

# L'ORIGINE DE *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* DANS LES VINS

Vincent RENOUF <sup>(1-3)</sup>, Pascal BARBIN <sup>(2)</sup>, Cécile MIOT-SERTIER <sup>(3)</sup>, Jean-François GILIS <sup>(4)</sup>,  
Patricia TAILLANDIER <sup>(2)</sup>, Aline LONVAUD-FUNEL <sup>(3)</sup> Pierre STREHAIANO <sup>(2)</sup>

(1) UMR EGFV 1287 ENITAB, ISVV – 1, cours du général de Gaulle, CS 40201 - 33175 Gradignan cedex

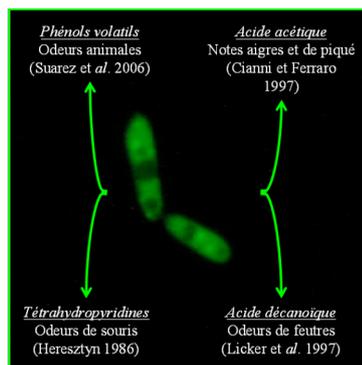
(2) Laboratoire de Génie Chimique, UMR INP, CNRS, 5503 - 5, rue Paulin Talabot - 31106 Toulouse cedex

(3) UMR Oenologie 1219 Université Bordeaux 2 Victor Segalen, INRA, ISVV - 351, cours de la libération - 33405 Talence cedex

(4) Oenodev SA - 32400 Maumusson

## INTRODUCTION

Parmi les altérations microbiennes des vins, la production des phénols volatils par la levure *Brettanomyces bruxellensis* (*B. bruxellensis*) est l'une des plus redoutées par le vinificateur et probablement l'une des plus décriées par le consommateur. En outre, les phénols volatils ne sont pas les seuls produits de *B. bruxellensis* qui peuvent nuire à la qualité du vin (**Figure 1**) et qui font de cette levure l'ennemi numéro un des vinificateurs soucieux de produire un vin fin, fruité et de qualité.



**Figure 1** : Illustration des produits de *B. bruxellensis* d'altération des vins.

Initialement isolée de la bière (Clausen, 1905), la description de la levure *B. bruxellensis* dans le vin remonte au début de l'œnologie moderne (Agostino, 1950 ; Barret *et al.* 1950 ; Peynaud et Domercq, 1956). Mais ce n'est que relativement récemment que les microbiologistes du vin, sensibilisés par des consommateurs de plus en plus soucieux de la qualité du produit, se sont penchés sur cette problématique. Les premiers travaux menés sur la production du 4-éthylphénol et du 4-éthylgâicol se sont focalisés sur *B. bruxellensis*. Rapidement *B. bruxellensis* fut décrite comme la seule espèce impliquée et son développement dans le vin comme la conséquence d'une contamination au chai et du non-respect des conditions élémentaires d'hygiène, si bien que les chais victimes de *B. bruxellensis* étaient aussitôt montrés du doigt.

Depuis des études ont démontré que le problème des « Brett » était commun à de nombreux domaines malgré les efforts d'hygiène réalisés. La levure *B. bruxellensis* fait partie intégrante du consortium microbiologique œnologique (Medawar, 2003) au même titre que l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* par exemple. Les études ont montré que *B. bruxellensis* était une levure particulièrement résistante aux contraintes œnologiques comme l'alcool, le SO<sub>2</sub> et les bas pH.

De plus, elle est peu exigeante d'un point de vue nutritionnel (Uscanga *et al.* 2000 ; Medawar, 2003) et s'adapte aussi bien à la présence d'oxygène qu'à son absence (Ciani *et al.* 2003 ; Du Toit *et al.* 2005). Les vinifications où les *B. bruxellensis* sont totalement absentes sont très rares, si bien que l'objectif n'est plus de n'avoir aucune *B. bruxellensis* dans son vin mais de limiter sa multiplication.

La question de son origine reste toutefois posée. Pour cela plusieurs pistes ont été avancées, et, curieusement une origine au vignoble a longtemps été délaissée au profit du chai, probablement à cause de la difficulté d'étudier la microflore présente sur le raisin.

## 1. MISE EN EVIDENCE DE *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* SUR LE RAISIN

Les bactéries, les levures et les moisissures tapissent en nombre la surface de la baie de raisin. Cet écosystème varie selon le stade de la maturation du raisin, les cépages, les domaines et les traitements phytosanitaires (Renouf *et al.* 2005).

Mais de façon générale, il s'agit d'une microflore très complexe et très diversifiée où la plupart des groupes bactériens et levuriens sont présents. Une baie de raisins supporte selon sa taille, sa maturité et son état sanitaire entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>6</sup> cellules microbiennes avec environ autant de cellules de levures que de cellules de bactéries. Mais les écarts de populations entre les différentes espèces sont très importants (Prakitchaiwattana *et al.* 2004).

La population des espèces majoritaires pouvant atteindre 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> cellules par baie, certaines espèces minoritaires ne sont donc représentées que par une ou quelques dizaines de cellules. Que l'analyse se fasse par culture, où les dilutions éliminent les espèces minoritaires, ou par biologie moléculaire, où les compétitions de matrices d'ADN sont favorables aux espèces dominantes, il est évidemment plus probable de ne détecter que les espèces majoritaires et de passer à côté des espèces minoritaires.

C'est probablement pour ces raisons que *B. bruxellensis* a longtemps échappé aux microbiologistes qui n'examinaient que la flore majoritaire du raisin.

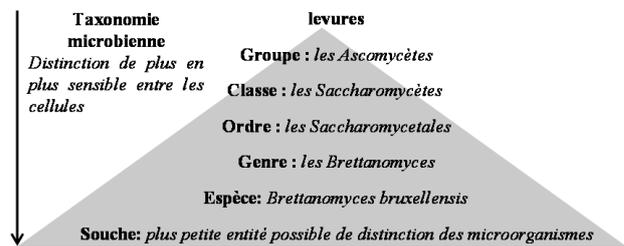
Récemment, des milieux particulièrement adaptés à la croissance de *B. bruxellensis* ont été développés. Ils ont permis de mettre en évidence la présence même minoritaire de cette levure sur le raisin par la méthode dite de « l'enrichissement » (Barbin, 2006 ; Renouf et Lonvaud-Funel, 2007). Bien que minoritaire par rapport aux espèces de levures du raisin comme *Aureobasidium pullulans* et les levures des genres *Cryptococcus* ou *Pichia* par exemple, *B. bruxellensis* est bien présente à la surface de la baie. Finalement ce sont toutes les espèces microbiennes du vin : *S. cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus* et donc aussi *B. bruxellensis* qui sont initialement présentes à la surface de la baie de raisin. Elles sont minoritaires et incluses au sein d'un biofilm microbien très diversifié et encore mal décrit (Renouf et Lonvaud-Funel, 2006). Il est important de souligner que la détection de *B. bruxellensis* n'est pas systématique. Elle est plus fréquente sur le raisin arrivé à maturité et sur les baies abîmées et il existe des différences de fréquence de détection selon les parcelles étudiées. Même si ces différences ne sont pas significatives et peuvent résulter d'un biais lors de l'analyse, elles laissent supposer une présence hétérogène de *B. bruxellensis* au vignoble.

Dans tous les cas, la détection de *B. bruxellensis* sur le raisin ne permet de répondre qu'en partie à la question de son origine dans le vin. En effet, on détecte *B. bruxellensis* sur le raisin mais également dans le bois des barriques, à la surface des cuves, dans l'air des caves et même à la surface des insectes (Licker *et al.*, 1997 ; Chatonnet, 1999 ; Connell *et al.*, 2002 ; Barbin 2006 ; Renouf *et al.*, 2006). Quel est parmi ces écosystèmes celui qui constitue la première source de *B. bruxellensis* (Figure 2).



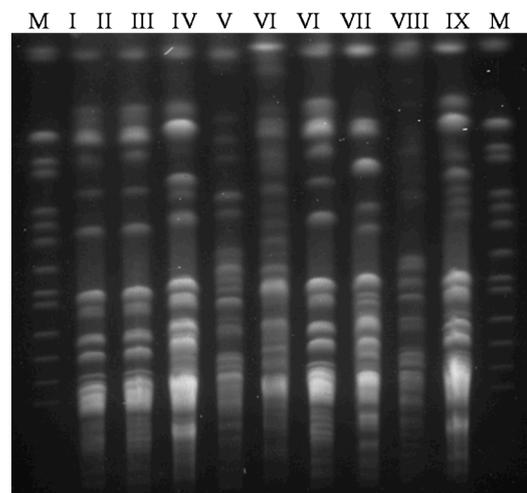
**Figure 2 :** Différentes origines possibles des *Brettanomyces* dans les vins.

Pour répondre à cette question il est nécessaire d'avancer dans l'identification des isolats de *B. bruxellensis* et de se placer au niveau des souches (Figure 3).



**Figure 3 :** Illustration de la classification des microorganismes ; au sein de l'espèce *B. bruxellensis*, des milliers de souches doivent exister

Le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire et l'avancée des connaissances du génome levurien ont permis de développer des méthodes efficaces destinées à l'identification des microorganismes du vin. Les microorganismes d'altération, y compris *B. bruxellensis*, ont fait l'objet d'une attention toute particulière (Ibeas *et al.*, 1996 ; Delaherche *et al.*, 2004). Récemment, Miot-Sertier et Lonvaud-Funel (2006) ont développé une méthode de restriction enzymatique suivie d'une électrophorèse en champ pulsé destinée à différencier les souches de *B. bruxellensis*. Cette méthode particulièrement sensible fournit un profil unique et original pour chaque souche. Le typage de plusieurs dizaines d'isolats de *B. bruxellensis* a confirmé des différences génétiques entre des *B. bruxellensis* d'origines différentes (Miot-Sertier *et al.*, 2006 ; Renouf *et al.*, 2006) (Figure 4).



**Figure 4 :** Illustration du typage des souches de *B. bruxellensis* par REA-PFGE (M : marqueur de taille et de I à IX résultats obtenus pour différents isolats de *B. bruxellensis*).

Des comparaisons de souches isolées sur raisins, dans le moût durant les fermentations puis dans le vin, ainsi qu'à la surface du matériel vinicole et dans des bouteilles de vieux millésimes, ont été réalisées. Dans un même domaine, des souches présentes sur le raisin se retrouvent dans le vin (Renouf et Lonvaud-Funel, 2006). L'origine des souches d'altération au vignoble, en amont du chai, est donc démontrée.

## 2. CORRELATION ENTRE LA PRESENCE DE *B. BRUXELLENSIS* SUR LE RAISIN ET LES RISQUES D'ALTERATIONS DES VINS

À chaque vendange, le raisin transporte les *B. bruxellensis* du vignoble au chai. Après le foulage des baies, une sélection des microorganismes les plus adaptés aux conditions oenologiques (sucre, SO<sub>2</sub>, pH, éthanol...) s'opère. Au laboratoire, des différences de cinétiques de dégradation des sucres et de capacité de multiplication à différents pH, TAV et doses de SO<sub>2</sub> libre ont clairement été mises en évidence entre les souches de *B. bruxellensis* (Barbin, 2006 ; Renouf, 2006).

Durant les fermentations, le moût riche en substrats devient le vin carencé et concentré en éthanol. Certaines souches sont éliminées, d'autres plus résistantes du fait d'un patrimoine génétique particulier peuvent survivre, et, même, se multiplier. Des interactions probables avec les principaux microorganismes des fermentations : *S. cerevisiae* pour la fermentation alcoolique (Renouf *et al.*, 2006) et *O. oeni* pour la fermentation malolactique (Gindreau et Augustin, 2006) doivent également participer à l'évolution de la diversité des souches de *B. bruxellensis*.

Mais dans tous les cas, cette diversité diminue progressivement. Parmi les souches détectées dans le moût, puis dans le vin, certaines sont clairement identiques à celles détectées à la surface du raisin et certaines sont également détectées à la surface des cuves et des barriques, mais uniquement du matériel usagé (Renouf *et al.* 2006).

Aucun travail ne rapporte la détection de *B. bruxellensis* à la surface de matériel vinicole neuf avant son premier contact avec le vin, ce qui laisse penser que ce sont les souches du vin qui

sont capables de coloniser la surface du matériel au fur et à mesure de son utilisation.

Le matériel vinicole n'est pas en soi une source de contamination, c'est le non respect des règles élémentaires d'hygiène (lavage, séchage, méchage, etc.). Finalement, parmi les *B. bruxellensis* présentes sur la baie de raisin certaines persistent dans le moût et dans le vin si bien qu'elles peuvent ensuite coloniser le chai et le matériel vinicole.

L'homologie des souches isolées de bouteilles produites lors de différents millésimes sur un même domaine confirment cette hypothèse (Figure 5).

De plus, ces souches seraient spécifiques des vignobles ce qui expliquerait pourquoi les souches de *B. bruxellensis* isolées, des vins diffèrent d'un chai à l'autre (Renouf *et al.*, 2006).

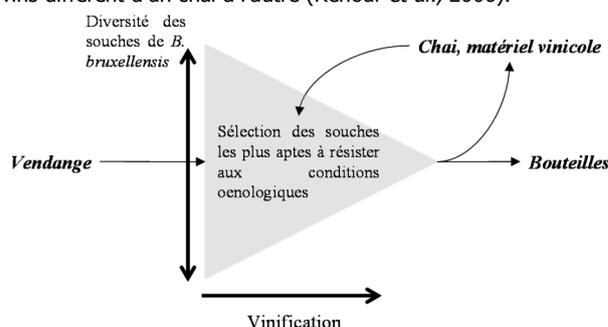


Figure 5 : Illustration de la sélection des souches *B. bruxellensis* au chai

## 3. VARIABILITE DE *B. BRUXELLENSIS* AU VIGNOBLE ET CONSEQUENCES AU CHAI

Au cours de plusieurs campagnes de suivis dans un vignoble du Sud-Ouest (2001 à 2004), 24 isolats parmi la centaine recueillis à partir d'échantillons de raisins de différentes parcelles et de vins en cours de fermentation ont été soumis à des tests supplémentaires.

Une identification par PCR-ITS spécifique (Guillamon *et al.*, 1998) permet en premier lieu de confirmer l'appartenance de ces 24 isolats à l'unique espèce *Brettanomyces bruxellensis*. Le typage de ces 24 isolats par restriction enzymatique en champ pulsé (Barbin, 2006) a permis de distinguer 23 souches différentes, c'est-à-dire presque autant que d'isolats.

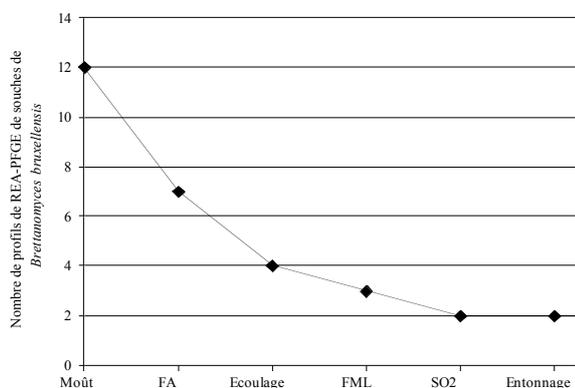
Ce premier résultat montre l'existence sur un vignoble étendu d'une diversité des souches présentes sur baie, et au chai. Ces études de dépistage et de suivis mettent en avant l'absence de souches dominantes sur un site donné pour un millésime donné.

Contrairement aux résultats présentés par Mitrakul *et al.* (1999) faisant état d'une contamination par une seule souche (contamination monosouche) dans une cave donnée alimentée par un vignoble de faible étendue, nous avons affaire à une contamination multi-souches dans la cave que nous avons considérée.

Outre l'effet probable de la méthode utilisée, la méthode retenue par Mitrakul *et al.* (1999) serait moins discriminante que la discrimination par REA-PFGE, nous retenons alors qu'il peut exister une variabilité du mode de contamination, fonction de plusieurs éléments parmi lesquels l'étendue et la diversité propre provenant du vignoble.

Le vignoble étudié qui a révélé cette importante diversité des souches de *B. bruxellensis* est très étendu (2 000 hectares en production principalement dédiés au rouge) et les cuves de vinifications très volumineuses (pouvant atteindre 450 hL et fournissant une cuverie totale de 250 000 hL disponibles). Dans des domaines bordelais moins vastes et qui utilisent des plus petites cuves de vinification (entre 5 hL et 30 hL) pour assurer des vinifications parcellaires, la diversité est moins élevée et, dans la plupart des cas, une ou deux souches sont majoritaires à la fin des fermentations (Figure 6).

Ces souches résistantes diffèrent néanmoins généralement d'un lot à l'autre suivant l'origine au vignoble. La compréhension des causes et des conséquences de cette diversité des souches de *B. bruxellensis* et la corrélation entre le vignoble et la cuve de fermentation est très intéressante.



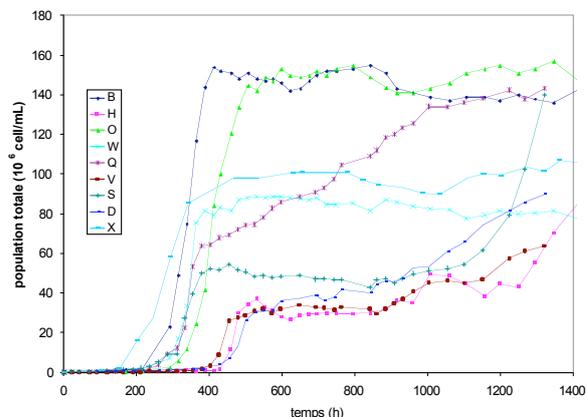
**Figure 6** : Evolution du nombre de profils de REA-PFGE des souches de *B. bruxellensis* lors d'un lot de cabernet-sauvignon vinifié en 2005 dans une cuve de 12 hl

Par ailleurs, des travaux menés sur des parcelles cibles montrent par la présence préférentielle de *B. bruxellensis* à la surface de baies abîmées fortement colonisées par des insectes (Barbin *et al.* 2007). Ces derniers (mouches, guêpes, etc.) se présentent alors comme des vecteurs potentiels d'apport et de dispersion de microorganismes parmi lesquels la levure redoutée. Des levures et des bactéries sont détectées à leur surface dans leur duvet de poils mais aussi dans leur système digestif (Stevic, 1962).

Avec leur origine sur les différentes parcelles, les souches qui se développeront en cours de campagne dans le chai présentent une variabilité désormais démontrée. Neuf souches isolées au cours de vinifications dans des lots de vins contaminés ont été étudiées en laboratoire. Des fermentations sur milieux synthétiques de type vin en fin de fermentation alcoolique montrent alors une très grande diversité de comportement. Ainsi neuf profils cinétiques sont retenus, différant tant par les populations maximales atteintes (**Tableau 1**) au bout de 1 400 heures que par les phases de croissances nécessaires pour y arriver (**Figure 7**). Certaines souches ne présentent qu'une unique phase classique de croissance alors que d'autres se caractérisent par une croissance en deux étapes bien marquées.

Souche	Biomasse finale (g/L)	Population finale ( $10^6$ cellules/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

**Tableau 1** : Biomasse et population finale après 1 400 heures de culture sur milieu synthétique pour 9 souches *B. bruxellensis*.



**Figure 7** : Profil de croissances sur milieu synthétique type vin fin FA, de 9 souches de *B. bruxellensis*.

Paramètre très important d'un point de vue œnologique, la production d'éthyl-phénol s'avère également être un élément variant considérablement d'une souche à l'autre. (**Tableau 2**).

Souche	Concentration maximale en 4EP (mg/L)
B	2,59
D	2,773
H	0,35
O	2,762
Q	1,905
S	2,088
V	0,453
W	2,749
X	1,228

**Tableau 2** : Production maximale en milieu synthétique de 4 éthyl-phénol (4EP) à parti de 5 mg/L d'acide para-coumarique.

Certaines souches sont alors de très fortes productrices de phénols volatils alors que d'autres n'en sont que très faibles productrices, bien qu'ici les teneurs dosées soient supérieures aux seuils de détection couramment utilisés dans le vin (mais ici le milieu avait été additionné d'une quantité relativement importante en acide coumarique qui est le précurseur de la réaction afin de se placer en condition de non-limitation par le substrat et forcer la capacité intrinsèque de production).

Nous comprenons au regard de ces résultats que la diversité au sein de souches contaminantes est problématique en ce sens ou elle peut rendre difficile et dangereuse toute généralisation des comportements et des développements en cours de vinification. De fait, il devient illusoire de proposer une unique méthode (ou méthode universelle) de lutte contre la contamination par *Brettanomyces*.

La gestion au chai de cette levure doit alors intégrer le contexte même de la contamination et s'adapter aux souches présentes.

## CONCLUSION

Longtemps ignorée ou mise de côté, une origine de *B. bruxellensis*, en amont du chai, sur le raisin, est maintenant clairement démontrée. Evidemment, ces résultats ne doivent pas restreindre les efforts d'hygiène au chai et de désinfection des fûts entre leurs utilisations mais ils démontrent néanmoins que *B. bruxellensis* est une levure naturellement présente dans le vin et que sa présence ne découle pas uniquement de mauvaises conditions de travail. Sur les raisins, au moment des vendanges, la détection de certaines souches est corrélée à leur présence dans le vin et à des altérations constatées par les phénols volatils. Les différences de souches entre les parcelles et même au sein de ces dernières sont très intéressantes. Elles laissent présager qu'une analyse du raisin lors de la vendange pourrait permettre de prédire les risques de contamination durant les vinifications. Pour cela les nouvelles techniques moléculaires mises au point, comme la PCR quantitative, sont très avantageuses car elles permettent une analyse sensible et rapide de la mise en évidence de la présence de *B. bruxellensis* et du dénombrement des cellules. Elles assureraient une bonne réactivité en s'approchant le plus près possible de la récolte.

Si la fréquence de détection des *B. bruxellensis* est hétérogène au vignoble cela signifierait que certaines parcelles pourraient être plus sensibles que d'autres, ce qui amènerait à plus d'attention et de contrôles lors de leur vinification. La compréhension des causes et des conséquences de cette diversité est fondamentale. Elle implique une meilleure caractérisation de l'écosystème microbien de la baie de raisin, ce qui pourrait également conduire à la mise au point de traitement préventif de la récolte. Des efforts doivent également être menés pour mieux caractériser les différences fonctionnelles entre les souches de *B. bruxellensis*. Il est évident que les souches qui sont les plus résistantes aux conditions œnologiques et/ ou qui ont les plus fortes capacités de production des phénols volatils sont les plus préjudiciables. Là encore, des corrélations à confirmer entre ces redoutables souches et des origines préférentielles sur certaines parcelles pourraient fournir des indications sur les lots à vinifier avec le plus grand soin. Une meilleure caractérisation de la diversité des *B. bruxellensis* au vignoble permettrait de ne plus subir le risque de *B. bruxellensis* mais de le prévoir et de l'anticiper. Des études devront également être menées pour avancer dans la modélisation des matrices chimiques et microbiologiques des vins afin de fournir des modèles susceptibles d'évaluer les risques de contamination après les fermentations lorsque le système est plus stable.

Des travaux devront également être menés au niveau moléculaire pour comprendre le mécanisme de production des phénols volatils. D'un point de vue physiologique, l'intérêt de ces transformations est encore l'objet d'interrogations. Deux hypothèses principales tentent d'expliquer pourquoi *B. bruxellensis* catabolise les acides hydroxycinnamiques. La première affirme que la levure puise de l'énergie à partir de cette décarboxylation / réduction sous la forme d'un gradient d'électrons permettant la production d'ATP. La seconde théorie plaide pour une réaction de détoxification car il est fréquent que les cellules microbiennes dégradent des composés inhibiteurs pour se protéger. *B. bruxellensis* dégraderait les acides phénoliques par décarboxylation pour les éliminer car ces composés sont toxiques pour la cellule puisqu'ils altèrent la membrane plasmique en s'intercalant entre les phospholipides et diminuent les fonctions essentielles de cette dernière. Une combinaison de ces deux hypothèses peut également être suggérée.

Une meilleure caractérisation des interactions avec la matière première, le raisin et sa composition : nature et concentration des substrats doit également être considérée. Finalement, tous ces paramètres devront être pris en compte pour améliorer la compréhension de la « problématique Brett » et permettre de proposer des réponses précises et efficaces aux interrogations des vinificateurs.

## BIBLIOGRAPHIE

- **Abbott D.A., Hynes S.H., Ingledew W.N.**, 2004. Growth rates of Dekkera/ *Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 641-647.
- **Agostino F.**, 1950. Polimorfismo esogene et endogenonei lieviti del genere *Brettanomyces*. *Agric. Ital.* 50, 193-198.
- **Alves-Aruaja C., Almeida M.J., Sousa M.J., Leao C.**, 2004. Freeze tolerance of the yeast *Torulaspora delbrueckii* : cellular and biochemical basis. *FEMS Microbiol. Lett.* 240, 7-14.
- **Bae S., Fleet G.H., Heard G.M.**, 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several vineyards. *J. Appl. Microbiol.* 100, 712-727.
- **Barbin P.**, 2006. Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure *Brettanomyces* au cours du procédé de vinification en rouge. Thèse de doctorat de l'INP de Toulouse. France.
- **Barbin P., Gilis J.F., Strehaiano P. et Taillandier P.**, 2007. Méthodologie de dépistage et d'isolement de *Brettanomyces* sur le raisin : application à l'échelle parcellaire. *Revue des Œnologues*. Sous Presse.
- **Barret A., Bidan P., Andre L.**, 1955. Sur quelques accidents de vinification dus à des levures de voiles. *Communic. Res. Acad. Agric.* 41, 496-504.
- **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. *Revue Française d'Œnologie*, 179, 20-24.

- **Ciani M., Ferraro L.**, 1997. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J. Sc. Food Agric.* 75, 489-495.
- **Ciani M., Maccarelli F., Fatichenti F.**, 2003. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/ Dekkera* under different conditions of aerobiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 419-422.
- **Clausen N.H.**, 1905. Occurrence of *Brettanomyces* in American larger beer. *Am. Brew. Rev.* 19, 511, 512.
- **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. Vitic.* 53, 322-324.
- **Delaherche A., Claisse O., Lonvaud-Funel A.** 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97, 910-915.
- **Du Toit W., Pretorius I., Lonvaud-Funel A.**, 2005. The effect of sulfur dioxide and oxygen on the viability and colourability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862-871.
- **Gindreau E., Augustin, C.**, 2006. Nouveautés dans les levains malolactiques. *Revue des Œnologues* 122, 13-16.
- **Guillamon J.M., Sabate J., Barrio E., Cano J., Querol A.**, 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFP analysis of ribosomal interanl transcribed spaces (ITS) region. *Arch Microbiol.* 169, 387-392
- **Heresztyn T.**, 1986. Formation of substituted tetra hydropyrimidines by a species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 127-132.
- **Ibeas J.I., Lozano I., Perdigones F., Jimenez, J.**, 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998-1003.
- **Licker J.L., Acree T.A., Henick-Kling T.**, 1997. What is « Brett » (*Brettanomyces*) flavour ? American Chemical Soc. Symposium, 21th National meeting, San Francisco, USA.
- **Medawar W.**, 2003. Etude physiologique et cinétique des levures du genre *Brettanomyces* dans un contexte œnologique. Thèse de doctorat de l'INP Toulouse, France.
- **Miot-Sertier C., Lonvaud-Funel A.**, 2006. Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *J. Appl. Microbiol.* 102, 555-562.
- **Miot-Sertier C., Renouf V., Lonvaud-Funel A.**, 2006. REA-PFGE : a tool for traceability of *Brettanomyces bruxellensis* strains during the winemaking process. 30th SASEV congress, Cape Town, South Africa.
- **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, 3-14
- **Peynaud E., Domercq S.**, 1956. Sur les *Brettanomyces* isolées de raisins et de vins. *Arch. Microbio.* 24, 266-280.
- **Prakitchaiwattana C.J., Fleet G.H., Heard G.M.**, 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analysis the yeast ecology of wines grapes. *FEMS Yeast Res.* 4, 865-877.
- **Renouf V., Lonvaud-Funel A.**, 2005. Incidence microbiologique de l'usage de barriques neuves et/ ou de barriques usagées. *Revue Française d'Œnologie* 211, 10-14.
- **Renouf V., Claisse O., Lonvaud-Funel A.**, 2005. Numeration, identification and understanding of yeast and bacteria ecosystem on grape berry surface. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 316-327.
- **Renouf V., Lonvaud-Funel A.**, 2006. Complexité et importance des équilibres microbiens à la surface de la baie de raisins. *Revue des Œnologues* 120, 28-32.
- **Renouf V., Claisse O., Miot-Sertier C., Perello M.C., de Revel G., Lonvaud-Funel A.**, 2006. Study of the microbial ecosystem present on the barrels surface used during the winemaking. *Sc. Aliments* 26, 427-445.
- **Renouf V., Miot-Sertier C., Strehaiano P., Lonvaud-Funel A.**, 2006. The wine microbial consortium : a real terroir characteristic. *J. Int. Sc. Vigne Vin* 40, 209-217.
- **Renouf V.**, 2006. Description et caractérisation de la diversité microbienne au cours de l'élaboration du vin : interactions et équilibres – relation avec la qualité du produit. Thèse de doctorat de l'INP de Toulouse.
- **Renouf V., Lonvaud-Funel A.**, 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/ Brettanomyces bruxellensis*, spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.*, 161, 154-167.
- **Suarez R., Suarez-Lepe J.A., Morata A., Calderon F.**, 2007. The production of ethylphenols in wine by yeast of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102, 10-21.
- **Stevic S.**, 1962. The significance of bees (*Apis* sp.) and waps (*Vespa* sp.) as carriers of yeast for the microflora of grapes and the quality of wine. *Arkh. Poljoprivredne Nauke* 50, 80-92.
- **Uscanga M.G., Delia M.L., Strehaiano P.**, 2000. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch chemostat cultures. *Can. J. Microbiol.* 46, 1046-1050.