactéries acétiques. En revanche une anaérobiose stricte se traduit par une absence de synthèse de cet acide (Ciani et al., 1997 et 2003).

Dans le vin où l'acide acétique est présent, on rencontre également souvent son dérivé, l'acétate d'éthyle, résultant de son estérification avec l'éthanol. La présence de l'acide et de ce dérivé se retrouve en dégustation par une note aigre et de raisin piqué. (Dubois, 1993 et 1994).

Les *Brettanomyces sp.* sont également responsables d'un enrichissement du milieu par d'autres acides organiques. On y compte par exemple des acides gras à chaîne courte (octa- ou nona-, ou décanoïque) qui en plus de concourir au défaut organoleptique, odeur de savon, (Licker et al. 1997) peuvent se révéler être des agents inhibiteurs de croissance de *Saccharomyces sp.* et d'*Oenococcus oeni* à partir de certaines concentrations (Viegas et al., 1989). La bibliographie actuelle ne fait pas état quantitatif de ces teneurs en acides gras produits par *Brettanomyces*.

3.1.4 – Un défaut encore difficilement cerné.

Il n a pas été à ce jour clairement démontré et quantifié de relation entre les teneurs exactes de ces composés dits malodorants dans la matrice vin et les degrés et caractères précis des défauts

olfactifs perceptibles. Plusieurs auteurs parlent d'un effet de synergie, rendant la compréhension du phénomène encore plus difficile (Licker et al., 1997, Chatonnet et al.,1992a et 1993). Pour s'en convaincre on peut par exemple préciser que pris séparément et sous forme pure l'éthyl-4-phénol et l'éthyl-4-gaïacol présentent respectivement des odeurs de sparadrap® et de bois brûlé alors qu'en combinaison dans le vin l'odeur ressentie varie de celle du clou de girofle à celle d'urine de cheval.

De plus, il a parfois été montré analytiquement des teneurs en phénols volatils supérieurs aux seuils de perception sans que gustativement les vins concernés présentent les défauts organoleptiques associés, mettant en avant toute la complexité du problème (recouvrement par d'autres molécules ? existence de pièges organoleptiques ? phénomènes de combinaison ? …) (diverses communications personnelles).

Pour certains, la présence de ces composés en quantités très faibles (inférieures au seuil de recouvrement) peut contribuer à la complexité de caractère du vin, pas forcément négative et parfois recherchée. Mais une telle complexité peut néanmoins dégénérer assez rapidement, sous l'action de paramètres non encore maîtrisés (Fugelsang, 1997 et 1998 ; Heimoff, 1996).

3.2 – Origines et foyers de contamination … :

Actuellement, la ou les origines de la contamination par *Brettanomyces* reste(nt) encore confuse(s). La contamination est-elle pré-fermentaire, post-fermentaire, une conjugaison des deux, ou bien plus complexe encore ? A ce propos, les avis ne sont pas clairement posés.

3.2.1 – *Brettanomyces* sur le raisin.

Pendant des décennies, de nombreuses écoles s'accordent pour réfuter la présence éventuelle de *Brettanomyces* au sein de la microflore naturelle du raisin et son implication dans le schéma de contamination des vins. Néanmoins, des travaux d'isolements récents conjugués au développement de méthodes de dépistage plus performantes semblent révèler la présence réelle de *Brettanomyces* sur raisin (Aroujo et al., 1998 ; Preterious, 2000 ; Oenodev Communications personnelles, 2000 2001 et 2002 ; Gadoury et al., 2002). Renouf et Lonvaud-Funel (2006(a)) confirment récemment présence de *B. bruxellensis* sur plusieurs domaines du vignoble Bordelais, à différents stades de maturité des baies, et précisent l'intérêt d'un enrichissement lors de la procédure de dépistage afin d'éviter les sous évaluations de présence.

3.2.2 – *Brettanomyces* dans les chais.

Peynaud et Domecq (1956) notent la présence de cellules de *Brettanomyces bruxellensis* viables sur les murs et sur les sols souvent humides de certaines caves. La présence de ce contaminant a

également été montrée en aval des étapes de fermentation, comme sur des lignes d'embouteillage (Connel et al., 2002). L'environnement même du chai est alors susceptible d'abriter ces germes comme le suggèrent ces derniers auteurs en mettant en avant la présence de *Brettanomyces* dans des échantillons d'air prélevé dans des chais. Peynaud met ainsi en garde dès 1984 les acteurs du monde vinicole, en rappelant que « chaque producteur se doit de considérer chaque centimètre carré de son chai et de l'équipement qui y est abrité comme source potentielle de levures». Néanmoins, personne n'a encore à ce jour apporté la preuve formelle par filiation génétique que les *Brettanomyces* dépistées sur les murs, sols, ou équipements sont les mêmes retrouvées comme agents de contamination de la boisson.

Il est intéressant de noter qu'il n'a pas été à ce jour établi de réelle relation de cause à effet entre la présence de *Brettanomyces* contaminantes dans des caves et le niveau de vétusté ou l'âge de cette cave. Ainsi, des vins contaminés ont été relevés dans des chais « récents » (cuverie inox, sols lisses, murs et plafonds lisses…) alors que certains anciens chais « traditionnels » (foudres de fermentation en bois, murs crépis, toiture apparente…) n'ont jamais été confrontés au problème *Brettanomyces.*

Les problèmes de contamination par *Brettanomyces* restent néanmoins associés aux défauts d'hygiène comme le suggère la présence de la levure dans des dépôts organiques dans des pompes servant au transfert des moûts (Fulgelsang, 1998). On garde cependant à l'esprit qu'une attention portée à l'hygiène dans la gestion des procédés, en particulier le nettoyage minutieux des équipements peut être un moyen de prévenir ou contenir la contamination.

3.2.3 – *Brettanomyces* dans les moûts.

De part le monde, nombreux sont les chercheurs qui ont isolé des *Brettanomyces* à partir de moût de raisin en cours de fermentation : France, Espagne, Portugal, Italie, Afrique du Sud, Vénézuéla, Japon … (Ibeas et al., 1996 ; Ciani et al, 1997 ; Chatonnet et al. 1995 ; Aroujo et al., 1998 ; Shinoara et al., 2000 ; Guilloux-Benatier M. et al.,2001 ; Rodriguez et al., 2001 ; Dias et al., 2003(a) ; Medawar, 2003, …). Mais aucun cas de contamination ne fait état d'une présence majoritaire de *Brettanomyces* dans les moûts en cours de fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* qui demeure l'espèce prédominante (Renouf et al., 2006).

La présence de *B. bruxellensis* dans les moûts au stade pré-fermentaire et/ou en cours de fermentation est donc certes reconnue comme un potentiel de contamination avérée ou non par la suite, mais aucune relation de cause à effet n'est démontrée.

3.2.4 – *Brettanomyces* dans les barriques.

Les barriques en bois constituent des foyers de prédilection de *Brettanomyces* (Chatonnet et al., 1992a – 1993 ; Chatonnet, 2000 ; Oenodev, Communications personnelles ; Renouf et Lonvaud-Funel,

2005). Il faut cependant préciser que les barriques ne sont pas des niches écologiques à proprement parler de *Brettanomyces*, mais qu'elles peuvent héberger pendant plusieurs années ces contaminants si elles ont préalablement contenu un vin contaminé dès la cuve. Plusieurs explications hypothèses sont avancées :

- d'une part, le bois, est un matériau impossible à stériliser complètement de part sa nature et structure fortement poreuse. Ainsi, les mesures classiques de nettoyage des barriques usagées ne suffisent pas à éliminer le risque de rétention puis relargage de la contamination. En effet, il existe une épaisseur non atteinte par l'agent de nettoyage ou/et stérilisation (eau, vapeur, souffre, ozone…) et susceptible d'être une zone de rétention pour le contaminant (Laureano et al., 2003)
- d'autre part, on rappelle que *Brettanomyces* possède une activité enzymatique forte. Plus particulièrement, elle produit des β-glucosidases lui permettant de croître en métabolisant les sucres naturels du bois : cellobiose et autres di-saccharides (Gondé et al., 1982 ; Fulgelsang, 1998).

Le potentiel de contamination devient alors de plus en plus important avec les usages répétés conjugués à une mauvaise maîtrise de l'assainissement (Chatonnet et al., 1992a ; Garde Cerdan et al., 2002).

3.2.5 – Vecteurs de propagation.

Aucune certitude n'est établie à ce sujet, mais de nombreuses hypothèses sont émises quant à la nature des vecteurs potentiels pouvant propager les *Brettanomyces.*

Ainsi, les *Drosophila sp.* , plus particulièrement *D. melanogaster* (mouche du vinaigre) qui abondent dans les alentours plus ou moins proches des chais apparaissent au premier rang des candidats. Des levures de différentes espèces dont *B. intermedius et B. schanderlii* ont été isolées sur des mouches présentes dans l'environnement des caves (Van Der Walt et Van Kerkan, 1959) mais aussi des vignes. Dès lors, on comprend les risques et le potentiel de propagation au sein des locaux et sur baies (Shehata et Mrak, 1951 ; Licker et al. 1998). Ce risque est d'autant plus grand que ces drosophiles, de part leur mode d'alimentation et de reproduction affectionnent particulièrement les entrepôts de marcs ou les tas de marcs stockés à l'air libre, considérés comme des niches écologiques riches en germes dont *Brettanomyces* (Chatonnet et al., 1999).

D'autres animaux et insectes sont connus pour être des vecteurs de levures : araignées, guêpes, abeilles, fourmis (Sandhu et Waraich, 1980). Mais les études qui s'attachent au dépistage de *Brettanomyces* à ce niveau sont particulièrement rares.

En 2002 Connell et al. mettent en avant la présence de *Brettanomyces* dans des échantillons d'airs relevés à divers endroits d'une cave. A plus forte raison, le vent peut aussi être considérés comme un vecteur potentiel de propagation au niveau des parcelles notamment.

3.3 – Dépistage de *Brettanomyces*.

D'une manière générale, dans toute industrie agro-alimentaire, de nombreuses méthodes existent pour déceler et mettre en avant la présence microbienne, dans un but de contrôler la qualités des produits. Dans le cadre d'un contrôle de contamination, il s'agit alors d'appliquer des procédures adaptées, dès l'échantillonnage, au dépistage du contaminant et permettant ainsi l'identification précise des agents susceptibles de représenter un risque (pour l'intégrité du produit), voire un danger (pour le consommateur). Une étape supérieure est franchie lorsqu'une quantification de cette contamination est proposée.

Dans le cadre de *Brettanomyces* en œnologie, l'objectif n'est pas de se munir d'outils pour faire face à une contamination pathogène, mais d'avoir les outils permettant une évaluation de la contamination afin d'agir le plus rapidement possible et éviter la détérioration du vin éventuellement contaminé. Il s'agit également de se munir d'outils de prospection dans un but de compréhension de la contamination (dès la/les sources de contamination). Néanmoins, on remarque dans l'ensemble de la bibliographie que les méthodes proposées pour le dépistage, l'identification et la quantification de *Brettanomyces* ne sont pas à ce jour parfaitement satisfaisantes ou adaptées au contexte « industriel ».

3.3.1 – Milieux sélectifs.

Une des possibilités envisagées pour détecter une espèce est de mettre en avant ses caractéristiques morphologiques et/ou physiologiques et/ou biochimiques. Ainsi, les critères les plus souvent retenus pour *Brettanomyces* sont : l'acidification en aérobiose, la synthèse d'éthyl-phénols en présence du précurseur qu'est l'acide para-coumarique, l'assimilation de diverses sources de carbone tels que des di-sacharides ou l'éthanol, la résistance à l'actidione (cycloheximide), la faible exigence nutrionnelle en facteurs de croissance et substrats carbonés et azotés. De nombreux milieux inspirés par ces critères sont développés. Nous ne donnons ici que quelques exemples disponibles sur les marchés ou simplement proposés par des auteurs :

- BSM (*Brettanomyces* Specific Medium, Millipore Corp.). Il contient de la cycloheximide et une teneur en glucose de 20 g/L. Selon Loureiro et Malfeito-Ferreira (2003), un tel milieu contenant 20 g/L de glucose n'est pas adapté à la détection de *Brettanomyces* car une telle teneur en sucre favorise le développement d'espèces à croissance rapide telles que *Kloechera apiculata*, *Candida tropicalis* ou *Pichia guillermondii*. Ainsi ce milieu précédemment décrit ne serait donc qu'un moyen de mettre en avant des espèces résistantes au cycloheximide (Stender, 2001).
- Chatonnet et al. (1992a) proposent un milieu contenant des sucres peu assimilés par les *Kloeckera* (saccharose et tréhalose), de l'actidione pour prévenir le développement de *Saccharomyces sp.*, de l'acide sorbique pour son action fongi-statique (ralentissement du développement de moisissures), de la pénicilline et de la gentamicine à titre d'antibiotiques

vis-à-vis des bactéries lactiques et acétiques. Le vert de bromocrésol est ajouté en tant qu'indicateur coloré de pH, virant du bleu au jaune puis vert sous l'action acidifiante de certaines espèces microbiennes (zone de virage : 3,8-5,4)

- Rodriguez et al. (2001) proposent quant à eux un milieu solide DBDM (*Dekkera/Brettanomyces* Differential Medium) qui permet la sélection de *B. bruxellensis* en utilisant l'éthanol comme unique source de carbone et d'énergie, la résistance à l'actidione, un indicateur d'acidité (vert de bromocrésol) et en fournissant l'acide p-coumarique précurseur de la synthèse des éthylphénols dépistés par l'odeur phénolée qui se dégage. Au fur et à mesure de l'incubation, les colonies de *Brettanomyces* se colorent en vert (Dias et al., 2003a). Une incubation de 10 jours minimum est recommandée avant lecture des boites. Ce milieu se montre très efficace pour révéler la présence de *B. bruxellensis* dans des échantillons de vins où une certaine sélection des espèces est déjà effectuée. Mais pour une gamme plus large d'échantillons à population très variée (raisin, jus de fruit, insectes, …) sa spécificité n'est pas suffisante. En effet, *P. guillermondi*, présente les mêmes caractères de croissance sur ce milieu que *Brettanomyces* : production d'acidité suffisante pour provoquer le virage de l'indicateur et aussi synthèse de phénols volatils (Dial et al., 2003(b)). La seule différentiation possible : la durée d'incubation nécessaire au développement des colonies : 2-3 jours pour *Pichia* ; et 7-12 pour *Brettanomyces/Dekkera*.
- Couto et al. (2003) développent un schéma simple de dépistage, en milieu liquide : appréciation de croissance par trouble dans un milieu semi-selectif (glucose, chloramphénicol et actidione) et la présence d'acide p-coumarique dans leur milieu permet d'apprécier, après conversion, la formation d'éthyl-4-phénol. Au regard des résultats croisés de Loureiro et Malfeito-Ferreira (2003) et de Dias et al. (2003(a)), ce milieu n'est que semi sélectif et ne permet que de dépister la présence de contaminant actidione-résistant et producteur d'éthyl-phénol (*Brettanomyces sp., Pichia guillermundii*).
- Divers autres milieux simples sont proposés avec comme seul critère la production d'acidité : milieu gélosé au carbonate de calcium (Barnett et al., 2000), milieu gélosé au rouge de méthyle (Gilis 1999) dont la zone de virage se situe entre 4,2 et 6,2. Ils ne sont donc que peu sélectifs pour une population aussi diversifiée que celle existante dans un moût en fermentation. En effet, nombres de micro-organismes du cadre œnologique sont producteurs d'une acidité plus ou moins importante.

Medawar développe en 2003 une méthode d'identification du genre *Brettanomyces* en plusieurs étapes : une première culture d'enrichissement semi-sélective en milieu liquide puis un isolement semi-sélectif sur milieu gélosé contenant chloramphénicol et actidione. Vient ensuite un test d'acidité sur gel au carbonate de calcium. Tout au long de cette procédure, des observations microscopiques

permettent une élimination des non-*Brettanomyces*. Cette procédure, ne permet qu'un dépistage à l'échelle générique, mais pas à un niveau de l'espèce et encore moins de la souche.

De manière générale, on retient que ces milieux ne sont que semi-sélectifs. Des levures n'appartenant pas au genre *Brettanomyces* pouvant elles aussi s'y développer, il est conseillé, voire indispensable de poursuivre l'investigation pour garantir la validité de la détection. Par ailleurs, s'agissant pour la majorité de cultures directes sur milieu solide (exceptions faites des procédures proposées par Medawar, 2003 et Couto, 2003), ces méthodes supposent l'aptitude du contaminant à se développer directement sur un gel. Or, le milieu d'échantillonnage (vin sulfité, teneur élevée en alcool, …) peut être considéré comme stressant, provoquant potentiellement un état physiologique particulier : les Cellules Viables mais Non Cultivables, comme le suggèrent Millet et Lonvaud-Funel (2000) et du Toit et al. (2005). Une sous-évaluation de la contamination est alors à prendre en compte.

Par ailleurs, ce type de dépistage s'arrête à l'échelle du genre, voire à de rares occasions de l'espèce. Mais il est encore exclu de pouvoir effectuer une discrimination des souches.

De plus, la limitation majeure à l'utilisation de milieu sélectif dans un contexte industriel est le temps nécessaire à l'obtention des résultats, parfois trop long (3 jours à 3 semaines) pour permettre une réactivité efficace en cas de contamination réelle.

3.3.2 – Profils d'acides gras.

Rozes et al. (1992) ont mis en place une base de données sur les profils d'acides gras cellulaires (de C8 à C18) de différentes levures par Chromatographie en Phase Gaz. Les profils d'acides gras sont alors classés en groupes par une Analyse Statistique en Composantes Principales (Dias et al., 2003(b)). Malfeito-Ferreira et al. (1997) appliquent cette méthode directement sur les vins pour identifier les micro-organismes de la flore de vinification ainsi que les agents de contamination des vins. Mais cette mise en application nécessite une étape préalable d'enrichissement et de concentration de la biomasse afin de produire suffisamment d'acide gras. Dès lors, l'intérêt quantitatif est perdu. Les levures du genre *Brettanomyces* sont identifiées par cette méthode avec une spécificité assez remarquable. Néanmoins, le matériel analytique nécessaire étant assez conséquent, cette méthode n'est pas du tout adaptée à des utilisations in-situ, dans des caves.

3.3.3 – Suivi des éthyl-phénols.

Depuis 1993, des analyses de vins par Micro-Extraction en Phase Solide (SPME), suivie d'un séparation par Chromatographie Phase Gazeuse et d'une identification par spectroscopie de Masse sont proposées pour le dépistage, ou du moins le suivi du développement de *Brettanomyces*. En émettant l'hypothèse que la concentration en éthyl-phénols est proportionnelle à la population totale

de *Brettanomyces*, Dominguez et al. (2002) relie la quantité mesurée de phénols à la quantification de la population active. Cette hypothèse de quantité de phénols formés corrélée linéairement à la population ne fait cependant pas l'unanimité (Medawar, 2003). Là également, la mise en œuvre pratique nécessaire réserve cette technique aux laboratoires et non aux caves.

De plus du fait même de la problématique : « teneur et effet organoleptique non corrélés », certains suggèrent que l'approche quantitative ne peut venir qu'en appui de l'approche qualitative pour juger d'une perte de la qualité due aux éthylphénols et de son état de contamination par la levure *Brettanomyces*... et non inversement. Emile Peynaud dira même: "on peut doser vinyl-phenol et éthyl-phenol mais ce dosage est inutile en cas de dégustation négative et il ne peut que (parfois) confirmer une dégustation positive." (Bloin et Peynaud, 2005).

3.3.4 – Galeries d'identification.

Les galeries d'identification microbiologiques sont des kits composés d'un certain nombre de substrats de croissance répartis dans des micro-puits d'incubation. Ces substrats sont choisis pour donner des réactions discriminantes entre des espèces d'un groupe spécifique de micro-organismes selon leur aptitude à les assimiler ou pas. Un travail préalable d'isolement est nécessaire à l'obtention de souche pure, une colonie pure étant pour le test inoculée dans les puits de la galerie et le kit est mis en incubation de 24 à 48 heures. Les réponses (croissance ou pas) sont alors comparées à des bases de données, permettant l'identification de l'espèce. De nombreuses galeries de ce type sont commercialisées : API 50CH (49 puits de réactions d'assimilation et de fermentation), BIOLOG 1005 (96 réactions d'assimilation et d'oxydation (Heard et Fleet, 1990)…) … etc.

3.3.5 – Méthodes génétiques.

Le développement de nouvelles technologies et l'avancée des connaissances du génome levurien permet d'envisager le développement des techniques moléculaires appliquées au dépistage et à l'identification des levures du monde œnologique (Loureiro, 2000 ; Clemente-Jimenez et al., 2004). Ces nouvelles approches ouvrent la porte à deux aspects non négligeables :

- une diminution du temps nécessaire au dépistage, ce qui dans un éventuel contexte de dépistage industriel ou de routine est un point important.

- une identification plus fiable car directement basée sur la reconnaissance de l'ADN (ou équivalent), ainsi non soumise aux variations physiologiques de l'organisme pisté (Ness et al., 1993).

En contrepartie l'équipement nécessaire et la fréquente complexité des protocoles sont plus difficiles à gérer directement dans le contexte industriel. Par ailleurs, ces méthodes restent relativement onéreuses. C'est en partie pour cela que ces techniques génétiques ne sont pas ou peu répandues à ce jour dans les caves et proches environnements.

De plus, en traçant directement l'ADN, ces techniques ne permettent généralement pas de faire le distinguo entre des micro-organismes encore vivants ou les résidus génétiques encore présents après leur mort.

3.3.5.1 – Sondes Nucléiques – PNA (Peptide Nucleic Acid).

Une sonde nucléique (Peptide Nucleic Acid) est utilisée par Stender et al. (2001) pour tracer la présence de *Dekkera bruxellensis* isolées de vin. Ce test utilise une sonde PNA marquée par la fluorescéine et capable de s'hybrider à une séquence spécifique de l'ARN ribosomal de l'espèce *D. bruxellensis*. L'interprétation se fait sous microscope par relevé de la fluorescence. Cette technique connue sous le nom de Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) se révèle particulièrement efficace pour montrer la présence de l'espèce mais ne permet pas de distinction au niveau des souches. Cette méthode, très sensible et spécifique pour la détection de *B. bruxellensis* ne revêt cependant qu'un caractère qualitatif.

En employant une PNA-CISH (Peptide Nucleic Acid Chemoluminescent In Situ hybridization) précédée d'une étape de filtration, Connell et al. (2002) parviennent à mettre en évidence al présence de *Brettanomyces* dans des échantillons d'air prélevés au chœur d'un chai.

3.3.5.2 – PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne).

Parmi les techniques prometteuses dans le dépistage génétique de *Brettanomyces*, la PCR occupe depuis ces dernières années une place importante. Parfois couplée à des fragmentations par enzymes de restriction, elle permet en effet de dresser des profils à partir de séquences génétiques spécifiques amplifiées. Bon nombres de protocoles sont proposés, variant sur la nature des séquences ciblées, et donc des amorces employées.

Dès 1994, des études plus approfondies de l'ARN ribosomal sont menées par Yamada et al. (1994) qui en déterminent les séquences pour plusieurs souches de *Brettanomyces/Dekkera*, par PCR et séquençage direct. Cette étude vise alors principalement à déterminer des relations phylogénétiques entre les souches de *Brettanomyces* étudiées.

Ibeas et al. (1996) mettent en place une PCR dite « PCR nichée » en 2 étapes d'amplification successives à partir d'une étude sur une souche de *Brettanomyces* isolée d'un vin de Xéres. Cette méthode permet une amplification d'ADN directement à partir de cellules intactes sans phase préalable d'extraction de l'ADN. Il est alors possible de caractériser le genre *Dekkera/Brettanomyces.* Le fragment d'ADN de 0,6 kb que ces auteurs ont isolé et séquencé en vue de la double amplification présente des similitudes avec le gène *RAD4* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Mitrakul et al. (1999) appliquent une technique de RAPD-PCR (Random Amplification Polymorphism DNA) pour distinguer des levures appartenant au genre *Brettanomyces*. La RADP PCR est une PCR dans laquelle les amorces ne sont pas spécifiquement fabriquées et choisies par rapport à une séquence à amplifier en particulier. Il s'agit d'un jeu d'amorces « arbitraires ». L'avantage de cette

technique en comparaison à une PCR classique réside dans le fait qu'il n'est pas utile de connaître le génome du micro-organisme. Mais les résultats obtenus montrent que cette caractérisation au niveau de l'espèce mais aussi des souches reste malheureusement encore mal maîtrisée car de faibles répétitivité et reproductibilité des résultats sont obtenues si des précautions sévères ne sont pas prise d'un point de vue méthodologie (Palumbi, 1996 ; Gomes et al., 2000). De plus elle nécessite une très grande pureté de l'ADN récupéré avant amplification.

Selon Daniel et al. (1999) les régions ITS 1 et ITS 2 (Internal Transcribed Spacers séparant les séquence 18S et 26S du gène 5.8 rARN) sont des régions présentant le double avantage d'être suffisamment conservées pour être identiques au sein d'une même espèce mais également de montrer suffisamment de différences significatives d'une espèce à l'autre. Elles représentant donc des sites cibles d'amplification intéressants pour identifier les espèces de *Brettanomyces*. Des amorces oligonucléotidiques pour chacune des espèces peuvent alors être conçues pour permettre une détection et identification spécifique et sure. Ainsi, aucune réaction croisée avec des espèces non-*Brettanomyces* présentes dans le vin durant la PCR sont relevées (Egli et Henick-Kling, 2001).

En ciblant la séquence D1-D2 du gène 26S rRNA, Cocolin et al. (2004) parviennent à détecter spécifiquement *B. Bruxellensis* et *B. anomalus*. Une analyse par restriction enzymatique (Dde1) des produits d'amplification est nécessaire pour distinguer les deux espèces.

Delaherche et al. (2003) proposent une méthode de détection et de quantification des populations de *Brettanomyces bruxellensis* du vin par PCR quantitative en temps réel utilisant des amorces développées à partir du gène RAD4. Le seuil de détection alors obtenu en milieu dilué est de l'ordre de 10^4 cellules/mL (ou encore 10^3 UFC/mL), et est de l'ordre de 10^5 cellules/mL pour des échantillons de vin. Ce seuil qui est relativement élevé reste le problème majeur de cette PCR quantitative.

Phister et Mills (2003) quant à eux parviennent à développer une méthode de PCR quantitative en temps réel permettant de détecter 1 cellule de *B. bruxellensis*/mL de vin, avec une réponse linéaire jusqu'à des concentrations de l'ordre de 10^6 cellules/mL. Les amorces utilisées ciblent le gène 26S rRNA. La spécificité de la méthode mise en place permet des applications en milieu ou la population microbienne est abondante et diversifiée sans une diminution de la sensibilité.

3.3.6 – Moyens de lutte.

3.3.6.1 – Sulfitage.

L'emploi d'anhydride sulfureux, classique fongistatique du vin, est actuellement le moyen de lutte le plus largement utilisé pour empêcher le développement de la levure d'altération. Une bonne gestion des sulfitages dès la vendange permet de réduire le risque d'altération des vins (cahiers itinéraires d'ITV France, 2006). Cependant, il s'agit d'une gestion qui se doit d'être raisonnée pour

éviter de perturber le déroulement de la vinification (retard de fermentation, mauvais enclenchement de la Malo-Lactique).

Pour les phases d'élevage, Chatonnet et Dubourdieu (1999) rappellent plusieurs méthodes mises à disposition des maîtres de chais pour réaliser le sulfitage : soit de manière indirecte (traitement des logements, barriques), tel que l'emploi de mèches soufrées, de pastilles de soufre, anhydride gazeux, soit de manière directe (traitement du vin), avec un ajout de solution sulfureuse, de bisulfite, de gaz ou de sels d'hydrogénosulfite (Chatonnet et Dubourdieu, 1999). Une concentration de 30 mg/L de SO_2 libre est alors nécessaire pour être efficace selon Chatonnet et al. (1992b). Néanmoins, du Toit et al. (2005) montre pour une souche de *B. bruxellensis* que l'emploi de 0,8 mg/L de SO_2 moléculaire ne provoque pas la mort/disparition des cellules par rapport au témoin mais entraîne leur passage à l'état Viable Non Cultivable.

3.3.6.2 – Traitements mécaniques/physiques.

Peu d'études spécifiques sont menées sur l'emploi des traitements physiques comme moyens de lutte contre *Brettanomyces*. Il s'agit alors souvent de méthodes pratiquées avec l'expérience de terrain. Ils sont alors employés de manière curative lorsque la contamination est dépistée (contrôle microbiologie ou dégustation négative). Il s'agit alors de se prévenir une aggravation de la situation par rapport à la population détectée, en réduisant les niveaux de populations (à défaut d'élimination complète). Mais les dégâts sur le produit, lorsque celui ci est déjà marqué ne peuvent alors pas être éliminés.

Il est important de rappeler que l'ensemble de ces traitements physiques sont susceptibles de réduire les populations de contaminant au moment du traitement, mais ne protégent en aucun cas contre une contamination secondaire (Les Cahiers Itinéraires de l'ITV France, 2006).

Aucun barème de flash-pasteurization n'est à ce jour proposé spécifiquement pour l'élimination de *Brettanomyces.* Ainsi, utilise-t'on classiquement une température de 72 °C ou 76 °C pendant quelques secondes (communications personnelles diverses). Seuls Couto et al. (2005) proposent les toutes premières études sur la Thermo-résistance de *Brettanomyces sp.,* calculant la grandeurs caractéristiques D (temps de réduction décimale) pour des températures de 32,5 à 55°C dans des matrices synthétiques et vin. On retient pour les deux souches testées des valeurs plus faibles que celle connues pour *Saccharomyces cerevisiae*. Ils attribuent alors une sensibilité importante vis-à-vis de l'éthanol et à la composition phénolique du milieu (plus particulièrement de l'acide ferulique).

Selon Kovacs (1971), une stérilisation d'une minute à 55 °C permet d'éliminer le risque de contamination microbienne dans les bouteilles. Néanmoins aucune étude n'a à ce jour été menée pour confirmer l'efficacité d'une telle procédure dans le cas de la contamination par *Brettanomyces*.

En alternative du méchage au soufre (ou assimilé) des barriques, l'emploi d'eau chaude (>80 °C), voire de la vapeur sous pression (105 °C et plus) est selon Chatonnet et Dubourdieu (1999) plus efficace que l'anhydride sulfureux pour détruire les micro-organismes s'abritant à l'intérieur des douelles. Néanmoins on peut s'interroger sur les conséquences de ces traitements répétés sur la qualité des barriques.

La filtration sur membrane inférieure à 1 µm est nécessaire pour éliminer les levures présentes. Même si aucune étude ne fait clairement état de l'efficacité de ces méthodes contre *Brettanomyces*, elles sont largement utilisées dans la pratique. Plus que toute autre méthode, il est difficile ici de faire une revue des méthodes employées en ce sens où elles sont mises en place dans la pratique avec des considérations de terrains.

3.3.6.3 – Traitements « chimiques ».

a – L'ozone.

Le rinçage à l'eau chargée d'ozone (O_3), gaz à fort pouvoir oxydant, est présenté au début des années 90 comme révolutionnaire. Mais très vite on se rend compte que l'efficacité impressionnante de cette méthode pour les matériaux lisses et imperméables comme les résines époxy et l'acier (Guzel-Seydim Z.B et al., 2004) n'est que très partielle dans le cas des barriques en bois du fait de la porosité du matériau. Cantacuzene et al. (2003) montrent cependant que l'emploi d'ozone gazeux permet d'atteindre les micro-organismes présents à quelques millimètres de profondeur. Néanmoins, la présence de réactions parasites entre l'ozone et les constituants du bois limite la diffusion au cœur du bois, et pourrait par ailleurs favoriser l'apparition de substances volatiles (Chatonnet et Dubourdieu, 1999).

b – Le Diméthylcarbonate (DMDC).

Au début des années 1970 apparaît en œnologie un nouvel antiseptique très efficace contre les levures et les bactéries : le diéthyldicarbonate (DEDC) ou Baycovin®. En 1972, la FDA (Federal Drug Administration) désapprouve l'usage du DEDC pour la stabilisation des vins en raison de la formation de carbamate d'éthyle connu pour être cancérigène pour l'homme. La firme allemande Bayer prépare alors un nouveau produit : le diméthyldicarbonate (DMDC), (Figure 02-6), ou Velcorin®, non susceptible de produire du carbamate d'éthyle mais qui libère par contre le carbamate de méthyle, substance considérée comme non toxique. Le DMDC est un liquide incolore à odeur légèrement piquante qui serait indétectable à la dégustation à des concentrations inférieures à 200 mg/l. (communication de la Délégation Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes). L'emploi du DMDC est désormais autorisé par la Réglementation Européenne, avant embouteillage pour des vins renfermant plus de 5g/L de sucres. Néanmoins, son utilisation nécessite un équipement encore coûteux, limitant son application aux structures de production de grande capacité.

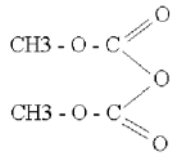


Figure 02 -6. Formule du DMDC.

Le DMDC agit sur les levures en inactivant certaines enzymes par réaction sur l'histidine et provoquant ainsi la mort du micro-organisme. Divol et al. (2005) montrent par ailleurs que ce produit est plus efficace que le SO_2 sur des cultures pures de *Saccharomyces cerevisiae, Candida Stellata et Zygosaccharomyces bailii*. Sur des moûts botrytisés, l'emploi de DMCD à hauteur de 200 mg/L (teneur légale autorisées au Etats-Unis depuis plusieurs années et nouvellement accepté en Europe) donne alors des résultats comparables à ceux obtenus avec l'anhydre sulfureux, avec un passage partiel de la microflore indigène en état de VNC.

Nous ne relevons pas ou peu de publications présentant de résultats spécifiques à la lutte *anti-Brettanomyces*, mais de nombreux travaux sont actuellement en cours pour évaluer l'efficacité de ce traitement vis-à-vis du contaminant. Henick-Kling et al. (2000) affirment cependant que les *Brettanomyces* peuvent être tuées par ce produit, sans préciser les doses nécessaires.

Conclusion de l'analyse bibliographique

Au regard de cette synthèse bibliographique il paraît donc intéressant de mettre en valeur plusieurs points :

§ ***Brettanomyces*** **apparaît de plus comme une levure capable de se développer et de se maintenir dans bons nombres de milieux du fait de ses faibles besoins nutritionnels. Cette levure est par ailleurs capable de métaboliser un nombre important de substrats secondaires. Nous ne pouvons cependant pas ignorer le manque de données et de renseignements lorsqu'on se place dans des conditions pratiques/de terrain en l'œnologique. Ainsi le comportement de *Brettanomyces* vis-à-vis des composants et constituants importants du vin ou des moûts, tels que les sucres résiduels, les sources azotées, les poly-phénols, et même les compléments oenologiques, … demeure encore très peu connu . Quelles sont alors les potentialités des milieux présents tout au**

long du procédé de vinification ? Quelles peuvent alors être les conséquences d'apports lors de vinifications ?

§ **Le dépistage du genre *Brettanomyces*, ou même des espèces (en particulier *B. bruxellensis*) est désormais possible. La multiplication des milieux proposés offre un éventail d'outils de détection. Mais cette multiplicité de méthode ne joue t'elle pas justement en la défaveur d'une approche commune et synthétique, tout un chacun proposant son protocole pour une condition donnée. Quant est il d'une procédure adaptée et adaptable permettant de faire une étude globale sur l'ensemble des environnements vitivinicoles ?**

§ **L'outil génétique de plus en plus développé offre désormais la possibilité d'appréhender la contamination rapidement dans une approche de bilan général : présence, absence, voire niveau de population. Mais on retient qu'il n'existe pas encore de protocole efficace qui soit établi et exploitable sur le terrain pour un dépistage de cette levure à un niveau supérieur. Cette étape est pourtant indispensable si on désire établir la « traçabilité » de cette contamination : identification des souches présentes sur un site, ses modes de propagation, sa rémanence d'une années sur l'autres ou inversement une dynamique spatio- temporelle des souches contaminantes. Les premiers outils proposés, allant dans ce sens ne sont pas encore maîtrisés.**

§ **Dans le contexte industriel, toute cette problématique de détection est d'autant plus intéressante à approfondir qu'il s'avère impératif de cerner le risque potentiel avant toute dérive, « fatale » pour le produits, tels que l'apparition des marqueurs de la contamination (notamment les phénols volatils).**

§ **D'ailleurs, la transformation des acides cinnamiques à l'origine les phénols volatiles, reste peu expliquée. Quels est l'enjeu/le gain de cette conversion d'un point de vue métabolisme ? Les paramètres environnementaux ont-ils une influence sur ce métabolisme ?**

§ **L'effet Custer que tous s'accordent à décrire comme une caractéristique métabolique du genre *Dekkera/Brettanomyces* reste également un point obscur. Le**

comportement vis-à-vis de l'oxygène est tout mal cerné. Les phénomènes sont en effet encore mal définis et les voies métaboliques impliquées encore incertaines.

§ **L'ensemble de ces particularités rend la compréhension des contaminations complexes. Comment cerner les éventuels facteurs déclenchants, ou simplement aggravants ? Quel risque se cache-t'il derrière les pratiques classiques ou originales de vinification ?**

§ **Tout aussi important que les conditions de développement en cours de vinification, la détermination des origines du contaminant est un des points-clé qui méritent de plus amples approfondissements. On s'accorde désormais de plus en plus sur la présence du contaminant en amont des vinifications : sur le raisin. Mais cette présence au sein de la microflore des baies est-elle influencée par des conditions particulières à la vigne ?**

On se rend donc compte que *Brettanomyces* est un sérieux personnage, et qu'il occupe une place importante à ce jour dans les préoccupations scientifiques et pratiques.

Faisant l'objet de bien nombreuses études, il demeure malgré tout entouré d'interrogations auxquelles il est impératif d'apporter des réponses pour se munir, des outils de lutte adaptés à la maîtrise et au contrôle dans les caves. Qu'il ait une dimension familiale ou celle d'une structure telle que la Cave de Buzet (et bien plus encore), tout acteur du secteur vitivinicole se doit de porter regard attentif à cette problématique *Brettanomyces.*

- CHAPITRE 3 -

MATERIELS ET METHODES

1 – Milieux de culture.

Les compositions sont données en g/L, sauf cas précisés.

1.1 – Conservation.

Toutes les souches de levures sont conservées à 5 °C sur milieu gélosé après 7 jours d'incubation à 30°C.

	10
Glucose	
Extrait de levure (Oxoid)	5
Agar	20

Les boites de Pétri ou les tubes (pour gélose inclinée) sont coulés après stérilisation du milieu à 120 °C pendant 20 minutes.

Un repiquage est effectué tous les 3 mois pour les boites et tous les 6 mois pour les tubes.

1.2 – Milieux sélectifs de dépistage et d'isolement de Brettanomyces.

1.2.1 – Milieux d'Enrichissement en Phase Liquide (MEPL).

Ces milieux concentrés sont par la suite ajoutés à un volume d'échantillon liquide dans une proportion de V mL de milieu d'enrichissement pour v mL d'échantillon. Nous donnerons l'indication correspondante sous la forme : « Proportion (V : v) »

1.2.1.1 – Echantillons « non sucrés » mais contenant de l'alcool tels que du vin post fermentation alcoolique, vin en bouteille :

	MEPL1.
Glucose	10
Extrait de levure	5
Chloramphénicol	0,4
Cycloheximide	0,1
Proportion	(1 : 1)

1.2.1.2 – Echantillons « non sucrés » mais ne contenant pas d'alcool ; comme une eau de rinçage ou des échantillons de surface ou échantillons solides (résidus, insectes…) :

	MEPL2.
Glucose	10
Extrait de levure	5
Chloramphénicol	0,4
Cycloheximide	0,1

Ethanol absolu alimentaire	8 % vol/vol
Proportion	(4 : 1)

1.2.1.3 – Echantillons « sucrés » (moût de raisin frais après foulage, moût en début de fermentation ou en cours de fermentation) :

MEPL3.

Cycloheximide	0.3
Chloramphénicol	1,2
Ethanol	48 % vol/vol
Proportion	(1 : 5)

Nous signalons que nous n'avons pas rencontré d'échantillons sucrés contenant de l'éthanol, ne travaillant pas sur vin muté ou liquoreux)

1.2.2 – Milieu Solide BiTest (MSBT).

MSBT.

Glucose	10
Extrait de levure	5
Chloramphénicol	0,1
Cycloheximide	0,1
Acide para-Coumarique (Sigma)	0,05
$CaCO_3$	3,5
Agar	20

1.2.3 – Milieu solide pour numération (MSN).

MSN.

Glucose	10
Extrait de levure	5
Chloramphénicol	0,1
Actidione	0,1
Agar	20

1.3 – Milieux sélectifs de dépistage et d'isolement d'autres micro-organismes.

1.3.1 – Milieu solide pour numération de bactéries.

MB.

Jus de pomme (commerce)	300 mL/L
Jus de tomate (commerce), centrifugé (5000 tpm, 10 minutes)	300 mL/L
Extrait de levure	2
Natamicine	0,1
Agar	15
pH 5	

1.3.2 – Milieux solides pour dépistage et isolement des champignons filamenteux.

Milieu *DRBC – Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol*

Glucose	10
Peptone	5
K_2HPO_4	1
Agar	15
$MgSO_4$, $7H_2O$	0,5
Rose de bengal	0,25
Chloramphénicol	0,1
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline)	0,002

Ce milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

Milieu *CZ – Czapek Agar*

Solution A	50 mL
Solution B	1 mL
Solution C	1 mL
Solution D	50 mL
Eau distillée	900 mL
Saccharose	30
Agar	20

Avec :

Sol. A :

$NaNO_3$	40
KCl	10
$MgSO_4$, $7H_2O$	10
FeSO4, $7H_2O$	2

Sol. B:	$ZnSO_4$,$7H_2O$	1g/100mL
Sol. C:	$CuSO_4$, $5H_2O$	0,5mg/100mL
Sol. D:	K_2HPO_4	20

Les solutions A, B, C, D peuvent être préparées à l'avance et conservées au réfrigérateur à 3 -5 °C plusieurs semaines. Le milieu CZ est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

1.4 – Milieux pour fermentation.

1.4.1 – Pré levain et Levain.

	pré levain.
Glucose	10
Fructose	10
Extrait de levure	1
Acide citrique	0,3
Acide malique	3
Acide tartrique	3
$MgSO_4$	0,4
$(NH_4)_2SO_4$	2
KH_2PO_4	5

pH ajusté à 3,4 avec du NaOH 10M

levain.

Identique au milieu pré levain, mais complété en éthanol : 4% vol/vol

1.4.2 – Milieu synthétique de base, type vin (SMW : Synthetic Wine Medium).

SWM.

Glucose	2
Fructose	8
Extrait de levure	0,5
Acide citrique	0,3
Acide malique	3
Acide tartrique	3
Acide p-coumarique	0,005
Glycérol	6
$MgSO_4$	0,4
$(NH_4)_2SO_4$	0,4
KH_2PO_4	5
Ethanol	10 % vol/vol
pH ajusté à 3,4 avec du NaOH 10M	

L'éthanol est ajouté par filtration sur 0,2 µm après stérilisation du milieu à 120 °C, 20 minutes.

1.4.3 – Milieu synthétique, avec modifications.

Afin de tester différents paramètres, le milieu SWM a été modifié par ajout de différents composés. Nous ne donnerons ici que les modifications sans rappeler la composition de base du milieu (cf 1.4.1).

1.4.3.1 – SWM avec Azote assimilable réduit à 50 mg/L.

SWM-Azote50.

Idem SWM, mais $(NH_4)_2SO_4$ à 0,18 g/L au lieu de 0,4 g/L.

1.4.3.2 – SWM avec Thiamine.

SWM-Thiamine.

Idem SWM, et Thiamine ajoutée à 0,0006 g/L par filtration stérilisante sur 0,2 µm, et diluée dans l'alcool.

1.4.3.3 – SWM avec Poudre de tanins de raisin.

Un mélange (appelé ***TanRaisin***) est réalisé dans une proportion de 1 pour 1 à partir de deux poudres de tanins œnologiques extraits de raisin : Poudre de tanins de pellicules de *Vitis vinifera* et Poudre de tanins de pépins de *Vitis vinifera*, commercialisées par Laffort Œnologie, Bordeaux.

SWM-TanRaisin.

Identique à SWM, mais complété avec 3 g/L de TanRaisin. Les tanins sont ajoutés par filtration stérilisante dans le milieu, après dissolution dans l'alcool.

1.4.3.4 – SWM, sans acide para-coumarique.

SWM-coum0.

Idem SWM, mais Acide para-coumarique à 0 au lieu de 0,005 g/L

1.4.3.5 – SWM, avec acide gluconique.

Idem SWM, mais complété avec des teneurs variables d'acide gluconique (Aldrich):

- 0,5 g/L (SWM-glucon0,5)
- 1 g/L (SWM-glucon1)
- 5 g/L (SWM-glucon5)
- 10 g/L (SWM-glucon10)

1.4.3.6 – SWMcoum0, avec acide gluconique.

Idem SWMcoum0, mais complété avec des teneurs variables d'acide gluconique :

- 0,5 g/L (SWM-coum0glucon0,5)
- 1 g/L (SWM-coum0glucon1)
- 5 g/L (SWM-coum0glucon5)
- 10 g/L (SWM-coum0glucon10)

1.4.4 – Milieux Vin Corrigé.

1.4.4.1 – Milieu de base : Vin Corrigé MVC.

Nous utilisons comme base, du vin rouge, vin Basic de Buzet, commercialisé en Bag in Box de 3L, sous le nom commercial : *Buzet Rouge*.

La fiche technique donne les renseignements suivants :

Sucres résiduels	1,6 g/L
SO_2 total à la mise	96 mg/L
SO_2 libre à la mise	27 mg/L
Ethanol	12,5 %
pH	3,3

Afin de se placer dans des conditions similaires sur certains paramètres au milieu synthétique SWM, des corrections sont apportées à ce vin de base : Milieu Vin Corrigé (***MVC***)

- Dilution avec de l'eau distillée : facteur de dilution 0,8 ; pour passer de 12,5 % à 10 % vol/vol en éthanol.

- Neutralisation totale du SO_2, par ajout en proportion stœchiométrie de H_2O_2 (0,005 mol à partir d'une solution à 50 % mass. de H_2O_2)
- Complément en sucres pour atteindre 10 g/L totaux : 7g/L de fructose + 1,7 g/L de glucose.

A la fin de cette correction, le pH est à 3,4 et ne nécessite pas d'ajustement. Le vin ainsi corrigé est filtré stérilement sur 0,2 µm.

1.4.4.2 – Milieux Vin Corrigé complétés en poudre de tanins

a – MVC avec poudre de tanins de raisin.

MVC-TanRais.

Identique à MVC mais complété avec 2 g/L de TanRaisin (cf 1.3.2.3).

b – MVC avec poudres de tanins de raisin et de bois.

Un mélange *(appelé **TanBois**)* est réalisé à partir de 4 poudres de tanins œnologiques de bois dans des proportions identiques: Poudre de tanins de bois de chêne, Poudre de tanins de bois de châtaignier, Poudre de tanins de bois exotique (quebracho), Poudre de tanins de noix de Galles, toutes commercialisées par Laffort Œnologie, Bordeaux.

***MVC-TanMél** (pour « TANins MELangés : raisins + bois)*

Identique à MVC mais complété avec 1 g/L de ***TanRaisin*** (cf 1..2.3) et 1 g/L de ***TanBois***).

1.4.4.3 – Milieu Vin Corrigé et Traité au PVP.

MVC-phénol(-).

4 g/L de Poly-Vinyl-Propilone sont ajoutés au milieu vin corrigé. Après agitation pendant 10 minutes (100 rpm) à l'abri de l'air, le milieu est centrifugé à 5 °C pendant 10 minutes à 11600 tpm. Le surnageant, constitué de vin dé-polyphénolé partiellement, est filtré stérilement à 0,2 µm.

2 – Cultures en Erlenmeyer.

Toutes les cultures sont menées en flacons erlenmeyer fermés par des bouchons en coton cardé.

2.1 – Pré-cultures.

Un pré-levain est préparé dans 75 mL de milieu « *PréLevain* » contenu dans un erlenmeyer de 100 mL et inoculé à partir d'une colonie de la boite de conservation. La culture se déroule à 30 °C avec une agitation de 150 rpm.

Au bout de 72 heures, un levain de 150 mL de milieu « Levain » dans un erlenmeyer de 250 est inoculé à partir du pré-levain à hauteur de 5.10^6 cell/mL. La culture se déroule à 20 °C et 150 rpm.

2.2 – Culture principale.

Lorsque le levain est en pleine phase exponentielle de croissance (ou en phase quasi exponentielle), 300 mL de milieu de fermentation (la nature du milieu dépend de l'expérience considérée) dans un erlenmeyer de 500 mL, sont inoculés à partir du levain (le taux d'inoculum dépend de l'expérience considérée). La culture se déroule à 20 °C avec une agitation de 150 rpm.

3 – Etapes du dépistage *Brettanomyces* dans l'environnement viti-vinicole.

3.1 – Echantillonnage.

La procédure de prélèvement est fonction de la nature de l'échantillon.

3.1.1 – Echantillons de raisin.

Une grappe ou une aile de grappe est prélevée stérilement à l'aide d'un outil de coupe (sécateur, paire de ciseaux) préalablement nettoyé à l'alcool dénaturé. Le raisin est directement mis dans des poches stériles de prélèvement, sans aucun contact direct avec le manipulateur (Figure 03-1). Chaque échantillon de raisin pèse entre 100 et 300 grammes. Il est référencé par le nom de la parcelle, le numéro de rang, le numéro de pied dont il est issu (parcelles quadrillées virtuellement pour les besoins des expérimentations) et la date de prélèvement.

Figure 03-1a. Prélèvement de raisin

Figure 03-1b. Grappe dans une poche stérile

Figure 03-1. Echantillonage de Raisin.

3.1.2 – Moût et Vin encuvés.

Si la cuve dispose d'un robinet de dégustation ou assimilé, l'échantillonnage se fait au niveau de cette ouverture. Le robinet est alors nettoyé (extérieur et intérieur) à l'alcool avant d'être stérilisé à la flamme. Il est alors rincé par une première coulée de vin (ou moût) avant que l'échantillon ne soit prélevé et directement recueilli dans un flacon de prélèvement stérile de 25 à 100 mL.

Si la cuve ne dispose pas de robinet de dégustation ou assimilé (exemple de cuve d'écoulage en béton), le prélèvement se fait par l'ouverture principale de la cuve : la cheminée. Une canne plongeante munie d'une bouteille de prélèvement est alors utilisée. L'ensemble du montage de prélèvement est nettoyé à l'eau claire et chaude. La bouteille de prélèvement est alors rincée à l'alcool puis par un premier volume de vin à échantillonner. Le prélèvement est effectué lors d'une deuxième remontée de vin par la canne et recueilli dans un flacon stérile de 25-100 mL.

3.1.3 – Vins embouteillés.

L'échantillon est prélevé à l'aide d'une pipette stérile après homogénéisation du milieu.

3.1.4 – Résidus, dépôts et échantillons solides.

Les échantillons tels que résidus de raisin secs, de tartres, etc … sont prélevés à l'aide d'une pince à usage microbiologique, stérilisée tous les jours à 100°C pendant 30 minutes et nettoyée à l'alcool avant chaque usage. Des cotons tiges ouatés, stérilisables (tige en bois) sont également employés pour recueillir les échantillons solides conservés dans des flacons stériles.

Dans le cas des insectes (comme les Drosophiles), le prélèvement se fait directement «à la volée» en capturant l'insecte dans un flacon stérile de prélèvement, rapidement ouvert et refermé en piégeant l'insecte à l'intérieur.

3.1.5 – Echantillons de surfaces.

Des cotons tiges ouatés (en bois) sont stérilisés à 120 °C pendant 30 minutes et conservés stérilement avant d'être employés pour échantillonner des surfaces (parois de cuve, intérieur de tuyauterie, corps de pompes, etc..). Humidifiés avec de l'eau stérile, ils permettent d'écouvillonner sur des surfaces de plusieurs cm^2. Nous ne formalisons pas de surface type, car elle dépend véritablement du contexte de travail : pouvant aller d'une zone de 15 x 15 cm sur une surface parfaitement plane à l'équivalent de 2 x 2 cm sur des surfaces plus complexes. La partie ouatée ayant servi au prélèvement est détachée de la partie en bois à l'aide de ciseaux stérilisés à la vapeur et nettoyés à l'alcool entre chaque échantillon. Elle est alors recueillie dans un flacon stérile de prélèvement.

3.1.6 – Echantillons liquides divers, eaux de rinçage, eaux résiduaires.

Le prélèvement est effectué à l'aide d'une pipette stérile à usage unique. Si possible un volume de 2 mL minimum est recueilli et stocké dans un flacon stérile de prélèvement.

3.2 – Traitement des échantillons et mise en enrichissement.

Si les échantillons ne sont pas traités dans les 12 heures qui suivent le prélèvement, ils sont conservés au froid à 3 °C pendant une durée maximale de 72 heures.

Des échantillons de moût et de vins post fermentation alcoolique datant de plusieurs années ont également été traités. Ils n'ont pas connu de démarche de conservation particulière.

3.2.1 – Echantillons de raisin.

Les baies sont manuellement écrasées pour en extraire le moût frais en conservant les sacs fermés pour garantir la stérilité de l'échantillon. Après 24 heures de macération à température ambiante, les rafles sont enlevées en conservant la stérilité (travail sous hotte à flux laminaire ou utilisation d'un cône de stérilité à la flamme).

Chaque échantillon est alors pesé. Une corrélation est établie entre la masse de raisin foulé et le volume de jus obtenu et présent dans le sac (Figure 03-2). Pour chaque série de prélèvements (correspondant à une parcelle à une date donnée), une corrélation est établie à partir d'échantillons suicides.

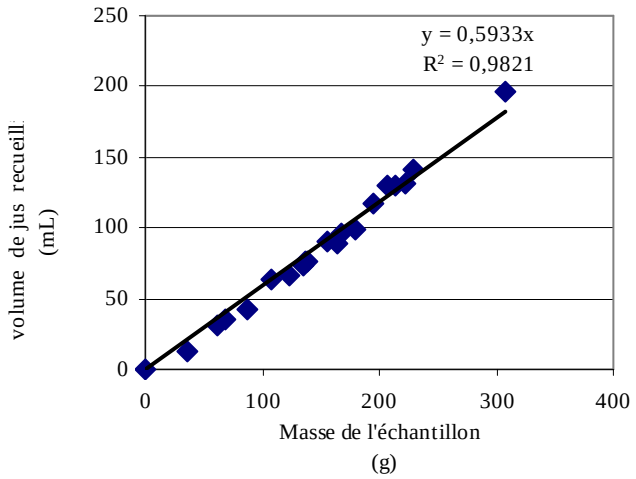


Figure 03-2. Corrélation Volume de moût obtenu = f(Masse de raisin écrasé). Parcelle X le 12/09/05

Sur l'ensemble des séries prélevées, le rapport Volume/Masse varie de 0,51 à 0,62 mL/g. Nous notons que ce rapport semble un peu faible par rapport à ce qui est obtenu classiquement dans les

étapes de foulage et de première presse en pratique dans « l'industrie » (rapport de 0,6 – 0,8), mais nous rappelons ici que nous procédons manuellement et ainsi le degré d'extraction des jus est moindre.

Pour chaque échantillon, le moût est alors complété à l'aide du milieu *MEPL3* (Cf 1.2.1.3) dans un rapport de 1 pour 5, directement ajouté dans la poche. (Soit par exemple : 20 mL de milieu sélectif ajoutés à 100 mL de moût). Compte tenu du taux de dilution, on se retrouve avec un milieu d'enrichissement contenant initialement :

Chloramphénicol	0,2 g/L
Actidione	0,05 g/L
Ethanol :	8 % vol/vol

Après homogénéisation, l'échantillon est laissé à température ambiance (variant de 20 à 30 °C), il est agité hebdomadairement.

3.2.2 – Moût et Vin encuvés et vins finis.

On mélange l'échantillon au milieu *MEPL1* (Cf 1.2.1.1) dans un rapport de 1 pour 1. Après agitation, l'échantillon ainsi complété est placé en enrichissement à 30 °C.

3.2.3 – Echantillons solides et de surface.

L'échantillon (ou le coton de prélèvement) est immergé dans 5 mL de *MEPL2* (Cf 1.2.1.2). Après agitation pour s'assurer d'une bonne mise en suspension, l'échantillon est placé en culture à 30 °C.

3.2.4 – Echantillons liquides divers (eaux résiduaires, de rinçage, …)

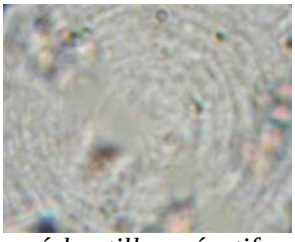
1 à 2 mL d'échantillon sont mélangés à 4 mL de *MEPL2* puis placés à 30 °C.

3.3 – Contrôle du développement microbien après la phase d'enrichissement.

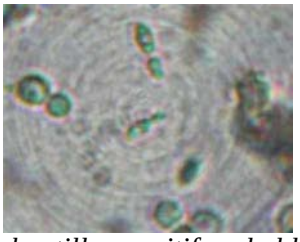
L'observation au microscope, Olympus BH-2 au grossissement 400, d'une goutte d'échantillon posée sur lame simple plus lamelle, permet d'apprécier la présence ou l'absence d'un développement microbien après la phase d'enrichissement. Comme il sera précisé plus tard, la durée de cette phase est variable.

Un tri est alors effectué en 3 catégories (Figure 03-3):

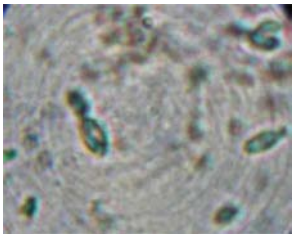
- § les échantillons négatifs (aucun micro-organisme visible)
- § les échantillons positifs probables (présence d'une microflore, avec soupçon de morphologie type *Brettanomyces*)
- § les échantillons positifs (morphologies « classiques »).



échantillon négatif



échantillon positif probable



échantillon positif

Figure 03-3. Observations au microscope d'échantillons après enrichissement. (X400)

3.4 – Test sur milieu solide.

Ce test est réalisé soit en :

- § une seule étape lors d'une procédure de dépistage simple où l'on cherche à statuer sur la présence ou l'absence de *Brettanomyces* dans l'échantillon.
- § en deux étapes lors d'une procédure de dépistage que l'on seconde d'un isolement de souches de *Brettanomyces*.

Les échantillons positifs à l'observation sont mis en culture sur gel *MSBT* (Cf 1.2.2). Des dilutions sont éventuellement faites pour avoir moins de 300 colonies par boite après étalement de 0,5 ou 0,1 mL de milieu. L'incubation se fait à 30 °C pendant 5 jours.

Le milieu contenant du Carbonate de Calcium, on teste donc le caractère acidifiant des colonies qui se développent. L'acidification est alors mise en évidence par l'apparition d'un halo translucide autour des colonies produisant de l'acide.

Cette « décoloration » du gel est due à la réaction :

$CaCO_3 + H^+ \rightarrow Ca^{2+} + CO_2 + H_2O$

Le $CaCO_3$ insoluble forme une suspension trouble alors que le Ca^{2+} est parfaitement soluble, donnant un gel clair.

De plus, la présence dans la gélose *MSBT*, d'acide para-coumarique permet de juger s'il y a production d'éthyl-phénols par les micro-organismes présents. La présence de ces éthyl-phénols se fait par appréciation de l'odeur phénolée à caractère désagréable (« sniffing »).

Dans l'approche d'une simple détection (présence/absence), on juge de l'odeur pour l'ensemble des colonies présentes sur la boite. A ce moment, nulle possibilité d'identifier quelle(s) colonie(s) est/sont productrices du composé malodorant, mais on sait qu'il y en a.

En revanche dans le cas d'une procédure d'isolement, on prélève les colonies acidifiantes à l'aide d'une anse à fil de platine et l'on repique une seule colonie par nouvelle boite de MSBT. A ce moment, on affine la recherche et l'on peut juger après incubation du caractère phénolé, de manière « isolée » et l'associer à telle ou telle autre colonie.

Les colonies présentant alors la combinaison : acidité et production d'éthyl-phénol, sont au besoin conservées dans la collection, et sont alors repiquées sur milieu simple de conservation (Cf 1.1).

3.5 – Identifications génétiques.

Remarque préliminaire :

L'ensemble des tests génétiques est réalisé à l'Institut Départemental d'Analyse et de Conseil (Nantes, France), par l'équipe du Docteur J.L. Cheval, de la Division Biologie Vétérinaire. Les protocoles, modifiés et optimisés par leur soin ne sont donc pas entièrement décrits dans ce présent document.

3.5.1 – Identification de l'espèce.

Une première PCR spécifique *Brettanomyces* est utilisée pour confirmer l'appartenance ou non des souches isolées à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*. Les amorces utilisées pour cibler le gène 26S rRNA et amplifier un segment de 79 bp (paires-bases) sont :

DBRUXF: 5'-GGATGGGTGCACCTGGTTTACAC-3'

DBRUXR: 5'-GAAGGGCCACATTCACGAACCCCG -3'.

Les procédures d'extraction de l'ADN à partir de clone pur, de réalisation de la PCR (volumes, protocole thermique) et de la migration sur gel sont identiques à celles décrites par Phister et Mills (2003).

On fait suivre ce test par une PCR-ITS (Internal Transcribed Space), utilisant les amorces : ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' et ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3', et réalisé suivant les protocoles décrits par Guillámon et al. (1998).

3.5.2 – Typage intra-spécifique des *Brettanomyces bruxellensis* par Restriction Enzymatique et Electrophorèse en Champ Pulsé.

Après confirmation de l'espèce, l'identification au niveau des souches (typage intraspécifique) s'effectue par E.C.P. couplée à une R.E :

- Lyse des levures incluses dans de la gélose (plugs) et purification de l'ADN à l'aide de zymolase et de pronase.
- Lavage des plugs : Tris-EDTA.
- Restriction enzymatique : enzyme Sfi I

- Gel de migration : agarose 1,5 %
- Tampon de migration : TBE 1X
- Température de migration : 14 °C
- Programme de migration : Angle de 120°- Voltage : 6 Volts/cm^2 - 18 heures de migration avec des pulses avariant de 10 à 15 secondes, coloration au Bromure d'éthidium.

4 – Dépistage d'autres micro-organismes : champignons filamenteux (*Aspergillus sp*. et *Penicillium sp.)* et bactéries acétiques.

Un échantillon de raisin (environ 100 g) est prélevé suivant la procédure déjà décrite en 3.1.1. Il est écrasé et bien malaxé pour obtenir un moût homogène le plus représentatif possible de l'échantillon. Après 6 heures de macération et une nouvelle agitation d'homogénéisation, 100 µL de ce moût sont alors étalés sur milieux MB (pour recherche de bactéries) et/ou sur milieu *DRBC* (Cf 1.2.5) (pour recherche de champignons). Les boites de Pétri sont mises en incubation à 25 °C pendant 2 jours pour le dépistage de bactéries et 5 à 7 jours pour les champignons.

Pour une procédure plus poussée d'isolement des champignons, on repique les champignons filamenteux que l'on pense appartenir aux genres recherchés (*Aspergillii* et *Penicillia*) sur milieu *CZ* à l'aide d'une pique en bois préalablement stérilisé à 120°C pendant 30 minutes.

Après un minimum de 7 jours d'incubation dans l'obscurité à 25°C, on procède à l'identification des champignons, par genre (et au mieux des cas par espèces) en se basant sur des critères morphologiques (formes et couleurs des colonies, aspect des filaments, et si il y a fructification observation au microscope des conidiospores, spores, …). Plusieurs étalements sur CZ sont indispensables pour isoler des clones purs.

5 – Matériel biologique : Souches employées dans les études.

Une souche de référence de *Brettanomyces bruxellensis* est utilisée au cours de différentes expérimentations. Elle est nommée : *Souche A* dans les travaux présentés. Cette souche a été isolée lors d'une contamination de fermentation alcoolique dans une distillerie industrielle et a été identifiée par L'Institut d'Hygiéne et d'Epydémologie- Mycologie de Bruxelles, désormais répertoriée à l'IHEM sous le numéro 6037 (Phowchinda, 1994 ; Aguilar-Uscanga et al., 2000)

Les autres souches de *Brettanomyces bruxellensis*, désignées par *Souche B à Z* ont été isolées au cours de nos travaux et ont été identifiées par l'Institut Départemental d'Analyse et de Conseil de Nantes. Elles font désormais partie de la collection privée du Laboratoire de Génie Chimique de

Toulouse. La société Oenodev a également fourni des souches de *Brettanomyces* isolées sur des vins de Madiran. Nous ne les répertorions pas précisément dans ses travaux, malgré leurs emplois dans certaines expériences. (Par souci de simplicité, nous les nommerons génériquement : *Souches Oenodev*)

Une souche de *Saccharomyces cerevisae* est également utilisée pour certains tests : souche 522 Davis, commercialisée par Laffort Œnologie, sous l'appellation ACTIFLORE Cerevisiae™. Cette souche est employée comme souche de fermentation à la Cave de Buzet. Dans nos travaux elle est appelée *Souche Sacc*.

Une souche supposée de *Rhodotorula sp.* ainsi qu'une apiculée (non précisée) ont été isolées à partir d'un échantillon de raisin étalé sur milieu minimum de conservation. Les faciès des colonies (pigmentées en rouge orangé pour *la Rhodotorula* et crémeuse beige pour l'apiculée) ainsi que la morphologie des cellules lors d'observation microscopique (petites cellules ovales pour la *Rhodotorula* et en forme de citron pour l'apiculée) ont été considérés comme suffisant pour statuer de l'appartenance de ces souches respectivement au genre *Rhodotorula* et au groupe des apiculées du raisin (probablement du genre *Kloeckera*). Nous les nommons respectivement s*ouche Rhod* et *souche Apic*

6 – Techniques et Méthodes analytiques.

6.1 – Evaluation de la biomasse.

6.1.1 – Méthode gravimétrique : détermination du Poids Sec.

La biomasse totale formée peut être évaluée par la méthode de dessiccation par infrarouge permettant de calculer le poids sec d'un échantillon. 25 mL d'échantillon sont centrifugés à 5°C, 12 000 tpm. Le culot est lavé une fois à l'eau distillée pour éliminer toutes traces de particules appartenant au milieu résiduel de culture. Une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions permet de récupérer la biomasse qui est alors séchée et pesée par un analyseur d'humidité (thermo-balance) PRECISA HA60. On obtient ainsi la concentration en g/L.

6.1.2 – Densité Optique.

La turbidité du milieu de culture évolue au fur et à mesure de l'apparition et de la disparition des cellules. Ainsi la densité optique du milieu permet indirectement de quantifier la biomasse présente.

La DO (Densité Optique) est mesurée à 620 nm par un spectrophotomètre double faisceau "SECOMAM Anthelie Advanced " dans des cuves de 10 mm de trajet optique. On effectue les dilutions adéquates afin de se trouver dans une gamme de DO mesurée comprise entre 0,1 et 0,8.

Une corrélation est alors établie entre concentration (cellulaire ou massique) et DO_{620}. (Nous discuterons ce point dans le *Chapitre 04, Module C*).

6.1.3 – Numération cellulaire.

6.1.3.1 – Population totale.

La biomasse peut également être quantifiée par comptage au microscope du nombre de micro-organismes contenus dans un volume donné. Cette numération s'effectue à l'aide d'une cellule de THOMA sous microscope Olympus BH-2, objectif 40.

Cette cellule est constituée de 16 grands carreaux d'un volume de 4.10^{-6} mL, chacun d'eux est divisé en 16 petits carreaux. La figure 03-4 donne le schéma de la cellule de THOMA.

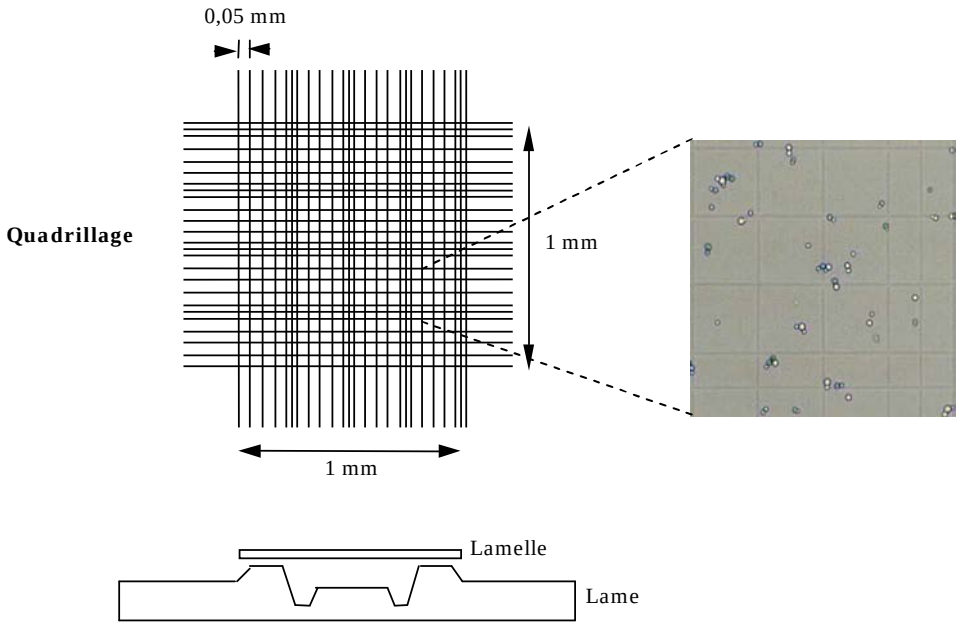


Figure 03-4. Schéma d'une cellule de THOMA.

Les micro-organismes se répartissent aléatoirement sur le quadrillage. Chaque comptage est réalisé à partir de 5 grands carreaux de la cellule. Dans le cas des milieux peu concentrés (en début de culture par exemple), il est conseillé de faire le comptage sur l'ensemble des 16 grands carreaux. Le prélèvement doit être dilué de façon à obtenir entre 100 et 250 cellules sur le comptage considéré.

La concentration cellulaire [biomasse] en nombres de cellules / mL est donnée par la relation :

$$[concentration] = \frac{nombre\ de\ cellules\ comptées\ .\ dilution\ .250\ 000}{nombre\ de\ grands\ carreaux}$$

6.1.3.2 – Population viable.

Le pourcentage de cellules dites viables est estimé par comptage au microscope après coloration au bleu de méthylène selon PIRTH : 0,1 g de bleu de méthylène par litre de citrate de sodium à 2 %

(Lange et al., 1993). On mélange un volume d'échantillon à un volume égal de bleu et on homogénéise. Après quelques minutes de contact, les cellules non viables se colorent en bleu alors que les cellules viables restent incolores.

Chilver et al. (1978) appuyé par Postgate (1967) puis Bonora et Mares en (1982) proposent deux hypothèses différentes pour expliquer le mécanisme de coloration et le distingo qui en résulte entre cellule viable/fonctionnelle et non viable:

- un passage à travers la membrane plasmide de la cellule lorsque celle-ci devient déficiente.
- une hydrolyse/réduction du bleu dans le cytoplasme tant que les cellules sont fonctionnelles et possèdent leurs activités enzymatiques.

On définit alors le taux de viabilité comme le rapport du nombre de cellules viables (ie incolores) sur le nombre total de cellules dénombrées.

Cette méthode permet ainsi de suivre l'état physiologique des levures au cours des cultures (point que nous discuterons dans le cas de *Brettanomyces* lors *Chapitre 04-ModuleC*).

6.1.4 – Numération sur boites.

Des étalements réalisés sur gélose MSN (Cf 1.2.3) permettent de quantifier le nombre de micro-organismes susceptibles de croître et de se multiplier en formant des colonies. Un échantillon de suspension cellulaire est dilué (dilution décimale) puis un volume précis (de 0,1 à 0,5 mL) de ces dilutions est étalé à l'aide d'un râteau stérile, sur le milieu solide coulé dans des boites de Pétri. Les boites sont ensuite incubées à une température de 30 °C pendant 5 jours. Chaque niveau de dilution est étalé sur 3 boites. Lors du relevé des boites, on considère la moyenne de ces trois comptages. Pour minimiser les erreurs lors de la numération, on admet que le nombre de colonies présentes par boite doit se situer entre 30 et 300. En dehors de cette zone, le comptage devient peu précis (Lange et al. 1993). La biomasse est alors quantifiée non plus en nombre de Cellules mais en nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) par mL.

6.1.5 – Observation et Photographies.

Une goutte de suspension diluée de micro-organismes est observée sous microscope Olympus BH-2, au grossissement 400. Les photographies sont réalisées à l'aide d'un appareil photographique numérique, Panasonic DMC- Lumix FZ5, avec un zoom 2. Les éventuelles travaux d'amélioration des images (contraste, luminosité, netteté, etc...) s'effectuent à l'aide du logiciel Adobe® Photoshop® 7.0.

6.2 – Dosages.

6.2.1 – Sucres.

Les seuls sucres considérés dans notre étude et dosés au cours du suivi sont le glucose et le fructose.

6.2.1.1 – Sucres réducteurs totaux : DNS

Les sucres réducteurs (en raison de leurs groupements carbonyl libres C=O) réagissent avec le DNS (acide di-nitrosalycilique) en le réduisant en acide 3-amino-5-nitrosalicylique selon la réaction décrite sur la Figure 03-5.

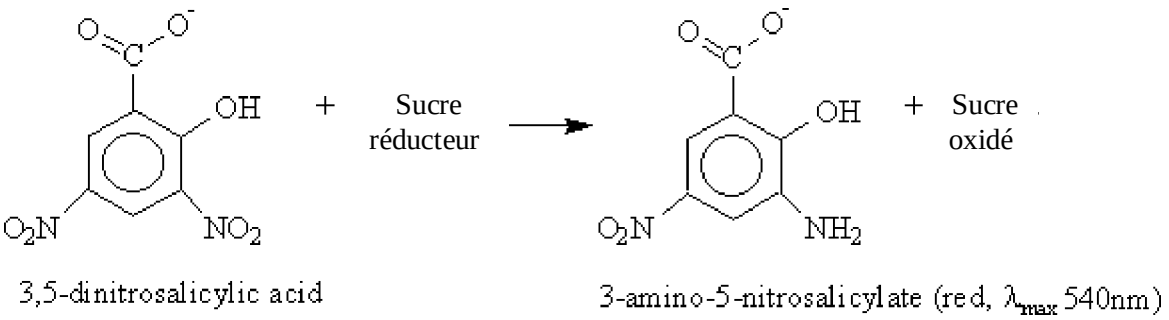


Figure 03-5. Réaction du DNS avec un sucre réducteur.

Le DNS ou réactif dinitrosalicylique est préparé de la façon suivante :

- 2,5 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique
- 75 g de sodium potassium tartrate
- 4 g d'hydroxyde de sodium

Ces différents constituants sont dissous suivant l'ordre indiqué dans 250 mL d'eau distillée. Le réactif est conservé à l'obscurité à 4 °C et a une durée de vie de 15 jours.

Une solution mère de sucre de 2 g/L à 50% glucose et 50% fructose est utilisée pour la préparation de la gamme étalon (dilution au ¾, ½, et ¼ pour obtenir respectivement des concentrations de 1,5 ; 1 et 0,5 g/L).

Après avoir dilué l'échantillon pour être dans un intervalle de mesure cohérent avec la gamme étalon, on mélange dans des tubes à essai 1 mL de chaque échantillon et 1 mL de DNS. On homogénéise avant d'incuber les tubes surmontés d'une bille de verre pour éviter l'évaporation au bain-marie 5 minutes à 100°C. Les tubes sont par la suite refroidis dans un bain de glace et additionnés de 10 mL d'eau distillée.

La Densité Optique des mélanges réactionnels trempés est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm (cuve de 10 mm de trajet optique). Les différentes concentrations des échantillons sont déterminées à partir de la gamme étalon.

L'erreur maximale obtenue sur le dosage des sucres est de l'ordre de 6 %.

6.2.1.2 – Glucose : analyseur biochimique.

L'utilisation de l'analyseur biochimique à enzymes fixées YSI 2700 Select permet de déterminer la concentration en glucose d'un mélange. Le principe de l'appareil est l'oxydation par voie enzymatique (glucose-oxydase) du glucose. Il se forme alors du glucono-lactone et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est ensuite dosé par ampérométrie, le courant électrique généré étant proportionnel à la quantité de glucose oxydé.

Il convient de diluer les échantillons afin de se trouver dans la gamme de mesure de l'appareil située entre 0 et 25 $g.L^{-1}$.

Par ailleurs, le mélange à doser devant être totalement dépourvu de particules solides, on réalise au préalable une centrifugation de l'échantillon.

La présence de tanins interfère lors du dosage. Dans le cas d'échantillon type vin ou milieu tanisé, il convient alors d'éliminer ces composés avant d'effectuer la mesure avec le YSI. Pour ce faire, on additionne l'échantillon avec une solution de PVP à 40 g/L dans un rapport de 9 pour 1 (soit une concentration finale en PVP de 4 g/L). Après agitation de quelques minutes, on centrifuge à 5 °C à 12 000 tpm. Le surnageant est alors dosé. On tient compte de la dilution engendrée par le traitement.

6.2.2 – Azote assimilable.

6.2.2.1 – Titrage au formol.

Les cations (NH_4^+), et les groupes azotés des acides alpha-aminés (NH_3^+) présents dans l'échantillon constituent la principale source d'azote utilisée par les levures. Ils vont se combiner après neutralisation à pH 8,0 (formation de groupes carboxyliques libres) avec le formaldéhyde. Les protons libres ainsi formés vont être neutralisés par le NaOH additionnée.

Pour commencer, il faut ajuster la valeur du pH de l'échantillon (100 mL) à 8 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 1 N. 25 mL de formaldéhyde à pH 8 sont ajoutés, l'ensemble étant bien mélangé. La solution résultante est titrée jusqu'à pH 8 à l'aide d'une solution de soude à 0,1 N (volume V, versé, exprimé en mL).

Notons que le formaldéhyde utilisé est à 37 % mass. et qu'il est neutralisé à pH 8 à l'aide d'une solution de soude à 1N.

La concentration de l'azote assimilable est calculée comme suit :

[azote assimilable] (mg/L) = V x 28

Cette méthode, qui consomme beaucoup de volume d'échantillon est réservée à des dosages sur des volumes non limités (non adaptée aux échantillonnages lors de suivi de fermentation).

6.2.2.2 – Dosages à l'aide de l'analyseur multi-paramétrique sélectif.

L'utilisation du MASCOTT Lisabio (Analyseur multi-paramètrique sélectif) permet lz détermination de la concentration en azote assimilable par mesures automatisées, basées sur des réactions enzymatiques ou chimiques quantifiables par spectrophotométrie. Dans le cas de l'azote assimilable, deux dosages sont considérés permettant de doser respectivement l'azote ammoniacal et azote alpha-aminé libre, principales formes d'azote assimilable par les levures dans les conditions œnologiques.

Pour ces deux dosages, l'appareil fonctionne en mode mono-réactif. Il réalise le prélèvement de l'échantillon. Une réaction est alors déclenchée dans une micro-cuve par adjonction d'un réactif. La mesure des densités optiques avant et après la réaction permet de déterminer la concentration recherchée à partir d'un étalonnage réalisé au préalable.

a – Azote Ammoniacal.

En présence de la déshydrogénase de glutamate (GIDH) et du dinucléotide nicotinamide-adénine réduit (NADH), l'ammoniac réagit avec le 2-oxoglutarate pour donner le L-glutamate. Le NADH s'oxyde alors en NAD+.

$$\text{2-Oxoglutarate} + \text{NADH} + NH_4^+ \xrightarrow[\text{GIDH}]{} \text{L-glutamate} + NAD^+ + H_2O$$

La quantité de NADH oxydée dans la réaction ci-dessus est stoechiométrique à la quantité d'ammoniac. Le NADH est déterminé au moyen de son absorbance à 334, à 340 ou à 365 nm.

Le dosage de l'azote ammoniacal se fait avec un Kit enzymatique MicroDom comprenant :

- 2 x 40mL de chromogène diluent
- 2 x 20mL de chromogène
- 2 x 50mL de solution blanc
- 2 x 10mL de solution standard de 50mg/L de N-ammoniacal

Une programmation de l'analyseur prenant en considération l'ensemble des paramètres de la réaction enzymatique mise en jeu et les mesures spectro-photométriques considérées est mise en place.

Le mono réactif employé est alors réalisé en mélangeant : 5 mL de solution chromogène et 20 mL de solution chromogène diluent (25 mL de ce réactif permettent le dosage de 20 échantillons).

Une droite étalon est réalisée à partir de 5 dilutions de la solution standard. Les échantillons sont alors dilués au besoin pour être cohérent avec cet étalonnage.

Pour une mesure test, le dosage de 5 répétitions d'un échantillon de jus de raisin donne : Azote ammoniacal : 103,3 mg/L, avec une erreur expérimentale de 5,2% et un écart type de 5,3 mg/L.

b – Azote alpha-aminé.

Les groupements azotés acides amines libres (NH_3^+) présents dans l'échantillon réagissent avec le N-acétyl-L-cystéine et l'ortho-phtaldialdéhyde pour former des dérivés iso-indole.

Azote alpha-aminé + N-acetyl-L-cysteine + o-phthaldialdehyde → dérivés isoindole

La quantité de ces dérivés formés au cours de la réaction, déterminée par une mesure d'adsorbance à 340 nm, est proportionnelle à la teneur initiale en groupement aminé.

L'azote alpha-aminé est dosé à l'aide d'un kit Megaryme Primary Amino Nitrogen (K-PANOPA) comprennant :

- 1 x 100 comprimés de borax et de N-acetyl-L-cysteine (NAC).
- 160 mg de o-phthaldialdehyde (OPA; 160 mg) dans 12 mL d'éthanol (96 % v/v).
- 1 x 5 mL de Solution standard d'isoleucine, correspondant à 140 mg/L d'azote aminé.

Une programmation de l'analyseur prenant en considération l'ensemble des paramètres de la réaction mise en jeu et les mesures spectro-photométriques considérées est effectuée.

Le mono réactif employé est alors réalisé en mélangeant : 1 comprimé de borax/NAC, 3 mL d'eau distillée, 0,2 mL de solution d'OPA. (Le volume obtenu permet de doser 10 échantillons).

Une droite étalon est réalisée à partir de 5 dilutions de la solution standard d'isoleucine.

6.2.3 – Ethanol, acide acétique et glycérol.

Le dosage de ces différents composés est effectué par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). L'appareil utilisé – TSP Spectra System – est équipé d'une colonne Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column de dimension 300 x 7,8 mm spécifique pour la séparation des acides organiques et des alcools. Le liquide vecteur est une solution d'acide sulfurique de concentration 5 mM circulant à 0,40 $mL.min^{-1}$. On travaille à 40 °C avec une boucle d'injection de 20 µL.

La détection des constituants se fait à l'aide d'un réfractomètre différentiel TSP RefractoMonitor I. L'intégration des pics et le traitement des données sont effectués grâce à un logiciel spécialisé (PCI 1000, Refracto).

Une corrélation entre la surface des pics obtenus et la concentration des différents constituants est mise en place pour chaque composé à partir de gammes étalon.

Pour ces constituants, les erreurs relatives sont estimées à moins de 5 % par rapport à des solutions standard.

6.2.4 – 4-éthyl-phénol.

6.2.4.1 – Principe général du dosage par MEPS/CPG.

Le dosage de composés volatils souvent à l'état de traces dans le vin peut s'effectuer par une méthode d'extraction préalable à une analyse chromatographique. La Micro-Extraction sur Phase Solide est une miniaturisation d'un tel procédé d'extraction sur phase solide. Cette nouvelle technique d'extraction gaz-solide ou liquide-solide, commercialisée depuis 1993, est le plus souvent couplée à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) en vue de l'analyse des composés extraits. Cette méthode, qui n'utilise pas de solvant organique et ne nécessite qu'un très faible volume d'échantillon se décompose en deux étapes :

- La première étape, d'extraction, (appelée phase d'Adsorption) se base sur un équilibre de partage entre une phase solide et une phase gazeuse (ou liquide). Cette phase solide est un film polymère (d'une longueur de 1 cm, d'une épaisseur de 7 à 100 µm) enrobant une fibre en verre de silice (d'un diamètre de 100 µm), l'ensemble étant protégé dans une aiguille creuse amovible. L'aiguille amovible a pour rôle de percer le septum du flacon contenant l'échantillon à analyser ; la fibre est alors déployée hors de l'aiguille et plongée, soit directement dans l'échantillon, à l'état liquide ou gazeux, soit au-dessus de l'échantillon (espace de tête) à l'état liquide et chauffé pour provoquer l'évaporation des composés d'intérêt. Les solutés se concentrent alors dans la phase solide polymère. La figure 03-6 illustre le montage alors employé.
- La seconde étape consiste en la désorption thermique des solutés adsorbés. Pour ce faire, la fibre dans son aiguille/carter est plongée dans un injecteur CPG chauffé. Une fois dans l'injecteur, la fibre est à nouveau déployée hors de l'aiguille creuse protectrice et les molécules de solutés sont alors rapidement désorbées et transférées vers la colonne de CPG pour l'analyse. Ce système permet une analyse à la fois qualitative et quantitative.

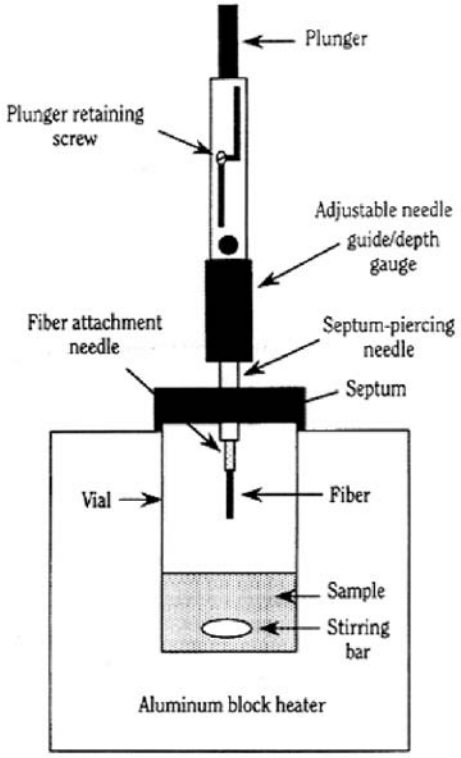


Figure 03-6. Méthode MEPS : montage pour la phase d'adsorption.

6.2.4.2 – Application au dosage du 4-éthyl-phénol.

Monje et al. (2001) montrent que cette technique donne des résultats très fiables en utilisant une fibre Polyacrylate 85 µm (Supelco®). Un système CPG Dani® GC1000^{TM} muni d'un Détecteur à Ionisation de Flamme (250 °C pour un mélange air/hydrogène) est utilisé avec une colonne capillaire polaire en polyéthylène glycol Alltech® EC-WAX^{TM} (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). L'hélium à 1 mL/min est employé comme gaz vecteur.

La phase d'adsorption se déroule dans un flacon de 5 mL avec un septum en caoutchouc serti et contenant 2 mL d'échantillon à doser. 1 g de chlorure de sodium et 0,1 mL d'une solution de 3,4-diméthyl-phénol à 200 mg/L (étalon interne) sont ajoutés à l'échantillon. L'adsorption dans l'espace tête du flacon se déroule pendant 40 minutes, alors que l'échantillon est maintenu à 55°C avec une agitation constante à 800 rpm.

La désorption s'effectue dans la chambre d'injection à 250 °C pendant 5 minutes (en mode splitless).

Le programme thermique du four est le suivant :

- 40 °C pendant 5 minutes
- rampe à 10 °C/minutes pendant 14 minutes (passage de 40 à 180 °C)
- rampe à 3 °C/minutes pendant 8 minutes (passage de 180 à 204 °C)
- rampe à 10 °C/minutes pendant 3 minutes (passage de 204 à 234 °C)
- 234 °C pendant 5 minutes.

Un double étalonnage est établi pour chaque type de milieu testé (les propriétés physico-chimiques régissant l'étape d'adsorption - équilibre liquide/gaz puis gaz/solide - dépendent en effet de la matrice considérée) :

- [1-5 mg/L], avec 5 points : 1 – 2 – 3 – 4 – 5
- [0 -1 mg/L] avec 6 points : 0 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1

Selon les auteurs précédemment cités, l'erreur maximale est estimée à 6 %.

6.2.5 – Acide para-coumarique.

Le dosage de l'acide para-coumarique est réalisé par HPLC.

Après centrifugation de l'échantillon à 5 °C pendant 10 minutes à 12 000 tpm, le surnageant est filtré sur membrane à 0,45 µm. 20 µL sont alors injectés pour l'analyse, qui a lieu à l'aide d'un système – TSP Spectra System – équipé d'une colonne Sherisorb S5-ODS2 (Phase Sep). La phase mobile est constituée d'eau ultra pure, d'acide formique et d'acétonitrile. Un détecteur UV (TSP Spectra Series UV150) à longueur d'onde variable est employé pour déterminer l'absorbance en sortie de colonne. L'intégration des pics et le traitement des données sont réalisés à l'aide du logiciel PCI 1000 UV.

Une gamme étalon est établie entre 0 et 6 mg/L d'acide para-coumarique dissous dans une solution aqueuse à 10 % vol/vol en éthanol.

Remarque importante :

Des travaux de Salaméh et al. (Communication interne au laboratoire relatif à des travaux en cours et à paraître) ont permis l'optimisation des conditions opératoires de cette méthode initialement proposée par O'neill et al. (1996). Nous ne détaillerons donc pas ici ces conditions de travail préconisées dans ces nouveaux travaux (composition et débit de l'éluant, programme thermique, longueur d'onde du détecteur).

6.3 – Mesure d'Oxygène dissous.

La mesure d'oxygène dissous est réalisée à l'aide d'un oxymètre muni d'une sonde immergeable à capteur LDO à mesure optique (Luminescent Dissolved Oxygen) : HQ10 Hach Portable LDO^{TM}.

La teneur en O_2 est déterminée par une couche sensible qui réagissant à la lumière bleue renvoie une lumière rouge : phénomène de luminescence. Le temps entre l'émission et le retour est corrélé à concentration en oxygène (figure 03-7), dans des conditions données de température et de pression.

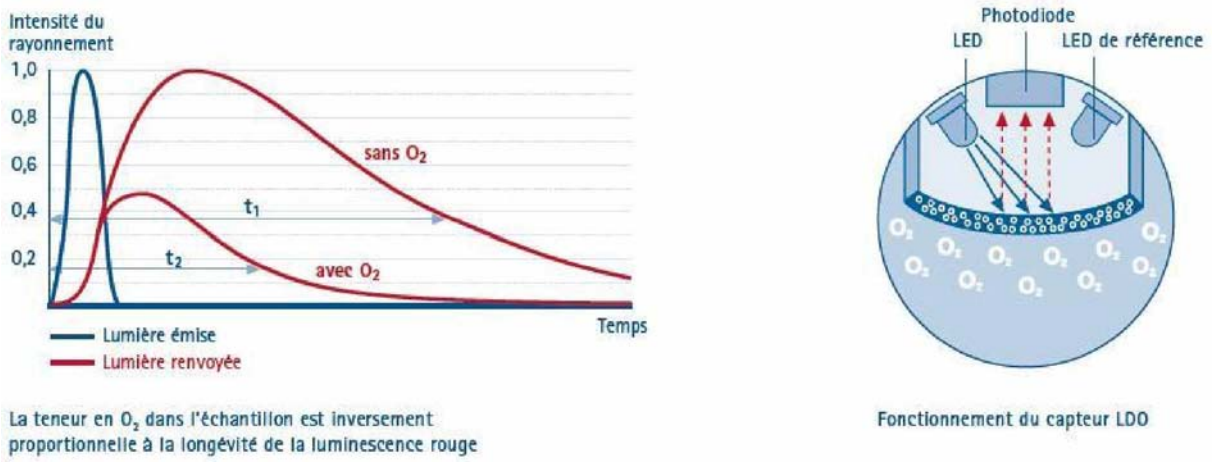


Figure 03-7. Principe de la mesure d'oxygène par capteur LDO.

Une calibration à 100 % de la saturation dans l'eau est nécessaire. Le résultat est alors fourni en % de saturation ou concentration exprimée en mg/L. La précision de l'appareil est estimée par le constructeur à ± 0,1 mg/L (La corrélation « % de la saturation / concentration en mg/L » dans l'eau est fournie en Annexe 03)

L'acquisition peut se faire de manière ponctuelle/instantanée ou moyennée sur différentes durées : 30 s, 1 minute, 2 minutes et 5 minutes. Du fait du montage utilisé pour la culture (emploi d'un incubateur à table agitante), et afin d'intégrer le temps de mise en régime et de stabilisation du système nous optons pour une moyenne sur 5 minutes.

Au cours de la culture plusieurs mesures d'oxygène dissous sont effectuées aux différents moments clé de la croissance. La sonde utilisée n'étant pas stérile et n'étant pas stérilisable, nous menons une fermentation pour une souche donnée, dans des conditions données, dans une batterie d'erlenmeyers identiques conduits en parallèle (même milieu, même volume, même inoculum). Ainsi, une mesure effectuée à un moment donnée se fait dans un erlenmeyer qui est alors « sacrifié » (principe de suivi d'une fermentation unique dans des cultures suicides en parallèle).

7 –Traitements de données.

7.1 – Bilans Carbone et Azote.

La réaction biochimique de la croissance microbienne s'écrit en première approximation

$$CH_mO_l + aNH_3 + bO_2 \quad \rightarrow \quad y_c\, CH_pO_nN_q + zCH_rO_sN_t + cH_2O + dCO_2$$

Où CH_mO_l, $CH_pO_nN_q$, $CH_rO_sN_t$ représentent respectivement le substrat carboné, la biomasse et les produits.

§ Le bilan carbone s'écrit donc

$$\boldsymbol{1 = yc + z + d}$$

avec yc, z et d les fractions massique de carbone du substrat transformé en biomasse, en produits et en dioxyde de carbone. Ils se calculent d'après :

$$\boldsymbol{yc = \frac{X}{So - S}\frac{\sigma x}{\sigma s}} \qquad \boldsymbol{z = \frac{P}{So - S}\frac{\sigma p}{\sigma s}} \qquad \boldsymbol{d = \frac{Cco2}{So - S}\frac{\sigma co2}{\sigma s}}$$

X, P, Cco2, **S** et **So** sont respectivement les concentrations massiques en Biomasse, Produits, $CO_{2\ dégagé}$, Substrat résiduel et Substrat initial.

σs, σx, σp et **σco2** sont les fractions massiques du carbone dans le substrat, la biomasse, le produit et le dioxyde de carbone.

$$\sigma = \frac{\boldsymbol{C.Mc}}{\boldsymbol{M}}$$

C : nombre d'atomes de carbone dans la formule brute du composé

Mc : masse molaire du Carbone : 12,01 g/L

M : masse molaire du composé (g/L)

§ Bilan azote

Le Bilan en Azote se définit de manière analogue en transformant l'équation à l'aide des formules élémentaires exprimées en N-mole, et non plus en C-mole.

Nous retrouvons alors

$$\boldsymbol{1 = yn + zn}$$

avec yn et zn les fractions d'azote du substrat transformée en biomasse et en produit.

$$\boldsymbol{yn = \frac{X}{So - S}\frac{\vartheta x}{\vartheta s}} \qquad \boldsymbol{zn = \frac{P}{So - S}\frac{\vartheta x}{\vartheta s}}$$

ϑ s, **ϑ x** et **ϑ p** sont les fractions massiques de l'azote dans le substrat, la biomasse et le produit.

$$\vartheta = \frac{\boldsymbol{N.Mn}}{\boldsymbol{M}}$$

N : nombre d'atomes d'azote du composé

Mn : masse molaire de l'Azote: 14,01 g/L

M : masse molaire du composé (g/L)

7.2 – Calculs des rendements.

S, X, P sont les concentrations massiques en Substrat, Biomasse et Produit.
Les indices **o** et **f** signalent respectivement le début et la fin de la fermentation.

§ Le rendement en biomasse par rapport au substrat, Yx/s (g de biomasse/g de substrat), se définit par :

$$Yx/s = \frac{Xf - Xo}{So - Sf}$$

§ Le rendement en produit par rapport au substrat, Yp/s (g de produit/g de substrat), se définit par :

$$Yp/s = \frac{Pf - Po}{So - Sf}$$

§ Dans le cas des ***Ethyls phénols***, nous définissons le Taux de conversion comme le rapport de la Quantité d'éthylphénol produite *(exprimée en mol)* sur la Quantité d'acide para-coumarique introduite *(exprimée en mol).*

7.3 – Lissage des données expérimentales.

Dans le but d'interpoler une courbe lissée qui représente la croissance, nous utilisons une macro des fonctions splines cubiques g(t) vérifiant pour chaque couple de points expérimentaux (t_i, x_i) les conditions :

$$\int_{t0}^{tn} g''(t)^2\,dt \text{ minimum} \qquad \text{et} \qquad \sum_{i=0}^{i=n}\left(\frac{g(t_i)-x_i}{\sigma(x_i)}\right)^2 < S$$

x_i : valeur expérimentale de la variable x au temps t_i ;

t_i : temps de prise de l'échantillon, compté à partir de l'ensemencement ;

$\sigma(x_i)$: écart-type lié aux valeurs expérimentales de x ;

n : nombre total de points expérimentaux ;

S : constante de lissage

La première condition vise à minimiser la dérivée seconde g''(t) des fonctions de lissage g(t), ce qui linéarise les jonctions des courbes les unes aux autres, générant ainsi des fonctions lisses. La deuxième condition exerce une contrainte sur ce lissage. En effet, la somme des carrés des écarts entre les points expérimentaux et les points du lissage ne dépasse pas la constante 'S'.

Le programme permet à l'utilisateur de choisir la constante de lissage. Cette constante 'S' détermine donc le degré de liberté du lissage. En pratique, nous la choisissons conformément aux règles suivantes :

§ L'allure de la courbe dérivée g'(t) doit être physiquement significative

§ La courbe g(t) généré par un choix de la constante 'S' ne doit pas dépasser graphiquement les barres d'erreur sur les points expérimentaux ;

§ La valeur de la constante 'S' doit être minimisée, tout en vérifiant les deux conditions précédentes.

Les données lissées ont permis de déterminer le taux spécifique de croissance 'μ_i', dans la mesure où la concentration en biomasse (X) est associée à la fonction g(t) :

$$\mu_i = \frac{1}{X_i}\left(\frac{dX}{dt}\right)_i$$

7.4 – Traitements statistiques : Comparaison de proportions - Test de χ^2

(d'après « Statistique appliquée à l'exploitation des mesures, CETAMA, Masson (ed) Paris 1978-1986 »)

Dans un test de χ^2, il s'agit d'évaluer l'importance des écarts entre des fréquences d'occurrence (ou des pourcentages de présence) observées à l'intérieur d'échantillons aléatoires et des fréquences (ou des pourcentages) théoriques espérées qui devraient être observées si l'hypothèse nulle soumise au test était vraie.

Les étapes du test de χ^2 sont les suivantes:

- Formulation de l'hypothèse nulle H_0 et l'hypothèse alternative H_1. Dans ce cas, H_0 affirme qu'il n'existe aucune différence significative (c'est-à-dire non attribuable à l'erreur d'échantillonnage) entre les fréquences observées dans les populations et les fréquences hypothétiques.
- Choix d'un seuil de signification du test α.
- Calcul des fréquences théoriques espérées fe (ou les pourcentages) que l'on devrait observer si l'hypothèse nulle était vraie, à partir de l'échantillonnage empirique (fréquence observée pour chaque population).
- À partir de fréquences observées (f_o) et des fréquences théoriques espérées (f_e), calcul la valeur de χ^2 à l'aide de la formule.

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

On note que si toutes les fréquences observées étaient égales aux fréquences espérées, cette somme serait égale à 0. Donc 0 est la valeur *idéale* que devrait prendre la valeur du χ^2 lorsque H_0 est vraie.

§ Comparaison de la valeur du χ^2 calculée obtenue avec la valeur critique de la table de Pearson : $\chi^2_{1-\alpha}$ (selon α et le degré de liberté du test, Cf Annexe 04 pour la table de valeurs du test) afin de déterminer si le χ^2 calculé est significativement différent de 0. Si c'est les deux valeurs différent on conclut que l'hypothèse H_0 est probablement fausse, à la probabilité (1-α).

- CHAPITRE 4 -

RESULTATS ET DISCUSSIONS

MODULE A
Dépistages et Isolements

La première partie de nos travaux a consisté à mettre en place une procédure simple et fiable de dépistage et d'isolement du contaminant *Brettanomyces bruxellensis* à différents niveaux dans l'environnement viti-vinicole. La possibilité de conserver le clone isolé et intègre pour sa caractérisation ultérieure a également été une des contraintes fixées pour cette démarche.

Beaucoup de travaux à ce jour présentent des méthodes de dépistage de cette levure dans les moûts ou le vin (Connell et al, 2002 ; Cocolin et al, 2004 ; Rodriguez et al, 2004 …), ou sur les baies de raisin (Renouf et Lonvaud-Funel, 2006(b)), mais nul ne propose de procédure « générale » et adaptable aux différents contextes, en se basant sur une démarche simple et applicable dans la pratique avec des moyens de microbiologie accessible. C'est en nous basant sur cette observation et avec un souci de mise en place pratique pour les acteurs du monde œnologique que nous avons construit la procédure présentée.

1 – Procédure de dépistage et d'isolement.

Par principe, une méthode de dépistage et d'isolement doit permettre, à partir d'échantillons susceptibles de contenir une charge microbiologie diverse et variée (d'autant plus en se plaçant dans un contexte comme celui de l'industrie du vin où l'environnement n'est pas aseptique) de cibler et de mettre en avant la présence d'un agent, soit au niveau du genre, soit au niveau de l'espèce, voire des souches. Pour ce faire, elle doit se baser sur une, voire des étapes de sélection de cet agent ciblé vis-à-vis des autres micro-organismes présents. Une des approches les plus simples et celle que nous avons choisie est l'utilisation de milieux sélectifs. De tels milieux doivent alors permettre un développement préférentiel du micro-organisme recherché et la mise en avant de caractères assurant l'appartenance au groupe recherché.

1.1 – Mise en place de la méthode.

En travaillant par étapes, et en exploitant différents critères successivement, nous espérons fonctionner à la manière d'une sélection en entonnoirs ou en filets (Figure 04A-1). De plus, en multipliant les tests, on réduit la probabilité de fausse conclusion dans la mesure où un unique test pourrait échouer par l'existence de clones mutants passant au travers des mailles d'un unique filet (développement par une souche d'un groupe non ciblé d'une résistance à un composé par exemple).

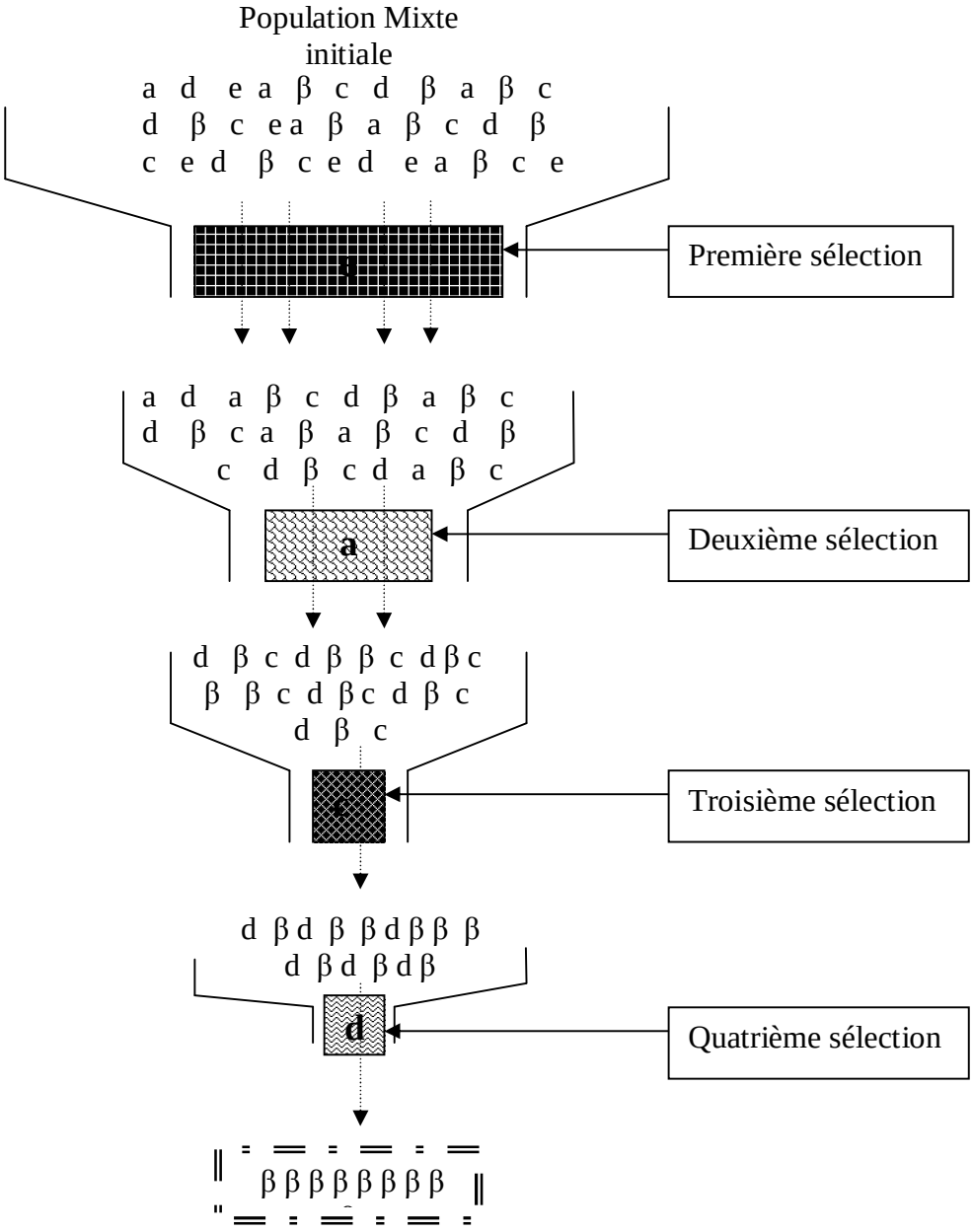


Figure 04A-1. Sélections successives.
Principe schématisé de sélections successives pour cibler les individus appartenant à un groupe β à partir d'une population mixte.

Par rapport au schéma précédent, il est possible d'envisager des couplages entres les différents niveaux de sélection, permettant de réduire le nombre d'étapes tout en conservant les critères de discrimination afin d'assurer la véracité du résultat.

1.1.1 – Les critères discriminatoires retenus pour cibler *Brettanomyces.*

La revue bibliographique (Chapitre 02, 2.) nous permet de sélectionner 4 critères qui considérés ensemble permettraient de cibler le genre *Brettanomyces/Dekkera* :

- la résistance à la cycloheximide/actidione (élimination des micro-organismes sensibles à ce composé : *Saccharomyces sp.*)
- la résistance à l'éthanol (élimination des micro-organismes sensibles à l'alcool : champignons filamenteux, levures apiculées telles que *Kloeckera apiculata, Candida pulcherrima*, *Hansenula sp.*, etc… (Fugelsang, 1997)).
- la production d'acide acétique en aérobie (ou aérobie partielle).
- la conversion de l'acide para-coumarique en vinyl-4-phénol puis éthyl-4-phénol.

A ces critères, se rajoute l'emploi d'un antibactérien à large spectre sans effet fongistatique tel que chloramphénicol qui permet d'éliminer les bactéries communes en œnologie et ainsi concentrer la sélection aux niveaux des levures (Asselineau et Zalta, 1973).

1.1.2 – Les étapes de la méthode.

L'ensemble de ces critères a donc été pris en compte pour formuler des milieux sélectifs.

Medawar (2003) montre qu'une étape d'enrichissement et d'activation en milieu liquide a été nécessaire dans le cas de dépistage sur des anciens échantillons de vins afin d'éviter les faux négatifs, en raison d'une très faible population supposée. Nous décidons alors d'étendre cette notion de phase de culture liquide à l'ensemble de notre démarche, quelque soit le type et l'origine de l'échantillon considéré. L'emploi simultané à ce niveau de l'actidione (cycloheximide) et de l'éthanol dans un milieu dont la composition a été fournie précédemment (Chapitre 02, 1.2.1), permet une première sélection importante vis-à-vis des levures majoritaires dans l'environnement œnologique, qu'il soit situé à une étape pré- fermentaire ou fermentaire.

Pour le test physiologique de production d'acide acétique, nous orientons après quelques essais (avec divers indicateurs d'acidité) notre choix vers le gel à base de Carbonate de calcium dont la composition est présentée en Chapitre 03, 1.2.2. En effet, l'emploi d'autres indicateurs tels que le vert de bromo-crésol, le rouge de méthyle s'avère non discriminant car trop sensibles au changement de pH (certaines souches *Saccharomyces* et autres levures du contexte œnologique étant capables de provoquer les virages, impliquant des faux positifs). Ce choix rejoint celui retenu par Medawar (2003). Nous couplons alors à ce test, un autre test physiologique ciblant l'aptitude à former des composés malodorants à partir d'acide cinnamique.

Comme présenté dans le paragraphe 3.4 du Chapitre 02, ce bi-test (acidité et formation des phénols volatiles) peut être mené en une seule ou plusieurs étapes selon que l'on se place dans un contexte de dépistage ou d'isolement. L'isolement devant aboutir à l'obtention de colonie de souches

pures, une procédure de propagation en utilisant ce même milieu permet de confirmer les caractères testés à l'échelle de colonie(s) isolée(s) et non plus d'ensemble de colonies.

De plus, nous conjuguons à l'ensemble de ces étapes des approches macro et micro morphologiques : appréciation de la forme des colonies sur milieu solide et la morphologie des cellules en culture liquide. Même si ce critère n'est pas en soit discriminatoire du fait du polymorphisme du genre *Dekkera/Brettanomyces*, en fonction des milieux et des âges de cultures (Aguilar-Uscanga, 1998 ; Medawar, 2003), il permet somme toute de faire un tri grossier mais efficace vis-à-vis de certaines morphologies non ambiguës (Medawar, 2003).

Par la suite, les souches retenues dans le cadre d'isolement sont soumises à une identification génétique par PCR spécifique *Brettanomyces* (Chapitre 03, 3.5) avant de les répertorier dans la banque des souches du laboratoire et de les utiliser dans des travaux ultérieurs.

Nous présentons dans la figure 04A-2 l'organigramme de la procédure mise en place pour le dépistage et l'isolement de *Brettanomyces*.

1.1.3 – Une méthode non quantitative.

Du fait de la première étape qui est une mise en culture plus ou moins longue de l'échantillon initial, la procédure présentée n'est pas quantitative et ne permet donc pas d'évaluer numériquement la contamination. Se voulant avant tout qualitative, elle permet de statuer sur une présence réelle du contaminant, peut importe son nombre dans l'échantillon considéré. Elle apparaît alors avant tout comme un outil de prospection dans une approche généralisée de compréhension de la contamination ; comme faire un état des lieux des sources potentielles par exemple.

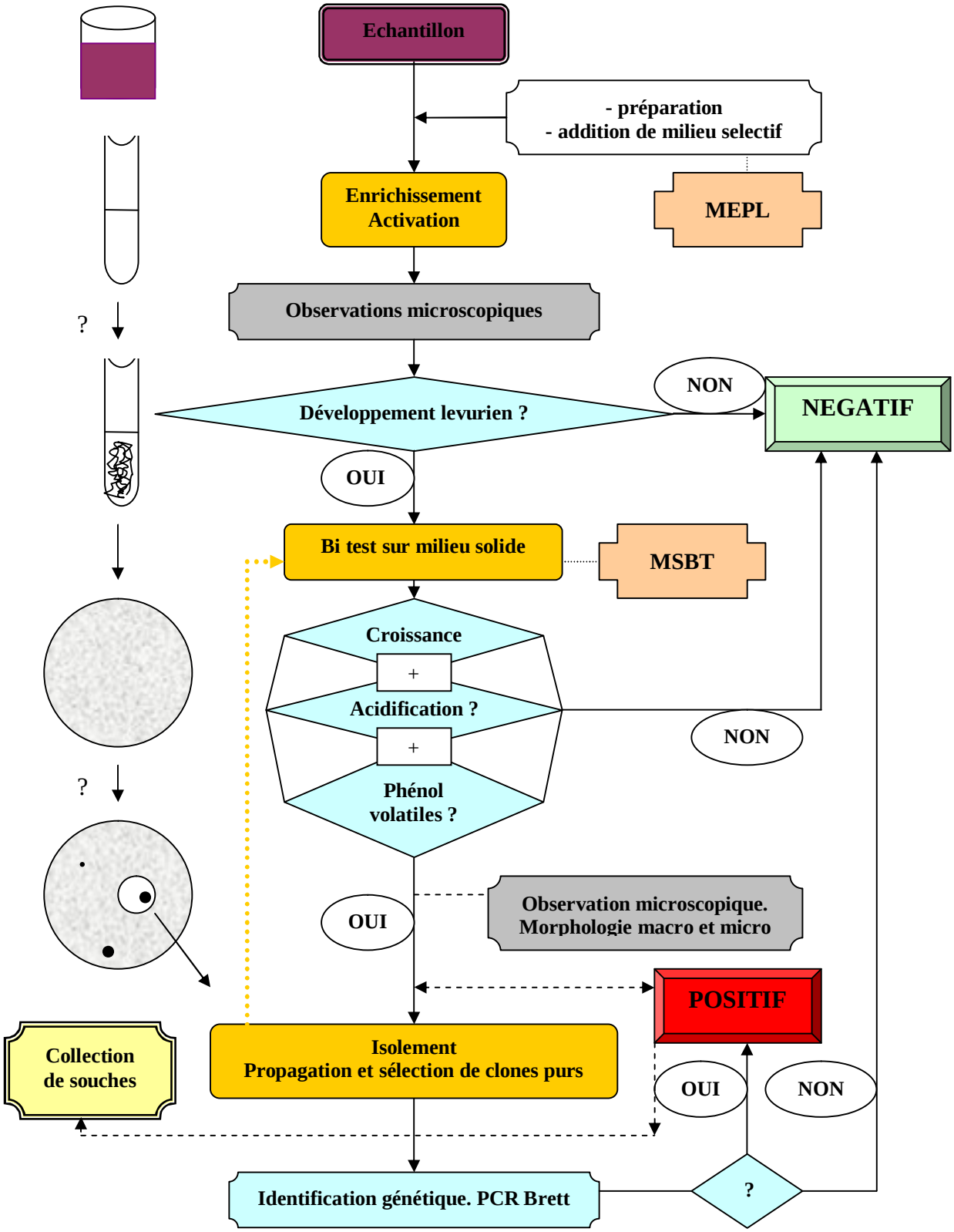


Figure 04A-2. Procédure de dépistage et d'isolement.

1.2 – Efficacité de la méthode.

Afin de tester la méthode, nous menons une expérimentation de détermination de son efficacité de recouvrement d'échantillons contaminés. Ainsi, 120 échantillons fictifs ont été créés en laboratoire (Tableau 04A-1). 5 mL de différentes matrices sont inoculées à hauteur de 1000 cellules totales /mL avec trois types de cocktails microbiens.

- Cocktail A : mélange de *B. bruxellensis* Souche A, Souches Oenodev, de *Saccharomyces cerevisiae* Souche Sacc, de *Rhodotorula sp.* Souche Rhod et d'apiculée Souche Apic.
- Cocktail B : mélange de *B. bruxellensis* Souche A et Souches Oenodev
- Cocktail C : mélange de *Souche Sac*, *Souche Rhod*, *Souche Apic*.

(Les cocktails sont réalisés par simple mise en suspension de colonies de souches désirées dans une solution de Glucose à 10 g/L puis agitation à 150 rpm pendant 12 heures à 30°C).

Les matrices considérées sont :

- Eau distillée filtrée sur 0,2 µm
- Vin commercialisé (Buzet rouge, en b.i.b. de 3L), filtré sur 0,2 µm
- Jus de raisin (Pampryl Jus de raisin rouge sans sucre ajouté®), filtré sur 0,2 µm.

Tableau 04A-1. Démarche de validation.Echantillons fictifs.

matrices	nombre d'échantillons correspondants				
	cocktail A	cocktail B	cocktail C	témoin	total
eau	15	15	5	5	40
vin	15	15	5	5	40
jus de raisin	15	15	5	5	40
total	45	45	15	15	120

(Les témoins ne sont pas inoculés)

Les échantillons sont alors dépourvus de toute identification, à l'exception de l'indication de la matrice pour mener un test à l'aveugle quant au cocktail utilisé.

Après brassage des échantillons et en incubation à 30°C pendant 24h, la démarche de dépistage est mise en application sur chacun d'eux.

Au final, on relève le nombre d'échantillons identifiés comme positifs d'après la procédure utilisée (Tableau 04A-2).

Tableau 04A-2. Démarche de validation.Résultats des dépistages.

matrices	positifs	négatifs
eau	29	11
vin	27	13
jus de raisin	30	10
total	86	34

Partant de 90 échantillons sur 120, inoculés effectivement avec des *Brettanomyces* (et donc effectivement contaminés), la méthode de dépistage permet de retrouver 86 échantillons contaminés, soit une efficacité de détection de 95,5 % sur notre test.

On retrouve néanmoins a priori 4 faux négatifs. Soit une sous-évaluation de 4,4 % du risque de contamination. En revanche, avec les cocktails microbiens testés, il n'y a pas eu a priori de faux positifs, ce qui laisse supposer une bonne sélectivité lors des différentes étapes. A ce titre, nous ne retrouvons pas de colonies à la morphologie type *Rhodotorula* ou apiculée lors des relevés, validant a fortiori le caractère discriminant vis-à-vis de ces deux groupes « non-*Brettanomyces* ». Cette observation ne doit cependant pas être étendue hâtivement à l'ensemble des espèces présentes dans l'environnement œnologique, en ce sens où nous n'avons pris en considération que 3 souches non-*Brettanomyces* : *Saccharomyces*, de *Rhodotorula* et apiculée. La preuve est donnée notamment par la présence lors de nos identifications génétiques de 2 faux positifs, non *Brettanomyces*, (sur une série de 37 testées, dans la suite, paragraphe 1.3) mais supposés l'être d'après la procédure d'isolement.

La procédure utilisée permet donc un recouvrement très efficace des échantillons contaminés, mais ne garantit pas une évaluation sans faille du risque. On gardera donc en tête l'existence d'une sous-évaluation éventuelle. Nous ne pouvons pas mener de comparaison vis-à-vis d'autres méthodes proposées dans la littérature, l'évaluation des sous ou sur évaluations n'étant pas proposées par les auteurs.

1.3 – Appui de l'outil génétique.

Une série de 37 souches, isolées grâce à cette procédure a été soumise à l'identification génétique (chapitre 03, §3.5) et 35 ont été effectivement identifiées comme appartenant à l'espéce *B. bruxellensis*.

Malheureusement, le travail génétique n'a pas été approfondi sur les deux souches non *Brettanomyces* ayant passé avec succès les tests de la procédure. Mais les récents travaux de Dias et al. (2003(b)) ainsi que Martorell et al. (2006) laissent à supposer qu'il pourrait s'agir de souches de *Pichia guilliermondii*.

Nous retenons donc qu'une très faible proportion d'isolats considérés comme *Brettanomyces* ne l'étaient pas effectivement. Isolats qui au demeurant présentent des caractéristiques proches pour ne pas dire similaires à celles de *Brettanomyces bruxellensis*, impliquant notamment des détériorations du produit. Elles devront donc être également au coeur des préoccupations dans la pratique.

2 – Influence de la durée de la première étape : activation et enrichissement.

Nous nous sommes par ailleurs plus particulièrement intéressés à la durée nécessaire de la première étape de la démarche retenue, en fonction du type d'échantillon considéré.

En effet, nous pouvons supposer que dans ces différents contextes de prélèvement (sur le raisin, dans les moûts, les vins finis, sur le matériel) *Brettanomyces* si elle est présente, ne l'est pas de manière équivalente d'un point de vue quantitatif : pouvant variant de quelques cellules par kg de vendange ou cm² de surface sale, à plusieurs milliers de cellules par mL de vin.

Lorsque nous commençons nos travaux en 2003, aucune indication réelle n'est fournie sur l'intérêt et la nécessité d'une telle procédure pour des échantillons de nature diverse. Par la suite, Renouf et Lonvaud (2006(b)) montrent par exemple qu'une pré-culture de 10 jours en milieu liquide spécifique est nécessaire avant qu'un test génétique ne permette de dépister la présence du contaminant dans un échantillon de vendange. Cet enrichissement est alors une étape qui permet de développer un nombre suffisant de micro-organismes pour passer au delà la limite de détection des méthodes en aval, dans leur cas différentes méthodes PCR. A titre indicatif, le meilleur seuil de détection de PCR est proposée actuellement dans la bibliographie par Phister et Mills, 2003 : 1 cellule par mL.

N'utilisant pas systématiquement de méthode génétique dans notre démarche, mais des approches simples de microbiologie classique tels que les étalements sur milieux spécifique, notre seuil de détection serait par exemple, si l'on travaillait en étalement direct d'1 mL par boite de 1 UFC/mL (seuil réduit à 2 UFC/mL pour un étalement de 0,5 mL et ainsi de suite). Dès lors, tout échantillon présentant une population inférieure à ce seuil apparaîtrait négatif aboutissant alors à une sous-évaluation la présence réelle du contaminant.

De plus, l'environnement viti-vinicole rassemblent des conditions pouvant engendrer des situations de stress vis-à-vis des micro-organismes (notamment : alcool, SO_2). Or Millet et Lonvaud (2000) montrent que dans certaines conditions, des bactéries, mais également des levures, dont le genre *Brettanomyces*, sont capables de survivre dans un état physiologique particulier de Cellules Viables mais Non Cultivables (VNC). Il s'agit de cellules vivantes, pourvues d'activités métaboliques diverses, mais incapables de se développer sur des milieux solides de dépistage. Dès lors la présence de micro-organismes dans cet état est indétectable par des voies classiques de microbiologie

(étalement sur gélose) et peut aboutir à une conclusion erronée quant à la contamination. Ces mêmes auteurs montrent, dans le cas de VNC induites par sulfitage, qu'une culture en milieux liquides nutritifs de plusieurs jours peut permettre de modifier cet état physiologique des cellules et d'aboutir à des levures pouvant à nouveau croître sur gélose. Ainsi, une étape d'activation, voire de ré-activation, devient nécessaire.

De ce fait, la première étape de notre procédure joue ce double rôle : d'activation/réactivation afin de rendre les éventuels micro-organismes présents Cultivables et détectables par la culture sur milieux solides tests, mais également d'enrichissement, afin de fournir un nombre suffisant de ces micro-organismes pour dépasser le seuil de détection.

Nous pouvons par ailleurs supposer que cette durée est significative d'une phase d'adaptation des micro-organismes lors de leur passage d'un milieu naturel (baie de raisin) à un milieu de culture (milieu liquide).

Le travail qui suit est donc mené pour adapter cette étape clé en se plaçant dans les différents cas de figures d'échantillons envisagés dans le contexte œnologique.

2.1 – Description générale de l'expérimentation.

Plusieurs prélèvements représentatifs d'un type d'échantillons donnés sont soumis au dépistage.

Après différentes durées d'enrichissement initial, une observation au microscope permet d'apprécier le développement ou non de levure. Les résultats sont alors notés :

- *Obs* + : lorsqu'on observe un quelconque développement de levures dans le milieu d'enrichissement
- *Obs* - : lorsque aucun développement levurien n'est observé. Mais cela ne signifie pas dans l'absolu l'absence totale de micro-organisme, mais seulement à un niveau inférieur au niveau détectable par l'observation (moins de 1 cellule dans le volume présent entre la lame et la lamelle utilisée).

Pour chaque échantillon, 0,5 mL de ce milieu enrichi sont étalés sur milieu MSBT pour le double test : acidité + conversion de l'acide para-coumarique. Les résultats de ce test sont notés :

- + : lorsque les deux tests sont positifs : présence d'au moins une levure acidifiante ET productrice d'odeur caractéristique de la métabolisation de l'acide p-coumarique.
- - : lorsqu'au moins un des deux tests est négatif.

Ce résultat au double test sert alors de conclusion sur le dépistage : « + » signifie alors Présence de *Brettanomyces* dans l'échantillon et « - » en notifie l'absence.

2.2 – Echantillons de baies de raisin.

10 échantillons sont prélevés sur une parcelle de Cabernet Franc, connue pour des antécédents de présence de *Brettanomyces* sur la vendange (communication personnelle de la Cave de Buzet, 2002-2003).

Le tableau 04A-3 présente le résultat des dépistages pour ces échantillons.

Tableau 04A-3. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons de baies de raisin.

	durée de l'enrichissement							
	1 semaine		1 mois		2 mois		3 mois	
échantillon	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT
1	-	-	-	-	+	+	-	-
2	-	-	+	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+		+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	+	+	+	+
10	+	-	+	-	+	+	-	-
total (+)	2	0	4	1	6	6	5	4

Une durée de 2 mois d'enrichissement donne donc le maximum d'échantillons dépistés positifs en *Brettanomyces* sur le raisin. Les enrichissements d'une semaine, et d'un mois aboutissent à une sous-évaluation de la présence du contaminant sur les baies. L'enrichissement plus long ne semble pas apporter d'amélioration quand au dépistage, tendant même vers une diminution (disparition des cellules par lyses, état physiologique particulier de résistance, …) du nombre de dépistages positifs et donc une sous-évaluation là encore de la présence initiale du contaminant.

Nous remarquons par ailleurs une différence notable pour les échantillons connaissant 1 semaine puis 1 mois d'enrichissement entre l'observation au microscope spécifiant un développement levurien et le résultat du double test spécifiant la présence de *Brettanomyces*. Nous pouvons supposer ainsi que les échantillons obs +, mais MSBT – sont caractérisés à ce moment là par la présence de cellules de *Brettanomyces* en VNC (Viable Non Cultivable) dans la mesure où ses échantillons sont plus tard détectés positifs donc confirmant bel et bien la présence du contaminant dès le début en quantité visible sous microscope. Nous pouvons également supposer qu'il s'agit de cellules de *non-Brettanomyces* pouvant se développer dans le milieu MEPL : donc des levures cycloheximide-résistantes et tolérantes à l'éthanol à 8 % vol/vol.

2.3 – Echantillons de vin en cours d'élaboration, post fermentation alcoolique.

2.3.1 – Echantillons "frais", prélevés et traités dans un laps de temps réduit.

(moins de 72h)

10 échantillons ont été prélevés dans des cuves de la cave Buzet 2, en fin de fermentation alcoolique juste avant l'écoulage.

Nous proposons les résultats du dépistage dans le tableau 04A-4.

Tableau 04A-4. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons frais de vins en cours d'élaboration.

	durée de l'enrichissement									
	0 jour		2 jours		1 semaine		3 semaines		5 semaines	
échantillon	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
total (+)	10	4	10	4	6	4	5	4	5	5

Remarque:

Pour les échantillons connaissant un enrichissement de 0 et 2 jours, l'observation au microscope est systématiquement positive car l'échantillon est prélevé alors que les levures fermentaires sont encore bien présentes. Ainsi, la présence de levure n'est pas significative d'un développement dû à l'enrichissement.

Nous notons donc qu'il n'y a pas de différence sur le résultat au double test sur gélose pour les enrichissements allant de 0 à 3 semaines. Il faut atteindre 5 semaines pour observer une légère augmentation du nombre de dépistages positifs, mais la variation n'est pas significative par rapport à l'extension de la durée nécessaire. Ce constat nous amène donc à considérer que l'enrichissement dans le cadre de ce genre d'échantillon n'est pas d'une réelle importance pour obtenir une bonne efficacité de détection.

Nous remarquons là également une différence entre le résultat de l'observation au microscope et le résultat final du dépistage (échantillons 7 et 8). Nous pouvons donc supposer le développement des souches (au moins une) dans le milieu MELP. C'est tout naturellement que l'on s'oriente vers la souche de levure théoriquement choisie pour mener la fermentation, *Souche Sacc 522* Davis. Or, un test rapide avec cette levure montre que la *Souche Sacc* n'est pas résistante à la cycloheximide et ne peut en conséquent pas se développer dans le MELP. Dès lors, nous envisageons la présence de *non-Brettanomyces* et *non-Souche Sacc* dans les échantillons 7 et 8. Il peut s'agir notamment de souches indigènes (provenant de la vendange ou de la cave) qui ont pu s'implanter ou du moins demeurer présente lors de la fermentation.

2.3.2 – Echantillons "vieux", traitement longtemps après le prélèvement.

(plusieurs mois, voire années, avec conservation à température ambiante ou à 5°C).

Des échantillons de vins en cours issus de lots considérés comme contaminés pendant d'élaboration (dégustation révélant la présence assurée du contaminant) avaient été prélevés à La Cave de Buzet et dans une cave de la région de Madiran en 2001 et 2002 puis conservés. 10 d'entre eux ont alors pu être utilisés pour mener l'étude ici décrite dont les résultats figurent dans le tableau 04A-5.

Tableau 04A-5. Influence de la durée d'enrichissement pour des vieux échantillons de vins prélevés en cours d'élaboration.

	durée de l'enrichissement									
	2 jours		1 semaine		3 semaines		5 semaines		8 semaines	
échantillon	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
total (+)	3	1	3	2	5	5	8	8	8	8

De longues périodes d'enrichissement sont nécessaires pour mener à bien le meilleur dépistage. En tout cas, on retient également qu'il est donc possible de détecter la présence du contaminant dans des échantillons vieux de plusieurs années, et que le passage dans des conditions favorables de culture

(ici le milieu MELP, simple dans sa formulation mais nutritif : sucre, extrait de levure) suffit à un redémarrage du développement de *Brettanomyces*.

Le fait de ne pas observer de différence entre 5 et 8 semaines suggère qu'un enrichissement plus long n'est pas nécessaire. Les échantillons 7 et 9, à ce jour dépistés négatifs sont donc dépourvus de contaminant. S'agissant à priori d'échantillons que l'on savait contaminés, on peut supposer que la ou les souches contaminante/s n'a/ont pas survécue/s aux deux années d'attente.

Pour les échantillons 3 et 8 nous observons dès le début des levures au microscope mais ne les retrouvons pas lors de la culture sur gel. Il s'agit là encore d'une probable mise en avant de l'existence de cellules V.N.C..

2.4 – Echantillons de vins finis et embouteillés.

5 bouteilles de vins de différents millésimes allant de 2001 à 2003 et marqués « *Brettanomyces* » (dégustation) avec un dépôt levurien plus ou moins important au fond de la bouteille ont été récupérées. (*Par soucis de discrétion vis-à-vis de personnes ayant fourni les échantillons nous ne détaillons pas l'origine de ces vins).* Les résultats de ce test sont proposés dans le tableau 04A-6.

Tableau 04A-6. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons de vins embouteillés.

	durée de l'enrichissement					
	0 jour		1 semaine		2 semaines	
échantillon	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	-	+	+
4	+	-	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
total (+)	5	2	5	4	5	5

Même si l'observation au microscope permet ici de constater la présence directement de levures dans l'ensemble des bouteilles (0 jour d'enrichissement) le dépistage ne devient pleinement efficace qu'au bout de 2 semaines où il est alors possible de retrouver la totalité des échantillons positifs. La réactivation des levures présentes est néanmoins effective dès 1 semaine pour 4 des 5 échantillons. Ainsi dans ce cas d'échantillon, la première étape de la procédure joue surtout le rôle d'activation des levures présentes dans le milieu.

2.5 – Echantillons « solides ou assimilés».

10 échantillons solides ou assimilés de natures différentes (résidus secs de vendange, morceau de tartre, insectes, échantillons de surface, eaux résiduaires, ...) sont traités. Le tableau 04A-7 rassemble les résultats du dépistage relatif à ces échantillons.

Tableau 04A-7. Influence de la durée d'enrichissement pour des échantillons « solides ou assimilés ».

	durée de l'enrichissement									
	1 jour		1 semaine		3 semaines		5 semaines		8 semaines	
échantillon	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT	obs	MSBT
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
total (+)	2	1	3	2	6	6	6	6	7	7

3 semaines d'enrichissement est une durée qui permet d'avoir des résultats suffisamment significatifs pour statuer sur un état de contamination lors d'un bilan. En effet, même si 8 semaines est une durée qui permet de détecter un échantillon positif supplémentaire, on peut s'interroger sur l'intérêt de l'information apportée par rapport au temps alors consacré/investi.

Nous ne pouvons pas ici porter de précision vis-à-vis de la nature exacte de l'échantillon et la durée optimale associée (erreur de référencement lors de l'expérimentation a conduit à la perte de l'information : numéro de l'échantillon / nature exacte). Nous nous contenterons donc de considérer globalement la durée de 3 semaines comme convenable pour le grand groupe des « échantillons solides » (et ceux qui s'y approchent).

3 – Résultats globaux.

3.1 – Dépistages.

Le tableau 04A-8 est une synthèse de l'ensemble des dépistages que nous avons menés au cours de 3 années d'études (principalement sur les deux premières années). Ces prélèvements et dépistages

ont été effectués en majorité dans la région de Buzet, (et accessoirement la région de Madiran). Les échantillons ayant servi à l'étude sur la durée de l'enrichissement (paragraphe 2 de ce présent module) ne sont pas comptabilisés.

Ainsi, différents types d'échantillons ont été considérés afin de déterminer la présence de la levure *Brettanomyces* dans les différents environnements rencontrés en viti-viniculture : du vignoble au produit fini.

Nous précisons quelques contextes pour ces dépistages :

- Le dépistage sur le raisin s'est inscrit dans une recherche de source potentielle de contamination avec la matière première, (nous reviendrons sur ces différents points et les approfondirons par la suite). Nous détaillerons ce point par la suite (Chapitre 04, Module B).
- Les dépistages dans les chais et sur différents outils viticoles (machines a vendanger par exemple) se sont inscrits quant à eux dans des démarches de contrôle d'hygiène et de recherche de contamination interne aux caves ainsi que du mode éventuel de propagation de cette contamination.
- Les dépistages sur vins en cours ont été effectués pour dresser les bilans de contamination et mener le suivi lors des campagnes de production.

D'un regard global nous retenons la présence de *Brettanomyces* de la matière première au produit final en passant par les structures de production.

3.2 – Isolements.

Lors de ces différentes campagnes d'échantillonnages, une centaine de souches de *Brettanomyces* ont été isolées et une cinquantaine sont conservées dans les collections du laboratoire. 35 d'entre elles ont été génétiquement identifiées comme appartenant bien à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*.

Tableau 04A-8. Résultats globaux des dépistages effectués entre 2003 et 2006.

nature de l'échantillon	nombre d'échantillons	nombre d'échantillons positifs	durée de l'enrichissement
raisin	215	51	2 mois
machine à vendanger	12	6	3 semaines
appareil et surfaces dans les chais	120	29	3 semaines
résidus dans les chais	40	23	3 semaines
vins contaminés, vieux échantillons	90	78	5 semaines
vins en cours, échantillons frais	365	95	0 jour
mouches	25	3	3 semaines
Total	867	285	

Résumé du module

Nous retiendrons donc la mise en place d'une procédure de dépistage et d'isolement basée sur des critères de sélection simples et l'utilisation de méthodes pratiques simples. Elle s'est avérée, et cela en était l'objectif, adaptée à différents types d'échantillons, représentatifs des différents environnements de l'univers œnologique.

La première étape de cette démarche, étape d'enrichissement, est désignée comme une étape clé et il est montré l'attention particulière à porter à sa durée afin de garantir l'efficacité des dépistages.

L'utilisation de cette méthode lors de différentes campagnes de dépistage a ainsi pu montrer la présence réelle du contaminant à différents niveaux avec une fréquence importante : de la matière première au produit fini, en passant par le chai lui-même et les outils qui le composent.

Enfin, les isolements ont permis la mise à disposition d'une collection de souches, exploitables par la suite lors d'études visant la compréhension du développement et des conditions favorables à ce contaminant.

MODULE B
Etudes à la vigne

1 – Avant – propos : Présence confirmée de *Brettanomyces* sur le raisin.

1.1 – Point de départ : les premières études réalisées par Œnodev …

L'équipe R&D d'Oenodev, et le Laboratoire du Génie Chimique de Toulouse (LGC), mènent depuis plusieurs années une vaste campagne de recherche de terrain et en laboratoire autour de la problématique *Brettanomyces*, de la grappe à la mise en bouteille. Des prélèvements sur pied sont alors effectués à quelques jours des vendanges en France (diverses régions) et en Amérique du Sud : ciblant des grappes présentant des grains abîmés.

Ce travail précurseur permet dès 2001 de poser des bases quant à la recherche de ce contaminant sur le raisin en mettant en place les premiers protocoles de dépistage adaptés (que nous ne détaillons pas dans ce présent document).

Des premiers résultats intéressants ont alors pu être apportés (tableau 04B-1) ; le premier et non des moindres étant la confirmation de la présence de *Brettanomyces* sur le raisin dans différents vignobles du monde, présence longtemps sujette à polémique (Larue et al., 1991 ; Wright et Parle, 1973).

Tableau 04B-1. Résultats d'études préliminaires menées par Œnodev : présence de Brettanomyces sur le raisin.

Lieu	Nombre de prélèvements	% de résultats positifs
Argentine	27	11
Uruguay	44	7
France	49	18

On note donc que *Brettanomyces* est présente sur le raisin avec une fréquence et des concentrations différentes selon les régions géographiques. En moyenne, ces levures sont détectables sur 12,5% des prélèvements de grappes abîmées effectués dans cette étude. Les cépages concernés lors de ces campagnes de dépistage sont le Merlot, le Cabernet Sauvignon, le Cabernet Franc, le Tannat, le Fer Servadou, l'Ancelota, le Zynfandel et le Malbec. Aucun autre cépage n'ayant fait l'objet de prélèvement, on peut cependant émettre l'hypothèse que toutes les variétés sont concernées et qu'il ne semble pas exister de spécificité de cépage.

Ces résultats encourageants ont motivé un approfondissement du sujet passant par l'amélioration et optimisation des protocoles (aboutissant à la méthode décrite dans le module A) et le développement des connaissances sur la présence de *Brettanomyces* dans le vignoble.

C'est dans cette optique que la cave de Buzet s'est engagée avec Œnodev dans le partenariat de recherche dont une partie des résultats se trouve dans ce présent document.

1.2 – … le point d'arrivée : Bilan général des dépistages lors des études à Buzet.

Ainsi, un travail de dépistage de population *Brettanomyces* sur des parcelles ciblées de l'appellation Buzet est effectué lors des campagnes 2004 et 2005, en suivant la démarche décrite au module A. Là encore, la présence de *Brettanomyces* sur le raisin a bel et bien été confirmée sur les trois cépages principaux de l'appellation : Merlot, Cabernet Franc et Cabernet Sauvignon.

Sur un total de 215 échantillons sur pieds, 51 sont ressortis positifs en *Brettanomyces* (soit 24 % ; proportion non négligeable).

Nous tenons à préciser somme toute que ce chiffre pouvant paraître alarmant quant à la présence effective de *Brettanomyces* sur le raisin n'est pas significatif d'une réalité générale sur le vignoble de Buzet. Il s'agit en effet de dépistages ciblés, menés dans le cas de parcelles particulières (que nous développerons par la suite) : soit reconnues par l'expérience sur le domaine comme étant touchée par la levure, ou alors conduites spécifiquement afin d'exacerber la microflore présente.

2 – Etude d'une parcelle en l'état : Parcelle X. Profil de présence de la levure.

2.1 – Présentation de l'étude et particularités de la parcelle.

Dès 2004, une étude est menée sur une parcelle de 3 hectares, nommée X, mono-cépage Cabernet Franc du vignoble de Buzet pour déterminer d'une part la présence éventuelle de la levure sur les raisins mêmes et savoir le cas étant, montrer la répartition de cette population sur la parcelle au moment de la vendange.

Cette parcelle a été ciblée car elle est associée à des lots de vins fréquemment contaminés par *Brettanomyces* lors de campagnes antérieures de vinification.

Les 75 rangs comprenant de 5 pieds pour le plus court à 240 pieds pour le plus long sont orientés Sud-Ouest / Nord-Est.

La parcelle X est caractérisée par un relief marqué (en forme de « mamelon ») comme le suggère la photographie proposée en Figure 04B-1. Elle a par ailleurs pour particularité de présenter 3 frontières de nature différente : une route de campagne, un bosquet, et une autre parcelle de vigne (Figure 04B-2).

Figure 04B-1. Parcelle X : mise en avant du relief marqué de la parcelle.

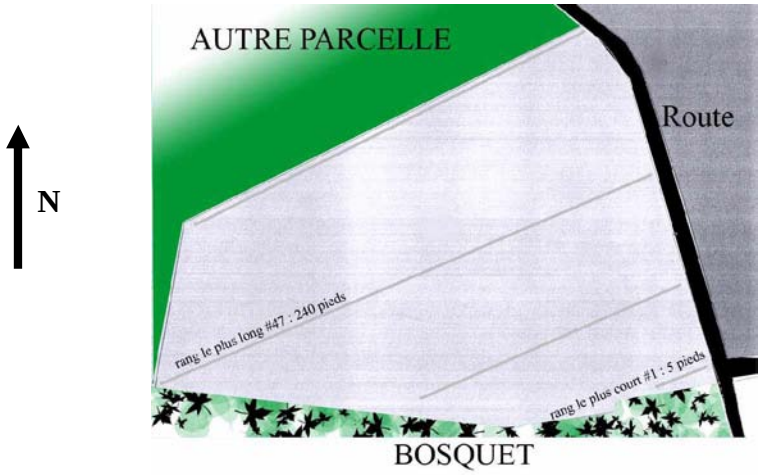


Figure 04B-2.Parcelle X : les trois frontières et topographie générale.

2.2 – Échantillonnages sur la parcelle.

Un quadrillage est effectué sur la parcelle pour répartir les prélèvements sur l'ensemble des pieds et des rangs. Les échantillonnages sont effectués suivant la procédure présentée Chapitre 03, 3.1.1.

Lors des deux années d'étude, des modifications sont apportées sur le prélèvement, par soucis d'amélioration des résultats :

- En 2004, s'agissant d'une pré-étude, le maillage de prélèvement est relativement peu serré. Une série est collectée tous les 5 rangs, avec 5 points par rang considéré (à l'exception du premier rang ou seul un point est pris) : 2 points d'extrémité, 1 central et 2 intermédiaires. Ces points sont répartis de manière la plus équidistante possible en fonction du nombre de pieds que compte le rang. 76 échantillons sont alors récoltés. Cette première année, une unique série de prélèvement est effectuée la veille de la récolte (11 Octobre 2004).

§ En 2005, dans un but de plus grande précision de l'étude, le maillage d'échantillonnage est amélioré et défini afin que les points soient le plus représentatifs de la globalité de la parcelle. Le maillage est réalisé comme suit : un point de prélèvement tous les 30-40 pieds, un rang sur 5 (à l'exclusion des 15 premiers rangs courts – coté bosquet – où le maillage a été resserré pour couvrir la zone correctement). Ainsi, au total : 110 points sont soumis au dépistage. Cette seconde année, deux séries de prélèvements sont menées : 18 jours avant vendange (12 septembre 2005) et l'avant-veille de la vendange (29 septembre).

2.3 – Résultats des dépistages *Brettanomyces*.

Rappel préalable :

Les résultats présentés donne une idée quant à la présence ou non de la levure sur les baies sans faire état de quelque niveau de population que ce soit ... la méthodologie employée ne permettant pas de quantifier la population initiale présent du fait de l'enrichissement systématique pour ce type d'échantillons.

2.3.1 – Année 2004.

Les premiers résultats obtenus lors de cette étude font état pour cette parcelle d'une présence non négligeable de *Brettanomyces* sur le raisin, à hauteur de 22 % (17 échantillons positifs sur 76 prélèvements).

Nous confortons en premier lieu (mais sans pouvoir encore la confirmer) notre hypothèse selon laquelle la présence de contamination en cave des lots associés à cette parcelle est peut être liée à la présence du contaminant dès la vendange.

La Figure 04B-3 permet de visualiser la répartition des échantillons positifs en *Brettanomyces* sur la parcelle.

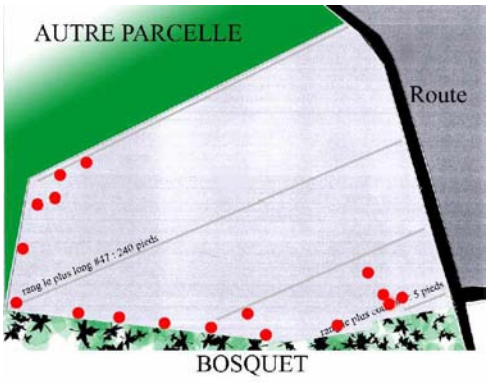


Figure 04B-3. Parcelle X en 2004, veille de vendange: présence de Brettanomyces. (points marqués : positifs)

Des zones préférentielles relativement localisées se détachent donc de ce profil de présence. La population de *Brettanomyces* apparaît donc hétérogène, laissant supposer des facteurs favorisant (ou *a contrario* défavorisant) ou du moins influant la présence au sein de la parcelle.

On retrouve ainsi 2 grandes zones de présence :

- § zone frontalière au bosquet : la présence est quasi systématique sur les points en extrémité, les plus proches du bosquet (quelques mètres).
- § zone frontalière à l'autre parcelle (qui correspond également à la partie la plus basse topographiquement de la parcelle).

En revanche, peu de *Brettanomyces* sont dépistées sur la partie centrale de la parcelle, située quant à elle en hauteur et recevant un ensoleillement relativement constant tout au long de la journée.

Ce premier travail laisse révèle donc une répartition non homogène de la population sur une parcelle donnée. Présence pouvant être influencée par des éléments environnants directs (bois, bosquet) ou par un effet de relief / topographique (zone basse, humidité, ou ombre portée... etc.).

Cependant, avant de tirer une conclusion tranchée à ce niveau, il nous est apparu impératif de confirmer ces résultats, et de les affiner au besoin, pour s'assurer que ces premières observations/conclusions proposées en 2004 ne relèvent pas de l'anecdotique ou de l'artéfact. Ce qui justifie le travail reconduit en 2005 sur cette même parcelle.

2.3.2 – Année 2005.

2.3.2.1 – Dépistage du 12 Septembre 2005 (18 jours avant vendange).

Un seul échantillon s'avère positif au dépistage (Figure 04B-4) soit une proportion de présence <1 %.

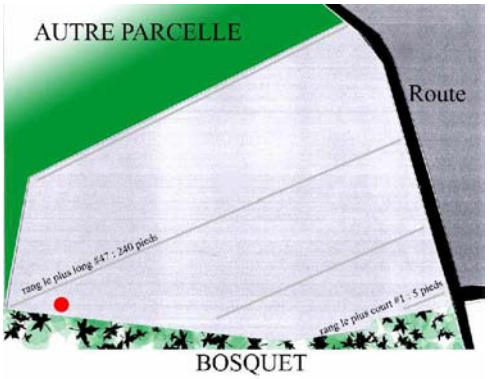


Figure 04B-4. Parcelle X en 2005,12 septembre 2005: présence de Brettanomyces. (points marqués : positifs).

2.3.2.2 – Dépistage du 29 Septembre 2005 (2 jours avant vendange).

La présence de *Brettanomyces* sur cette parcelle est de nouveau confirmée en proportion importante au moment de la veille de vendange cette année à hauteur de 11 % (12 échantillons positifs sur 110 totaux) (soit 11%), Figure 04B-5 .

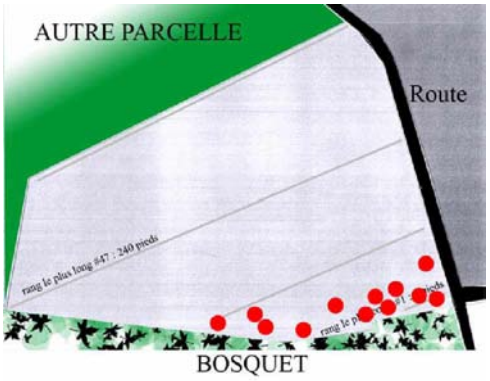


Figure 04B-5. Parcelle X en 2005, avant veille de vendange, 29 septembre 2005: présence de Brettanomyces. (points marqués : positifs)

Le premier constat est donc celui d'une nette augmentation de dépistages positifs par rapport à la première date de prélèvement. Néanmoins, le pourcentage de présence reste moindre par rapport à 2004. Nous pouvons penser que la différence est due à un effet temporel. En effet, 2005 a été une année précoce par rapport à 2004. Ainsi, la vendange a eu lieu 12 jours avant. Les baies ont donc été exposées dans une moindre mesure au climat d'automne : humidité et radoucissement des températures, si tant est que ces paramètres influent sur la présence de la levure (nous reviendrons sur ce point plus tard). De telles suppositions ne sont pas à exclure, d'autant que Deak (2006) rappelle l'influence effective des facteurs physiques et climatiques sur la présence et le développement de micro-organismes à la surface des plantes et des fruits.

Nous retenons somme toute que pour 2005, tout comme 2004, le profil de population de *Brettanomyces* est hétérogène laissant supposer de nouveau l'existence de facteurs jouant un rôle sur la présence de la levure au sein de la parcelle. La Figure 04B-6 permet clairement de visualiser une zone de présence relativement peu étendue sur la parcelle. Celle ci qui se cantonne en effet à la partie Sud-est de la parcelle, limitrophe au Bosquet. Nous pouvons même préciser que ce sont principalement les pieds en bout de rang qui portent des grappes où la levure considérée est présente.

Si l'on se réfère à l'étude menée en 2004 sur cette même parcelle (Figures 04B-4), nous constatons que cette partie de la parcelle avait déjà été identifiée comme une zone de présence de *Brettanomyces*. C'est d'ailleurs la seule zone déjà identifiée en 2004 que nous retrouvons deux années de suite, montrant donc une présence favorisée dans cette partie de la parcelle. Nous ne retrouvons pas

les autres zones de présence mises en avant en 2004 (frontières Ouest avec l'autre parcelle et Sud Ouest avec le bosquet en zone basse de parcelle), sans pouvoir avancer d'explication.

De plus, en proportion (même si l'échantillonnage total sur les deux années n'a pas été le même), il semble qu'il y ait eu moins de *Brettanomyces* sur cette parcelle en 2005 qu'en 2004. (Une proportion divisée par deux). Nous n'avons malheureusement d'autre explication à avancer que la simple hypothèse de contingence : travaillant dans des conditions extérieures, de nombreux facteurs totalement aléatoires peuvent intervenir, notre étude se faisant sans interventation ni maitrise de ces paramètres.

2.4 – Observations et études complémentaires.

En plus du dépistage à proprement parler de *Brettanomyces*, nous menons en 2005 un ensemble d'observations de terrain et études complémentaires sur la parcelle, en nous efforçant de mettre en valeur les liens éventuels avec la présence hétérogène de la levure contaminante.

2.4.1 – Zones d'ombre.

2.4.1.1 – Observation, caractérisation.

La conjonction relief / orientation / présence du bosquet est l'origine sur cette parcelle d'une zone ombragée qui connaît une exposition au soleil moindre par rapport au reste de la parcelle. Cette zone est alors caractérisée par une humidité matinale qui demeure significative jusqu'à des heures avancées (11h00 voire 12h00 à la fin du mois de septembre) contrairement au reste de la parcelle rapidement séchée par le soleil. Les photographies présentées sur la figure 04B-6 ont été prises à 11h00 le 29 septembre 2005.

Cette première zone comprend les 5 premiers rangs en entier, et les 20 suivants environ en bout de rang. Dans une moindre mesure sur les 10-15 bouts de rangs suivants il existe également un ombre portée mais qui est de plus courte durée.

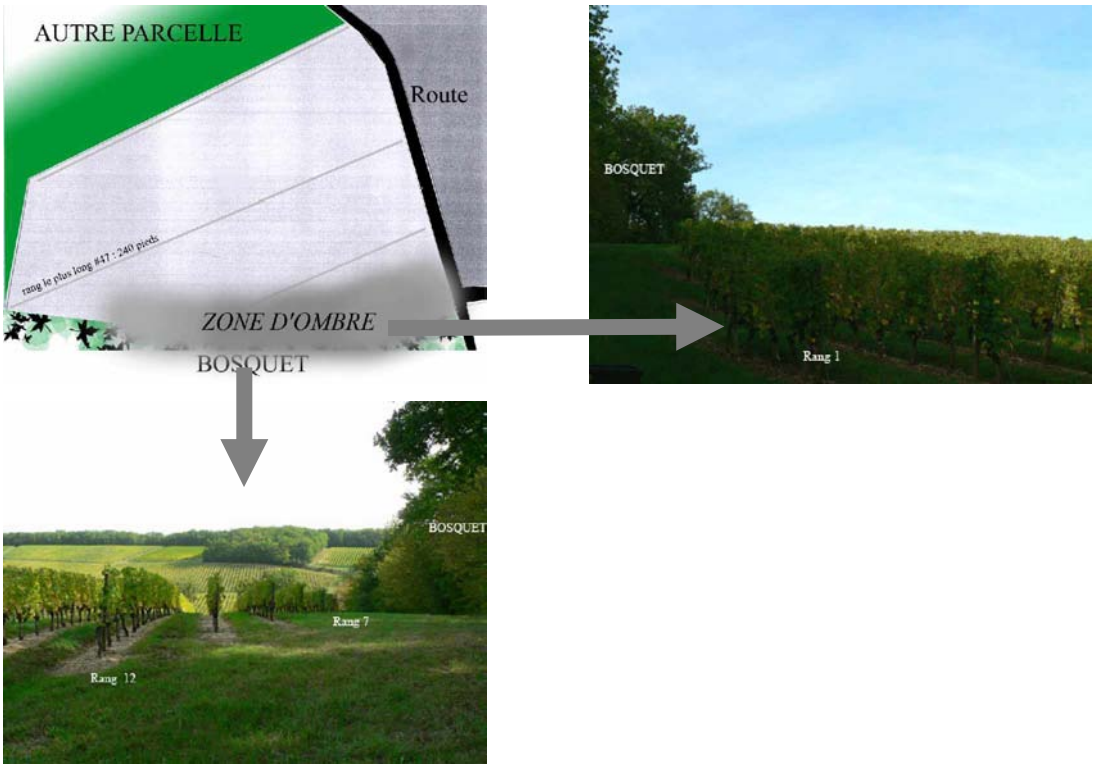


Figure 04B-6. Parcelle X. Présence d'une zone d'ombre matinale.

Ce phénomène d'inégalité quant à l'exposition au soleil est d'autant plus prononcé que ce dernier est rasant, soit en automne.

On peut imaginer assez facilement que des épisodes d'ombres aussi marqués s'accompagnent de micro-climat humide et plus frais autour des ceps et des grappes particulièrement, du fait par exemple d'une évaporation tardive de la rosée et/ou de l'humidité consécutive aux pluies/bruines matinales. C'est d'ailleurs ce que notre observation nous confirme. En effet, en cas de jour ensoleillé dès le petit matin, alors que la parcelle est dans sa globalité généralement « séchée » de sa rosée vers 9h00-10h00, … il faut attendre 12h00 voire 13h00 pour les zones à l'ombre. Les grappes y sont alors humides en surface et entre les grains toute la matinée. De plus du fait de l'ombre portée sur les pieds, on y note également une différence de température pouvant aller jusqu'à 8° C (Tableau 04B-2) en cours de matinée entre la zone ombragée et la zone *dégagée/toujours éclairée*.

Ainsi, on se retrouve avec une parcelle qui présente des caractéristiques environnementales différentes.

Tableau 04B-2. Température et hygrométrie au niveau des grappes, 27 septembre 2005, 11h00 : comparatif ente zone ombragée et zone éclairée.

pieds à l'ombre		
	Température (°C)	% humidité
1	18,1	61
2	19	57
3	18,4	52
4	17,9	65
5	17,9	64
6	18,6	53
7	19,1	52
8	18,8	55
9	18,1	62
10	19,1	54
11	17,6	67
12	19,1	55
moyenne	18,5	58,1
écart type	0,5	5,4

pieds au soleil		
	Température (°C)	% humidité
1	24	50
2	24,8	51
3	26	47
4	26,1	53
5	25,9	52
6	25,1	53
7	24,9	52
8	25,3	50
9	25,7	50
10	24,9	53
11	25	53
12	26,1	48
moyenne	25,3	51,0
écart type	0,7	2,0

Remarques.

Le principe de cette mesure est précisée ultérieurement,3.1.2.2.d

Malgré ce phénomène de micro-climat humide, on ne relève pas sur cette parcelle la présence de pourriture grise (de surface).

2.4.1.2 – Lien avec *Brettanomyces* ?

Nous portons alors notre attention au fait que la zone d'ombre très marquée se superpose relativement bien avec la zone de présence de *Brettanomyces* que nous avons mis en avant pour 2004 et 2005. Une telle observation est novatrice mais nécessite un recul plus important sur plusieurs années avant de porter une conclusion véritablement affirmée. Nous retenons donc la concordance entre les profils de présence de la levure et l'existence au sein de la parcelle de zones marquées d'un point de vue environnemental/microclimatique. On peut supposer qu'à ce stade du travail, que phénomène d'ombre engendre une présence, ou tout du moins favorise, de *Brettanomyces* sur les baies (probabilité de présence plus importante), par la formation d'un microclimat plus humide et plus frais (proche de 20 °C) le matin suivi d'une augmentation des températures en journée avec un ensoleillement plus important dans l'après midi.

Par ailleurs, la présence d'une zone fraîche et humide, proche du bosquet peut constituer une niche macro-écologique favorable à la présence de vecteurs tels que les insectes (mouches, guêpes, abeilles … Shehata et Mark, 1951). Nous n'en restons qu'au stade de supposition et n'avons pas mené d'études spécifiques pour contrôler l'hypothèse des insectes vecteurs (campagne de capture par exemple). Seule une observation quant à la présence plus marquée (mais non quantifiée) de ces insectes dans la région ombragée nous conforte dans cette piste à explorer.

2.4.2 – Présence de baies abîmées.

2.4.2.1 – Observation.

Bien que cette parcelle soit une parcelle extrêmement bien travaillée et bien entretenue, nous notons cependant la présence de quelques grappes abîmées.

Les pieds touchés sont systématiquement à la frontière du bosquet (parmi les 4-5 derniers pieds des rangs 1 à 20 environ). On retrouve très ponctuellement quelques grappes abîmées sur le reste de la parcelle, mais toujours placées en début ou fin de rang (Figure 04B-7).

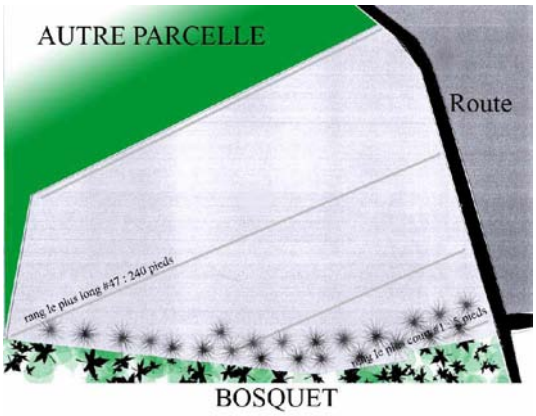


Figure 04B-7. Localisation des baies abîmées sur la parcelle X, septembre 2005.

Comme le montre la photographie qui suit (Figure 04B-8), ces grappes semblent avoir été abîmées par des oiseaux : quelques baies picorées et percées par grappe, laissant plus ou moins s'écouler l'intérieur des baies et attirant par la même des insectes divers.

Figure 04B-8. Parcelle X, 2005, baies abîmées.

Nous décidons donc de voir si ces baies abîmées ont un lien avec ou une influence sur la présence ou non de *Brettanomyces.*

2.4.2.2 – Présence de *Brettanomyces*.

Pour ce faire, nous procédons à une autre série de prélèvements le 29 Septembre 2005.

10 points de prélèvements sont choisis parmi les pieds présentant des grappes abîmées (positionnées donc les 5 derniers pieds des 20 premiers rangs). Sur chaque point une grappe clairement abîmée est prélevée (simple appréciation visuelle) ainsi qu'une grappe « parfaitement intacte » en comparaison.

Les échantillons suivent le protocole de dépistage de *Brettanomyces* sur le raisin, dont nous présentons le résultat dans le tableau 04B-3.

Tableau 04B-3. Parcelle X, 29 septembre 2005. Comparaison entre grappes abîmée et saine lors du dépistage de Brettanomyces.

	grappe		
échantillon	saine	abîmée	rang
1	-	+	3
2	-	+	4
3	+	+	8
4	-	+	9
5	+	+	10
6	-	+	12
7	+	+	13
8	+	+	16
9	-	+	18
10	-	+	20
total	4	10	

Il apparaît clairement une différence entre les grappes saines et abîmées. Ainsi, 100 % des grappes abîmées sont colonisées par *Brettanomyces* contre « seulement » 40 % pour les grappes saines.

Le fait de ne pas avoir 0 % de présence pour les grappes saines nous amène à dire que le caractère « grappe abîmée » n'est pas une condition utile et nécessaire à la présence de *Brettanomyces*, mais uniquement une condition très favorable, voire un critère aggravant.

Remarque :

Attention, nous rappelons que ce sont des grappes saines prises en fin des rangs 1 à 20. Ces derniers appartenant à la zone de présence mise en valeur, le chiffre de 40 % n'est valable que pour cette zone, désormais montrée comme zone de présence préférentielle, et en aucun cas représentatif de l'ensemble des grappes saines de toute la parcelle.

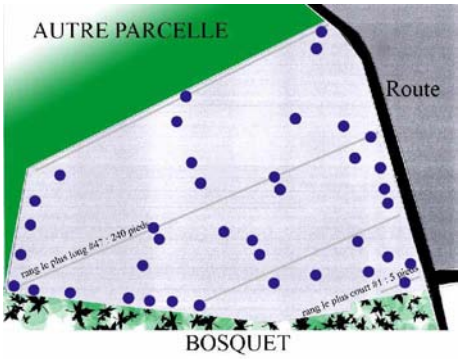
Ce résultat est particulièrement intéressant à prendre en compte lors de la vendange. On ne peut alors que conseiller une attention toute particulière à écarter les grappes abîmées de la récolte, ne serait ce que par quelques grains uniquement. Non seulement il s'agit d'une préconisation de bon sens pour assurer une vendange de qualité, mais bien plus encore, il s'agit d'une possibilité éventuelle de réduire l'apport de la levure de contamination au sein de la cave. Cette attention peut être d'autant plus concrète et respectée dans la pratique que ces grappes ne concernent qu'une toute petite partie de la parcelle qui est vendangée entièrement manuellement.

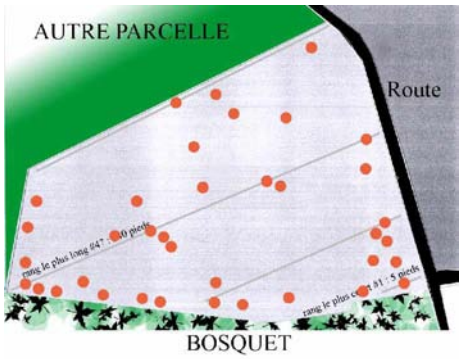
2.4.3 – Microflore « annexe ».

En plus de la recherche ciblée *Brettanomyces* que nous avons présentée, nous faisons également un relevé microbiologique un peu plus large en nous intéressant notamment aux bactéries acétiques et aux champignons filamenteux (*Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.*). Ainsi, sur les 110 points initialement mis en place pour la recherche de *Brettanomyces*, 55 sont échantillonnées pour ce travail supplémentaire. (Concrètement : un point marqué sur deux sur la grille de prélèvement).

2.4.3.1 – Champignons filamenteux.

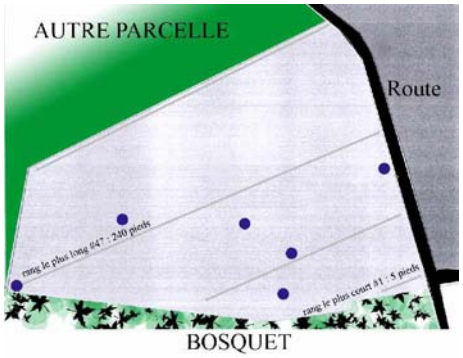
On relève la présence sur la parcelle de *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.* répartis comme indiqué figure 04B-9 pour le 12 septembre et figure 04B-10 pour le 29 septembre.

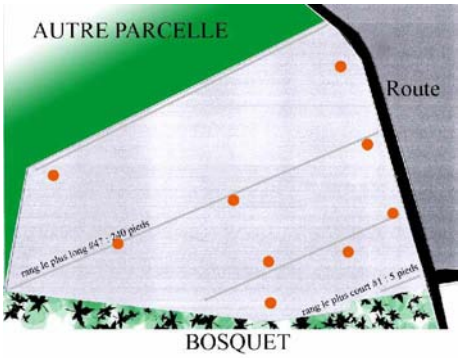




Penicillium (points marqués : positifs) *Aspergillus (points marqués : positifs)*

Figures 04B-9. Parcelle X, 12 septembre 2005. Profil de présence de Penicillium et d'Aspergillus.





Penicillium (points marqués : positifs) *Aspergillus (points marqués : positifs)*

Figures 04B-10. Parcelle X, 29 septembre 2005. Profil de présence de Penicillium et d'Aspergillus

Penicillium sp. et *Aspergillus sp.* sont présents de manière relativement homogène (et aléatoire) sur la parcelle lors des deux séries de prélèvements. Si l'on superpose ces profils à ceux de présence de *Brettanomyces* aux dates correspondantes *(Figures 04B-5 et 04B-6)*, on peut conclure qu'il n'y a priori pas de relation, pour ce lot d'échantillons entre la présence de *Penicillia/Aspergillii* et celle de la levure *Brettanomyces.*

Cette observation rejoint ce qui avait été observé en 2004. (Résultats non présentés ici).

Nous pouvons cependant faire remarquer, en comparant les résultats obtenus pour les deux dates de dates les populations en *Aspergillus* et *Penicillium* ont significativement évolué au cours du temps. En effet, alors que nous avons 41 échantillons positifs sur 55 en *Penicillium* le 12/09/05, nous n'en retrouvons que 6/55, 17 jours après. Cette même tendance s'observe avec Aspergillus sp., passant de 43 positifs sur 55 échantillons à 9/55.

Remarques :

§ *Par étalement de 100 µL de jus de raisin écrasé et homogénéisé, sur milieu simple (à base de glucose, saccharose, fructose, extrait de levure, chloramphénicol et agar) et appréciation des myco-morphologies nous relevons également la présence aux deux dates*

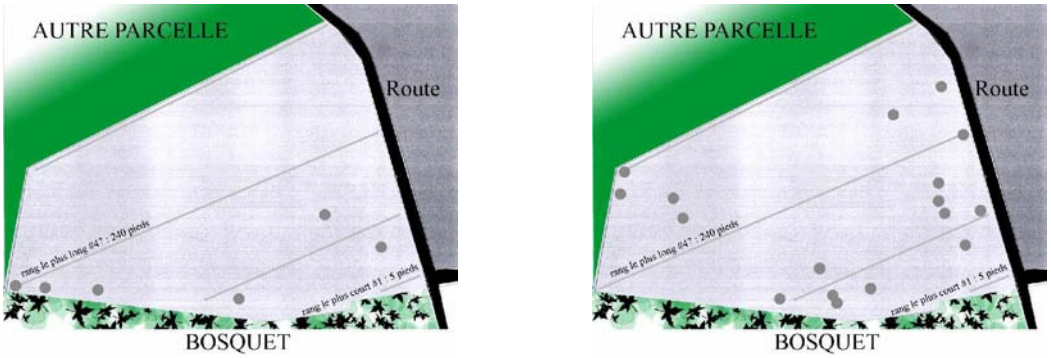
d'échantillonnage sur la parcelle de champignon du genre Cladosporium, mais là encore, aucun lien ne semble se dégager entre les profils respectifs de présence entre ce champignon et Brettanomyces.

§ *En employant ce même milieu, nous ne relevons pas de Botrytis sur la parcelle le 12 septembre 2005. Ce qui conforte l'observation faite sur le terrain, d'absence totale de baies pourries. En revanche, alors que l'observation sur terrain n'a permis de constater aucun développement de Botrytis, nous obtenons avec le dépistage sur boites, 6 points positifs sur 55 échantillons pour la série du 29 septembre. Nous pouvons supposer qu'il s'agit soit de spores de Botrytis qui ne se sont pas développées sur les raisins en raison de conditions environnementales défavorables, soit de Botrytis qui s'est développé non pas sous sa forme extérieure, mais uniquement à l'intérieur des baies. Nous précisons par ailleurs, sans en faire apparaître les données associées que la répartition des points positifs en Botrytis ne semblait pas liée à ceux de Brettanomyces.*

2.4.3.2 – Bactéries acétiques.

55 échantillons parmi les 110 des deux séries de prélèvements de 2005 sont soumis à un dépistage type : bactéries acétiques. (Sans précision du genre ni de l'espèces)

La figure 04B-11 illustre les profils de présence obtenus respectivement pour le 12 et le 29 Septembre 2005.



12 Septembre 2006 *29 Septembre 2006*

Figures 04B-11. Parcelle X, Profil de présence de bactéries acétiques. (points marqués : positifs).

Nous ne notons aucun lien pour ces deux lots d'échantillons entre la présence *Brettanomyces* (figure 04B-5 et 04B-6) et celle de bactéries acétiques.

2.4.3 - Vendange et vinification de la parcelle X, en 2005.

La parcelle X a été récoltée manuellement les 01 et 02 Octobre 2005, en veillant à écarter les baies repérées comme abîmées. La vendange, sulfitée au quai à hauteur de 8 g/hL a alors été encuvée dans une cuve inox, sur le site d'Espiens.

La cuvée a été exclusivement réalisée à partir de cette parcelle, ce qui a permis un suivi isolé et identifié du lot associé.

Des prélèvements en cours de vinification ont été réalisés et des dépistages de *Brettanomyces* menés à plusieurs reprises. Ainsi 7 mois de suivi ont été entrepris : dépistage par étalement direct sur milieu sélectif pour un résultat « instantané » et quantitatif mais également avec enrichissement pour une recherche plus qualitative.

Seul 1 échantillon positif a été détecté après enrichissement : il correspond au moût prélevé le jour de l'encuvage. Pour l'ensemble des autres échantillons prélevés pendant la fermentation alcoolique, l'écoulage post FA, la fermentation malo-lactique et le début d'élevage en cuve, le dépistage de *Brettanomyces* n'a donné aucun échantillon positif.

Ainsi, même si la vendange a été susceptible d'apporter des levures, comme le suggère le dépistage positif le jour de l'encuvage (probablement en très faible quantité), il n'y a pas eu un développement systématique du contaminant en cuve. (Inoculum très/trop faible, sulfitage suffisant, conduite de fermentation défavorable au développement du contaminant …).

3 – Parcelles expérimentales : étude de paramètres à la vigne sur la présence de *Brettanomyces* sur le raisin.

3.1 – Pré-étude de 2004.

3.1.1 – Présentation de l'expérimentation.

Sur le domaine de Gueuze, vignoble de Buzet, plusieurs rangs ont été réservés pour une expérience de terrain en 2004. L'axe de cette expérience a été l'influence de conditions et de paramètres environnementaux à la vigne sur le développement éventuel de la levure *Brettanomyces* sur le raisin. Trois paramètres ont alors été choisis :

§ Le *cépage* : Merlot, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, aux récoltes décalées les unes par rapport aux autres, respectivement notés dans la suite : « condition **M**, **CF**, **CS** ».

§ L'*humidité à la vigne*. Par rapport à la condition d'humidité naturelle (imposée par la météo), désignée « condition Hnat » on tente de provoquer une humidité forcée plus importante par arrosage artificiel, désignée « condition **H(+)** ».

§ L'emploi de *traitement antiBotrytis.* Par rapport à la tactique mis en place par défaut pour le traitement de la vigne, « condition **antiB(tém)** »sur les parcelles utilisées on effectue un traitement anti-botrytis supplémentaire, nommé « condition **antiB(+)** ».

On se retrouve alors avec 12 combinaisons de modalités présentées dans le tableau 04B-4.

Tableau 04B-4 Modalités expérimentales lors de la pré-études2004, Gueyze.

cépage	M				CF				CS			
humidité	H(+)		Hnat		H(+)		Hnat		H(+)		Hnat	
traitement	antiB (+)	antiB (tém)	antiB (+)	antiB (tém)	antiB (+)	antiB (tém)	antiB (+)	antiB (tém)	antiB (+)	antiB (tém)	antiB (+)	antiB (tém)

3.1.2 – Réalisations pratiques des rangs expérimentaux.

Chaque modalité est représentée par deux rangs (le nombre de pieds par rang étant variable en fonction de la géométrie de la parcelle concernée). On sépare les rangs expérimentaux par des rangs « tampons » ne subissant aucun traitement particulier.

Pour des raisons pratiques et topographiques (l'étendue du domaine, pentes des terrains, etc…) nous n'avons pu mettre en place de système particulier pour la réalisation des conditions H(+) sur ce domaine. A défaut nous réalisons cette condition par un arrosage « manuel », à l'aide de pulvérisateurs à dos (de ce fait, l'arrosage supplémentaire est non quantifiable réellement) : arrosage réalisé de sorte à ce que les grappes soient entièrement mouillées. De plus du fait d'un emploi du temps chargé l'arrosage amplifié s'est fait au mieux des disponibilités du personnel sur le terrain, soit deux ou trois fois pendant la vingtaine de jours précédant la récolte.

La tactique par défaut du traitement anti-botrytis sur le domaine a consisté en une pulvérisation de *Sumisclex® liquide* (1,5 L/ha) après fermeture des grappes (calendrier précisé par le responsable du domaine dont nous ne donnons pas ici le détail).

Nous précisons en revanche la réalisation de la condition antiB(+) :

§ pulvérisation de *Sumisclex® liquide* (500 g/L de procymidone, fongicide de type préventif et curatif par contact, très actif sur les champignons des genres *Botrytis cinerea*, et *Sclerotinia* par inhibition de la germination des spores et de l'élongation des hyphes mycéliens), à raison de 1,5 L/ha (les indications fournisseurs quant à la dilution à employer ont été de 150 ml/hL).

Le tableau 04B-5 récapitule les dates de réalisation des différentes modalitése et de récolte.

Tableau 04B-5. Calendrier des récoltes et des modalités.

cépage	M			CF			CS		
récolte	30-sept 2004			07-oct 2004			20-oct 2004		
Arrosage H(+)	20-sept	24-sept	x	20-sept	24-sept	01-oct	20-sept	24-sept	01-oct
traitement antiB(+)	20-sept 2004			24-sept 2004			01-oct 2004		

Nous relèvons la pluviométrie sur le site: 13 septembre : 10mm, 15 septembre : 3 mm, 25 septembre : 6 mm

Nous faisons remarquer par ailleurs que les semaines allant du 11 octobre 2004 au 24 octobre 2004 ont été marquées par une humidité « importante » sous forme, non pas de pluie franche, mais de brouillard et de légère bruine matinale. Nous ne disposons pas de relevé permettant d'appuyer cette observation, autre que l'appréciation sur place.

Pour chaque parcelle (correspondant à 1 cépage donné) réservée à cet essai on retrouve le schéma de la figure 04B-12 suivant pour la disposition des rangs expérimentaux (par souci de simplicité, on représente ici une parcelle par un rectangle, ce qui dans la réalité n'est pas toujours le cas).

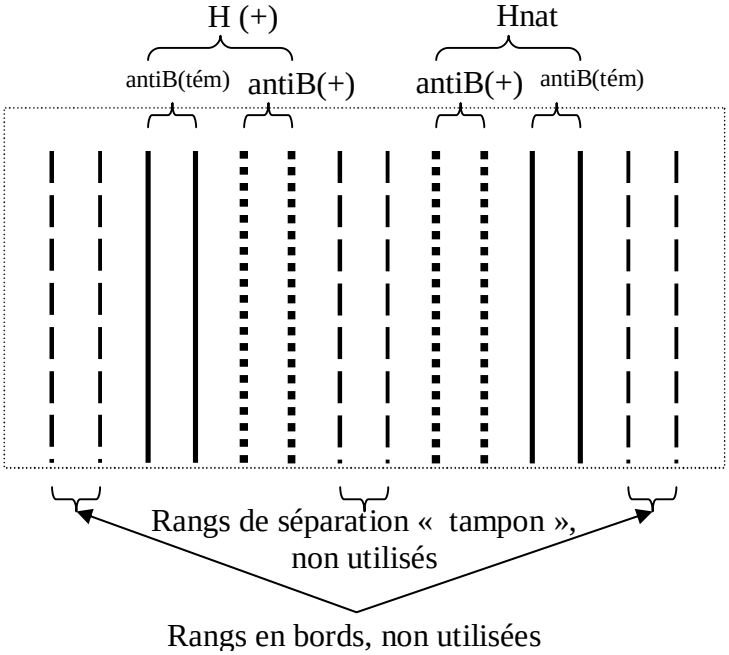


Figure 04B-12. Organisation type des rangs expérimentaux, 2004.

3.1.3 – Echantillonnages.

Les prélèvements de raisins sur ces rangs sont effectués 1 jour ou deux avant la récolte. On récupère 5 points par combinaison testée. La figure 04B-13 donne une vision de la disposition des échantillons, sachant que dans la pratique on adapte la position des points en fonction du nombre de pieds par rang.

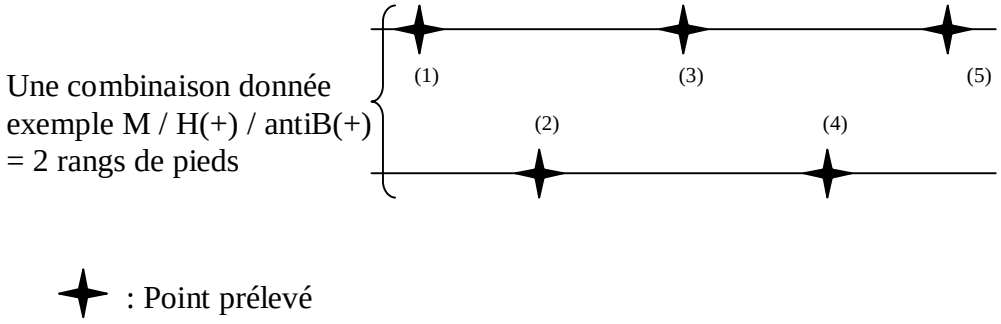


Figure 04B-13. Répartition des points d'échantillonnage sur les rangs expérimentaux lors de la recherche de Brettanomyces.

Dans la procédure de dépistage, après foulage du raisin dans les poches, les 5 échantillons d'une modalité testée donnée sont rassemblés en un unique échantillon représentatif de la combinaison concernée.

3.1.4 - Echantillons supplémentaires.

En plus des parcelles réservées pour les rangs expérimentaux, et initialement prévues pour notre étude, nous avons eu la possibilité de prélever ponctuellement des échantillons sur deux autres domaines/sites du vignoble.

3.1.4.1 – Série P.

Sur une parcelle « P » de Cabernet franc (Château de Piis) : deux rangs n'ont pas été traités contre le *Botrytis* en comparaison au traitement par défaut sur le reste de la parcelle. Malgré cela, nous ne constatons pas de développement de pourriture grise. Cet état sanitaire très bon est probablement dû à une météo relativement sèche jusqu'au moment de la récolte (10 octobre 2004) et peu propice au développement du *Botrytis.*

Deux modalités sont donc comparées sur la série P dans ce cas :

- PantiBot(-) (pas de traitement)

§ PantiBot(tém) (traitement classique par défaut sur le domaine)

3.1.4.2 – Série G.

Quelques parcelles « G » de Cabernet Sauvignon (château de Guillambois) ont fait partie des rares parcelles du domaine de Buzet où de la pourriture grise s'est développée en 2004 malgré les traitements (attaque constatée après une chute de grêle juste avant la deuxième semaine d'octobre). Nous profitons alors de cette opportunité pour voir si le développement de *Brettanomyces* sur le raisin est éventuellement lié à celui de la pourriture grise. Ainsi, nous comparons deux modalités à partir des échantillons récupérées sur cette série γ :

§ GBot(+) pour le raisin botrytisé,

§ GBot(-) pour raisin sain.

Les échantillons GBot(+) et GBot(-) portant un indicatif numérique identique sont prélevés sur un même pied ou grappes pourrie et saine sont présente.

3.1.5 – Résultats.

Le tableau 04B-6 compile les résultats des dépistages type *Brettanomyces.*

Tableau 04B-6. Dépistages de Brettanomyces sur raisin, pré étude 2004.

	brett (+)	brett (-)
M H(+) antiB(+)		x
M H(+) antiB(tém)		x
M Hnat antiB(+)		x
M Hnat antiB(tém)	**x**	
CF H(+) antiB(+)		x
CF H(+) antiB(tém)		x
CF Hnat antiB(+)		x
CF Hnat antiB(tém)		x
CS H(+) antiB(+)	**x**	
CS H(+) antiB(tém)	**x**	
CS Hnat antiB(+)		x
CS Hnat antiB(tém)	**x**	
PantiB(-)		x
PantiB(tém)		x
GBot(+) [1]	**x**	
GBot(+) [2]	**x**	
GBot(+) [3]	**x**	
GBot(-) [1]	**x**	
GBot(-) [2]		x
GBot(-) [3]		x

Cette première étude nous confirme dès 2004 qu'il est effectivement possible de retrouver sur le vignoble de Buzet des *Brettanomyces* directement sur le raisin.

Aucun résultat significatif ne ressort néanmoins à propos de l'effet de l'humidité sur la présence du contaminant.

La probabilité de présence de *Brettanomyces* est semble-t'il accrue lorsque le raisin est botrytisé, c'est en tout cas la conclusion tirée à partir des échantillons de la série « G ». (nous reviendrons sur ce point (3.2.3.2.d)

Nous ne notons pas sur ces rangs expérimentaux d'effet réel du traitement antiBotrytis supplémentaire sur le développement ou non développement éventuel de *Brettanomyces* sur le raisin.

Nous constatons par ailleurs assez nettement qu'une grande proportion des échantillons positifs est issue de la parcelle de Cabernet Sauvignon. Peut on pour autant en conclure qu'il y a un effet cépage dans le développement de *Brettanomyces* ? Ou alors, est-ce dû au fait que ce cépage est tardif et qu'il ait été exposé à des conditions favorables au développement (brouillard et bruine matinaux quasi quotidiens pendant les 10 jours précédents la récolte au mois d'octobre : effet humidité lié à la date de récolte). Nous n'avons malheureusement pas les éléments de réponse à ce constat.

Sur la parcelle de Cabernet Franc utilisée pour cette expérience, nous ne relevons aucun point positif. Il ne faut pas y voir la non plus un effet cépage, laissant supposer par exemple une absence de la levure. Un simple exemple suffit pour se convaincre du contraire, le cas de la parcelle étudiée en l'état, parcelle X, évoqué au paragraphe 2 de ce présent module. La présence de *Brettanomyces* sur un vignoble semble donc aléatoire et variable d'une parcelle à l'autre, d'un même cépage, à état sanitaire comparable, relativement peu éloignées l'une de l'autre, récoltées à quelque jours d'intervalle seulement.

3.1.6 – Auto-critiques sur la pré-étude.

Cette étude ne permet pas au final de tirer de véritables conclusions quant à l'influence de certains paramètres sur la présence, désormais fait admis, de *Brettanomyces* sur le raisin.
Mais nous sommes en droit de nousinterroger sur les modalités que avons considérées lors de cette pré étude :

- La différence entre nos conditions dites humides et sèches est-elle significative ou trop peu marquée pour voir apparaître une population de *Brettanomyces* différente. Nous optons pour la deuxième solution. En effet, il semble que le simple arrosage par vaporisation manuelle ne soit pas suffisant pour créer une condition forcée marquée par rapport à l'humidité naturelle à cette période de travail.
- L'échantillonnage réalisé est par ailleurs probablement trop restreint par rapport à l'ensemble de la parcelle et des conditions développées.

§ Enfin, l'influence du cépage n'a ici pas de poids réel, car bien trop limitée. Une étude statistique étendue à l'ensemble du vignoble aurait été préférable, mais non réalisable à ce moment et avec nos moyens techniques.

3.2 – Etude 2005. Parcelle pilote.

La campagne 2005 a été l'occasion de mener une étude plus contrôlée et maîtrisée de l'influence de conditions à la vigne sur la présence du contaminant, en nous servant des critiques tirées de l'étude 2004. L'accent a alors été mis sur l'influence de l'humidité et du traitement antiBotrytis. Lors de cette nouvelle campagne, une véritable parcelle pilote équipée d'un montage d'arrosage (initialement un système antigivre) a pu être mise en place grâce au concours matériel, technique et humain du propriétaire du Domaine de Tauzia.

3.2.1 – Modalités et réalisations pratiques.

3.2.1.1 – La parcelle

L'expérience est menée sur une parcelle de Merlot, de 40 rangs d'environ 100 pieds par rang. La parcelle est plane et d'exposition homogène. Les rangs sont orientés nord nord-ouest / nord nord-est. Nous ne savons pas a priori si les vendanges de cette parcelle ont connu des épisodes de contamination par Brettanomyces en cuves. Nous mobilisons le quart de la parcelle. Cette partie qui sert à notre expérimentation n'est pas vendangée, du fait d'arrosages et autres modifications menées sur les rangs. En revanche les 3 quarts restant de la parcelle sont vendangés et encuvés à la cave de Buzet (Figure 04B-14)

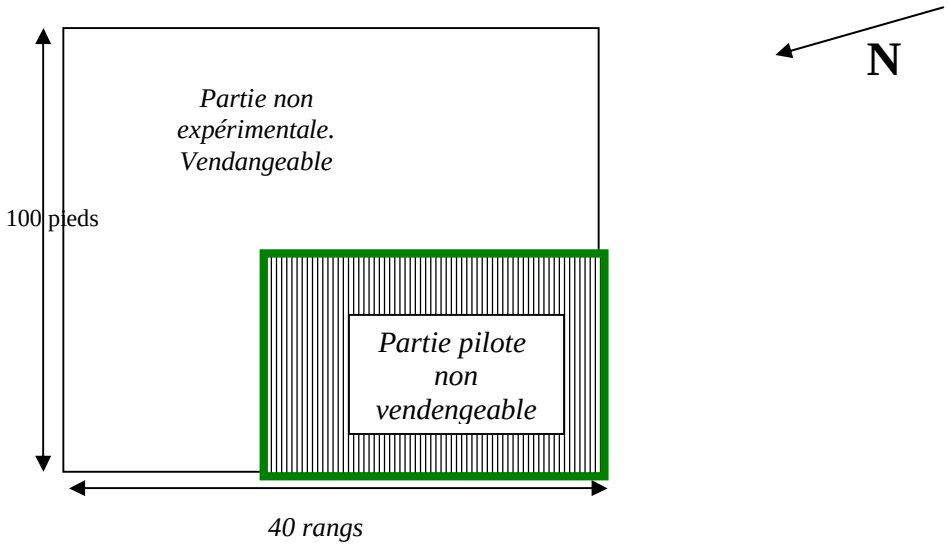


Figure 04B-14. Utilisation de la Parcelle de Merlot pour mise en place d'une parcelle Pilote.

En réalité, la parcelle est légèrement trapézoïdale, mais cela n'a pas d'influence sur notre travail et les schémas que nous utilisons comme support de nos explications.

3.2.1.2 – Les arrosages.

Nous précisons que les arrosages se font en plus de la pluviométrie … il s'agit donc d'arrosage forcé par rapport au naturel, pris comme référence pour notre expérimentation.

a – Mise en place.

Les arrosages forcés sont réalisés à l'aide de sprinklers d'aspersion tournant sur des cannes de 2 mètres. Sur une même ligne d'arrivée d'eau, les cannes sont espacées de 12 à 15 mètres. La photographie présentée sur la figure 04B-15 permet de visualiser le montage.

Les sprinklers ayant un rayon d'arrosage de 5-6 mètres, une ligne d'arrivée d'eau effectue un arrosage que l'on considère homogène sur 3 rangs de part et d'autre de la ligne.

Sur un rang donné, l'arrosage réalisé par un sprinkler est identique sur environ 13 pieds. (Figure 04B-16)

Figure 04B-15 : Ligne d'arrosage mise en place sur la parcelle pilote.

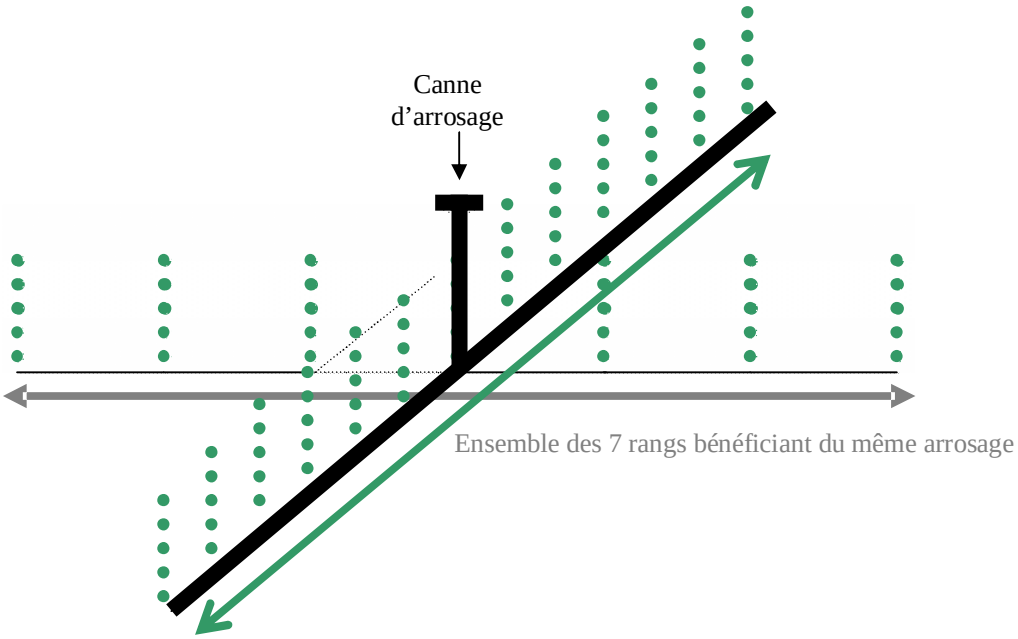


Figure 04B-16 : Champ d'action d'un élément d'arrosage {canne + sprinkler}.

L'eau utilisée pour les arrosages est puisée dans une réserve (d'eau de pluie), qui n'a subi aucun traitement particulier.

Le choix des buses et la gestion des débits nous permettent de mettre en place deux niveaux d'arrosage :

- **30 mm/h**
- **4 mm/h**

Nous nommons respectivement ces modalités : **[30]** et **[4].** La modalité naturelle, correspondant aux précipitations, sert de référence et est nommée **[nat]**.

Des pluviomètres permettent de faire les relevés de précipitations et de contrôler les arrosages réalisés.

b – Programme d'arrosage.

Les arrosages ne sont pas réalisés en continu, mais suivant un protocole et une fréquence précise :

- Trois arrosages par jour : 1 heure en début de matinée (de 8h00 à 9h00), 1 heure à mi journée (de 12h00 à 13h00) et 1 heure en début de soirée (de 18h00 à 19h00).
- Deux fois par semaine, espacés de 3 ou 4 jours. (Soit par exemple : lundi/jeudi puis de nouveau la semaine suivante le lundi/jeudi …)

La campagne d'arrosage débute le 12 Septembre 2005. La récolte ayant eu lieu le 29 Septembre 2005, … nous avons des arrosages séquencés sur pratiquement 3 semaines.

Avec cette procédure d'arrosage, nous créons des humidités forcées de 24 mm/semaine (pour la ligne à 4 mm/h) et de 180 mm/semaine (pour la ligne à 30 mm/h) par semaine. Ce sont donc des niveaux d'humidité très différents. A Buzet, pour une « année humide », il est fréquent de rencontrer des relevés de 30-35mm / semaine. Dans ce cas, notre modalité [4] est très proche de cette réalité, en supposant que nous nous plaçons (mais cela est soumis aux aléas climatiques que nous ne contrôlons past au début de l'expérimentation) dans une année « normale ». La modalité [30] quant à elle est fortement exagérée même dans le cas d'une année très pluvieuse, mais nous nous y tenons, afin de grossir le phénomène humide.

Après coup, nous avons la chance de pouvoir confirmer que l'année a été effectivement normale d'un point de vue météorologie. En effet, la pluviométrie naturelle totale de la Mi-Août à la vendange (29 Septembre 2005) a été de 81 mm sur tout le domaine.

c – Le Bâchage.

Nous décidons par ailleurs de mettre en place une modalité « sèche », en ce sens où nous voulons protéger complètement des pieds des précipitations. Pour ce faire, nous installons des bâches en plastique transparent sur des rangs. Les bâches sont installées de sorte à complètement recouvrir les ceps, mais également le sol sur au moins 1 mètre par rapport à la base des plans. La configuration en tunnel (Figure 04B-17) nous paraît la plus adaptée et pratique à mettre en place. Disposant d'une surface de bâche limitée, nous ne pouvons pas bâcher des demis rangs, de 50 mètres, mais uniquement des quarts de rang, d'une vingtaine de pieds environ.

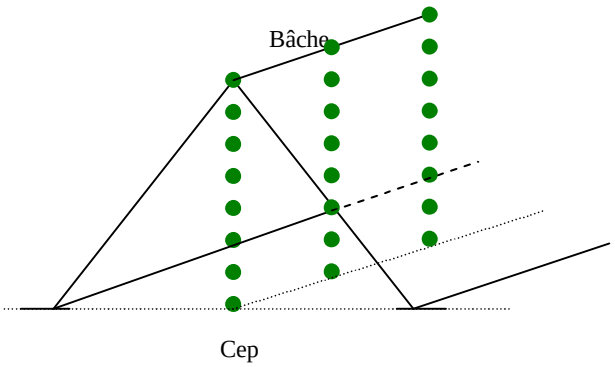


Figure 04B-17. Schéma du bâchage de rang.

Du fait de l'évapotranspiration, il règne sous les bâches une atmosphère assez chaude et humide. Mais cette eau se condense assez rapidement sur la face intérieure des bâches et est

éliminée par ruissellement (Figure 04B-18). De fait, les grappes restent parfaitement sèches, ce qui pour nous est le plus important dans cette manip.

Figure 04B-18. Condensation sous les bâches.

Nous avons donc au final 4 niveaux d'humidité différents sur cette parcelle pilote, que nous rappelons grâce aux photographies présentées sur la figure 04B-19.

Modalité : humidité naturelle [nat]

Modalité : humidité forcée forte [30]

Modalité : humidité forcée moyenne [4]

Modalité : humidité contrôlée [bach]

Figures 04B-19. Montages pour les différents niveaux d'humidité sur la parcelle pilote.

d – Contrôle des arrosages.

Pour vérifier que les arrosages créent réellement une différence dans l'environnement proche des baies de raisins, nous effectuons une série de mesures du taux d'humidité et de la température aux niveaux des grappes (micro-climat au niveau des grappes). Ces mesures sont effectuées un jour d'arrosage (journée ensoleillée, sans vent), vers 14h00, soit une heure après l'arrosage de mi-journée (le 23 Septembre 2005).

Nous utilisons pour ce faire un thermo-hygromètre de poche et la mesure se fait à proximité grappes, à la hauteur du premier fil de palissage, comme montré sur la figure 04B-20.

Figure 04B-20. Mesure de l'humidité et de la température dans l'environnement des grappes.

Les résultats de ce relevé sont présentés dans le tableau 04B-7 et nous permettent donc de confirmer la pertinence de notre parcelle pilote d'un point de vue différence d'humidité créée au niveau des grappes, grâce au protocole d'arrosage mis en place. Les rangs arrosés sont donc caractérisés par une humidité plus importante et une légère diminution de la température par rapport au témoin. Néanmoins, nous ne notons pas de différence de température entre les deux modalités humides.

Tableau 04B-7. Parcelle pilote. Relevé d'hygrométrie au niveau des grappes.

[nat]												
#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	moyenne	écart type
temp (°C)	25	23,2	23,3	24	24,5	25,1	26	25,1	25	24,1	24,5	0,9
%humidité	54	50	57	58	55	55	57	58	59	51	55,4	3

[4]												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	moyenne	écart type
temp	24,1	23,5	24,6	23,5	24,5	23,1	24,3	24	24,1	20,1	23,6	1,3
%humidité	54	62	56	60	59	59	61	62	58	54	58,5	3

[30]												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	moyenne	écart type
temp	23	23,6	24	24,3	24,6	24	23,6	23	24	22,5	23,7	0,7
%humidité	67	70	63	71	60	68	67	65	66	65	66,2	3,2

[bach]												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	moyenne	écart type
temp	27,3	30	29,5	29,5	31	29	28,9	30,7	26	29,9	29,2	1,5
%humidité	58	57	53	61	54	61	53	51	57	60	56,5	3,6

3.2.1.3 – Utilisation de traitement antiBotrytis.

L'idée initiale de cette expérimentation est de voir si l'humidité favorise le développement de *Brettanomyces*, soit par la mise en place d'un micro-climat favorable, soit par le développement d'autres micro-organismes susceptibles de favoriser ou non la présence de *Brettanomyces* ; notamment la micro-flore associée à la pourriture du raisin : champignons filamenteux, et *Botrytis cinerea*. Afin de faire la part des choses, nous divisons chacune de nos différentes modalités d'humidité en deux groupes, avec d'un coté la modalité considérée telle quelle, et de l'autre, la même modalité complétée par des traitements anti-botrytis supplémentaires (action ciblant le *Botrytis*, mais également les filamenteux). De plus, nous tentons de voir si l'emploi de tel traitement a une action directe sur la présence de la levure.

Ainsi, nous avons sur cette parcelle pilote 8 modalités principales que nous rappelons dans le tableau 04B-8.

Tableau 04B-8. Récapitulatif des modalités sur la parcelle pilote.

humidité	[nat]		[30]		[4]		[bach]	
antibot	X		X		X		X	
nom	**[nat]anti**	**[nat]**	**[30]anti**	**[30]**	**[4]anti**	**[4]**	**[bach]anti**	**[bach]**

[x] et [x]anti représentant respectivement une modalité d'arrosage simple et la même modalité avec traitements supplémentaires antiBotrytis.

Cette parcelle est traitée par défaut une première fois le 15 Août 2005 avec de Sumisclex® liquide, 500 g/L de procymidone à raison de 1,5 L/ha (avec une dilution à 150 mL/hL), ce qui constitue la référence pour nous par rapport à nos modalités : « traitements antiBotrytis supplémentaires ».

Les traitements supplémentaires sont commencés 12 jours avant vendange. Il s'agit alors de traiter les rangs concernés après chaque nouvel arrosage (par exemple : si l'arrosage à lieu le lundi, le traitement se fait le mardi matin). Le traitement employé est identique en composition et en dosage que celui employé précédemment. Au regard de notre planning général d'expérimentation, 3 traitements supplémentaires ont donc été réalisés avant le prélèvement final : les 16, 20 et 24 Septembre.

3.2.1.4 – Le rang « Frappé ».

Nous considérons une modalité supplémentaire. Un rang, positionné à mi chemin entre les arrosages moyen et fort (donc avec un niveau d'humidité importante mais que nous ne quantifions pas) est volontairement abîmé 10 jours avant la récolte.

Pour ce faire, nous utilisons une Machine à Vendanger réglée de sorte à venir frapper les grappes avec les battants. L'intensité de battage est telle que les baies sont légèrement frappées, et abîmées, sans être complètement explosées ou tombées au sol (Figure 04B-21).

L'idée est ici de voir si un état sanitaire très mauvais du raisin (baies abimées en conditions humides) est susceptible d'engendrer une population de *Brettanomyces* plus importante. Nous nommons cette modalité : **[frap]**

Figure 04B-21. Grappes de raisins du rang « Frappé » .

3.2.1.5 – Récapitulatif des modalités.

Le schéma de la figure 04B-22 permet de visualiser la disposition des différentes modalités sur la partie pilote.

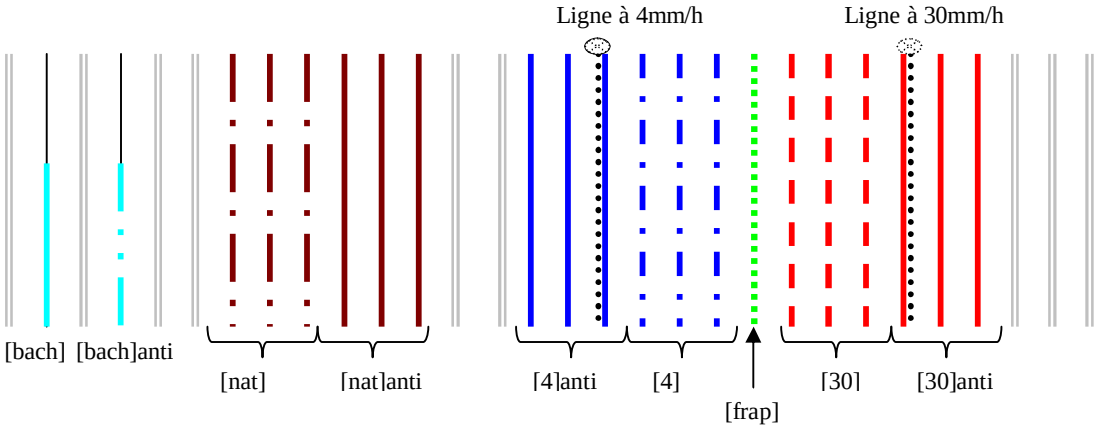


Figure 04B-22. Parcelle pilote, disposition des différentes modalités.

Dans la pratique, chacune des modalités est représentée par 3 demi rangs, à l'exception des modalités [bach] et [bach]anti qui pour des moyens techniques ne sont représentés que par 1 quart de rang chacun. Le « rang frappé » s'étend quant à lui sur un seul demi rang.

3.2.2 – Echantillonnages et dépistages.

Deux grandes séries d'échantillons sont prélevées lors de cette expérience :

- Le 16 Septembre 2005, au tout début de la campagne d'arrosage et de traitement,
- Le 26 Septembre 2006, quelques jours avant la vendange de la parcelle.

3.2.2.1 – Recherche de *Brettanomyces*.

Pour chacune des 6 principales modalités ([nat] / [4] / [30] avec l'alternative anti), nous effectuons 9 prélèvements pris aléatoirement sur les 3 rangs afin d'être le plus représentatif possible de la modalité. Pour le rang frappé, nous prenons 4 échantillons. Enfin, pour les deux modalités bâchées, nous prélevons également 4 points sur chacune.

3.2.2.2 – Recherche de champignons filamenteux.

Nous considérons 5 points par modalité (ou 4 pour les modalités plus petites).

3.2.2.3 – Recherche de *Botrytis cinerea*.

Nous estimons l'éventuelle présence de *Botrytis* par simple observation. Cette présence est quantifiée comme suit : on relève le nombre de grappes atteintes de pourriture grise sur 100 grappes

observées aléatoirement par modalité. Nous avons conscience que cette méthode est très sommaire et ne permet de détecter que les foyers de *Botrytis* à développement extérieur et de surface, mais nous considérons cette information comme suffisante.

3.2.3 – Résultats.

3.2.3.1 – Prélèvements du 16 Septembre 2005

a – Avant propos.

Il n'y a à priori pas de différences visibles entre les différentes modalités, la procédure d'arrosage ayant commencé 4 jours auparavant seulement. A ce stade, les modalités […]anti n'ont pas de signification réelle dans la mesure où n'il y a pas de de traitement supplémentaire, le premier traitement ayant lieu après les prélèvement pour des raisons pratiques évidentes et de sécurité. De même la modalité [frap] n'est ici qu'indicative et non effective car la manipulation n'a lieu que le 19 Septembre.

b – Dépistage de *Brettanomyces* .

Le tableau 04B-9 donne le résultat du dépistage *Brettanomyces* pour cette série.

Tableau 04B-9. Parcelle pilote. Dépistage de Brettanomyces, 16 Septembre 2005.

	nombre d'échantillons positifs
[30]anti	0
[30]	1 / 9
[4]anti	0
[4]	1 / 9
[nat]anti	0
[nat]	0
[bach]anti	0
[bach]	0
[frap]	0

Quelques échantillons positifs sont donc présents, le résultat est très peu significatif. Les tests de comparaison menés entre les différentes modalités confirment l'hypothèse d'égalité des proportions au seuil 0,1 entre les modalités.

c – Dépistage de *Botrytis.*

Nous n'observons pas au moment de cette première série d'échantillon la présence de foyers de *Botrytis.*

d – Recherche de champignons filamenteux.

Le tableau 04B-10 rassemble les résultats obtenus pour les dépistages de *Penicillium* et *Aspergillus* sp. sur les rangs expérimentaux.

Tableau 04B-10. Parcelle pilote. Relevé des champignons filamenteux, 16 Septembre 2005.

	nombre d'échantillons positifs	
	penicillium	aspergillus
[30]anti	1 / 5	2 / 5
[30]	1 / 5	0
[4]anti	2 / 5	0
[4]	2 / 5	2 / 5
[nat]anti	1 / 5	2 / 5
[nat]	1 / 5	0
[bach]anti	0	0
[bach]	2/4	1 / 4
[frap]	0	1 / 4

Aspergillus sp. et *Penicillium sp.* sont présents ponctuellement et aléatoirement sur l'ensemble des rangs de la parcelle pilote.

3.2.3.2 – Prélèvements du 26 Septembre 2005.

a – Avant-propos.

Cette série de prélèvements a lieu après plus de 15 jours d'arrosage suivant la procédure.

Trois traitements complémentaires antiBotrytis ont été effectués sur certains rangs. Donc contrairement à la première série de prélèvements, du 16 Septembre 2005, les modalités mises en place sont désormais susceptibles de présenter des différences significatives. Une simple observation le prouve, par exemple, en examinant les inter-rangs où l'herbe a beaucoup plus poussé entre les rangs mouillés, ou encore à l'aspect du sol sous les ceps : boueux, légèrement ruisselé et lavé ; etc … .

b – Dépistage *de Brettanomyces.*

Nous donnons les résultats du dépistage *Brettanomyces* pour cette série d'échantillons dans le tableau 04B-11.

Tableau 04B-11. Parcelle pilote. Dépistage de Brettanomyces, 26 Septembre 2005.

	nombre d'échantillons positifs
[30]anti	2 / 9
[30]	3 / 9
[4]anti	2 / 9
[4]	5 / 9
[nat]anti	0
[nat]	1 / 9
[bach]anti	0
[bach]	0
[frap]	2 / 4

En comparaison de la série du 16 septembre (tableau 04B-9), on constate une nette augmentation du nombre d'échantillons positifs en *Brettanomyces.*

Nous concluons donc en premier lieu que l'humidité forcée a d'une manière globale favorisé le développement de *Brettanomyces* sur le raisin. En effet un test de comparaison des proportions (test χ^2) entre l'ensemble des modalités arrosées artificiellement ([30] + [30]anti + [4] + [4]anti) et les modalités témoins ([nat] + [nat]anti) montre une différence significative (au risque $\alpha = 0,1$) : χ^2 4,33 > $\chi^2_{1-\alpha}$ 2,71.

Néanmoins, les résultats suggèrent que cette présence n'est pas toujours favorisée par l'humidité quand celle-ci devient excessive ; l'humidité la plus importante ne s'accompagnant pas de la présence la plus importante. En effet si on distingue assez nettement une présence de *Brettanomyces* dans les modalités d'humidité forcée par rapport aux témoins [nat] + [nat]anti, la plus forte proportion de positifs se trouvent parmi les modalités [4] + [4]anti (7 points positifs sur 15 échantillons) et dans une moindre proportion au sein des rangs [30] + [30]anti (5 points positifs sur 15). Nous pouvons tenter d'interpréter ce résultat par le phénomène de lessivage de la microflore à la surface des baies, phénomène d'autant plus important que l'arrosage est important et susceptible de prendre le dessus sur l'effet positif dû quant à lui à l'augmentation d'humidité.

En terme pratique, une année pluvieuse serait donc plus favorable à la présence de *Brettanomyces* sur le raisin par rapport à une année sèche, mais une année très pluvieuse le serait dans une moindre mesure. Nos résultats ne nous permettent pas à ce jour que d'apprécier qualitativement cette tendance, sans en donner des indications précises quant aux pluviométries associées.

Par ailleurs, pour l'arrosage modéré si on compare les rangs ayant subi le traitement antiBotrytis supplémentaire [4]anti et les rangs non traités [4], on constate que le nombre de positifs en

Brettanomyces est plus important là où il n'y a pas eu de traitement. Le test de χ^2 met en avant une différence significative entre [4] et [4]anti au risque $\alpha = 0,1$ (χ^2 2,8 > $\chi^2_{1-\alpha}$ 2,71). Cette différence n'est pas aussi significative dans le cas de l'arrosage excessif [30] ($\chi^2 = 0,3$).

On se demande alors si le traitement employé agit directement sur les *Brettanomyces* en limitant leur développement. Comme le suggèrent Calhelha et al. (2006), la procymidone possède au même titre que la dichlofluanide, le benomyl, l'iprodione et le vinclozoline (substances actives de traitements antifongiques classiquement employés pour la vigne) des propriétés toxiques pour les levures *Saccharomyces* et *non-Saccharomyces* présentes dans les environnements vitivinicoles. Nous précisons par ailleurs qu'aucun travail spécifique n'a été à ce jour mené et publié sur l'action de tels produits sur *Brettanomyces*.

Néanmoins nous pouvons également supposer que l'action du traitement est indirecte par contrôle de la microflore fongique et des interactions microbiennes qui pourraient en découler.

A ce stade, les travaux que nous proposons ouvrent des pistes de réflexion mais ne permettent pas encore d'apporter la réponse précise.

Nous ne pouvons que constater l'absence de *Brettanomyces* sur les échantillons des rangs bâchés. En supposant la pertinence de l'échantillonnage de cette modalité, nous pouvons penser que les conditions créées par ce montage (atmosphère contrôlée et chaude) est défavorable au développement du contaminant. Par ailleurs, un tel bâchage prévient tel une barrière physique l'action des vecteurs comme les insectes et le vent susceptibles de véhiculer les micro-organismes, dont la levure recherchée.

A contrario, le rang frappé [frap] affiche le plus grande proportion de positifs (avec 50 % des échantillons). Conjuguant humidité forte, mauvais état sanitaire (donc substrat/s disponible/s et attrait des insectes), les raisins de cette modalité proposent un terrain favorable au développement d'une microflore d'altération, dont *Brettanomyces.*

c – Dépistage de *Botrytis*.

Lors de cette série de prélèvements, nous observons nettement la présence de *Botrytis* sur certains rangs. Le tableau 04B-12 donne le relevé du nombre de grappes botrytisées comptées sur 100 grappes observées aléatoirement le long des rangs (sans considération du degré de développement de la pourriture : on compte positif dès qu'on observe la moindre trace de *Botrytis* : de la grappe avec quelques grains à peine colonisés, à la grappe complètement pourrie). Il s'agit ici de la moyenne sur deux comptages réalisés par deux opérateurs différents.

Tableau 04B-12. Botrytis sur la parcelle pilote.

	Grappes (+) /100
[nat]	0
[nat]anti	0
[4]	16
[4]anti	3
[30]	13
[30]anti	5
[bach]	0
[bach]anti	0
[frap]	14

Sans réelle surprise, les attaques par la pourriture grise se localisent sur les rangs humidifiés. Les traitements antiBotrytis réalisés ont par ailleurs été efficaces réduisant significativement le taux de grappes botrytisées. (L'action n'est pas totale car elle ne réduit pas ce nombre à 0. Nous pouvons supposer que les arrosages cadencés ont tendance à laver le produit au bout de 2 à 3 jours d'action selon le planning d'intervention sur la parcelle, et en conséquence, amoindrir son action antifongique).

Globalement le taux d'attaque par le *Botrytis* est le même (proche de 15 %) pour les deux niveaux d'humidité forcée [4] et [30]. Cependant, le degré d'attaque n'est pas le même. En effet, pour la modalité [30], les grappes botrytisées sont fortement abîmées ; en grande majorité, elles sont pourries, du cœurs de la grappe aux raisins en périphérie, alors que pour la modalité [4], l'attaque est plus faible en intensité : quelques grains pourris en bord de grappe, et beaucoup plus rarement des grappes entières colonisées (Figure 4B-23).

Botrytisation type sur les rangs de la modalité [4]

Botrytisation type sur les rangs de la modalité [30]

Figure 04B-23. Photographies de grappes botrytisées sur les rangs arrosés de la parcelle pilote.

d – *Botrytis* et *Brettanomyces* : un lien ?

Au regard de la présence simultanée de *Brettanomyces* et de *Botrytis* sur les rangs humidifiés, il serait tentant de dire que dans les conditions de cette parcelle pilote, ces deux micro-organismes se développent simultanément, supposant pourquoi pas des interactions positives entre ces deux espèces

... Mais à ce stade, rien ne permet une conclusion aussi tranchée. De ce fait, pour l'instant, nous devons modérer nos interprétations et nous contenter d'un constat : la mise en place d'une humidité forcée par rapport à la météo entraîne un développement plus important de *Brettanomyces* conjointement à celui de *Botrytis*.

Afin de confirmer somme toute un lien éventuel entre la présence des deux espèces, une série de prélèvements supplémentaires est réalisée. L'idée est alors de comparer la fréquence de *Brettanomyces* sur de grappes saines et des grappes botrytisées, pour une condition d'humidité donnée. Dans nos rangs humides, nous prélevons aléatoirement par modalité, 10 grappes saines et 10 grappes botrytisées et les soumettons au dépistage de *Brettanomyces*.

Le tableau 04B-13 donne la moyenne du nombre d'échantillons que nous avons retrouvés positifs en *Brettanomyces* à la suite de ce dépistage. Il s'agit ici d'une moyenne sur deux séries de 10 échantillons pour chaque modalité (chaque série étant prélevée par un opérateur différent).

Tableau 04B-13. Nombre d'échantillons positifs. Relation avec le Botrytis.

	Raisin Botrytisé	Raisin Sain
[4]	6	2
[4]anti	3	1
[30]	5	3
[30]anti	1	0
[frap]	4	4

Afin de discuter les résultats, nous menons les tests de comparaison des proportions entre les échantillons botrytisés et sains d'une même modalité (Tableau 04B-14).

Tableau 04B-14. Résultat du test de comparaison des proportions : grappes saines et botrytisées.

comparaison entre		χ^2
[4] bot	[4] sain	3,33
[4]anti bot	[4]anti sain	1,25
[30] bot	[30] sain	0,83
[30]anti bot	[30]anti sain	1,05
[frap] bot	[frap] sain	0

Nous ne relevons de différence significative au seuil risque de 0,1 que pour la modalité [4] entre les échantillons botrytisés et sains. ($\chi^2_{1-\alpha}$ = 2,71). Dans ce cas de figure, la présence d'attaque de *Botrytis* est indiscutablement favorable à la présence de *Brettanomyces* sur le raisin. Cette même tendance s'observe pour les autres modalités, sans que nous puissions cependant y donner un réel poids statistique.

Ainsi, le *Botrytis*, à un degré d'attaque faible (quelques grains attaqué et non grappe entière complètement colonisée par le champignon), pourrait favoriser le développement de *Brettanomyces* au sein de la micro-flore du raisin. Nous ouvrons là une piste intéressante à explorer, d'autant que l'idée semble confortée par l'observation déjà faite en 2004 lors des observation menées durant la pré-étude 2004 (paragraphe 3.1.5 de ce présent module)

Comme cela a déjà été évoqué précédemment, nous retrouvons ici une population moindre dans le cas des rangs subissant le traitement supplémentaire contre le *Botrytis*, confortant l'idée d'une action (directe ou indirecte ?) du produit sur la présence du contaminant.

e – Recherche de champignons filamenteux.

Sur cette seconde série d'échantillons, nous n'obtenons pratiquement pas de champignons filamenteux. Aspergillus sp. et *Penicillium sp.* confondues, 14 colonies sur l'ensemble des 42 échantillons sont répartis aléatoirement sur l'ensemble des modalités. Aucun lien n'est alors perçu entre cette présence et celle déjà évoquée de *Brettanomyces* ou *Botrytis*.

3.2.4 – Vinification.

Suite à l'expérimentation, les rangs concernés de la parcelle pilote ont été déclassés et en conséquence non encuvés en cave. De ce fait, nous avons pu disposer des raisins pour poursuivre l'expérimentation dans une approche vinification. L'idée est alors de voir si les « mini vendanges » obtenues pour les différentes modalités avaient des comportements particuliers en vinification vis-à-vis du développement de *Brettanomyces*.

Nous procédons donc à la récolte des différentes modalités, le raisin étant recueilli dans des poches en plastique de 100 L. 100 à 150 kg de raisin sont vendangés par modalité.

Les grappes des différentes modalités sont éraflées à la main grâce à une grille d'érafloir (Vaslin-Bucher) directement dans des garde-vin en plastique alimentaire. Les mains sont protégées par des gants stériles changés entre chaque modalité. La grille d'éraflage est lavée (détergent), désinfectée (solution chlorée DEPTAL) puis rincée abondamment à l'eau claire entre chaque modalité. Le foulage est assuré par pigeage à l'aide d'un pigeur en inox nettoyé (détergent) puis désinfecté à l'alcool et flambé entre chaque modalité. Un sulfitage à 3 g/hL est réalisé à l'encuvage. Les moûts sont ensemencés avec des LSA à raison de 20 g/hL de moût avec la levure Enolevure SL souche 7013, commercialisée par DSM. Après 3 semaines de fermentation, chaque modalité est décuvée par pompage du jus à l'aide d'un tuyau muni d'une crépine et d'une pompe volumétrique. Le vin obtenu

est stocké dans des fûts à bière de 50 L désinfectés pour finir leur fermentation. Le volume de vin obtenu est de 40 à 45 L par modalité.

Le tableau 04B-15 permet de voir le suivi *Brettanomyces* qui a été effectué en cours de vinification de ses 9 lots (numération sur gélose sélective)

Tableau 04B-15. Vinifications des lots de la parcelle pilote. Suivis de population de Brettanomyces.

		jours		
		0	101	157
population Brett UFC/mL	[nat]	<1	<1	<1
	[nat]anti	<1	<1	<1
	[4]	<1	<1	<1
	[4]anti	<1	<1	<1
	[30]	<1	<1	20692
	[30]anti	<1	<1	80
	[bach]	<1	<1	3888
	[bach]anti	<1	<1	<1
	[frap]	<1	3200	7776

Au jour 0 de la vinification, aucun des lots ne présente de contamination, soulevant une contradiction avec les propos précédents faisant état de la présence effective de la levure sur le raisin. Mais il convient de préciser ici que le dépistage se fait directement par étalement sur milieu solide sélectif (approche quantitative), alors que le dépistage sur raisin se fait avec une phase longue d'activation et d'enrichissement (approche qualitative). De ce fait, on peut supposer, comme cela a déjà été suggéré dans ce document et évoqué par d'autres auteurs, que les levures présentes sur le raisin et immédiatement dans le moût ont une concentration cellulaire trop faible lors de la vendange et/ou ne sont peut être pas dans un état physiologique permettant un dépistage direct.

Durant les deux premières grandes étapes : Fermentation Alcoolique et Fermentation Malo Lactique (spontanée) aucun développement de *Brettanomyces* n'est détecté par suivi direct (étalement sur milieu de numération).

En revanche, au bout de 100 jours environ, … on détecte dans le lot issu de la vendange [frap] des *Brettanomyces* à raison de 3200 UFC/mL alors que rien n'est détectable pour les 8 autres lots (<1 UFC/mL sur boite). Cette population continue à augmenter pour atteindre 7776 UFC/mL au bout de 157 jours. D'autres lots présentent alors à ce moment une contamination par la levure. Ainsi, le lot [30] atteint une population très importante de 20 692 UFC/mL sans qu'aucun dépistage préalable ne signale la présence du contaminant. [30]anti amorce quant à lui un début de contamination, avec un niveau de 80 UFC/mL. On garde cependant à l'esprit que ces lots présentaient au regard des résultats évoqués précédemment une contamination sur baies. Il a cependant fallu pratiquement attendre 3 mois avant que la contamination ne devienne détectable.

Deux résultats relativement surprenant ressortent par ailleurs de ce suivi. En effet, aucun des lots [4] et [4]anti, qui initialement sont marqués par la présence du contaminant sur le raisin la plus importante ne déclenche de contamination en cuve, alors que le lot [bach] pour lequel l'absence de levure sur baie avait été mis en avant connaît un développement significatif de la levure en cuve (3888 UFC/mL). (Nous ne pouvons par ailleurs pas exclure la possibilité d'une contamination en cours de manipulation)

On se rend alors compte que d'une manière générale la contamination se met en place d'une manière très lente dans les lots touchés, et que la cinétique d'implantation diffère véritablement d'un lot à l'autre.

Des analyses diverses menées à l'aide d'un analyseur multi-paramétres de composition chimique des vins, Multispec de Microdom Cetim (IRTF + UV/Visible) sur les moûts associés aux modalités sont effectuées : sucres résiduels, acides organiques (tartrique, malique et lactique), couleur, éclat, teinte, etc… sont effectuées pour tenter d'identifier des paramètres discriminants entre les lots de vins. De l'ensemble des résultats obtenus, seule la composition initiale des moûts en potassium diffère significativement d'une modalité à l'autre (Figure 04B-24).

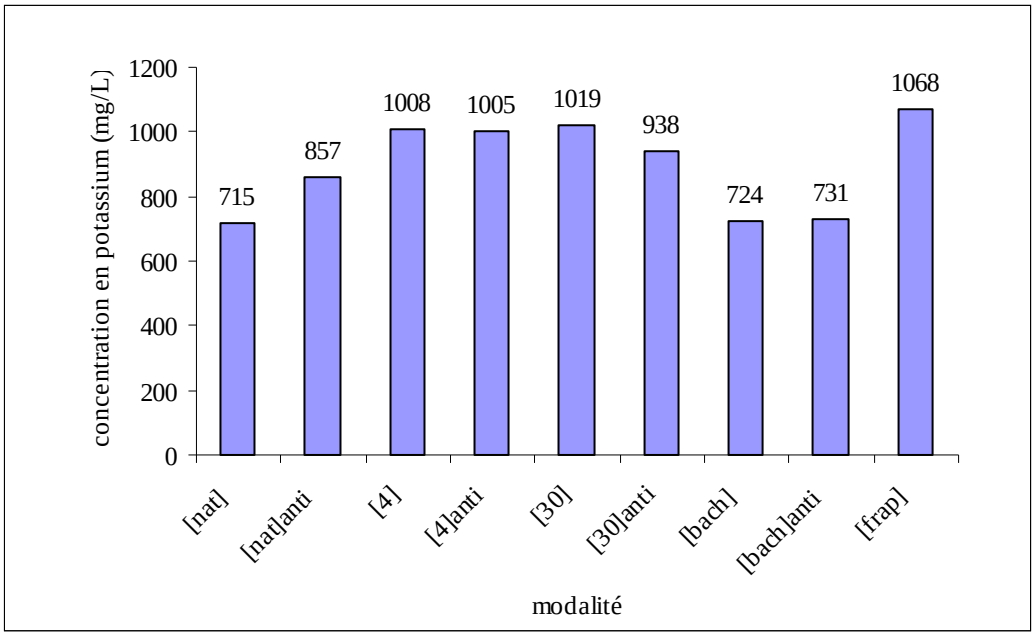


Figure 04B-24. Parcelle pilote. Concentration en potassium des différents moûts.

Néanmoins, il ne semble pas possible d'établir quelque lien que ce soit avec le développement du contaminant lors de la vinification. Même si on constate que [frap] et [bach] présentant les plus grandes concentrations en potassium sont les moûts qui développent la contamination le plus rapidement, il semble que la concentration en ce cation ne soit pas un facteur nécessaire et suffisant.

En effet [4] et [4]anti, possédant eux aussi de fortes concentrations de ce cation ne connaissent pas du tout de développement de la levure au cours de la vinification.

Résumé du module

Nous retiendrons donc en premier lieu le dépistage effectif de la levure Brettanomyces sur plusieurs parcelles du vignoble de Buzet, laissant supposer une des origines potentielles du contaminant dans la cave : la matière première.

Cette présence de la levure sur les baies n'est a priori pas homogène au sein des parcelles. L'existence de zone préférentielle de présence est alors liée à la conjonction des configurations physiques des parcelles (topographie) et de leur proche environnement (comme un bosquet).

L'humidité et la fraîcheur, créant au niveau des grappes un micro-climat particulier, sont dans une certaine mesure un facteur augmentant la probabilité de rencontrer la levure sur le raisin.

Un mauvais état sanitaire des baies est par ailleurs un élément aggravant du risque de développement du contaminant sur la vendange.

Alors que la présence de Brettanomyces n'apparaît pas liée à celles d'autres micro-organismes tels que Penicillium sp., Aspergillus sp. et les bactéries acétiques, il semble qu'un lien complexe régisse les présences conjuguées de Brettanomyces et de Botrytis.

Enfin, l'emploi de traitement antiBotrytis, à base de procymidone apparaît, dans les conditions et aux doses considérées dans notre travail (qui ne s'inscrit pas dans les impératifs légaux), comme un élément limitant de la présence du contaminant sur les baies.

MODULE C
Problèmes de quantification en laboratoire.

1 – Avant – propos.

La levure *Dekkera/Brettanomyces* est connue comme un micro-organisme pouvant être sujet à une grande variabilité morphologique en cours de culture, aussi bien dans des conditions de laboratoire que dans des milieux naturels, sur le terrain. Ce comportement peut alors rendre la quantification de cette levure relativement délicate dans certains cas.

Dans le cadre d'études de *Brettanomyces bruxellensis*, peut-on alors utiliser indifféremment, par des jeux de corrélations simples comme cela est classiquement fait pour des levures plus connues comme *Saccharomyces*, l'évaluation quantitative par mesure de Densité Optique, la numération sous microscope, la détermination du Poids sec ? … telle est la question que nous nous posons dès les premières tentatives de fermentation.

Afin de statuer sur les/la méthode/s à adopter lors de nos études ultérieures nous menons donc une étude comparatives de ces méthodes simples mises à notre disposition

2 – Numération avec cellule de Thomas et mesure de la Densité Optique.

Nous choisissons dans un premier temps la souche B comme représentative pour ces études préliminaires. Elle est alors cultivée dans le milieu synthétique SWM à 20 °C avec une agitation de 150 rpm. L'inoculum pour ce test est de 10^6 cell/mL.

Remarques préalables.

- *Pour la numération avec la cellule de Thoma, l'intervalle de confiance est estimé pour la souche B à : [valeur moyenne ± 3 %] ; La valeur moyenne étant obtenue pour deux comptages d'un même échantillon.*
- *L'erreur expérimentale pour la mesure de DO_{620} est inférieure à 1 %.*

Les figures 04C-1 et 04C-2 représentent respectivement pour une unique culture l'évolution au cours du temps de la population cellulaire totale (obtenue par comptage sur Cellule de Thoma) et de la Densité Optique de la suspension cellulaire à 620nm (DO_{620}).

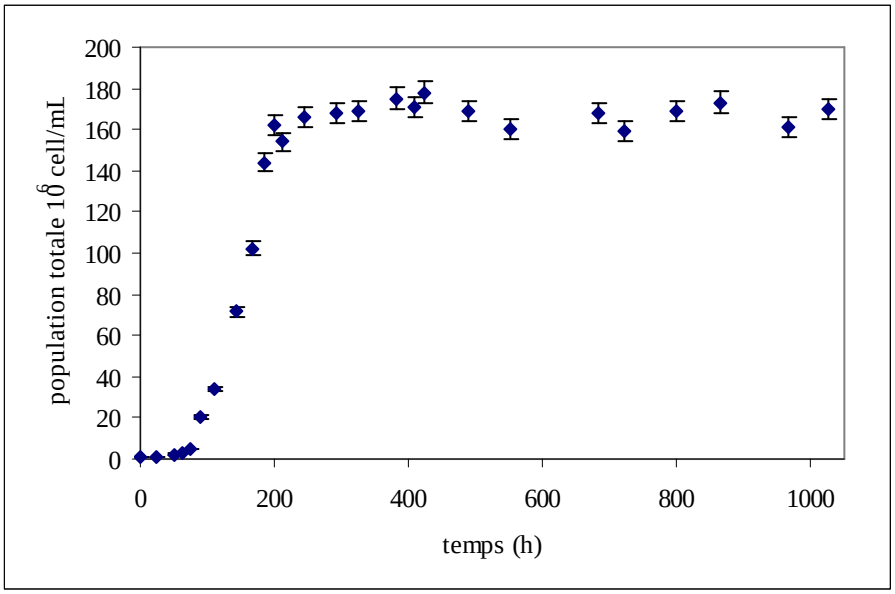


Figure 04C-1. Souche B. Suivi par comptage avec la cellule de Thoma.

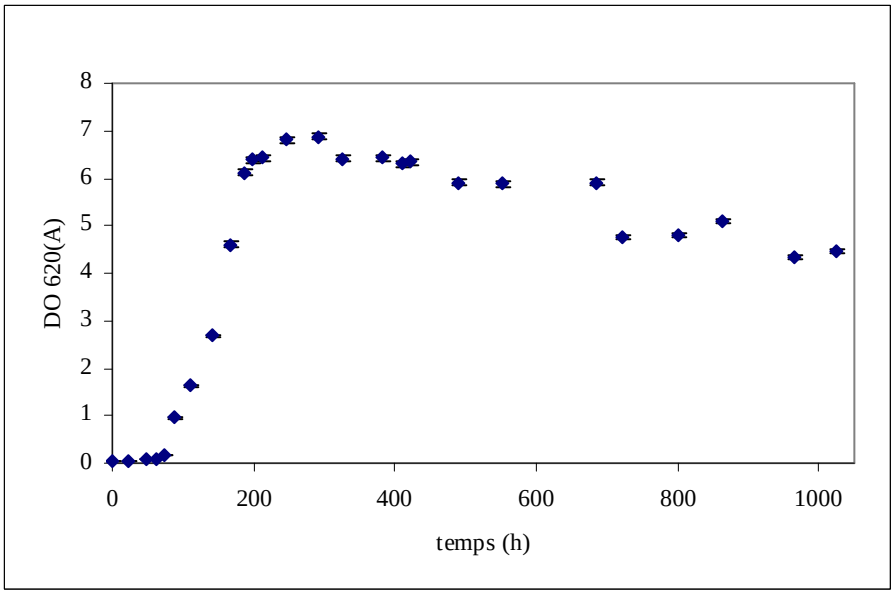


Figure 04C-2. Souche B. Suivi par mesure de DO_{620}.

Pour des suivis de cultures levuriennes, il est d'usage d'établir, pour un micro-organisme donné dans un milieu donné, une corrélation linéaire entre la numération cellulaire sous microscope (comptage avec cellule de Thoma) et la DO_{620}. L'intérêt pratique d'une telle corrélation est la possibilité d'utiliser la mesure de DO620, beaucoup plus facile à mettre en place, pour estimer ensuite la biomasse.

Or dans un cas tel que celui présenté ici, on se rend compte de l'erreur d'appréciation faite sur la croissance si on établissait une telle relation. En effet, alors que le suivi sous microscope avec la cellule de Thoma laisse clairement apparaître une très longue phase stationnaire où la population se

maintient à un niveau constant (à 200-250 heures de cultures) le suivi par mesure de DO_{620} suggère une chute progressive de cette même population.

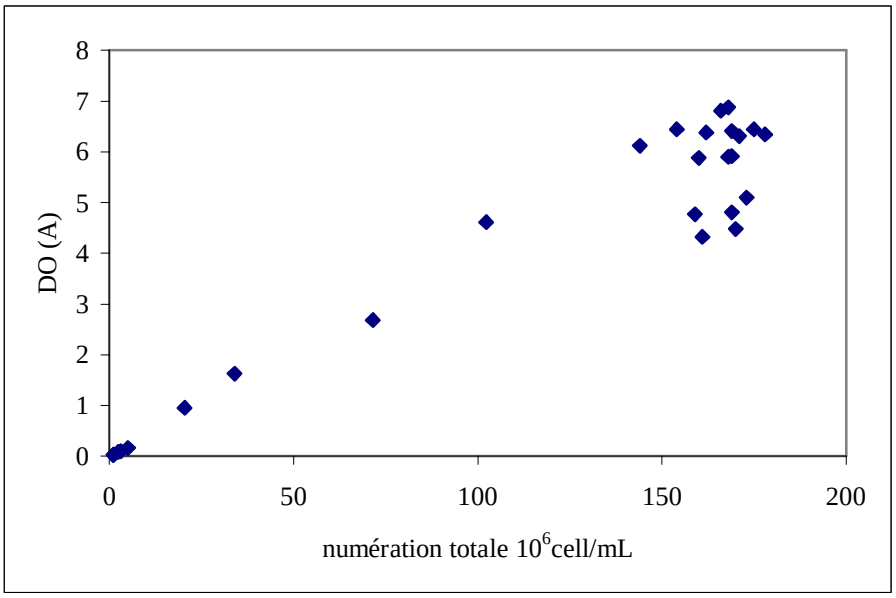


Figure 04C-3. Souche B. Comparaison Numération sur cellule de Thoma et mesure de DO620.

Comme le montre la figure 04C-3, il est difficile d'établir une relation linéaire entre le nombre de cellule/mL et la densité optique de la suspension pour toute la durée de la fermentation. Une linéarisation semble néanmoins possible pour une DO variant de 0 à 4, mais cela ne correspond pour la souche B qu'aux 200 premières heures de culture. Passée cette durée, à nombre égal de cellules on est susceptible d'obtenir des mesures de DO_{620} très différentes. L'observation sous microscope de la variation de taille et de faciès des cellules au cours de la culture permet de comprendre ce résultat.

En effet, alors qu'elles sont ovoïdes, à bourgeonnement multipolaire en début de fermentation (Figure 04C-4a), on observe un allongement des cellules entre 150 et 200 heures (Figure 04C-4b). Au-delà de 200 heures, on peut trouver des cellules turgescentes formant parfois des grappes ou des cellules dissociées de forme ovoïde, mais tendant à diminuer en taille (Figure 04C-4c). Cette tendance s'accentue tout au long de la culture, aboutissant parfois à des cellules dissociées d'une taille inférieure au quart de la taille observée en début de fermentation (Figure 04C-4d). On continue à observer quelques cellules bourgeonnantes, mais la taille des cellules mère et fille est considérablement réduite (Figure 04C-4e).

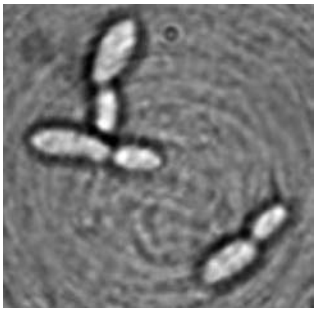


Figure 04C-4A

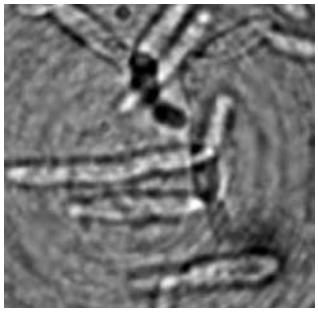


Figure 04C-4b

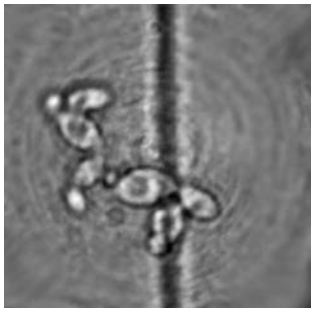


Figure 04C-4c

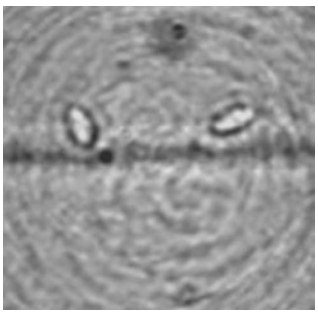


Figure 04C-4d

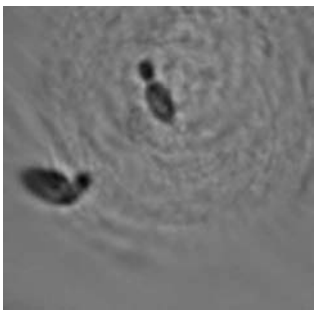


Figure 04C-4e

Figure 04C-4. Souche B. Evolution morphologique en cours de culture sur milieu synthétique. (X400)

La mesure de Densité Optique apparaît comme peu adaptée à un suivi rigoureux de la croissance chez la souche étudiée, et par extension et précaution aux autres souches de *Brettanomyces*.

3 – Numération sur boites.

La souche B est mise en culture dans le milieu SWM, à 20 °C avec une agitation de 150 rpm. L'inoculum se fait à 10^6 cell/mL. Lors du suivi, nous menons une comparaison entre la numération à l'aide de la cellule de Thoma et celle obtenue par étalement sur boite (milieu MSN) (Figure 04C-5).

Au cours de la division cellulaire, la séparation entre cellules mère et fille n'est pas instantanée. De ce fait, ces deux cellules actives métaboliquement sont alors appariées et n'aboutissent à la formation que d'une seule colonie lors de la culture sur gélose. Il y a alors sous estimation de la population totale de 20 à 40 % dans le cas de cellules non floculantes. Mais comme nous l'avons déjà évoqué, le comportement de *Brettanomyces sp*. varie souvent : appariement, cellules dissociées, etc… elle est même susceptible en cours de culture de former des amas cellulaires, tantôt sous forme de grappes, tantôt de chaînettes. Dans ce cas là, la formation d'une seule unité colonie sur gélose n'est pas significative du nombre de cellules réellement présentes et actives. Il devient difficile d'estimer la minimisation de la biomasse par une telle procédure de dénombrement surtout au-delà de 200 heures.

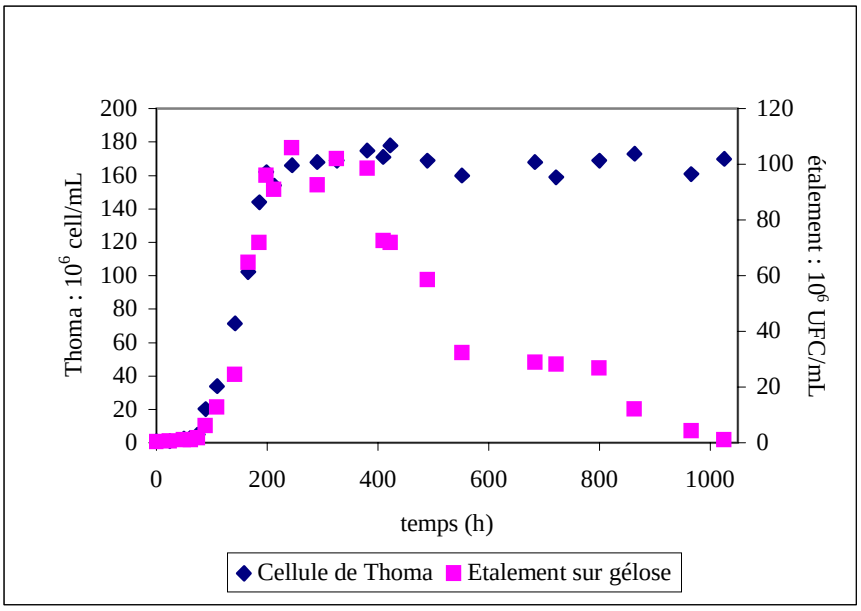


Figure 04C-5. *Figure 04C-3. Souche B. Comparaison Numération sur cellule de Thoma et étalement sur gélose.*

Par ailleurs, dans le cas de *Brettanomyces*, il semblerait qu'il existe, même en cours de culture liquide sur milieu simple, un état physiologique en phase stationnaire qui ne permette pas à la levure de croître sur gélose. Ce résultat est suggéré par le décrochage entre les deux profils à partir de 400 heures. En effet, alors que le comptage sur cellule de Thoma donne un état stationnaire sur le long terme de la concentration cellulaire totale, la numération sur boite présente une chute brutale de la population. Comme nous le montrerons par la suite (Chapitre 04 Module D), l'activité métabolique persiste pendant cette phase stationnaire (notamment une consommation d'éthanol), laissant donc supposer une présence (non quantifiée en proportion) de cellules viables et fonctionnelles. Nous précisons que lors du comptage sous microscope nous n'observons peu le phénomène de lyse cellulaire intervenant après la mort cellulaire.

On retrouve ici une extension du phénomène de Cellule Viable Non Cultivable décrit par Millet et Lonvaud (2000) dans le cadre de milieux à fort potentiel stressant. Cet état est peut être initié ici par des conditions particulières dans le milieu lors de culture de longue durée. Cette hypothèse est d'autant plus probable que les cellules observées au microscope sont de dimensions très réduites, caractère souvent associé selon ces mêmes auteurs à l'état de VNC.

Nous préférons donc l'emploi de la numération par cellule de Thoma au dénombrement sur boite dans le cadre de suivi de croissance.

4 – Problèmes de détermination de la Viabilité.

Dans une approche de microbiologie simple et en vue d'application dans les contextes d'industrie ne possédant qu'un minimum d'équipement, nous n'envisageons dans nos études que l'emploi de la coloration au bleu de méthylène. Cette méthode très répandue en brasserie et en oenologie permet un distinguo entre cellules viables et non viables pour des levures classiquement étudiées (*Saccharomyces cerevisiae, S. bayanus*, etc .... Lange et al., 1993).

Néanmoins nous sommes rapidement confrontés à l'estimation de la viabilité par cette méthode dans le cas de fermentation avec nos souches de *Brettanomyces*.

Plusieurs auteurs mettent cependant en avant le fait que la coloration au bleu de méthylène s'accompagne souvent d'une sous-évalutation ou même une sur-évaluation dans l'estimation de la viabilité pour des cultures de Saccharomyces, pendant la phase de déclin notamment (Pierce, 1970 ; Jones, 1987 ; Willetts et al., 1997)

4.1 – Exemple de la Souche B.

La Souche B est mise en culture dans le milieu SWM, à 20 °C, avec une agitation de 150 rpm. L'inoculum se fait à 10^6 cell/mL. Lors de la numération avec la cellule de Thoma, nous effectuons le test de viabilité au Bleu de Méthylène et comparons les résultats avec d'autres méthodes de quantification.

Le problème principal rencontré avec la souche B est l'existence de 3 classes de couleurs lors de la coloration au bleu de méthylène. En effet, alors que l'on observe classiquement deux couleurs bien distinctes avec cette méthode pour *Saccharomyces* : cellules claires et cellules d'un bleu soutenu (Figure 04C-6), nous obtenons lors des cultures avec cette souche des cellules claires (Figure 04C-7a), des cellules bleu soutenu (Figure 04C-7b) et des cellules que nous qualifions de Bleu Clair (Figure 04C-7c).

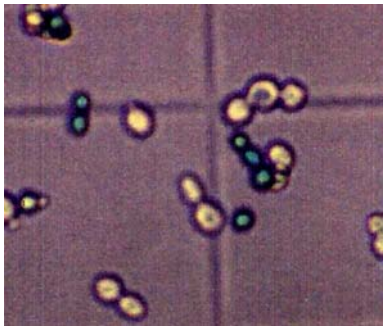


Figure 04C-6. Coloration au bleu de méthylène chez Saccharomyces cerevisiae. Test de Viabilité.

Figure 04C-7a *Figure 04C-7b* *Figure04C-7c*

Figure 04C-7. Souche B. Différentes couleurs obtenues lors d'une coloration au bleu de méthylène. (X400).

La figure 04C-8 compare les profils de croissance obtenus lors de différents scénarii :

- § Population totale : en ne tenant pas compte de la coloration.
- § Population viable1 : Population viable, en supposant que les cellules bleu clair sont viables.
- § Population viable2 : Population viable, en supposant que les cellules bleu clair sont non viables.

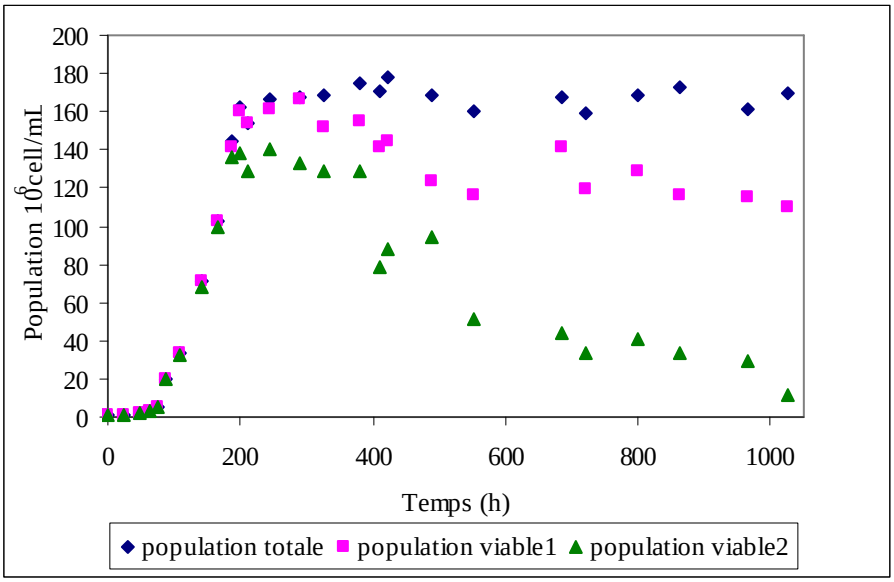


Figure 04C-8. Souche B. Evolution des populations totale et viables. Plusieurs hypothèses.

Les interprétations diffèrent significativement selon que nous supposons que les cellules bleu clair sont viables ou non. Nous pouvons alors penser dans un cas que la population viable tend à se maintenir à un niveau quasi constant proche de 120.10^6 cell/mL, et dans l'autre cas constater une chute importante de la population rejoignant alors le résultat obtenu pour les numérations sur boites.

De plus si nous observons l'évolution des différentes classes de couleurs (Figure 04C-9), bien que l'on note que les cellules bleu clair apparaissent notablement avant les cellules bleu soutenu (décalage d'une centaine d'heures), rien ne permet de dire que les cellules bleu clair sont un état

intermédiaire entre les cellules claires et bleu soutenu (cellules moribondes ?). En effet, si tel avait été le cas, on observerait probablement un profil en forme de cloche pour les cellules bleu clair. Or ici, leur nombre continue à augmenter, en même temps que celles des cellules bleu foncé. En d'autres termes il ne s'agit pas a priori de cellules « moribondes ».

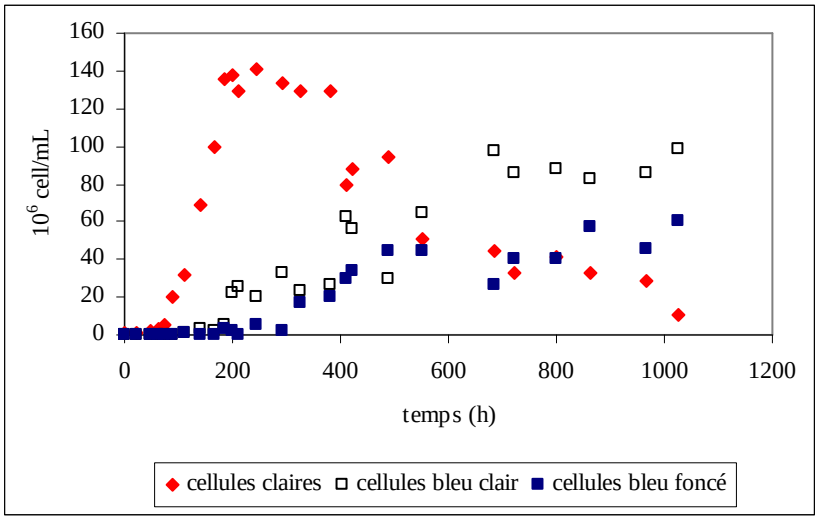


Figure 04C-9. Souche B. Evolution des trois classes de couleur lors d'un test au bleu de méthylène.

Il devient alors ambigu de faire la part des choses entre cellules viables et cellules non viables au cours de ce test.

Quant est-il des cellules bleu clair ? … doivent elles être considérées comme viables ou non ? … Pour tenter d'y répondre, nous comparons les populations viables selon les deux interprétations et le dénombrement sur boite (Figure 04C-10).

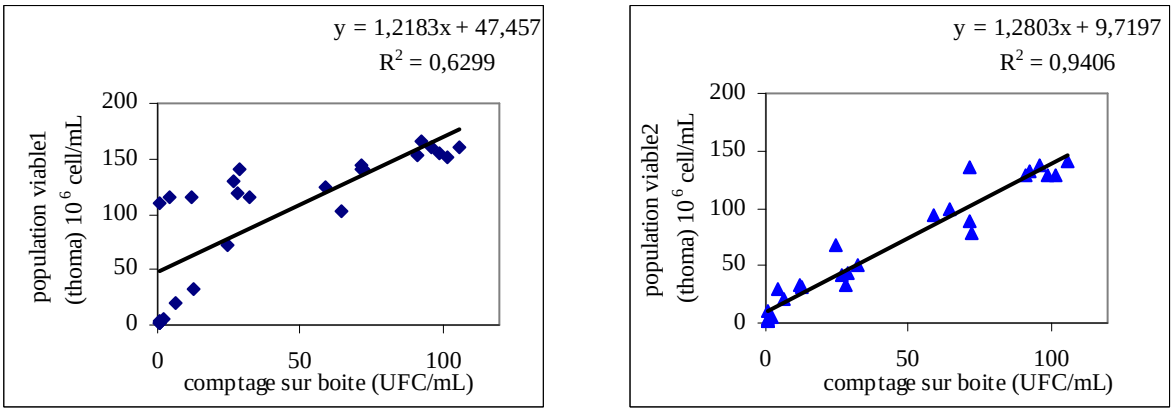


Figure 04C-10. Souche B. Comparaison entre populations viables et dénombrement sur boite.

Nous constatons qu'il existe une très bonne corrélation entre le nombre d'UFC/mL trouvées sur boite et la population viable2. Ce résultat laisse donc supposer que les cellules bleu clair sont des cellules non viables, si nous définissons la viabilité comme l'aptitude des cellules à se multiplier.

Mais une autre expérience menée par la suite contredit cette première hypothèse. En effet, nous inoculons un nouveau milieu de culture SWM à partir de la culture précédemment décrite, en fin de fermentation.

Ainsi, au bout de 1025 heures de la première culture, nous avons une population totale de 170.10^6 cell/mL, composée de 11.10^6 cell. claires /mL, 99.10^6 cell bleu clair /mL et 60.10^6 cell bleu foncé /mL (soit : population viable1 : 110.10^6 cell/mL et population viable2 : 11.10^6 cell/mL). Cette culture joue alors le rôle de « levain ».

L'inoculum de la seconde fermentation se fait alors à 10^6 cellules viables /mL ; viables au sens 2 (c'est-à-dire : viable = cellules claires uniquement). Nous suivons alors les différentes catégories de cellules au cours de la fermentation (Figure 04C-11): cellules claires, cellules bleu clair et cellule bleu foncé (et population totale).

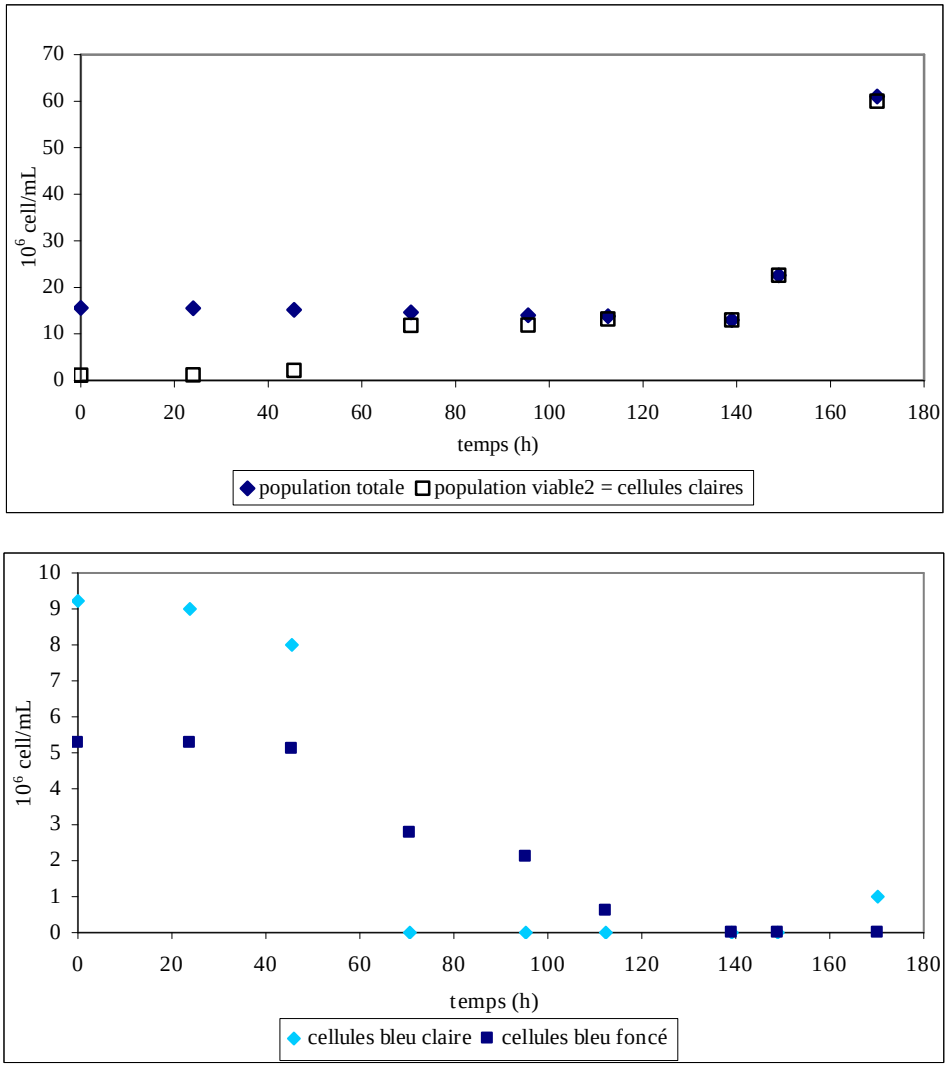


Figure 04C-11. Souche B. Seconde fermentation, suivis des différentes populations.

L'analyse de ces différents profils nous amène donc à penser que les cellules bleu clair ne sont pas des cellules non viables et moribondes amenées à se lyser. En effet, entre 24 et 113 heures, alors

que les cellules bleu foncé disparaissent (observation de lyse sous microscope des cellules de cette couleur), nous observons une bascule du nombre de cellules bleu clair vers les cellules claires. Ce phénomène débute au bout de 45,5 heures (Confirmé par le bilan population, tableau 04C-1). Après cette phase de changement, la fermentation se déroule comme si l'ensemencement avait été fait, non pas de 10^6 cell/mL mais à un niveau plus important incluant une grande part des cellules bleu clair.

Tableau 04C-1. Souche B. Bilan de population lors de la seconde fermentation.

					variation			
	population totale	cellules 10^6 cell/mL			cellules 10^6 cell/mL			population totale
temps(h)		claires	bleu clair	bleu foncé	claires	bleu clair	bleu foncé	
0	15,6	1,1	9,2	5,3	0	0	0	0
24	15,5	1,2	9	5,3	0,1	-0,2	0	-0,1
45,5	15,2	2,1	8	5,1	1	-1,2	-0,2	-0,4
70,5	14,6	11,8	0	2,8	10,7	-9,2	-2,5	-1
95,5	14	11,9	0	2,1	10,8	-9,2	-3,2	-1,6
113	13,8	13,2	0	0,6	12,1	-9,2	-4,7	-1,8
139	13	13	0	0	11,9	-9,2	-5,3	-2,6
149	22,6	22,6	0	0	21,5	-9,2	-5,3	7
170	61	60	1	0	58,9	-8,2	-5,3	45,4

Ainsi, le passage dans un milieu frais permet un changement d'état physiologique des cellules apparaissant en bleu clair dans le milieu fermenté (ou en cours de fermentation), changement mis en avant par le nouveau comportement vis-à-vis du bleu de méthylène : absence de coloration. On retrouve alors des cellules viables et pleinement actives au même titre que des cellules non colorées au bleu de méthylène.

Cette expérience met alors en avant le caractère complexe de ces cellules à la coloration intermédiaire. En tout cas, elles ne semblent pas être des cellules non viables stricto sensu c'est-à-dire sans aucune activité métabolique et incapable de croissance et, mais plutôt proche de l'état VNC.

Finalement, en confrontant ces deux résultats, il nous est toujours difficile, voire impossible de statuer sur l'état de ces cellules bleu clair : viable ou non viable …

4.2 – Exemple de la Souche Q.

La souche Q est mise en culture dans le milieu SWM, à 20 °C avec une agitation de 150 rpm. L'inoculum se fait à 10^6 cell/mL.

Remarques préalables.

Pour la numération avec la cellule de Thoma, l'intervalle de confiance est estimé pour la souche Q à [valeur moyenne ± 9%]. La valeur moyenne étant obtenue pour deux comptages d'un même échantillon.

Le problème rencontré avec la souche Q est totalement différent de celui précédemment décrit pour la souche B. Pour cette souche, lors de la coloration au bleu de méthylène, nous retrouvons la différenciation classique et binaire entre cellules claires et cellules bleues. Mais dès 75 heures de culture, nous observons une augmentation importante du nombre de cellules bleues signalant une chute a priori de la viabilité (Figure04C-12). Nous atteignons alors rapidement une viabilité proche de 0 au bout de 200 heures (Figure 04C-13). Néanmoins, cette observation est en contradiction avec la croissance qui se poursuit (augmentation du nombre total de cellules). Ainsi, les cellules colorées en bleu, et donc supposées non viables, continuent à se multiplier.

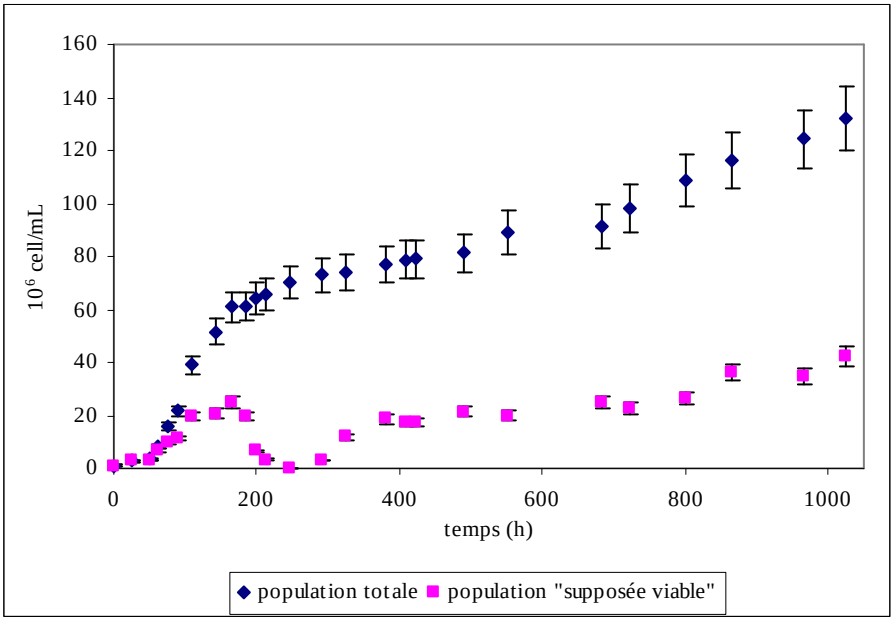


Figure 04C-12. Souche Q. Evolution des populations totale et viables.

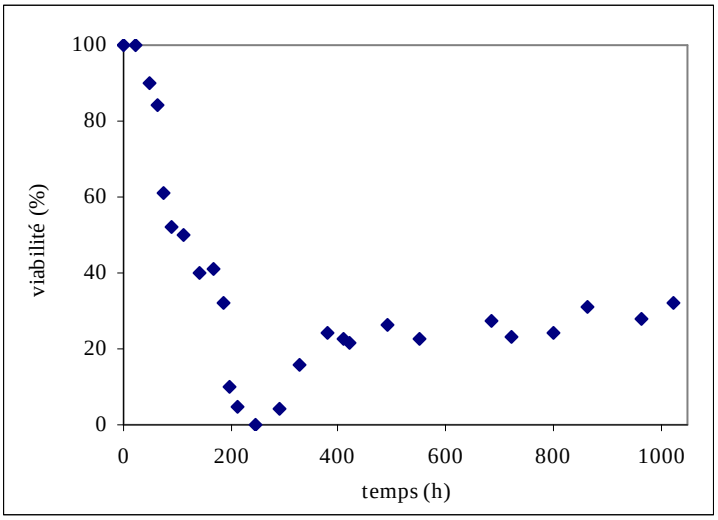


Figure 04C-13. Souche Q. Evolution de la viabilité en cours de fermentation sur milieu SWM.

La méthode au bleu de méthylène n'est donc a priori pas du tout significative pour la souche Q. Cette la coloration n'est pas révélatrice de la perte de viabilité. Nous ne savons donc pas avec précision pourquoi des cellules a priori viables (et représentant une grande proportion de la population) se colorent totalement au bout de 200 heures.

Nous pouvons rappeler les deux hypothèses avancées concernant le principe de la coloration et tenter d'y donner l'explication associée au cas de la souche Q.

- la membrane des levures mortes devient perméable au bleu de méthylène alors que les cellules vivantes conservent une perméabilité membranaire sélective (Bonora et Mares, 1982). Dans notre cas, nous pouvons supposer que des cellules vivantes perdent cette selectivité membranaire dans nos conditions de culture.
- le bleu de méthylène, colorant d'oxydoréduction, est réduit par une hydrogénase et devient incolore (forme réduite) si la cellule est vivante. Dans notre cas, nous pouvons supposer que des cellules vivantes perdent rapidement cette activité enzymatique dans les conditions de la culture (présence d'une métabolite inhibiteur ? limitation par un substrat ? inhibition par un composé tel que l'éthanol à 10 % vol/vol. ? …)

Nous ne nous proposons pas de vérifier ces hypothèses, et les explications avancées, notre propos n'étant pas une étude précise du phénomène mais la mise en avant du problème dans la manière future de suivre les cultures.

La souche Q possède également une autre particularité. En effet une observation annexe laisse supposer une affinité de cette souche pour les colorants. En effet, lors de cultures sur milieu solide MSBT complété en colorant alimentaire ExGrape® Color E163-EPR3 riche en anthocyane, nous

constatons la formation de colonies blanches, roses et rouges. Un probable phénomène d'adsorption sur la paroi cellulaire a lieu. Nous n'observons pas ce phénomène avec la souche B.

Résumé du module

Dans le cadre de fermentations sur des milieux synthétiques type vin avec la levure Brettanomyces bruxellensis, il est difficile d'établir des corrélations pratiques entre mesure de Densité Optique et Dénombrement avec cellule de Thoma. La grande variabilité morphologique en cours de culture est avancée comme explication.

La numération sur boite n'est par ailleurs pas une méthode d'intérêt pour le suivi de culture de plusieurs centaines d'heures pour Brettanomyces bruxellensis. Plusieurs raisons à cela peuvent être avancées : le comportement de la levure, tantôt sous forme de cellules dissociées, tantôt de chaînettes ou de grappes, et l'existence d'état physiologique particulier lors de culture de moyenne ou longue durée les rendant indétectable par cette méthode.

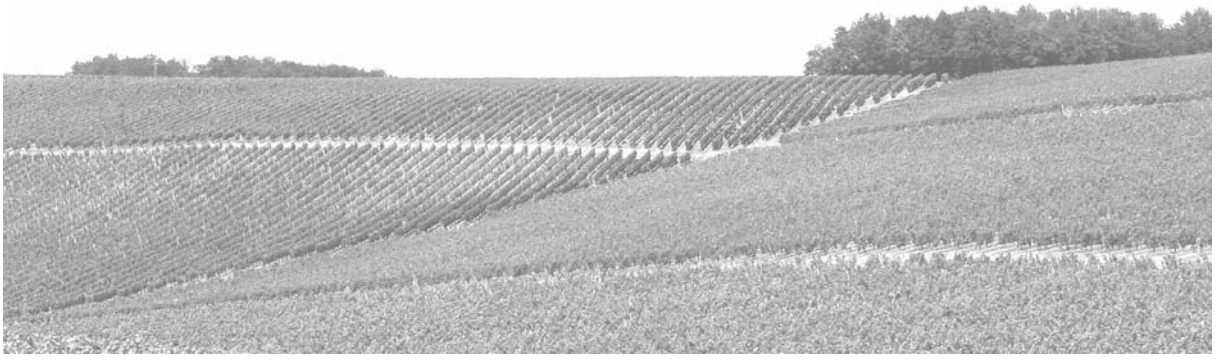
La numération avec la cellule de Thoma est donc au regard de ces résultats la méthode la plus adaptée et simple pour le suivi de fermentation en laboratoire.

Il est cependant difficile d'évaluer la viabilité par la méthode simple de coloration au bleu de méthylène. L'existence de coloration « intermédiaire » dans certains cas, ou la non correspondance classique « cellule claire = viable, cellule colorée = non viable », rend la méthode inappropriée pour les cultures de Brettanomyces bruxellensis.

Dans le cas de souches telles que la souche B, présentant d'après le suivi de la population totale, une longue phase stationnaire où la population se maintient, on montrera par la suite qu'une activité métabolique est détectable. Il convient cependant de se demander si la totalité ou partie de cette population totale est active.

Nous prenons comme décision pour la suite des travaux proposés de ne considérer que les populations totales. Ne désirant pas faire appel à des techniques plus complexes (de fluorométrie par exemple), et n'en percevant pas la nécessité dans la suite pour nos axes d'études nous ferons fi de la notion de viabilité. Un regard tourné vers les interprétations de nos travaux et leurs applications industrielles est également un argument pour ne considérer que les populations totales.

MODULE D
Diversité au sein de l'espèce B. bruxellensis



1 – Diversité génétique.

Après confirmation de leur appartenance à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* par des tests génétiques (Chapitre 03, 3.5), 26 souches dont 25 (souches B à Z) sont issues des campagnes d'isolement dans deux caves du Sud Ouest de la France (des régions de Madiran et de Buzet) au cours des millésimes 2001 à 2004 (détails donnés dans le tableau 04D-1) ainsi que la souche A de référence (isolat de distillerie) sont soumises au typage génétique pour une analyse au niveau intra spécifique.

Tableau 04D-1. Origines et années d'isolement des souches de travail.

Souches	Origine	Millésime
A	Distillerie	1997
B	Buzet	2003
C	Madiran	2001
D	Madiran	2001
E	Madiran	2001
F	Madiran	2001
G	Madiran	2001
H	Madiran	2002
I	Madiran	2002
J	Madiran	2002
K	Madiran	2002
L	Madiran	2002
M	Buzet	2003
N	Buzet	2003
O	Buzet	2003
P	Buzet	2003
Q	Buzet	2003
R	Buzet	2004
S	Buzet	2004
T	Buzet	2004
U	Buzet	2004
V	Buzet	2004
W	Buzet	2004
X	Buzet	2004
Z	Buzet	2004

L'examen des résultats ECP-RE (Figure 04D-1) permet en premier lieu de mettre en avant 25 profils non identiques.

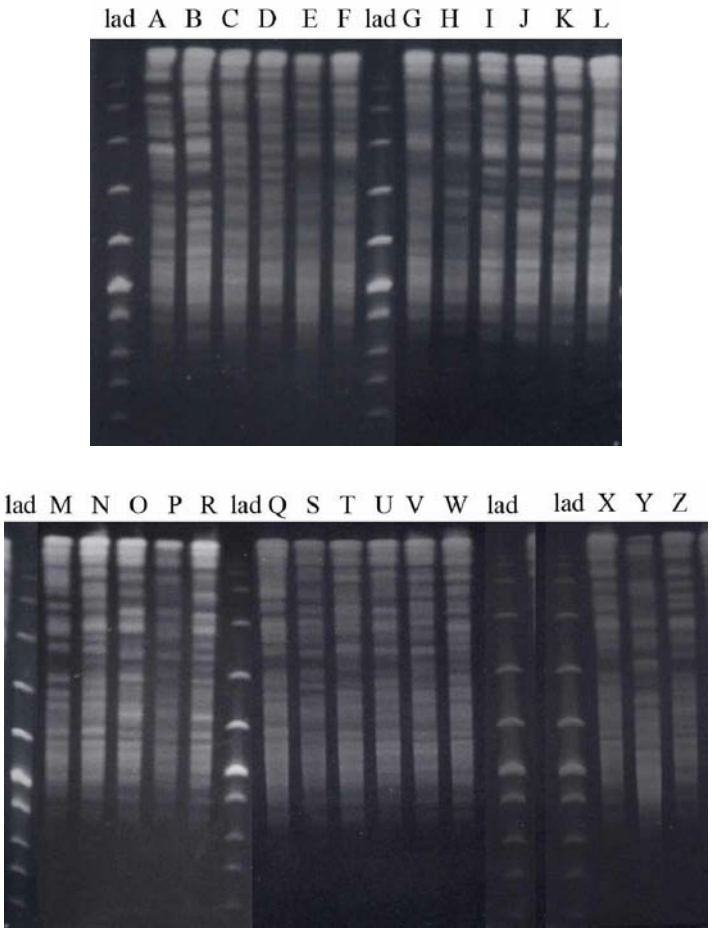


Figure 04D-1. Profils ECP-RE des souches A à Z.

A l'exception des profils B et M strictement identiques, tous les autres profils obtenus différent, signifiant donc 25 souches rigoureusement distinctes génétiquement. Les souches B et M ayant été isolées à partir d'un même échantillon, nous pouvons supposer qu'il s'agit d'une unique souche répertoriée et traitée deux fois.

Par ailleurs, en comparant les profils (hauteur, largeur et intensité des bandes), il est possible d'établir des groupements : 6 groupes auxquels s'ajoutent 3 profils indépendants (tableau 04D-2).

Tableau 04D-2. Groupements génétiques établis à partir des profils ECP-RE.

	souches
groupe 1	O, P, R, S, U
groupe 2	A, N, W, X, Z
groupe 3	C, D.
groupe 4	E, F, G
groupe 5	B = M, I, J, L
groupe 6	T, V
indépendantes	H
	K
	Q

Remarque :

Au sein des groupes, plusieurs niveaux sont considérés dans les rapprochements. Par exemple : dans le groupe 1, le profil de la souche P est le plus différent en comparaison aux souches O et U très similaires (mais non identiques). Nous détaillons ces nuances en Annexe 05.

La comparaison entre les informations du tableau 04D-1 et le classement du tableau 04D-2 montre qu'il n'existe pas de lien systématique entre les groupes génétiques et les origines des souches. Même si on relève quelques tendances (groupes 3 et 4 relatifs à Madiran 2001, groupe 6 relatif à Buzet 2004) des exceptions obligent à réfuter l'idée selon laquelle 1 groupe génétique est lié à une origine commune. A titre d'exemple, le groupe 1 se compose de souches provenant de Buzet sur deux millésimes (2003 et 2004) et de la souche de distillerie (contexte totalement différent aussi bien en terme spatial que temporel : souche isolée avant 1994) ; de même que le groupe 5 comprenant des souches isolées à Madiran en 2002 et Buzet en 2003.

Pour un millésime donné sur un site donné, les souches considérées sont isolées dans des cuves différentes. Nous notons alors qu'il n'existe pas de souche (ni de groupe génétique) prédominante et rémanente (5 souches différentes sur Madiran 2001, 5 sur Madiran 2002, 6 sur Buzet 2003 et 8 sur Buzet 2004). Ce bilan met en évidence une richesse et une diversité génétique des contaminants pour des combinaisons année/lieu données. Mitrakul et al. (1999) suggèrent la prédominance d'une souche unique dans différents vins produits dans un même chai Californien supposant une unique souche implantée sur le site. Cette observation nous conduit donc à considérer la variabilité du mode de contamination en fonction du chai : multi-souches (dans notre cas) et mono-souche établie (cas de Mitrakul et al.). Ainsi, le type de contamination n'est pas commun d'un lieu à l'autre mais semble être le résultat d'un contexte qu'il conviendra de connaître et comprendre pour mener à bien la lutte in situ contre le contaminant.

Le fait de (re)trouver des souches différentes dans différentes cuves nous amène à formuler l'hypothèse d'une multiplicité des sources de contamination : différentes souches installées dans la cave mais également un apport de nouvelles souches provenant du raisin (différentes souches à partir de différentes parcelles). Nous n'avons cependant pu vérifier ou infirmer cette hypothèse, n'ayant pas réussi à établir de filiation de lots éventuellement contaminés depuis la vendange.

2 – Diversité phénotypique.

La diversité génétique précédemment décrite se retrouve-t'elle d'un point de vue phénotypique et comportemental ? Telle est la question que nous nous posons par la suite. Pour tenter d'y répondre, nous testons plusieurs souches dans un contexte de fermentation sur milieu synthétique type vin.

2.1 – Avant propos : Diversité morphologique.

Une simple observation du faciès des souches mises en culture dans des conditions données (Figure 04D-2) permet très rapidement de se rendre compte de la diversité morphologique existant au sein de l'espèce *B. bruxellensis* (150 mL de milieu Pré-levain inoculé à partir d'une colonie, placés dans un erlenmeyer de 250 mL ; agitation par barreau magnétique à 150 rpm, 30 °C, 48 heures de culture).

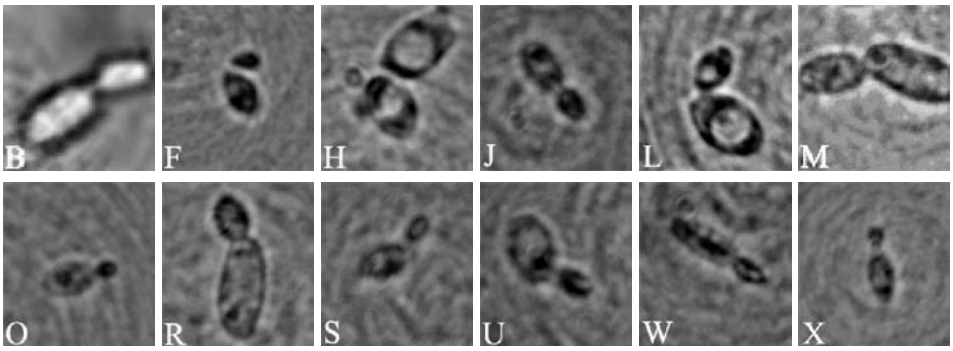


Figure 04D-2. Comparaison morphologique entre 12 souches de B. bruxellensis.
Présentation du faciès majoritaire par souche lors de l'observation au microscope.
(mêmes conditions et même âge de culture pour les 12 souches)

On retrouve donc concrètement toute la diversité morphologique déjà suggérée par Smith et Van Grinsven, 1984 ; Shung-Chang et al., 1985, puis Aguilar-Uscanga, 1998.

Dans la pratique, un tel polymorphisme intra-spécifique est problématique, rendant difficile voire quasi impossible le dépistage de lots de vin contaminés par simple observation au microscope.

2.2 – Fermentations sur milieu synthétique vin.

9 souches parmi les 25 génétiquement identifiées sont sélectionnées pour la suite du travail. Chaque groupe génétique mis en avant (à l'exception du groupe 4) est représenté au moins par une souche (groupe 1 : O et S, groupe 2 : W et X, groupe 3 : D, groupe 5 : B, groupe 6 : V) ainsi que 2 des souches indépendantes (H et Q).

Les inocula se font à raison de 10^5 cell/mL.

Remarques :

- *Conformément au choix établi dans le module C, nous ne relevons que la population totale. Pour cette numération, l'intervalle de confiance est donné par [valeur moyenne ± C%]. C étant inférieur ou égal à 11 pour l'ensemble des souches considérées. La valeur moyenne étant obtenue pour deux comptages d'un même échantillon. Afin d'alléger les graphiques, nous ne représentons que cette valeur moyenne.*
- *Le paragraphe final 5- de ce module présente un tableau récapitulatif des différents classements que nous faisons en fonction des grandeurs étudiées au fur et à mesure. Il est donc possible de s'y référer pour comparer les groupements et comportements retenus pour chaque souche testée.*

2.2.1 – Les sucres.

Même s'il a été montré que *Brettanomyces* peut se développer sur des milieux contenant moins d'1 g/L (Gilis, 2003 et communications personnelles), nous optons pour un milieu plus riche en sucre, afin de produire de la biomasse significativement d'une part et d'amplifier certains comportements éventuellement liés à la croissancess. Par ailleurs, nous nous plaçons dans les conditions d'un vin en fin de fermentation alcoolique donc encore pourvu de 10 g/L de sucres réducteurs.

2.2.1.1 – Profils de consommation.

La figure 04D-3 rassemble les profils de consommation obtenus pour chacune des 9 souches.

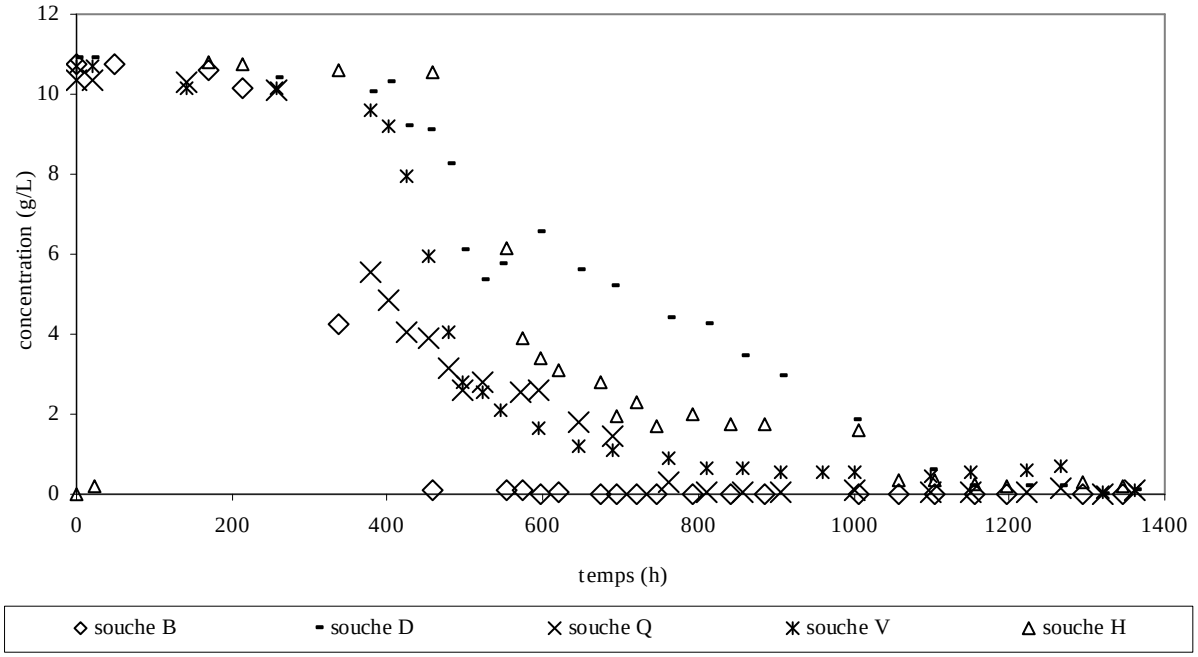


Figure 04D-3a. Souches B (gg 5), D (gg 3), H (indpdt), Q (indpdt), V (gg 6)

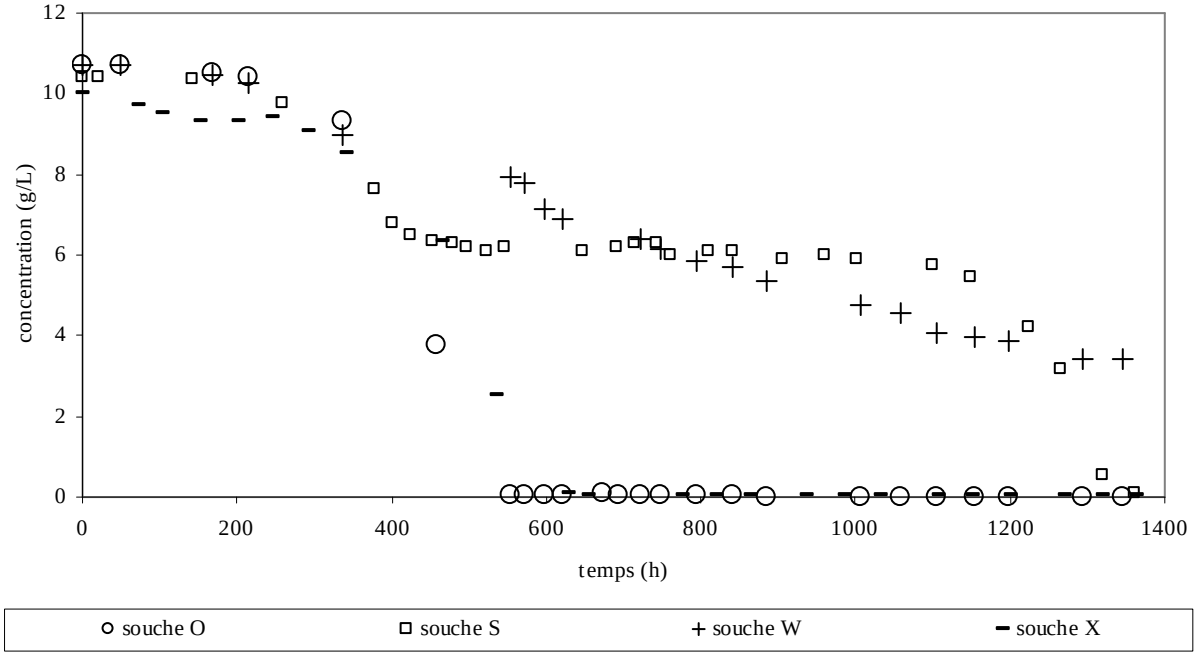


Figure 04D-3b. Souches O et S (gg 1), W et X (gg 3)

Figure 04D-3. Consommation des sucres totaux par 9 souches de B. bruxellensis.

(gg : groupe génétique ; indpdt : indépendante)

Différents comportements sont observés parmi les profils de consommation de sucres totaux :

- Type A : Une consommation rapide jusqu'à assèchement complet du milieu (0 g/L) : souches B, O, X et Q

- Type B : Une consommation lente et progressive des sucres. Alors que la souche D atteint 0 g/L de sucre résiduel, la souche W est incapable de consommer la totalité du sucre présent : 3,4 g/L résiduel au bout de pratiquement 1400 heures de culture.
- Type C : Une consommation en deux étapes. Au terme de la première étape similaire à celle du type A, la consommation en sucre stagne pendant une période relativement longue à une concentration non nulle. Les souches S et V présentent ainsi un palier pendant 500 heures avec des concentrations respectives de 6 g/L et 0,5 g/L. Passé cette étape stationnaire, une seconde consommation a lieu et permet l'épuisement total des sucres résiduels. La souche H, qui possède un palier pendant environ 250 heures peut être incluse dans ce groupe, mais on retient néanmoins qu'au terme de la seconde phase de consommation, il demeure 0,78 g/L de sucres dans le milieu.

Il est intéressant de noter que ce classement selon le profil de consommation des sucres ne correspond pas au regroupement d'un point de vue génétique établi dans le paragraphe 1. Nous verrons par la suite qu'il n'y a pas non plus correspondance systématique avec les profils de croissance. Ainsi, la notion de diversité s'élargit au fil des critères considérés pour distinguer les souches.

2.2.1.2 – Consommation simultanée des deux sucres : Glucose et Fructose.

A l'image du comportement observé pour les souches B, S et W, présenté sur la Figure 04D-4, nous ne notons pas de décalage significatif dans la consommation des deux sucres pour aucune des 9 souches testées.

Cette observation est contraire à ce qui est présenté par Gilis (1999). Ne travaillant cependant pas dans les mêmes conditions expérimentales (concentrations initiales en sucres et aération différentes notamment), il est difficile de mener des comparaisons strictes entre ces deux résultats. Ainsi la compétition supposée, hypothèse formulée par ce même auteur, entre les deux substrats pour le transporteur unique est moindre, dans notre milieu et nos conditions.

En d'autres termes la compétition si elle existe est liée à l'environnement où se développe le micro-organisme.

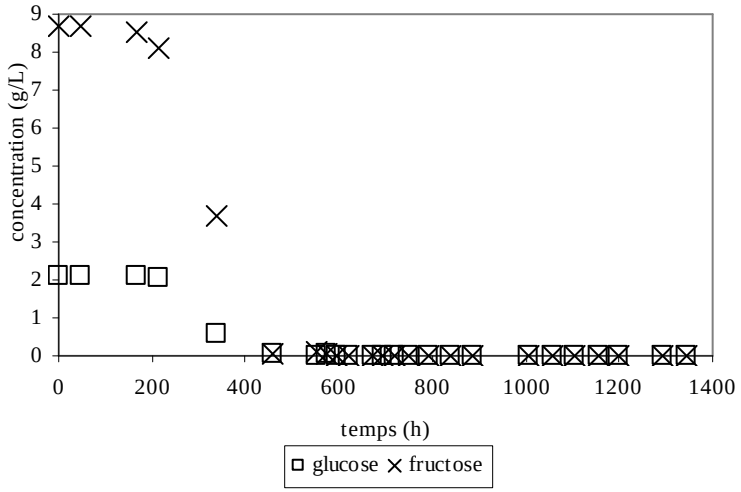


Figure 04D-4a. Souche B.

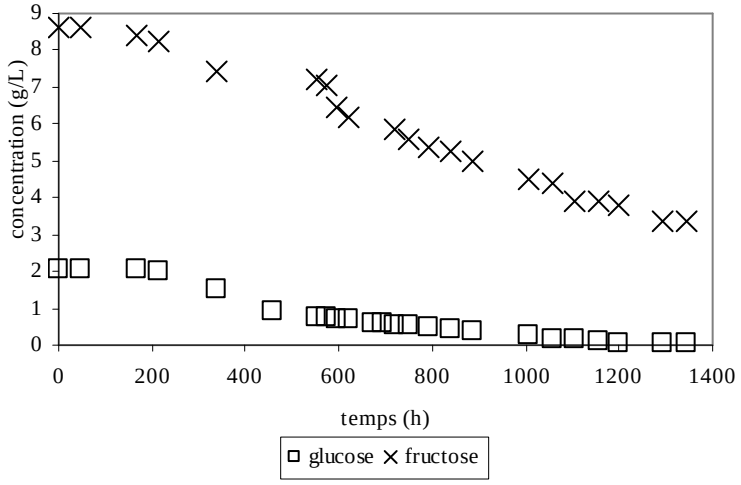


Figure 04D-4b. Souche W.

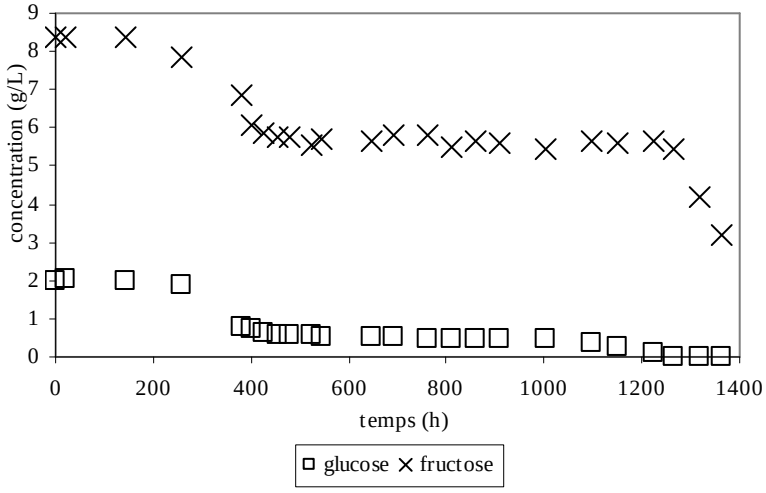


Figure 04D-4c. Souche S.

Figure 04D-4. Consommation du glucose et du fructose par 3 souches de B. bruxellensis.

Néanmoins, alors que le glucose est toujours complètement épuisé au terme des 1400 heures de culture pour toutes les souches, il existe certains cas où le fructose ne l'est pas et représente alors la totalité des sucres résiduels mesurés (souches H et W).

2.2.2 – Croissance.

2.2.2.1 – Les profils de croissance.

Nous rassemblons dans la figure 04D-5 les différents profils de croissance obtenus pendant les cultures sur 1400 heures.

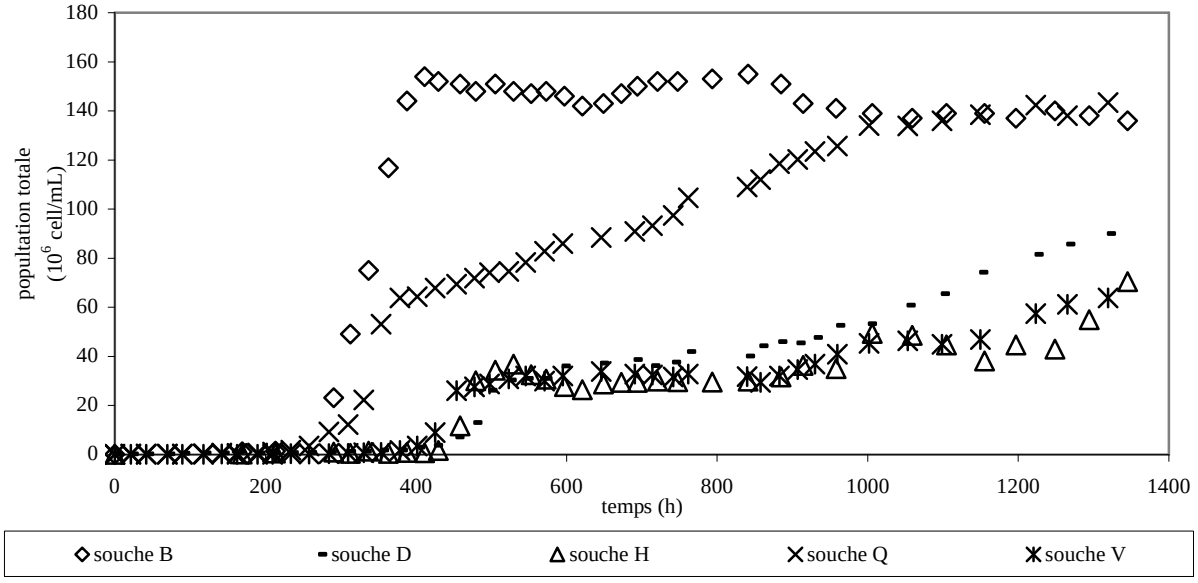


Figure 04D-5a. Souches B (gg 5), D (gg 3), H (indpdt), Q (indpdt), V (gg 6)

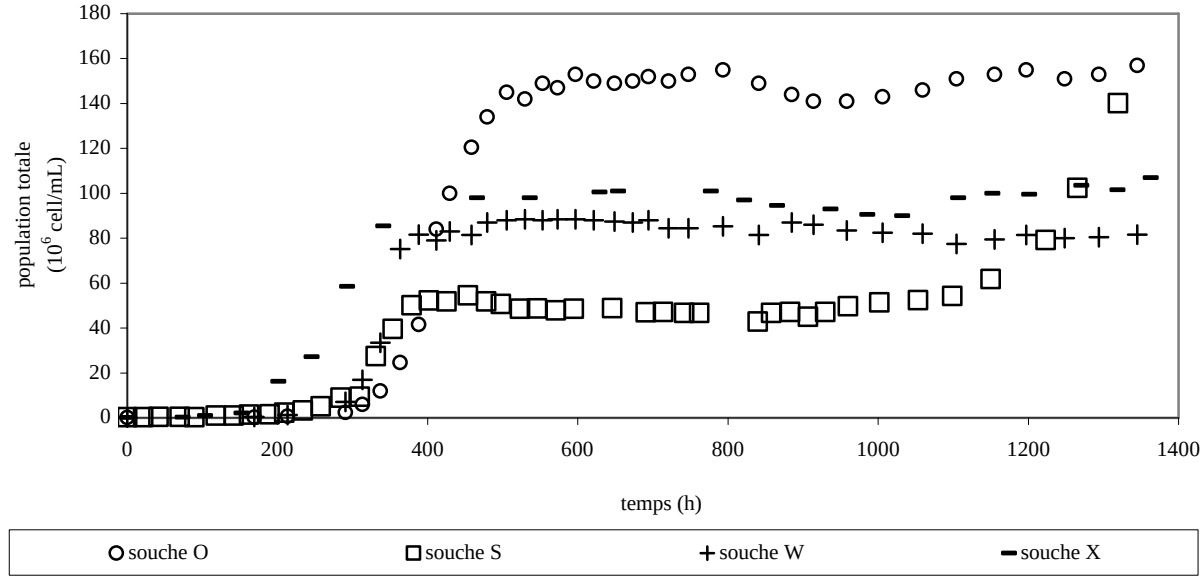


Figure 04D-5b. Souches O et S (gg 1), W et X (gg 3)

Figure 04D-5. Profils de croissance sur milieu SWM de 9 souches de B. bruxellensis.

Les neufs profils de croissances obtenus différent les uns des autres, tant au niveau cinétique qu'au niveau des populations atteintes (variant de 80.10^6 à 160.10^6 cell/mL). On peut cependant effectuer un regroupement par grands types de profils.

- Profils de type 1. Une croissance simple et classique (latence, phase d'accélération, phase exponentielle ou assimilée, phase de ralentissement, phase stationnaire suivie ou non d'un déclin). On retient ici une très longue phase stationnaire après la phase de croissance « exponentielle » : souches B, O et W
- Profils de type 2. Une croissance double. La première croissance, classique est suivie par une seconde croissance lente et quasi-linéaire : souches D et Q
- Profils de type 3. Une croissance double. La première croissance, classique est suivie par une seconde croissance exponentielle. Ces deux croissances sont séparées par une longue phase stationnaire : souches H et S
- Profils de type 4. Une croissance double. La première croissance, classique est suivie après une phase stationnaire par une seconde croissance progressive et lente, sans pour autant être linéaire. Ce type se situe à mi-chemin entre les types 2 et 3 : souches V et X.

Des souches présentant des profils d'une même tendance n'appartiennent pas forcément au même groupe génétique (souches B et W). A contrario, deux souches d'un même groupe génétique ne possèdent pas systématiquement le même type de croissance (souches O et S). Le regroupement génétique effectué auparavant ne correspond pas donc pas au classement des profils de croissance. Nous retiendrons pour la suite comme souches « modèles » des 3 principaux schémas de croissance les souches B, Q et S (Figure 04D-6). Nous confondons le type de profil 4 avec le profil 2 et nous nous limitons donc par la suite aux trois profils clé.

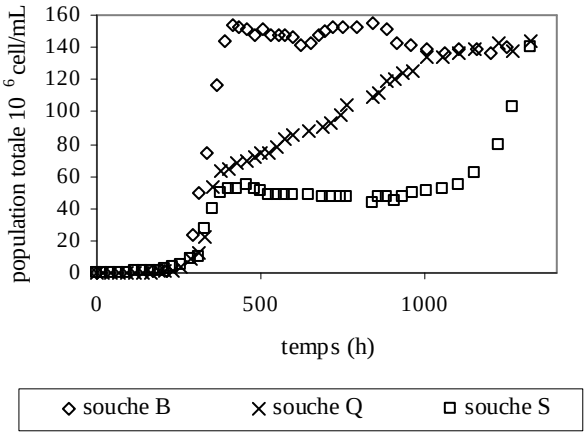


Figure 04D-6. 3 exemples de souches définissant les profils type de croissance.

2.2.2.2 – La biomasse finale.

Le tableau 04D-permet de renforcer la notion de différences existant entre les souches lors de la culture sur milieu synthétique. Ainsi, d'une souche à l'autre, les *Brettanomyces sp.* sont capables d'une conversion en biomasse finale pouvant varier du simple au quadruple en terme de poids sec.

Tableau 04D-3. Biomasse et population finale après 1400 heures de culture sur milieu synthétique pour 9 souches B. bruxellensis.

souche	biomasse finale (g/L)	population finale (10^6 cell/mL)
B	1,88	136
D	1,35	90
H	2,6	70,4
O	1,55	157
Q	1,54	143,3
S	0,68	140,1
V	2,08	63,8
W	0,5	81,6
X	0,94	107

Nous notons par ailleurs que les souches produisant le plus de biomasse ne sont pas systématiquement les souches produisant le nombre final de cellules le plus important. Le rapport biomasse/population cellulaire varie significativement (de $0{,}005.10^{-6}$ à $0{,}04.10^{-6}$ g/cellule). Ce résultat se retrouve d'ailleurs dans la notion même de diversité morphologique en ce sens où au moment de l'arrêt des cultures, les souches présentent des différences significatives, tant au niveau de la forme des cellules que de leur taille.

Dans l'absolu il ne nous est pas possible de réaliser un bilan matière complet sur le carbone car nous ne connaissons pas l'ensemble des sources de carbone ni le CO_2 dégagé. Le tableau 04D-4 présente malgré tout en première approximation la fraction massique de carbone du substrat intégrée dans la biomasse (yc) pour chaque souche.

Pour ce faire nous supposons en premier lieu une composition élémentaire identique pour toutes les souches donnée par : $C_1H_{0,154}O_{0,83}N_{0,107}$ correspondant à la composition de la souche étudiée par Aguilar Uscanga (1998). Cette composition correspond donc dans la biomasse à 5,5 % d'azote et 44,5 % de carbone en pondéral. (Suite au bilan d'azote qui sera présenté au paragraphe 4- , nous rediscuterons cette hypothèse de formule élémentaire unique pour toutes les souches).

Par ailleurs, nous supposons que la seule source de carbone utilisée est le sucre. (Par souci de simplicité en premier lieu nous négligeons la contribution de l'éthanol, et celle éventuelle d'autres substrats carbonés).

Tableau 04D-4. Rendement et fraction massique de carbone provenant du sucre transformée en biomasse.

souche	Yx/s (g/g)	yc (%)
B	0,19	21
D	0,14	15
H	0,28	31
O	0,16	17
Q	0,15	17
S	0,07	08
V	0,21	23
W	0,08	08
X	0,09	10

L'assimilation du carbone fourni par les sucres dans la biomasse varie donc sensiblement d'une souche à l'autre et constitue de ce fait un élément supplémentaire de la diversité intra-spécifique. Certaines souches, telles que W, S et X utilisent donc principalement le carbone disponible à d'autres fins que la simple production de biomasse (métabolites, CO_2, énergie et maintien), en comparaison aux souches H, B et S par exemple. On retiendra cependant à titre indicatif, une moyenne de 17 % du carbone provenant du sucre transformé en biomasse. Dans une approche plus rigoureuse, ce résultat est à modérer à la baisse du fait des hypothèses simplificatrices retenues (notamment l'existence de substrats secondaires).

2.2.2.3 – Latence apparente et phases stationnaires.

a - Attention danger !

Malgré l'emploi d'un levain et un ensemencement au moment où les levures sont en pleine phase exponentielle de croissance, donc des levures en pleine activité, on observe pour l'ensemble des souches une phase de latence apparente initiale très longue, la plus courte étant de 200 heures environ pour la souche X. L'existence de telles phases de latence, mais également des phases stationnaires de plusieurs centaines d'heures pour les profils en deux épisodes de croissance est un élément capital à prendre en compte dans les suivis et contrôles de population contaminante en cave. En effet, elle suppose qu'une population détectée à un très faible niveau un jour donné, suggérant à priori un danger négligeable voire insignifiant pour le praticien, peut au bout de quelques jours de relâchement dans le suivi, se transformer en situation catastrophique où il n'est plus possible de faire machine arrière. Ce point est d'autant plus vrai et important à intégrer qu'il est difficile d'anticiper le développement de *Brettanomyces* à partir d'un niveau de population donné, voire même un inoculum donné.

b- Influence de l'inoculum X_0

Comme le montre la figure 04D-7, les temps de latence apparente varient considérablement avec des niveaux d'ensemencement (X_0) différents. Nous comparons pour une souche donnée (souche B) ici les profils de croissances obtenus pour plusieurs valeurs de X_0 : 10^2, 10^3, 10^5 et 10^6 cell/mL.

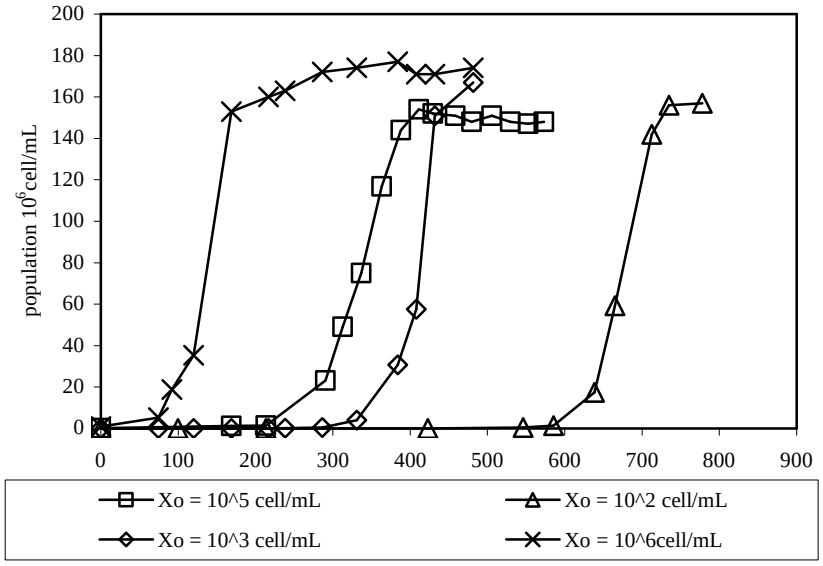


Figure 04D-7. Souche B. Influence de l'inoculum sur le profil de croissance.

Nous ne présentons ici que l'exemple de la souche B. Les souches Q et S ont elles aussi été soumises à ce test et ont présenté des résultats semblables.

Il est intéressant de noter que lorsque la croissance devient significative (nous emploirons même le terme illustré de croissance « fulgurante ») au-delà de quelques 10^6 cell/mL, on observe une vitesse quasi identique sur l'ensemble des cultures comparées pour une souche donnée (par comparaison de la pente pendant la phase « exponentielle »).

Il n'est alors pas possible pour aucune des 3 souches testées d'établir quelques modèles prédictifs que ce soit (entre la valeur de l'inoculum X_0 et la durée de la phase précédente la croissance « fulgurante »). Il n'y a pas de manière évidente de relation linéaire, ni de relation géométrique entre ces grandeurs (ou leur fonctions associées tels que le log). Aucun modèle proposé dans la bibliographie n'est adapté à ces résultats. Nous n'entrons pas d'avantage dans ces considérations et retenons seulement que quelque soit l'inoculum considéré, la population finit par atteindre des niveaux très importants après des temps de cultures variables et difficiles à prévoir. On comprend dès lors tout l'intérêt d'un suivi constant, et régulier, dès les encuvages (état des lieux du risque initial dès les premières étapes de vinification), mais surtout dans les situations les plus à risques, telles que les phases d'attente entre la fin de la fermentation alcoolique et la fermentation malo-lactique, les phases d'élevage des vins, qu'il soit réalisé en barrique ou en cuves (Renouf et Lonvaud-Funel, 2006b et

2006c). La constance et la régularité des dépistages doivent alors permettre d'appréhender les phases de démarrage significatif de la population, et d'agir alors à temps.

Nous soulignons alors que la notion de niveau de population seuil (à partir duquel la population devient dangereuse ou le risque très grand) apparaît comme erronée en ce sens où un développement ultérieur et important de la population peut avoir lieu, et ce de manière inexpliquée. C'est donc plus dans une logique de dynamique et d'évolution des populations détectées qu'il faut s'inscrire pour prévenir la détérioration du produit par le contaminant.

Nous employons volontairement le terme de latence apparente. En effet, le propos précédemment tenu accompagne la figure 04D-7. Or, sur cette dernière, nous avons raisonné sur les populations lorsqu'elles sont supérieures à 10^6 cell/mL (ordre de grandeur sur le graphique). Il convient alors de rappeler que les inocula de 3 des 4 cultures comparées sont inférieurs à 10^6 cell/mL (10^2, 10^3 et 10^5). L'estimation de la population totale par numération avec une cellule de Thoma n'est pas possible à ce niveau de concentration.

Néanmoins, il nous est possible de zoomer sur ces populations plus faibles correspondant au début des cultures avant que la croissance ne devienne fulgurante et quantifiable sous microscope (de l'ordre de 10^5-10^6 cell/mL). Pour ce faire, nous effectuons les suivis par numération sur boite.

La figure 04D-8 représente donc le suivi de population (en UFC/mL) pour les cultures $X_0 = 10^2$, 10^3 cell/mL, avant d'arriver à une concentration équivalente à 10^6 cell/mL.). (Le suivi de la culture pour $X_0 = 10^5$ cell/mL n'a pas été suffisamment serré pour avoir des points significatif ente 10^5 et 10^6 cell/mL, nous ne le représentons donc pas).

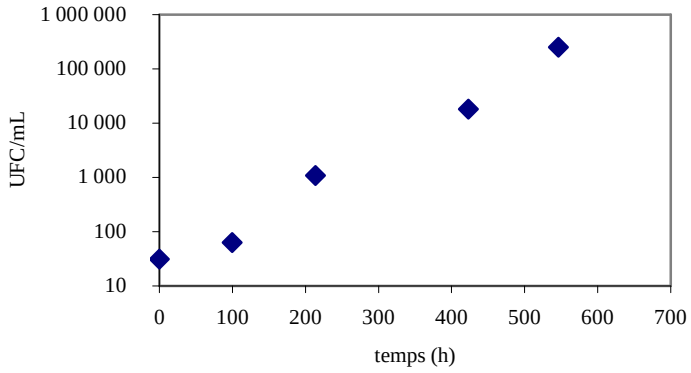


Figure 04D-8a. X0 = 10^2 cell/mL

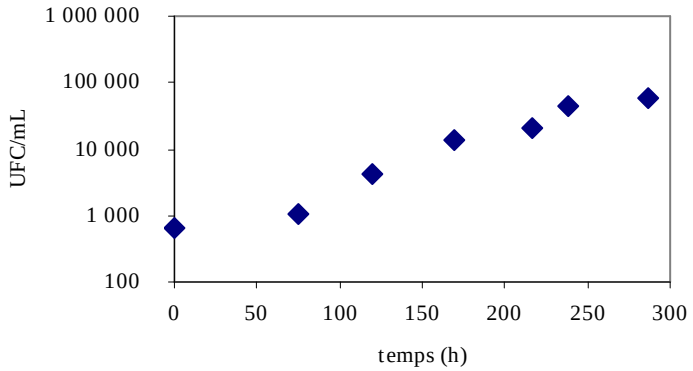


Figure 04D-8b. X0 = 10^3 cell/mL

Figure 04D-8. Souche B. Début de culture pour des ensemencements très faibles.

Nous portons l'attention sur l'axe des ordonnées en échelle logarithmique pour plus de lisibilité des résultats.

Nous constatons donc que ce qui apparaissait comme un phase de latence du fait d'une échelle non significative sur la figure 04D-7 est en fait, une phase pendant laquelle les populations augmentent progressivement pour passer du niveau d'ensemencement faible (10^2 et 10^3) au niveau 10^6 cell/mL. Passé cette étape, la croissance s'accentue de manière importante pour donner cette phase « fulgurante » qui permet alors d'atteindre des populations très importantes.

Nous pouvons par ailleurs préciser, au regard de la figure 04D-8 que cette croissance se fait en première approximation pour ces deux cultures suivant une loi du type.

$X = X_0 \, e^{\mu t}$

X est la biomasse (exprimée en UFC/mL)

µ une constante (obtenue à partir d'une linéarisation de la courbe de croissance) : correspondant à un taux de croissance népérien (taux de croissance spécifique) : en h^{-1}

t, le temps exprimé en (h).

Nous obtenons une telle loi en négligeant l'éventuelle latence réelle (sans variation de la population) pendant les toutes premières heures de cultures. Nous n'avons en effet pas suffisamment de points précis au démarrage de cette expérimentation pour savoir s'il en existe une et sa durée. De ce fait, l'ensemble des points a été utilisé dans la linéarisation.

Nous obtenons alors pour $X_0 = 10^2$, $\mu = 0{,}008$ et $X_0 = 10^3$, $\mu = 0{,}0088\ h^{-1}$, soit des grandeurs quasiment identiques. De plus les coefficient de corrélation obtenus (respectivement 0,97 et 0,96) permettent de dire que l'hypothèse d'une absence de vraie phase de latence est fondée pour ces deux cultures. Ainsi, nous montrons que le taux de croissances spécifique n'est pas déterminé par l'inoculum.

Il est cependant ici trop hâtif de vouloir généraliser ce résultat, en l'extrapolant à l'ensemble des valeurs possibles de X_0 (notion de seuil et de temps de génération ou équivalent) et d'y voir d'emblée une projection dans la pratique, tel qu'un outil de prédiction des niveaux de population.

Nous n'avons ici que l'exemple d'une souche (or comme nous montrerons tout au long de ce module, la notion de diversité intra-spécifique au sein de l'espèce rend toute généralisation délicate), De plus nous rappelons plus particulièrement que nous sommes dans cette expérimentation dans un cadre particulier, à savoir un inoculum réalisé à partir d'un levain en pleine phase exponentielle de croissance. Or dans la pratique, les levures que nous sommes susceptible de détecter à un moment ou un autre du procédé ne sont pas nécessairement dans cet état physiologique et peuvent donc avoir des comportement totalement différent suivant leurs antécédents.

Néanmoins, force est de constater que ces premiers résultats ouvrent une piste qu'il serait intéressant d'explorer.

2.2.2.4 – Discussion et considérations diverses sur les profils de croissances.

a – Hypothèses.

Pour les profils de croissance de type 1 (souche B) nous pouvons supposer qu'un substrat principal est consommé et converti en biomasse lors de l'unique phase de croissance. La comparaison des deux profils, de croissance et de consommation des sucres montre clairement que le mélange (Glucose/Fructose) constitue ce substrat limitant. Lorsque ces substrats sont épuisés, ce type de souche est incapable de métaboliser les éventuels autres substrats présents dans le milieu pour poursuivre sa croissance. Néanmoins, elle semble y trouver des ressources énergétiques suffisantes pour maintenir sa population à un niveau (éventuellement dans un état physiologique spécifique de maintien) quasi constant sur du très long terme (plus de 1000 heures parfois). A ce stade, nous ne sommes pas encore en mesure de préciser la nature de ce/ces second/s substrat/s de maintien.

La souche W, qui pourtant possède elle aussi une croissance en une seule étape se comporte différemment vis-à-vis des sucres. En effet, ces derniers sont consommés aussi bien pendant la phase de multiplication cellulaire que pendant la longue phase stationnaire qui suit. Nous supposons qu'un substrat voire un co-substrat limitant, autre que les sucres, fait défaut dans le milieu, bloquant la poursuite de la croissance de la levure.

Dans le cas des profils de type 2 (souches D, Q) avec une seconde phase linéaire, nous retrouvons le schéma classique d'une croissance où un substrat est apporté progressivement en quantité limitée. La croissance a donc lieu mais se retrouve restreinte par cet apport. Nous supposons

donc qu'une telle restriction a lieu après la première phase de croissance. Parmi les éléments susceptibles de jouer le rôle de substrat (au sens large) limité et limitant, nous pensons en premier lieu à l'oxygène. En effet, les fermentations sont menées en fioles Erlenmeyer cotonnés et agités, donnant lieu à une micro-aération. Ces conditions peuvent aboutir à des limitations dans le transfert d'oxygène par rapport au besoin des micro-organismes en culture (nous discuterons cette hypothèse par la suite).

Les profils de type 3 (H, S, V) suggèrent une diauxie. Des travaux antérieurs évoquent la capacité du genre *Dekkera/Brettanomyces* à basculer du glucose vers un autre substrat afin d'entamer une seconde croissance dans le cas de milieux contenant plusieurs substrats de développement potentiels. Les deux phases de croissance sont alors séparées par une phase d'adaptation du métabolisme levurien nécessaire à l'assimilation du second substrat. De tels comportements sont décrits lorsqu'un mélange de sucres tels que {Glucose + Cellobiose} ou {Glucose + Saccharose} est proposé comme nous l'avons déjà évoqué dans l'analyse bibliographique, (Blondin et al. 1983, Gilis 1999, Gondé et al. 1982, Parekh et al. 1988). Le glucose est alors toujours consommé en premier. Le glucose et le fructose sont les seuls sucres présents dans le milieu de culture utilisé. Mais la comparaison des Figures 04D-4 et 04D-5 montre clairement que le profil de croissance en diauxie ne correspond à aucune bascule dans les consommations des deux carbohydrates. Nous notons même que pour les souches H, S et V les deux phases de consommation simultanée des deux sucres, séparées par une phase où les concentrations non nulles ne varient pas, se superposent à celles de la croissance. L'hypothèse formulée est alors celle de l'existence d'un facteur de croissance ou un substrat faisant défaut au terme de la première phase de croissance et obligeant la levure à une réadaptation de son métabolisme pour poursuivre l'assimilation des sucres (et éventuellement d'autres substrats).

Dans le cas des souches intermédiaires des types 2 et 3 (X notamment) une combinaison entre diauxie et limitation par un facteur ou substrat nécessaire et disponible de manière restreinte et progressive peut être envisagée. L'oxygène apparaît là encore comme un candidat potentiel. Les sucres, épuisés au terme de la première phase de croissance sont donc pour ces souches également le premier substrat limitant.

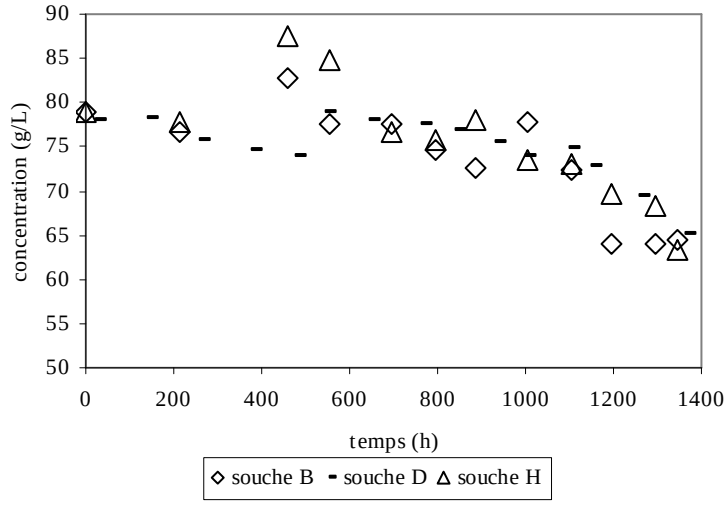
b- Substrat et métabolites secondaires ?

Les différentes hypothèses formulées précédemment suggèrent l'existence de substrats secondaires dans le milieu, autres que les deux sucres fermentescibles présents.

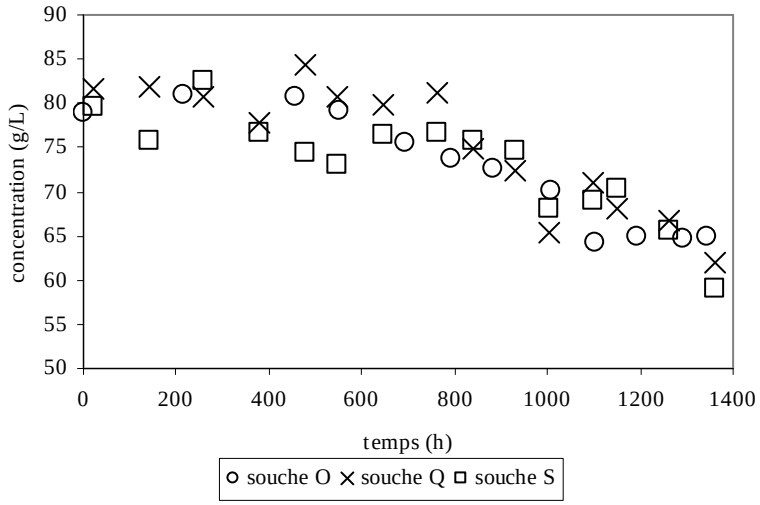
§ Ethanol.

L'éthanol est reconnu comme source potentielle de carbone et d'énergie pour *Brettanomyces sp.* lors de cultures anaérobie ou semi-aérobie. (Rodriguez et al., 2001 ; Freer, 2001 ; Geros et al., 2000). La micro-aération réalisée lors de nos fermentations correspondrait ainsi à une condition favorable à l'oxydation de cet alcool en acide acétique, puis en biomasse (Ciani et Ferraro, 1997).

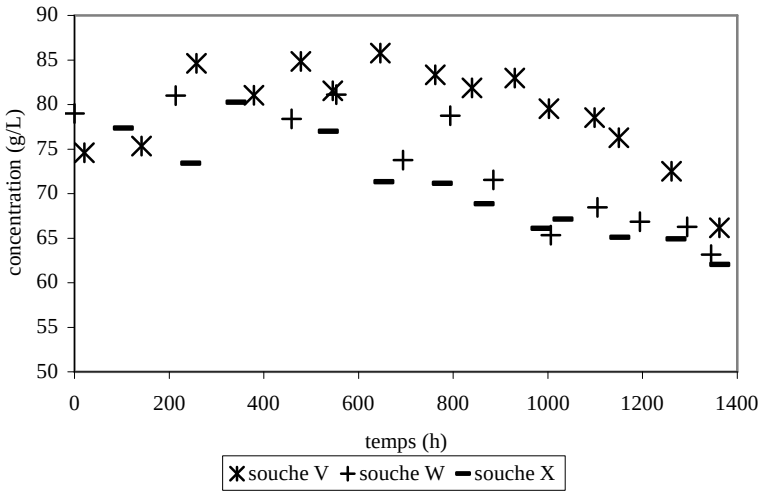
Nous montrons sur la figure 04D-9 les profils de consommation de l'éthanol.



- Figure 04D-9a



- Figure 04D-9b



- Figure 04D-9c

Figure 04D-9. Consommation de l'éthanol par 9 souches de B. bruxellensis.

Les profils de variation de l'éthanol en cours de fermentation sont corrigés de la diminution de ce composé due à l'évaporation, (une perte de 0,185 g/L/jour) Ce résultat est obtenu à partir d'une expérimentation témoin sur milieu stérile incubé dans les mêmes conditions en faisant l'hypothèse d'une évaporation à vitesse constante et d'une variation négligeable de volume (Cf Annexe 06).

L'ensemble des souches testées est capable de consommer l'éthanol. La souche H, avec une diminution globale de 24,6 ± 1,23 g/L est la souche qui appauvrit le plus le milieu, à l'opposé de la souche V qui provoque une diminution de moitié moindre (12,9 ±0,65 g/L). Pour 7 des 9 souches, la diminution de l'éthanol est amorcée dès la première centaine d'heures, c'est-à-dire alors qu'il reste encore du sucre, glucose et fructose, dans certains cas.

En revanche, nous remarquons que 2 souches (H et X) produisent dans les premiers temps de la culture une quantité non négligeable d'éthanol (pratiquement 10 g/L) qui est par la suite re-consommé. Cette production se fait parallèlement à la première phase de croissance.

Par la suite, pour les 9 souches, la diminution de l'éthanol dans le milieu est plus marquée au-delà de 700 heures lorsque la culture est soit en état stationnaire, soit en cours de seconde phase de croissance. Ce caractère est particulièrement marqué dans le cas des souches H et V.

Dans le cas précis des souches présentant un profil de croissance diauxique (type 3) (H et S notamment), le démarrage de la seconde croissance (respectivement 1200 heures et 1300 heures) ne coïncide pas avec la phase la plus marquée de consommation de l'alcool (respectivement 800 et 900 heures). Ainsi, même si ce composé est susceptible d'être utilisé comme source de carbone pour former de la biomasse lors de la seconde croissance, il est également consommé à d'autres fins, notamment pendant la phase de réadaptation. Nous ne pouvons malheureusement pas préciser d'avantage cet aspect au regard de cette expérience.

§ Acide acétique.

Nous compilons les profils de production d'acide acétique pour les 3 souches sur la figure 04D-10.

Les souches présentées ont donc des capacités de production d'acide acétique très différentes les unes des autres. Ainsi, trouve-t-on des souches peu acidifiantes (produisant moins de 1 g/L pour S, H et V qui n'en produit pratiquement pas), et des souches acidifiantes voire très acidifiantes tels que B, Q, W et X capables de produire plus de 5 g/L d'acide acétique. Là encore la notion de diversité intra-spécifique se retrouve renforcée par cette variabilité dans l'aptitude des souches à transformer l'alcool (ou les sucres) en acide acétique.

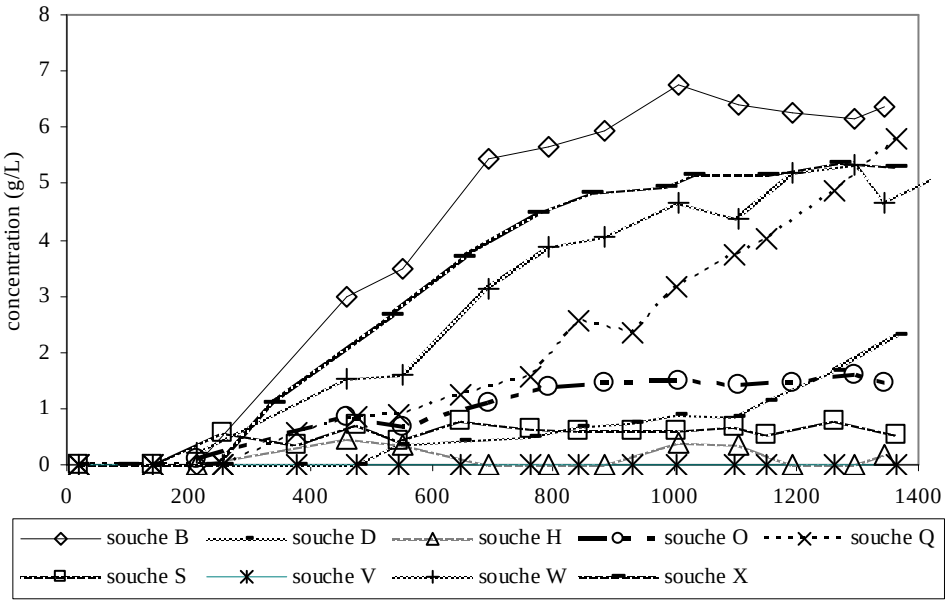


Figure 04D-10. Production d'acide acétique par 9 souches de B. bruxellensis.

La mise en regard des profils de production de l'acide acétique avec les profils de croissance permet de mettre en avant plusieurs comportements :

- § Pour 3 souches (B, W et X), la production est amorcée dès la première phase de croissance et se poursuit de manière peu importante, voire pas de production (plateau) tout au long de la phase stationnaire et/ou pendant la seconde phase de croissance.
- § La souche O présente un comportement proche, mais est caractérisée par une production beaucoup plus faible. Au même titre que la souche H. Pour ces souches, la concentration d'acide a atteint un palier qui ne sera pas dépassé jusqu'à la fin de la culture malgré le démarrage ultérieur d'une deuxième phase de croissance. Ainsi, certaines de ces souches possèdent un métabolisme de deuxième croissance qui n'implique pas la production d'acide acétique.
- § La souche Q, quant à elle amorce la production en parallèle de la première étape de croissance. La seconde phase de croissance, linéaire s'accompagne alors d'une production constante et quasi linéaire d'acide acétique.
- § La souche S atteint déjà la concentration maximale au bout de 250 heures alors que la croissance ne commence qu'entre 250-300 heures, laissant supposer une acidification antérieure à la croissance. Nous avons alors une concentration en acide qui reste inchangée pendant la phase stationnaire qui suit et pendant la seconde phase de croissance. La souche semble donc avoir atteint rapidement une concentration limite/inhibitrice en acide acétique, ce qui, d'après les observations faites par Maiorella et al (1983) et rappelées par Aguilar-Uscanga (1998) affecte sa croissance sur glucose. Néanmoins, après une phase de réadaptation aux contraintes du milieu (longue

phase stationnaire), la levure est capable de reprendre sa croissance sur les sucres encore présents. Son métabolisme semble alors modifié, n'utilisant plus les voies de production de l'acide acétique (concentration stationnaire). Ce qui apparaissait donc en premier lieu comme une diauxie pour la souche S relève plus d'après ces observations d'une croissance découpée en deux parties séparées par une phase de réadaptation aux contraintes du milieu. Nous rappelons que pour S la seconde phase de croissance est associée à une seconde phase de consommation des sucres encore présents à la fin de la première phase de croissance.

§ A l'inverse, pour la souche D, nous ne relevons pas de production significative au cours de la première étape de croissance. La production n'a lieu et s'accentue réellement qu'au cours de la seconde phase de croissance linéaire et progressive. Nous observons par ailleurs que la production d'acide acétique est ici liée à la diminution marquée de l'éthanol lors de la seconde croissance. Bien qu'appartement au même groupe de profil de croissance que Q, la production de l'acide se fait selon un schéma sensiblement différent en ce sens où Q produit cet acide en accompagnement de sa première croissance.

Nous remarquons que les souches B et X tendent vers un palier respectivement à 6,4 ± 0,15 g/L (la teneur maximale relevée sur l'ensemble des souches testées) et 5,3 ± 0,07 g/L. Le milieu étant encore riche en éthanol nous pouvons donc préciser que ces concentrations sont pour ces souches les concentrations maximales qu'elles peuvent produire dans les conditions de la culture. Nous retrouvons une valeur limite du même ordre de grandeur que celle présentée comme inhibitrice par Aguilar-Uscanga (1998). D'autres souches en revanche semblent se limiter à des valeurs beaucoup plus faibles, à l'image des souches O et S, présentant un palier dès 1,48 ± 0,05 g/L et 0,62 ± 0,07 g/L. Elles montrent une probable résistance moindre à ce composé. On rappelle que l'acide acétique est reconnu, dans sa forme dissociée, comme inhibiteur potentiel sur la croissance microbienne (Pampulha et Loureiro, 1989 ; Powchinda et al., 1995).

Pour la majorité des souches testées (sauf D) il n'est possible de relier linéairement la consommation en éthanol à la production de l'acide acétique. Ces deux phénomènes ne sont donc pas en couplage direct. Le schéma de conversion : glucose → éthanol (+ CO_2) → acide acétique, couplé avec la production de biomasse pouvant intervenir à chacune de ces étapes rend le bilan difficile à établir avec les expériences menées ici.

Notre propos étant la mise en avant d'une diversité comportementale, nous ne tentons pas de calculer les bilans de consommations et productions afin de mieux cerner les schémas de conversion potentielle. A ce titre, nous ne prenons notamment pas en compte tous les autres substrats potentiels

présents (acides organiques, acides aminés) et les métabolites produits. Nous pouvons simplement préciser pour l'ensemble des souches considérées, nous n'observons pas de variation significative de la concentration en glycérol, supposant la non utilisation de ce composé dans les conditions des fermentations (Cf annexe 07). Seule la souche B présente une variation significative de la concentration en glycérol. En effet, nous relevons une perte globale de 0,9 ± 0,01 g/L, soit une variation d'environ 15 % par rapport à la concentration initiale (variation supérieure donc aux 5 % d'erreur donnée par la méthode de dosage).

c- Micro aération … limitation en oxygène ?

Comme nous l'évoquons dans les hypothèses 2.2.2.4-a, une limitation ou une restriction dans l'apport d'oxygène est envisageable comme explication de certains profils de croissances observés : arrêts de croissance, croissances ralenties et progressives, etc.

Du fait du montage expérimental : utilisation de flacons Erlenmeyer, cotonnés et agités à 150 rpm, nous pouvons en effet suspecter une telle limitatio : conditions de micro-aération. Nous envisageons donc de tester ce paramètre pour 3 souches, B, Q et S, représentatives chacune d'un type de profil (Figure 04D-6).

La mesure de l'oxygène dissous se fait ponctuellement en cours de fermentation. (Figure 04D-11)

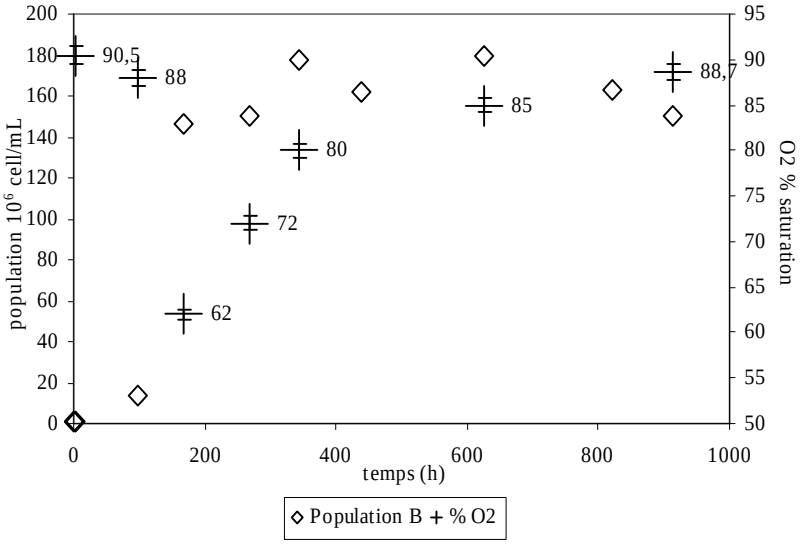


Figure04D-11a Souche B

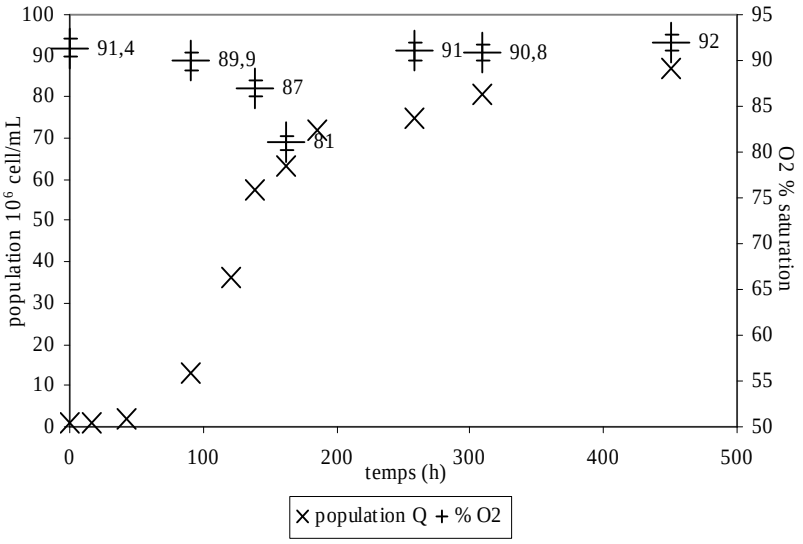


Figure04D-11b Souche Q

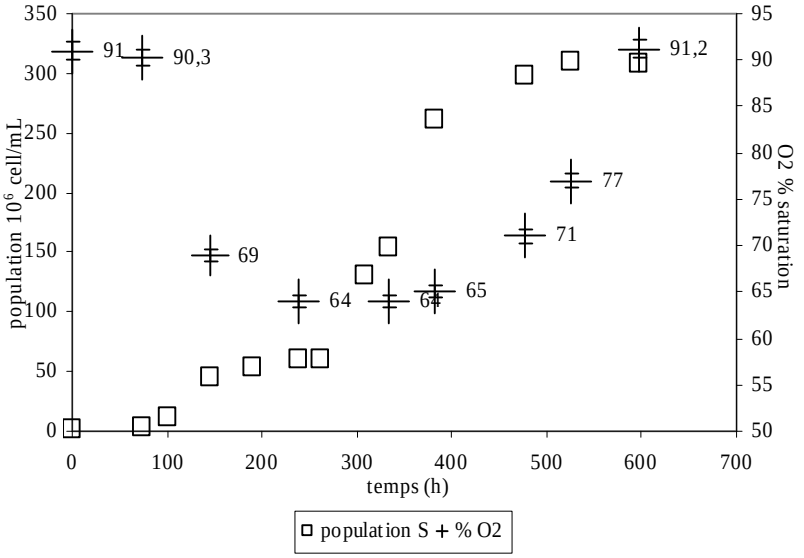


Figure04D-11c Souche S

Figure 04D-11. Evolution de l'oxygène dissous (pO_2) en cours de culture pour 3 souches de B. bruxellensis.

Nous précisons que l'inoculum s'effectue à 10^6 cell/mL, et non à 10^5 cell/mL comme lors de la précédente expérimentation. Nous constatons alors que les profils pour les souches B et Q, respectivement de type 1 et 2 sont inchangés, celui de S est modifié. En effet, la phase stationnaire entre les deux étapes de croissances est écourtée à 100 heures au lieu de 500 heures. Nous n'expliquons pas ce changement, non attribué à une variabilité et contingence expérimentale car rencontrée lors des différents essais de cultures à inoculum 10^6cell/mL. Ce résultat montre donc que la

durée de cette phase d'adaptation avant la reprise de croissance est dépendante de l' « historique » de la première phase de croissance.

Nous observons un décalage systématique lors des mesures de pO_2. Ainsi le point initial avant ensemencement n'est pas à 100% saturation mais proche de 91 %. Nous pouvons supposer qu'il s'agit là d'un effet matrice par rapport à la calibration de la sonde. En effet, celle-ci est calibrée dans de l'eau distillée. Notre milieu contient des solutés susceptibles de modifier la conductivité et par conséquent la mesure. On confirme qu'il ne s'agit alors là que d'une translation constante qui se retrouve pour tous les points. Les interprétations que nous tirons des graphiques présentés n'en sont donc pas modifiées.

Nous rappelons que l'annexe 03 présente la corrélation entre % de saturation et concentration en mg/L

Dans le cas de la souche B la consommation en oxygène se superpose à l'unique étape croissance. Ainsi c'est au moment de la pleine phase de croissance (assimilée à une phase exponentielle) que la concentration en oxygène chute dans le milieu pour atteindre une valeur minimale proche de 60 % de la saturation lorsque la vitesse de croissance est maximale. Lors du ralentissement de croissance, la concentration augmente de nouveau pour atteindre de nouveau le niveau maximal lors de la phase stationnaire. Ainsi, lors de cette longue phase qui suit la croissance, la levure qui se maintient consomme très peu, voire pas d'oxygène. Le transfert d'oxygène, lors de cette micro aération n'est donc pas limitant et permet d'apporter l'oxygène en quantité suffisante tout au long de la croissance de la souche B.

La phase de consommation la plus importante d'oxygène par la souche Q est également la première étape de croissance. Ainsi, la pO_2 diminue de manière importante lors de la phase d'accélération et de pleine croissance (entre 100 et 200 heures). Nous notons que la concentration minimale demeure très élevée, en comparaison à la souche B. Mais nous rappelons que les niveaux de population à ce moment ne sont pas les mêmes. Alors que B avoisine les 160 millions de cellules/mL à la fin de phase quasi exponentielle, Q n'atteint que 60 millions de cellules/mL. Alors que nous pensions dans nos hypothèses que la limitation en oxygène après cette première phase de croissance était la cause de la croissance linéaire et progressive qui a lieu au bout de 200 heures de culture, nous nous rendons compte d'après le profil de variation en oxygène dissous que ce n'est pas le cas. Nous observons même une ré-augmentation de la teneur en oxygène disponible jusqu'à sa la saturation, montrant que le transfert en oxygène dans le milieu est au moins égal voire supérieur au besoin. L'oxygène n'est donc pas le substrat limitant dans la seconde étape de croissance dans le cas de la souche Q.

Tout comme les deux souches précédentes, la consommation en oxygène accompagne pour la souche S la première étape de croissance. Lors de la phase stationnaire que nous avons supposée être une étape d'adaptation avant nouvelle croissance, la consommation se maintient à son niveau le plus important (pO_2 représentant 65% de la saturation). Le second épisode de croissance se fait également

selon un mécanisme respiratoire (au moins en partie), car la teneur en oxygène reste « faible » mais affiche une légère remontée. Ce n'est qu'à la fin de cette seconde croissance que l'oxygène dissous retrouve son niveau maximal. Le transfert en oxygène est alors au moins égal ou supérieur au besoin. Il n'y a donc pas non plus limitation par l'oxygène, suffisamment fourni par la micro-aération.

Nous n'avons ici étudié que 3 des souches, mais pouvons supposer que pour l'ensemble des fermentations, le transfert d'oxygène dans le milieu est suffisant pour répondre aux besoins des levures. Ainsi, la disponibilité en oxygène n'est pas le facteur qui permet de comprendre les profils de croissances complexes obtenus (phases de ralentissement, stationnaires, etc...).

3 – Azote assimilable.

Classiquement en œnologie, on considère que Azote assimilable = azote ammoniacal + azote alpha aminé, (Fleet, 1993 ; Butzke, 1998). Le tableau 04D-5 présente le bilan global en azote assimilable.

Tableau 04D-5. Dosage final et variation globale en azote assimilable au cours de la culture.

souche	concentration finale (mg/L)	dont azote (mg/L)		variation globale (mg/L)
		ammoniacal	alpha aminé	
B	5,2	0,0	5,2	116,8
D	14,5	4,5	10,0	107,5
H	18,7	0,9	17,8	103,3
O	10,6	0,0	10,6	111,4
Q	8,1	5,3	2,8	113,9
S	8,1	1,1	7,0	113,9
V	10,5	3,0	7,6	111,5
W	20,4	10,1	10,3	101,6
X	15,6	8,6	7,0	106,4

Remarque :

Le milieu SWM contient initialement : 122 ± 0,4 mg/L (décomposé en 92,7 mg/L et 29,3 mg/L respectivement en azote ammoniacal et alpha aminé).

Les souches testées ont donc des consommations globales différentes. Au terme des 1400 heures de fermentation, certaines souches ont consommé la quasi-totalité de l'azote assimilable présent dans le milieu (provenant de l'extrait de levure et du $(NH_4)_2SO_4$) : souche B, et dans une moindre mesure les souches Q et S. A l'opposé, certaines souches n'ont consommé que 85 % de l'azote initial, à l'image des souches H et W.

Nous ne pouvons cependant pas statuer sur le caractère limitant strict ou non de l'azote. En effet, aucune des fermentations n'est caractérisée au moment de son arrêt par une concentration nulle. Nous n'y pouvons donc pas y associer les arrêts de croissances observés ou non. Cependant, il semble que l'azote, présent aux concentrations de notre milieu synthétique n'apparaisse pas comme un facteur limitant pour la croissance de *B. bruxellensis*. Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Aguilar-Uscanga (1998), utilisant un milieu synthétique minimum ne contenant que 0,5 g/L de sulfate d'ammonium (soit 102 mg/L d'azote). Ce même auteur montre néanmoins un effet inhibiteur de ce composé au-delà de 2 g/L (soit 408 mg/L d'azote).

Nous pouvons par ailleurs constater que les souches B et O, en phase stationnaire depuis une longue période présentent une concentration nulle en azote ammoniacal. Nous devons néanmoins nuancer notre propos dans le cas des souches B et O. En effet l'azote résiduel étant exclusivement alpha-aminé, nous pouvons penser qu'il s'agit d'un relargage par les levures lors de la phase stationnaire (à ce titre, il convient de ne pas le considérer comme une fraction assimilable à proprement parler). De plus notre dosage ne permet pas une différenciation au sein de l'azote alpha-aminé. Dès lors, une carence peut éventuellement exister au niveau d'un acide aminé donné. Ne possédant pas la cinétique de consommation de l'azote sur cette expérience, nous ne pouvons pas préciser si l'arrêt de la croissance coïncide avec un tel phénomène, mais nous ouvrons là une piste à exploser. Cette piste est d'autant plus intéressante que W, qui présente pourtant le même type de profil n'a pas consommé la globalité de cet azote ammoniacal.

Nous remarquons enfin que l'azote résiduel est majoritairement l'alpha-aminé laissant supposer pour l'ensemble des souches testées une consommation préférentielle pour l'azote ammoniacal.

Au même titre que le carbone il ne nous est pas possible de fournir le bilan complet en azote. Le tableau 04D-6 présente cependant le pourcentage massique théorique d'azote dans la biomasse récupérée en fin de fermentation, si nous supposons que la globalité de l'azote assimilable consommé intègre la biomasse.

Tableau 04D-6. Pourcentage théorique d'azote dans la biomasse

souche	% N(biomasse)
B	6,2
D	7,9
H	4
O	7,2
Q	7,4
S	16
V	5,3
W	20
X	11,3

Ce résultat nous permet alors, sous réserve de notre hypothèse, de dire que les formules brutes de la biomasse varient sensiblement d'une souche à l'autre. La diversité se retrouve donc au niveau même de la composition des cellules.

Ce point est largement confirmé par une seconde approche, présentée dans le tableau 04D-7. En effet, si nous émettons l'hypothèse d'une unique formule brute pour toutes les souches (fournie en 2.2.2.2) – raisonnement par l'absurde-, nous obtenons les masses théoriques d'azote dans la biomasse formée, grâce aux poids secs en fin de culture et aux fractions massiques d'azote assimilable transformée en biomasse. Nous constatons alors que ces masses différent notablement des quantités d'azote assimilable consommé, fournies par nos dosages (tableau 04D-5).

Tableau 04D-7. Fraction massique d'azote assimilée dans la biomasse et masse théorique d'azote dans la biomasse.

souche	yn (g/g) x 10^4	Masse théorique N dans biomasse (mg)
B	8,95	103,4
D	6,98	75
H	1,4	143
O	7,74	85
Q	7,52	84,7
S	3,32	37,4
V	1,04	114
W	2,74	27,5
X	4,91	51,7

4 – Production de 4-Ethyl-Phénol.

4.1 – Production globale et cinétique de production.

La production de 4-éthyl-phénol vient elle aussi étayer la notion de diversité au sein de l'espèce *B. bruxellensis*. En effet, comme le suggère le tableau 04D-8, les neufs souches testées différent tant au niveau de la quantité maximale de 4-éthyl-phénol (Cmax) produit (variant de 0,35 mg/L à 2,773 mg/L) et donc du rendement de conversion du précurseur que du temps nécessaire pour arriver à cette concentration maximale (de 600 heures à 1360 heures).

Tableau 04D-8 – Concentration maximale en 4-éthyl-phénol ; temps de culture et population correspondants et taux de conversion molaire théorique de l'acide para-coumarique.

souche	Cmax (mg/L)	temps (h)	population (10^6 cell/mL)	Taux de conversion du coumarate (%).
B	2,59	600	146	69.6
D	2,773	1265	85,7	74.6
H	0,35	1300	55	9,4
O	2,762	1300	153	74,3
Q	1,905	1350	143,4	51,2
S	2,088	1350	140,1	56,1
V	0,453	1265	61,3	12,2
W	2,749	800	85,3	73,9
X	1,228	1363	107	33

Remarque :

Nous introduisons lors de la préparation du milieu : 5 mg/L d'acide p-coumarique. Un dosage du milieu SWM après auto-clavage, à l'instant initial ne permet d'en retrouver que 1,70 ± 0,12 mg/L. Il y a donc diminution de la quantité détectable et disponiblea priori dès l'instant t = 0 heure. Cette observation rejoint ce qui a été déjà montré par Medawar, 2003. En effet, cet auteur signale une perte de l'acide para-coumarique lors de préparation de solution pour sa gamme étalon. Cette « perte » est probablement due à des phénomènes d'instabilité du composé, associés à des re/combinaisons avec d'autres composés présents dans le milieu. (Des études sont menées pour comprendre les phénomènes concernés, Salameh, Laboratoire de Génie Chimique, communications personnelles). Or si on tient compte uniquement de ces teneurs détectées lors du dosage, il apparaît une évidente aberration dans la capacité de conversion du précurseur en phénol volatil. De ce fait, les Brettanomyces sont capables de métaboliser ces éventuelles formes de l'acide para-coumarique non détectables et dosables par la méthode employée, mais bel et bien présentes dans le milieu. Les taux de conversion : acide para-coumarique → 4 éthyl-phénol, présentés tiennent donc compte de la teneur théorique totale en para-coumarique introduite dans le milieu (5 mg/L).

Certaines souches sont donc très productrices d'éthyl-phénol, à l'image de D, O, W et B, capable de convertir 70 % (ou plus) de l'acide para-coumarique présent. Elles possèdent donc un fort potentiel de pollution organoleptique et s'affichent sans conteste comme de sérieuses candidates à la détérioration du vin lors de leur développement. D'autres souches telles que H et V, présentent une capacité de conversion relativement faible en comparaison (9 et 12 %).

Cette distinction au niveau de la capacité spécifique de conversion est en accord avec les observations faites parfois sur le terrain.

En effet, il est rapporté que des vins fortement contaminés par une population importante de *Brettanomyces* (de l'ordre de 10^4 voire même 10^5 cell/mL ou plus) ne présentent à la dégustation qu'un caractère peu voire pas marqué type *Brettanomyces* d'un point de vu défaut phénolé (communications de producteurs divers). Dans ce cas, on peut facilement imaginer que les contaminants implantés (qu'ils soient mono souche ou multi souche) sont de type : « faibles voire très faibles producteurs de phénols volatils ».

A contrario, des vins présentant un fort défaut organoleptique phénolé peuvent ne présenter qu'une population faible (de l'ordre de 10^2 ou 10^3 cell/mL, ou moins encore) de « forts producteurs ».

On comprend donc toute l'attention à porter au dépistage puis suivi et élimination précoce de population contaminante même à un niveau très faible, afin de minimiser le risque de scénario catastrophe avec comme acteur principal : les souches très productrices !

Remarque :

Précisons que dans notre expérience, nous classons les souches H et V dans une catégorie de « faible productrices de 4 éthyl-phénol ». Il convient de dire que ce propos se positionne par rapport aux autres souches testées. Mais dans une mise en situation, partant d'une concentration en acide para-coumarique classiquement dosé dans les vins rouges, elles permettent de générer une quantité de 4-éthyl-phénol pouvant causer les défauts phénolés souvent imputés au contaminant (on rappelle le seuil de détection de 0,4 mg/L). Ces souches ne sont donc malgré tout pas bénignes.

De plus, nous retenons la généralisation du propos déjà tenu par Medawar en 2003 : le niveau d'éthyl-phénol n'est pas significatif du niveau de population de *Brettanomyces* présentes dans le milieu de culture, et à priori, dans le vin.

Caractéristique des levures *Brettanomyces sp.* (Dominguez et al., 2002) et donc indice de leur présence, les teneurs ne sont cependant pas liée à la biomasse détectée.

A cette variabilité dans la conversion globale, s'ajoute une diversité quant aux profils mêmes de production (Figure 04D-12).

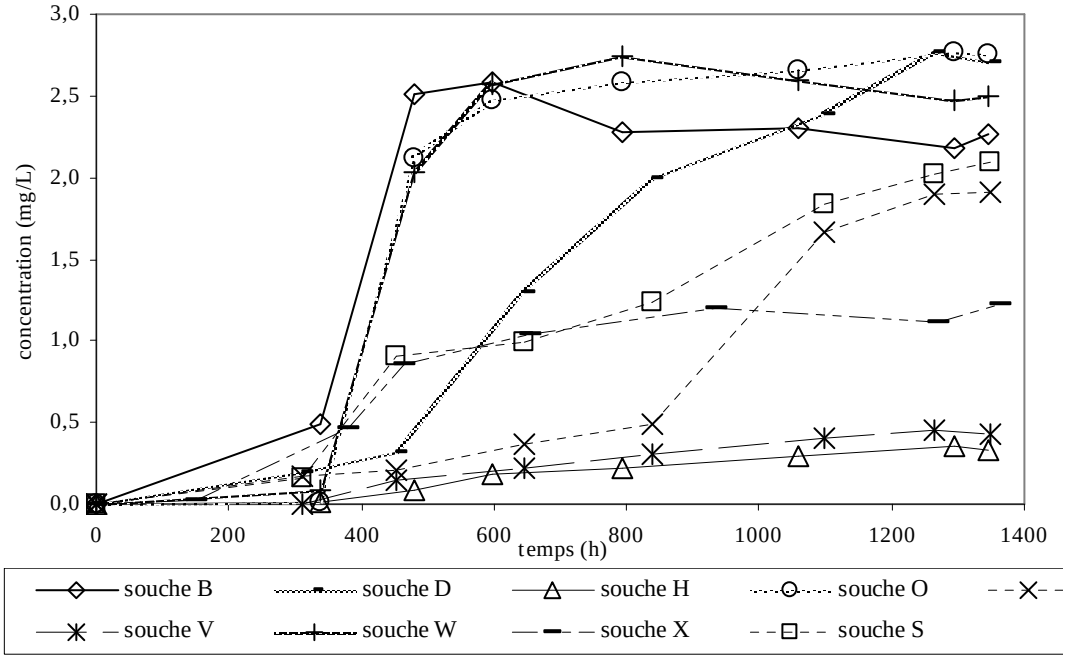


Figure 04D-12. Production de 4-éthyl-phénol par 9 souches de B .bruxellensis.

On peut néanmoins former des groupes de tendance au sein de ces divers profils.

- une production rapide avec l'obtention de la concentration maximale en quelques centaines d'heures (souches B, W).
- une première production très rapide qui précède une deuxième phase de production plus lente et progressive (souches O, X).
- une production plus lente mais qui permet d'atteindre des concentrations élevées au bout d'une durée relativement longue (souches D, Q, S).
- une production très lente avec des concentrations finales relativement faibles (souches H et V ne produisant « que » 0,35 et 0,453 mg/L en comparaison aux autres souches qui affichent une moyenne de 2,3 ± 0,43 mg/L).

4.2 – Lien avec la croissance ?

Alors que Zoecklein (2000 et 2006) montre que l'excrétion de 4-éthyl-phénol se fait principalement au cours de la phase de déclin, Medawar (2003) met en avant une production prépondérante de ce même composé lors des phases de croissance.

Qu'en est il réellement de cette divergence que nous relevons dans la bibliographie ? Nos résultats, sans viser à donner tort ou raison à l'un ou l'autre, permettent simplement de montrer que la différence dans les considérations de ces deux auteurs tire sa probable explication dans le fait que les souches étudiées sont différentes et ont alors des comportements différents du point de vue production 4-éthyl-phénol, notamment au niveau du lien avec la croissance des levures.

Là encore la notion de diversité phénotypique intra-spécifique trouve un étayement. En effet, si nous nous intéressons à savoir maintenant si la production de 4-éthyl-phénol est liée à la croissance dans le cas des 9 souches ici étudiées, nous nous rendons compte d'une très grande variabilité de comportement (Figure 04D-13).

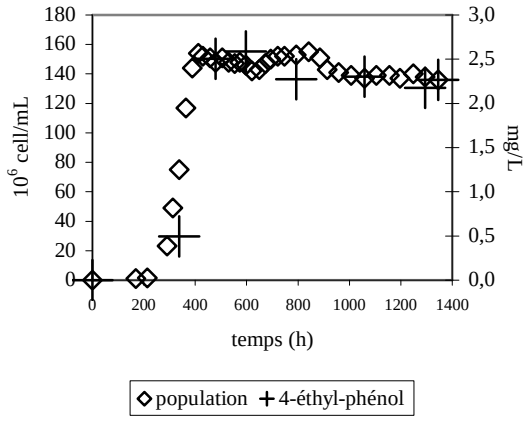


Figure 04D-13a. Souche B

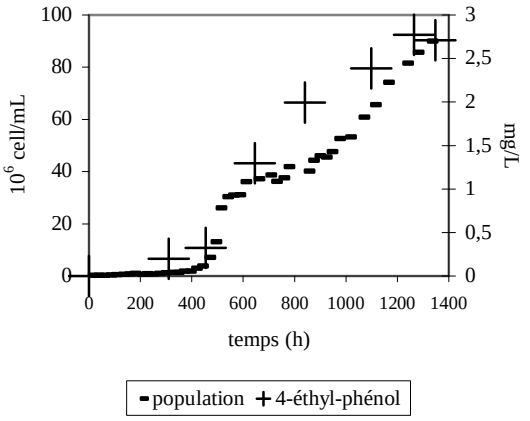


Figure 04D-13b. Souche D

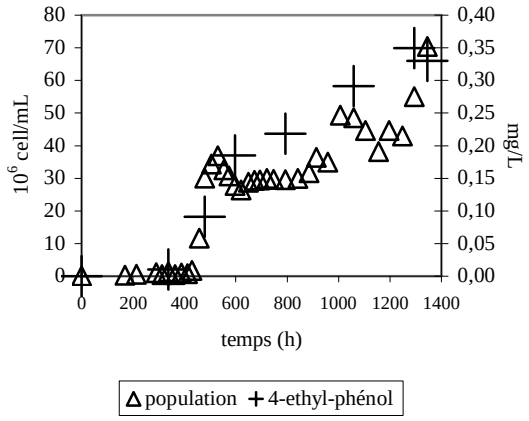


Figure 04D-13c. Souche H

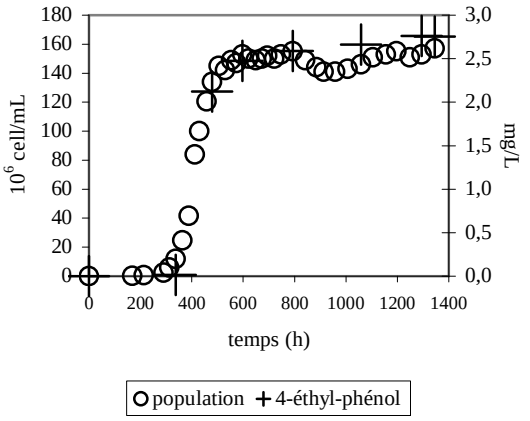


Figure04D-13d. Souche O

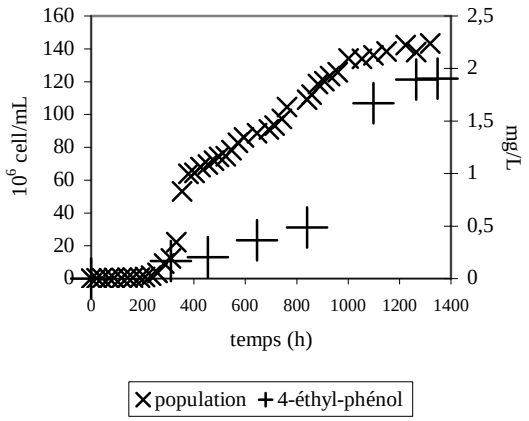


Figure 04D-13e. Souche Q

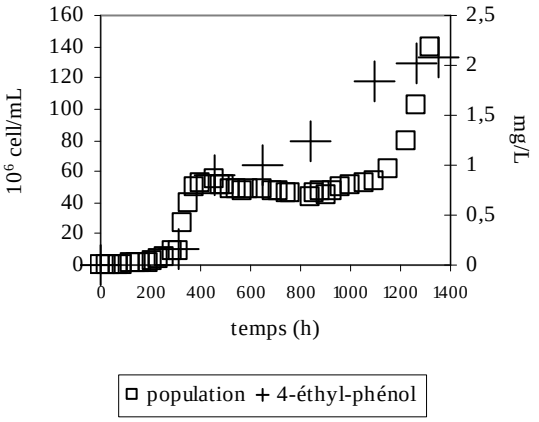


Figure 04D-13f. Souche S

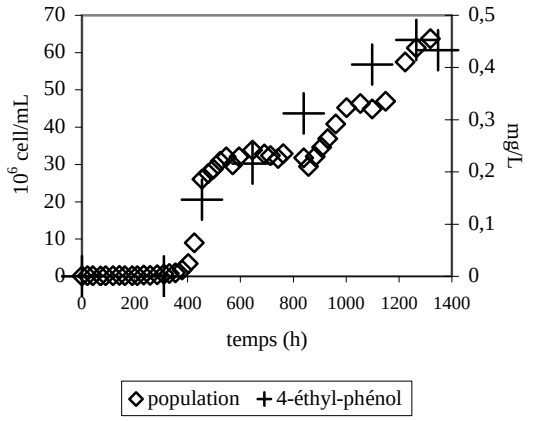


Figure 04D-13g. Souche V

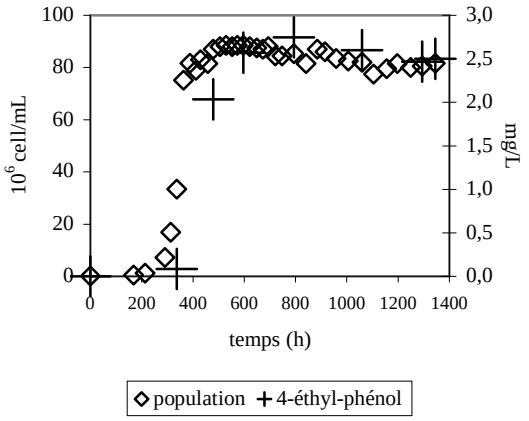


Figure 04D-13h. Souche W

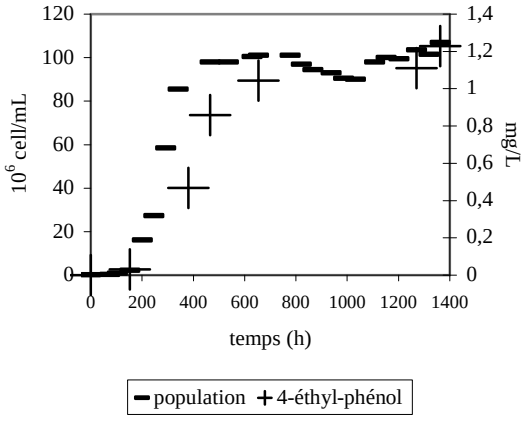


Figure 04D-13i. Souche X

Figure 04D-13. Comparaison entre production de 4-éthyl-phénol et croissance chez 9 souches de B. bruxellensis.

Une classification peut alors être établie par rapport aux comportements relevés.

§ Certaines souches présentent une superposition entre le profil de croissance et la courbe de production de 4-éthyl-phénol. Un couplage direct existe donc entre croissance et relargage dans le milieu du composé volatil. La production démarre en même temps que l'augmentation de population.

- dans le cas de souches ne présentant qu'une étape de croissance (B et W), suivie d'une phase stationnaire longue, les éthyl-phénols atteignent leur teneur maximale à la fin de la phase exponentielle de croissance. Pendant la longue phase stationnaire, on observe une légère diminution de la quantité dosable d'éthyl-phénol. Cette perte apparente du composé dans le milieu peut être imputée à un phénomène d'adsorption sur du long

terme par les cellules présentes et les lies, comme le suggèrent Chassage et al. (2005), ou à un phénomène d'évaporation du fait de l'agitation du milieu.

- dans le cas de souches à plusieurs étapes de croissance, la seconde se faisant lentement par rapport à la première étape, la production continue à se superposer à la croissance (souche D, X).

§ Une superposition partielle des deux courbes, la première phase de croissance se superposant bien avec le démarrage de la production de 4-éthyl-phénol, laissant supposer un couplage initial, mais un décrochage (et donc une perte de couplage) a lieu par le suite entre les deux courbes. On observe ainsi une production de 4-éthyl-phénol, sans augmentation de la population. C'est le cas des souches H et S avec une production quasi-linéaire de 4-éthyl-phénol alors que la population stagne pendant plus de 500 heures. La souche O qui continue à produire, certes lentement, des phénols volatils alors que la population stagne s'inscrit dans ce groupe également.

§ La souche Q présente également un découplage des deux phénomènes, mais dès le début de la culture. En effet, ici, il est question d'une production lente et progressive pendant les 800 premières heures de culture, la croissance se faisant quant à elle de manière quasi exponentielle dès 300 heures, avant de passer en mode linéaire. Ce n'est donc qu'au bout de 500 heures de croissance linéaire que la production en 4-éthylphénol s'accélère. Il y a là véritablement découplage entre les deux métabolismes impliqués.

§ Nous relevons même une forme de séquençage/alternance entre couplage et découplage. La souche V en est l'illustration. Alors que la production de 4-éthyl-phénol accompagne la première étape de croissance (couplage), nous observons un découplage pendant la phase stationnaire (la teneur en 4-éthyl-phénol continue a augmenter et non la population). De nouveau un couplage a lieu lors de la seconde étape de croissance. Ainsi, la phase de réadaptation (de plus de 300 heures) entre les deux étapes de croissance ne semble pas perturber le métabolisme de conversion de l'acide para-coumarique.

Nous précisons par ailleurs que cette classification établie ici ne correspond pas au regroupement génétique précédemment considéré. Les distinctions génétiques ainsi mises en avant ne sont donc pas significatives du comportement des souches d'un point de vue conversion des acides hydroxy-cinnamiques.

Remarque :

Notre but lors de cette étude n'est pas la description/décryptage des métabolismes mis en jeu mais bel et bien de montrer la diversité comportementale qui règne au sein de l'espèce. Nous n'entrons donc pas dans les considérations explicatives des voies enzymatiques principales et alternatives impliquées (Golderg et al., 1998), ni des équilibres osmotiques entre milieu et cytosol

pouvant jouer un rôle majeur dans les séquences de rétention, conversion, production, et relargage, permettant de passer de l'acide p-coumarique au 4-éthyl-phénol (Baranoswki et al. 1980 ; Chatonnet, 1992)

5 – Récapitulatif des différences intra-spécifiques : Diversités.

Nous proposons dans le tableau 04D-9 un récapitulatif des différents points que nous mettons en avant comme argument à la notion de diversité intra-spécifique au sein de l'espèce Brettanomyces.

Nous nous rendons alors compte que les différents classements par type que nous effectuons avec les paramètres et approches considérés au fur et a mesure ne coïncident pas. Dès lors la notion de diversité se retrouve amplifiée. L'éventail des comportements différents les uns des autres s'agrandit, mettant en avant une complexité évidente si l'ont veut cerner et décrire précisément une souche type.

Lorsque nous initions notre étude aucune publication ne fait état de travaux similaires quant à la mise en avant de cette diversité. Nous pouvons cependant citer Conterno et al. (2006) qui tout récemment montrent eux aussi la grande diversité génétique et physiologique au sein de l'espèce. Ces auteurs, testant différents caractères, ne retrouvent pas non plus de classification commune dans les approches génétiques (6 groupes lors du séquençage du gène 26S rDNA) et les différences comportementales lors de tests physiologiques et phénotypiques. La production de 4-éthyl-phénol et de 4-éthyl-gaïcaol leur apparaît alors comme le caractère le plus discriminant dans cette diversité intra-spécifique.

Tableau 04D-9. Récapitulatif des différents comportements de 9 souches de B bruxellensis pendant la fermentation sur milieu synthétique. (1/2)

souche	B	D	H	O	Q
groupement génétique	**groupe 5**	**groupe 3**	**indépendante**	**indépendante**	**groupe 1**
consommation des sucres	**type A** : consommation rapide. 0 g/L résiduel	**type B** : consommation lente et progressive. 0 g/L résiduel	**type C** : consommation en deux étapes séparées par un palier. 0,78 g/L résiduels (fructose)	**type A** : consommation rapide. 0 g/L résiduel	**type C** : consommation en deux étapes séparées par un palier. 6 g/L résiduels (fructose)
croissance	**type 1** : une seule croissance, classique	**type 2** : deux étapes : 1ère croissance classique, immédiatement suivie d'une croissance linéaire	**type 2** : deux étapes, profil à allure diauxique	**type 2** : deux étapes : 1ère croissance classique, immédiatement suivie d'une croissance linéaire	**type 2** : deux étapes, profil à allure diauxique
production d'acide acétique	**type a1 :** production importante pendant la première phase de croissance, et début de la phase stationnaire, puis palier.	**type d :** production importante pendant la seconde croissance, accompagne la diminution en éthanol	**type a2 :** production faible pendant la première phase de croissance puis palier.	**type b :** production importante pendant les deux épisodes de croissances	**type c :** production avant la premiére croissance, puis palier.
production de 4EP	forte production, rapide en une étape, couplage avec croissance	forte production, progressive, couplage avec croissance	faible production, progressive, couplage initial avec croissance puis découplage (croissance sans production)	production moyenne, progressive, découplage avec la croissance dès le début	production moyenne, progressive, couplage initial avec croissance puis découplage (croissance sans production)

Tableau 04D-9. Récapitulatif des différents comportements de 9 souches de B bruxellensis pendant la fermentation sur milieu synthétique. (2/2)

souche	S	V	W	X
groupement génétique	**groupe 6**	**groupe 2**	**groupe 2**	**groupe 1**
consommation des sucres	**type C** : consommation en deux étapes séparées par un palier. 0,5 g/L résiduels (fructose)	**type B** : consommation lente et progressive. 3,4 g/L résiduels (fructose)	**type A** : consommation rapide. 0 g/L résiduel	**type A** : consommation rapide. 0g/L résiduel
croissance	**type "4"** : deux étapes séparées par une longue phase stationnaire. 1ére croissance classique, seconde croissance lente et quasi linéaire.	**type 1** : une seule croissance, classique	**type "4"** : deux étapes séparées par une longue phase stationnaire. 1ére croissance classique, seconde croissance lente et quasi linéaire.	**type 1** : une seule croissance, classique
production d'acide acétique	**type e :** production peu significative.	**type a1 :** production importante pendant la première phase de croissance, et début de la phase stationnaire, puis palier.	**type a1 :** production importante pendant la première phase de croissance, et début de la phase stationnaire, puis palier.	**type a2 :** production faible pendant la première phase de croissance puis palier.
production de 4EP	faible production, progressive, couplage et découplage en alternance	forte production, rapide en une étape, couplage avec croissance	production moyenne, en deux étapes : rapide puis quasi linéaire, couplage avec croissance	forte production, en deux étapes : rapide puis quasi linéaire, couplage initial avec croissance puis découplage (production sans

Résumé du module

Les identifications génétiques réalisées sur les souches isolées dans plusieurs caves, dont la Cave de Buzet montre qu'il s'agit pour ces sites de contaminations multi-souches, variant tant en origine géographique que temporelle. Un regroupement génétique, à partir des profils de restrictions enzymatiques, peut néanmoins être effectué (6 groupes et 3 indépendantes sur 25 isolats), mais ne concorde pas dans l'absolu avec quelque origine spatio-temporelle que ce soit. La notion de DIVERSITE GENETIQUE au sein de l'espèce peut ainsi être mis en avant dans ce cas d'étude.

A la diversité génétique mise en avant, vient se rajouter la notion de DIVERSITE PHENOTYPIQUE. Ce concept est alors étayé par plusieurs points mettant en avant la variabilité comportementale.

Un polymorphisme intra spécifique important peut alors rendre l'identification par simple observation ambigüe voire erronée.

Les cultures sur milieu synthétique permettent de montrer des profils de croissances très variables d'une souche à l'autre. 3 profils type peuvent néanmoins être mis en avant, avec des variations quant aux cinétiques, aux niveaux de population et aux enchaînements d'étapes de croissance. Ce regroupement par profils de croissance ne concorde pas avec la classification génétique.

La consommation des sucres est également un élément variant d'une souche à l'autre, aussi bien du point de vue cinétique que des quantités consommées et de la teneur résiduel en fructose. Le regroupement envisageable vis-à-vis de la consommation des sucres ne concorde pas non plus avec la classification génétique mise en place.

Nous retenons par ailleurs qu'il est erroné de considérer une formule brute unique de la biomasse pour B. bruxellensis. La diversité au sein de l'espèce se traduit alors également par des compositions élémentaires différentes d'une souche à l'autre.

La production d'acide acétique permet également de montrer la variabilité comportementale au sein de l'espèce. Ainsi certaines souches apparaissent comme très productrices et d'autres le sont dans une bien moindre mesure. Les cinétiques de production et les liens éventuels avec les profils de croissance ne sont par ailleurs pas les même d'une souche à l'autre.

La conversion de l'acide para-coumarique en 4-éthyl-phénol vient elle aussi en renfort de la notion de diversité intra-spécifique. En effet, tant au niveau du rendement global de conversion que d'un point de vue cinétique de production, on relève de nettes différences entre les souches. Il est par ailleurs intéressant de rappeler que certaines souches présentent un couplage entre production du 4-éthyl-phénols et croissance alors que d'autres présentent un découplage évident. Certaines souches sont même caractérisées par un couplage partiel ou une alternance entre couplage et découplage tout au long des cultures sur milieu type vin synthétique.

Dans les conditions expérimentales considérées, ni l'apport d'oxygène par micro-aération, ni l'azote assimilable ne sont apparus comme facteurs limitants pouvant éventuellement expliquer certains profils de croissance observés. Nous montrons même que les souches testées n'ont pas les mêmes besoins en ces composés.

La diversité mise ainsi en avant tout au long de ce chapitre permet de se rendre compte qu'il est difficile de cerner précisément le comportement de la levure Brettanomyces bruxellensis. A chaque nouvelle considération, génétique et comportementale, on se rend compte que les comportements se différencient notablement, ouvrant de plus en plus

l'éventail de la diversité. Ce travail permet donc de comprendre qu'il est impossible d'extrapoler des phénomènes observés, d'une souche à l'autre, tant elles sont dans l'absolu susceptibles de se comporter différemment. Dès lors nous ne pouvons que formuler une mise en garde contre les solutions et les interprétations qui se veulent généralistes, mais qui n'ont été établies qu'à partir d'études isolées sur une ou quelques souches données. Dans ce contexte, on comprend toute la difficulté pour appréhender la gestion de la contamination par Brettanomyces d'une point de vue général, chaque cas impliquant des souches probablement distinctes et avec elles des scenarii de contamination différents.

MODULE E
Etudes et Implications en Œnologie.

1 – Cultures en milieux vin.

1.1 – Fermentations en Milieu Vin Corrigé.

Afin de valider les précédentes observations faites lors des fermentations sur le milieu synthétique et de juger de leur projection éventuelle en conditions de terrain nous mettons en culture quelques souches dans un milieu vin. Désirant limiter le nombre de différences entre ces deux milieux, nous corrigeons le vin utilisé sur certains facteurs déjà étudiés dans la bibliographie. Nous désirons donc nous retrouver dans des conditions proches à ceux du milieu SWM :

- En éthanol : dilution jusqu'à 10 % vol/vol.
- En SO_2 : neutralisation totale.
- En sucre réducteur : complément à 10 g/L total, avec un rapport glucose : fructose = 2 : 8
- pH = 3,4

Lors de ce travail, nous ne considérons que 3 souches, représentatives pour nous des trois types de profils de croissances, présentés dans le module D, 2.2.2 : souches B, Q et S.

1.1.1 – Croissance.

Les inocula sont effectués à hauteur de 10^6 cell/mL.

Pour des raisons pratiques, les cultures n'ont pu être suivies que sur 450 heures. L'ensemble des profils de croissance déjà décrits sur des cultures à long voire très long terme (Cf Chapitre 04, Module D) n'a pu être obtenu (notamment les deuxièmes phases de croissance). Seule la première phase de croissance est considérée ici et présentée sur la Figure 04E-1.

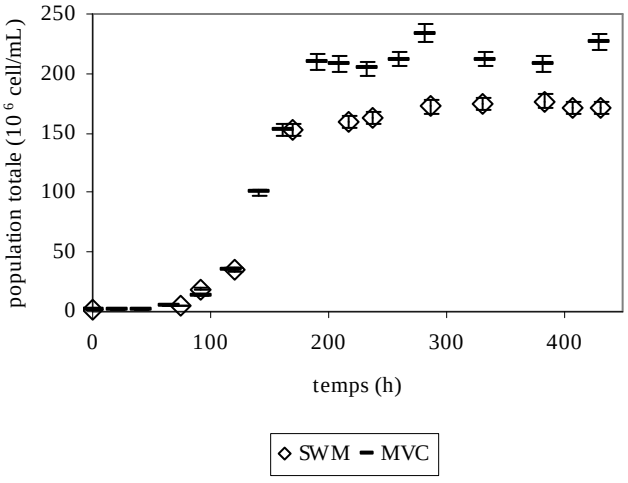


Figure 04E-1a. *Souche B*

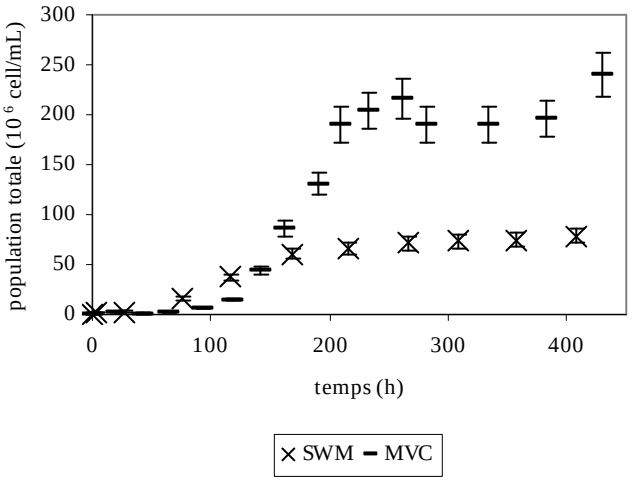


Figure 04E-1b.*Souche Q*

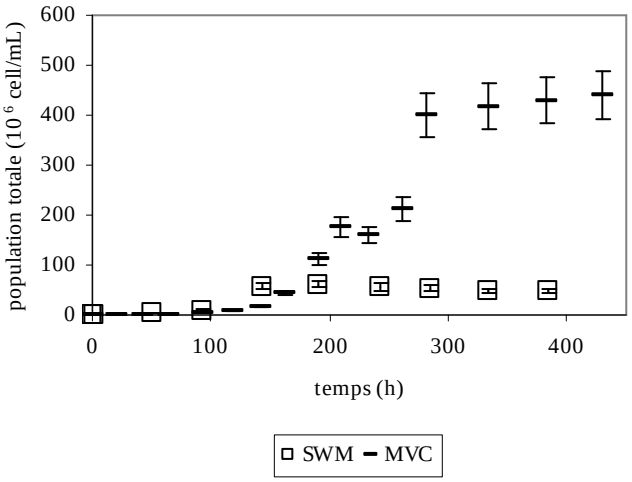


Figure 04E-1c. *Souche S*

Figure 04E-1. Croissance comparée pour 3 souches de B. bruxellensis : milieu synthétique SWM et Milieu Vin Corrigé.

Pour les trois souches testées, la culture sur milieu vin permet une augmentation significative du niveau de population totale. Cette différence est la plus significative pour la souche S avec une population maximale au bout de 450 heures multipliée par 7,1. Ce facteur multiplicatif est respectivement de 3,1 et 1,4 pour les souches Q et B. Ainsi, bien qu'elles bénéficient toutes de conditions plus favorables à la croissance dans ce milieu en comparaison au milieu synthétique, toutes les souches n'en tirent pas un profit identique. Il y a donc une sensibilité variable vis-à-vis de ces nouvelles conditions de culture en milieu naturel. On retrouve donc une fois de plus la notion de diversité au sein de l'espèce.

Comme le suggère la figure 04E-2, alors que pour la souche B, il n'y a aucune influence sur le démarrage de la croissance, on constate pour les souches Q et S un retard de croissance d'une vingtaine d'heures en milieu vin. Néanmoins, pour les trois souches, la croissance est alors plus rapide par la suite, les vitesses spécifiques maximales variant respectivement de + 11 %, + 21% et + 18 % pour B, Q et S, en faveur du vin corrigé.

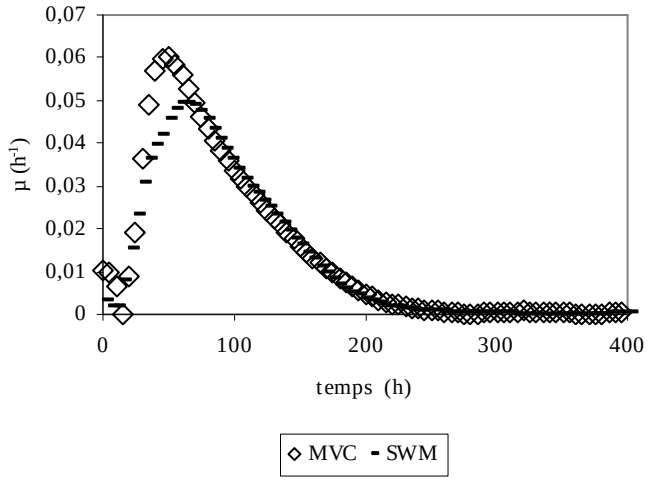


*Figure*04E-2a. *Souche B*

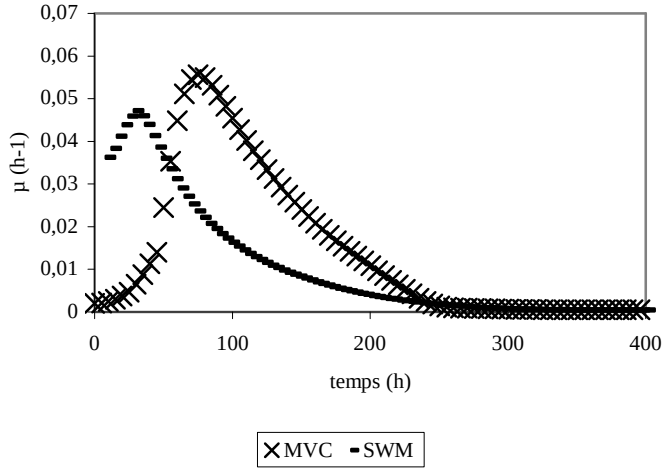


*Figure*04E-2b. *Souche Q*

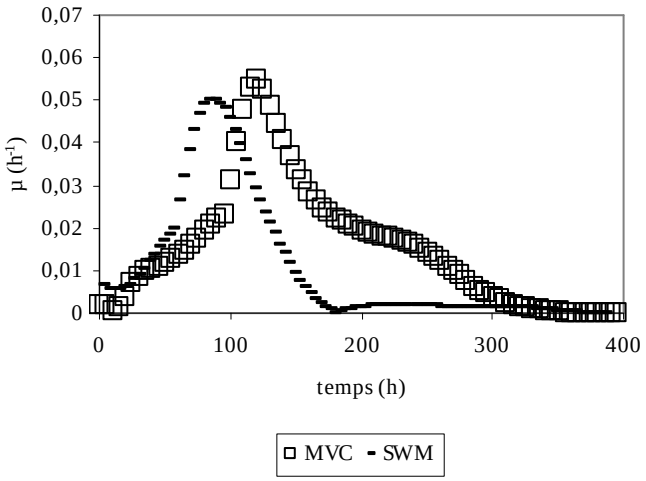


*Figure*04E-2c. *Souche S*

Figure 04E-2. Vitesses spécifiques de croissance comparées pour 3 souches de B. bruxellensis : milieu synthétique SWM et Milieu Vin Corrigé (MVC).

Remarque :

La consommation des sucres, que nous ne présentons pas ici suit les schémas déjà présentés dans le module D : superposition de l'assèchement du milieu avec la première phase de croissance. (Assèchement total pour B et Q et partiel pour S avec 5,1 g/L résiduel au bout de 400 heures de croissance).

1.1.2 – 4-éthyl-phénol.

Le milieu corrigé n'a pas été complété en acide para-coumarique. Ce précurseur est cependant déjà présent dans le vin rouge utilisé. Le dosage nous donne alors une teneur initiale de 2,147 ± 0,091 mg/L. Nous nous intéressons donc à sa transformation globale en 4-éthyl-phénol (Tableau 04/E-1). Nous donnons également les taux de conversion molaire par rapport aux quantités initiales connues de précurseur.

Nous précisons en premier lieu que le vin de base utilisé est dosé à 0 mg/L en 4-éthyl-phénol. De ce fait, le 4-éthyl-phénol dosé ne provient que de la synthèse au cours de la culture.

Nous retiendrons donc d'après ces résultats que la conversion est plus importante en milieu synthétique pour l'ensemble des 3 souches. On reste néanmoins dans des ordres de grandeurs très proches, et ne pouvons donc pas a priori statuer sur des différences significatives, pouvant traduire un comportement fondamentalement différent d'un milieu à l'autre.

La synthèse des éthyl-phénols semble donc inchangée (du moins en terme de bilan), plus particulièrement pour les deux souches Q et S.

Tableau 04E-1. Production maximale de 4-éthyl-phénol par 3 souches de B. bruxellensis (400 ± 12 heures) en Milieu Vin Corrigé et milieu synthétique SWM.

	MVC		SMW	
Souche	4EP max (mg/L)	taux de conversion (par rapport aux 2,147 mg/L dosés)	4EP max (mg/L)	taux de conversion (théorique par rapport aux 5 mg/L introduits)
B	0,857	54,6 %	2,439	65,6 %
Q	0,664	41,6 %	1,792	48,2 %
S	0,778	48,7 %	1,909	51,3 %

1.1.3 – SWM, un milieu de culture complet mais un modèle incomplet du vin.

L'ensemble des résultats que nous présentons précédemment nous permet donc de conclure que le milieu synthétique SWM utilisé lors de nos études en laboratoire n'est qu'un modèle approximatif et incomplet du vin : sous évaluation des populations totales et des cinétiques de croissances. Cependant, nous ne pouvons pas savoir si le métabolisme aboutissant à la formation des éthyl-phénols est inchangé ou pas. Nos mesures nous permettent cependant de dire que la conversion globale est la même. Nous précisons qu'il est commun lors de comparaison entre milieu modèle et matrice originale (vin) d'avoir des résultats beaucoup plus performants dans le cas du milieu original, sans que des explications précises ne soient proposées.

Néanmoins, les croissances obtenues sur ce milieu synthétique montrent qu'il contient tous les éléments nécessaires au développement de *Brettanomyces* dans des conditions proches de celles d'un vin post fermentation alcoolique. Notre milieu, à défaut donc d'être un modèle stricte du vin est un milieu minimum, simple de formulation, permettant un développement proche de celui obtenu dans le vin.

De part la composition simplifiée de ce milieu bons nombres de substrats potentiels présents dans le vin peuvent être responsables des différences observées lors de ces cultures comparées. En effet, nul besoin de rappeler que le vin est une matrice complexe pouvant contenir plus de 1000 composés organiques et minéraux (Taillandier et Bonnet, 2005). En revanche, une très rapide comparaison permet de se rendre compte que le milieu SWM ne contient pas de composés (à l'exception de l'acide para-coumarique), génériquement qualifiés de Phénoliques ou Poly-phénoliques tels que les acides phénols, les anthocyanes et les tanins.

1.2 – Milieu Vin Corrigé « partiellement dé-phénolisé ».

1.2.1 – Avant-propos : préparation du milieu.

Nous menons donc une culture dans un vin corrigé et traité afin de juger de l'influence de ces composés poly-phénoliques. L'idée étant d'appauvrir le vin de base corrigé en composé phénolique, un traitement au PVP (Poly-Vinyl-Pyrrolidone) est effectué. Ce polymère organique de synthèse

disponible sous forme d'une poudre blanche, insoluble dans l'eau présente une forte affinité pour les poly-phénols. Il est alors possible par un traitement physique (adsorption) de débarrasser un moût ou un vin d'une partie ou totalité de ses composés poly-phénoliques.

Nous précisons que la dose de PVP employée pour le traitement, à savoir 4 g/L est largement supérieure à la dose maximale autorisée lors des collages en œnologie (0,8 g/L). Le protocole que nous employons (Cf Chapitre 03, 1.3.3.3-) ne permet cependant qu'une élimination partielle des composés poly-phénoliques. En effet le Milieu Vin Corrigé (*MVC*) de base possède un Indice Poly-phénols Totaux de 44, et le Milieu Vin Corrigé traité *MVC-phénol(-)* un IPT de 21, soit une réduction de moitié des composés poly-phénoliques totaux (sans précision sur leur nature).

La formation du gel lors de l'ajout du PVP et son élimination par centrifugation entraîne une perte probable de composés autres que les composés poly-phénoliques. Nous pouvons citer en premier chef les protéines puis les polysaccharides (mais également des minéraux divers). Ces pertes ne sont pas quantifiées dans notre étude et nous ne pouvons donc pas nous prononcer sur leur impact.

Nous vérifions par ailleurs que le pH reste à 3,4 (correction avec de l'acide ortho-phosphorique), que la teneur en sucre réducteur n'a pas varié (on relève une diminution de - 0,098 g/L, que nous négligeons par rapport aux 10 g/L initiaux) et que la teneur en éthanol ne change pas (une variation de - 2,4 g/L est relevée, que nous ne jugeons pas utile de corriger).

1.2.2 – Croissance.

Comme le montre le Tableau 04E-2 , pour les trois souches testées, le milieu traité pour éliminer en partie les composés poly-phénoliques permet une croissance beaucoup plus rapide.

Tableau 04E-2. μ_{max} pour 3 souches de B. bruxellensis mises en culture dans 3 milieux différents MVC et MVC-phénol(-) et SWM.

	MVC		MVC-phénol(-)		SWM	
souche	µmax (h^{-1})	temps de culture correspondant (h)	µmax (h^{-1})	temps de culture correspondant (h)	µmax (h^{-1})	temps de culture correspondant (h)
B	0,06	63	0,1	20	0,05	62
Q	0,056	75	0,129	24	0,047	24
S	0,055	120	0,063	70	0,05	80

Par ailleurs, la comparaison entre les figures 04E-1 et 04E-3 permet de mettre en avant des niveaux de population plus importants lors des cultures en milieu appauvri en composés poly-phénoliques :

§ Pour la souche B : 289.10^6 cell/mL au bout de 300 heures dans MVC-phénol(-) contre 180.10^6 cell/mL dans MVC

§ Pour la souche Q : 350.10^6 cell/mL au bout de 300 heures dans MVC-phénol(-) contre 240.10^6 cell/mL dans MVC

§ Pour la souche S : 360.10^6 cell/mL au bout de 300 heures dans MVC-phénol(-) contre 280.10^6 cell/mL dans MVC.

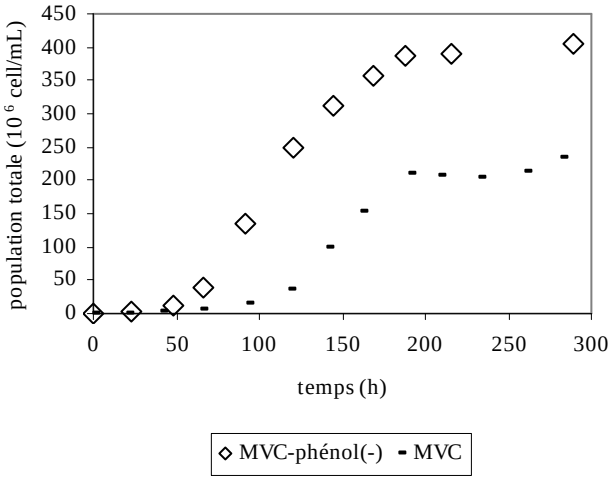


Figure 04/E-3a. Souche B

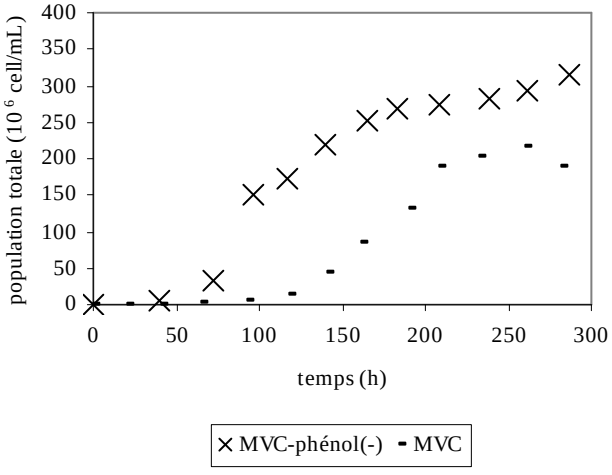


Figure 04E-3b. Souche Q

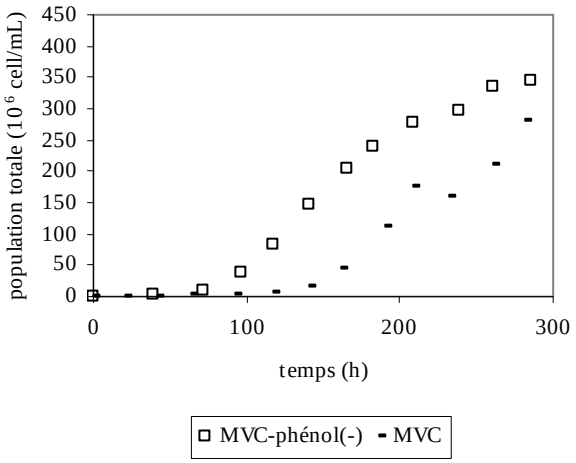


Figure 04E-3c. Souche S

Figure 04E-3.Croissance de 3 souches de B. bruxellensis sur Milieu Vin Corrigé et Dé-phénolisé partiellement.

On peut alors supposer d'après l'ensemble de ces résultats que certains composés poly-phénoliques présents dans le milieu non traité MCV provoquent un ralentissement de la croissance. Des études montrent en effet le pouvoir antibiotique, antifongique voire simplement fongistatique de composés poly-phénoliques du vin, tout particulièrement des tanins (Kekos et Macris, 1987 ; Scalbert, 1991 ; Chung et al., 1998 ; Ahmad et Beg, 2001, Rodriguez Vaquero et al., 2006). Différents mécanismes sont alors proposés pour expliquer cette activité antimicrobienne des tanins : inhibitions des activités enzymatiques extracellulaires, inhibition de la phosphorylation (par voie oxydative) ou combinaison avec le fer ou d'autres facteurs de croissances voire des substrats rendus dés lors indisponibles pour le métabolisme cellulaire. A ce jour aucune étude n'a été proposée spécifiquement pour tester l'action de tels composés sur le développement de la levure *Brettanomyces* et les mécanismes impliqués. Ces premiers résultats que nous présentons semblent aller dans le sens d'une influence négative de la présence de ces composés sur la croissance de la levure *Brettanomyces*.

En revanche, comme les deux dernières colonnes du tableau 04E-2, une absence totale de composés poly-phénoliques (cas du milieu *SWM*), n'est pas synonyme de meilleure croissance. En effet, même si la croissance se fait rapidement, pour les trois souches, nous retrouvons un µ max moindre dans *SWM* que dans *MVC-phénol(-)*. Cependant, en raison de nombreux autres facteurs de différences entre les deux types de milieux, on ne peut pas conclure une éventuelle stimulation de la croissance par une faible quantité de poly-phénols.

Nous n'énonçons ici que des travaux préliminaires dans le domaine, et n'avons pas suffisamment d'éléments précis pour donner une confirmation appuyée quant aux tendances

observées. Cette réserve sur le rôle éventuellement inhibiteur des tanins sur la croissance de *Brettanomyces* est d'autant plus justifiée qu'une étude que nous présentons par la suite semble suggérer des résultats contraires.

1.2.3 – 4-éthyl-phénol.

L'emploi de PVP n'élimine pas totalement l'acide para-coumarique contenu dans le Vin Corrigé. Le dosage à l'HPLC permet en effet de détecter 1,069 ± 0,097 mg/L de cet acide hydroxy-cinnamique après la dé-phénolisation. (Soit une diminution de 50% de la concentration dans le *MVC* initial).

Le tableau 04E-3 donne ainsi les concentrations maximales en 4-éthyl-phénol relevées au bout des 350 heures de cultures.

Tableau 04E-3. Production maximale de 4-éthyl-phénol par 3 souches de B. bruxellensis, au bout de 350 heures lors de cultures en Milieu Vin Corrigé et partiellement dé-phénolisé.

	MVC phénol(-)		MVC		SWM	
Souche	4EP max (mg/L)	taux de conversion (par rapport à 1,062 mg/L)	4EP max (mg/L)	taux de conversion (par rapport à 2,147 mg/L)	4EP max (mg/L)	taux conversion (par rapport à 5 mg/L)
B	0,487	61,2 %	0,857	54,6 %	2,439	65,6
Q	0,374	47,0 %	0,664	41,6 %	1,792	48,2
S	0,399	50,2 %	0,778	48,7 %	1,909	51,3

Nous constatons donc que le taux de conversion global ne varie pas significativement d'un milieu à l'autre. Ainsi, la capacité globale de conversion de l'acide para-coumarique présent semble indépendante de la composition en composés polyphénoliques du milieu.

2 – Effet d'adjuvants œnologiques.

2.1 – Avant propos.

Dans une optique d'amélioration et de maîtrise des vinifications, l'œnologue peut recourir à plusieurs stratégies afin d'éviter, notamment, les fermentations alcooliques languissantes, voire les arrêts de fermentation.

Bien qu'il subsiste encore des incertitudes sur toutes les origines possibles des fermentations difficiles, ces dernières sont souvent dues à des problèmes de carences nutritionnelles. Le moût de raisin peut être carencé en différents nutriments susceptibles de causer des problèmes de croissance et d'activité fermentaire chez la population de *Saccharomyces* (qu'elle soit sélectionnée ou indigène). Parmi eux, trois sont le plus souvent cités : l'azote assimilable, la thiamine (vitamine B1) et l'oxygène

en cours de process – donc indirectement une carence en stérols (auxquels nous ne nous intéressons pas dans cette étude).

La concentration en azote assimilable influe beaucoup sur la cinétique pendant la majeure partie de la fermentation. Ainsi lorsque cette concentration est très faible, la fermentation alcoolique est très longue. (Sablayrolles, 1998).

La thiamine peut aussi être limitante et provoquer des fermentations très lentes. En effet, si la levure est capable de synthétiser de la thiamine, elle ne peut le faire qu'à une vitesse faible qui ralentit considérablement la fermentation. Bataillon et al. (1996) suggère une concentration minimale de 250 µg/L pour que la thiamine ne limite pas la vitesse de fermentation. La thiamine, au même titre que de nombreuses vitamines, est susceptible de disparaître du milieu très rapidement, et seul un ajout permet d'obtenir à nouveau des cinétiques fermentaires normales.

A l'heure actuelle il est donc possible de compléter le moût initialement en ces deux composés clé, soit de manière distincte ou combinée avec des formulations commerciales mises à disposition des œnologues.

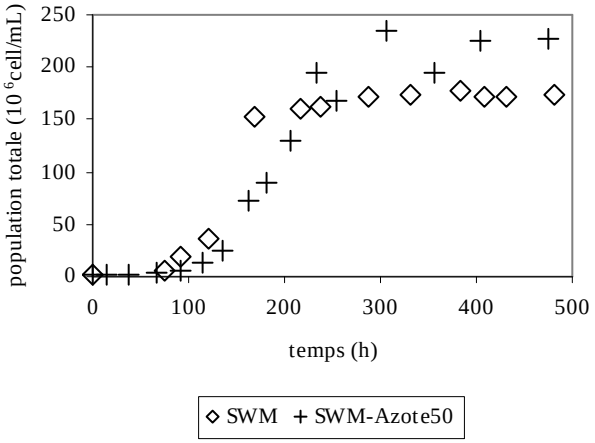
Ainsi, ces adjuvants « anti-carence » (au sens générique) sont désormais reconnus pour leur bénéfice vis-à-vis de la population fermentaire, mais quant est il de leur conséquence sur le développement de population microbienne moins désirable telle que *Brettanomyces* ?

2.2 – Influence de l'azote assimilable, apporté sous forme de $(NH_4)_2SO_4$.

Comme nous l'avons déjà signalé dans le chapitre 01, à la cave de Buzet, il y a quasi systématiquement complément d'azote dans les moûts en début de vinification. Sur ce site, seul le sulfate d'ammonium est employé pour compléter les moûts. Avec un ajout à hauteur de 30 g/hL (dose légale autorisée jusqu'à 2006) les vins obtenus possèdent au final des teneurs d'azote résiduel encore assimilable par les levures (azote ammoniacal et alpha-aminé) souvent supérieures à 100 mg/L à la mise (pour des vins Basics et vins vendus en « bag in box » notamment). N'y a-t-il alors pas danger vis-à-vis de *Brettanomyces*, en offrant une telle disponibilité en azote assimilable ?

Nous effectuons alors une comparaison entre deux cultures menées l'une sur un milieu riche en azote assimilable (le milieu *SWM*, correspondant à une teneur de 122 mg/L) et un milieu plus pauvre : *SWM-Azote50 (CF chapitre 03, 1.4.3)*, identique au précédent, mais corrigé en théorie par une diminution de 50 % de la teneur en azote assimilable. Pour ce faire nous modifions la quantité initiale de $(NH_4)_2SO_4$ .Le dosage donne en réalité une concentration de 58 ± 1,1 mg/L en azote assimilable pour le milieu *SWM-Azote50*.

La figure 04E-4 présente les profils de croissance obtenus pour les trois souches de *Brettanomyces* testées avec un ensemencement à 10^6cell/mL.



- Figure 04E-4a. Souche B

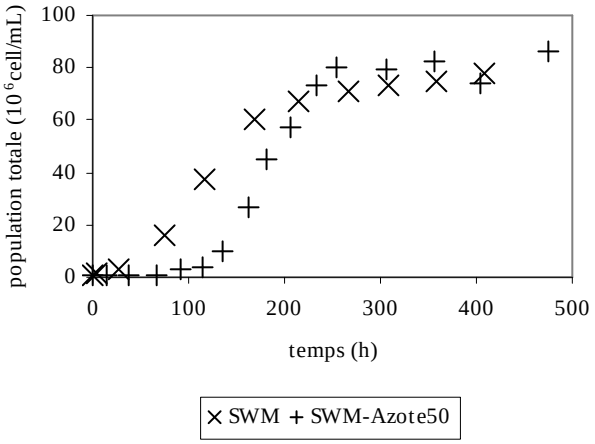


Figure 04E-4b. Souche Q

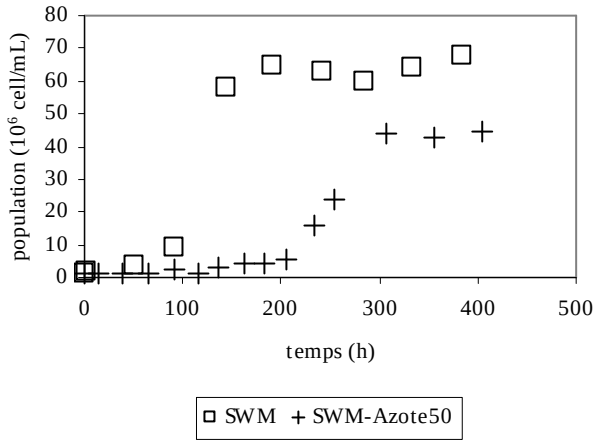


Figure 04E-4c. Souche S

Figure 04E-4. Croissance comparée pour 3 souches de B. bruxellensis : milieux synthétiques SWM et SWM-Azote50.

La diminution de la concentration initiale d'azote assimilable induit donc une augmentation de la durée de latence. Cette incidence est plus ou moins marquée selon les souches. D'à peine 25 heures pour B, l'écart atteint pratiquement 150 heures pour S, la souche Q étant intermédiaire avec un écart de 100 heures. Là encore il semble qu'une certaine diversité s'exprime quant à la sensibilité vis-à-vis de la teneur en Azote assimilable ce qui vient donc renforcer ce qui a déjà été évoqué dans le chapitre 04, module D.

Lorsque la croissance débute à proprement parler (phase d'accélération puis quasi exponentielle) nous ne notons pas de différence significative dans les vitesses de croissance pour B avec respectivement dans le milieu *SWM-Azote50* et *SWM* : μ_{max} = 0,052 h^{-1} et 0,056 h^{-1}. Nous observons cependant une forte diminution de la vitesse de croissance pour la souche S : μ_{max} = 0,027 h^{-1} dans le milieu *SWM-Azote50* contre 0,046 h^{-1} dans le milieu *SWM*. La souche Q quant à elle présente avec une faible variation de la vitesse de croissance spécifique maximale cette fois ci en faveur du milieu pauvre en azote : 0,042 h^{-1} pour SWM 0,047 h^{-1} pour le milieu SWM-Azote50.

Ainsi pour les souches B et Q, la concentration en azote influe peu (Q) ou pas (B) sur la croissance au niveau residuel testé. Ce composé est d'ailleurs présent en quantité suffisante pour permettre leur croissance sans être épuisé au bout des 450 heures (Tableau 04E-4).

En revanche, pour la souche S, nous notons clairement une influence négative de la diminution de ce composé dans le milieu. Nous ne pouvons néanmoins pas parler de facteur limitant, la croissance se faisant tout de même et la teneur en azote résiduel à la fin de l'expérimentation étant encore non nulle (Tableau 04/E-4) L'effet de la teneur en azote assimilable sur S est aussi bien perceptible d'un point de vue cinétique que de la croissance globale (sur les 450 heures de cultures).

Tableau 04E-4. Azote assimilable résiduel, au bout de 450 heures de cultures dans le milieu SWM-Azote50.

souche	concentration finale (mg/L)	dont azote (mg/L)	
		ammoniacal	alpha aminé
B	12,3	8,9	3,4
Q	10,4	1,8	8,6
S	12,6	10,8	1,8

Au regard de ces premiers résultats, il est encore difficile de quantifier un risque lié au développement de *Brettanomyces* et la teneur en azote assimilable disponible (du moins entre 60 et 120 mg/L). Il est donc impératif de continuer l'investigation commencée avec cette étude, dans d'autres gammes de concentration en azote assimilable pour préciser les répercussions réelles de ce

composé sur la levure. Nous retenons à ce stade une croissance pouvant être favorisé par une teneur résiduelle croissante en azote assimiliable (aux niveaux testés).

De plus, comme le suggèrent Hernandez-Ortes et al. (2005) d'après leurs études sur différents moûts complétés en azote ammoniacal et aminé, des teneurs différentes en ces composés sont susceptibles d'influer fortement sur les profils organoleptiques des vins finaux. Il y a alors modification des différentes voix métaboliques des levures présentes (seuls des Starters *Saccharomyces cerevisiae* sont employés) avec des répercussions notables sur l'excrétion de métabolites secondaires (dont certains contribuent au caractère aromatique du produit final).

Nos observations sur les quantités produites de 4-éthyl-phénol rejoignent les propos avancés par ces auteurs. En effet, nous retrouvons, comme indiqué dans le tableau 04E-5 une très nette différence entre les deux milieux. Pour les trois souches, les levures produisent beaucoup moins de 4-éthyl-phénol dans le milieu « pauvre » en Azote. Ce résultat suggèrent donc l'implication de l'azote, probablement sous sa forme ammoniacal (ou alors, faut il y voir le rôle du ratio ammoniacal/alpha-aminé ?), dans le métabolisme de conversion des acides cinnamiques au niveau de leur taux de conversion. A ce stade les facteurs déterminant ce taux de conversion restent encore inconnus.

Tableau 04E-5. Production de 4éthyl-phénol par 3 souches de B. bruxellensis dans 2 milieux synthétiques : SWM et SWM-Azote50.

	4 EP (mg/L)	
souche	SWM	SWM-Azote50
B	2,383	1,595
Q	1,629	0,255
S	1,82	0,502

(on rappelle que ces deux milieux ont des teneurs identiques en précurseur)

2.3 Influence de la Thiamine.

2.3.1 – Avant propos.

Les carences en thiamine (vitamine B1, dont la formule développée est rapellée sur la figure 04E-5) sont rarement dues à une présence insuffisante du composé dans le moût de départ. Elles sont en effet souvent induites par une absorption rapide de la vitamine par des populations de levures indigènes, dans les toutes premières heures de la fermentation (Nishimura et al., 1982 ; Bataillon et al.,1996). Un apport préventif de thiamine peut être préconisé en particulier dans des moûts provenant de vendanges atteintes de pourriture grise.

En complément de son action sur la fermentation alcoolique, la thiamine diminue la combinaison du SO_2. En effet, ajoutée en début de fermentation alcoolique, la thiamine favorise la multiplication cellulaire et modifie le métabolisme levurien entraînant une diminution des composés cétoniques produits et donc une diminution de la fraction combinée du soufre.

On rappelle qu'actuellement, la dose maximale autorisée est de 0,6 mg/L (ajouté sous forme de dichlorohydrate de thiamine, règlement CEE 822/87).

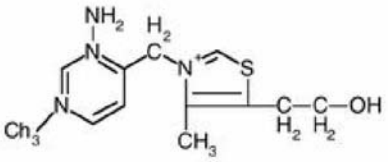


Figure 04E-5. Formule développée de la Thiamine.

S'agissant ici d'études préliminaires, nous n'avons considéré qu'une seule souche de travail : souche B. Cette dernière est donc mise en culture à 20 °C avec une agitation de 150 rpm.

2.3.2 – Croissance.

La figure 04E-6 nous permet de comparer la croissance pour la souche B lorsque le milieu synthétique est complété en thiamine (à hauteur de + 0,6 mg/L) ou non.

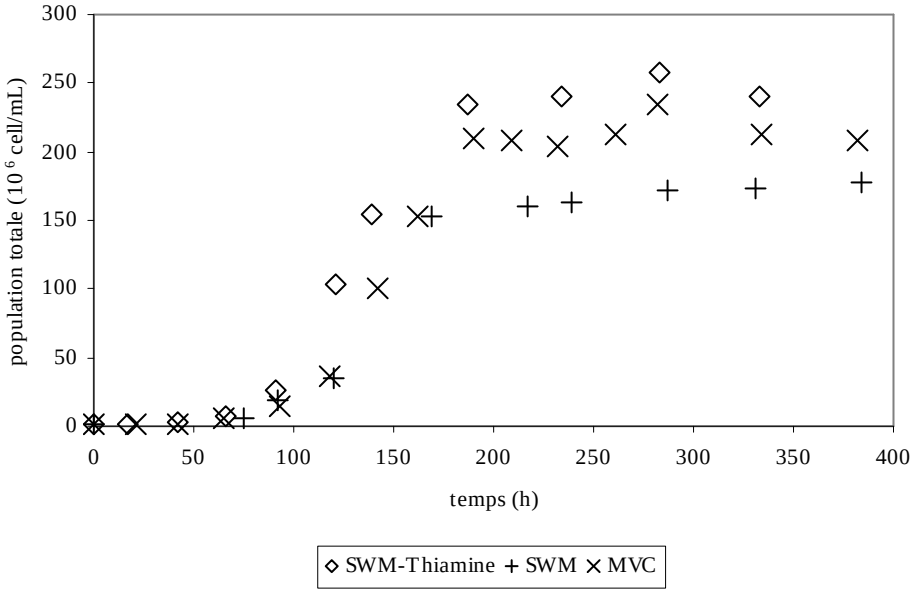


Figure 04E-6. Comparaison des profils de croissance pour la souche B, dans différents milieux : SWM, SWM-thiamine et MVC.

Dans l'absolu, nous considérons le milieu SWM comme référence dans cette comparaison, mais ne devons pas affirmer que ce milieu est exempt de thiamine. En effet, nous rappelons qu'il est constitué de 0,5 g/L d'extrait de levure (Oxoid). Ce type de produit contient entre 0,02 et 0,2 mg/g de vitamine B1, selon les fabriquants. Cependant, en raison d'un autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, nous ne pouvons pas estimer les concentrations résiduelles. Le milieu complété contient alors un complément de 0,6 mg/L (ajouté par filtration stérile) par rapport à la référence.

La thiamine peut chez certaines souches de *Saccharomyces uvarum*, induire des limitations de la croissance et du métabolisme respiratoire (Umezana et Kishi, 1989), phénomène qui n'a pas lieu dans notre cas. En effet, de manière évidente, nous ne notons pas d'effet inhibiteur de la thiamine sur la souche à la concentration considérée.

Nous observons même un effet inverse, de stimulation. Ainsi la croissance démarre plus rapidement, avec un avancement d'une vingtaine d'heures et un taux de croissance plus important pendant la phase « exponentielle ».

La présence de thiamine favorise alors nettement la croissance comme le suggère la Figure 04E-7., permettant même de dépasser les performances relevées dans un milieu vin.

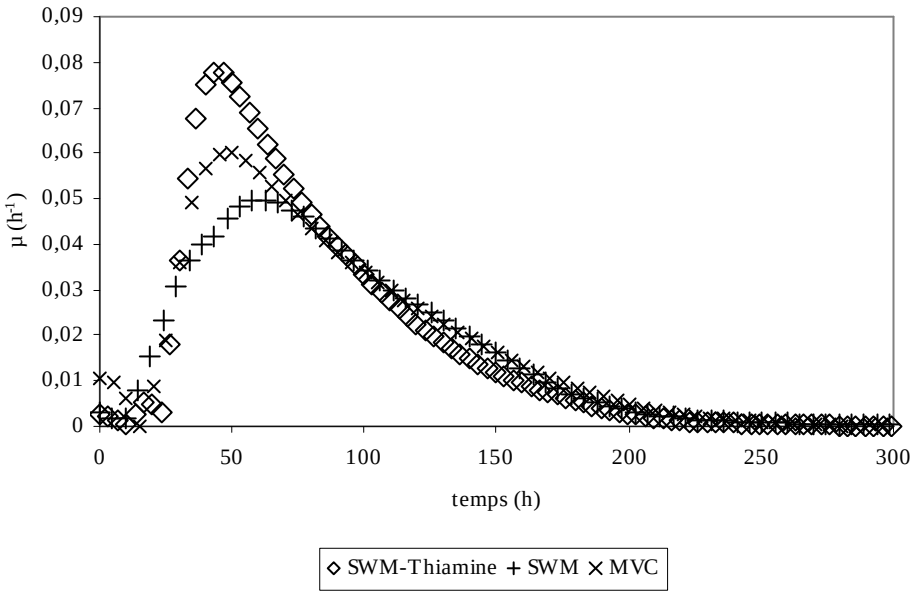


Figure 04E-7. Vitesses spécifiques de croissance comparées pour une souche de B. bruxellensis dans 3 milieux : SWM-Thiamine, SWM et MVC.

La thiamine à 0,6 mg/L est donc un activateur de croissance pour *Brettanomyces* (en tout cas pour la souche testée). Il convient donc de prendre cet élément en considération lors des éventuels

compléments des moûts avec ce composé, celui-ci pouvant favoriser le développement du contaminant.

Nous n'avons ici testé qu'une unique souche, mais ce seul essai déjà significatif, nous amène à considérer le principe de précaution.

Il sera par la suite intéressant d'approfondir ce premier résultat afin de mieux cerner l'influence de ce composé sur la levure, déterminé l'existence éventuelle de valeurs seuil ou optimales ... même si la notion de diversité que nous présentons en amont laisse supposer là aussi un éventail de comportements différents.

2.3.3 – 4-éthyl-phénol.

Nous relevons 1,627 mg/L de 4-éthyl-phénol en fin de culture (350 heures) dans le milieu *SWM-thiamine*, soit 33 % de moins que la teneur relevée pour le milieu SWM sans thiamine (2,439 mg/L). Ainsi l'ajout de thiamine à cette concentration semble défavoriser le métabolisme aboutissant à la formation des phénol-volatils.

Ce composé est-il inhibiteur des voies de conversion ? Intervient-il dans une compétition énergétique ou une réorientation des flux métaboliques ? .... ces premiers résultats ne permettent pas encore d'y répondre. L'approfondissement de cette piste pourrait permettre d'offrir de nouvelles pistes dans la compréhension de ce métabolisme, notamment son intérêt pour la levure.

2.4 – Influence des tanins œnologiques.

2.4.1 – Avant propos.

D'autres types d'adjuvants peuvent être considérés dans les procédés vinicoles. Il s'agit des tanins œnologiques. Il existe plusieurs tanins commerciaux, d'origines diverses, dont la composition varie (Moutounet et al., 2004 ; Taillandier et Bonnet, 2005) :

- Tanins de noix de galles, constitués de gallotanins (copolymères de l'acide gallique et de matières glucidiques).
- Tanins de bois de chênes et de châtaigners, riches en tanins ellagiques (copolymère complexe de l'acide ellagique, d'acide gallique et de matière glucidique).
- Tanins de bois exotique : quebracho, constitué de fisétinidol, de catéchine et d'épicatéchine.
- Tanins de raisin, autorisés depuis 2000:
  - tanins de pépin formés d'enchaînement d'épicatéchine, de catéchine et d'épicatéchine gallate.

- tanins de pellicules de raisin, consitutés d'épicatéchine, de catéchine, d'épicatéchine gallate et d'épigallocatéchine.

Dans le commerce, il s'agit de poudres de tanins, extraites de bois ou de raisin par des traitements à l'alcool dilué.

Nous présentons en Annexe 09 les différentes structures évoquées précédemment.

Le règlement CEE 822/87 du 16 mars 1987 autorise l'emploi de tanin à tous les stades de l'élaboration du vin (moûts frais, vins en fermentation, vins finis). Suivant leur origine et leur degré de polymérisation, leur ajout vise alors à :

- § Améliorer la conservation du vin et prévenir l'oxydation (tanins ellagiques hydrolysables vont alors consommer rapidement l'oxygène).
- § Stabiliser la couleur rouge (tanins condensés, pro-anthocyanidique qui s'associent aux anthocyanes).
- § Protéger le vin contre la casse oxydative dans le cas de vin issu de vendanges pourries (réactivité vis à vis de la laccase).

Les tanins sont alors souvent employés sous forme de mélange, car leurs actions se complètent.

Nous voulons donc savoir si l'ajout de tels composés a une conséquence sur le développement de *Brettanomyces*.

Pour ce faire, nous composons plusieurs milieux en utilisant des poudres de tanins commercialisées (Laffort œnologie, Bordeaux).

- § Un milieu synthétique complété uniquement à partir d'oenotanin, c'est à dire de tanins de raisin (cocktail équi-massique de tanins de pépins et de pellicules): *SWM-TanRaisin*
- § Un Milieu Vin Corrigé, complété uniquement en tanins de raisin (cocktail équi-massique de tanins de pépins et de pellicules): *MVC-TanRaisin*
- § Un Milieu Vin Corrigé, complété en tanins de raisin et en tanins de bois (avec un cocktail équi-massique des différentes essences de bois disponibles : chêne, châtaigner, galle et quebracho) : *MVC-TanMél*.

Afin de se fixer un repère, les différents ajouts sont effectués afin de se trouver avec des milieux possédant un Indice Polyphénols Totaux compris entre 70 et 80 (fourchette peu précise, mais les modifications d'IPT ne sont pas linéaires avec les doses ajoutées, … il nous a donc fallu nous fixer une gamme plus qu'une valeur précise d'IPT). Les doses correspondantes sont présentées dans le chapitre 03.

S'agissant ici d'études préliminaires, nous n'avons considéré qu'une seule souche de travail : souche B. Cette dernière est mise en culture à 20 °C avec une agitation de 150 rpm.

2.4.2 – Croissance.

La figure 04E-8 présente les profils de croissances obtenues pour la souche B dans les différents milieux précédemment cités.

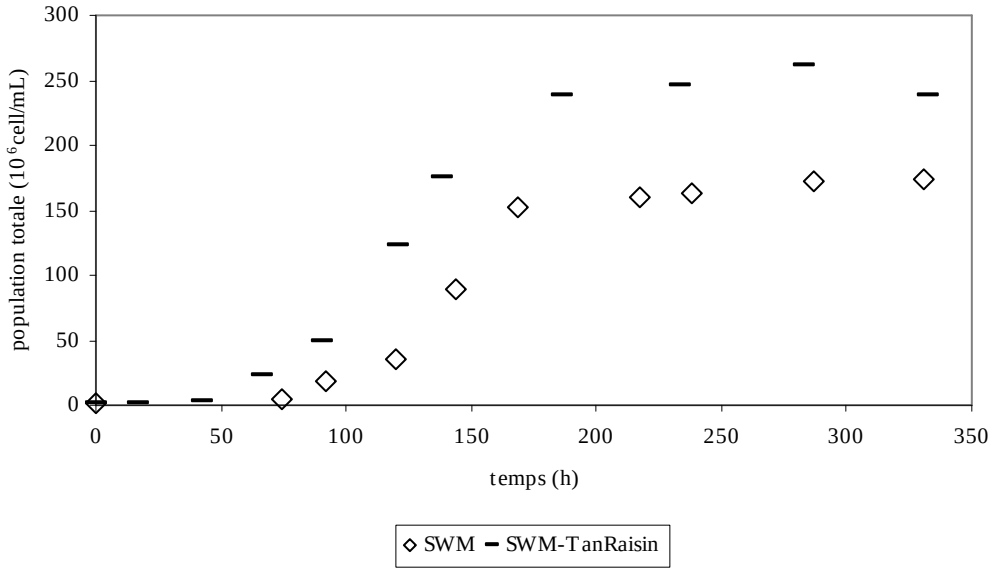


Figure 04E -8a. SWM et SWM complété en tanins.

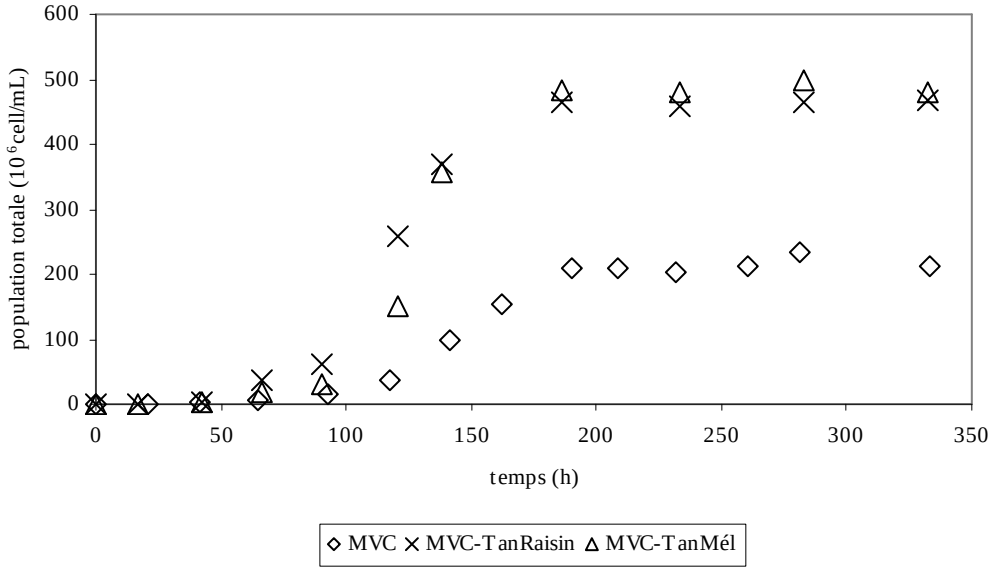


Figure 04E -8b. MVC et MVC complété en tanins.

Figure 04E -8. Croissance comparée pour une souche B. bruxellensis dans des milieux complétés en tanins œnologiques.

L'ajout de tanin de raisin en milieu synthétique s'accompagne d'une augmentation significative du niveau de population finale en phase stationnaire ($173 \pm 5 .10^6$ cell/mL et $246 \pm 11 .10^6$ cell/mL respectivement pour les milieux SWM et SWM-TanRaisin sur les 4 derniers points relevés)

Nous remarquons par ailleurs un taux de croissances a priori semblable pour les deux cultures (phase de croissance présentant une pente semblable). Mais la croissance s'arrête plus tôt dans le milieu exempt de complément.

De même pour le Milieu Vin, l'ajout des cocktails de tanins a largement favorisé la croissance. Ainsi, nous retrouvons des populations finales multipliées pratiquement par 2,5 entre le milieu *MVC* et les milieux complétés. ($213 \pm 6 .10^6$ cell/mL, $465 \pm 8 .10^6$ cell/mL et $480 \pm 9 .10^6$ cell/mL respectivement pour les milieux *MVC, MVC-TanRaisin* et *MVC-Tan Mél*)

En revanche nous ne trouvons pas de différences significatives entre les deux types de cocktails ajoutés. La nature des tanins, aux doses considérées dans l'expérience, n'a donc semble-t-il pas d'importance sur le comportement de la levure et aboutit aux mêmes performances d'un point de vue croissance. Nous observons une légère avance au démarrage de croissance en faveur du milieu complété en tanins de raisins seuls (une vingtaine d'heures) par rapport au mélange de tanin raisin/bois.

L'ensemble des cultures dans les milieux complétés en tanins, et ce peu importe la nature de l'ajout présente une phase de latence du même ordre de grandeur, d'une cinquantaine d'heures. Cette observation nous amène à dire que la présence de ces ajouts ne joue a priori pas sur la phase initiale de la croissance. (Il aurait fallu pouvoir mener la comparaison avec les témoins pour compléter cette information).

Comment expliquer une telle différence de croissance due à ces adjuvants ? Les tanins seuls sont ils responsables d'une telle augmentation de la population ? A ce jour, aucune étude ne fait état de tel effet des tanins sur le comportement levurien, et plus particulièrement sur le développement du contaminant.

Nous pouvons supposer que *Brettanomyces* est capable de tirer profit d'une source supplémentaire de carbone apportée avec les ajouts. Existe-il alors un métabolisme particulièrement original chez cette levure lui permettant d'assimiler les tanins ? Ce serait là un fait totalement inédit à ce jour où on ne relève, dans la bibliographie, aucun comportement similaire évoqué chez quelque micro-organisme que ce soit.

Cette hypothèse serait d'ailleurs en contradiction avec les résultats évoqués précédement (module E, 1.2). En effet, le vin traité au PVP et donc partiellement dépouillé d'une partie de ses

tanins présente une croissance légèrement plus importante par rapport au témoin, laissant alors supposer un effet inhibiteur de ces tanins du raisin.

Nous pouvons par ailleurs faire l'hypothèse que les tanins ne sont pas eux même les composés dont profite le contaminant lors de tels ajouts. En effet, les poudres de tanins considérés ne sont pas des tanins purs, mais des poudres complexes obtenues par extractions. Elles sont donc susceptibles de contenir d'autres éléments provenant de la matière utilisée. Néanmoins, Moutonnet et al. (2004) montrent que les composés poly-saccharidiques (candidats potentiels au métabolisme) ne représentent qu'une fraction infime des poudres commerciales, évoquant quelques mg/g de poudre à quelques 100 mg/g pour les plus riches.

Il est encore difficile d'interpréter les phénomènes impliqués dans ces observations.

2.4.3 – 4-Ethyl-phénol.

Les résultats des dosages du 4-éthyl-phénol pour l'ensemble des milieux considérés sont présentés dans le tableau 04E – 6.

Tableau 04E-6. Teneur finale en 4-éthyl-phénol pour une souche de B. bruxellensis dans des milieux complétés en tanins œnologiques.

	milieu				
	SWM	SWM-TanRaisin	MVC	MVC-TanRaisin	MVC-TanMél
4-EP (mg/L)	2,439	0,918	0,857	0,466	0,59

Nous vérifions que les ajouts de tanin n'augmentent pas la teneur initiale en acide para-coumarique. (Test effectué en dosant l'acide para-coumarique dans des solutions hydroalcoolique – 10 % vol/vol – de poudre de tanins, filtrées sur 0,2 µm avant la mesure).

Aussi bien dans le milieu synthétique que dans le milieu Vin, l'ajout des poudres de tanins entraîne une diminution importante de la production de 4-éthyl-phénol. Le métabolisme de l'acide cinnamique est donc modifié, voire inhibé par la présence dans le milieu de ces exo-tanins ou d'autres composés apportés avec les exo-tanins.

Ainsi, malgré une population plus importante, la conversion de l'acide para-coumarique est amoindrie par la présence de cet adjuvant.

Ces concentrations correspondent donc à des taux de conversion molaire de l'acide para-coumarique de 53,7 %, 29 % et 36,9 % respectivement pour les milieux *MVC*, *MVC-TanRaisin* et *MVC-TanMél*. Nous rappelons alors que pour le milieu MVC partiellement détanisé (MVC-Phénol(-)),

le taux de conversion de l'acide para-coumarique est de 61,2 %. Nous retrouvons donc là aussi l'idée que la présence de tanins supplémentaires joue en la faveur d'une diminution de la conversion de l'acide cinnamique.

Il ne faut cependant pas y voir une solution miracle permettant d'inhiber les méfaits du contaminant. En effet nous restons à des niveaux d'éthyl-phénols proches voire supérieurs aux seuils de détection, et donc, non sans conséquence sur la qualité du produit final. De plus, notre réserve se justifie par le fait qu'il ne s'agit ici que d'une seule étude, et qu'il sera impératif de conduire des tests similaires sur un nombre plus important de souches avant de statuer sur le comportement général, s'il en existe un (diversité intra-spécifique déjà démontrée à bon nombres de niveaux).

2.4.4 – Synthèse.

Nos résultats suscitent une mise en garde vis-à-vis des conséquences d'apport de tels adjuvants qui ne semblent donc pas anodins par rapport au risque *Brettanomyces*. Sans en être un élément déclencheur ou indispensable, l'emploi de ces poudres peut rimer avec facteur aggravant pour la croissance dans certains cas, mais non pour la production d'éthyl-phénols.

Notre étude, originale par apport aux travaux présents dans la bibliographie, ne constitue cependant qu'une première d'approche du problème qui soulève bons nombres d'interrogations. Il serait donc intéressant de l'approfondir, en travaillant plus particulièrement sur des tanins purs et identifiés avec précision pour en cerner l'influence exacte. Une analyse complète de la composition des poudres de tanins œnologiques serait aussi un élément clé à la compréhension des effets observés sur la croissance du contaminant.

3 – Influence de la teneur en Acide Gluconique.

3.1 – Avant-propos.

Lors de l'étude sur le raisin (Chapitre 04 module B), nous avons montré que la présence de *Brettanomyces* sur les baies était plus probable lorsque *Botrytis cinerea* se développe également. S'agit-il alors de l'existence de conditions favorables au développement conjoint des deux espèces (sans qu'il n'existe de relation directe entre elles) ? Ou alors, s'agit il d'une relation de cause à effet : le développement de *Botrytis* engendrant un terrain favorable (et non nécessairement indispensable) au le développement de *Brettanomyces* ? Les premiers éléments que nous avons relevés ne nous ont pas permis d'y répondre clairement.

Néanmoins, nous trouvons intéressant de continuer les investigations sur les liens éventuels entre ces deux micro-organismes. Pour donner suite à l'étude précédente, portant sur une étape en

amont du procédé de vinification en lui-même (matière première), nous tentons ici de voir si des moûts issus de vendanges botrytisées constituent un terrain favorable au développement de la levure.

Pour ce faire, nous nous intéressons au métabolite principal de ce champignon : l'acide gluconique (acide 2,3,4,5,6-pentahydroxy hexan-1-oïque, Cf figure 04E-9).

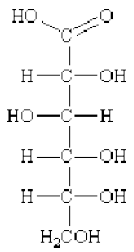


Figure 04/E-9. Formule de l'acide gluconique.

Cet acide résulte de l'oxydation de la fonction aldéhyde du glucose provoqué par une glucose-oxydase, abondante chez les moisissures. Il se retrouve intégralement dans les vins finis, car il est non fermentescible. Sa concentration peut alors atteindre plusieurs g/L pour des vins issus de vendanges très touchées par la pourriture grise.

3.2 – Cultures en présence d'acide para-coumarique.

3.2.1 – Croissance.

La figure 04/E-10 montre les profils de croissance obtenus pour la souche B cultivée dans le milieu synthétique SWM complété en différentes teneurs en Acide gluconique : 0 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 g/L. L'inoculum se fait à 10^6 cell/mL.

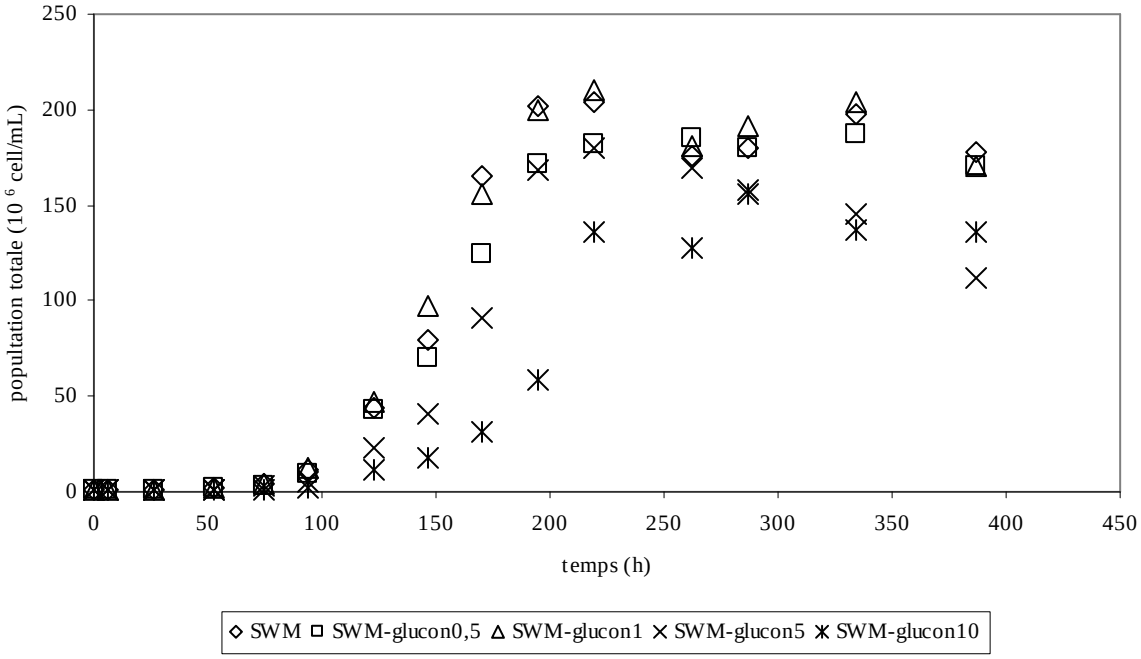


Figure 04E-10. Croissance comparée pour une souche de B. bruxellensis, influence de la concentration en acide gluconique dans le milieu SWM.

Nous ne notons pas de différences sur les croissance pour les expériences : SWM, SWM-glucon0,5 et SWM-glucon1. Il semble donc que sur cette gamme de concentration, l'acide gluconique n'ait pas d'effet notable.

En revanche pour les deux milieux possédant les concentrations plus importantes, SWM-glucon5 et SWM-glucon10, nous relevons un effet négatif avec la concentration croissante en acide gluconique. Ainsi, à 10 g/L, la levure subit un retard de pratiquement 50 heures dans le démarrage de la croissance. De plus, sa population atteint des niveaux sensiblement moins élevés que ceux obtenus pour les concentrations moindres en acide. Nous faisons remarquer également une vitesse de croissance nettement plus faible que pour les milieux faiblement complétés en acide gluconique. SWM-glucon5 est également marqué par un léger retard dans le démarrage et une vitesse de croissance plus faible. En revanche, dans ce milieu, la levure atteint une population maximale proche de celles obtenues pour les milieux à 0 ; 0,5 et 1 g/L en acide gluconique. Nous constatons cependant pour ce milieu une phase de déclin rapide, avec lyse des levures (observation au microscope), phénomène peu ou pas observé pour les autres conditions de travail. Nous ne pouvons pas expliquer ce phénomène, d'autant que la lyse n'est pas observée pour la concentration plus élevée.

3.2.2 – 4-Ethyl-phénol.

Le tableau 04E-7 rassemble les teneurs de 4-éthyl-phénol obtenues à la fin de l'expérimentation (on rappelle que pour la souche B, la teneur maximale est obtenue dès la fin de la première et unique phase de croissance).

Tableau 04E-7. Concentration finale en 4-éthyl-phénol : Influence de la teneur en acide gluconique dans le milieu SWM.

4-EP	SWM	SWM-glucon0,5	SWM-glucon1	SWM-glucon5	SWM-glucon10
(mg/L)	2,389	2,409	2,391	2,375	1,875

Alors que nous ne notons pas de différence significative entre les milieux avec une concentration en acide gluconique inférieure ou égale à 5 g/L, on relève une forte diminution dans la production de ce composé pour le milieu SWM-glucon10.

Deux interprétations sont possibles :

- imputer cette minoration de la production d'éthyl-phénol au niveau de population atteint, lui-même plus faible pour cette condition. Or, d'autres travaux menés sur cette souche au laboratoire suggèrent que la quantité de 4-éthyl-phénol produite au final n'est pas corrélée au niveau de population.
- supposer une action directe de la présence de l'acide gluconique à cette concentration sur le métabolisme de conversion de l'acide para-coumarique en phénol volatil. Il nous est alors difficile d'expliquer ce phénomène. Le métabolisme éventuel de cet acide dérivé du glucose ou son impact sur le métabolisme est totalement inconnu, aucune recherche antérieure n'a semble-t'il été menée pour déterminer l'action de ce composé sur le métabolisme des levures.

3.3 – Cultures en absence d'acide para-coumarique.

La dernière hypothèse émise dans le paragraphe précédent suggérait un lien entre métabolisme de acide acide para-coumarique et celui de l'acide gluconique.

Mais existe-t'il alors un lien entre la présence combinée de ces deux acides sur le développement de *Brettanomyces* ?

Nous menons alors une comparaison de la croissance de la souche dans les milieux SWM (contenant 5 mg/L d'acide para-coumarique) et SWMcoum0 (contenant 0 mg/L d'acide para-coumarique), complété avec 0, 1, 5 et 10 g/L d'acide gluconique (Figure 04E – 11).

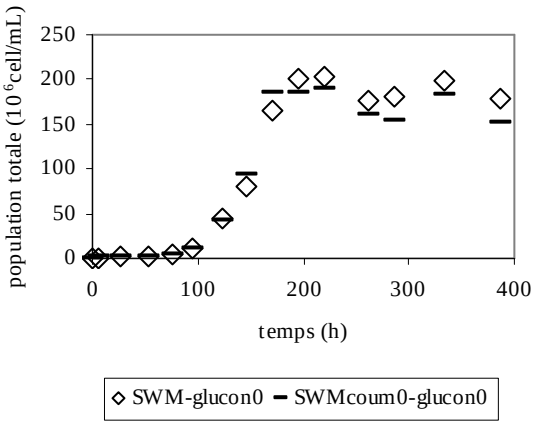


Figure 04E-11a. Acide gluconique 0g/L

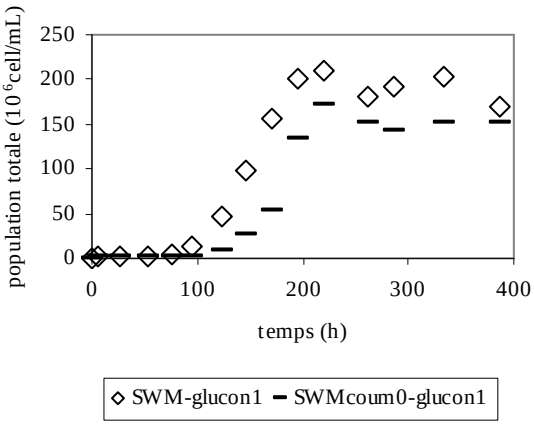


Figure 04E-11b. Acide gluconique 1g/L

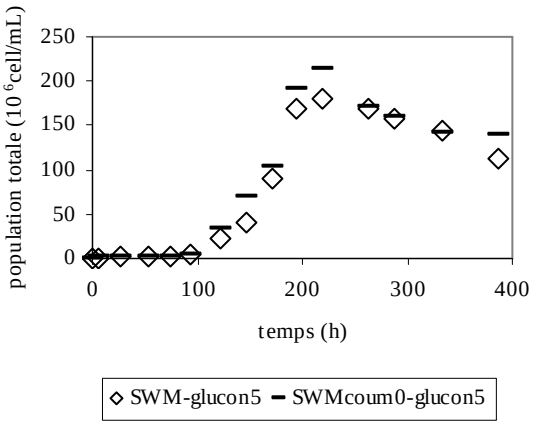


Figure 04E-11c. Acide gluconique 5g/L

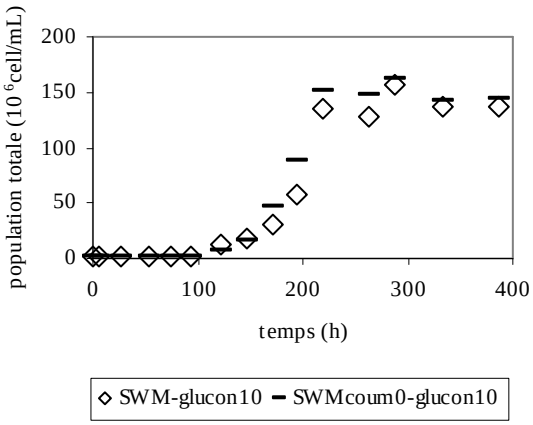


Figure 04E-11d. Acide gluconique 10g/L

Figure 04E-11. Comparaison pour une souche de B. bruxellensis entre milieux SWM et SWMcoum0 avec différentes concentrations en acide gluconique.

En premier lieu, la Figure 04E –11a, comparant la croissance dans le milieu *SWM* et dans ce même milieu dépourvu d'acide para-coumarique (*SWMcoum0*) nous permet, en dehors de toute considération pour l'acide gluconique, de dire que pour cette souche, la présence de l'acide para-coumarique (à raison de 5 mg/L) n'a aucun incidence sur le développement de la levure.

Par ailleurs, si nous nous intéressons à l'acide gluconique, nous relevons pour une concentration de 1 g/L, la croissance est nettement ralentie dans le cas d'un milieu dépourvu d'acide para-coumarique (Figure 04E-11b). La population atteinte se retrouve quant à elle diminuer également dans *SWMcoum0*. Ainsi la présence d'acide gluconique à cette concentration, s'accompagne, en absence d'acide para-coumarique, d'un effet négatif sur la croissance de la souche B, tant d'un point de vue cinétique que population finale. Ce résultat suggèrait donc un lien éventuel entre deux

phénomènes/métabolismes impliquant pour l'un l'acide gluconique et pour l'autre l'acide para-coumarique.

Nous tendons cependant à considérer ce résultat comme un d'artefact, par rapport aux autres cultures (0, 5 et 10 g/L) qui elles ne présentent pas de différences significatives (si ce n'est une légère avance dans la croissance) par rapport aux milieux avec acide para-coumarique.

3.4 - Synthèse.

Cette première étude rapide sur l'influence de l'acide gluconique est particulièrement innovante. A ce jour, nul autre travail n'évoque l'effet de ce composé sur la levure *Brettanomyces.*

Nous retenons donc que l'acide gluconique n'a donc pas d'action à proprement parler favorable sur le développement de *Brettanomyces*, contrairement à ce qu'on aurait pu trop rapidement penser (par extrapolation enthousiaste à partir des présences liées de *Brettanomyces* et *Botrytis* sur le raisin). Il exercerait même un effet négatif sur le développement du contaminant dans une gamme de concentration élevée (au-delà de 5 g/L). Par ailleurs la présence ou non d'acide para-coumarique (à 5 mg/L) n'a pas d'influence notable sur l'action de l'acide gluconique.

Ainsi au regard des travaux présentés il est encore trop tôt pour présenter l'acide gluconique, ou tout autre composé comme un paramètre pouvant par exemple permettre de déterminer le potentiel d'un moût (caractérisé par un état sanitaire donné), vis-à-vis du risque de développement du contaminant.

Nous n'avons ici testé qu'un seul composé rencontré préférentiellement lors de vendanges altérées. Il va sans dire qu'il existe encore un grand nombre d'autres composés, liés à la présence de pourriture grise. Tester leur influence sur le développement du contaminant *Brettanomyces* peut permettre dans le futur de déterminer le potentiel d'un milieu/moût vis-à-vis de la contamination. Citons pour exemples : l'acide glycuronique, l'acide mucique, l'acide galacturonique, voire les polysaccharides colloïdaux tels que le glucane ou encore des exo-enzymes comme la laccase (dont l'acide para-coumarique est un inducteur efficace de production lors d'attaques de pourriture grise selon Mayer, 1987). A ceux là s'ajoutent également les composés qui diminuent du fait du développement de la pourriture.

Résumé du module

Nous montrons en premier lieu que le milieu synthétique que nous employons n'est pas un modèle parfait de la matrice vin. L'absence de certains composés non identifiés se traduit alors par une légère sous-évaluation des populations et des cinétiques par rapport à un développement dans un vin dans les mêmes conditions. Néanmoins, le milieu SWM de formulation simple permet une bonne croissance et donc des études en laboratoire sans risque de modifier totalement le développement de la levure par rapport à un vin. En ce sens il constitue un bon milieu minimum, type vin, pour des études préliminaires.

Nous notons par ailleurs que la déphénolisation partielle d'un milieu vin entraîne un développement plus important du contaminant. Ce point suggère alors la présence d'un/des élément/s inhibiteur/s dont le milieu est dépouillé lors du traitement au PVP. Il convient alors de prendre garde lors de tel traitement en pratique, et avoir conscience d'un risque accru vis-à-vis de la contamination. Nous rappelons somme toute que les concentrations pour le traitement au PVP considéré dans notre travail sont largement exagérées par rapport aux doses légales autorisées en œnologie pour les collages.

L'emploi d'adjuvants œnologiques nous apparaît par ailleurs non sans risque vis-à-vis de Brettanomyces. En effet dans le cas d'emploi de compléments anti-carences, tels que l'apport d'azote sous forme ammoniacal, ou d'ajout de thiamine, censés favoriser le bon déroulement des fermentations, nous montrons que les teneurs résiduelles après Fermentation Alcoolique généralement observables sur le terrain suffisent à favoriser le développement de Brettanomyces. L'ajout de ces deux composés ($(NH_4)_2SO_4$ et vitamine B1) influe également sur la formation des phénols volatils. Ainsi l'azote favorise la production de 4-éthyl-phénol, à l'opposé de la thiamine qui présente une tendance à diminuer cette production. Une fois de plus, ce point confirme qu'il n'y a pas de lien direct entre stimulation de croissance et production de phénols volatils chez Brettanomyces.

L'ajout de poudres de tanins œnologiques, qu'ils soient de raisin ou de bois, s'avère également une procédure pouvant favoriser le développement de la levure. Là également la production d'éthyl-phénols est modifiée de façon inverse par ces ajouts. Les mécanismes et phénomènes impliqués ne sont pas encore connus. Il conviendra, à défaut de connaissances précises sur leur métabolisme de retenir que dans la pratique, l'emploi de ces tanins exogènes ne peut se faire sans y associer une vigilance accrue.

Enfin, l'acide gluconique, caractérisant les vendanges botrytisées et donc a priori à pression plus forte, semble jouer à certaines concentrations (> 5 g/L) un effet modérateur du développement de Brettanomyces tant d'un point de vue croissance que de production de 4-éthyl-phénol.

- CONCLUSION GENERALE -

Au cours de ces 3 années d'études sur la levure de *Brettanomyces*, nous nous sommes efforcés de concilier les approches de terrains et approches de laboratoire pour mieux cerner la contamination dans le contexte œnologique tout en conservant une approche « procédé » par l'analyse pratique des points critiques dans le cas de la cave de Buzet.

Nos premiers travaux ont donc permis de mettre en avant une méthode de dépistage et d'isolement de *Brettanomyces* à partir des différents échantillons tout au long du procédé de vinification : de la matière première au produit fini. Les durées nécessaires pour obtenir les conclusions sont relativement longues, et ne permettent pas une détection en temps réel. Une détection rapide, intéressante en production peut se faire essentiellement par des méthodes de biologie moléculaire, mais elles sont encore à ce jour à améliorer. Néanmoins, dans le cadre d'études de compréhension générale, notre méthode permet d'obtenir des conclusions pertinentes avec une mise en œuvre de microbiologie classique très simple et accessible. Bien que non quantitative dans la majorité des cas, cette procédure de détection a permis néanmoins de déceler la présence de levures *Brettanomyces* même à de très faibles niveaux initiaux et souvent dans des états de survie.
La première étape de cette procédure, étape dite d'enrichissement et de réactivation est alors apparue comme une étape clé. Sa durée a été adaptée aux différents types d'échantillons afin d'optimiser le taux de recouvrement de la population contaminante.
De plus en garantissant l'intégrité des souches, la démarche retenue a autorisé des isolements, mettant alors à notre disposition de nombreuses souches indigènes pour des travaux ultérieurs.

Des applications de cette méthode aux suivis sur plusieurs années, nous retenons donc la présence effective de la levure *Brettanomyces* sur le raisin de plusieurs parcelles du vignoble de Buzet. Ces résultats mettent en avant une source potentielle de contamination pour le procédé de vinification en aval. Dès lors, il convient d'envisager des méthodes préventives et adaptées vis-à-vis de la vendange (sulfitage adéquat, tri, identification des lots à risque et traçabilité impérative des lots pour éviter le croisement des vins à risque...) afin de minimiser l'apport de contaminant en entrée de cuve et sa dissémination en cave.
L'observation d'une parcelle à l'échelle macroscopique nous a permis par ailleurs de montrer l'impact des facteurs environnementaux sur la présence de la levure à la surface des baies. Qu'il s'agisse d'humidité, de fraîcheur ou de vecteurs (insectes, oiseaux), nous nous rendons compte que de tels paramètres influent notablement sur les profils de présence au sein d'une parcelle donnée.
La mise en place d'une parcelle pilote a par ailleurs permi de préciser l'influence de l'humidité sur cette présence levurienne. Ainsi une humidité accrue augmente notablement la probabilité de présence du contaminant sur les baies. Cependant, ces effets varient avec les quantités d'eau mises en jeu. Un arrosage trop important (que nous avons voulu exagéré par rapport à la réalité) aura un impact positif moindre qu'un arrosage moyen (pouvant correspondre à une météorologie réaliste).

La présence de *Brettanomyces* est de plus apparue liée à celle de *Botrytis*. Nous n'avons pas pu étudier d'avantage la relation entre ces deux micro-organismes : s'agit-t'il alors de conditions favorables communes entrainant un développement simultané ou d'un phénomène de cause à effet ? En revanche, nos résultats ont suggéré que la présence de *Brettanomyces* sur le raisin n'était pas du tout liée à celles des champignons filamenteux : *Penicilium sp.* et *Aspergilus sp.*, pas plus qu'aux bactéries acétiques.
Au cours de ces expérimentations sur parcelle pilote, l'emploi d'un anti-Brotytis à base de procymidone, et appliqué à des doses sortant du cadre législatif a eu pour effet de limiter la présence de *Brettanomyces* sur les baies.

Nos travaux et suivis à la Cave de Buzet pendant plusieurs campagnes de vinification nous ont permis d'effectuer des bilans de population en cours de campagne. Il nous est alors apparu que le concept d'hygiène, en tout point du procédé, reste un point primordial dans la gestion de la contamination en cave. Néanmoins, malgré des efforts constants dans l'amélioration de l'hygiène du chai et du matériel viti-vinicole, une contamination reste présente à la cave, à des niveaux très faibles et avec des impacts moindres en comparaison à la situation au démarrage de nos travaux. Ce constat nous amène alors à préciser que l'hygiène seule ne permet pas de résoudre tous les problèmes. Pour des raisons de confidentialité, nous n'avons pas évoqué ces résultats dans le présent document, mais n'en donnons ici les grandes lignes.

En préambule aux travaux en laboratoire, des expérimentations préliminaires ont montré toute la difficulté d'appliquer des méthodes classiques de quantification et de numération lors de cultures de *Brettanomyces*. Ainsi la mesure de Densité Optique a trouvé très vite des limites, de même que les numérations sur boite. L'appréciation de la viabilité par coloration au bleu de méthylène s'est avérée problématique pour plusieurs souches de *B. bruxellensis*. La numération cellulaire totale avec cellule de Thoma a alors été considérée comme seule procédure de quantification satisfaisante pour nos études futures.

Par la suite, nos études sur des souches isolées par nos soins à Buzet et Madiran entre 2001 et 2004, ont mis en avant une incroyable diversité au sein de la seule espèce *B. bruxellensis*. La variabilité au niveau génétique que nous avons trouvée (24 souches testées ont alors été regroupées en 6 groupes génétiques distincts + 3 souches indépendantes) a été renforcée par une variabilité comportementale très étendue.
Nous rappelons alors que lors de cultures sur milieu synthétique type vin en fin de Fermentation Alcoolique pour 9 souches testées, nous avons obtenu 3 grands types de profils de croissance, 3 types de profils de consommation du glucose et du fructose, 6 groupes quant à la production d'acide acétique. La conversion de l'acide para-coumarique a également été un argument clé de cette distinction intra-spécifique : tant d'un point de vue capacité de production (les taux de conversion

varient d'à peine 10 % à pratiquement 80 %) que d'un point de vue cinétique de production (certaines souches présentant un couplage avec la croissance alors que d'autres affichaient un découplage des deux phénomènes). Nous précisons de plus qu'il n'est apparu aucune concordance possible entre ces différentes classifications phénotypiques entre elles mais aussi avec les regroupements génétiques, ouvrant d'avantage l'éventail de la diversité.
Nous montrons par ailleurs que sur le site de Buzet, nous n'avons pas retrouvé dans nos isolats de souche dominante établie, ni dans l'espace, ni dans le temps. Cette multiplicité des souches contaminantes sur site nous a donc amené a envisager des sources de contaminations diverses, avec des apports de souches différentes. A ce niveau, nous avons renforcée l'idée d'un apport de la contamination avec la vendange ou des vecteurs physiques (tels que les drosophiles), même si nous n'avons pu le confirmer par une traçabilité génétique.

Nous retenons également que les bilans carbone et azote sur ces souches a permis de montrer une grande variabilité dans la composition élémentaire de la levure, venant par la même seconder la grande variabilité morphologique observée au sein du groupe de souches étudiées.
Ainsi qu'il s'agît de leur profil de croissance, de leur composition cellulaire, de la consommation des sources carbonées et azotées, mais aussi de production de phénols volatils ou de métabolites mineurs, les différentes souches étudiées se sont démarquées les unes des autres.
Il est donc impossible d'établir dans l'absolu un comportement type pour *Brettanomyces*. De ce fait nous avons pris conscience de toute la difficulté, et risque, de proposer des solutions types et généralistes pour faire face à la contamination.

Par ailleurs, lors de ces études sur milieu type vin synthétique minimum, nous avons été confrontés à des interrogations quant au métabolisme même de ces levures. En effet, les profils de croissances relevés suggèrent des métabolismes complexes d'assimilation de substrats divers et séquentiels et non encore identifiés. Des phases d'adaptation aux conditions du milieu qui évolue ont été suggérées, mais les facteurs clé de ces étapes restent encore à préciser (limitation ? inhibition ? ...).

Une comparaison des performances de la levure sur le milieu synthétique employé et une matrice vin nous amène à préciser que le milieu synthétique n'a été qu'un modèle approché et incomplet du milieu naturel. Néanmoins, nous avons pu le considérer comme un milieu minimum, facile à réaliser, et permettant d'obtenir des résultats significatifs quant au comportement de la levure en contexte œnologique.

Nous avons également montré qu'une déphénolisation partielle du vin par un traitement au PVP entraînait une nette augmentation de la croissance chez *B. bruxellensis*. Ces résultats nous ont alors suggéré une probable action inhibitrice sur la croissance de *Brettanomyces* des composés poly-phénoliques. En revanche, ces composés n'ont eu a priori pas de conséquence sur la capacité globale

des levures à convertir l'acide para-coumarique. En effet, vin normal, vin partiellement déphénolé, et milieu synthétique totalement dépourvu de composés poly-phénoliques ont permis d'obtenir des taux de conversion très proches pour les 3 souches considérées lors de l'expérience.

Les influences sur le développement du contaminant de différents produits œnologiques ont également été testées.

La thiamine à la teneur légalement autorisée (60 mg/hL résiduel) est alors clairement apparue comme un facteur de croissance chez *Brettanomyces :* population plus importante et légère accélération de la croissance.

Néanmoins la répercussion sur la production d'éthyl phénol s'est avérée contraire. Bien que supérieures aux concentrations tolérables, les concentrations obtenues dans le milieu complété en thiamine ont été largement inférieures à celles obtenues dans le témoin. Ce résultat montre encore une fois que croissance et production d'éthyl-phénol ne sont pas des phénomènes liés par un couplage absolu.

De même la teneur en azote assimilable résiduel en fin de fermentation alcoolique pouvait avoir des conséquences sur le comportement de la levure. Toutes les souches testées n'ont cependant pas réagi de la même manière, montrant des sensibilités différentes. Ainsi, pour une teneur de 120 mg/L certaines souches n'ont présenté qu'une légère accélération de la croissance par rapport à un milieu contenant 2 fois moins d'azote résiduel. Une autre souche en revanche a présenté une très forte accélération de la croissance doublée d'une population finale beaucoup plus importante dans le milieu à forte teneur en azote.

Nous retenons par ailleurs pour les 3 souches testées la diminution significative de la production d'éthyl-phénols avec les faibles teneurs en azote résiduel.

Ces résultats ont donc montré le risque important à avoir des vins contenant des teneurs importantes en azote résiduel.

L'ajout de poudres de tanins œnologiques (qu'ils soient de raisin ou de bois, dans le vin ou le milieu synthétique) a abouti à des croissances plus importantes pour la souche testée. Tout comme la thiamine, cette augmentation dans la croissance de la levure ne s'est pas accompagnée d'une augmentation de la production d'éthyl-phénol. Une diminution de la conversion du précurseur, a même été observée.

Nous précisons ici que cette expérience, qui peut paraître contradictoire avec celle du vin déphénolisé, a permis de montrer l'influence d'ajout de poudre de tanins commercialisés, et non des tanins purs. En effet, ces poudres disponibles sur le marché, de part les procédés de fabrication peuvent contenir bon nombre de constituants (non connus précisément) dont nous ne connaissons pas les conséquences sur le comportement de la levure. Un travail ciblé avec des tanins purs, de différentes natures, permettrait de faire la part des choses et de préciser ainsi le rôle de ces composés phénoliques.

Nous gardons donc à l'esprit en conclusion de ce travail sur les adjuvants œnologiques que même si ceux–ci ne sont probablement pas des facteurs déclenchants, leur emploi (en considérant les doses résiduelles en fin de vinification) n'est pas anodin par rapport au risque de développement de *Brettanomyces*. Il convient alors d'intégrer ces éléments et de considérer le suivi nécessaire dans l'itinéraire de vinification.

Nous avons montré par ailleurs que l'acide gluconique n'est pas un composé susceptible de favoriser le développement de *Brettanomyces*. Des concentrations élevées, supérieures à 5 g/L (correspondantes à des moûts issus de vendange fortement botrytisées) ont même présenté une action légèrement inhibitrice, tant d'un point de vue de la croissance que de la production d'éthyl-phénol.

Au final, nos travaux ont donc permis d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de la contamination par la levure *Brettanomyces* en contexte œnologique. Il conviendra donc d'en tirer profit en vue d'améliorer les outils de lutte contre ce contaminant.

Néanmoins, nous prenons conscience que de nombreuses questions n'ont pas été élucidées. Certaines nouvelles autres interrogations se sont même présentées suite aux observations faites lors de nos études.

En compléments des pistes que nous avons ouvertes au cours de notre synthèse nous pouvons proposons quelques autres points qu'il serait intéressant d'étudier pour compléter nos travaux.

- Le dépistage reste dans la pratique un élément clé de la lutte (préventive) contre *Brettanomyces*. Celui ci ne peut s'avérer pleinement efficace que si des outils performants, maîtrisés et rapides sont mis à disposition. De ce fait, les méthodes génétiques paraissent à ce jour les plus proches de cet objectif. Néanmoins, une étape de développement doit être franchie si l'on veut que les acteurs principaux puissent y avoir accès dans la pratique. De plus ces outils permettrait d'approfondir les connaissances sur les modes mêmes de contamination. Une approche complémentaire de traçabilité à des niveaux génétiques autoriserait alors d'identifier, au cas par cas les sources de contamination et les points sensibles dans les procédés ainsi que les modes de dissémination.
- Les voies métaboliques chez *Brettanomyces* sont partiellement connues. Il devient impératif d'identifier et de mieux comprendre les différentes voies métaboliques qui permettent à cette levure de s'adapter, se développer dans de nombreux milieux, tout en tirant profits de divers constituants présents ou apportés. Quels sont à ce titre les substrats secondaires de croissance et ou de maintien ? Quel rôle joue l'oxygène, tant d'un point de qualitatif que quantitatif, dans le métabolisme de cette levure très originale ?

- Le bénéfice pour la levure de la bioconversion des acides cinnamiques reste encore inconnu En revanche, au regard de nos résultats, elle est fortement influencée par de nombreux paramètres. L'exploration de ces pistes pourrait permettre de mieux comprendre cette activité indésirable de la levure.
- L'élaboration du vin fait intervenir un nombre très important de micro-organismes, et ce de la matière première au produit final. Il parait intéressant de s'interroger sur les interactions éventuelles qui peuvent exister entre *Brettanomyces* et ces autres micro-organismes. Citons pour exemple les interactions : *Brettanomyces / Botrytis* (comme suggéré par nos études sur le raisin), *Brettanomyces / Saccharomyces*, mais également *Brettanomyces /* bactéries lactiques.

Nous conclurons en rappelant que la mise en place d'outils efficaces dans une lutte, quelle qu'elle soit, nécessite tout un travail, parfois long, de compréhension du problème à solutionner. Dans le cas de *Brettanomyces*, qui est une problématique plus que jamais d'actualité, les connaissances encore réduites montrent qu'il existe encore de très nombreuses pistes à explorer et à comprendre. Néanmoins, l'œnologue possède aujourd'hui quelques outils, le plus souvent acquis par l'expérience collective, qu'il lui faut adapter, améliorer et utiliser à bon escient en fonction du contexte dans lequel il se trouve. Les travaux de recherches devront donc dans un premier temps viser à renforcer ces méthodes, souvent curatives, qui pour la plupart ne sont pas suffisamment ciblées. L'effort devra également se faire dans le développement d'outils préventifs, comme l'estimation des risques et l'évaluation d'un risque qui intègre l'ensemble des étapes du procédé, définissant au cas par cas une situation à maîtriser (de la vigne à l'embouteillage).

- REFERENCES -

- BIBLIOGRAPHIQUES -

v **AGOSTINO F., 1950** Polimorfismo esogene et endogenonei lieviti del genere *Brettanomyces*. *L'agricoltora Italiana, 50, p193*

v **AGUILAR USCANGA M.G., 1998** Caractérisation cinétique et métabolique d'une souche de *Brettanomyces*. *Thèse INP Toulouse, France.*

v **AGUILAR USCANGA M.G., DELIA M.-L., STREHAIANO P., 2000** Nutritional requirements *of Brettanomyces bruxellensis* : Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can J Microbiol, 46, pp1046-1050*

v **AHMAD I., BEG A.I., 2001** Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogen. *J. Ethnopharmacology, 74, pp113-123*

v **ARFMANN H.A., AGRAHAM W.R., 1989** Microbial formation of substitute styrenes. *Zeitun Naturforsh/Bioscience, 44, pp765-770*

v **AROUJO S., FERRER A., SULBARAN de FERRER B., NAVA C., 1998** Aislamiento de levaduras de judo fermentado extraido de variedades de uvas de vino blanci en el Estado Zylia, Venezuela. *Rev Fac Agron (LUZ), 15, pp246-255*

v **ASSELINEAU J., ZALTA J.P., 1973** *In* Les antibiotiques : structures et exemples de mode d'action. *Herman (ed), Frankfort*

v **BARANOWKY J.D., DAVIDSON P.M., NAGEL C.W., BAREN A.L., 1980** Inhibition of *Saccharomyces* by naturally occuring hydroxycinnamates. *J Food Sc, 45, pp592-594*

v **BARATA A., NOBRE A., CORREIRA P., MALFEITO-FERREIRA M., LOUREIRO V., 2006** Growth and 4-ethylphenol by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. *Am J Enol Vitiv, 57(2), pp133-138*

v **BARNETT J.A., PAYNE R.W., YARROW D., 1990** *In* Yeast : characterization and identification. 2nd edition. *Cambridge University Press (ed). Cambridge, New York, Port Chester, Sydney*

v **BARRET A., BIDAN P., ANDRE L., 1955** Sur quelques accidents de vinification dus à des levures à voiles. *Communications and Research of the Academy of Agriculture, Paris, 41, p496*

v **BARRETTE J., 1998** Production d'extraits de levure biostimulants destinés à la propagation de *Lactocoques. Thèse Maitre Es Science, Université Laval, Canada*

v **BATAILLON M., RICO A., SABLAYROLLES J.M., SALMON J.M., BARRE P., 1996** Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. *J Ferm Bioeng, 82, pp101-106*

v **BAUMES R., 1998** Les constituants volatils du stade fermentaire. *In* Œnologie, fondements scientifiques et technologies, *Franzy C. (coord) Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Tec&Doc Lavoiser (ed), Paris, pp181-201*

v **BIOTEAU C., 2000** Les arômes phénolés mieux maîtrisés. *Réussir Vigne, 53, pp30-31*

v **J. BLOIN J., PEYNAUD E., 2005** Connaissance et Travail du vin. 2005. *4e édition. Dunod (ed)*

- **BLONDIN B., RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GALZY P., 1982** A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol Bioeng, 17, pp2031-2037*
- **BLONDIN B., RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GALZY P., 1983** Purification and properties of the β-glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol : *Dekkera intermedia. Van Der Walt, Appl Microbiol Biotechnol, 17, pp1-6*
- **BLONDIN B., GONDE P.,RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GALZY P., 1984** A study of cynanide-insensitive respiration in the genus *Dekkera* and *Brettanomyces*. *Microbiol Imm, 28, pp637-644*
- **BONORA A., MARES D., 1982** A simple colorimetric method for detecting cell viability in cultures of eukaryotic microorganisms. *Current Microbiol, 7, pp217-222*
- **BYNUM M.T., KOMPALA D.S., GROHMANN K., WYMAN C.E., 1987** Modeling of *Brettanomyces clausenii* growth on mixtures of glucose and cellobiose. *17th Annual Biochemical Engineering Symposium, Lowa (USA), pp97-106*
- **CALHELHA R.C., ANDRADE J.V., FERREIRA I.C., ESTEVINHO L.M., 2006** Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiol, 23(4), pp393-398*
- **CANTACUZENE N.O., DORMEDY E.S., SMILANICK J.L., DORMEDY D.F., 2003** Treating *Brettanomyces* in oak cubes with gazeous and aquaeous ozone. Poster, *54th ASEV meeting, Nevada, Juin 2003.*
- **CARRASCOSA J.M., VIGUERA M.D., NUNEZ DE CASTRO I., SCHEFFERS W.A., 1981** Metabolism of acetaldehyde and Custers effets in the Yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek, 47(3), pp203-215*
- **CASTELLI T., 1971** Sviluppo dei lieviti in Cognac. *Vini d'Italia. 13(75), pp523-534*
- **CAVIN J.F., ANDIOC V., ETIEVANT P.X., DIVIES C., 1993** Ability of wine lactic acid bateria to metabolize phenol carboxylic acid. *Am J Enol Vitiv, 44(1), pp76-81*
- **CHASSAGNE D., GUILLOUX-BENATIER M., ALEXANDRE H., VOLLEY A., 2005** Sorption of wine phenols by yeast lees. *Food Chemistry, 91, pp39-44*
- **CHATONNET P., BOIDRON J.N., PONS M., 1990** Elevage des vins rouges en fût de chêne : évolution de certains composés volatils et leur impact aromatique. *J Sc Food and Agric.*
- **CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N., PONS M., 1992a** The origin of ethylphenol in wines. *J Sci Foof Agric, 60, pp165-178*
- **CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J.N., 1992b** Le caractére phénolé des vins rouges : caractérisation, origine et moyens de lutte. *Rev Franç Oenol, 32(138), pp21-24*
- **CHATONNET P., BOIDRON J.N., DUBOURDIEU D., 1993** Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur la teneur en acide acétique et en éthylphénols. *J Int Vigne Vin, 17, pp 277-298*

v **CHATONNET P., DUBOURDIEU D., BOIDRON J-N., 1995** The influence of *Brettanomyces/Dekkera sp.* yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am J Enol Vitic, 46, 463-468*

v **CHATONNET P., VIALA C., DUBOURDIEU D., 1997** Influence of polyphenolic components of red wine on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am J Enol Vitic, 48 (4), pp443-448*

v **CHATONNET P., DUBOURDIEU D., 1999** Origine et incidence des éthylphénols dans les vins rouges. Application à la maîtrise de l'élevage. *EUROVITI, ITV Paris (ed), pp149-162*

v **CHATONNET P., MASNEUF I., GUBBIOTTI M.C., DUBOURDIEU D., 1999** Prévention et détection des contaminations par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage des vins. *Rev Franç Œnol , 179, pp20-24*

v **CHATONNET P., 2000** La contamination des vins par *Brettanomyces* au cours de la vinification et de l'élevage : incidence, détection et moyens de lutte. Extrait de *Rapport Tonnellerie Séguin Moreau, pp44-53. Rev des Œnologues, 96*

v **CHILVER M.J., HARRISON J., WEBB T.J.B., 1978** Use of immunofluorescence and viability stains quality control. *J Am Society Brew Chem, 36, pp13-18*

v **CHUNG K.T., WONG T.Y., WEI C.I.Y., HUANG Y.W., LIN Y.Y., 1998** Tannins and human health: a review. *Critical Review in Food Science and Nutrition, 38(6), pp421-464*

v **CIANI M., FERRARO L., 1997** Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J Sc of Food and Agricul,75(4), pp489-495*

v **CIANI M., MACCARELLI F., FATICHENTI F., 2003** Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. *W J Microbiol and Biotechnol 19, pp419-422*

v **CLAUSEN N.H., 1905** Occurrence of *Brettanomyces* in American lager beer. *American Brewer's Review, 19, pp511-512*

v **CLEMENTE-JIMENEZ J.M., MINGORANCE-CAZORLA L., MARTINEZ-RODRIGUEZ S., LAS HERAS-VASQUEZ F.J., RODRIGUEZ-VICO F., 2004** Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food microbiol, 21, pp149-155*

v **COCOLIN L., RANTSIOU K., IACUMIN L., ZIRONI R., COMI G., 2004** Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Appl Env Microbiol, pp1347-1355*

v **COLLARD B, 1999** Bestiales *Brettanomyces. La Vigne, 105-Décembre 2001, pp69-70*

v **CONNELL L., STENDER H., EDWARDS C.G., 2002** Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am J Enol Viticul, 53(4), pp322-324*

v **CONTERNO L., LUCY JOSEPH C.M., ARVIK T.J., HENICK-KLING T., BISSON L., 2006** Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am J Enol Vitic, 57(2), pp139-147*

v **COUTO J.A., BARBOSA A., VIEIRA M., CABRAL L., GARCA A.R., SOARES FRANCO J.M., HOGG T., 2003** Detection of *Brettanomyces/Dekkera* in wine in a liquid culture medium. *Oenologie 2003, 7eme Symposium International d'Oenologie, Tec&Doc,Lavoisier (ed), pp235-237*

v **COUTO J.A., NEVES F., CAMPOS F., HOGG T., 2005** Thermal inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces. Int J Food Microbiol, 104, pp337-344*

v **CUSTER M.**, 1940. Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*. *PhD Thesis, Delft, Netherland*

v **DANIEL P., LARBRE C., BREDOUX M., LE CLINCHE C., 1999** Détection de *Brettanomyces* par PCR : intérêt et résultats. *Cahier technique ITV du 12éme colloque Viticole et Œnologique, Montpellier France, ITV (ed), pp163-165*

v **DEAK T., 2006** Environmental factors influencing yeasts. *In* The Yeast handbook, Biodiversity and ecophysiology of yeast, *C. A. Rosa, G. Péter (Eds) Springer, Berlin heidelberg, pp155-174*

v **De MINIAC M., 1989** Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre *Brettanomyces. I.A.A. juillet/août, pp459-463*

v **DELAHERCHE A., CLAISSE O., LONVAUD FUNEL A., 2003** Détection et quantification des populations de *Brettanomyces bruxellensis* du vin par PCR quantitative en temps réel. *Oenologie 2003, 7eme Symposium International d'Oenologie, Tec&Doc, Lavoisier (ed), pp238-241*

v **DELIA M.L., PHOWCHINDA O., ALFENORE S, STREHAIANO P, 1997** *Brettanomyces* as a polluting yeasts in alcoholic fermentations : study of its relations to *Saccharomyces*. *18th International Specialized Symposium on Yeast, Bled, Slovenia, 24-29 / 08 / 1997*

v **DIAS L., DIAS S., SANCHO T., STENDER H., QUEROL A., MALFEITO-FERREIRA M., LOUREIRO V., 2003(a)** Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphénol**.** *Food Microbiol, 20, pp567-574*

v **DIAS L., PEREIRA-DA-SILVA S., TAVARES M., MALFEITO-FERRIRA, LOUREIRO V., 2003(b)** Factor affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol, 20, pp7-384*

v **DIVOL B., STREHAIANO P., LONVAUD-FUNEL A., 2005** Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiol, 22, pp169-175*

v **DOMINGUEZ C., GUILLEN D.A., BARROSO C.G., 2002** Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta, 458, pp95-102*

v **Du TOIT W., PRETORIUS I.S., LONVAUD-FUNEL A., 2005** The effect of sulfur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J Appl Microbiol, 98, pp862-871*

v **DUBOIS P., 1993** Les arômes du vin et leurs défauts – I – *Revue Française d'Oenologie, 33(144), 63-72*

v **DUBOIS P., 1994** Les arômes du vin et leurs défauts – II – *Revue Française d'Oenologie, 35(145), 27-39*

v **EDLIN D.A.N., NARBAD A., DICKINSON J.R., LLOYD D., 1995** The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters 125, pp311-316*

v **EDLIN D.A.N., NARBAD A., GASSON M.J., DICKINSON J.R., LLOYD D., 1998** Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus.* Enzyme and Microbial Technology, 22, pp332-339

v **EGLI C.M., HENICK-KLING T., 2001** Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA internal transcribed spacer region. *Am J Enol Viticult, 52(3), pp241-247*

v **ETIEVAN P.X., ISSANCHON S.N., MARIE S., DUCRUET V., FLANZY C., 1989** Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma. Influence of carbonic maceration and time storage. *Sciences des Aliments, 9, pp19-33*

v **FLEET G.H., 1993** Yeasts-Metabolism of nitrogen compounds. *In* Wine Microbiology and Biotechnology, *Fleet G.H. (ed), Switzerland, Harwood Academic Publishers, pp79-98*

v **FREER S.N., 1991** Fermentation and anaerobic metabolism of cellodextrins by yeasts. *App Env Microbiol, 57(3), pp655-659*

v **FREER S.N., 2002** Acetic acid production by *Dekkera/Brettanom*yces yeasts. *W J of Microbiol and Biotechnol, 18(3), pp271-275*

v **FROUDIERE I., LARUE F., 1988** Conditions de survie de *Brettanomyces (Dekkera)* dans le moût de raisin et le vin. *Connaissance de la Vigne et du Vin, 2, pp296-303*

v **FUGELSANG K.C., 1997** Yeast and molds. *In* Wine Microbiology, *Fugelsang K.C.(ed), NY, Chaman and Hall, pp72-80*

v **FUGELSANG K., 1998** *Brettanomyces* : Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins ? *Biofutur, 182, pp22-23*

v **GALZY D.M., RIOUX J.A., 1955** Observations sur quelques vins atteints de la maladie de *« la fleur »* dans le Midi. *Progres Agric et Viticult, 144, pp365-370*

v **GARDE CERDAN T., RODRIGUEZ MOZAZ A., ANCIN AZPILICUETA C., 2002** Volatile composition of aged wine in used barrels of Frenc oak and American oak. *Food Research International, 35, pp603-610*

v **GEROS H., AZEVEDO M-M., CASSIO F., 2000** Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala. Food Technol.Biotechnol., 38 (1), pp59-62*

v **GILIS J.F., 1999** Etude de contamination de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces. Thèse, INP Toulouse, France*

v **GILIS J-F., SEILLER I., DELIA M-L., 1999** Effets de certains paramètres physico-chimiques (pH, O_2) sur la cinétique de croissance de *Brettanomyces*. *In : 6éme Symposium International d Œnologie, Bordeaux, Tec & Doc, Lavoisier (ed), Paris, pp264-267*

v **GOLDBERG D.M., TSANG E., KARUMANCHIRI A., SOLEAS G.J., 1998** Quercetin and p-coumaric acid concentrations in commercial wines. *Am J Enol Vitic, 19, pp142-151*

v **GOMES L.H., DUARTE K.M.R., ARGUESO J.L., ECHEVERRIGORAY S., TAVARES F.C.A. 2000** Methods for yeast characterization from industrial products. *Food Microbiol,187, pp217-223*

v **GONDE P., BLONDIN B., RATOMAHENINA R., ARNAUD A., GALZY P., 1982** Selection of yeast strains for cellobiose alcoholic fermentation. *J of Fermentation and Technol, 60, pp579-584*

v **GRANDO M.S., VERSINI G., NICOLINI G., MATTIVI F., 1993** Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production. *Vitis, 32, pp46-50*

v **GRBIN P.R., MARKIDES A.J., HENSCHKE P.A., 1999** *The role of L-lysine in the formation of mousy off-flavour by Dekkera. Proceedings of the 9th International Union of Microbiological Societies Congress (Sydney: IUMS), p. 271.*

v **GRBIN P., HENSCHKE P.A., 2000** Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research, 6, pp255-262.*

v **GUILLAMON J.M., SABATE J., BARRIO E., CANO J., QUEROL A., 1998** Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol, 169, pp387-392*

v **GUILLOUX-BENATIER M., CHASSAGNE D., ALEXANDRE H., 2001** Influence de l'autolyse des levures après fermentation sur le développement de *Brettanomyces* dans le vin. *J Int Sci Vigne Vin, 35, no3, pp157-164*

v **GUNATA Z., 1998** Evolution des Constituants volatils du vin au cours de la conservation. *In* Œnologie, fondements scientifiques et technologies, *Flanzy C. (coord). Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Tec&Doc, Lavoiser (ed), Paris, pp202-218*

v **GUZEL-SEYDIM Z.B., GREENE A.K., SEYDIM A.C., 2004** Use of ozone in the food industry. *Lebesm Wiss u Technol, 37, pp453-460*

v **HEARD G.M., FLEET G.H., 1990** A convinient microtray procedure for yeast identification. *J Appl Bact, 68, pp447-451*

v **HEIMOFF S., 1996** Brett study yields surprises. *Wine Business Monthly, 3, pp37-40*

v **HENICK-KLING T., EGLI C., LICKER J., MITRAKUL C., ACREE T.E., 2000** *Brettanomyces* in wine. *Proceeding of the 5th International Symposium in Cool Climate, Melbourne Australie*

v **HERDERICH M., COSTELLO P.J., GRBIN P.R., HENSCHKE P.A., 1995** The occurrence of 2 acetyl-1-pyrroline in mousy wines**.** *Natural Product Letters, 7, pp129-132.*

v **HERESZTYN T., 1986** Formation of substituted tetra hydropyrimidines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am J Enol Vitic, 37, pp127-132*

v **HERESZTYN T., 1986** Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch Microbiol, 146, pp96-98*

v **HERNANDEZ-ORTE P., IBARZ M.J., CACHO J., FERREIRA V., 2005** Effects of addition of ammonium and amino acids to musts Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chemistry, 89, pp163-174*

v **IBEAS J.I., LOZANO I., PERDIGONES F., JIMENEZ J., 1996** Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl and Env Microbiol, pp998-1003*

v **JIAN W., JU L.K., 1998** Enhancing enzymatic saccharification of waste newprint by surfactant addition. *Biotechnol Progress, 14(4), pp649-652*

v **JONES R.P., 1987** Measures of yeast death and deactivation and their meaning : Part I. *Proc Biochem, 8, pp118-128*

v **KEKOS D., MACRIS B.J., 1987** Effect of tannins on growth and amylase production by *Calvatia gigantea. Enzyme and Microbial Technology, 9(2), pp94-96*

v **KOVACS L.B., 1971** Microbialogical stabilization of bottled wines by heat treatment. *Borgazdasag, 19, pp30-36*

v **KUFFERATH H., VAN LAER M.H., 1921** Etude des levures du Lambic. Leur action chimique sur les milieux de culture. *Bulletin de la Société Chimique de Belgique, 30, pp270-276*

v **LACHANCE M.A., 1995** Yeast communities in natural tequila fermentations. *Antonie van Leewenhoek, 68, 151-160*

v **LANGE H., BAVOUZET J.M., TAILLANDIER P., DELORME C., 1993** Systematic error and comparison of four methods for assessing the viability of *Saccharomyces cerevisiae* suspensions. *Biotechnol. Tech., 7, pp223-228*

v **LARUE F., ROZES N., FROUDIERE I., COUTY C., PERREIRA G. P., 1991** Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins. *J Int Sci Vigne Vin, 25, pp149-165*

v **LAUREANO P., D'ANTUONO I., MALFEITO-FERREIRA M., LOUREIRA V., 2003** Effect of different sanitation treatments on the numbers of total microorganisms and of *Dekkera bruxellensis* recovered from the wood of wine ageing barriques. *Abstracts of the 23rd International Specialized Symposium on Yeasts, Budapest*

v **LICKER J.L., ACREE T.A., HENICK-KLING T., 1997** What is "Brett" *(Brettanomyces)* flavour ? *American Chemical Soc. Symposium,213th National Meeting, San Francisco, CA, 04 1997*

v **LIU C.H., HSU W.H., LEE F.L., LIAO C.C., 1996** The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiol, 13, pp407-415*

v **LOUREIRO V., 2000** Spoilage yeasts in foods and beverages : characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International, 33, pp247-256*

v **LOUREIRO V., MALFEITO-FERREIRA M., 2003** Spoilage yeast in the wine industry. *Int J of Food Microbiol, Review, 86, pp23-50*

v **MALFEITO-FERREIRA M., TARECO M., LOUREIRO V., 1997** Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *Int J Food Microbiol, 38, pp146-155*

v **MARTORELL P., BARATA A., MALFEITO-FERREIRA M., FERNANDEZ-ESPINAR M.T., LOUREIRO V., QUEROL A., 2006** Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guillermondii* recoverded from wine related sources. Int J Food Microbiol, 106, pp79-84

v **MAYER A.M., 1987** Polyphenol oxidases in plants Recent progress. *Phytochem., 26, pp11-20*

v **MEDAWAR W., 2003** Etude physiologique et cinétique des levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte œnologique. *Thèse INP Toulouse, France*

v **MEDAWAR W., STREHAIANO P., DELIA M.-L., 2003** Yeast growth : lag phase modelling in alcoholic media. *Food Microbiol, 20, pp527-532*

v **MILLET V., LONVAUD A., 2000** The viable but non-cultivable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Appl Microbiol, 30, pp136-141*

v **MITRAKUL C.M., HENICK-KLING T., EGLI C.M., 1999** Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiol, 196, pp3-14.*

v **MONJE M.C., PRIVAT C., GASTINE V., NEPVEU F., 2002** Determination of ethylphenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta, 458(1), pp111-117*

v **MOUTOUNET M., SOUQUET J.M., MEUDEC E., LEAUTE B., DELBOS C., DOCO T., WILLIAMS P., LEMPEREUR V., 2004** Analyse de la composition de tanins œnologiques. *Rev Franç Œnol, 208, pp22-27*

v **NEDERVELDE L., DEBOURG A., 1995** Properties of Belgian acid beers and their microflora – II – Biochemical properties of *Brettanomyces* yeasts. *Cerevisiae and Biotechnology, 20(1), pp43-48*

v **NESS F., LAVELLE F., DUBOURDIEU D., AIGLE M., 1993** Identification of the yeast strains using the Polymerase Chain Reaction. *J Sc Food Agricult, 62, pp89-91*

v **NISHIMURA J.I., NAGUMO T., YAMASHITA S., 1982** Thiamine transport in *Saccharomyces cerevisiae* protoplast. *J Bact, 150(8), pp960-962*

v **O'NEILL F.H., CHRISTOV L.P., BOTES P.J., PRIOR B.A., 1996** Rapid and simple assay for feruloyl and p-coumaroyl esterases. *W J Microbiol Biotechnol, 12, pp239-242*

v **PALUMBI S.R., 1996** Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In* Molecular Systematics, *D.M. hillis, C. Moritzz, B.K. Mable (eds), Sinauer Ass Inc. Massachusetts, USA, pp205-320*

v **PAMPULHA M.E., LOUREIRO DIAZ M.C., 1990** Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl Microbiol Biotechnol, 34, pp375-380*

v **PAREKH S.R., PAREKH R.S., WAYMAN M., 1988** Fermentation of cellobiose by *Pichia stipitis* and *Brettanomyces clausenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 18, pp325-338*

v **PARK S.W., HONG Y.K., KIM S.W., HONG S.I., 1999** Development of strain fermenting the glucose/cellobiose mixed sugar for simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic materials. *Sanop Misaengmul Hakhoechi, 27(2), pp145-152*

v **PEREZ F., REGODON J.A., VALDES M.E., De MIGUEL C., RAMIREZ M., 2000** Cycloheximide resistance as marker for monitoring yeasts in wine fermentations. *Food Microbiol, 17, pp119-128*

v **PEYNAUD E., DOMERCQ S., 1956** Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Arch Für Mikrobio, 24(8), pp266-280*

v **PEYNAUD E., 1984** *In* Knowing and making wine, *John wiley & sons (ed), New york, p102*

v **PIERCE J.S., 1970** Measurement of yeast viability. *J Inst Brew, 76, pp442-443*

v **PISHER T.G., MILLS D.A., 2003** Real-time PCR assay for detection and enumeration *of Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl Env Microbiol, 69(12), pp7430-7434*

v **POSTGATE J.P., 1967** Viability measurements and the survival of microbes under minimum stress. *Adv Microbiol Physiol, 1, pp1-23*

v **POWCHINDA O., 1994** Fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae*. Utilisation d'un substrat complexe. Contamination du procédé par *Brettanomyces sp. Thèse, INP Toulouse, France*

v **POWCHINDA O., DELIA M-L., STREHAIANO P., 1995** Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology Letters, 17(2), pp237-242*

v **RASMUSSEN J.A, SCHULTZ E., JONES R.S., SMITH C.R., 1995** Acetic acid as a causative agent in producing stuck fermentation. *Am J Enol Vitic, 46, pp278-280*

v **RENOUF V., LONVAUD-FUNEL A., 2005** Effet microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ou de barriques anciennes. *Rev Franç Œnol, 2011, pp10-147*

v **RENOUF V., LONVAUD-FUNEL A., 2006a** Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol Research, In Press.*

v **RENOUF V., LONVAUD-FUNEL A., 2006b** Le suivi microbiologique du vin. Partie 1 : De la parcelle au conditionnement : un outil pour une œnologie raisonnée. *La Revue des Œnologues, 118, pp27-31*

v **RENOUF V., LONVAUD-FUNEL A., 2006c** Le suivi microbiologique du vin. Partie 2 : conseils pratiques pour la mise en place d'un suivi microbiologique. *La Revue des Œnologues, 119, pp39-42*

v **RENOUF V., PERELLO M.C., STREHAIANO P. LONVAUD-FUNEL A., 2006** Global survey of the microbial ecosystem during alcoholic fermentation in winemaking. *J Int Sci Vigne Vin, 40(2),pp101-116*

v **RODRIGUEZ N., GONCALVES G., PEREIRA-DA-SILVA S., 2001** Development and use of a new medium to detect yeast of the genera *Dekkera/Brettanomyces. J Appl Microbiol, 90, pp588-599*

v **RODRIGUEZ VAQUERO M.J., ALBERTO M.R., MANCA De NADRA M.C., 2006** Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes.Food control, sous presse, disponible « En ligne » Science Direct, 17 Avril 2006.*

v **ROSE A.H., HARRISON J.S., 1971** *In* The Yeast, vol.2, *Academic Press (ed), 1ère ed, London, pp3-73*

v **ROZES N., GARCIA JARES C., LARUE F., LONVAUD A., 1992** Differentiation between fermenting and spoilage yeasts in wine by total free fatty acids analysis. *J Sci Food Agricult, 59(3), pp351-357*

v **SABLAYROLLES J.M., 1998** Conduite de la fermentation alcoolique. *In Œnologie, fondements scientifiques et technologiques,Flanzy C. (coord.), Tec&Doc, Lavoisier (ed), Paris , pp454-468*

v **SCALBERT A., 1991** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry, 30(12), pp3875-3883*

v **SCHEFFERS W.A., 1966** Stimulation of fermentation in yeasts by acetoin and oxygen. *Nature, 210, pp533-534*

v **SCHEFFERS W.A., NANNINGA G.L., 1997** The anaerobic inhibition of fermentation (Custers effect) in *Brettanomyces. Proceeding of the EUCHEM Conference on Metabolic Reactions in the Yeast Cell in Aerobic and Anaerobic Conditions, Helsinki, pp53-55*

v **SCHEFFERS W.A., WIKEN T.O., 1969** The Custers effet (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces. Antonie van Leeuwenhoek, Supplement : Yeast Symposiun, 35, pp31-32*

v **SHINOHARA T., KUBODERA S., YANAGIDA F., 2000** Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavours in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 90(1), pp90-97.*

v **SHEHATA A.M., MRAK E.M., 1951** *The American Naturalist, 85, pp381-383*

v **SANDHU D.K., WARAICH M.K., 1980** Ecology of yeasts associated with pollinating bees, nectary glands of flowers and fermented foods. *Proceedings of the 5th International Yeast Symposium, London, pp535-539*

v **SHUNG-CHANG J., LEE F.L., BENGSTON L., 1985** Direct evidence of relationship between *Dekkera and Brettanomyces. Mycotaxon.XXIII, pp271-273*

v **SILVA P., CARDOSO H., GEROS H., 2004** Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera spp. Am J Enol Viticult, 55(1), pp65-72*

v **SMITH M., VAN GRISVEN A.M., 1984** *Dekkera anomala* sp. nov., the teleomorph of *Brettanomyces anomalus*, recovered from spoiled soft drinks. *Antonie Van Leewenhoek, 50, pp143-148*

v **SPAEPEN M., VAN OEVELEN D., VERACHTERT H., 1978** Fatty acids and esters produced during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. *Journal of the Institute of brewing, 84, pp278-282*

v **SPAEPEN M., VERACHTERT H., 1982** Esterase activity in the genus *Brettanomyces*. *J Inst Brew, 88, pp11-17*

v **SPINDLER D.D, WYMAN C.E., GOHMANN K., 1989** Evaluation of thermotolerant yeast in controlled simultaneous saccharifications and fermentations of cellulose to ethanol. *Biotechno Bioeng, 34, pp189-195*

v **SPINDLER D.D, WYMAN C.E., GOHMANN K., PHILIPPIDIS G.P., 1992** Evaluation of cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in simultaneous saccharification and ermentation of cellulose. *Biotechnol Lett, 14, pp403-407*

v **STENDER H., KURTZMAN C., HYLDIG-NIELSEN J.J., SORENSEN D., BROOMER A., OLIVIERA K., PERRY-O'KEEFE H., SAGE A., YOUNG B., COULL J., 2001** Identification of *Dekkera bruxellensis (Brettanomyces)* from wine by Fluorescence In Situ Hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl Env Microbiol, pp 938-941*

v **TAHERZADEH M.J., NIKLASSON C., LIDEN G., 1997** Acetic acid - friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Eng Sci, 52, pp2653-2659*

v **TAILLANDIER P., BONNET J., 2005** *In* Le vin. Composition et transformations chimiques. *Tec&Doc, Lavoisier (ed), Paris*.

v **TONCHEV T.A., BAMBALOV G.K.,** 1968 Damage of dry wine as a result of the development of the yeast *Brettanomyces*. *Lozarstov i Vinarstov, 17(1), pp30-33*

v **UMEZAWA C., KISHI T., 1989** Vitamin metabolism. *In* Yeast, *vol.3, Metabolism and physiology of yeasts, Rose A.H. (ed), 2nd ed, Academic press, Great Britain, pp470-476*

v **VAN DER WALT J.P., VAN KERKAN A.E., 1959** The wine yeasts of the Cape – II – The occurrence of *Brettanomyces intermedius* and *Brettanomyces schanderlii* in South African table wines. *Antonie van Leuuwenhoek, 25, pp145-151*

v **VAN DER WALT, 1970** The genus *Dekkera*. *In* The Yeast. *Van der Walt in J. Lodda (ed), 2nd ed. North-Holland publi. Co. Amsterdam, pp154-165*

v **VAN DIJKEN J.P., SCHEFFERS W.A., 1986** Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews, 32, pp199-224*

v **VAN WYK C.J., 1973** The formation of volatile acids and esters by *Brettanomyces* yeasts. *AGFD Abstract of the American Chemical Society, 165, p59*

v **VERACHTERT H., SHANTA KUMARA H.M.C., DAWOUD E., 1990** Yeasts in mixed cultures with emphasis on lambic beer. *In* Yeast in Biotechnology and Biocatalysis, *Verachtert et De Mot P.(eds), New York, pp429-449*

v **VIEGAS C.A., ROSA M.F., CORREILA I., NOVAIS J.M., 1989** Inhibition of yeasts growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl Env Microbiol, 55(1), pp21-28*

v **WAYMAN M., PAREKH R.S., PAREKH S.R., 1987** Simultaneous saccharification and fermentation by mixed cultures of *Brettanomyces clausenii* and *Pichia stipitis* of SO_2-préhydrolised wood. *Biotechnology letters, 9(6), pp435-440*

v **WIJSMAN M.R., VAN DIJKEN J.P., VAN KLEEFF B.H.A., SCHEFFERS W.A., 1984** Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. *Antonie van Leewenhoek, 50, pp183-192*

v **WIKEN T.O., 1967** L'influence de l'oxygène sur la fermentation alcoolique par les levures. *2ème Symposium d'œnologie, Bordeaux (France)*

v **WILLETTS J.C., SEWARD R., DINSDALE M.G., SULLER M.T.E., HILL B., LLOYD D., 1997** Viability of cider yeast grown micro-aerobbically with added ethanol, butan-1-ol or iso-butanol. *J Inst Brew, 103, pp79-84*

v **WINKEN T., SCHEFFERS W.A., VERHAAR A.J.M., 1961** On the existence of a negative Pasteur effect in yeast classified in the genus *Brettanomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek, 27, pp401-433*

v **WRIGHT J.M., PARLE J.N., 1973** *Brettanomyces* in the New Zealand wine industry. *N.Z. J. of Agric Research. 1973, 17, pp273-278.*

v **YAMADA Y., MATSUDA M., MAEDA K., MIKATA K., 1994** The phylogenetic relationships of species of the genus *Dekkera* Van Der Walt, based on the sequences of 18S and 26S ribosomal RNA. *Biosciences, Biotechnology and Biochemistry, 58(10), pp1803-1808*

v **ZOEKCKLEIN B.W., 2000** *Brettanomyces* aroma/flavor research. Vinter's Corner. 15(1) *<<http://www.fst.vt.edu/Zoecklein/Janfeb00.html>>*

v **ZOEKCKLEIN B.W., 2006** Practical Monitoring and management of *Brettanomyces*. *Originally presented at the International Cool Climate Symposium, New Zealand* *<<http://www.vtwines.info/>>*

v **The National Center for Biotechnology Information** web site *<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> (search for Dekkera/b=Brettanomyces, taxonomy)*

v **Les Cahiers Itinéraires d'ITV France. #12 Juillet 2006.** *Brettanomyces* et phénols volatils, Prévenir et limiter les altérations.

- ANNEXES -

ANNEXE 01

Gamme de vins produits à la cave de Buzet

Vins rouges

- BARON D´ARDEUIL
- CARTE D´OR
- CARTE D´OR CANADA
- CHATEAU BALESTE
- CHATEAU CARAUD
- CHATEAU DE BOUGIGUES
- CHATEAU DE GACHE
- CHATEAU DE GUEYZE
- CHATEAU DE MAZELIERES
- CHATEAU DE PADERE
- CHATEAU DE PIIS
- CHATEAU DU BOUCHET
- CHATEAU DU TAUZIA
- CHATEAU GUILLAMBOIS
- CHATEAU LA HITTE
- CHATEAU LA PASTORALE
- CHATEAU LARCHE
- CHATEAU RIBEAU
- CHATEAU STE MARTHE
- CHATEAU TOURNEMINE
- CUVEE JEAN-MARIE HEBRARD
- DOMAINE DE LA CROIX
- DOMAINE DE LA CROIX VIEILLES VIGNES
- DOMAINE DE LA TUQUE
- DOMAINE DE PATIENT
- DOMAINE DE PRADA
- GRANDE RESERVE
- HAUTS DE PADERE
- LYS ROUGE
- TRADITION

Vins rosés

- CHATEAU DE GUEYZE ROSÉ
- LYS ROSE
- VIN GRIS

Vins blancs

- BARON D´ARDEUIL BLANC
- CARTE D´OR BLANC CANADA
- LYS BLANC

ANNEXE 02

Extrait du Codex Œnologique International, relatif au DMDC :

DICARBONATE DE DIMETHYLE (DMDC)
Pyrocarbonate de diméthyle
N° SIN = 242
C.A.S 004-525-33-1
(Oeno 25/2004)

EINECS 224-859-8

Formule chimique : $C_4H_6O_5$
$H_3C\text{-}O\text{-}(C{=}O)\text{-}O\text{-}(C{=}O)\text{-}O\text{-}CH_3$,

Poids moléculaire 134,09

1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

Antiseptique principalement actif contre les levures. Produit de synthèse.

2. ETIQUETAGE

Doivent être indiquée sur l'étiquette le nom « Dicarbonate de diméthyle », le numéro de lot, la date limite d'utilisation, la température de stockage (20 – 30 °C) et les consignes de sécurité.

3. CARACTERES

Liquide incolore, se décompose en solution aqueuse. Corrosif pour la peau et les yeux, toxique en cas d'inhalation et d'ingestion.
Après dilution dans l'eau, il se forme du CO_2, qui peut être caractérisé.

Point de fusion : 17 °C.

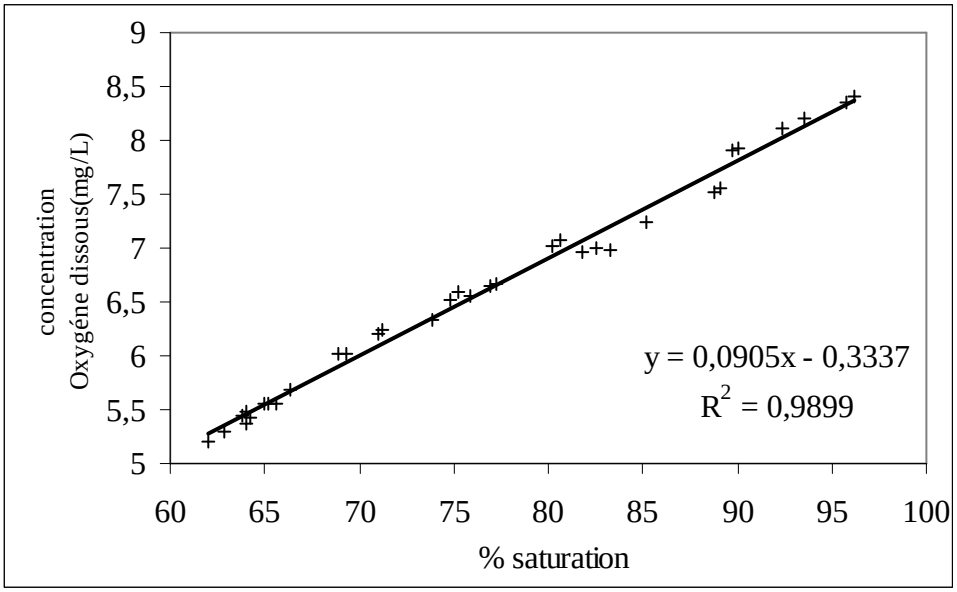
Point d'ébullition : 172 °C avec décomposition.

Densité à 20 °C : environ 1,25.

Spectre infrarouge : absorption maximum à 1156 nm et 1832 nm.

ANNEXE 03

Corrélation entre le % de saturation et la concentration en Oxygène dissous (mg/L) Analyseur HQ10 Hatch Portable LDO™. Milieu SWM, 20 °C, pression atmosphérique.



ANNEXE 04

Table de la Loi de χ^2, ou loi de Pearson.

P = valeur critique = α

d.d.l = degré de liberté

p d.d.l.	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,016	0,455	1,074	1,642	2,706	3,841	5,412	6,635	10,827
2	0,211	1,386	2,408	3,219	4,605	5,991	7,824	9,210	13,815
3	0,584	2,366	3,665	4,642	6,251	7,815	9,837	11,345	16,266
4	1,064	3,357	4,878	5,989	7,779	9,488	11,668	13,277	18,467
5	1,610	4,351	6,064	7,289	9,236	11,070	13,388	15,086	20,515
6	2,204	5,348	7,231	8,558	10,645	12,592	15,033	16,812	22,457
7	2,833	6,346	8,383	9,803	12,017	14,067	16,622	18,475	24,322
8	3,490	7,344	9,524	11,030	13,362	15,507	18,168	20,090	26,125
9	4,168	8,343	10,656	12,242	14,684	16,919	19,679	21,666	27,877
10	4,865	9,342	11,781	13,442	15,987	18,307	21,161	23,209	29,588
11	5,578	10,341	12,899	14,631	17,275	19,675	22,618	24,725	31,264
12	6,304	11,340	14,011	15,812	18,549	21,026	24,054	26,217	32,909
13	7,042	12,340	15,119	16,985	19,812	22,362	25,472	27,688	34,528
14	7,790	13,339	16,222	18,151	21,064	23,685	26,873	29,141	36,123
15	8,547	14,339	17,322	19,311	22,307	24,996	28,259	30,578	37,697
16	9,312	15,338	18,418	20,465	23,542	26,296	29,633	32,000	39,252
17	10,085	16,338	19,511	21,615	24,769	27,587	30,995	33,409	40,790
18	10,865	17,338	20,601	22,760	25,989	28,869	32,346	34,805	42,312
19	11,651	18,338	21,689	23,900	27,204	30,144	33,687	36,191	43,820
20	12,443	19,337	22,775	25,038	28,412	31,410	35,020	37,566	45,315
21	13,240	20,337	23,858	26,171	29,615	32,671	36,343	38,932	46,797
22	14,041	21,337	24,939	27,301	30,813	33,924	37,659	40,289	48,268
23	14,848	22,337	26,018	28,429	32,007	35,172	38,968	41,638	49,728
24	15,659	23,337	27,096	29,553	33,196	36,415	40,270	42,980	51,179
25	16,473	24,337	28,172	30,675	34,382	37,652	41,556	44,314	52,620
26	17,292	25,336	29,246	31,795	35,563	38,885	42,856	45,642	54,052
27	18,114	26,336	30,319	32,912	36,741	40,113	44,140	46,963	55,476
28	18,939	27,336	31,391	34,027	37,916	41,337	45,419	48,278	56,893
29	19,768	28,336	32,461	35,139	39,087	42,557	46,693	49,588	58,302
30	20,599	29,336	33,530	36,250	40,256	43,773	47,962	50,892	59,703

ANNEXE 05

Résultats du typage

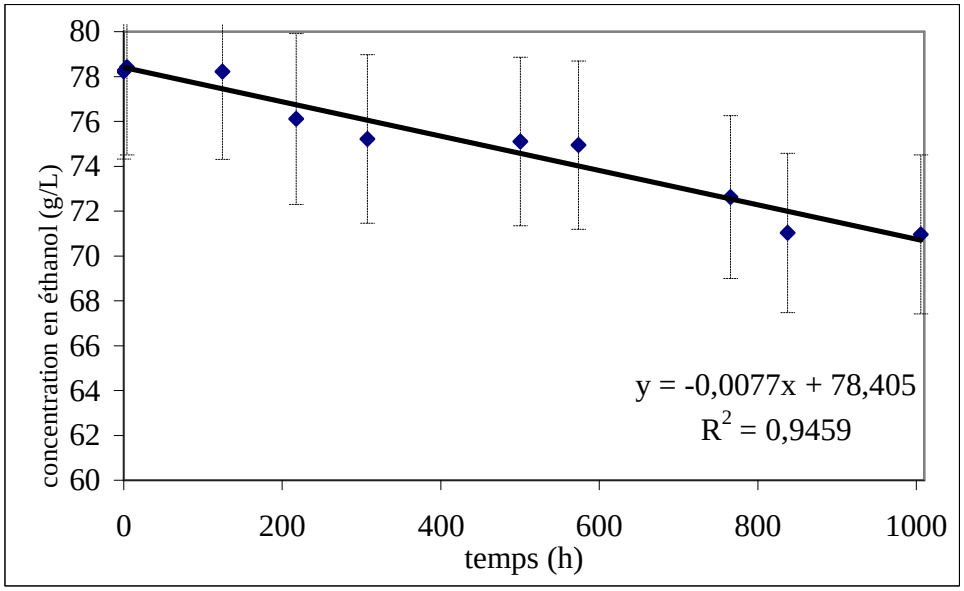
nom de la souche	Origine	détail de l'échantillon : cuverie et date	groupe génétique	précision sur profils
B	BE03	E226 07/11 écoulage	5	B et M identiques
C	M01	C7 - 15/11	3	C et D proches
D	M01	C7 - 26/11	3	C et D proches
E	M01	C7 - 26/11	4	E, F et G similaires
F	M01	C10 - 15/11	4	E, F et G similaires
G	M01	C10 - 26/11	4	E, F et G similaires
H	M02	C9 - 07/01/03	i	indépendant
I	M02	C9 - 09/11	5	I et J similaires
J	M02	C9 - 09/11	5	I et J similaires
K	M02	C10 - 18/11	ii	indépendant
L	M02	fibre ext. 30/11	5	
M	B03	E219 -22/10	5	B et M identiques
N	B03	A106 - 05/11	2	N : le plus éloigné au sein du gpe2
O	B03	levain contaminé L22B48	1	O et U similaires
P	B03	C40 - 16/11	1	
Q	B03	A46 - 05/11	iii	indépendant
R	B04	3HE - 14/10 écoulage	1	
S	B04	A17 19/10 écoulage	1	S : le' plus éloigné au sein de gpe1
T	B04	A17 07/10 écoulage	6	T et V très proches
U	B04	C25 - 11/10 écoulage	1	O et U similaires
V	B04	C31 -13/10 écoulage	6	T et V très proches
W	B04	A10 - 21/10 écoulage	2	W et X similaires
X	BE04	E95 -11/10 écoulage	2	W et X similaires
Z	BE04	E205 - 8/10 écoulage	2	Z se rapproche beaucoup de W et X

M01 : Madiran 01
M02 : Madiran 02
B03 : Buzet 03
B04 : Buzet 04
BE04 : Buzet Espiens 04

i, ii et iii sont des souches n'appartenant à aucun autre groupe de souches
identiques : mêmes profils électrophorétiques
similaires : très légères différences sur l'intensité ou la position des bandes,
proches : présences de quelques différences nettes

ANNEXE 06

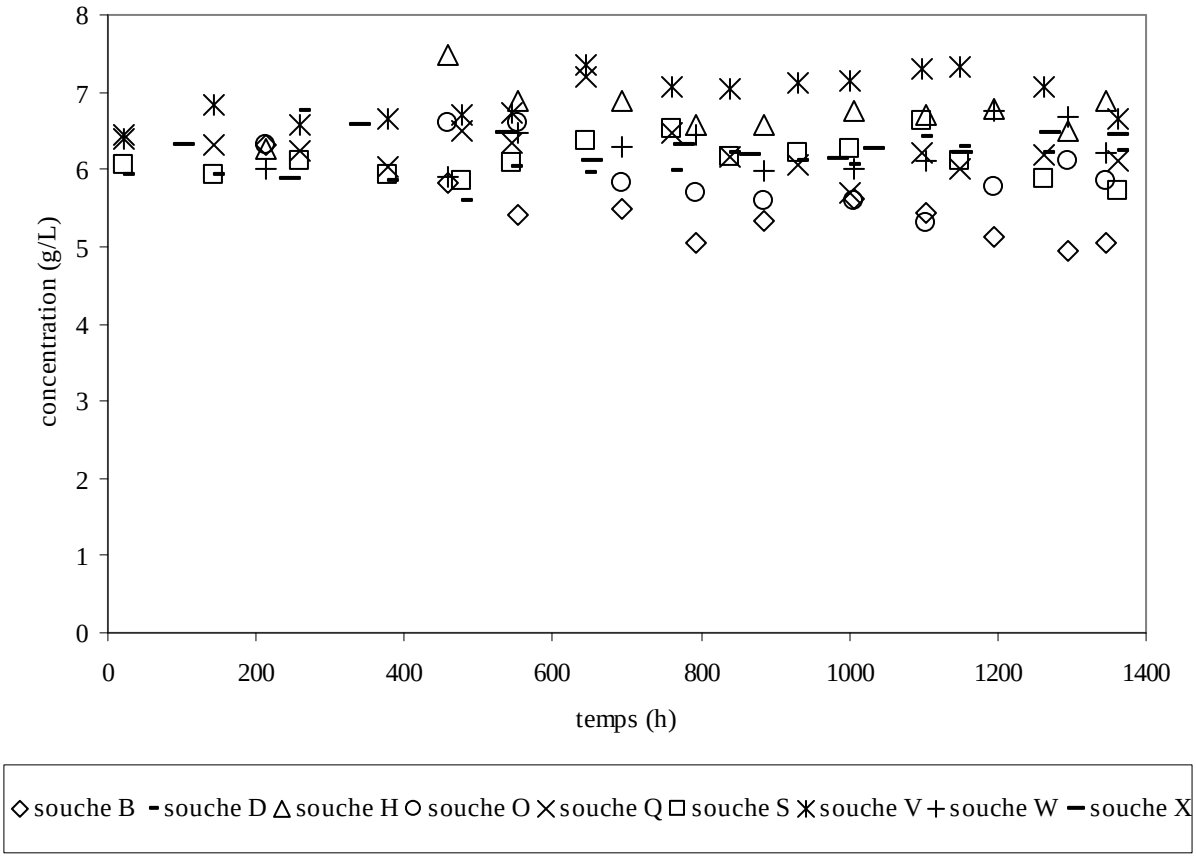
Perte de l'éthanol par évaporation lors de cultures à 20 °C, 150 rpm
Volume utile : 300 mL dans une fiole Erlenmeyer de 500 mL.



Soit une diminution considérée comme linéaire sur la durée des expérimentations, avec un taux de disparition de 0,185 g/L/jour.

ANNEXE 07

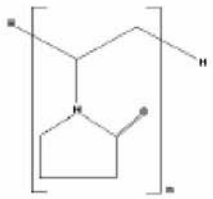
Evolution de la concentration en Glycérol en cours de fermentation sur milieu SWM. 20°C.150 rpm : *B. bruxellensis.*



ANNEXE 08

Extrait du Codex Œnologique International, relatif au PVP :

POLYVINYLPOLYPYRROLIDONE
POVIDONE
(PVPP)
$(C_6H_9NO)n = (111,1)n$
N° SIN : 1202
(Oeno 11/2002)



1. OBJET, ORIGINE ET DOMAINE D'APPLICATION

La polyvinylpolypyrrolidone insoluble est un polymère poly[1-(2-oxo-1-pyrrolidinyléthylène] réticulé de façon à la rendre insoluble. Elle est fabriquée par polymérisation de la N-vinyl-2-pyrrolidone en présence de divers catalyseurs (par exemple de l'hydroxyde de sodium) ou en présence de N,N'-divinylimidazolidone.
La PVPP fixe les polyphénols des vins, cette adsorption dépend du taux de polymérisation. Sa dose d'utilisation est limitée.

2. SYNONYMES

poly(1-éthénylpyrrolidin-2-one)
Crospovidone (nomenclature de la pharmacopée)
Polyvidone réticulée
Homopolymère réticulé de 1-éthényl-2-pyrrolidone
Polymère réticulé insoluble de la N-vinyl-2-pyrrolidone
P.V.P. insoluble
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP).

3. ETIQUETAGE

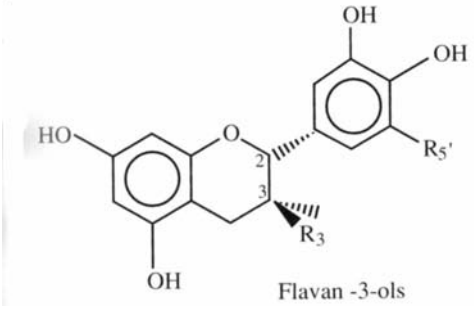
L'étiquette doit mentionner que la PVPP est à usage oenologique, l'efficacité minimum garantie vis-à-vis du test et les conditions de sécurité et de conservation.

4. CARACTERES

Poudre légère, blanc à blanc crème.
Insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques.
Insoluble dans les acides minéraux forts et les alcalins.

ANNEXE 09

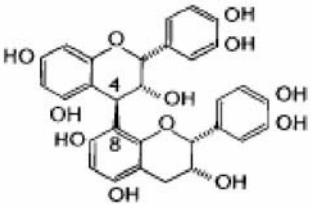
Structure des tanins et acides taniques.



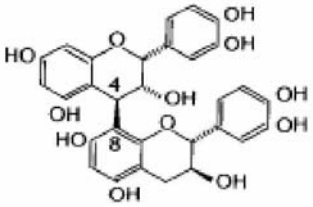
Flavan -3-ols

R_3	$R_{5'}$	
OH	H	(+) Catéchine
H	H	(-) Épicatéchine
OH	OH	(+) Gallocatéchine
H	OH	(-) Épigallocatéchine

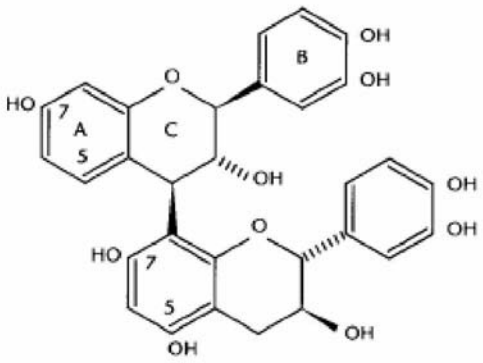
Flavan-3-ols issus du raisin



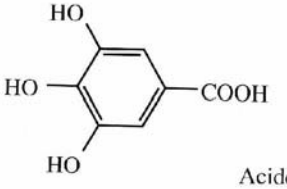
Procyanide B2 : épicatéchine-épicatéchine



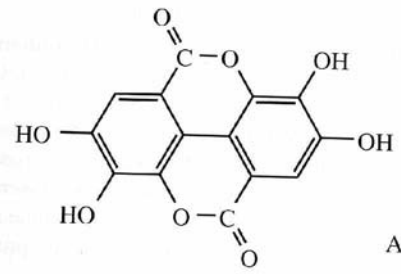
Procyanide B1 : épicatéchine-catéchine



Profisetinidine dimère : fisétinidol-catéchine



Acide gallique



Acide ellagique