

N° d'ordre : 2186

THESE

présentée  
pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR  
DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

Sciences des procédés  
Génie des procédés et de l'environnement

par M. Benoit DIVOL

La microbiologie des vins issus de raisins botrytisés au cours de l'élevage.  
Caractérisation des souches de *Saccharomyces cerevisiae* responsables de  
refermentations.

Soutenue le 15 décembre 2004 devant le jury composé de :

Pr Bruno BLONDIN

Rapporteur

Pr Hervé ALEXANDRE

Rapporteur

Dr Isabelle MASNEUF-POMAREDE

Examineur

M. Eric KOHLER

Examineur

Pr Aline LONVAUD-FUNEL

Examineur

Pr Pierre STREHAIANO

Directeur de thèse

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not “Eureka !” (I found it!) but rather, ‘hmmm... that’s hunny...’”

Isaac Asimov

## REMERCIEMENTS

Je tiens, en premier lieu, à saluer l'aimable contribution de l'ensemble des membres du jury.

Messieurs les Professeurs Bruno Blondin et Hervé Alexandre ont accepté la charge de rapporteur et je leur en adresse mes remerciements.

Monsieur Eric Kohler a assuré l'orchestration technique des travaux lors de ces trois années de thèse et a bien voulu porter son attention et son soutien aux travaux effectués. Je le sais gré de son investissement.

Madame le Docteur Isabelle Masneuf-Pomarede a bien voulu s'intéresser à mes recherches, m'apporter son soutien technique et me faire partager ses intuitions. Je tiens à l'en remercier sincèrement.

Monsieur le Professeur Pierre Strehaiano a eu la gentillesse d'accepter l'encadrement de cette thèse dans des conditions un peu particulières. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Madame le Professeur Aline Lonvaud-Funel m'a implicitement assuré de sa confiance en me proposant ce travail de thèse. Elle a su sagement me guider tout au long des avancées. Je salue sa disponibilité en dépit d'un emploi du temps surchargé, et sa patience envers un vieux râleur, un peu trop bavard... Sa curiosité scientifique, ses remises en cause, son enthousiasme à chaque découverte, son intérêt général pour la microbiologie du vin, tant d'un point de vue fondamental que pratique, percent au travers de ses silences éloquents et ses conseils avisés. Qu'elle trouve dans ces quelques lignes l'hommage de mon immarcescible gratitude.

Je tiens également à remercier sincèrement le syndicat des crus classés de Sauternes et de Barsac, représenté par sa présidente, Madame Nancy de Bournazel, ainsi que le château d'Yquem et en particulier Monsieur Alexandre de Lur-Saluces, pour leur soutien financier et leur intérêt pour le travail accompli. Souffrez que, derrière ma modeste contribution à la connaissance de la microbiologie des vins liquoreux, se cache mon admiration pour votre savoir-faire dans l'élaboration de vins ineffables et indéfectibles.

Je salue aussi le volontariat des châteaux ayant cordialement accepté le sacrifice de quelques volumes de vin pour permettre l'avancée de mes recherches. Que soient remerciés les directeurs administratifs et techniques, ainsi que les maîtres de chai des châteaux Guiraud, La Tour Blanche, de Malle, Rieussec, Suduiraut et d'Yquem.

Madame le Docteur Sandrine Garbay a bien voulu s'enthousiasmer pour ce travail en le suivant attentivement. Je me souviendrai longtemps de nos discussions tant professionnelles que personnelles entre deux barriques. Qu'elle soit assurée de mon amitié.

Ce travail n'aurait pu être accompli sans le soutien technique, moral et affectif de l'ensemble du personnel du laboratoire de biotechnologie et de microbiologie appliquée de la faculté d'œnologie de Bordeaux. Je salue particulièrement les compétences professionnelles et le secours des membres permanents. Je n'oublierai pas de sitôt les heures passées dans le laboratoire à leurs côtés. Mes fréquents éclats de voix ne sont que le reflet de mon attachement à tous, permanents, doctorants et stagiaires. Merci donc à Manu, Olivier, Benjamin, Marguerite, Patrick, Emilie, Joana, Vincent, Arnaud, Alice et un clin d'œil particulier à Marie-Louise en souvenir de nos fous rires...

Une partie de ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide précieuse de Madame Cécile Miot-Sertier. Je souhaite lui témoigner ma reconnaissance pour sa gentillesse, ses compétences techniques, ses bonnes idées, sa curiosité naturelle et son intérêt pour mes travaux. Nos éclats de rire et nos médisances chuchotées sont les preuves de notre collaboration fructueuse et de notre amitié. Qu'elle soit assurée que mes colères ne trahissent que l'expression de ma fougue professionnelle.

Un merci distinctif et chaleureux à Audrey et à Stéphane pour leur amitié et leur complicité. Leur sympathie et leur affection me sont précieuses.

Je souhaite également adresser mes salutations et mes remerciements à mes amis « hors labos », qui ont su me distraire de mes recherches parfois frustrantes, justement parce qu'ils ne comprenaient pas (ou si peu) mes travaux de recherche.

Enfin, j'adresse mon incommensurable gratitude à ma famille pour son soutien à tous égards. A la fin de ces longs remerciements (mais je ne pouvais faire plus court, sans oublier quelqu'un), les mots deviennent trop futiles pour exprimer l'exactitude de mes sentiments envers ceux qui me sont les plus chers.

Permettez-moi, par conséquent, d'emprunter ceux d'une artiste dont vous devinerez le nom sans peine, vous qui me connaissez le mieux.

« Mon Papa, tu m'as donné toutes les chances (...)

Petite sœur, t'es la plus belle que j'aie aimée (...)

Oh Maman, sans qui je n'aurais rien créé »

Je vous dédie cette thèse en témoignage de mon amour indicible.

## Glossaire et abréviations utilisées

Dans ce manuscrit, un certain nombre d'abréviations et de termes impropres ou même inventés ont été employés. Il convient donc ici de les expliciter pour une meilleure compréhension de l'ensemble du texte.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARNr (ou ADNr)** : Acide (désoxy)ribonucléique ribosomique

**Cultivabilité** : Anglicisme basé sur l'existence du mot « *cultivability* » qui n'a pas de traduction en français. Ce terme désigne la potentialité de croissance d'un micro-organisme sur ou dans un milieu de culture approprié.

**DGGE** : *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (Electrophorèse en gradient dénaturant)

**Dioxyde de soufre (ou SO<sub>2</sub>)** : le terme dioxyde de soufre tel qu'il est employé dans ce manuscrit désigne indistinctement toutes les formes chimiques de la molécule ; SO<sub>2</sub> (dioxyde de soufre moléculaire), H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (acide sulfureux), HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> (ion bisulfite) ou SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (ion sulfite).

**DMDC** : Diméthylcarbonate

**Ethanal** : terme français désignant l'acétaldéhyde anglais.

**kb** : Kilopaires de base, soit 1000 paires de bases.

**Levurienne** : néologisme constituant l'adjectif de levure, au même titre que bactérienne pour bactéries.

**M** : Molaire. 1 M = 1 mol/L, 1 mM = 1 mmol/L.

**pb** : Abréviations signifiant paires de bases : unité de mesure de la taille d'un fragment d'ADN.

**PCR** : *Polymerase chain reaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)

**p/v** : Poids à volume.

**Refermentation** : néologisme couramment employé en jargon de vinificateur pour désigner une fermentation non désirée par le vinificateur, susceptible de se produire après le

mutage, pendant l'élevage ou le vieillissement en bouteille. Le verbe refermenter est dérivé de ce terme.

**Résurrection** : Le terme de résurrection a été souvent utilisé pour désigner la sortie de l'état viable non cultivable des micro-organismes. Néanmoins, il n'est pas à proprement parlé parfaitement approprié. Il s'inspire du terme anglais « resuscitation » dont la traduction n'existe pas en français. Le terme de re-vivification a parfois été indistinctement employé en tant que synonyme.

**RFLP** : *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RT-PCR** : Retrotranscription – PCR

**UFC** : Unité Formant Colonie

**Vin botrytisé** : Cette expression a été utilisée couramment dans cette thèse afin de simplifier, cependant, elle est incorrecte. L'expression vin issu de raisins botrytisés serait plus appropriée.

**VNC** : Viable Non Cultivable.

**v/v** : Volume à volume.

Les abréviations courantes officielles du système international ont été utilisées pour désigner les diverses unités de mesure (masses, volumes, concentrations...).

---

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>3</b>
<b>GLOSSAIRE ET ABREVIATIONS UTILISEES .....</b>	<b>6</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>PREMIERE PARTIE ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>14</b>
1. LES VINS BOTRYTISES : UNE ELABORATION MAITRISEE, MALGRE UNE CONNAISSANCE BIOLOGIQUE IMPARFAITE.....	14
1.1. <i>Qu'est-ce qu'un vin botrytisé ? Historique, élaboration et produit fini</i> .....	14
1.1.1. Les différents types de vin botrytisé. Les vins de Sauternes .....	14
1.1.2. Maturation du raisin, intervention et rôle de <i>Botrytis cinerea</i> .....	16
1.1.3. Elaboration du vin par des procédés traditionnels plus ou moins empiriques .....	17
1.1.4. Mutage et rôle du dioxyde de soufre, notamment sur les micro-organismes .....	19
1.1.5. Principales caractéristiques chimiques, physico-chimiques et organoleptiques du produit fini .....	20
1.2. <i>Les vins botrytisés : milieu de vie</i> .....	21
1.2.1. Micro-organismes du raisin botrytisé (bactéries acétiques et levures).....	21
1.2.2. Levures (oxydatives, apiculées et fermentaires) et bactéries acétiques du moût botrytisé .....	22
1.2.3. Levures de fermentation alcoolique (levures fermentaires) .....	23
1.2.4. Et après mutage ?.....	24
2. LA REFERMENTATION, UN ACCIDENT FRUIT D'UNE INSTABILITE MICROBIOLOGIQUE NATURELLE... 25	25
2.1. <i>Qu'est-ce que la refermentation ? Conséquences techniques et économiques</i> .....	25
2.2. <i>Connaissances générales sur la refermentation</i> .....	26
2.2.1. Etat des connaissances : observations .....	26
2.3.2. Interprétations proposées .....	26
3. LA SURVIE DES MICRO-ORGANISMES EN MILIEU DEFAVORABLE .....	32
3.1. <i>Exemple de survie post-fermentaire et problèmes rencontrés dans le vin (LAB, AAB, Levures). Les différents accidents microbiologiques connus, parfois depuis longtemps</i> .....	32
3.2. <i>Les états de survie des micro-organismes en milieu difficile (viables, blessées, en dormance, VNC, mortes). Notion de stress</i> .....	33
3.3. <i>L'état VNC : une réponse physiologique originale. Un concept récent et méconnu</i> .....	34
4. METHODES D'ETUDES EN ECOLOGIE MICROBIENNE.....	37
4.1. <i>Dénombrement des micro-organismes dans le vin</i> .....	37
4.2. <i>Méthodes d'identification des levures par biologie moléculaire</i> .....	38
4.2.1. Bref rappel des différentes techniques connues .....	38



4.2.2. Organisation du locus codant pour les ARN ribosomiques chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
4.2.3. Identification à partir de colonies distinctes (culture pure) .....	43
4.2.4. Identification au niveau de l'espèce à partir d'un échantillon de vin .....	46
5. LUTTE CONTRE LES MICRO-ORGANISMES SURVIVANT AU COURS DE L'ELEVAGE.....	48
5.1. Procédés physiques : soutirage, stabulation à froid, collage, filtration, flash-pasteurisation, mise en bouteille à chaud .....	48
5.2. Procédés chimiques.....	49
5.2.1. Les différents fongicides connus et utilisés.....	49
5.2.2. Le dioxyde de soufre : efficacité sur les levures .....	49
5.2.3. Le DMDC .....	50
<b>DEUXIEME PARTIE MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>53</b>
1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES DE CULTURE.....	53
1.1. Matériel biologique .....	53
1.2. Milieux de culture des levures .....	53
1.3. Autoclavage et filtration.....	54
2. TECHNIQUES D'EPIFLUORESCENCE ENVISAGEES .....	54
2.1. Méthode Chemunex .....	54
2.2. Observation et analyse d'image (taille et intensité de fluorescence des cellules).....	55
2.3. Méthode Live/Dead (Molecular Probes).....	55
3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE .....	56
3.1. Extraction des acides nucléiques des levures et préparation pour analyse ultérieure .....	56
3.1.1. Extraction des ADN génomiques de levures et purification .....	56
3.1.2. Extraction de l'ADN des levures présentes à la surface des baies de raisin.....	57
3.1.3. Extraction d'ADN du champignon <i>Botrytis cinerea</i> .....	57
3.1.4. Conservation des acides nucléiques .....	58
3.1.5. Extraction des ARN totaux de levures, purification et rétro-transcription .....	59
3.1.6. Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires (ADNc).....	60
3.1.7. Mesure de la concentration en acides nucléiques extraits .....	61
3.2. Analyse des acides nucléiques.....	61
3.2.1. La Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	61
3.2.2. PCR quantitative en temps réel ( <i>ACT1</i> , <i>SSUI</i> ) .....	62
3.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	63
3.2.4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).....	64
3.2.5. Séquençage des bandes de DGGE après réamplification par PCR .....	65
3.2.6. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .....	65
3.2.7. Caryotype des levures .....	66
3.3. Clonage d'un fragment d'ADN dans <i>E. coli</i> par électroporation.....	67
3.3.1. Clonage et électrotransformation .....	67
3.3.2. Sélection des transformants .....	67
4. DOSAGES CHIMIQUES .....	68
4.1. Dosage du dioxyde de soufre libre et total par méthode de Ripper.....	68
4.2. Calcul du pouvoir de combinaison d'un milieu de culture .....	70

4.3. Dosage de la concentration en éthanal .....	70
4.4. Dosage de la concentration en D-Glucose et D-Fructose.....	71
<b>TROISIEME PARTIE RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>73</b>
1. OBSERVATIONS PRELIMINAIRES D'ORDRE CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE.....	73
1.1. <i>Observations chimiques</i> .....	73
1.1.1. Premier bilan chimique .....	73
1.1.2. Suivi de quelques paramètres chimiques.....	74
1.2. <i>Observations microbiologiques</i> .....	75
1.2.1. Effet du mutage sur le nombre de levures.....	75
1.2.2. Effet du mutage sur la sélection des levures .....	76
1.3. <i>Observations d'un lot particulier de refermentation</i> .....	77
1.4. <i>Conclusions et perspectives</i> .....	78
2. DE LA SURVIE DES LEVURES DANS UN ENVIRONNEMENT SULFITE .....	79
2.1. <i>Suivi microbiologique de 6 lots de vins après mutage (vendange 2002)</i> .....	79
2.1.1. dénombrement des levures du vin en début d'élevage .....	79
2.1.2. Analyse des images d'épifluorescence.....	81
2.1.3. Possibilité de réversibilité du phénomène .....	82
2.1.4. Dénombrement sur le long terme .....	83
2.2. <i>Evolution de la diversité des espèces au cours de l'élevage</i> .....	84
2.2.1. Essai d'utilisation de la PCR en temps réel : identification des différentes espèces par température de fusion des amplifiats .....	84
2.2.2. PCR-DGGE et RT-PCR-DGGE .....	88
2.3. <i>Provenance des levures d'un vin en cours d'élevage</i> .....	93
2.4. <i>Discussion : survie possible d'un petit nombre d'espèces sous forme VNC</i> .....	95
3. COMMENT EXPLIQUER LA REFERMENTATION ? .....	97
3.1. <i>Possibilité de résurrection des espèces de levures survivant au cours de l'élevage</i> .....	97
3.2. <i>Mise en place d'essais dans différentes conditions de sulfitage, de pH et fréquence d'aération</i> .....	99
3.2.1. Suivi de la teneur en éthanal .....	100
3.2.2. Suivi de la capacité de croissance des levures et identification de quelques colonies.....	101
3.2.3. Combinaison des deux paramètres.....	102
3.3. <i>Ecologie du vin en barrique au cours de l'élevage selon les différents teneurs en dioxyde de soufre actif et en oxygène</i> .....	104
3.4. <i>Discussion : proposition d'un scénario expliquant le phénomène de la refermentation</i> .....	105
4. COMMENT EVITER LES REFERMENTATIONS ?.....	106
4.1. <i>Etude de la possibilité de mutage par le DMDC en remplacement partiel du dioxyde de soufre</i> .....	106
4.1.1. Action sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	107
4.1.2. Action sur <i>Candida stellata</i> et <i>Zygosaccharomyces bailii</i> .....	107
4.1.3. Microvinification : action sur vin botrytisé en cours de fermentation alcoolique .....	108
4.1.4. Action sur du vin issu de fermentation alcoolique en barrique .....	112

4.2. Conclusion sur les possibilités d'éviter les refermentations.....	112
5. FINALEMENT, QU'EST-CE QU'UNE LEVURE DE REFERMENTATION ? .....	113
5.1. Isolement de levures de refermentation.....	113
5.2. Ecologie des souches de <i>S. cerevisiae</i> en fermentation et en refermentation.....	114
5.3. Capacité à croître dans le vin désulfité .....	115
5.4. Capacité à former de l'éthanal suite à un choc au dioxyde de soufre.....	117
5.5. Caractéristiques génétiques de la résistance au dioxyde de soufre des levures de refermentation .....	118
5.5.1. Discrimination des souches selon leur potentiel d'expression du gène <i>SSU1</i> .....	118
5.5.2. Comparaison de l'expression du gène <i>SSU1</i> en réponse à la l'addition de dioxyde de soufre pour une souche résistante et une souche sensible au dioxyde de soufre.....	120
5.6. Quelques singularités génétiques .....	121
5.6.1. DGGE sur différentes souches de levures.....	121
5.6.2. PCR-RFLP sur la région <i>ITS1-5.8S ARNr-ITS2</i> .....	124
5.7. Discussion : souches de <i>S. cerevisiae</i> avec capacités de survie et d'adaptation supérieures aux autres. ....	125
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>128</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>132</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....</b>	<b>154</b>

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

La stabilisation des vins à l'issue des vinifications a, de tout temps, été un sujet de préoccupation, des vigneron, mais aussi et surtout des commerciaux. Les préjudices, tant financiers, que d'image portés au commerce des vins de France a conduit, dès 1863, l'empereur Napoléon III à commander à Louis Pasteur une étude sur les causes des maladies des vins et sur les moyens d'y remédier. Les vins liquoreux de la région de Sauternes font partie des vins les moins atteints par les maladies des vins. La raison essentielle réside probablement dans la concentration élevée en sucres et en alcool, deux conservateurs connus depuis bien longtemps. Peu d'attaques bactériennes peuvent être recensées, les risques les plus importants pour le vinificateur se situant à la vigne et non au chai. La pourriture noble, élément principal de la spécificité de ces vins, ne peut en effet se manifester que sous certaines conditions climatiques et peut rapidement dévier vers d'autres formes de pourriture à rejeter. Seules quelques difficultés de fermentation sont notées. Les vins sont protégés durant leur élevage par des fortes concentrations en dioxyde de soufre, bloquant le développement des micro-organismes. Néanmoins, au cours de l'élevage ou du vieillissement en bouteille, il est parfois constaté un nouveau départ en fermentation alcoolique, venant détruire irrémédiablement l'équilibre alcool-sucre, savamment établi par le vinificateur. La stabilité du vin est également anéantie et la qualité organoleptique du vin ne répond plus aux critères d'excellence formulés pour ce type de vin.

Or, la plupart des analyses microbiologiques classiques menées au cours de l'élevage ou, à tout le moins, avant la mise en bouteille, rendent un rapport de stérilité apparente des vins : aucun micro-organisme vivant ne peut être décelé. La théorie des générations spontanées étant reconnue sans aucun fondement depuis les travaux de Pasteur, il convient de mieux comprendre et d'avancer une explication plus scientifique à ce phénomène observé couramment. Autrement dit, il s'agit de répondre à la question suivante : les levures responsables de la fermentation alcoolique peuvent-elles survivre à l'issue du mutage, addition massive de dioxyde de soufre en cours de fermentation ? Dans le cas contraire, les refermentations ne pourront être attribuées qu'aux seules contaminations éventuelles. Mais

s'il s'avère que les levures de fermentations peuvent survivre, il conviendra d'expliciter sous quelle forme.

Les levures appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* sont les micro-organismes reconnus de la fermentation alcoolique. Cependant, au cours des refermentations déjà constatées dans la littérature, d'autres genres de levures peuvent être mises en cause. Leur origine est toujours un sujet d'interrogation. Une étude plus exhaustive de la microflore levurienne des vins en cours de fermentation alcoolique, et surtout en cours d'élevage, s'avère donc nécessaire afin de mieux cerner les risques de refermentation. L'origine des levures présentes en cours d'élevage pourrait également être menée jusqu'à la surface des baies de raisin botrytisées, afin d'éliminer le facteur contamination dans la mise en cause des refermentations.

Les doses massives de dioxyde de soufre employées pour la stabilisation des vins liquoreux ne semblant que prévenir partiellement les refermentations, il convient d'examiner la possibilité de mutage par un autre moyen. Les traitements à la chaleur préconisés par Pasteur pour éliminer les micro-organismes des vins n'étant pas les bienvenus dans la vinification des vins liquoreux pour des raisons organoleptiques, il paraît indispensable d'envisager une autre technique. Or, depuis de nombreuses années, l'emploi de diméthylcarbonate est autorisé dans les pays du « Nouveau Monde » comme fongicide. L'utilisation potentielle de cette molécule au cours du mutage est donc à étudier afin de réduire les teneurs en dioxyde de soufre des vins liquoreux, répondant, du même coup, aux demandes de plus en plus pressantes du législateur.

Enfin, une étude plus détaillée des levures responsables de la refermentation s'impose. Une recherche sur les micro-organismes capables de résister à des stress multiples tels que la pression osmotique, l'éthanol, le dioxyde de soufre est nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires garantissant leur survie.

Ces indications pourraient permettre de mieux combattre la présence de ces levures en cours d'élevage et de prévenir les refermentations.

**PREMIERE PARTIE**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# PREMIERE PARTIE

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. LES VINS BOTRYTISES : UNE ELABORATION MAITRISEE, MALGRE UNE CONNAISSANCE BIOLOGIQUE IMPARFAITE

« Le vin, en définitive, vaut ce que vaut l'homme et l'ignorant ne fait du bon vin que par hasard. »

Emile Peynaud

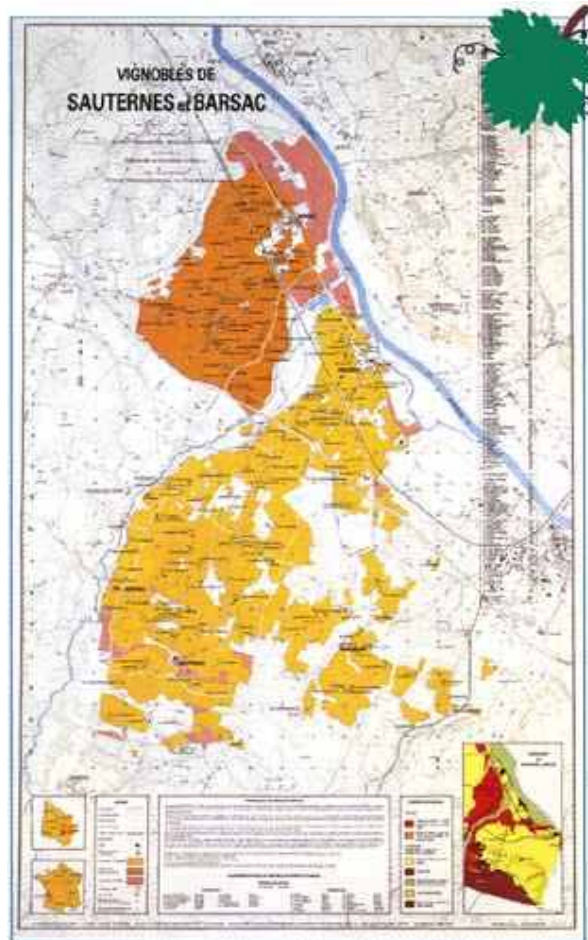
#### 1.1. Qu'est-ce qu'un vin botrytisé ? Historique, élaboration et produit fini

##### 1.1.1. Les différents types de vin botrytisé. Les vins de Sauternes

Les vins qualifiés de liquoreux en France sont des vins spéciaux au sens de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Ce sont des vins blancs doux. Leur particularité vient du fait qu'ils sont élaborés à partir de raisins blancs atteints par la pourriture noble. Ce développement de pourriture noble est si rare que peu de régions en produisent dans le monde, et toujours en quantité très mesurée.

En effet, on en distingue principalement en Europe et notamment dans le Bordelais (Sauternes, Barsac, Sainte-Croix-du-Mont, Loupiac, Cadillac, Cérons ; liste à laquelle on peut ajouter Monbazillac si on étend un peu la région vers l'est), en Val de Loire (Côteaux-du-Layon, Côteaux-de-l'Aubance, Bonnezeaux et Quart-de-Chaume, Vouvray, Montlouis), ou en Alsace (où ce vin est remarqué par la mention « Sélection de grains nobles » sur l'étiquette). Une production confidentielle est également notable dans le Mâconnais. L'élaboration de vins liquoreux est aussi réalisée en Allemagne (notamment dans l'Etat du Rheingau) et en Autriche (dans l'Etat de Wachau et surtout dans le Burgenland). Dans ces deux pays, les vins issus de pourriture noble sont repérés par la mention « Trockenbeerenauslese » sur les étiquettes des bouteilles. La Hongrie est également un producteur important d'un vin





**Figure 1** : Le vignoble de Sauternes et Barsac.

liqueureux de l'appellation Tokay. Dans ce dernier cas, l'élaboration des vins est bien différente. Cependant, la pourriture noble constitue également la condition *sine qua non* à la naissance de ce vin. Dans cette lignée, la Roumanie élabore la « perle de Moldavie » ou Cotnari. La Slovénie produit également des vins liqueureux dans la région de Bela Krajina. En Espagne, une production confidentielle de vin liqueureux est réalisée autour de Corella (Ribera Baja, Navarre). Les Américains tentent également l'élaboration de ce type de vin, de manière encore restreinte, notamment sur la section occidentale de l'Arroyo Seco (Californie, Etats-Unis) et à Potter Valley, au nord de la région de Mendocino (Californie, Etats-Unis). De même, les Australiens en produisent en petite quantité en Nouvelles-Galles du Sud, près de Griffith.

Cette longue liste de régions (Johnson et Robinson, 2001) ne représente finalement qu'une production minimale à l'échelle de la production mondiale de vin. Cela est dû, sans conteste possible, à la nécessité absolue de la pourriture noble, intimement liée au développement d'un champignon filamenteux : *Botrytis cinerea* (anamorphe de *Botrytinia fuckeliana*). Or, ce champignon est également responsable de grands ravages dans les vignobles du monde entier en condition climatique humide de maturation du raisin. Il est en effet responsable de la pourriture grise, véritable maladie de la vigne. Uniquement dans des conditions climatiques très particulières au moment de la maturation du raisin (et surtout de la sur-maturation du raisin), ce champignon peut se développer d'une façon originale et donner naissance à la pourriture noble.

La région de Sauternes jouit du climat océanique bordelais, mais bénéficie également d'un micro-climat particulier, lié à sa proximité avec la Garonne (au nord) et le Ciron (à l'ouest) (figure 1). A l'automne, les beaux jours encore chauds succèdent aux nuits plutôt fraîches et humides. Cette succession, qui se concrétise par la présence de brouillards parfois denses en matinée, puis par un chaud soleil asséchant les vignes, permet le développement de *Botrytis cinerea* sous forme de pourriture noble.

La production de vin à partir de raisins pourris nobles dans la région de Sauternes est probablement récente. La date exacte est inconnue. Des légendes situent les premières vendanges tardives de raisins pourris nobles aux alentours de 1650 en Hongrie et 1775 en Rheingau (Olney, 2003). Dans la région de Sauternes, Bidet parle déjà de vins doux et

liqueureux en 1759. Olney en 2003 se rapporte à un acte notarié de 1666 établi par Me Fontanieu, notaire à Barsac, qui fait état de vendanges coutumières chaque année vers le 15 octobre dans cette région. On peut donc supposer que le vignoble était entièrement infesté par la pourriture noble lorsque ces vendanges tardives débutaient.

La région de Sauternes a fait l'objet d'un classement en 1855, qui récompense les grands crus producteurs de vins blancs. Ils ont été classés en trois catégories : premier cru supérieur (un seul retenu : le Château d'Yquem), premiers et deuxièmes crus.

Laville et Dubreuilh (1987) ont rapporté une description des terroirs des environs de Sauternes et de Barsac. Il s'agit de formations superficielles avec un substrat calcaire situé autour de Barsac. Les sédiments sont recouverts de colluvions limoneuses arrachées à la haute nappe alluviale plus méridionale mélangées à des avancées orientales du sable des Landes. Les sols de la région se déclinent en fait en terrasses graveleuses feutrées de limons pour Sauternes et en un versant calcaire altéré en sols argileux pour Barsac. Les vignobles de Sauternes et de Barsac, orientés respectivement vers le nord et vers l'est, sont dans une dépression contribuant à leur conférer un régime hygrométrique humide et frais.

Les cépages utilisés sont le sémillon (environ 75 à 80 %), le sauvignon (environ 20 %) et la muscadelle (maximum 5 %). Le rendement maximal est de 25 hL/ha pour les Grands Crus depuis 1936, mais les châteaux classés réalisent en réalité souvent moins de 15 hL/ha.

Toutes les pratiques viticoles sont dominées par l'idée d'une bonne maturation et d'une attaque rapide du raisin mûr par *Botrytis cinerea* sous forme de pourriture noble. La région se marginalise du reste du bordelais par une taille traditionnelle particulière nommée « gobelet palissé » ou « à cots ». Elle permet de mieux répartir le raisin, effet renforcé par une charge généralement faible. Tous les travaux en vert contribuent à diminuer l'humidité et à augmenter l'aération des raisins, proches du sol.

#### 1.1.2. Maturation du raisin, intervention et rôle de *Botrytis cinerea*

Les étapes de l'infection des baies de raisin par *Botrytis cinerea* ont été décrites par Ribéreau-Gayon *et al.* (1998). La germination d'une conidie du champignon à la surface d'une baie de raisin est suivie d'une pénétration dans le raisin. Le développement est avant

tout superficiel. Lorsque le mycélium a totalement envahi les parois des cellules épidermiques et sous-épidermiques, les raisins atteignent le stade pourri plein. Des filaments apparaissent alors à la surface des baies de raisin. L'hydratation de la baie n'étant plus régulée, la concentration en sucres augmente et bloque le développement du champignon. Ce stade est nommé pourri rôti. Les raisins sont alors vendangés pour l'obtention des vins liquoreux.

### 1.1.3. Elaboration du vin par des procédés traditionnels plus ou moins empiriques

La vinification des vins liquoreux a longtemps été considérée comme basée sur le savoir-faire du vinificateur (Hugel, 1981) et reste encore traditionnelle.

La vendange des raisins pourris nobles n'est pas chose aisée. Elle est toujours manuelle et, en général, réalisée par des mains expertes. Celle-ci s'effectue en effet par tries successives : les grappes ou morceaux de grappes sont récoltés en plusieurs passages au fur et à mesure de l'avancement de l'infection par *Botrytis cinerea*. Toute autre forme de pourriture est écartée par les vendangeurs (raisins atteints de pourriture aigre, grise ou raisins moisissés). Les raisins confits sont amenés au chai où ils sont pressés. En raison de la faible teneur en eau des raisins, le pressurage est long, les montées en pression lentes et les rebêchages peu nombreux. Le pressoir pneumatique est le plus couramment utilisé avec des pressions appliquées de 2 à 3 bars, mais pouvant monter à 6 bars. Certains châteaux utilisent également la presse verticale avec des pressions maximales de 9 bars. D'autres utilisent parfois un système de pressurage sélectif par le froid : la cryoextraction. Ce procédé s'inspire du mode d'élaboration des vins de glace. On porte le raisin à une certaine température négative (entre -4 et -10 °C), gelant ainsi l'eau se trouvant à la surface des baies de raisin. Seuls les raisins les plus riches en sucres donneront du jus lors du pressurage, les autres restant solides (Chauvet *et al.*, 1986). Cette méthode soustractive de concentration des moûts est la seule autorisée dans les décrets d'appellation. Cependant, des essais sont réalisés pour l'utilisation de l'osmose inverse.

Le débourbage des moûts, opération classique lors de la vinification des vins blancs, est ici rendue très délicate par leur viscosité, en raison de la présence de glycérol et de  $\beta$ -glucane de *Botrytis cinerea* (Robertson *et al.*, 1980 ; Dubourdieu, 1978). Réalisé entre 4 et 10°C, il n'est donc que très partiel et n'est pas appliqué dans tous les châteaux.

Le moût est ensuite entonné en barrique, où se déroule la fermentation alcoolique. On observe actuellement une tendance à favoriser une fermentation par les levures indigènes dans les crus classés, afin de renforcer la typicité des vins. Cependant, les vinificateurs n'hésitent pas à utiliser des préparations commerciales de levures ou « levures sèches actives » lorsque la fermentation se déroule mal. En raison de la richesse en sucres des moûts et du manque courant d'éléments essentiels (azote, vitamines...), la fermentation alcoolique est lente et l'acidité volatile augmente fortement (Müller-Thurgau, 1888), atteignant couramment la valeur de 1 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L. Une teneur maximale de 25 meq/L (soit 1,225 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L) est autorisée pour ce type de vin par décret officiel de l'Union Européenne. Il est parfois ajouté du sulfate d'ammonium et de la thiamine, afin de faciliter la fermentation (Lafon-Lafourcade, 1979). L'utilisation de levures sèches actives est parfois d'un grand secours contre les arrêts de fermentation. La présence d'inhibiteurs produits par *Botrytis cinerea* connus sous le nom de botryticine (Lafon-Lafourcade, 1955) qui seraient en fait des hétéropolysaccharides riches en rhamnose et en mannose (Dubourdieu, 1978) accroît la formation de glycérol et d'acide acétique par les levures via une stimulation de la fermentation glycéro-pyruvique (Ribéreau-Gayon, 1979). Lorsqu'un certain équilibre advient entre la teneur en alcool formé et la teneur en sucres résiduels, la fermentation alcoolique est stoppée par un ajout massif de dioxyde de soufre en une seule fois. Le moment précis de l'arrêt de la fermentation alcoolique est laissé à l'appréciation du vinificateur. Cependant, il est souvent dicté par les levures qui s'arrêtent quelquefois de fermenter en raison d'une teneur en éthanol élevée (12,5 %vol. minimum selon les décrets d'appellation). Cette opération, nommée mutage, est précédée ou non d'un refroidissement du vin avec débourage. Les deux opérations essentielles du mutage (refroidissement et ajout de dioxyde de soufre en quantité importante et en une seule fois après débourage) ont été conseillées par Peynaud et Lafourcade (1952) afin d'éliminer un maximum de levures. Une baisse indicative de 0,1 unité de densité est en général souhaitée avant d'effectuer le mutage pour qu'un bon équilibre organoleptique s'établisse dans le vin. La dose de dioxyde de soufre ajoutée tourne en général autour de 250 mg/L.

L'élevage des vins liquoreux dans la région de Sauternes dure entre 6 et 36 mois en barrique, avec des ouillages bimensuels et des soutirages trimestriels. A chaque soutirage, les teneurs en dioxyde de soufre libre sont réajustées et maintenues aux alentours de 50 mg/L.

Avant mise en bouteille, les vins sont collés (généralement à la gélatine) et filtrés sur plaque (porosité de 5-6  $\mu\text{m}$  en général). Quelques châteaux utilisent également la filtration tangentielle. Tous ces procédés ont été mis au point de manière plus ou moins empirique et chaque château possède ses propres astuces de vinification.

#### 1.1.4. Mutage et rôle du dioxyde de soufre, notamment sur les micro-organismes

Le mutage est probablement l'une des étapes-clés de la vinification des vins liquoreux. Dans l'élaboration de certains vins doux naturels, on ajoute de l'alcool neutre ou sous forme d'eau-de-vie pour stopper la fermentation alcoolique. Pour les vins de Sauternes, un ajout d'alcool briserait l'équilibre organoleptique précaire que le vinificateur a établi. C'est pourquoi, le mutage est provoqué par un ajout de dioxyde de soufre massif. Les ajouts successifs mais indispensables de dioxyde de soufre au cours de l'élevage ont conduit la législation à autoriser des doses de 400 mg/L de dioxyde de soufre total dans les vins issus de raisins botrytisés (résolution OENO 9/98 de l'OIV).

##### Les différentes formes chimiques du dioxyde de soufre dans les vins :

Le dioxyde de soufre est une molécule qui peut se présenter sous différentes formes chimiques en fonction du pH du vin :  $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{HSO}_3^-$  et  $\text{SO}_3^{2-}$ . Des constantes de dissociation régissent le passage d'une forme à l'autre.

Les pouvoirs anti-oxydants, anti-oxydasiques et anti-microbiens du dioxyde de soufre ont rendu son utilisation indispensable en œnologie et particulièrement dans la vinification des vins liquoreux. Mais, cette molécule, par sa forme  $\text{HSO}_3^-$ , majoritaire dans le vin, se combine d'autant plus que le pH est élevé. L'éthanal est probablement le premier responsable de la combinaison du dioxyde de soufre, mais en réalité, un grand nombre de molécules des vins liquoreux réagissent avec le dioxyde de soufre (Barbe, 2000), selon un équilibre régi par leur constante de dissociation de la combinaison bisulfite. Un ajout de dioxyde de soufre dans le vin se traduit parfois par une forte combinaison de celui-ci. La partie non combinée est qualifiée de libre. Seule la forme  $\text{H}_2\text{SO}_3$  de la partie libre est active vis-à-vis des levures (Macris et Markakis, 1974).

Les problèmes de maintien de la concentration en dioxyde libre ont incité les œnologues à utiliser une mesure simple du pouvoir de combinaison des moûts puis des vins. Ce calcul a été établi suite aux travaux de Kielhöfer et Würdig (1960). Après avoir dosé le dioxyde de soufre libre et total d'un vin, un échantillon de 100 mL de ce vin est amené à pH = 5 par ajout de soude. Quatre ajouts d'une quantité croissante connue de dioxyde de soufre sont effectués sur des fractions de 25 mL. Une heure après l'ajout, la concentration en dioxyde de soufre libre est à nouveau déterminée. La droite de régression concentration en dioxyde de soufre total en fonction de la concentration en dioxyde de soufre libre permet de calculer la teneur en dioxyde de soufre total à ajouter pour obtenir 50 mg/L de dioxyde de soufre libre dans le vin considéré. Cette valeur est nommée TL50.

#### 1.1.5. Principales caractéristiques chimiques, physico-chimiques et organoleptiques du produit fini

Les vins liquoreux sont caractérisés avant tout par leur pH exceptionnellement élevé par rapport aux autres vins (souvent aux alentours de 3,90). La concentration en glycérol (produit par *Botrytis cinerea*, puis par les levures au cours de la fermentation alcoolique) et en sucres résiduels sont élevées d'où une forte pression osmotique du vin. De plus, ces vins ne réalisent bien sûr pas de fermentation malolactique, puisqu'il reste des sucres résiduels, ce qui ne facilite pas la stabilité microbiologique. D'autre part, une caractéristique intrinsèquement liée à ce type de vin est la forte concentration en molécules combinant le dioxyde de soufre. Barbe (2000) les a recensées. On trouve en particulier l'éthanal, l'acide 2-oxoglutarique, l'acide pyruvique, les  $\gamma$ - et  $\delta$ -gluconolactones, le 5-oxofructose (notamment lors de la présence de bactéries acétiques sur les raisins), le glucose, des trioses, et les composés  $\alpha$ -dicarbonylés.

La dégustation des vins de la région de Sauternes révèle des vins sans pareil, qui se différencient fortement des autres vins doux. Les grands vins de Sauternes développent, en effet, une forte intensité aromatique au nez et en bouche où vient s'équilibrer une belle onctuosité, rehaussée d'un certain dynamisme.

Cinq types d'arômes peuvent être décelés dans les vins liquoreux de la région bordelaise : des arômes végétaux (thé vert, menthe, tilleul, verveine, aubépine, eucalyptus, miel de forêt, sous-bois), fruités (agrumes, fruits confits, fruits blancs, fruits jaunes, fruits

secs, fruits exotiques), floraux (chèvrefeuille, acacia, rose, violette), épicés (vanille, paprika, cumin, safran, cannelle, clou de girofle, muscade), empyreumatiques (café, caramel, cacao, vanille, pain grillé cire) et boisés (cèdre, chêne et bois de santal, et même tilleul) (descriptif inspiré de Cobbold, 2001).

Lorsqu'ils sont jeunes, ces vins exhalent plutôt des arômes d'ananas, de citron, de pamplemousse, de poire, d'acacia, de miel et de vanille. Avec l'âge, les caractères confits s'amplifient : abricot confit, orange, coing, cannelle et clou de girofle (Lenoir, 1998). Notons que les grands vins de cette région ont l'espérance de vie la plus élevée au monde, lors des meilleurs millésimes.

## 1.2. Les vins botrytisés : milieu de vie

### 1.2.1. Micro-organismes du raisin botrytisé (bactéries acétiques et levures)

La littérature est relativement peu généreuse en indications sur l'origine de la microflore dans le cas des vins liquoreux. D'une manière générale, Pasteur (1872) avait déjà émis l'hypothèse de la présence des levures fermentaires à la surface des baies de raisin. Néanmoins, de nombreux auteurs s'interrogent encore sur l'origine des levures de fermentation des vins, étant donné leur faible fréquence sur les raisins (Mortimer et Polsinelli, 1999). Il n'existe toutefois que très peu d'études écologiques sur la microflore des raisins botrytisés. En 1973, Le Roux *et al.* ont montré qu'il existait une certaine différence entre la microflore des raisins sains et infectés par *Botrytis cinerea*, ces derniers hébergeant préférentiellement des espèces telles que *Kloeckera apiculata* ou *Candida stellata*.

Couramment, sur les baies de raisin sain, on trouve des levures telles que *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus humicolus*, *Hanseniaspora sp.* et *Metschnikowia sp.* (Rementaria *et al.*, 2003 ; Fleet, 2003). Les genres *Rhodotorula* et *Cryptococcus* sont les plus courants (De la Torre *et al.*, 1999).

*Botrytis cinerea* est accompagné en général d'autres champignons sur les baies de raisin. Fleet (2003) rapporte par exemple la présence conjointe des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Celle de *Cladosporium sp.* est également notée par Loureiro-Malfeita (2003). Sur



raisin endommagé, donc pas uniquement botrytisé, les genres *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* (très rare cependant selon Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003) semblent davantage prédominants. La présence de *Hanseniaspora uvarum* et de *Candida stellata* est notée comme un fait majeur accompagnant l'infection de *Botrytis cinerea* (Donèche, 1992 ; Mills *et al.*, 2002 ; Loureiro et Malfeito-Ferreira, 2003). Néanmoins, la microflore des raisins botrytisés est encore plus ou moins méconnue.

Le développement de *Botrytis cinerea* augmente globalement le nombre de micro-organismes à la surface des baies de raisin. Si les levures représentent la grande majorité de ces populations microbiennes, les bactéries sont également représentées et notamment les bactéries acétiques. On trouve surtout le genre *Gluconobacter*, suivi par les espèces *Acetobacter pasteurianus* et *Acetobacter aceti* (Barbe, 2000). Ces bactéries et notamment *Gluconobacter*, qui peut synthétiser le 5-oxofructose (Barbe, 2000) sont, en grande partie, responsables des augmentations de pouvoir de combinaison des baies botrytisées.

#### 1.2.2. Levures (oxydatives, apiculées et fermentaires) et bactéries acétiques du moût botrytisé

La présence de levures telles que *Hanseniaspora uvarum* (anamorphe de *Kloeckera apiculata*) et *Candida stellata* dans le moût issu de raisins botrytisés a été vérifiée depuis longtemps (Donèche, 1992). Ces deux espèces de levures pourraient jouer un rôle d'un point de vue organoleptique. D'après le dosage des produits secondaires de la fermentation alcoolique, elles possèdent un profil similaire, caractérisé par une forte production d'acétoïne et d'acétate d'éthyle, alors que l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* produit davantage d'alcool amylique et de butane-2,3-diol. D'autre part, ces non-*Saccharomyces* interviendraient par le biais d'interactions avec des précurseurs aromatiques du raisin (Romano *et al.*, 2003). Une interaction positive d'ordre organoleptique entre ces espèces et *Saccharomyces cerevisiae* a également été notée par plusieurs auteurs (Herraiz *et al.*, 1990 ; Romano, 2000 ; Jolly *et al.*, 2003).

La levure *Candida stellata* est connue depuis longtemps comme une levure du raisin (Kroemer et Krumbholz, 1931), mais Peynaud et Domercq (1959) montrent qu'elle ne représente que 17,3% des levures présentes sur les raisins botrytisés. Ribéreau-Gayon *et al.* (1975) la considèrent même comme une levure spécifique des raisins pourris. Par ailleurs,

l'utilisation de *Candida stellata* pour un ensemencement des moûts est de plus en plus envisagée. Elle est très rencontrée dans le moût de l'Ontario (Canada), grande région productrice de vins de glace doux (Holloway *et al.*, 1992) grâce à sa tolérance au dioxyde de soufre libre (jusqu'à 50 mg/L) (Moore *et al.*, 1988), à l'éthanol (jusqu'à 10% vol.) (Benda, 1982), et sa production importante de glycérol (Ciani *et al.*, 2000). Pendant la fermentation alcoolique, *Candida stellata* semble diminuer les concentrations en alcools supérieurs, acétate d'isoamyle, caproate d'éthyle, caprylate d'éthyle et caprate d'éthyle (Ferraro *et al.*, 2000). Son emploi a même été envisagé en utilisation conjointe de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* de manière immobilisée, incluses dans des billes d'alginate de sodium (Ciani et Ferraro, 1996 et 1998).

Dans la région de Tokay (Hongrie), une levure osmotolérante et psychrotolérante a été isolée, capable de fermenter les moûts botrytisés : *Candida zemplinina*, une proche parente de *Candida stellata* (Sipiczki, 2003).

Le moût contient également des bactéries acétiques, dont la plus importante en nombre semble être *Gluconobacter oxydans* (Joyeux *et al.*, 1984).

### 1.2.3. Levures de fermentation alcoolique (levures fermentaires)

Dans les moûts liquoreux, la présence de botryticine conduit à une sélection de *Saccharomyces cerevisiae* à la place de *Saccharomyces bayanus* (désormais *Saccharomyces cerevisiae* var. *oviformis*) pourtant plus alcoogène (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1981). En raison de sa tolérance à l'éthanol, à la forte teneur en sucres et de sa capacité fermentaire élevée, *Saccharomyces cerevisiae* prend rapidement le dessus et elle est considérée comme responsable de la réalisation de la fermentation alcoolique (Ribéreau-Gayon, 1985). La présence de *Saccharomyces bayanus* a toutefois été observée dans des vins liquoreux (Naumov *et al.*, 2000 et 2002). Néanmoins, la présence d'autres espèces de levures a été notée : des levures apiculées en début de fermentation, laissant la place au genre *Candida* (notamment à l'espèce *stellata*, dont la survie au cours de la fermentation alcoolique est également affirmée par Fleet *et al.* (1984), Pardo *et al.* (1989) et Mills *et al.* (2002) pour la vinification des moûts botrytisés), *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces bailii* ou encore *Zygosaccharomyces florentinus* (Fleet, 2003). En fin de fermentation alcoolique, Rementeria *et al.* (2003) détectent dans des vins blancs du Pays Basque espagnol la présence

de quelques levures oxydatives telles que *Rhodotorula sp.* ou d'autres espèces telles que *Hanseniaspora uvarum* par exemple.

Concernant les souches de *Saccharomyces cerevisiae*, on peut imaginer une certaine variabilité de souches, comme c'est le cas dans de nombreuses fermentations difficiles (Frezier et Dubourdieu, 1992 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

#### 1.2.4. Et après mutage ?

« Il y a donc toujours des levures vivantes dans les vins, même en présence d'acide sulfureux ». Cette citation extraite du traité d'œnologie de 1960 (Ribéreau-Gayon et Peynaud) montre que ses auteurs relataient déjà d'incidents microbiologiques au cours de l'élevage des vins après mutage.

S'il est vrai que la fonction principale du mutage est de bloquer la fermentation alcoolique et qu'il induit bien l'arrêt de l'activité fermentaire des levures, il semble donc incorrect d'affirmer qu'il les élimine définitivement. L'arrêt de la fermentation alcoolique a pour effet de bloquer la production de dioxyde de carbone par les levures et entraîne donc une sédimentation naturelle de celles-ci au fond des barriques. Elles sont éliminées par des soutirages successifs (et particulièrement par le premier).

La littérature décrit depuis fort longtemps des incidents de nouveaux départs en fermentation au cours de l'élevage ou de la mise en bouteille (Peynaud et Lafourcade, 1952, Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1960). La possibilité de dégradation d'acide sorbique éventuellement ajouté au vin par certaines bactéries lactiques en composé malodorant a également été décrite dans ce type de vin (Crowell and Guymon, 1975). La présence de micro-organismes vivants (levures ou bactéries lactiques) est donc connue depuis longtemps au cours de l'élevage, malgré les fortes teneurs en dioxyde de soufre utilisées. Ribéreau-Gayon et Peynaud (1960) mettent en évidence jusqu'à 72000 cellules/mL (vivantes ou mortes), ce qui est considérable. Néanmoins, les mécanismes de leur survie n'ont jusqu'alors pas été élucidés.

## **2. LA REFERMENTATION, UN ACCIDENT FRUIT D'UNE INSTABILITE MICROBIOLOGIQUE NATURELLE**

« Si le principe sucré prédomine dans le moût sur le principe végétal ou ferment, ce dernier sera tout employé pour ne décomposer qu'une partie du sucre, et le vin conservera nécessairement un goût sucré.

Les vins de cette nature peuvent être conservés sans altération aucune, aussi longtemps qu'on peut le désirer. »

Jean Chaptal (1807)

### 2.1. Qu'est-ce que la refermentation ? Conséquences techniques et économiques

La refermentation est une nouvelle fermentation alcoolique intervenant après l'addition au vin de dioxyde de soufre. Ce phénomène indésirable constitue le problème microbiologique le plus grave des vins liquoreux au cours de l'élevage. Ribéreau-Gayon et Peynaud (1960) proposent de classer ce phénomène à part entière dans les maladies du vin, en raison des conséquences désastreuses engendrées d'un point de vue organoleptique, ce qui sous-entend en général des conséquences commerciales et financières. Ces refermentations se produisent au cours de l'élevage, en barrique la plupart du temps ou en bouteille après mise. Le vinificateur est alerté par un dégagement gazeux ou plus exactement par un pétilllement perçu au moment d'un ouillage. Un certain trouble apparaît en raison de la forte population levurienne présente. Des modifications aromatiques sont notées, apparition d'une odeur oxydée de pomme, d'une odeur de levure et d'une certaine amertume en bouche. Si elle est remarquée rapidement en barrique, les conséquences techniques et financières sont moindres : le vinificateur filtre généralement le vin afin d'éliminer les levures et réajuste la teneur en dioxyde de soufre libre. La filtration, non systématique, est réalisée sur filtres lâches (6-14 µm). Elle est facilitée par un effet tamisage et adsorption sur la plaque de cellulose. L'ajustement en dioxyde de soufre libre s'avère souvent délicat, car le pouvoir de combinaison du vin a subitement augmenté. Si elle survient après mise en bouteille et si les bouteilles sont encore au chai : débouchage des bouteilles, filtration et ajustement du dioxyde de soufre libre sont les opérations réalisées. Si le vin est déjà chez le consommateur, ce phénomène pose un problème d'image du château concerné, avec parfois un retour au château de certains lots. Le vin refermenté n'est pas impropre à la consommation au sens sanitaire du terme, mais sa qualité organoleptique est fortement dépréciée d'où une mévente entraînant des conséquences financières plus ou moins importantes.

## 2.2. Connaissances générales sur la refermentation

### 2.2.1. Etat des connaissances : observations

« La refermentation accidentelle d'un vin sucré est en général une fermentation pure conduite par une seule espèce de levure qui a été sélectionnée par les conditions de la conservation du vin à l'inverse de la première fermentation alcoolique du moût provoquée par un mélange d'espèces de levures. » Cette observation est extraite du traité d'œnologie de 1960. Ses auteurs attribuent 50 % des cas de refermentations à *Saccharomyces cerevisiae*, 35 % à *Zygosaccharomyces bailii* et 15% à *Saccharomyces ludwigii*, la première étant surtout responsable des cas de refermentations des vins à titre alcoométrique volumique élevé.

Les vinificateurs savent, par expérience, que les refermentations se produisent généralement lorsque les températures sont clémentes, au printemps ou à l'automne, en général quelques mois après la fermentation alcoolique initiale. De même, elles se produisent souvent sur des vins difficiles à stabiliser (fort taux de combinaison, pH élevé, vins de lies, vins ayant une concentration en sucres résiduels faible...).

Lorsqu'une refermentation se produit, d'une part les concentrations en éthanal sont toujours très élevées (en général, supérieure à 100 mg/L) et les teneurs en dioxyde de soufre libre très faibles (aux alentours de 10 mg/L voire moins). Le pouvoir de combinaison du vin a fortement progressé. D'autre part, l'acidité volatile a souvent augmenté.

### 2.3.2. Interprétations proposées

#### • Action du dioxyde de soufre sur la levure

Le dioxyde de soufre est utilisé depuis des siècles pour inhiber le développement des micro-organismes. En 1892, Ripper démontrait que le dioxyde de soufre libre est la forme principale qui supprime la croissance des micro-organismes. Cela fût confirmé par Ingram (1948) démontrant que seule la partie libre du dioxyde de soufre des vins avait une action anti-levures. L'effet du pH sur l'action antimicrobienne du dioxyde de soufre a été étudiée par Rahn et Conn en 1944, qui démontraient que le dioxyde de soufre est totalement inefficace à pH neutre. Rehm et Wittmann (1962 et 1963) estiment même que le dioxyde de soufre moléculaire est cent à cinq cents fois plus actif que le dioxyde de soufre sous forme bisulfite.

En 1974, Macris et Markakis, prouvent que seule une petite partie de ce dioxyde de soufre, représenté par sa fraction moléculaire est active. L'entrée du dioxyde de soufre dans la cellule est fonction de la concentration dans le milieu et suit une cinétique qui s'apparente à une cinétique de réaction enzymatique de type Lineweaver-Burk. Ils observent, comme pour une réaction enzymatique un effet marqué de la température, avec un maximum d'incorporation à 50°C. Les pH faibles facilitent l'entrée du dioxyde de soufre dans la cellule car c'est le dioxyde de soufre moléculaire qui est transporté dans la cellule. La cinétique enzymatique de l'entrée du dioxyde de soufre amène à la conclusion d'un transport actif. Cependant, Stratford et Rose (1986) ont plutôt suggéré un transport passif par simple diffusion. La question du mode de transport du dioxyde de soufre dans la cellule reste donc toujours d'actualité. Le pH interne d'une cellule de levure étant d'environ 6 (Polarkis et Barkley, 1965), l'action intracellulaire du dioxyde de soufre ne peut s'opérer que via l'ion sulfite et/ou bisulfite. En fait, la dissociation de  $\text{H}_2\text{SO}_3$  en  $\text{HSO}_3^-$  entraîne une réduction de la concentration intracellulaire en dioxyde de soufre, entraînant ainsi une nouvelle diffusion dans la cellule, jusqu'à ce que les concentrations intra- et extracellulaires s'équilibrent. La cellule agit donc comme un piège à sulfite, entraînant une accumulation intracellulaire de  $\text{HSO}_3^-$  qui peut réagir sur les constituants de la cellule (Gunnison, 1981). Au niveau cellulaire, Schimz (1980) a montré que des cultures sulfitées toléraient le dioxyde de soufre pendant une brève période avant d'être irréversiblement endommagées. Cette période de résistance augmente quand les cellules atteignent la phase stationnaire tardive. De plus, l'action du dioxyde de soufre augmente lorsque la température est élevée. En 1982, Anacleto et van Uden montrent que la mort des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* s'effectue en trois étapes : d'abord, le dioxyde de soufre moléculaire se combine avec des récepteurs à la surface de la cellule. Ensuite, le changement d'activité du complexe récepteur - dioxyde de soufre entraîne des dommages sur la membrane plasmique de la cellule, d'où une perte de viabilité de la cellule. Il existerait deux types de récepteur dont l'un à affinité élevée pour le dioxyde de soufre (protéine membranaire) et l'autre indirectement lié à la mort de la cellule par dénaturation d'une partie de la membrane, ce qui entraînerait une fuite des molécules intracellulaires. La chute de la concentration en adénosine triphosphate dans la cellule lors d'une exposition au dioxyde de soufre a été notée par différents auteurs (Freese *et al.*, 1973 ; Schimz et Holzer, 1979). Schimz (1980) a envisagé une ATPase liée à la membrane qui, en se combinant avec le dioxyde de soufre hydrolyserait l'ATP intracellulaire. La réduction des réserves en ATP de la cellule entraînerait alors la mort de celle-ci. Beech et Thomas (1985)

résumé les actions intra- et extracellulaires du dioxyde de soufre de la manière suivante : limitation des substances nutritives et de l'oxygène, adsorption, peroxydation des lipides, inhibition de la glycolyse, clivage des liaisons disulfidiques des enzymes, destruction de la thiamine, dommages sur les protéines post-structurelles, élimination des intermédiaires des processus physiologiques essentiels, inhibition du métabolisme du soufre, interaction avec des cofacteurs et des vitamines, transformation de l'ADN et de l'ARN, mutations (Dorange et Dupuy, 1972) avec des transitions C-G en A-T (Mukai *et al.*, 1970 ; Hayatsu et Miura, 1970). Au niveau métabolique, le dioxyde de soufre agit en se combinant au glucose et à la dihydroxyacétone-phosphate, au pyruvate et à l'éthanal, à l'acide oxaloacétique et à l'acide alpha-cétoglutarique.

#### • Formation d'éthanal

Bien entendu, les levures adoptent généralement un état de résistance lorsqu'elles sont exposées au dioxyde de soufre. Cet état a été remarqué par Dott et Trüpper (1978). La capacité de résistance de certaines espèces et/ou de certaines souches seraient génétiquement déterminée et transmise aux générations suivantes, même en l'absence de dioxyde de soufre (Beech et Thomas, 1985). Cependant, d'autres auteurs tels que Romano et Tini (1975) pensent qu'elle peut être induite.

La première forme de résistance, remarquée et étudiée dans la littérature, est la production par les cellules de substances capables de combiner le dioxyde de soufre (Weeks, 1969) ; notamment la synthèse d'éthanal (Beech et Thomas, 1985). La capacité des souches de *Saccharomyces cerevisiae* à former de l'éthanal en présence de dioxyde de soufre dans le vin avait déjà été notée par Peynaud et Lafourcade (1952) et par Ribéreau-Gayon et Peynaud (1960). La production d'éthanal par les souches résistantes au dioxyde de soufre de *Saccharomyces cerevisiae* a été vérifiée par Stratford *et al.*, (1987) et confirmée par Casalone *et al.* (1992) que le milieu contienne ou non du dioxyde de soufre. En 2003, Herrero *et al.* ont également constaté le phénomène lors de la fermentation de moût de cidres sulfités.

Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu pour comprendre l'influence de la présence de dioxyde de soufre sur la formation d'éthanal n'ont jamais été décrits dans la littérature. Néanmoins, si la formation d'éthanal par *Saccharomyces cerevisiae* est un processus de défense évident, toutes les différences trouvées entre souches dans la tolérance

au dioxyde de soufre ne s'expliquent pas totalement par la production d'éthanal (Xu *et al.*, 1994). Cette observation a conduit plusieurs auteurs à s'interroger sur l'existence d'autres mécanismes de résistance au dioxyde de soufre.

• **Différences de résistance au dioxyde de soufre : mécanismes moléculaires**

Parmi les mécanismes de défense du dioxyde de soufre, notons la possibilité de consommation du dioxyde de soufre via la sulphite réductase (Thomas *et al.*, 1992).

L'existence d'une activité sulfite-oxydasique a également été décrite chez certains micro-organismes dont *Saccharomyces cerevisiae* (Heimberg *et al.*, 1953). Néanmoins, comme pour la production d'éthanal, ces possibilités de défense n'expliquent pas toutes les différences entre souches (Park et Bakalinsky, 2000).

La résistance des souches de levures au dioxyde de soufre est connue pour être génétiquement déterminée et transmise aux générations suivantes, même en l'absence de dioxyde de soufre (Beech et Thomas, 1985).

Casalone *et al.* (1992) ont réalisé, des croisements entre souches résistantes. Tous les hybrides étant résistants, ils en ont déduit que la résistance au dioxyde de soufre était dominante et ils l'attribuent à un seul gène situé sur le chromosome VII (coordonnées chromosomiques 22304 - 23203, qu'ils identifient puis clonent (Casalone *et al.*, 1994). Ce gène a été appelé *FZFI*. En 1996, Avram et Bakalinsky ont caractérisé ce gène comme codant pour une protéine présentant cinq « doigts » de zinc. Ce gène supprime le phénotype de sensibilité au dioxyde de soufre lorsqu'il est ajouté en multicopie chez des mutants sensibles, notamment ceux déficients dans le gène *GRR1* situé sur le chromosome X (coordonnées chromosomiques 594241 – 590786), dont la fonction est multiple (répression par le glucose, transport du glucose, expression du gène *SUC2*, transport de cation divalent, turnover des cyclines G1, suppression de la mutation *BEM2* influençant la morphologie des cellules). Les mutants  $\Delta GRR1$  sont partiellement déficients dans la formation d'hydrogène sulfide. Leur sensibilité au dioxyde de soufre est notée quel que soit le sucre utilisé pour faire croître les cellules. Ce gène n'est donc pas seulement lié au métabolisme du glucose. Les auteurs pensent que *GRR1* interviendrait indirectement dans la résistance au dioxyde de soufre. La sensibilité de ces mutants  $\Delta GRR1$  au dioxyde de soufre serait une conséquence de l'entrée



déficiente de glucose dans la cellule en définitive. Comme le glucose entre moins vite, la formation d'éthanal est moindre. Il pourrait également y avoir une détérioration des processus dépendant du glucose comme le transport du dioxyde de soufre, ce qui pourrait ralentir une pompe à sulfite ou un passage qui détoxifieraient vis-à-vis des sulfites.

Si le gène *FZF1* introduit chez des mutants  $\Delta GRR1$  supprime la sensibilité au dioxyde de soufre, il ne supprime pas en revanche la morphologie aberrante de ces cellules, la dépression du glucose et la déficience dans la formation d'hydrogène sulfide. En fait, en 1999, Avram *et al.* ont montré que *FZF1* était un facteur de transcription qui activait le promoteur du gène *SSU1* en se fixant sur la zone d'activation [-455 ; -378]. Le premier doigt de zinc de la protéine ainsi que les onze acides aminés N-terminaux seraient indispensables à la fixation de *FZF1*. Ce gène protègerait la région [-442 ; -420] de la digestion de la DNase I lors de l'activation transcriptionnelle.

Le gène *SSU1* est situé sur le chromosome XVI (coordonnées chromosomiques 373788 – 375164). Les levures présentant un phénotype de résistance ont un allèle *SSU1-R* identique à 99,7% avec *SSU1*. La séquence variant est située en amont du gène et provient de la translocation d'une partie proche du télomère du chromosome VIII (Goto-Yamamoto *et al.*, 1998). Par *Northern blot*, ces auteurs ont également montré la présence d'ARNm de *SSU1* / *SSU1-R* en présence ou en absence de dioxyde de soufre dans le milieu ; ce qui révèle une expression constitutive du gène. Selon Avram *et al.* (1999), la forme *SSU1-R* est suractive par rapport à *SSU1* du fait de la multiplicité des sites de combinaison de *FZF1*.

La protéine Ssu1 est une protéine transmembranaire. Par ailleurs, les cellules déficientes en *SSU1* accumulent davantage de dioxyde de soufre. Ces observations ont conduit à penser que la protéine Ssu1 était une « pompe à sulfite » capable d'expulser hors de la cellule les excès de dioxyde de soufre (Avram et Bakalinsky, 1997). Les différents transporteurs multi-drogues connus chez les levures ont tous un site de fixation de l'ATP, ce qui n'est pas le cas pour *SSU1*. Ce transporteur utilise donc l'énergie indirectement pour expulser le dioxyde de soufre à l'extérieur de la cellule.

Notons que la résistance au dioxyde de soufre est souvent accompagnée d'une résistance à d'autres fongicides tels que l'acide sorbique ou l'acide benzoïque (Steels *et al.*,

2000). Warth (1977) avait d'ailleurs déjà émis l'hypothèse de l'existence d'une pompe membranaire énergie dépendante qui permettrait l'expulsion de ces fongicides à l'extérieur de la cellule.

• **Processus général proposé pour expliquer le phénomène de refermentation**

Dès 1952, Peynaud et Lafourcade s'étaient intéressés à l'emploi du dioxyde de soufre dans les vins liquoreux, et notamment aux conditions pour éviter la formation excessive d'éthanal par les levures, qui entraînait non seulement une combinaison du dioxyde de soufre ajouté, mais aussi des refermentations. Après le mutage, la fermentation s'arrête et les levures sédimentent au fond du récipient (barrique ou cuve). Cependant, selon ces auteurs, bien que les doses de dioxyde de soufre empêchent toute activité métabolique « les levures ne sont pas tuées, elles restent plus ou moins actives et cette activité se traduit par une formation d'éthanal. Tout se passe comme si les levures étaient capables de créer ainsi autour d'elles dans le liquide, une zone exempte d'antiseptique dans laquelle elles continuent à se reproduire insensiblement et à fermenter le sucre. La quantité d'éthanal formée donne une image de la sulfito-résistance des levures. Il y a davantage d'éthanal quand le nombre de levures est plus grand et quand le sulfitage a été plus faible et cette formation s'accroît en fonction du temps. (...) Tant qu'il y a des levures vivantes en présence d'acide sulfureux, il y a formation d'éthanal et, par conséquent, combinaison de l'acide sulfureux. Quand on élimine les levures par filtration ou par centrifugation, il n'y a plus de formation d'éthanal ».

Ils expliquent donc les refermentations par la présence de levures qui ne meurent pas après mutage, malgré la pression exercée par le dioxyde de soufre, forment de l'éthanal qui vient combiner le dioxyde de soufre et peuvent ensuite se développer librement. Mais, les conditions de survie des levures ne sont pas expliquées. Il s'agit donc désormais de répondre aux questions suivantes. Comment parviennent-elles à survivre ? Peut-on accepter l'idée d'une zone exempte de dioxyde de soufre dans le vin ? Toutes les espèces (souches) de levures sont-elles capables de survivre ? Pourquoi certains vins refermentent et d'autres pas ?

### 3. LA SURVIE DES MICRO-ORGANISMES EN MILIEU DEFAVORABLE

« Le vin, c'est la vie. »

Horace

#### 3.1. Exemple de survie post-fermentaire et problèmes rencontrés dans le vin (LAB, AAB, Levures). Les différents accidents microbiologiques connus, parfois depuis longtemps.

Les maladies du vin sont connues depuis longtemps. Elles sont toutes d'origine microbiologique (Pasteur, 1866), si on exclut les quelques troubles et précipités d'origine chimique parmi lesquels les casses. Néanmoins, si les symptômes sont connus depuis longtemps et se traduisaient par une consommation rapide ou par une transformation post-fermentaire des vins (ajout d'épices, de miel...), Pasteur (1866) rapporte les recommandations des auteurs géoponiques grecs et romains qui préconisent l'ajout de poix, de résine et d'aromates dans les vins. Les problèmes commerciaux posés par les maladies des vins ont conduit les autorités de l'époque à demander des études sur ces maladies. En 1866, Pasteur révéla leur nature microbiologique. Néanmoins, la solution couramment proposée était alors d'éliminer tout micro-organisme des vins, notamment par chauffage. Pasteur parle également des vins liquoreux et de leur durée de vie : « pour donner de la vigueur à leurs vins, on obtient de très bons effets dans la conservation par l'emploi du sucre. C'est le cas des vins liquoreux dont la conservation est si facile ». Il avait simplement omis les problèmes de refermentations... Les moyens scientifiques dont disposait Pasteur ne lui ont pas permis de mettre en évidence tous les phénomènes, même si ses études marquent le début de l'œnologie moderne et notamment de la microbiologie.

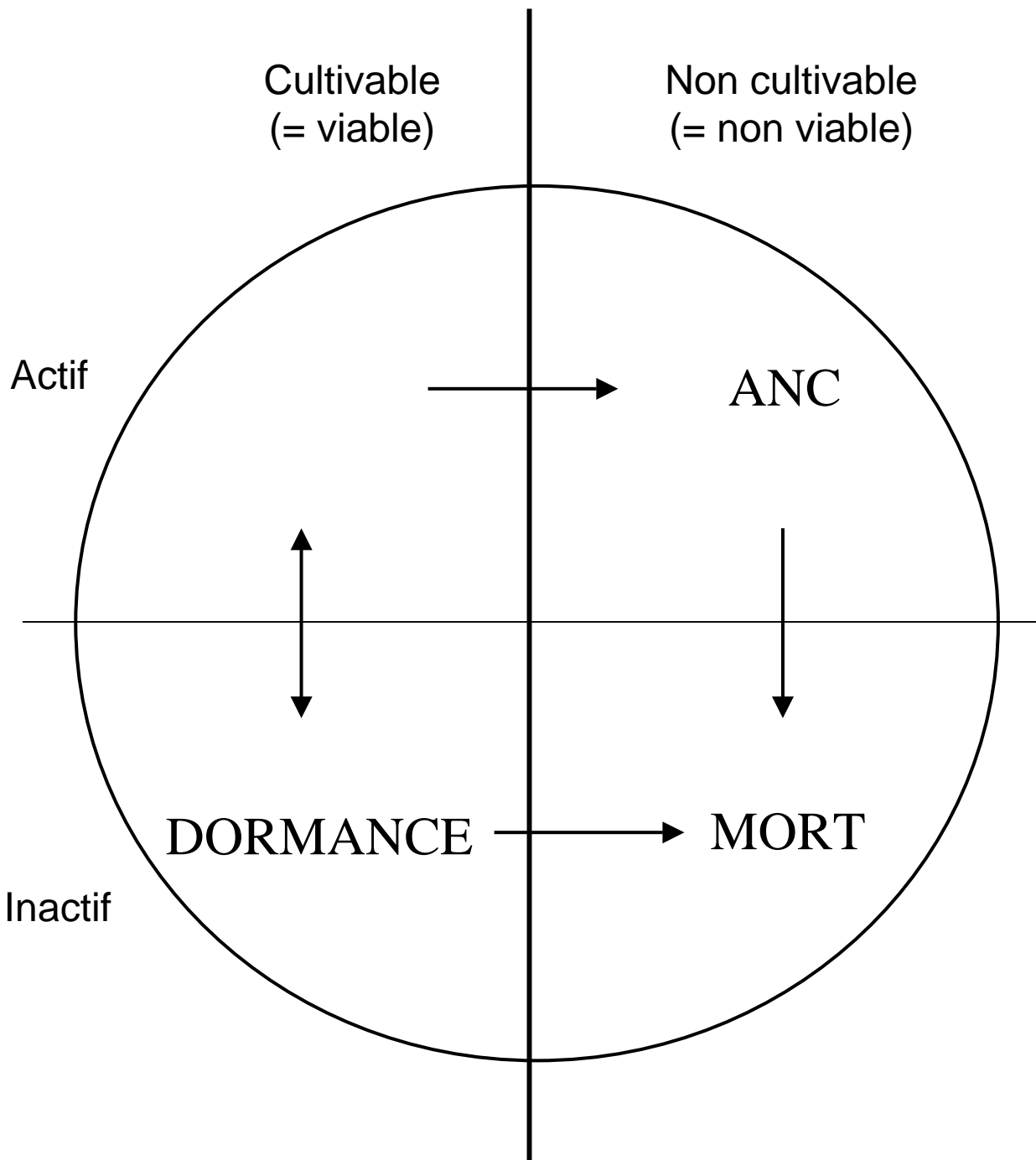
Les différentes maladies des vins se résument en piqûres lactiques et acétiques, maladie de l'amertume (Pasteur, 1866 ; Claisse et Lonvaud-Funel, 2001), maladie de la graisse (Pasteur, 1866 ; Lonvaud-Funel et Joyeux, 1988 ; Gindreau *et al.*, 2001), production d'amines biogènes (Lonvaud-Funel et Joyeux, 1994 ; Lucas et Lonvaud-Funel, 2002, Lucas *et al.*, 2003), de carbamate d'éthyle (Ough *et al.*, 1988 ; Tonon, 2000 ; Divol *et al.*, 2003) et de molécules odorantes désagréables lors de la dégustation du vin telles que les phénols volatils (Heresztyn, 1986 ; Dias *et al.*, 2003).

La plupart de ces maladies apparaissent pendant l'élevage du vin, c'est-à-dire dans un environnement sulfité, semi-anaérobie, souvent en quasi-absence de sucres résiduels ; soit *a priori* dans un milieu de vie très difficile pour des micro-organismes. Pourtant, le vin n'est pas un milieu stérile et on sait désormais qu'il constitue un bon milieu de croissance pour certaines souches de levures ou de bactéries.

### 3.2. Les états de survie des micro-organismes en milieu difficile (viables, blessés, en dormance, VNC, mortes). Notion de stress.

Tout organisme est capable de répondre à des changements de conditions environnementales afin de survivre. Certaines réponses requièrent un réseau complexe de détecteurs et de transduction de signal. L'adaptation est contrôlée par une nouvelle expression des gènes, des activités métaboliques et autres caractéristiques. Lorsque les conditions environnementales menacent leur survie, ou les empêchent de vivre dans des conditions optimales, les cellules peuvent être qualifiées de stressées (Hohmann and Mager, 2003). Cette notion de stress joue un rôle fondamental dans la survie des micro-organismes des aliments. Giraffa (2004) affirme que la capacité des micro-organismes à croître, survivre et avoir une activité métabolique dans les aliments est le résultat de réactions de réponse au stress. En effet, suite à un changement de ses conditions de vie, un micro-organisme se défend. Bien entendu, un stress trop important entraîne la mort de celui-ci. Cependant, entre l'état non stressé et la mort, un certain nombre d'états physiologiques différents peuvent naître. Le passage d'un état physiologique à un autre est conditionné par le degré de stress imposé par les conditions environnementales. Ce degré varie d'un individu à un autre (Booth, 2002). En 1998, Kell *et al.* résument les différents états de vie d'une cellule bactérienne. Il est possible de distinguer les états physiologiques suivants : viable cultivable, blessé, en dormance, actif mais non cultivable, mort.

Le trouble est parfois semé dans l'esprit du microbiologiste par le fait que le milieu étudié peut à un certain moment paraître « stérile » puis révéler une activité microbienne. Cependant, ce phénomène est connu depuis longtemps (van Leeuwenhoek, 1702). En 1753, Henry Baker affirmait déjà : « Life may be suspended and seeming destroyed...and yet, after a long while, life may begin a new... ».



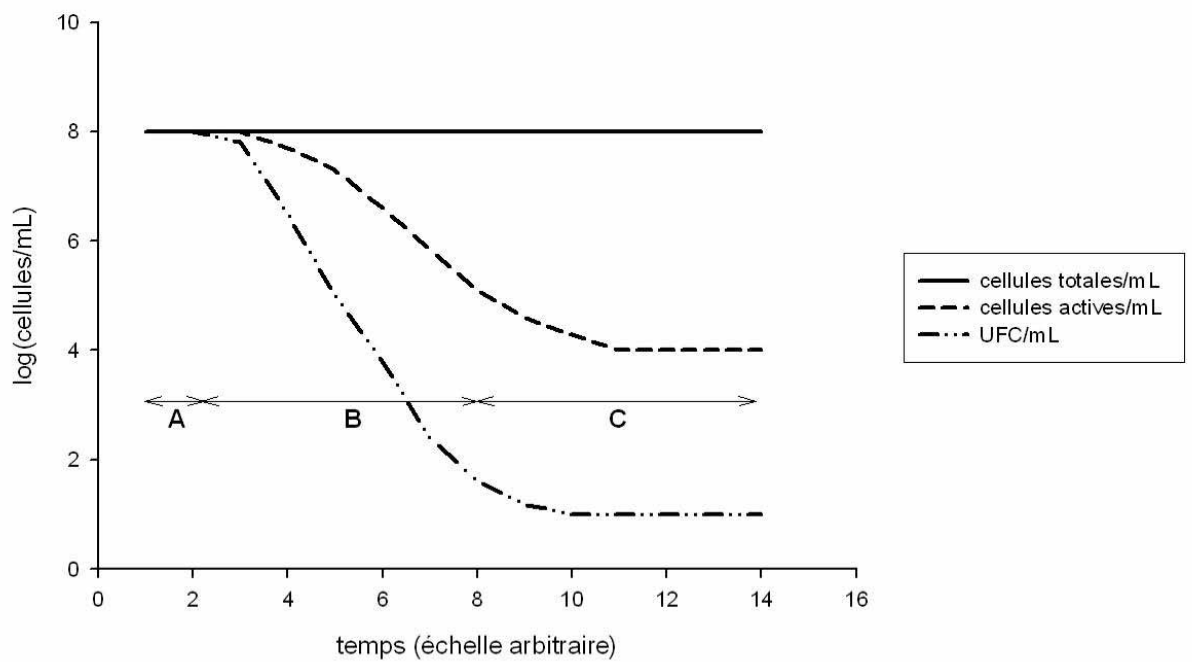
**Figure 2** : Représentation schématisée des différents états physiologiques d'un micro-organisme dans l'hypothèse où cultivable est synonyme de viable, hypothèse qui ne sera pas retenue par la suite. (ANC : Actif mais non cultivable). Selon Kell *et al.* (1998).

Les microbiologistes, malgré les remarques de leurs prédécesseurs, ont longtemps adhéré à la thèse : cultivabilité = viabilité (Postgate, 1969). Au microbiologiste incombe alors la tâche de trouver les conditions optimales de croissance de chaque micro-organisme. Cet axiome peut être schématisé comme le montre la figure 2. La reconnaissance de différences entre cultivabilité et activité d'un organisme a conduit à la proposition de l'existence d'un état viable non cultivable (Xu *et al.*, 1982). Notons qu'une cellule viable non cultivable (VNC) n'est pas une cellule en dormance. Une cellule en état VNC est métaboliquement active, mais non cultivable alors qu'une cellule dormante donne une réponse négative aux essais vitaux mais est pourtant capable d'être cultivée (Kell *et al.*, 1998). Ces définitions ne s'appliquent bien sûr qu'aux micro-organismes que l'on sait cultiver, et non à ceux qui ne sont pas cultivables en laboratoire.

### 3.3. L'état VNC : une réponse physiologique originale. Un concept récent et méconnu.

Le concept d'organisme viable non cultivable n'a été admis par la communauté scientifique que très récemment comme une stratégie de survie (Oliver *et al.*, 1995). Oliver (1993) a très bien défini l'état VNC. Il s'agit de cellules métaboliquement actives mais incapables de réaliser la division cellulaire et donc de croître dans un milieu de culture, en réponse à un stress environnemental. Les facteurs pouvant induire ou influencer l'état VNC sont variés : température (Xu *et al.*, 1982 ; Oliver *et al.*, 1995), âge physiologique de la culture (en phase stationnaire, les cellules mettent deux fois plus de temps pour entrer en état VNC qu'en phase exponentielle), la salinité (Roth, 1988), la nutrition (Oliver, 1989), la lumière et l'aération (Rollins et Colwell, 1986).

L'état VNC est caractérisé par une diminution de la synthèse des macromolécules, une chute de la respiration jusqu'à un niveau indétectable (Morgan *et al.*, 1991), la synthèse de peptidoglycane (Nyström et Kjelleberg, 1989), un changement dans la composition lipidique des membranes (Linder et Oliver, 1989) ainsi que dans la composition des parois cellulaires (McDougald *et al.*, 1998 ; Signoretto *et al.*, 2000) et par une réduction de la taille des cellules, démontrées par de nombreux auteurs dont Rollins et Colwell (1986). Au cours du passage en état VNC, les cellules assurent la maintenance de leur ADN (Lázaro *et al.*, 1999).



**Figure 3 :** Profil d'évolution des populations inoculées dans un milieu ne permettant pas la croissance cellulaire selon les méthodes de dénombrement. A : phase de concordance, B : phase de discordance partielle, C : phase de discordance absolue. Selon Kell *et al.* (1998).

D'un point de vue pratique, l'état VNC ne peut être caractérisé qu'en comparant deux méthodes de dénombrement des micro-organismes, l'une est obligatoirement la culture sur milieu de culture solide permettant de contrôler la cultivabilité, l'autre doit être directe. La figure 3 (Kell *et al.*, 1998) montre bien le type de courbes que l'on doit observer pour valider l'état VNC. La démonstration de l'entrée en VNC implique la succession de trois étapes : une phase de concordance où les deux méthodes donnent des résultats similaires, une phase de discordance partielle que l'on pourrait qualifier d'entrée en VNC, puis une phase de discordance absolue où la population est devenue indénombrable par culture classique (inférieure à 10 UFC/mL).

La possibilité de « résurrection » des levures ayant adopté l'état VNC est une condition *sine qua non* à la validation de l'hypothèse VNC (Oliver, 1993). La sortie de l'état VNC correspond à une inversion des processus métaboliques et physiologiques. Cependant, la sortie de cet état peut être délicate. Ainsi, Besnard *et al.* (2002) définissent les cellules en état VNC comme incapables de croître sur milieu de culture usuel et qui ne peuvent pas ressusciter par les techniques traditionnelles, mais dont l'activité métabolique est détectable. D'autre part, Lleò *et al.* (2001) ont montré que le nombre de cellules que l'on peut ressusciter chute en fonction du délai pour réaliser cette opération.

Il est important de noter que les cellules en état VNC conservent toute leur virulence, en réponse à des stimuli extérieurs tels que la présence de toxines (Rahman *et al.*, 1996). La virulence de certaines bactéries pathogènes pour l'homme est mise en cause dans certaines pathologies : *Vibrio cholerae* et *Campylobacter jejuni* (Lázaro *et al.*, 1999), *Salmonella enterica* (Asakura *et al.*, 2002), *Shyella dysentereriae* (Rahman *et al.*, 1996). Les scientifiques pensent désormais qu'un certain nombre de maladies peuvent être induites par des VNC. Par analogie, les problèmes rencontrés dans le vin, qui ne sont pas d'ordre sanitaire, pourraient être liés à des cellules en état VNC. L'état actuel des connaissances sur le sujet ne permet pas de conclure à la programmation génétique déterminée et régulée de l'entrée dans l'état VNC comme suggérée par certains auteurs (Dow *et al.*, 1983) de façon analogue à la sporulation. Notons que, dans l'impossibilité d'atteindre l'état VNC, certaines bactéries non sporulantes adoptent des programmes différents de maintien de la cultivabilité (Östling *et al.*, 1993).



En œnologie, l'état des connaissances dans ce domaine est très limité. Néanmoins, Millet et Lonvaud-Funel (2000) ont formulé l'hypothèse pour les micro-organismes de vins subissant un élevage de plusieurs mois. Cet état a été révélé pour la plupart des types de micro-organismes trouvés dans le vin : les bactéries lactiques, les bactéries acétiques et les levures. En ce qui concerne les levures, le phénomène d'entrée et de sortie d'un état s'apparentant à l'état VNC bactérien a été mis en évidence pour *Brettanomyces bruxellensis*, l'entrée et la sortie d'un tel état répondant à la concentration en oxygène dissous dans le vin (du Toit *et al.*, 2004). L'état VNC n'avait jusqu'alors été admis que chez les bactéries. Cependant, tous les symptômes décrits par Millet et Lonvaud-Funel (2000) démontrent l'existence d'un état physiologique similaire chez les levures. La diminution de taille par exemple a été démontrée par le fait qu'un petit nombre de cellules était capable de passer au travers d'une membrane de porosité 0,45 µm. En 2001, Millet suggère même à demi-mot la possibilité d'existence d'un état VNC pour expliquer les refermentations dans les vins liquoreux, et en tout cas, pour expliquer l'apparente stérilité du vin avant une nouvelle découverte d'activité microbienne.

Del Mar Lleó *et al.* (2000) avaient déjà suggéré pour *Saccharomyces cerevisiae* l'existence d'un état comparable à celui décrit chez les bactéries. Plus récemment encore, Guillou *et al.* (2003) observent une perte de cultivabilité mais pas de viabilité chez *Saccharomyces cerevisiae*, suite à un choc électrolytique de faible ampérage, décrivant ainsi un état comparable à l'état VNC bactérien. De même, Bleve *et al.* (2003) ont détecté la présence de levures de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* dans les aliments pasteurisés dans un état similaire à celui de VNC. Enfin, lors d'une étude écologique menée en cours de fermentation alcoolique des vins liquoreux, Mills *et al.* (2002) émettent l'hypothèse d'un état VNC après détection de *Candida stellata* par des méthodes excluant la culture préalable des cellules.

#### 4. METHODES D'ETUDES EN ECOLOGIE MICROBIENNE

« Microbial ecology is microbial physiology under the worst possible conditions ».

T.D. Brock, 1966

##### 4.1. Dénombrement des micro-organismes dans le vin

Depuis l'ère de l'œnologie moderne, apparue avec Pasteur (1866), le dénombrement des micro-organismes du vin s'est avéré comme un outil primordial dans la prévention et/ou le traitement des problèmes microbiologiques. De nombreuses méthodes ont vu le jour suite à la constatation suivante : la croissance sur milieu de culture solide ne révèle qu'une petite partie (viable et cultivable) de la microflore réelle d'un écosystème naturel. D'abord parce qu'on ne connaît pas une grande partie des micro-organismes ; *a fortiori* le moyen de les cultiver, ensuite parce que nombreux sont les micro-organismes viables mais non cultivables (Giraffa, 2004). Le dénombrement des levures totales peut être réalisé à l'aide de deux outils principaux : la méthode classique (milieu de culture aspécifique gélosé additionné de chloramphénicol pour inhiber la croissance des bactéries et de biphényl afin de stopper le développement des champignons filamenteux) et des techniques qui permettent de passer outre la cultivabilité des cellules. Citons par exemple la cytométrie de flux (Graça da Silveira *et al.*, 2002), la visualisation des micro-organismes par la méthode FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*) (Beimford *et al.*, 1993), la détection par hybridation *in situ* (Sohier et Lonvaud-Funel, 1998) et séparation immunomagnétique (Duffy *et al.*, 1997).

La technique d'épifluorescence a été développée par Hobbie *et al.* (1977). Depuis, de nombreux applications ont vu le jour notamment dans l'industrie laitière (Pettipher *et al.*, 1983). Cette technique a également été appliquée dans le contrôle des vins dès 1980 par Cootes et Johnson. L'avantage en gain de temps pour le comptage des micro-organismes (quelques minutes contre quelques jours) a inspiré Froudière *et al.* (1990) pour développer cette technique en France. Les micro-organismes sont mis en contact avec un fluorochrome activé par la lumière bleue d'une lampe ultraviolet. Sa fixation provoque une fluorescence verte visualisable au microscope. Le premier fluorochrome utilisé fut l'acridine orange qui a pour propriété d'être métachromatique, c'est-à-dire que sa fixation sur l'ADN révèle une

fluorescence verte et celle sur l'ARN une fluorescence rouge-orangé. Ainsi, les cellules vivantes présentant un fort taux d'ARN apparaissent en orange, alors que les mortes dont le rapport ADN/ARN est élevé sont colorées en vert. Les dangers de l'utilisation de l'acridine orange a conduit au développement d'autres fluorochromes. Ainsi, Millet et Lonvaud-Funel (2000) ont utilisé le diacétate de fluoresceine et Boulos *et al.* (1999) ont testé l'utilisation conjointe de SYTO 9™ et d'iodiure de propidium réunis dans un kit nommé Live/Dead® BacLight™. Dans cette dernière méthode, le premier fluorochrome pénètre dans toutes les cellules et colore les cellules en vert, tandis que le second ne pénètre dans les cellules que lorsque la membrane cellulaire est endommagée (cellules mortes) et les colore alors en rouge.

La comparaison des dénombrements obtenus par la méthode classique et une méthode occultant toute préculture permet le comptage de micro-organismes viables mais pas toujours cultivables.

## 4.2. Méthodes d'identification des levures par biologie moléculaire

### 4.2.1. Bref rappel des différentes techniques connues

L'apparition de la biologie moléculaire a permis de comprendre que les méthodes d'identification des micro-organismes, traditionnellement fondées sur les phénotypes des différents individus (capacité à dégrader tel ou tel substrat) n'étaient pas toujours fiables, car les résultats pouvaient varier dans le temps (perte d'une fonction métabolique, acquisition d'une résistance...). Brock (1987) soulignait, en effet, que les études écologiques, basées sur la culture et les propriétés métaboliques des micro-organismes recueillis d'un milieu donné ne donnaient qu'une pâle idée des populations microbiennes de ce milieu. L'utilisation de la biologie moléculaire est ainsi apparue comme indispensable à une meilleure appréciation des populations microbiennes d'un environnement et les premières études de phylogénie par biologie moléculaire ont été menées par Zuckerlandl et Pauling (1965).

Plusieurs techniques ont donc été développées pour discriminer et/ou identifier les micro-organismes par l'analyse de l'ADN ou d'une partie de celui-ci. Ainsi, l'hybridation ADN/ADN (Vaughan-Martini et Martini, 1985) permet de comparer l'ADN génomique d'une espèce inconnue avec celui d'une espèce connue. En œnologie, elle est appliquée aux bactéries lactiques (Lonvaud-Funel *et al.*, 1991). L'électrophorèse en champ pulsé permet de

comparer les caryotypes des levures (Querol *et al.*, 1992a ; Frezier et Dubourdiou, 1992) et pour les souches de bactéries lactiques du vin, le profil de restriction de leur ADN (Viti *et al.*, 1996). Mais, beaucoup de méthodes dérivent aujourd'hui de la réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction* ou PCR) développée par Saïki *et al.* (1985). La matrice d'ADN bicaténaire est dénaturée à la chaleur, puis des amorces nucléotidiques qui délimitent la portion d'ADN à amplifier sont hybridées. Grâce à la présence dans le mélange réactionnel d'une ADN polymérase tolérant les hautes températures et d'un mélange de désoxyribonucléotides, deux nouveaux brins complémentaires sont synthétisés comme des copies de la matrice initiale. Cette étape est répétée n fois, aboutissant à 2<sup>n</sup> copies de la portion d'ADN délimitée.

Sur cette base, de nombreuses applications ont vu le jour. Des PCR spécifiques d'espèces ont été mises au point (Pearson and McKee, 1992). L'amplification des introns en utilisant des amorces complémentaires aux sites d'épissage a été utilisée pour différencier les espèces de levures (de Barros Lopes *et al.*, 1996 et 1998). La *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) a été développée par Williams *et al.* (1990), puis adaptée par différents auteurs pour différencier les souches de levures (Baleiras Couto *et al.*, 1994 ; Quesada et Cenis, 1995 ; Molnar *et al.*, 1995 ; Baleiras Couto *et al.*, 1995). Cette technique utilise l'existence de courtes répétitions de séquences nucléotidiques dispersées sur le génome des micro-organismes. Une seule amorce est utilisée et la taille de l'élongation est aléatoire. D'autres techniques permettant de réaliser un profil génétique ont été mises au point telles que l'*Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Cette technique est basée sur l'amplification spécifique par PCR de fragments de restrictions issus de la digestion de l'ADN génomique (Vos *et al.*, 1995). Elle a été appliquée aux levures du vin en 1999 par de Barros Lopes *et al.*

Dans la même idée, une PCR a été mise au point pour discriminer les souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est basée sur l'amplification des régions comprises entre les éléments  $\delta$ , portions répétées et mobiles du génome (Ness *et al.*, 1993 ; Masneuf et Dubourdiou, 1994, Legras et Karst, 2003). Ces familles de séquences homologues de 250 pb, décrites par Cameron *et al.* (1979), sont présentes à chaque extrémité des éléments répétés Ty1 (contenus surtout dans les régions codant pour les ARNr et ARNt), et parfois disséminées dans le génome de la levure comme unité simple ou multiple. Il en existerait au moins une

centaine de copies. Certaines portions du génome ont une forte densité d'unités  $\delta$ . Ce sont ces régions qui seront amplifiées dans le cas de la discrimination de souches. Les éléments répétés Ty1 interviennent dans les réarrangements de séquence et les régions  $\delta$  dans les processus de transposition.

La discrimination des souches de *Saccharomyces cerevisiae* peut également être réalisée par caryotypage. Les souches sont différenciées par le nombre, la taille et l'intensité des bandes obtenues, donc par leur profil chromosomique (Veizinh et al., 1990 ; Yamamoto et al., 1991). Les levures du vin de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ont un caryotype assez stable, à l'inverse des levures de boulangerie (Codón et al., 1997).

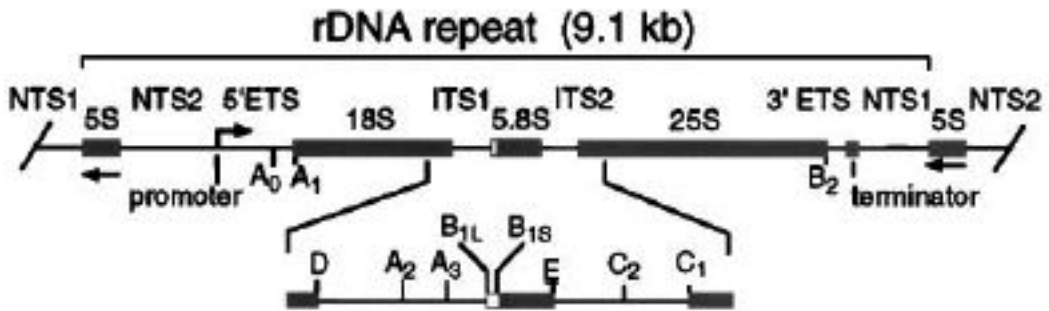
De même, la découverte de courtes séquences, de deux à quatre nucléotides, répétées dans le génome (*short sequence repeat* ou microsatellites) a été utilisée pour discriminer les souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Baleiras Couto et al., 1996 ; Gallego et al., 1998). L'amplification est réalisée en utilisant une seule amorce dont la séquence est souvent le microsatellite répété n fois. Un profil génétique plus ou moins spécifique des souches est obtenu à l'issue de l'amplification. La *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) a également été développée par Botstein et al. (1980). Cette technique permet d'amplifier une région de taille variable chez différentes espèces et de digérer l'amplicon obtenu par différentes enzymes de restriction. En se référant aux tailles des fragments obtenus, on peut identifier un grand nombre d'espèces de levures (Constanti et al., 1998 ; Esteve-Zarzoso et al., 1999 ; Granchi et al., 1999 ; Pramateftaki et al., 2000 ; Morakile et al., 2002 ; Las Heras-Vazquez et al., 2003).

Plus récemment, d'autres techniques sont apparues. Elles sont basées sur l'étude des portions hypervariables des régions d'ADN codant pour les ARN ribosomiques. L'amplification spécifique de ces régions variables, à l'aide d'amorces oligonucléotidiques hybridant dans des zones hautement conservées, conduit à des amplicons de même taille, mais de composition nucléotidique variable. Conduite sur un mélange d'espèces de micro-organismes, on obtient un mélange de différents amplicons. Une électrophorèse particulière les sépare en fonction de leur séquence nucléotidique. Elle se décline en deux techniques proches : la *Thermal Gradient Gel electrophoresis* (TGGE) et la *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE). Cette dernière technique a été décrite pour la première fois par

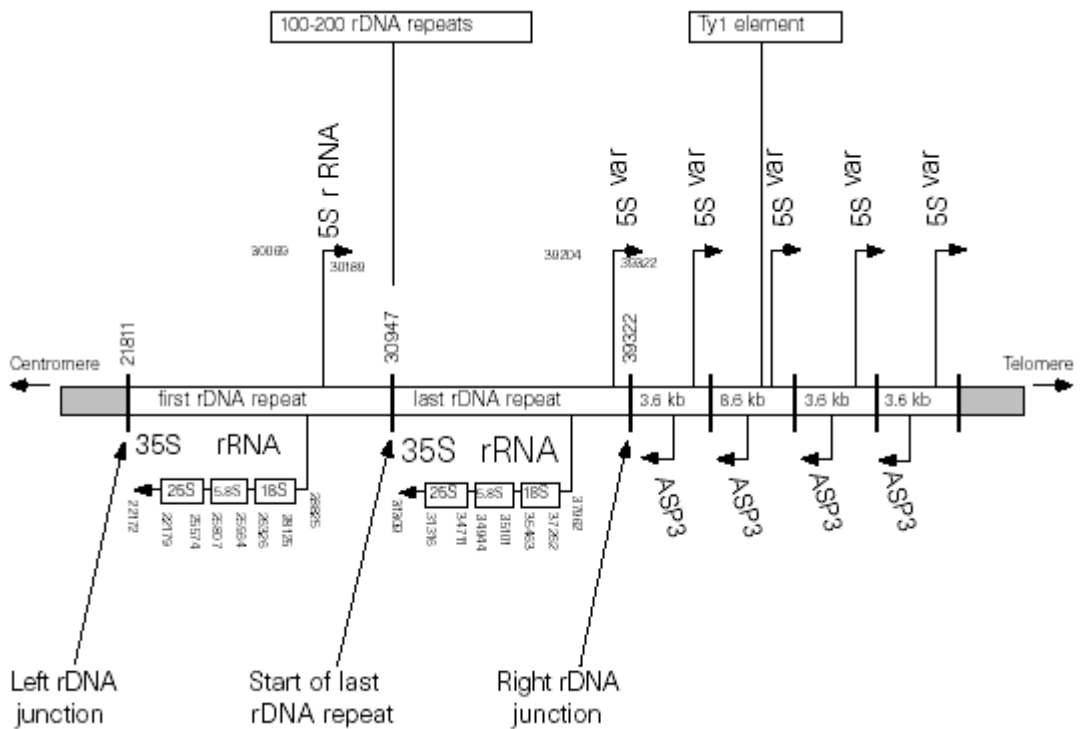
Myers *et al.* (1987), suite aux travaux de Fischer et Lerman (1979). Les ADN migrent dans un gel d'acrylamide et se dénaturent soit en fonction d'un gradient de température (TGGE), soit en fonction d'un gradient chimique d'urée-formamide (DGGE) (Hernan-Gomez *et al.*, 2000). Fernandez-Gonzalez *et al.* (2001) sont parvenus à différencier les espèces de levures du vin en utilisant la TGGE pour la migration des amplicons issus d'une PCR amplifiant une région de l'ARNr 18S. Malgré cette tentative, la DGGE reste bien plus utilisée pour discriminer les espèces de levures d'un écosystème alimentaire naturel (Cocolin *et al.*, 2000, 2001a, 2002a, 2004a, 2004c ; Mills *et al.*, 2002 ; van Beek et Priest, 2002). L'identification des bandes d'un profil peut être réalisée par comparaison de leur hauteur de migration avec celle d'une espèce pure connue et, plus sûrement, par découpage des bandes d'intérêt, réamplification par PCR en utilisant les mêmes amorces et séquençage. La comparaison avec des banques de données permet d'assigner une bande à une espèce (Ferris *et al.*, 1996). La technique est particulièrement performante pour l'étude de la dynamique des populations dans un environnement donné, notamment suite à un stress laissant non cultivables une partie de la microflore. Cependant, la limite de la méthode est l'assignation de bandes particulières à un groupe spécifique de micro-organismes car parfois, des bandes multiples correspondent à ce micro-organisme. La fluctuation des populations ne peut être appréciée, au mieux, que de manière semi-quantitative (Head *et al.*, 1998).

Une autre technique encore plus récente a vu le jour il y a peu de temps. Elle utilise la PCR en temps réel. Grâce à l'utilisation d'une molécule fluorescente capable de se fixer sur l'ADN, on peut observer, en temps réel, l'augmentation de la quantité d'ADN au cours de la PCR. Mais surtout, on peut dénaturer, à l'issue des cycles d'amplification, l'amplicon obtenu, afin de déterminer (par le tracé de l'opposé de la dérivée par rapport à la température de la courbe obtenue) sa température de fusion, fonction de sa composition nucléotidique. Cette technique a été appliquée pour des amplifications spécifiques d'espèces (Phister et Mills, 2003 ; Delaherche *et al.*, 2004), mais aussi sur des amplifications de régions hypervariables comme pour la DGGE (Casey et Dobson, 2004). Cependant, elle possède encore des faiblesses pour les amplifications directes sur mélange.

A



B



#### 4.2.2. Organisation du locus codant pour les ARN ribosomiques chez *Saccharomyces cerevisiae*

La première cible moléculaire dans les études écologiques est constituée par l'ADNr codant pour les ARN ribosomiques. En effet, ces ARNr sont présents chez tous les micro-organismes et présentent la particularité de posséder des régions très conservées entre espèces et des régions hypervariables (Gutell *et al.*, 1994 ; Van de Peer *et al.*, 1996). Les parties hautement conservées permettent l'identification des grands groupes de micro-organismes (eucaryotes, eubactéries, archaebactéries) (Hicks *et al.*, 1992), et les parties hypervariables l'identification d'espèces ou même parfois de sous-espèces (Amann *et al.*, 1995). Plusieurs techniques d'identification des levures sont basées sur l'amplification de certaines régions de l'ADNr. Ces portions du génome sont en effet présentes chez toutes les levures, car elles codent pour des fonctions essentielles de vie et de survie qui seront à la base de la constitution des ribosomes, sièges de la traduction des ARN messagers en protéines. Cet ADN est organisé de manière à contenir tous les ARNr.

L'ARN ribosomique est codé par le locus *RDNI*, une région d'environ 1 à 2 Mb consistant en une répétition de 100 à 200 copies d'une séquence de 9,137 kb, située sur le bras droit du chromosome XII. Le génome de la levure inclut en fait 2 locus *RDN* : *RDNI* et *RDN2*. Chaque répétition de 9,137 kb (figure 4) contient les gènes codant pour les ARNr 5S, 5,8S, 25S et 18S, ainsi que trois types de régions séparatrices de ces gènes nommées *internal transcribed spacers* (*ITS1* et 2), *external transcribed spacers* (*ETS1* et 2) et *nontranscribed spacers* (*NTS1* et 2). Les gènes codant pour le 18S, le 5,8S et le 25S sont transcrits par l'ARN polymérase I en un seul transcrite (35S). Cet ARN pré-messager contient les régions *ITS1* et *ITS2*. La transcription commence à l'extrémité 5'-*ETS1* et se termine à l'extrémité 3'-*ETS2*. L'ARNr 5S est transcrit séparément sur le brin opposé par l'ARN polymérase III.

L'épissage de l'ARN pré-messager 35S se passe dans le nucleolus et débute par le clivage co-transcriptionnel dans la séquence 3'-*ETS2*. Le transcrite est ensuite fortement modifié et rapidement traité. Chaque ARNr est présent en une seule copie dans un ribosome de levure : l'ARNr 18S est un composant de la petite sous-unité ribosomique 40S et les ARNr 25S, 5,8S et 5S sont des composants de la grande sous-unité ribosomique 60S.



La taille de la région englobant le complexe *ITS* et le gène codant pour l'ARNr 5,8S varie de façon importante selon les espèces (Kurtzman, 1992 et 1993 ; Cai *et al.*, 1996 ; James *et al.*, 1996). La méthode d'identification par PCR-RFLP est basée sur cette constatation. D'autres régions des ARNr peuvent également être ciblées en PCR-RFLP pour identifier d'espèces de levures, comme les régions 18 S ou même les régions *NTS* (Capece *et al.*, 2003 ; Caruso *et al.*, 2002).

En définitive, les séquences des régions codant pour les ARN ribosomiques ont un haut polymorphisme interspécifique, mais un faible polymorphisme intraspécifique (Li, 1997). Les ARNr ont permis de différencier les espèces des genres *Saccharomyces* (Huffman *et al.*, 1992 ; Molina *et al.*, 1992 ; Valente *et al.*, 1996 ; Wyder et Puhán, 1997), *Kluyveromyces* (Belloch *et al.*, 1997 et 1998), *Brettanomyces* (Cocolin *et al.*, 2004b), *Zygosaccharomyces* (Stubbs *et al.*, 1994 ; Kurtzman, 2001), *Candida* (de Llanos Frutos, 2004), *Metschnikowia* (Henriques *et al.*, 1991)... Toutefois, selon les souches, des différences importantes existent pour le gène codant pour l'ARNr 25S, et plus particulièrement dans la région hypervariable D1-D2 située à l'extrémité 5' du gène (Peterson et Kurtzman, 1991).

#### 4.2.3. Identification à partir de colonies distinctes (culture pure)

La plupart des identifications sont faites sur des cellules viables et cultivables, après isolement sur milieu de culture solide. La première méthode explicitée ci-après permet d'identifier et de distinguer entre elles les espèces de levures. La seconde permet de discriminer les souches. Mais dans tous les cas, l'identification nécessite la comparaison des résultats à ceux répertoriés dans des bases de données (personnelles ou partagées sur Internet).

- **Au niveau de l'espèce**

Concernant les espèces, une des méthodes couramment employée fait appel à l'amplification de la région *ITS1*-ARNr 5,8S-*ITS2*. Cette région, décrite par White *et al.* (1990) a été choisie pour son haut degré de polymorphisme interspécifique. Cette méthode a été développée suite aux travaux de Kurtzman (1992 et 1993), Cai *et al.* (1996) et James *et al.* (1996), puis exploitée par Guillamón *et al.* (1998), Esteve-Zarzoso *et al.* (1999), Granchi *et al.* (1999) et enfin par Las Heras-Vazquez *et al.* (2003). Elle est basée sur les différences de

taille de cette région selon les espèces de levures. En cas d'égalité dans la taille amplifiée, une digestion enzymatique (RFLP) permet de distinguer des espèces, par leur profil de restrictions sur quelques enzymes. Il s'agit d'une méthode rapide et relativement fiable. Néanmoins, bien que Granchi *et al.* (1999) l'expérimentent sur un mélange d'ADN de levures, elle n'est pas très performante pour identifier un mélange d'espèces. Pourtant, Espinosa *et al.* (2002) ont réussi à appliquer cette méthode sans préculture sur un mélange de souches dans le vin par PCR, découpage des bandes, suivi par une digestion enzymatique sur ces bandes purifiées.

• **Au niveau de la souche**

La méthode de PCR-RFLP ne permet pas de discriminer les souches au sein d'une même espèce, sauf pour *Cryptococcus neoformans* et *Candida krusei* (respectivement Fan *et al.*, 1995 ; Carlotti *et al.*, 1997). D'autres ont donc été développées dans ce but, toutes basées sur l'obtention d'un profil génétique, caractéristique d'une souche donnée. Le caryotype par électrophorèse en champ pulsé (Blondin et Veziñhet, 1988 ; Petering *et al.*, 1988 ; Frezier et Dubourdiou, 1992) et la restriction de l'ADN mitochondrial (Veziñhet *et al.*, 1990 ; Lopes *et al.*, 2002 ; Granchi *et al.*, 2003 ; Querol *et al.*, 1992b ; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2000) ont été, et sont encore, largement utilisées. Leur complexité ou le temps nécessaire pour leur mise en œuvre sont un inconvénient. La RAPD (Quesada et Cenis, 1995 ; Baleiras Couto *et al.*, 1995), la PCR sur les régions inter $\delta$  (Ness *et al.*, 1992 ; Legras et Karst, 2003) et sur les régions microsatellites (Gallego *et al.*, 1998 ; Caruso *et al.*, 2002) sont nettement plus rapides et simples à mettre en œuvre. Mais, la PCR ciblant les régions inter $\delta$  ne peut être utilisée que sur *Saccharomyces cerevisiae*, les autres espèces ne possédant que peu de régions  $\delta$  dans leur génome.

En revanche, l'utilisation des microsatellites convient bien pour l'obtention d'un profil génétique (Tautz, 1989 ; Weising *et al.*, 1995). Les microsatellites sont de courtes répétitions de séquence qui révèlent un niveau de polymorphisme important dans un grand nombre de génomes eucaryotes (Debrauwere *et al.*, 1997 ; Richard *et al.*, 1999). Chez l'homme, les analyses de ces séquences sont à la base des tests de paternité, d'études médico-légales et de structure de populations. Deux types d'analyse peuvent être réalisées. La première consiste à amplifier une répétition en utilisant les amorces bordant cette séquence dont la longueur variera d'une souche à l'autre (Hennequin *et al.*, 2001 ; Gonzalez Techera *et al.*, 2001). La migration des amplifiats sur gel de polyacrylamide, sépare les différents amplifiats à la base

près. L'autre consiste à utiliser la séquence microsatellite en tant qu'amorce unique de la PCR (Lieckfeldt *et al.*, 1993 ; Baleiras Couto *et al.*, 1996 ; Perez *et al.*, 2001 ; Caruso *et al.*, 2002 ; Capece *et al.*, 2003). Elle porte le nom de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)-PCR (Zietkiewicz *et al.*, 1994). On obtient ici des amplifiats de taille variable sous forme de profil par électrophorèse classique sur gel d'agarose.

#### 4.2.4. Identification au niveau de l'espèce à partir d'un échantillon de vin

Les techniques précédemment citées présentent l'inconvénient majeur d'être basées sur l'isolement préalable des individus que l'on veut identifier, en général par culture sur milieu de culture solide et analyse des colonies. Les contraintes décrites au chapitre 3 de cette étude bibliographique ont conduit à envisager de nouvelles techniques permettant de décrire la microflore totale d'un écosystème donné, en s'affranchissant de la culture. En une seule analyse, toutes les espèces contenues dans ce milieu sont révélées.

Les acides nucléiques des micro-organismes du milieu étudié sont extraits directement et servent ensuite de matrice lors de l'amplification par PCR d'une région hypervariable du génome en utilisant des amorces placées dans des régions hautement conservées, bordant les régions de séquences présentant un haut polymorphisme interspécifique. La troisième étape consiste à séparer ces amplifiats de même taille, mais de séquence variable, dans un gel d'acrylamide dénaturant. La dénaturation peut être de nature thermique (*Thermal Gradient Gel Electrophoresis*) ou chimique (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). La TTGE a été appliquée pour discriminer des levures du vin (Hernán-Gómez *et al.*, 2000). Par ailleurs, la DGGE a également été utilisée dans le même but visant les levures ou les bactéries par Cocolin *et al.* (2000 et 2001b), Mills *et al.* (2002), Lopez *et al.* (2003), Enfin, van Beek et Priest (2002) ont utilisé cette méthode pour discriminer les levures du Whisky. Cette technique a été utilisée sur les bactéries et les champignons filamenteux sur des milieux tels que le compost (Marshall *et al.*, 2003 ; Ishii et Takii, 2003), l'intestin humain (Heilig *et al.*, 2002), le fromage (Cocolin *et al.*, 2004a), le lait (Cocolin *et al.*, 2002b) et différents échantillons de nourriture (Cocolin *et al.*, 2002c). La plupart du temps, les régions hypervariables d'une des régions codant pour un ARNr sont amplifiées. Pour les levures, la région D1 de l'ADNr 26S est couramment employée (Mills *et al.*, 2002), la région D1-D2 de ce même ADNr (Cocolin *et al.*, 2002b ; Marshall *et al.*, 2003), ou une région de l'ADNr 18S (Hernán-Gómez *et al.*, 2000 ; Marshall *et al.*, 2003) également.

Pour les bactéries, certains auteurs ont utilisé la région V1 de l'ADNr 16S (Cocolin *et al.*, 2001b ; Cocolin *et al.*, 2004a), la région V3 (Walter *et al.*, 2001), la région V2 (Van Beek

et Priest, 2002), la région V6 à V8 (Lopez *et al.*, 2003) ou des amorces amplifiant le gène codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase (*RPOB*) présent en une seule copie, à l'inverse de l'ARNr 16S (Dallhof *et al.*, 2000 ; Peixoto *et al.*, 2002 ; Taylor *et al.*, 2004). Des amorces spécifiques des bactéries lactiques (Walter *et al.*, 2001 ; Heilig *et al.*, 2002 ; Lopez *et al.*, 2003 ; Meroth *et al.*, 2003) ou encore des amorces spécifiques d'un genre de bactéries (Cocolin *et al.*, 2004a) sont également décrites.

L'utilisation de l'ADN des micro-organismes d'un écosystème naturel présente toujours le risque de révéler des micro-organismes morts. La nécessité d'utiliser les ARN totaux plutôt que les ADN (Sheridan *et al.*, 1998) pour être certain de révéler des micro-organismes actifs (donc vivants) a été comprise et utilisée pour la première fois par Vaitilingem *et al.* (1998) puis reprise par Duineveld *et al.* (2001), van Beek et Priest (2002), Randazzo *et al.* (2002), Mills *et al.* (2002) et Griffiths *et al.* (2003). Del Mar Lleo *et al.* (2000) préconisent d'ailleurs l'utilisation de la RT-PCR-DGGE dans le cadre de l'étude d'une microflore à l'état VNC.

Enfin, l'apparition de la PCR quantitative en temps réel a récemment permis de tenter d'établir un profil écologique d'un milieu donné, soit en ciblant un gène spécifique d'une espèce (Phister et Mills, 2003 ; Delaherche *et al.*, 2004), ce qui permet de révéler la présence de l'espèce choisie et de la quantifier, soit une séquence universelle telle l'ARNr 18S pour identifier n'importe quelle espèce (Casey et Dobson, 2004). Dans ce dernier cas, l'identification est basée sur la mesure de la température de fusion de l'amplifiat, comparée avec celles contenues dans une base de données personnelle contenant les températures de fusion des différentes espèces. Cette méthode très prometteuse pourrait permettre non seulement d'identifier, mais aussi de quantifier les espèces en présence dans un milieu. Malheureusement, cette technique ne fonctionne pas encore bien sur un mélange d'espèce en tout cas pour leur identification. En effet, Bleve *et al.* (2003) ont développé une RT-PCR quantitative basée sur l'amplification de l'ARNm du gène *ACT1* qui permet de quantifier les levures vivantes dans un milieu alimentaire, y compris les viables non-cultivables, puisque Del mar Lleó *et al.* (2000) ont détecté la présence d'ARNm du gène *ACT1* dans des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* dans un état comparable à l'état VNC. Malheureusement, une telle PCR permet seulement de quantifier une contamination microbienne, mais pas d'en identifier les responsables.

## 5. LUTTE CONTRE LES MICRO-ORGANISMES SURVIVANT AU COURS DE L'ELEVAGE

« De là cette conséquence claire et précise qu'il doit suffire, pour prévenir les maladies des vins, de trouver le moyen de détruire la vitalité des germes des parasites qui les constituent, de façon à empêché leur développement ultérieur.

Nous verrons combien il est facile d'atteindre ce but.»

Louis Pasteur

Etudes sur le vin, 1866, p.123

### 5.1. Procédés physiques : soutirage, stabulation à froid, collage, filtration, flash-pasteurisation, mise en bouteille à chaud

L'ajout de produits chimiques tels que le dioxyde de soufre dans le vin doivent être aussi limités que possible, afin de garantir une qualité sanitaire en accord avec la législation ainsi que l'origine naturelle du vin. Cela est d'autant plus vrai pour les vins liquoreux, dont la teneur en dioxyde de soufre est déjà très élevée, notamment dans le cas de moûts et/ou de vins « combinants ». C'est pourquoi, différentes méthodes physiques peuvent être utilisées :

- les ouillages et les soutirages réguliers après sédimentation naturelle (la stabulation à froid accélère le débourbage, mais n'a aucun effet direct sur la viabilité des micro-organismes)
  - le collage entraînant les particules grossières et également des micro-organismes
  - la filtration (sur précouche de diatomées, sur plaques de cellulose, sur membrane ou tangentielle de la moins fine à la plus fine)
  - la centrifugation (de 5000 à 20000 tr/min)
  - la traitement à la chaleur (allant de l'embouteillage à chaud (45°C) à la flash-pasteurisation (90°C), en passant par le chauffage du vin (60°C pendant 1 min) déjà préconisé par Pasteur en 1866)
- les champs électriques pulsés. Leur utilisation est aujourd'hui envisagé pour détruire les micro-organismes du vin et notamment ceux de contamination au cours de l'élevage, mais n'a pas encore été autorisée. Cette dernière méthode n'en est qu'au stade des essais en laboratoire.

Lorsqu'une refermentation est avérée, Ribéreau-Gayon et Peynaud (1960) conseillent aux vinificateurs de filtrer ou de centrifuger les vins. Ils montrent, en effet, qu'un filtrage sur

plaque de celluloses permet d'éliminer 95 % des levures initiales et que la centrifugation en élimine 99,8 %.

## 5.2. Procédés chimiques

### 5.2.1. Les différents fongicides connus et utilisés

Les procédés physiques évoqués dans le paragraphe précédent sont évidemment à préconiser, cependant l'utilisation d'adjuvants chimiques peut parfois s'avérer indispensable.

L'ajout de dioxyde de soufre étant soumis par la législation à une teneur maximale, le vinificateur peut lui adjoindre l'acide sorbique. Les doses nécessaires pour bloquer une fermentation (mutage) sont trop élevées pour être envisageables. Son emploi est donc réservé à la conservation des vins doux, pour éviter les refermentations. Notons toutefois que l'acide sorbique n'a qu'une activité fongicide, son activité bactéricide étant plus réduite, à l'inverse du dioxyde de soufre.

L'inconvénient majeur de cet emploi, par ailleurs assez souvent utilisé dans le Sauternais, consiste en sa dégradation possible par les bactéries lactiques en 2-éthoxy-3,5-hexandiene à forte odeur de géranium, peu appréciée dans le vin (Crowell et Guymon, 1975).

### 5.2.2. Le dioxyde de soufre : efficacité sur les levures

Comme déjà évoqué précédemment, le dioxyde de soufre reste l'élément chimique indispensable à la vinification, surtout celle des vins liquoreux.

Cependant, les levures sont capables de résister au dioxyde de soufre (cf paragraphe 2.3.3.). Cette résistance n'est pas la même selon les espèces et même selon les souches de levures. Ainsi, Beech et Thomas (1985) rapportent que *Saccharomyces ludwigii* et *Zygosaccharomyces bailii* peuvent supporter des concentrations en dioxyde de soufre supérieures à 500 mg/L. Suite à une addition de dioxyde de soufre dans le milieu, cette dernière est capable de survivre sans croissance pendant plusieurs jours pendant lesquels elle forme des molécules combinant le dioxyde de soufre libre. Lorsque la teneur en dioxyde de soufre libre atteint une valeur suffisamment basse, elle reprend sa croissance, mais de façon

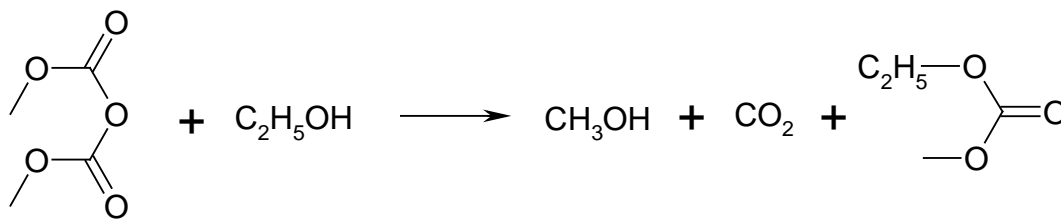
plus lente qu'en présence de dioxyde de soufre. Thomas et Davenport (1985) montrent que *Zygosaccharomyces bailii* peut résister à des concentrations supérieures à 3 mg/L de dioxyde de soufre moléculaire.

D'une manière plus générale, Romano et Suzzi (1992) ont établi la liste des levures de vinification tolérantes au dioxyde de soufre. Ces auteurs considèrent que les levures des genres *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Hansenula* et *Pichia* ne tolèrent pas la présence de dioxyde de soufre, alors que les genres *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Brettanomyces* sont hautement résistants au dioxyde de soufre. Concernant plus particulièrement l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, son comportement varie vis-à-vis du dioxyde de soufre d'une souche à l'autre (Suzzi et Romano, 1982). 80% des souches (étude menée sur 1600 souches) montrent une grande sensibilité au dioxyde de soufre. Mais une étude complémentaire a montré qu'en présence de dioxyde de soufre, une sélection des souches résistantes, ainsi que l'apparition de mutants résistants s'opèrent.

### 5.2.3. Le DMDC

Les inconvénients de l'utilisation exclusive du dioxyde de soufre dans les vins (réglementation internationale induite par des raisons sanitaires) ont conduit de nombreux scientifiques à chercher une nouvelle molécule qui puisse remplacer partiellement le dioxyde de soufre. L'activité fongicide des esters des acides pyrocarboniques est connue depuis longtemps (Boehm et Mehta, 1938). Ils s'agit d'une famille regroupant deux molécules : le diméthylidcarbonate (DMDC) et le diéthylidcarbonate (DEDC). L'utilisation du DEDC a été autorisée aux Etats-Unis à partir de 1963. Genth (1972) a montré que l'efficacité de ces deux fongicides était sensiblement la même. Pourtant, le DEDC a été abandonné depuis 1972 par la Food & Drug Administration, au profit du DMDC, pour éviter la formation de carbamate d'éthyle, car c'est une molécule cancérigène (Schlatter et Lutz, 1990). Lorsque le DMDC est ajouté au vin, il réagit très rapidement avec l'éthanol du vin pour former principalement du méthanol, du dioxyde de carbone, du carbamate de méthyle, plus modérément du carbonate d'éthyle, et quelques dérivés carbométhoxy (Ough, 1975). On peut globalement schématiser cette hydrolyse par la réaction suivante.





Le carbamate de méthyle formé n'est pas cancérigène, contrairement au carbamate d'éthyle. C'est plutôt l'apparition de méthanol qui a longtemps inquiété la communauté scientifique. Cette inquiétude se traduit d'ailleurs toujours à l'heure actuelle par une interdiction d'utilisation du DMDC dans le vin au niveau européen, malgré l'autorisation d'utilisation par l'OIV depuis 2001 (résolution OENO 5/2001). En 1976, Stafford et Ough ont prouvé que la concentration en méthanol formée est proportionnelle à la concentration en DMDC ajoutée, et indépendante du pH et des concentrations en éthanol des vins. Généralement, pour les additions de DMDC préconisées, la concentration de méthanol formée se situe aux alentours de 48,3 mg/L. Les teneurs moyennes des vins sont de 0,1 g/L (Amerine, 1954 ; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982) et le méthanol est toxique pour l'homme à des doses de 340 mg/kg (Anon. Tox. Substances List, 1973). Un homme de 70 kg devrait donc boire 70 L de vin contenant une dose de méthanol de 340 mg/L pour atteindre une dose létale. Par conséquent, l'addition de DMDC dans le vin ne conduit pas à une formation de méthanol significativement toxique pour l'homme (Stafford et Ough, 1976). La teneur maximale autorisée de méthanol dans les vins blancs est de 250 mg/L (résolution OENO 19/2004 de l'OIV)

L'hydrolyse du DMDC est rapide : 1 heure à 30°C et 5 heures à 10°C (Delfini *et al.*, 2002). Après hydrolyse, il est totalement inactif vis-à-vis des micro-organismes. La mort de ces micro-organismes doit donc intervenir avant la fin de l'hydrolyse. Le DMDC est d'autant plus actif que le pH est bas et que la concentration en DMDC et la température sont élevées (Ough et Ingraham, 1961). La présence de dioxyde de soufre dans le vin augmente l'efficacité du DMDC bien que la combinaison de dioxyde de soufre et d'autres fongicides tels que l'acide sorbique réduise l'efficacité de chaque composant individuellement (Terrell *et al.*, 1993). Des effets additionnés entre dioxyde de soufre et DMDC ont également été notés par Ough *et al.* (1988). Genth (1980) rapporte que le DMDC n'interagit pas avec les sucres. Dautt et Ough (1980) ont montré que des concentrations de 50 mg/L de DMDC étaient généralement suffisantes pour stériliser le vin. Cependant, d'après Delfini *et al.* (2002) des doses bien plus élevées seraient nécessaires pour inhiber la croissance de levures dans le moût

comme *Zygosaccharomyces bailii*, pour laquelle il faut atteindre une dose de 400 mg/L pour obtenir un effet notoire. Ces auteurs ont utilisé le DMDC pour décontaminer le moût avant addition de levures sèches actives commerciales et ainsi favoriser l'implantation rapide du levain.

Barbe et Bertrand (2000, communication personnelle) ont testé le DMDC sur le vin botrytisé en tant qu'agent de mutage, en remplacement du dioxyde de soufre. Ils ont confirmé que l'action du DMDC était rapide, mais de courte durée, à l'inverse du dioxyde de soufre dont l'action est progressive, mais durable. Ils ont également conclu que l'addition de DMDC et de dioxyde de soufre simultanément était la solution la plus efficace pour stopper la fermentation alcoolique des vins liquoreux. Threlfall et Morris (2002) ont comparé la capacité du DMDC et du dioxyde de soufre à prévenir la refermentation après contamination du vin par *Saccharomyces bayanus*. Ils concluent que le DMDC est très efficace seul à partir de 100 mg/L, et à partir de 50 mg/L en addition avec du dioxyde de soufre.

**DEUXIEME PARTIE**

**MATERIELS ET METHODES**

**Tableau I** : Souches de levures commerciales de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* utilisées.  
N.C. : non communiqué (CLIB : Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique, INRA et INA-PG, Thivernal Grignon, France ; .AWRI : Australian Wine Research Institute, Glen Osmond, Australie ; CBS : Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft, Pays-Bas ; IOEB : Institut d'Enologie de Bordeaux, Talence, France).

<b>Espèce</b>	<b>Distributeur</b>	<b>Intitulé commercial</b>	<b>Souche</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort oenologie	ZymafloreST	CLIB 2026
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Burns Philp	UCD 522	522D
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Groupe ment des laboratoires oenologiques	Levuline BRG	UP30Y5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lallemand	Maurivin PDM	EC1118
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spindal	Fermol Aromatic	PB2540
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spindal	Fermol Arôme Plus	PB2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CHR. HANSEN	CH001 Noble	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Predel	Canadivin Primeur	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Predel	AWRI 796	AWRI 796
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort oenologie	Actiflore bayanus	B0213
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Predel	Maurivin B	AWRI B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Predel	Canadivin Cru Blanc	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lallemand	43	L43
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Exc C1	C1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spindal	Zymasil Bayanus	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Zymaflore F10	F10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gist Brocades	Enolevure SP rouge	7303
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin	Bourgorouge RC212	212R1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Zymaflore VL1	VL1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lalvin	L2056	Rhone 2056
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spindal	PB2033	PB2033
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Actiflore VB killer	MON86
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Uvaline Arome	LO122
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Exc B2	VL2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	BM45	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spindal	Fermol 1 <sup>er</sup> cru	PB2031
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Actiflore primeur	71B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	VL3	VL3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Burns Philp	Maurivin AWRI R2	AWRI R2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Actiflore C	F33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	F33	F33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Burns Philp	Canadivin primeur	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Actiflore RB2	F1515
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Exc SP	SP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenofrance	Levuline Killer	GLO522K

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Actiflore PM	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenofrance	Levuline Primeur	GLO7447
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenofrance	Fermol Chardonnay	PB2585
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Burns Philp	Maurivin AWRI B50	AWRI B50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Spindal	Fermol Sauvignon	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	Exc XR	XR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gist Brocades	Fermiblanc Arome	N.C.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	F15	F15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laffort	VL3c	IOEB VL3c

**Tableau II** : Autres souches de levures utilisées.

<i>Botrytis cinerea</i>	IOEB	01BRS206	Isolé sur raisins pourris nobles à Sauternes.
<i>Candida boidinii</i>	IOEB	L0402	Château M – Vin de goutte 2003 (CS)
<i>Candida cantarelli</i>	IOEB	L0403	Château M – Vin de goutte 2003 (CS)
<i>Candida stellata</i>	IOEB	L0311	Isolée dans moût de Sauternes.
<i>Candida stellata</i>	CBS	2649	
<i>Cryptococcus albidus</i>	CLIB	373	Russie
<i>Debaromyces hansenii</i>	CLIB	236	Fromage Roncal en Espagne
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CLIB	300	Bière (Belgique)
<i>Hanseniaspora sp.</i>	IOEB	L0413	Château A – moût 2003
<i>Hanseniaspora sp.</i>	IOEB	L0414	Château A – moût 2003
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	IOEB	L0401	Isolée dans moût de Sauternes
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CLIB	303	Raisin muscat en Ukraine
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	CBS	5914	
Hybride <i>cerevisiae</i> × <i>uvarum</i>	IOEB	14a	
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	CLIB	292	Confiture de mirabelle en Russie
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	CLIB	403	datte en Egypte
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	IOEB	L0313	Château G – 2003
<i>Pichia anomala</i>	IOEB	L0426	Château M – Vin de goutte 2003 (CS)
<i>Pichia anomala</i>	CLIB	284	Etats-Unis
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLIB	370	Russie
<i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>uvarum</i>	CBS	7001	
<i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>uvarum</i>	IOEB	P3	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	L0431	Levure de refermentation isolée à Sauternes. Château TB – 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	L0432	Levure de refermentation isolée à Sauternes. Château Y – 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	L0433	Levure de refermentation isolée à Sauternes. Château G

# DEUXIEME PARTIE

## MATERIELS ET METHODES

### 1. MATERIEL BIOLOGIQUE ET METHODES DE CULTURE

#### 1.1. Matériel biologique

Les différentes souches de levures de collection utilisées dans la présente étude sont résumées dans les tableaux I (souches de *Saccharomyces cerevisiae* commercialisées) et II (autres souches et espèces de levures de collection).

De nombreux prélèvements ont été réalisés dans six châteaux comptant parmi les grands crus classés de Sauternes et Barsac, à différents stades de la vinification. Tous les prélèvements ont été effectués toujours dans des barriques à l'aide de pipettes stériles dans des tubes stériles. La hauteur de prélèvement correspond à la hauteur de la pipette. Par conséquent, les prélèvements ont eu lieu sensiblement au centre de la barrique. Certains clones ont été isolés et mis en collection. Ils figurent dans le tableau II.

#### 1.2. Milieux de culture des levures

Le milieu de culture le plus couramment utilisé aussi bien en milieu liquide qu'en milieu solide, est le YPG, dont la composition est donnée dans le tableau III. Le pH du milieu a toujours été ajusté à 5. Pour certaines expériences, le pH a été abaissé à 3,9 afin de mimer le pH d'un vin liquoreux de la région de Sauternes.

Dans le cas d'isolement de levures à partir du vin, des antibiotiques ont été ajoutés afin d'inhiber le développement d'autres types de micro-organismes. Ainsi, du Biphenyl (0,015% dilué dans l'éthanol) a été additionné pour prévenir le développement de champignons filamenteux, et du chloramphenicol (0,01% dilué dans l'éthanol) a été ajouté pour inhiber le développement des bactéries. Les boîtes de Petri sont incubées entre 3 et 10 jours à 25°C selon les espèces de levures et le stade de la vinification.

			- 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	L0440	Levure indigène isolée en cours de fermentation alcoolique à Sauternes (Château Y - 2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	L0441	Levure indigène isolée en cours de fermentation alcoolique à Sauternes (Château Y - 2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	L0437	levure de voile isolée sur vin rouge à Bordeaux en 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	L0439	levure isolée de refermentation d'un vin blanc additionné de moût concentré rectifié.
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	IOEB	L0312	Château G – 2003
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CLIB	833	Pologne
<i>Trichosporon sp.</i>	IOEB	L0421	Château CB – Vin de goutte 2003 (CF)
<i>Trigonopsis variabilis</i>	IOEB	L0408	Château M – Vin de goutte 2003 (CS)
<i>Zygoascus hellenicus</i>	IOEB	L0405	Château M – Vin de goutte 2003 (M)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CLIB	213	Bière au Japon
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IOEB	L0310	Château G – 2002
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	CBS	680	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IOEB	L0444	Château Y - 2002
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CLIB	233	Sauce de soja au Japon
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IOEB	L0314	Château Y – 2002
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	CBS	4021	



Pour certaines études, du jus de raisin blanc commercial a été utilisé additionné ou non de glucose et de fructose.

Pour faire sporuler les levures, un milieu ACK solide a été utilisé. Il s'agit d'acétate de potassium (10 g/L) et d'agar (20 g/L). Les levures sous forme de colonies fraîches (24 heures sur YPG solide) sont étalées grossièrement sur milieu ACK solide. Elles sont incubées 3 jours minimum à 30°C. L'observation d'asques est aisée au microscope.

### 1.3. Autoclavage et filtration

La stérilisation des instruments utilisés et des milieux de culture élaborés a été réalisée, dans la majeure partie des cas par autoclavage. Le temps de stérilisation est de 15 minutes à 1 bar de pression et une température de 120°C.

Pour les milieux trop sucrés (au delà de 20 g/L de sucres), la stérilisation par autoclave n'est plus possible en raison de la caramélisation qui se produit. Une filtration sur membrane dont les pores ont un diamètre de 0,45 µm a donc remplacé l'autoclavage.

Par ailleurs, pour certaines expériences, des filtres possédant des pores de 1,2 µm, 0,8 µm et 0,2 µm ont pu être utilisés.

## **2. TECHNIQUES D'EPIFLUORESCENCE ENVISAGEES**

### 2.1. Méthode Chemunex

La méthode que nous avons utilisée le plus couramment a été mise au point par la société Chemunex (Ivry-sur-Seine, France) et plus ou moins adaptée pour son utilisation dans le laboratoire. Elle consiste à retenir par filtration les micro-organismes du vin sur une membrane dont les pores ont un diamètre de 0,4 µm (Chemfilter CB04). Le volume de vin non dilué filtrable est en général de 1 mL, compte tenu de la viscosité importante du type de vin étudié. Les cellules retenues à la surface du filtre sont ensuite incubées en présence de 5,5 µL d'acétate de fluoresceine (ChemChrome V6) et de 550 µL d'un tampon de réaction (ChemSol B16). Le mélange réactionnel (tampon et substrat) parvient aux levures par capillarité au travers de la membrane, puis diffuse dans les cellules. Les cellules vivantes, possédant une activité enzymatique, hydrolysent ce substrat en fluoresceine, molécule fluorescente sous ultraviolets. Après action de l'acétate de fluoresceine pendant 30 min à 30°C dans le noir, la membrane, placée entre lame et lamelle, est observée au microscope

**Tableau III** : Description du milieu de culture YPG

<b>Composés</b>	<b>Concentration (g/L)</b>
Extrait de levure	10
Bactopeptone	10
Glucose	20
Agar (optionnel : pour milieu solide)	30
pH ajusté à 5,0	

Olympus (Rungis, France) BX51, en utilisant un grossissement de 1000 et un éclairage aux ultraviolets, générés par une lampe au mercure au travers d'un filtre vert interférentiel (Olympus, ref. 467803) (excitation à 480 nm et émission à 515 nm).

Cette technique permet de compter les cellules vivantes à la surface de la membrane. Le comptage des micro-organismes est facilité par la connaissance du nombre de champs par membrane (15625). Les résultats des dénombrements sont issus de la moyenne des dénombrements sur plusieurs champs.

Nombre de cellules vivantes = moyenne  $\times$  15625  $\times$  dilution éventuelle.

## 2.2. Observation et analyse d'image (taille et intensité de fluorescence des cellules)

Le logiciel Olympus-DP-Soft permet non seulement de recueillir des photos des champs observés via un appareil photographique numérique, mais également d'analyser les images obtenues. Le comptage des micro-organismes est assisté et l'intensité de fluorescence peut être mesurée, ainsi que la taille des cellules observées, après calibrage du logiciel. L'intensité de fluorescence du bruit de fond est retranchée de celle des cellules afin de pouvoir comparer les images entre elles. En effet, plus la fluorescence des cellules diminue, plus celle du fond augmente. Il est donc nécessaire de normaliser les mesures.

## 2.3. Méthode Live/Dead (Molecular Probes)

Une autre méthode d'observation des micro-organismes par épifluorescence a été utilisée. Elle a été mise au point par Molecular Probes (Leiden, Pays-Bas) et commercialisée sous le nom de Live-Dead® Yeast Viability Kit. Le principe a été analysé et validé par Boulos *et al.* (1999) en ce qui concerne le kit équivalent pour l'observation des bactéries. Un échantillon de 10 mL de vin est centrifugé à 5300 g pendant 5 min. Le culot de cellules repris dans 1 mL de tampon Glucose-Hepes (2% Glucose-10 mM Na-Hepes pH = 7,2). Une nouvelle centrifugation à 10.000 g pendant 5 min permet de récupérer les cellules lavées. Celles-ci sont reprises dans 1 mL du même tampon Glucose-Hepes. 1  $\mu$ L de solution Fun 1® est ajouté. L'incubation se déroule à l'obscurité pendant 30 min à 30°C. Un volume de 10  $\mu$ L de cette solution est placé entre lame et lamelle et observé au microscope sous épifluorescence. L'observation est réalisée au microscope au grossissement de 1000 sous

ultraviolets générés par une lampe à mercure au travers d'un filtre interférentiel à triple bande (Olympus, ref E0197412) (excitation à 480 nm et émission supérieure à 530 nm) adaptée pour les fluorochromes suivants : 4,6-diamidino-2-phényl-indole HCl (DAPI), fluorescein-isocyanate (FITC) et Tetramethylrhodamine-isothiocyanate (TRITC).

Les levures vivantes apparaissent en vert, les mortes en rouge.

### 3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### 3.1. Extraction des acides nucléiques des levures et préparation pour analyse ultérieure

L'extraction des acides nucléiques des levures a été réalisée à partir des cultures en milieu liquide (YPG ou jus de raisin) ou directement du vin sans culture préalable selon les expérimentations mises en œuvre. L'extraction directe à partir de vin a été facilitée par le fait que le vin considéré dans cette étude est blanc, donc contenant des teneurs en polyphénols faibles. En revanche, la présence de polysaccharides (notamment ceux synthétisés par *Botrytis cinerea* sur le raisin) a nécessité une purification systématique après extraction.

##### 3.1.1. Extraction des ADN génomiques de levures et purification

L'ADN a été extrait selon la méthode d'Ausubel *et al.* (1995) adaptée. On obtient ainsi l'ADN en mélange de tous les micro-organismes du vin. 10 mL de vin sont centrifugés à 5300 g pendant 5 min. Le culot de cellules récupéré est repris dans un tampon de lyse (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) et 200 µL de billes de verre (0,4 mm de diamètre) sont ajoutés ainsi que 200 µL d'un mélange phenol / chloroform / isoamyllic acid (25:24:1). Le tube est agité au vortex horizontalement (à l'aide d'un plateau librement adaptable) pendant 3 min puis 200 µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) sont ajoutés. Une centrifugation de 3 min à 16400 g est réalisée. 1 mL d'éthanol absolu est ajouté au surnageant. La mixtion est réalisée par retournements du tube. Une centrifugation à 16400 g pendant 5 min suit. Le culot est resuspendu dans 400 µL de TE et 1 µL de RNase (RnaseA, DNase free, QBiogene) est ajouté. La dégradation enzymatique des ARN s'effectue pendant 5 min à 37°C. 40 µL d'acétate de sodium et 1 mL d'éthanol absolu sont ajoutés. Le tube est mélangé par inversion puis centrifugé pendant 3 min à 16400

g. Le culot d'ADN est séché sous vide pendant 15 min puis resuspendu dans de l'eau pour préparation injectable (ppi) stérile.

L'ADN a ensuite été purifié grâce au GeneClean kit de Qbiogene en suivant les instructions du fabricant.

### 3.1.2. Extraction de l'ADN des levures présentes à la surface des baies de raisin

La première étape consiste à recueillir les levures présentes à la surface des baies de raisin sain ou botrytisé. 50 baies de raisin entières sont placées dans un volume d'eau physiologique (NaCl 0,9% (v/v)) additionnée de tween 80 (1% v/v). Elles sont mises en agitation lente pendant 2 heures à 25°C. Le surnageant est recueilli et un échantillon de 10 mL est centrifugé 10 min à 5300 g afin de recueillir les levures. L'extraction d'ADN est ensuite réalisée selon la méthode indiquée au paragraphe précédent avec un ajout de 1 µL de CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) 10% lors du broyage mécanique des cellules afin de complexer les polysaccharides de *Botrytis cinerea* pour les éliminer lors de la centrifugation suivant ce broyage. D'autre part, les ADN sont précipités, en fin d'extraction par ajout de 240 µL d'isopropanol en remplacement du mélange acétate de sodium / éthanol afin de limiter la précipitation des polysaccharides.

### 3.1.3. Extraction d'ADN du champignon *Botrytis cinerea*

La méthode choisie est celle préconisée par Möller *et al.* (1992). A partir d'une culture de *Botrytis cinerea* sur milieu solide Potato Dextrose Agar (PDA) contenant 39 g/L de Potato Dextrose Broth (PDB) et 10 mg/L d'agar), 10 mL d'eau stérile sont ajoutés à la surface de la boîte de Petri et le mycélium est récupéré en raclant à l'aide d'un râteau de verre stérile. 8 mL servent à ensemencer un erlenmeyer contenant 20 mL de milieu liquide PDB. Après quelques jours, le mycélium est prélevé puis lavé avec 5 volumes d'eau stérile. Après centrifugation 5 minutes à 10000 g, le mycélium est à nouveau lavé une fois. Après une nouvelle centrifugation identique, l'eau est éliminée et le mycélium est congelé à -80°C. Celui-ci est ensuite lyophilisé pendant une nuit.

Le mycélium lyophilisé est réduit en poudre grâce à un cône. 5 mL de tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM EDTA, 2% (v/v) SDS) sont ajoutés et mélangés au vortex. Après une heure d'incubation à 60°C, avec des agitations de temps à autre, la concentration en sel est ajusté à 1,4M par ajout de 1,4 mL de chlorure de sodium 5M. 65 µL de CTAB 10% (v/v) sont ajoutés. Après mélange au vortex, une incubation de 10 min à 65°C est réalisée. 7 mL de phénol/chlorophorme/alcool isoamylique (25 :24 :1) sont ajoutés. Suivent une émulsion par inversion du tube et une incubation de 30 min dans la glace. Après centrifugation de 10 min à 10000 g, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et l'ADN est précipité par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu et un dixième de volume d'acétate de sodium 3M. Une incubation de 30 minutes à -20°C est réalisée et l'ADN est récupéré sous forme de culot par centrifugation de 30 minutes à 10000 g. Cet ADN est lavé avec 5 mL d'éthanol 70% (v/v) et centrifugé à nouveau 10 minutes à 10000 g. Le culot est séché sous vide et suspendu dans 1 mL de TE additionné de 2 µL de RNase.

#### 3.1.4. Conservation des acides nucléiques

Pour certaines applications, le kit FTA® Starter Pack (Whatman) a été utilisé. Il s'agit de cartes sur lesquelles sont déposées une petite quantité d'extrait d'ADN en solution dans l'eau sous forme de spots. Des poinçons sont découpés dans la carte et utilisés pour amplification par PCR.

Des cellules entières peuvent également être utilisées directement, sans extraction d'ADN. Une colonie fraîche peut ainsi être dissoute dans 20 µL d'eau et 5 µL sont déposés sur la carte. A partir d'une culture liquide, 1 mL est centrifugé et lavé une fois dans l'eau. Le culot de cellules est alors repris dans 20 µL d'eau et 5 µL sont déposés sur la carte. 1 heure de séchage est nécessaire avant utilisation.

Les poinçons contenant les cellules entières sont lavés dans 200 µL de réactif de purification FTA sous agitation par retournement pendant 5 minutes, puis dans 200 µL de TE sans agitation encore 5 minutes. Les poinçons sont ensuite séchés 10 minutes à 65°C. Ils sont prêts pour utilisation en PCR. Le tampon de réaction est alors ajouté directement sur les poinçons secs.

Les ADN ou cellules entières déposées sur ces cartes peuvent être conservés plusieurs mois après dessiccation.

### 3.1.5. Extraction des ARN totaux de levures, purification et rétro-transcription

L'extraction des ARN totaux est délicate. Toutes les manipulations s'effectuent à l'aide de gants afin d'éviter une mise en contact des ARN extraits avec d'éventuelles RNases présentes inévitablement à la surface de la peau. De plus, toute suspension ou dilution dans l'eau est réalisée à l'aide d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC). La préparation de cette eau est réalisée par ajout de 1 mL de DEPC dans 1L d'eau. La dissolution se réalise par agitation toute une nuit. Le lendemain, le flacon est autoclavé. Par ailleurs, les ARN sont maintenus autant que possible à basse température (dans la glace).

L'ARN total des levures a été extrait en utilisant le FastRNA<sup>®</sup> Pro Red Kit (Qbiogene). 10 mL de vin ou de milieu de culture sont centrifugés pendant 5 min à 5300 g. Le culot de cellules est lavé une fois avec de l'eau traitée au diéthyle pyrocarbonate (DEPC) puis centrifugé à 10000 g pendant 5 min. Le culot de cellules est suspendu dans 1 ml de RNApro (Qbiogene) ou de Tri Reagent (Sigma) et placé dans un tube contenant 0,2 mL de billes de verre de 0,4 mm de diamètre préalablement autoclavés. Un traitement de lyse est ensuite réalisé en utilisant le FastPrep<sup>®</sup> FP120A (QBiogene) par deux cycles de 45 s d'agitation à la vitesse de 6,5 m/s alternés par un passage dans la glace de 5 min. Les débris de cellules sont éliminés par centrifugation pendant 5 min à 14000 g à 4°C. Au surnageant, transféré dans un nouveau microtube, est ajouté 300 µL de chloroforme. Le mélange est assuré par agitation au vortex pendant 10 s puis les deux phases sont séparées par centrifugation à 4°C à 13000 g pendant 5 min. Le surnageant est transféré dans un nouveau microtube et 500 µL d'éthanol absolu conservé à -20°C sont ajoutés. Le contenu du tube est mélangé par 5 inversions et incubé à -20°C pendant au moins 30 min. La précipitation des ARN est assurée par centrifugation à 14000 g à 4°C pendant 15 min. Un lavage des ARN est réalisé par ajout d'éthanol 75 % (dilué dans de l'eau traitée au DEPC) sans resuspension du culot. Cet éthanol est éliminé après centrifugation à 14000 g à 4°C pendant 5 min. Le culot d'ARN est ensuite séché sous vide pendant 5 min. Les ARN ainsi extraits sont repris dans de l'eau traitée au DEPC (le volume d'eau est apprécié au moment de l'extraction selon la taille du culot et peut varier de 20 à 100 µL).

Les contaminations en ADN sont éliminées en utilisant le kit DNA-free (Ambion Inc, Austin, TX, USA). Un volume d'ARN, contenant au maximum 10 µg d'ARN, est ajouté dans un microtube de 0,5 mL à 5 µL de tampon de réaction, 0,5 µL de DNase I et d'eau dépourvue de RNase qsp 50 µL. Une première incubation est réalisée à 37°C pendant 30 min dans un thermocycler. 0,5 µL de DNase I est à nouveau ajouté et une nouvelle incubation identique à la première est réalisée. Puis 5 µL de réactif d'inactivation sont ajoutés et une incubation de 2 minutes à température ambiante est réalisée. Après une centrifugation à 10000 g pendant 1 minute, le surnageant est récupéré et placé dans la glace dans un nouveau microtube. L'absence de contamination en ADN est vérifiée par PCR directement sur les ARN (les conditions de PCR sont donnés dans le paragraphe suivant). Dans le cas où une amplification serait visualisée, un nouveau traitement à la DNase serait réalisé comme suit. 0,15 volume de DnaseI Buffer est ajouté directement dans le tube contenant les ARN purifiés une première fois. 1 µL de rDNaseI est ajouté. Une incubation de 30 min à 37°C est réalisée. 0,1 volume de Dnase inactivation Buffer est ajouté et une incubation de 2 min à température ambiante permet l'inactivation de l'enzyme. Ce tampon d'inactivation est précipité par centrifugation pendant 1 min 30 à 13.000 g. Le surnageant est transféré dans un nouveau microtube. Une nouvelle vérification par PCR permet alors de contrôler l'absence d'ADN contaminant.

### 3.1.6. Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires (ADN<sub>c</sub>)

La rétrotranscription des ARN totaux en ADN<sub>c</sub> a été réalisé grâce au iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad).

Dans un microtube de 0,5 mL le mélange réactionnel suivant est préparé : 4 µL de iScript Reaction Mix 5X, 1 µL de iScript Reverse Transcriptase, 1 volume correspondant à 1 µg d'ARN et eau traitée au DEPC en quantité suffisante pour un volume final de 20 µL. Dans un thermocycler, le programme suivant est effectué :

- 5 min à 25 °C (activation) ;
- 30 min à 42 °C (rétro-transcription) ;
- 5 min à 85 °C (inactivation).

Pour les PCR qui seront réalisées ultérieurement, l'ADN<sub>c</sub> obtenu sera utilisé à hauteur de 1/25<sup>ème</sup> du volume réactionnel de PCR.



**Tableau IV** : Amorces utilisées lors de la discrimination et/ou l'identification des levures.

But de la PCR	Auteurs	Amorce	Séquence (5'→3')
Typage de souches	Ness <i>et al.</i> (1993)	δ1	CAAAATTCACCTAT <sup>A</sup> / <sub>T</sub> TCTCA
		δ2	GTGGATTTTTATTCCAACA
	Legras et Karst (2003)	δ12	TCAACAATGGAATCCCAAC
		δ21	CATCTTAACACCGTATATGA
	Baleiras-Couto <i>et al.</i> (1996) ; Caruso <i>et al.</i> (2002)	(GTG) <sub>5</sub>	GTGGTGGTGGTGGTG
	Baleiras-Couto <i>et al.</i> (1996) ; Caruso <i>et al.</i> (2002)	(GAC) <sub>5</sub>	GACGACGACGACGAC
Identification des levures par PCR-RFLP	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> (1999)	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
Identification des levures par PCR-RFLP	Masneuf <i>et al.</i> (1998)	P1	CGAAAACGCTCCAAGAGCTGG
		P2	GACCACGATATGCACCAGGCAG
Identification des levures par PCR-DGGE	Cocolin <i>et al.</i> (2000)	NL1GC	<u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGG</u> GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG
		LS2	ATTCCCAAACAACCTCGACT
Identification de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pearson and McKee (1992)	SC1	GGAGCACCTAATAACATTCT
		SC2	ACAGTTTATATCCGGTTGCATT

### 3.1.7. Mesure de la concentration en acides nucléiques extraits

La quantité d'acides nucléiques extraite peut être appréciée selon deux techniques : la visualisation sur gel d'agarose et la mesure par spectrophotométrie. La première sera décrite plus loin. Elle ne permet qu'une mesure approximative de la concentration en acide nucléique. La seconde fait appel à l'absorbance des acides nucléiques dans l'ultraviolet. Pour ce faire, une cuve en quartz de 1 cm est utilisée et les acides nucléiques sont en général dilués au centième dans l'eau (traitée au DEPC lorsqu'il s'agit d'ARN). Deux mesures sont réalisées (toujours par soustraction à l'eau-DEPC) : l'absorbance à 260 nm (acides nucléiques) et à 280 nm (protéines). Le quotient entre les deux absorbances donne une idée de la pureté de l'extraction. Ce rapport ( $DO_{260nm}/DO_{280nm}$ ) doit être proche de 2 pour révéler une bonne pureté de l'extraction. La concentration en ARN totaux (en ng/ $\mu$ L) est égale à la  $DO_{260nm}$  multipliée par 40 et par la dilution. Pour les ADN, il faut multiplier par 50.

## 3.2. Analyse des acides nucléiques

### 3.2.1. La Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Le principe de la technique de PCR a déjà été décrite précédemment. Un certain nombre de réactions de PCR ont été réalisées, notamment pour la discrimination et/ou l'identification des levures. Les amorces utilisées ont été rapportées dans le tableau IV. Les conditions de PCR correspondant à l'emploi de ces amorces ont été notées dans le tableau V. Le thermocycler utilisé est le PTC200 (MJ Research, Watertown, MA, Etats-Unis).

Un mélange réactionnel « à façon » dénommé Custom made PCR master mix (QBiogene, Illkirsch, France) concentré 12,5X a été systématiquement utilisé. Il contenait :

- un tampon de réaction comprenant : Tris-HCl (10 mM), KCl (50 mM), Triton X/100 (0,1% v/v), BSA (3,12 % v/v)
- du  $MgCl_2$  (1,5 mM)
- des désoxyribonucléotides : dATP, dTTP, dCTP et dGTP (200  $\mu$ M chaque)
- l'ADN polymérase (*Taq* polymerase) (0,1 U/ $\mu$ L).

Pour la méthode d'identification des levures par PCR-DGGE, la concentration en  $MgCl_2$  a été ajustée à 3 mM afin d'augmenter la spécificité des amorces.

Elles sont ajoutées à ce mélange réactionnel à raison de 200 ng/L de chaque.

**Tableau V** : Programme PCR utilisés pour la discrimination et/ou l'identification des levures (T : température).

Amorces utilisées	Dénaturation initiale		Cycles d'amplification			Elongation finale	
	temps	T	itération	temps	T	temps	T
$\delta 1$ et $\delta 2$	5 min	95°C	4	30 s	95°C	5 min	72 °C
				30 s	35°C		
				2 min	72°C		
			30	30 s	95°C		
				30 s	40°C		
				2 min	72°C		
$\delta 12$ et $\delta 21$	4 min	95°C	35	30 s	95°C	10 min	72°C
				30 s	47°C		
				1 min 30	72°C		
(GTG) <sub>5</sub>	5 min	95°C	35	15 s	95°C	4 min	72°C
				45 s	55°C		
				1 min 30	72°C		
(GAC) <sub>5</sub>	5 min	95°C	35	15 s	95°C	4 min	72°C
				45 s	45°C		
				1 min 30	72°C		
ITS1 et ITS4	5 min	95°C	35	1 min	94°C	10 min	72°C
				2 min	55,5°C		
				2 min	72°C		
P1 et P2	5 min	95°C	30	30 s	95°C	7 min	72°C
				30 s	60°C		
				2 min	72°C		
NL1GC et LS2	5 min	95°C	30	1 min	95°C	7 min	72°C
				45 s	52°C		
				1 min	72°C		
SC1 et SC2	5 min	95°C	30	2 min	92°C	5 min	72°C
				3 min	55°C		
				2 min	72°C		

La dilution du mélange réactionnel est réalisée dans de l'eau ppi afin de s'assurer de sa pureté et de sa stérilité.

La réaction de PCR est généralement conduite sur ADN purifié qui sert de matrice d'amplification. La concentration en ADN est alors ajustée à moins de 50 ng/L.

Il peut s'avérer nécessaire de passer outre l'extraction d'ADN. La PCR est alors réalisée sur cellules entières, prélevées dans une colonie. Le programme PCR se déroule de la même manière que lors d'une PCR sur ADN purifié, en ajoutant néanmoins une étape de chauffage des cellules afin de libérer leur ADN. Quelques cellules sont diluées dans 20  $\mu$ L d'eau et chauffées à 95°C pendant 10 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite ajouté (en tenant compte des 20  $\mu$ L d'eau déjà ajoutés lors de la préparation de celui-ci) et le programme traditionnel effectué.

### 3.2.2. PCR quantitative en temps réel (*ACT1*, *SSU1*)

Des PCR quantitatives en temps réel ont également été réalisées grâce au iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis). L'utilisation de cette technique permet notamment de contrôler l'expression d'un gène à un temps donné ou l'évolution de cette expression au cours du temps. Pour ce faire, le gène est amplifié après rétro-transcription de l'ARN extrait en ADNc et la visualisation de cette augmentation de la concentration en ADN est réalisée en temps réel par mesure de la fluorescence due à la présence de SYBR-Green dans le mélange réactionnel. Cette molécule est un intercalant de l'ADN. Le cycle de PCR où la concentration en ADN augmente de manière détectable (la fluorescence quitte la ligne de base du bruit de fond) détermine un cycle seuil. Celui-ci est rapporté à une courbe étalon déterminée par des dilutions successives au dixième d'échantillons d'ADN dont la concentration est connue grâce à une mesure préalable au spectrophotomètre. Ainsi, la concentration en ARN de départ peut-être calculée. Néanmoins, pour réaliser un suivi dans le temps de l'expression du gène étudié, il est nécessaire de comparer cette concentration avec celle d'un gène dont l'expression ne varie pas au cours du temps afin de normaliser tous les prélèvements effectués. Ce gène est nommé gène de ménage. Suzuki *et al.* (2000) ont rapporté les différents gènes de ménage de levures utilisés dans la littérature au cours de l'année 1999. Ainsi, les gènes codant pour la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (33%), la  $\beta$ -actine (32%), l'ARNr 18S (14%), l'ARNr 28S (11%), le

**Tableau VI** : Amorces utilisées en PCR quantitative en temps réel

Gène cible	Amorce	Séquence (5'→3')
<i>act1</i>	act5'	TACCGGCCAAATCGATTCTC
	act3'	CACTGGTATTGTTTTGGATT
<i>ssu1</i>	ssu5'	GGTGTCGGCATTTCATCGA
	ssu3'	GCAAGCGATAGCAAACATGA

**Tableau VII** : Programme PCR utilisés lors des PCR quantitative en temps réel

Amorces utilisées	Dénaturation initiale		Cycles d'amplification			Elongation finale	
	temps	T	itération	temps	T	temps	T
Toute PCRq	5 min	95°C	45	30 s	95°C	-	-
				30 s	55,8°C		
				5 s	72°C		

36B4 (2%) et la tubuline (1%) ont été les plus fréquemment utilisés. Dans cette étude, il a été arbitrairement choisi le gène codant pour la  $\beta$ -actine, une protéine du cytosquelette exprimée dans la plupart des cellules. Son expression varie peu, même s'il est rapporté qu'elle peut parfois changer en réponse à quelques stress (Giulletti *et al.*, 2001). Les amorces utilisées ainsi que les protocoles correspondant ont été respectivement reportés sur les tableaux VI et VII. Pour réaliser ces PCR, un mélange additionnel dénommé iQ SYBR Green Super Mix (Bio-Rad) concentré 2X a été utilisé. Il comprend les constituants suivants :

- un tampon de réaction : KCl (100 mM), Tris-HCl (40 mM), pH 8,4
- des désoxyribonucléotides : dATP, dTTP, dCTP et dGTP (400  $\mu$ M de chaque)
- une *iTaq* DNA polymerase (50 units/ml)
- du MgCl<sub>2</sub> (6 mM)
- du SYBR Green I
- de la fluoresceine (20 nM)
- des stabilisateurs.

### 3.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la visualisation de l'ADN, de fragments d'ADN amplifiés par PCR ou générés par restriction.

L'agarose est dissous à chaud dans du TAE 1X (0,04 M Tris-acétate, 0,001M EDTA). Le gel liquide est refroidi à 50 °C environ. Du bromure d'éthidium (0,2  $\mu$ g/mL) y est incorporé avant de le couler dans un support de gel. Une fois solidifié, il est immergé dans une cuve à électrophorèse contenant du TAE 1X.

Les échantillons d'ADN à visualiser sont additionnés de 1/10<sup>ème</sup> de tampon de charge (50 % TE pH 8, 50% glycérol, bleu de bromophénol) avant d'être déposés dans des puits du gel. La migration dans un champ électrique (5 à 10 V/cm), créé par une différence de potentiel appliquée aux deux extrémités du gel, permet de séparer les fragments d'ADN selon leur taille. Après migration, la visualisation se fait sous ultraviolets. L'ADN est révélé grâce au bromure d'éthidium qui s'intercale entre les brins d'ADN. La taille des fragments d'ADN est estimée par comparaison avec un marqueur de taille connue (selon les expériences, il a été utilisé le « 100bp DNA ladder » ou le « lambda-*Hind*III ladder » de Promega). Le pourcentage d'agarose varie en fonction de la précision désirée dans la séparation de

**Tableau VIII** : Composition des solutions destinées à former le gel d'acrylamide dans la technique de DGGE.

<b>Pourcentage de dénaturation</b>	<b>20%</b>	<b>45%</b>	<b>60%</b>
Acrylamide/Bisacrylamide (19 :1)	10 mL	10 mL	10 mL
TAE 50X	1 mL	1 mL	1 mL
Urée	4,2 g	9,45 g	12,6 g
Formamide	4 mL	9 mL	12 mL
Eau mQ	qsp 50 mL	qsp 50 mL	qsp 50 mL
Temed	35 µL	35 µL	35 µL
Ammonium persulfate 10 % (p/v)	210 µL	210 µL	210 µL

fragments en mélange, notamment pour les petites tailles (100 pb ou inférieures). Ainsi, un gel d'agarose à 1% (p/v) suffira à observer le résultat d'une PCR « classique » alors que 3% (p/v) seront nécessaires à observer un profil de restriction, ou des amplicons de petite taille.

Les ARN peuvent également être visualisés sur gel d'agarose, mais la préparation des échantillons diffère. 1 ou 2  $\mu\text{L}$  d'ARN sont additionnés de 10  $\mu\text{L}$  de formamide, de 4  $\mu\text{L}$  de formaldéhyde et 4  $\mu\text{L}$  de tampon de charge. Ce mélange est chauffé à 65°C pendant 10 min et placé immédiatement dans la glace pendant au moins 1 min. Il est ensuite chargé dans le puits d'un gel d'agarose (1,5% p/v) réalisé avec du TAE 1X contenant du bromure d'éthidium. La migration se déroule à 50 V pendant environ 1 heure. Les ARN sont ensuite observés sous ultraviolets. On observe en général 3 bandes : celles correspondant aux ARNr 25S, 18S et 5S.

Il a parfois été jugé utile de découper dans le gel des bandes d'intérêt et de récupérer l'ADN desdites bandes. Cela a été réalisé par utilisation du kit QIAEX II de Qiagen. Les bandes sont d'abord découpées dans le gel à l'aide d'une lame de scalpel préalablement stérilisée dans l'eau distillée bouillante, et par visualisation sous ultraviolets. Les indications du fournisseur ont ensuite été suivies afin de dissoudre l'agarose et de récupérer ainsi le fragment d'ADN purifié.

#### 3.2.4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

La technique de DGGE a été appliquée au cours de cette étude dans le but d'étudier l'écologie levurienne des vins liquoreux. Il s'agit d'une technique d'électrophorèse sur gel d'acrylamide qui permet de séparer des amplicons de même taille, mais de séquence nucléotidique différente, ce qui se traduit par une température de fusion des amplicons différente.

Dans cette étude, les amplicons sont des fragments de la région D1 de l'ADNr 25S des levures. Le programme PCR a été décrit plus haut. La séparation des fragments en mélange s'effectue dans un gradient chimique d'urée-formamide 20% - 60% dont la composition est donnée dans le tableau VIII. 15 mL de chaque solution sont placés dans un dispositif destiné à former le gradient et le gel liquide est envoyé entre deux plaques de verre espacées d'1 mm via une pompe péristaltique Warson & Marlow type 202 réglée sur un débit



d'environ 4 mL/min. La polymérisation due à la présence de Temed et d'ammonium persulfate se réalise à température ambiante en quelques minutes.

La migration se réalise dans 7 L de TAE 1X à 60°C à 120V pendant 6 heures. 40 µL de produits PCR sont additionnés de 4 µL de bleu de charge pour DGGE (20% (v/v) TE, 80 % (v/v) glycérol, bleu de bromophénol) et placés dans des puits prévus à cet effet lors du coulage du gel.

A l'issue de la migration, les gels sont démoulés et placés pendant 15 minutes dans du TAE 1X additionné de SYBR Green 100X, puis observés sous ultraviolets. Une photographie peut ensuite être réalisée sur film Polaroid négatif-positif type 665.

### 3.2.5. Séquençage des bandes de DGGE après réamplification par PCR

Les bandes d'intérêt peuvent être découpées dans le gel à l'aide d'une lame de scalpel préalablement stérilisée dans de l'eau distillée en ébullition. Chaque bande de gel isolée est placée dans un microtube dans 40 µL d'eau ppi. Après une nuit à 4°C, 2 µL sont prélevés et utilisés comme matrice pour une PCR identique réamplifiant chaque fragment spécifiquement. Le laboratoire ne disposant pas de séquenceur, les amplicons obtenus ont été envoyés à séquencer dans des entreprises réalisant ce type de prestations de service. Les entreprises choisies ont été alternativement Genaxis (Nîmes, France), Millegen (Baillargues, France) et Genome Express (Meylan, France).

L'analyse des fragments obtenus est réalisée par comparaison à des séquences contenues dans des bases de données disponibles sur Internet. Le programme Blastn du site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a été particulièrement sollicité. Cette analyse permet d'attribuer une espèce de levure à un amplicon donné.

### 3.2.6. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Pour certaines identifications de levures, la technique de PCR-RFLP a été utilisée comme signalé plus haut. Les conditions de réalisation de la PCR ont déjà été mentionnées. Les amplicons sont révélés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,5 % (p/v). La RFLP consiste en une digestion enzymatique des amplicons obtenus lors de la PCR. Les enzymes

**Tableau IX** : Enzymes de restriction utilisées et conditions d'utilisation (données en  $\mu\text{L}$ ).

enzyme	<i>HhaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
amplicon	10	10	10
volume d'enzyme	1 (20U)	1 (20 U)	1 (20U)
tampon 10X (N° et volume)	n°4 2	n°2 2	n°2 2
BSA 10X	2	0	0
eau mQ	5	7	7

utilisées sont les suivantes : *HhaI*, *HaeIII* et *HinfI*. Les mélanges réactionnels sont explicités dans le tableau IX. Après 2 heures à 37°C, les fragments de restriction sont séparés selon leur taille par électrophorèse dans un gel d'agarose 3% (p/v).

### 3.2.7. Caryotype des levures

Un erlenmeyer de 125 mL contenant 50 mL de milieu YPG est ensemencé avec une souche de levure et placé 24 heures à 25°C en agitation constante. La biomasse est récupérée par centrifugation 3000 g pendant 10 min. Le culot de cellules est lavé deux fois dans de l'EDTA 0,05M en jetant systématiquement le surnageant après centrifugation. 1 mL d'EDTA 0,05 M est enfin ajouté, et le tube est agité au vortex. On ne conserve qu'1 mL de cette solution. Une solution d'agarose spéciale plugs 1% est préparée. Dans un tube de 5 mL contenant la solution de 1 mL de suspension de cellules de levure, 1 mL d'agarose est ajouté. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, ce mélange est introduit dans un moule à plugs. Après solidification, l'excédent d'agarose est retiré et les plugs démoulés. Un tampon de lyse (0,5 M NaCl, 0,25 M EDTA, 0,125 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M  $\beta$ -mercaptoéthanol) est préparé, ajouté sur les plugs et laissé 6-18 heures à 37°C. Le tampon de lyse est ensuite remplacé par une autre solution (1 mg/mL de Pronase E de *Streptomyces griseus*, 1% sarcosyl, 0,45 M EDTA). Une incubation de 72 heures à 42°C est alors réalisée. Les blocs sont ensuite lavés 4 fois 60 minutes dans du TE à 50°C, puis 4 fois à température ambiante toujours dans du TE. Les plugs sont ensuite conservés dans du TE à 4°C, jusqu'à utilisation pour migration par électrophorèse en champ pulsé.

Un gel d'agarose spécial champ pulsé 1% est préparé dans du tampon TEB 0,5 % (5,4 g Tris-HCl, 2,75 g d'acide orthoborique, 2 mL d'EDTA pH 8, eau mQ qsp 1 L). Les plugs sont placés dans les puits du gel. Les chromosomes sont ensuite séparés par une électrophorèse en champs pulsés qui utilise des champs alternatifs à 120°C. Les petits chromosomes sont séparés pendant 14 heures avec un champ alterné de 60 s. Les chromosomes de haut poids moléculaire sont ensuite séparés pendant 9 heures avec un champ alterné de 90 s. Le tampon de migration utilisé le TEB 0,5X (réalisé dans de l'eau distillée cette fois-ci) réfrigéré à 10°C pendant toute la migration.

Les conditions de migration sont les suivantes :

- 200 V (6 V/cm en mesurant la distance entre les deux électrodes)
- 60 s pendant 14 h et 90 s pendant 9 h.

**Tableau X** : Composition du milieu SOC

<b>Constituants</b>	<b>concentration</b>
Tryptone	2 % (p/v)
Extrait de levure	0,5 % (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
glucose	20 mM

**Tableau XI** : milieu LB utilisé pour la culture d'*Escherichia coli*.

<b>Constituants</b>	<b>Concentration</b>
Bactotryptone	16 g/L
Extrait de levure	10 g/L
NaCl	5 g/L

Après migration, l'ADN est révélé par coloration dans du bromure d'éthidium à 0,5 mg/L. Après coloration, le gel peut être placé dans de l'eau distillée à 4°C pendant plusieurs heures afin de resserrer les mailles du gel. Les fragments sont visualisés sous ultraviolets et photographiés sur film polaroid négatif-positif type 665.

### 3.3. Clonage d'un fragment d'ADN dans *E. coli* par électroporation

#### 3.3.1. Clonage et électrotransformation

A la demande de certains prestataires de service pour le séquençage des fragments d'ADN issus de la DGGE, certains amplicons ont été clonés dans *Escherichia coli*. Le kit pCR®-XL-TOPO (Invitrogen) a été utilisé. Il utilise les souches TOP10 (*F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 numG*). 1 μL de plasmide pCR-XL-TOPO linéarisé portant en 5' un résidu désoxythymidine est mis en présence de 4 μL de fragment ADN issu du découpage du gel d'acrylamide. Ce fragment issu d'une amplification par PCR comporte en 3' un résidu désoxyadénosine, ajouté par l'ADN polymérase utilisée lors de cette PCR. Une topoisomérase ligature le plasmide et l'amplicon. Après 5 min, la réaction de clonage est arrêtée par ajout d'un tampon nommé 6X TOPO cloning stop, puis le microtube est placé dans la glace. Le nouveau plasmide est ensuite incorporé dans des souches TOP10 électrocompétentes par électroporation grâce au Gene Pulser™ de Bio-Rad. Pour ce faire, on utilise des cuvettes à électroporation de distance inter-électrode de 0,2 cm. 2 μL du mélange réactionnel contenant le plasmide à incorporer est ajouté aux cellules compétentes. L'électroporation se réalise selon les conditions suivantes : 1500 V, 25 mA, 25 W, 25 μF et 150 Ω. Après l'impulsion électrique, les bactéries sont transférées dans 450 μL de milieu SOC (Tableau X) et le mélange est incubé 1 heure à 37°C sous agitation. Une fraction de cette culture est étalée sur milieu LB (Tableau XI) gélosé contenant de la kanamycine (50 μg/mL). Après 16 heures de culture à 37°C, on récupère les colonies de cellules *d'E. coli* transformées.

#### 3.3.2. Sélection des transformants

L'opération suivante consiste à vérifier si les cellules des colonies obtenues ont bien intégré le fragment d'ADN désiré.

Après culture dans 5 mL de milieu LB liquide pendant une nuit des cellules issues d'une colonie, on les récupère par centrifugation 3 minutes à 10.000 g. De celles-ci, l'ADN plasmidique est extrait selon la méthode suivante.

Au culot de cellules, 525 µL de TEG (25 mM Tris-HCl pH 8 ; 10 mM EDTA ; 50 mM glucose) sont ajoutés. Après 5 minutes d'attente à température ambiante, 1,05 mL de tampon de lyse (0,2 N NaOH ; 1% v/v SDS) est additionné. Un mélange par inversion est effectué et suivi d'une attente de 10 minutes dans la glace. Puis 788 µL d'acétate de potassium 3 M sont ajoutés. Un nouveau mélange par inversion est effectué suivi d'une attente 10 minutes dans la glace. Une centrifugation à 10.000 g pendant 15 minutes est réalisée. A 1,5 mL de surnageant, un volume de phénol-SEVAG est ajouté et le surnageant est transféré dans un nouveau microtube après centrifugation pendant 5 minutes à 10.000 g. 900 µL d'isopropanol sont ajoutés et 15 minutes d'attente à température ambiante permettent aux ADNp d'apparaître. Une centrifugation pendant 15 minutes à 10.000 g permet de récupérer le culot d'ADNp qui est ensuite séché sous vide. Les ADNp sont suspendus dans 50 µL d'eau.

Une PCR ayant pour matrice cet ADN plasmidique sert à contrôler la présence d'un insert de la taille attendue. Pour plus de sûreté, une digestion enzymatique par *HindIII* permet de linéariser le plasmide et de vérifier la taille de celui-ci.

#### 4. DOSAGES CHIMIQUES

##### 4.1. Dosage du dioxyde de soufre libre et total par méthode de Ripper

La méthode choisie pour réaliser les dosages de dioxyde de soufre libre et total a été celle de Ripper car selon Barbe (2000), les résultats obtenus sont suffisamment précis et en concordance avec la méthode officielle de Franz-Paul, plus longue et plus fastidieuse.

Le principe du dosage repose sur l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode en milieu acide selon la réaction :  $\text{SO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{I}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + 2 \text{HI}$ .

En ce qui concerne le dioxyde de soufre, on travaille directement sur le vin à analyser, sans aucun traitement préalable. 20 mL de vin sont placés dans un erlenmeyer avec environ 2 mL d'acide sulfurique dilué au tiers (pour acidifier le milieu) et 1 pointe de spatule

d'indicateur coloré. La titration est réalisée par une solution d'iode N/100, préparée peu de temps avant, jusqu'au virage bleu-violet.

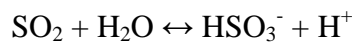
Si  $n$  est le volume d'iode versé pour atteindre le virage,  $N_{\text{iode}}$  la normalité de la solution d'iode et  $V_{\text{vin}}$  le volume de vin, le poids d'un équivalent  $\text{SO}_2$  étant de 32 eq/mg, la concentration en dioxyde de soufre libre dans le milieu est donnée par la formule suivante :

$$[\text{SO}_2 \text{ libre}] \text{ (mg/L)} = n \text{ (mL)} \times N_{\text{iode}} \times 32 \times 1000 / V_{\text{vin}} = n \text{ (mL)} * 16.$$

Le dosage du dioxyde de soufre total est réalisé selon le même principe. Cependant, il faut préalablement rompre les liaisons bisulfite afin de libérer le dioxyde de soufre combiné en alcalinisant le milieu. A 20 mL de vin, 10 mL de soude 1 N sont donc ajoutés. Après 10 minutes d'attente, le milieu est acidifié pour le dosage par ajout de 6 mL d'acide sulfurique dilué au tiers et une pointe de spatule d'indicateur coloré. On titre ensuite à l'aide d'une solution d'iode N/100 jusqu'au virage bleu-violet. Si  $n$  est le volume d'iode versé pour atteindre le virage, la concentration en dioxyde de soufre total dans le milieu est donnée par la formule suivante :

$$\text{SO}_2 \text{ total (mg/L)} = n \text{ (mL)} * 16.$$

A partir de la teneur en dioxyde de soufre libre et du pH d'un vin, on peut estimer la concentration en dioxyde de soufre moléculaire, actif sur les levures. En effet, au pH du vin, la teneur en sulfite neutre ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) peut être minimisée en raison de la valeur de la constante de dissociation entre l'ion bisulfite et l'ion sulfite trop élevée, il ne reste donc plus que la moléculaire ( $\text{SO}_2$ ) et la forme bisulfite ( $\text{HSO}_3^-$ ). L'équilibre entre les deux formes présentes dans le vin est régi par l'équation suivante :



La valeur de la constante de dissociation de cet équilibre ( $\text{pK}_a$ ) peut être considérée comme égale à 1,81.

La concentration en dioxyde de soufre moléculaire des vins peut donc être calculé selon la formule suivante ( $[\text{HSO}_3^-]$  représentant la concentration en dioxyde de soufre libre dans le vin) :

$$[\text{SO}_2] = \frac{[\text{HSO}_3^-]}{10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}$$

La valeur de pKa n'est pas réellement constante. Elle varie en effet selon la température et le degré alcoolique, ainsi que par la force ionique. Usseglio-Tomasset (1989) a d'ailleurs calculé l'influence de ces différents facteurs sur la teneur en dioxyde de soufre moléculaire dans les vins.

Ce calcul n'est donc pas juste, mais il donne une bonne idée de la teneur en dioxyde de soufre actif dans les vins.

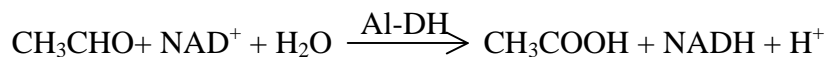
#### 4.2. Calcul du pouvoir de combinaison d'un milieu de culture

Dans un milieu donné, il est ajouté des quantités connues et croissantes de dioxyde de soufre, chaque concentration dans un flacon différent. Après une heure d'incubation, la concentration en dioxyde de soufre libre est mesurée par la méthode de Ripper. L'établissement de la droite de régression  $SO_2 \text{ total} = f(SO_2 \text{ libre})$  permet d'établir la relation entre ces deux valeurs.

On définit le TL50 comme étant la concentration en dioxyde de soufre total à ajouter à un vin pour obtenir une concentration en dioxyde de soufre libre de 50 mg/L.

#### 4.3. Dosage de la concentration en éthanal

Ce dosage a été réalisé par méthode enzymatique en utilisant les kits de Boehringer Mannheim (Roche), selon les instructions du fabricant. Le principe du dosage repose sur l'équation biochimique suivante (Al-DH étant l'aldéhyde déshydrogénase) :



La concentration en NADH (Nicotinamide-adénine dinucléotide) formée au cours de la réaction est stochiométrique à la concentration en éthanal de départ. Cette concentration en NADH est mesurée par l'absorbance à 340 nm au spectrophotomètre.

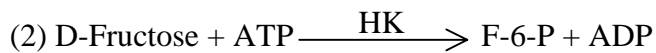
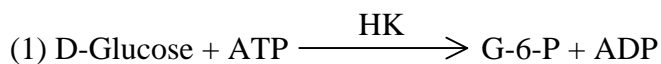
Précisons que ce dosage permet la mesure à la fois de l'éthanal libre et de celui lié au dioxyde de soufre. De plus, la présence de dioxyde de soufre n'interfère absolument pas avec le dosage.



Concernant la précision du dosage, il est indiqué qu'une petite variation de densité optique de 0,005 à 0,010, soit en général une variation de 0,5 à 1 mg/L d'éthanal entre deux mesures consécutives peut apparaître. Lundquist (1974) a déterminé un coefficient de variation de 2,2 % dans les mesures.

#### 4.4. Dosage de la concentration en D-Glucose et D-Fructose

De même, la concentration en sucres résiduels dans un vin a été mesurée par méthode enzymatique en utilisant les kits de Boehringer Mannheim (Roche). Ce dosage est réalisé en deux réactions enzymatiques. Le principe du dosage repose, dans un premier temps, sur la phosphorylation du D-glucose et du D-fructose respectivement en D-glucose-6-phosphate (G-6-P) et en D-fructose-6-phosphate (F-6-P) à l'aide de l'hexokinase et d'adénosine triphosphate (ATP) selon les équations suivantes :



En présence de  $\text{NADP}^+$  (Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate), le G-6-P et le F-6-P sont respectivement oxydés en D-gluconate-6-phosphate avec formation de NADPH en présence de Glucose-6-phosphate déshydrogénase, selon l'équation suivante :



L'augmentation de la concentration en NADPH est mesurée à 340 nm par spectrophotométrie.

Dans un deuxième temps, l'ajout de Glucose isomérase dans le mélange réactionnel permet la conversion du F-6-P en G-6-P. La G6P-DH entre alors en action selon l'équation (3).

Aux concentrations de sucres résiduels des vins liquoreux, il est nécessaire de diluer les échantillons mille fois.

La densité optique mesurée deux fois consécutivement peut varier de 0,005 à 0,010, ce qui correspond en général à une variation de 4 à 8 mg/L (pour un échantillon non dilué et donc de 4 à 8 g/L dans le cas des vins liquoreux). Dans un communiqué, l'OIV (1990) a déterminé l'erreur de mesure dans les vins comme obéissant aux paramètres suivants :

$$r = 0,056 \times x_i ; R = 0,12 + 0,076 \times x_i \text{ avec } x_i : \text{D-Glucose resp. D-Fructose (g/L)}.$$

**TROISEME PARTIE**

**RESULTATS ET DISCUSSION**

**Tableau XII** : Principales caractéristiques chimiques des vins étudiés lors du millésime 2003. \* : donnée recueillie auprès du château. [éthanal] en mg/L ; [glycérol], [sucres résiduels] en g/L ; [acide acétique] en g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/L ; [éthanol] en % vol.

	pH*	[éthanal]	[glycérol]	[éthanol]*	[sucres résiduels]*	[acide acétique]*
<b>moyenne</b>	3,97	34	20	13,64	127	0,88
<b>écart-type</b>	0,09	8	2	0,70	25	0,21
<b>médiane</b>	3,98	32	20	13,68	121	0,89
<b>maximum</b>	4,10	48	25	15,05	186	1,32
<b>minimum</b>	3,64	22	16	11,55	96	0,53

**Tableau XIII** : Coefficients de corrélation entre les différentes mesures du tableau XII.  
Unités : voir tableau XII.

	pH	[éthanal]	[glycérol]	[éthanol]	[Sucres Résiduels]	[acide acétique]
<b>pH</b>	1					
<b>[éthanal]</b>	-0.025	1				
<b>[glycérol]</b>	0.228	0.575	1			
<b>[éthanol]</b>	-0.196	-0.095	0.165	1		
<b>[Sucres Résiduels]</b>	0.307	0.213	0.354	-0.811	1	
<b>[acide acétique]</b>	0.333	0.140	0.511	-0.683	0.940	1

# TROISIEME PARTIE

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. OBSERVATIONS PRELIMINAIRES D'ORDRE CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE

« On dit souvent qu'il faut expérimenter sans idées préconçues. Cela n'est pas possible ; non seulement ce serait rendre toute expérience stérile, mais on le voudrait qu'on ne le pourrait pas. »

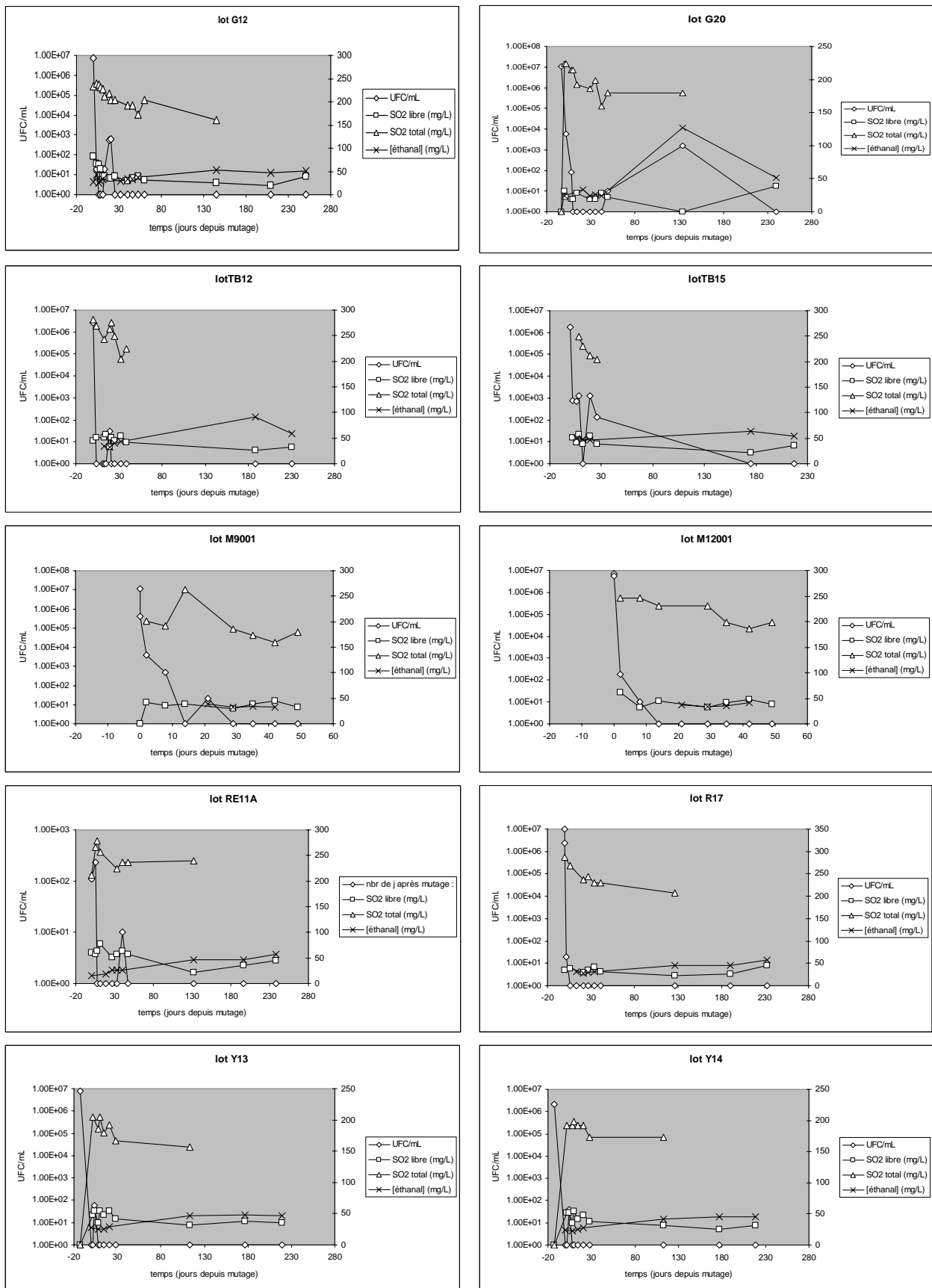
Henri Poincaré

Le phénomène de la refermentation des vins liquoreux n'est pas un phénomène récent. Cependant, les allusions à ce problème microbiologique sont rares dans la littérature et il a souvent été attribué à une erreur de dosage au moment du mutage, ou à un problème de combinaison du dioxyde de soufre certaines années. En somme, cet incident a d'abord été considérée comme un problème chimique, lié au dioxyde de soufre et à son utilisation sensible dans ce type de vinification particulière. C'est pourquoi, les premières expérimentations réalisées ont eu pour objectif principal d'observer le comportement des levures suite au mutage afin de comprendre si elles étaient capables de survivre au choc provoqué par l'ajout massif de dioxyde de soufre. Cette étude a été menée dans cinq châteaux sur les 8 premiers mois d'élevage de 22 lots vinifiés en barrique neuve.

#### 1.1. Observations chimiques

##### 1.1.1. Premier bilan chimique

Le tableau XII présente un bilan des principales caractéristiques chimiques des vins étudiés, à l'issue des fermentations à la mi-décembre. Toutes ces valeurs sont élevées, comparativement à un vin « classique ». Les pH atteignent la limite supérieure des pH connus du vin, les concentrations en glycérol élevées proviennent d'une synthèse par *Botrytis cinerea* lors de la contamination des raisins (Donèche, 1987) et de celles des levures par la fermentation glycéropyruvique. Les teneurs en sucres résiduels très élevées, ainsi que les teneurs en éthanol reflètent la richesse en sucres du moût d'origine. Les concentrations en éthanal et en acide acétique laissent entrevoir les difficultés de fermentation (Ribéreau-Gayon



**Figure 5 :** Suivi des teneurs en éthanal, dioxyde de soufre libre et total et de la population en levures totales dans 10 lots de vin (2 lots par château).

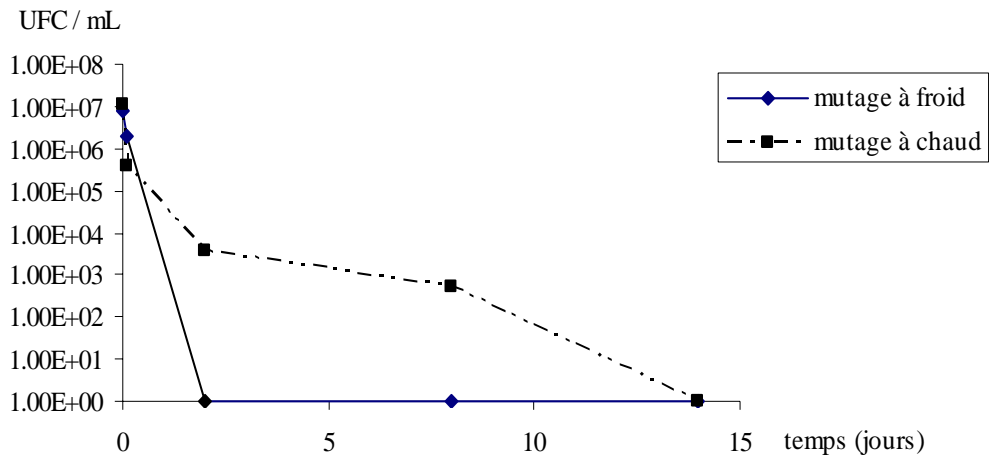
*et al.*, 1979). Le tableau XIII présente les coefficients de corrélation entre ces différentes valeurs. En fait, il est aisé d'en déduire que seules la teneur en sucres résiduels et la concentration en acide acétique sont liées. Cette corrélation est un résultat connu (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998) et caractéristique de la difficulté de fermentation alcoolique de ce type de vin. En effet, en raison de la lenteur de la fermentation alcoolique, imputable à de nombreuses causes déjà décrites, les levures forment beaucoup d'acide acétique, notamment en fin de fermentation. Il est connu depuis bien longtemps que la teneur en acide acétique augmente d'autant plus que la concentration en sucres est élevée. (Müller-Thurgau, 1988).

### 1.1.2. Suivi de quelques paramètres chimiques

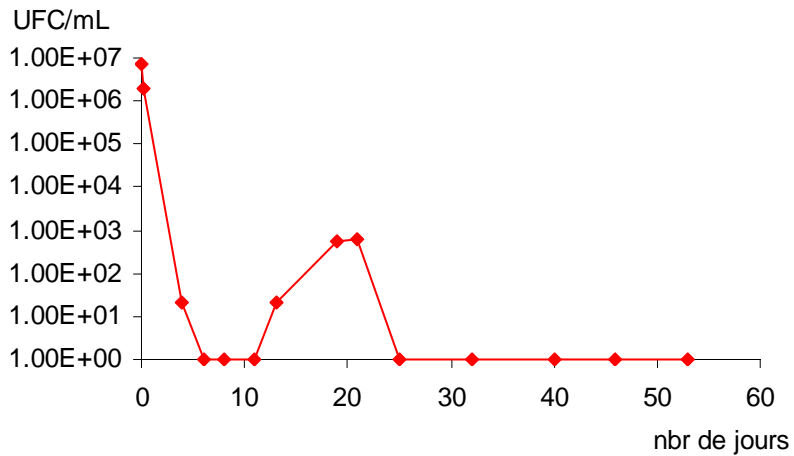
Sur l'ensemble des lots étudiés, les mesures de quelques paramètres chimiques d'importance ont été effectuées : il s'agit des concentrations en dioxyde de soufre libre et total et en éthanal. Les deux premiers paramètres sont couramment mesurés en œnologie, notamment au cours de la vinification des vins liquoreux, mais l'éthanal joue un rôle primordial dans les phénomènes de combinaison du dioxyde de soufre. D'autre part, la connaissance de ces paramètres semble particulièrement indiquée afin de vérifier si la refermentation n'est que le résultat d'un « mauvais mutage ».

La figure 5 détaille ces paramètres pendant les neuf premiers mois ayant suivi le mutage. Plusieurs conclusions sont tirées : Suite au mutage, la concentration en dioxyde de soufre total chute lentement pendant environ 1 mois quel que soit le lot considéré. Ce phénomène peut être attribué à une oxydation de l'acide sulfureux en acide sulfurique et à une certaine évaporation. Puis elle se stabilise. La teneur en dioxyde de soufre libre chute lentement mais régulièrement au cours du temps, inversement à la concentration en éthanal qui augmente lentement mais aussi régulièrement. Il est vraisemblable que ces deux derniers phénomènes soient liés puisque l'éthanal combine le dioxyde de soufre libre. En fait, la chute de la teneur en dioxyde de soufre libre est probablement la conséquence de l'augmentation de la teneur en éthanal. Entre mi-décembre et mi-février, la teneur en éthanal continue de croître dans tous les lots avec une moyenne d'augmentation de 21,6 mg/L par lot.

Le lot G20 a subi une reprise de fermentation à la mi-mars. Dans ce cas, l'augmentation d'éthanal est très importante : elle atteint 104 mg/L, ce qui porte la teneur totale à 128 mg/L ! Ce phénomène renforce l'hypothèse d'une origine microbiologique de



**Figure 6** : Différence de comportement des levures suite à un ajout de dioxyde de soufre en pleine fermentation (mutage à chaud) ou après 24 heures à 4°C (mutage à froid).



**Figure 7** : Courbe typique de la chute du nombre de levures cultivables suite au mutage dans un vin liquoreux en barrique



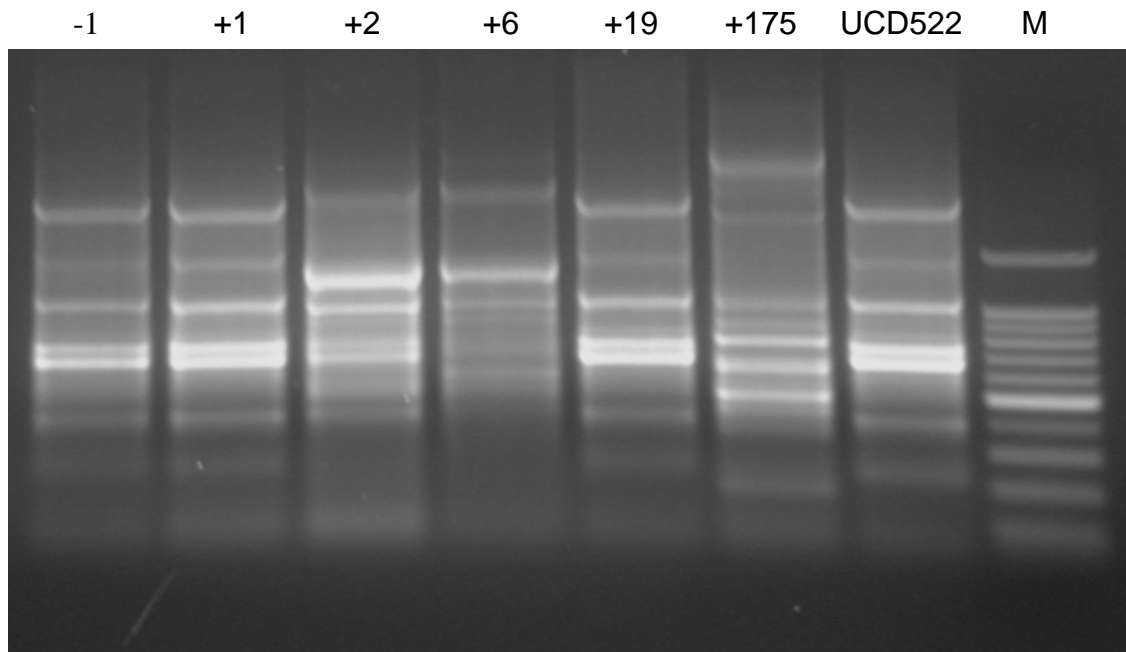
l'éthanal. Parallèlement, et par voie de conséquence, une chute de la teneur en dioxyde de soufre libre est enregistrée. Néanmoins, sur l'ensemble des lots étudiés, il n'a pas été possible de mettre en relation cette chute avec l'accroissement de la teneur en éthanal (coefficient de corrélation de 0,669) en raison des ajustements de la teneur en dioxyde de soufre au moment des soutirages.

## 1.2. Observations microbiologiques

### 1.2.1. Effet du mutage sur le nombre de levures

D'après Peynaud et Lafourcade (1952), l'augmentation de la teneur en éthanal dans les vins liquoreux a une origine microbiologique. Or, après mutage, la population de levures comptée par le nombre de colonies formées sur boîte de Petri chute à un niveau indétectable (moins de 10 UFC/mL). Notons que dans les lots M9001 et M12001, le nombre de levures chute plus lentement que dans les autres. La différence est due à la modalité de mutage. Tous les lots sont refroidis et débourbés avant mutage sauf ces deux lots qui sont mutés « à chaud », c'est-à-dire en pleine fermentation. D'ailleurs, la figure 6 présente plus exactement la différence de chute de populations entre les deux modalités de mutage, dans une expérience de laboratoire. Le froid possède probablement deux actions : l'inactivation des cellules (arrêt de la fermentation) et sédimentation (moins de cellules en suspension). Le mutage « à chaud » ne semble pas avoir de conséquence néfaste d'un point de vue microbiologique par la suite. Néanmoins, il est fortement conseillé d'éliminer un maximum de levures avant mutage et d'optimiser les conditions d'arrêt de fermentation (Peynaud et Lafourcade, 1952).

Le profil typique de la chute du nombre de levures, comme conséquence du mutage, est présenté à la figure 7. Il s'agit de la courbe observée pour un lot particulier, mais représentatif d'une large majorité de lots. Une chute rapide du nombre de cellules cultivables, jusqu'à atteindre une valeur indétectable, précède souvent une petite augmentation avant une nouvelle chute définitive à moins de 10 UFC/mL. L'augmentation transitoire du nombre de cellules cultivables est sans doute due au hasard du pipetage et n'est probablement pas représentative de l'ensemble de la barrique. Après quelques jours, l'ensemble s'homogénéise.



**Figure 8** : Evolution du profil génétique des levures cultivables en mélange recueillies sur milieu de culture solide à partir d'un lot de vin du millésime 2001 (lot TB15). Les profils ont été obtenus par amplification ISSR-PCR utilisant l'amorce  $(GTG)_5$ . Les nombres figurant en haut de chaque piste correspondent au temps en jours qui séparent du mutage. M : Marqueur de taille 100 bp Promega. L'avant-dernière piste correspond à la souche commerciale UCD522 ensemencée dans ce lot pour la réalisation de la fermentation alcoolique.

### 1.2.2. Effet du mutage sur la sélection des levures

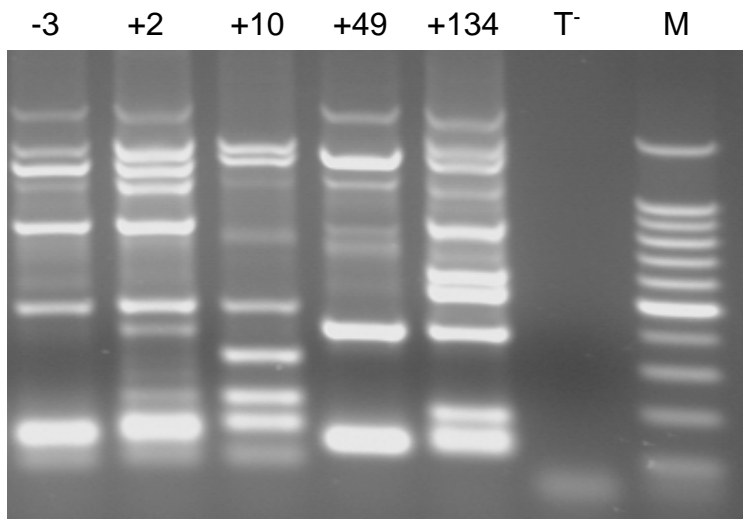
Le mutage provoque l'arrêt de la fermentation, donc la sédimentation des levures et leur mort supposée. En tout cas, elle crée un stress environnemental important. Cependant, dans les premières semaines qui suivent le mutage, il arrive qu'un petit nombre de cellules de levure forment des colonies sur milieu de culture solide, avant homogénéisation à un seuil indétectable. Ces colonies ont été étudiées. Après dénombrement, elles sont récupérées en masse à la surface de la gélose puis l'ADN des cellules est extrait. Par différentes PCR (régions inter $\delta$  selon Ness *et al.* (1993) ou selon Legras et Karst (2003), ou ISSR-PCR grâce à l'amorce (GTG)<sub>5</sub>), un profil génétique du mélange de clones est obtenu.

L'analyse de chaque clone est apparue comme fastidieuse et d'un intérêt limité en raison d'un problème statistique : combien de clones faudrait-il prélever pour avoir un échantillonnage représentatif de la population ? D'autre part, le nombre de cellules encore capables de former des colonies sur milieu de culture solide s'amenuisant au cours du temps, le problème de représentativité des échantillons est apparue clairement. C'est pourquoi, il a paru plus opportun de réaliser les profils génétiques d'un mélange, ne permettant pas d'isoler et d'identifier les souches en présence, mais de pouvoir observer l'évolution globale de la population au cours du temps.

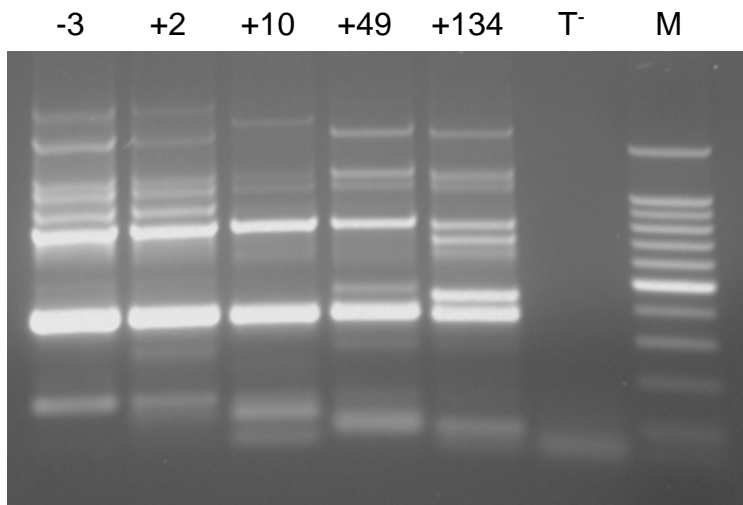
La figure 8 présente un exemple d'évolution de profil au cours du temps à partir du mutage obtenu par ISSR-PCR. Le profil de la population, représentée par la seule souche UCD 522 au moment du mutage (piste -1 et +1) se détache rapidement de ce profil de référence et évolue au cours du temps. Cela signifie qu'une autre population est bien présente en plus de la souche commerciale majoritaire au cours de la fermentation, et qu'elle prend le dessus en cours d'élevage.

Pour confirmer ce résultat, l'extraction d'ADN a été réalisée sur 20 clones provenant d'une boîte de Petriensemencée juste avant mutage. Une PCR sur les régions inter $\delta$  (selon Legras et Karst, 2003) a montré que 19 clones avaient le profil de la souche commerciale UCD522, et un seul le profil obtenu à 175 jours après mutage (figure non présentée).

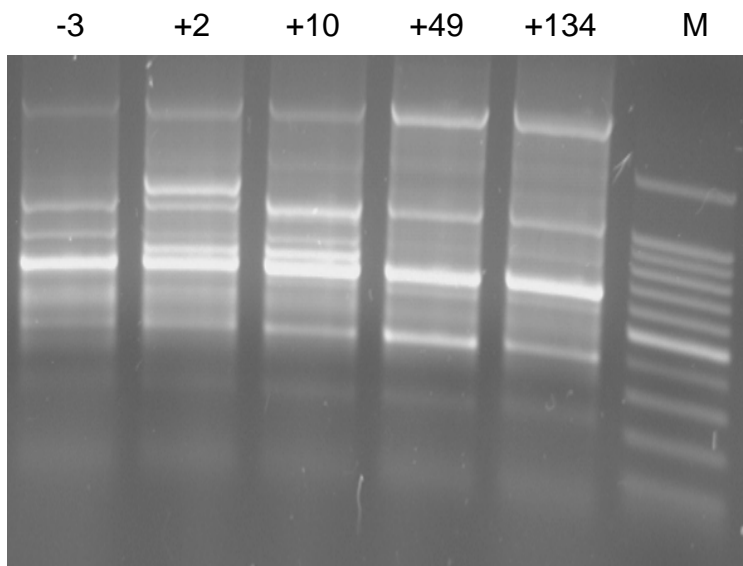
Ce qui confirme qu'une souche présente lors de la fermentation alcoolique, mais minoritaire, puisque son profil n'apparaît pas lors d'un profil réalisé sur mélange, peut



PCR inter $\delta$  (selon Legras et Karst, 2003)



PCR inter $\delta$  (selon Ness *et al.*, 1993)



ISSR-PCR avec (GTG)<sub>5</sub>

**Figure 9** : Evolution des profils génétiques d'un lot (G20) ayant subi une refermentation 134 jours après mutage obtenus selon trois méthodes différentes de PCR. Les nombres figurant en haut de chaque piste correspondent au nombre de jours séparant du mutage.

devenir majoritaire après mutage. La mort de la souche principale ayant conduit la fermentation alcoolique pourrait suffire à expliquer ce phénomène, même sans la croissance de la souche survivant. Il suffit à cette dernière de continuer à vivre. La population évolue par sélection des souches les plus résistantes aux nouvelles conditions du milieu extérieur, au détriment de la souche implantée au cours de la fermentation alcoolique. La souche inoculée était certainement adaptée au milieu tel qu'il était en cours de fermentation, mais pas au milieu riche en dioxyde de soufre et en éthanol tel qu'il est devenu.

### 1.3. Observations d'un lot particulier de refermentation

Un lot suivi au cours du millésime 2001 a subi une refermentation en barrique 134 jours après le mutage. Il s'agit du lot G20, dont les caractéristiques chimiques sont indiquées sur la figure 5. Lors de la refermentation, la teneur en éthanal a fortement augmenté, alors que la teneur en dioxyde de soufre libre a chuté à moins de 10 mg/L. Le nombre de levures responsables de ce nouveau départ en fermentation est faible par rapport à ce qui est observé lors d'une fermentation alcoolique initiale : seulement  $1,6 \cdot 10^4$  UFC/mL. Les levures responsables de la refermentation ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* par PCR spécifique. L'évolution de la population est mise en évidence sur la figure 9 montrant le changement des profils obtenus par les trois méthodes précédemment décrites. Dans les trois cas, une évolution du profil est clairement visible au cours du temps. A cette occasion, on note que la méthode PCR inter $\delta$  avec les amorces décrites par Legras et Karst (2003) est la plus adaptée à cette analyse.

Lors de la refermentation, les profils se différencient nettement de ceux observés lors de la fermentation alcoolique. Par voie de conséquence, la (les) souche(s) ayant conduit la fermentation alcoolique n'est (ne sont) pas la (les) responsable(s) de la refermentation. La conclusion du paragraphe précédent est donc la même : une certaine sélection se produit après mutage, modifiant la microflore et favorisant certaines souches par rapport à d'autres. Ce résultat est logique en raison du changement de milieu s'opérant lentement tout au long de la fermentation, puis brutalement au moment du mutage.

#### 1.4. Conclusions et perspectives

Le bilan des observations menées sur différents lots du millésime 2001 montre le rôle prépondérant que semble jouer la concentration en éthanal. Elle est élevée dès la fin de la fermentation alcoolique en raison des difficultés incontournables de ce type de vinification. Mais, plus curieusement, cette concentration augmente lentement, mais régulièrement au cours de l'élevage des vins, et de façon brutale lors d'une refermentation.

Le fait que la population se multiplie sur milieu de culture solide après plusieurs mois d'apparente stérilité du vin est également étonnant. La présence de quelques colonies de temps à autres après mutage ne peut expliquer le phénomène. Cependant, le nombre de cellules cultivables reste faible et limité aux premières semaines qui suivent le mutage. Avant refermentation, une longue période d'apparente stérilité s'installe.

Les prélèvements au cœur de la barrique pourraient également être mis en cause, sous-entendant que les levures de la refermentation sous forme cultivables sont présentes dans les lies. Pourtant, aucune refermentation n'a été observée avant le premier soutirage. Les levures des lies ont été éliminées lors des soutirages successifs. Cette incertitude a conduit à s'interroger sur le choix de la culture sur milieu solide pour le suivi de la microflore au cours de l'élevage. Giraffa (2004) insiste d'ailleurs sur le fait que la croissance sur milieu de culture solide ne révèle qu'une petite partie de la microflore réelle en écosystème naturel. Kell *et al.* (1998) suggèrent plusieurs possibilités de survie bien que l'on ne puisse récupérer les micro-organismes de leur milieu naturel sur milieu de culture, en particulier l'existence d'un état viable non cultivable, également décrit par Millet et Lonvaud-Funel (2000) dans les vins rouges.

Un certain nombre de PCR inter $\delta$  sur les cellules d'un même clone sont restées négatives. Tous les échantillons considérés n'appartiennent donc pas à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

Cela conduit à identifier les espèces de levures et leur dynamique au cours de l'élevage des vins. Il s'agira de répondre en particulier aux questions suivantes. Toutes les souches de levures sont-elles affectées de la même manière par le mutage ? Ont-elles une

capacité de survie après mutage ? Si oui, pendant combien de temps ? Il est également important de dénombrer les levures selon une autre méthode et de comparer les résultats obtenus avec les techniques classiques de dénombrement par ensemencement d'un milieu de culture solide.

Par ailleurs, l'éthanal semble jouer un rôle clef dans le processus de la refermentation, en particulier parce qu'il combine le dioxyde de soufre libre, laissant ainsi libre la microflore présente de se développer. Il est donc primordial de comprendre son origine dans les vins liquoreux : pourquoi et comment sa concentration augmente-t-elle régulièrement au cours de l'élevage ?

## **2. DE LA SURVIE DES LEVURES DANS UN ENVIRONNEMENT SULFITE**

« Il faut considérer le vin comme une infusion organique d'une composition particulière. Toutes les infusions donnent asile à des êtres organisés microscopiques. Le vin se comporte de la même façon. Telle est l'origine des altérations spontanées auxquelles il est sujet. »

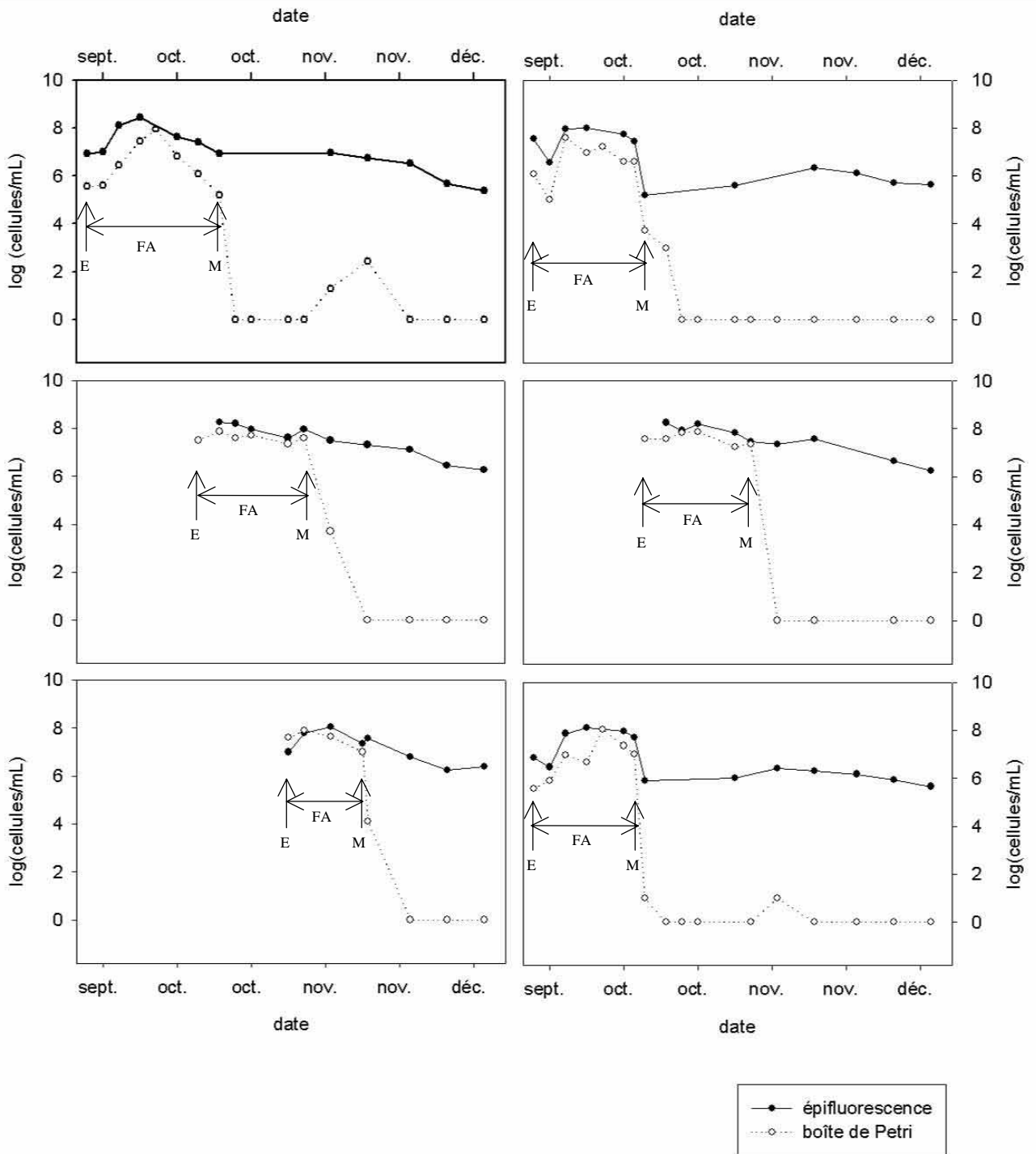
Louis Pasteur (1866)

### 2.1. Suivi microbiologique de 6 lots de vins après mutage (vendange 2002)

#### 2.1.1. dénombrement des levures du vin en début d'élevage

Lors des vinifications du millésime 2002, un total de dix lots, répartis dans six châteaux de l'appellation Sauternes, a été régulièrement suivi. L'étude de la microflore globale de ces lots de vins, fermentés en barrique avec les levures indigènes ou après ensemencement par des levures commerciales, a débuté par le dénombrement, à partir de l'entonnage, pendant la fermentation alcoolique puis pendant plusieurs mois d'élevage (jusqu'à 15 mois).

En raison des hypothèses formulées au chapitre précédent, le dénombrement a été systématiquement réalisé selon deux méthodes : la méthode de microbiologie classique qui consiste à ensemercer du vin sur milieu de culture solide en boîtes de Petri et une méthode d'épifluorescence. Pour cette dernière, la méthode développée par Chemunex a été choisie. Une comparaison de ces deux méthodes a été effectuée à chaque prélèvement.



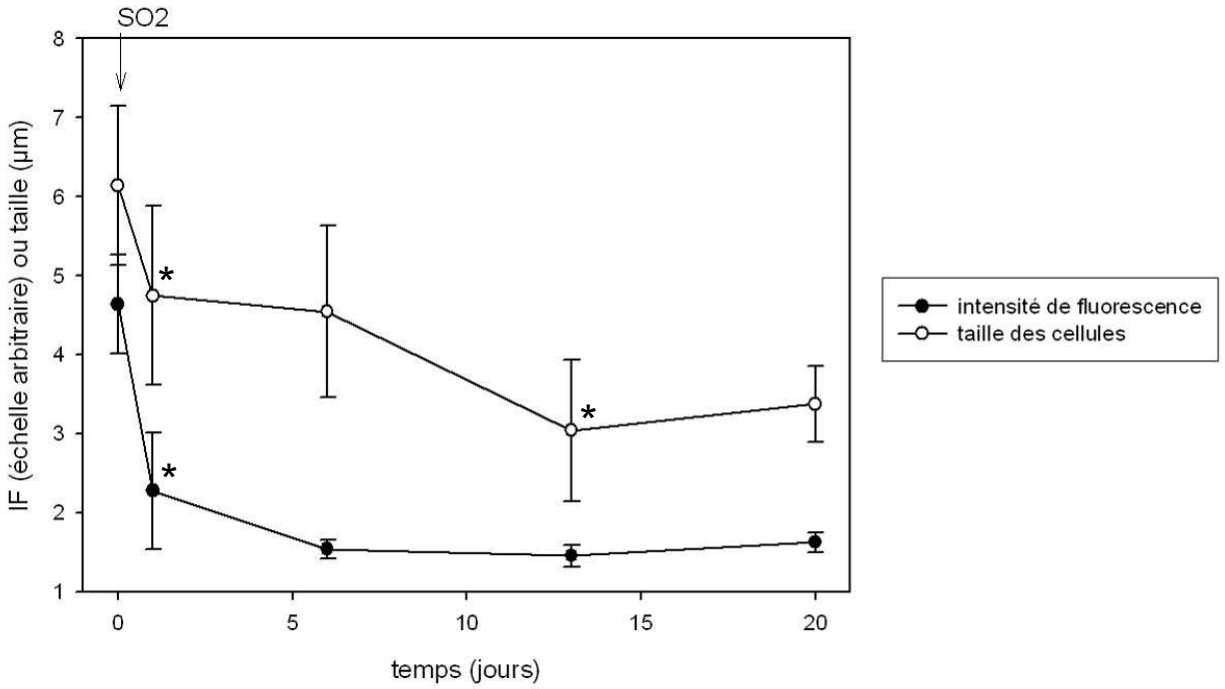
**Figure 10** : Evolution du nombre de cellules de levures vivantes totales (dénombrement par épifluorescence en cellules/mL) et du nombre de cellules cultivables (dénombrement sur milieu de culture solide en boîtes de Petri en UFC/mL) sur six lots de vin différents du millésime 2002 à partir des vendanges et jusqu'à la mi-décembre. E : Entonnage, M : Mutage, FA : Fermentation alcoolique. La valeur 0, choisie pour la clarté du graphique, correspond en réalité à un nombre indétectable (inférieur à 10 UFC/mL).



La figure 10 présente l'évolution au cours des premières semaines du nombre de levures vivantes totales (dénombrées par épifluorescence) et du nombre de levures cultivables (méthode classique) pour six des lots suivis (un par château). Les six graphiques sont semblables ; il en est de même pour les quatre autres non présentés. Sur chaque graphique, trois phases sont clairement visibles. Tout d'abord, une phase de concordance des deux courbes, correspondant au temps de la fermentation alcoolique, apparaît. Le nombre de cellules/mL mesuré par épifluorescence est, en général, supérieur à celui dénombré par culture d'une puissance de 10. Cette observation a déjà été faite par Millet et Lonvaud-Funel (2000). Néanmoins, il est impossible de déterminer si l'épifluorescence surestime le nombre de cellules, ou bien si la culture sous-estime ce même nombre. Après cette première phase de concordance, une courte phase de discordance relative commence à partir du mutage. A cette date, les deux courbes s'individualisent : le nombre de cellules vivantes totales demeure élevé alors que celui du nombre de levures cultivables atteint très rapidement un seuil non détectable (inférieur à 10 UFC/mL). A partir de ce moment, une dernière phase continue de discordance absolue s'installe. Tandis que le nombre de cellules vivantes totales diminue légèrement pour atteindre lentement une valeur comprise entre  $10^5$  et  $10^6$  cellules/mL, le nombre de levures cultivables se stabilise à une valeur inférieure à 10 UFC/mL : il est ainsi impossible d'isoler la moindre colonie par culture.

Les trois phases constituent les phases d'entrée en état viable non cultivable définies par Kell *et al.* (1998). Le simple dénombrement au cours des premières semaines d'élevage de différents lots de vin confirment donc les premières hypothèses sur l'existence de levures vivantes, mais incapables de former des colonies par culture sur milieu solide, et donc d'être isolées.

Le même type de graphiques comportant les trois phases a été enregistré sur tous les lots du millésime 2003 suivis, confirmant ainsi les observations du millésime précédent à partir du mutage. Le modèle proposé se répète donc chaque année et n'est pas le simple fait d'une année particulière. Il s'agit d'un comportement habituel des levures en réponse à l'ajout massif de dioxyde de soufre.



**Figure 11** : Evolution de l'intensité de fluorescence (IF) et de la taille des cellules de levures dans un lot de vin, suite à l'addition de dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>). \* : Point significativement différent du précédent (ANOVA, seuil 1%).

### 2.1.2. Analyse des images d'épifluorescence

La prise de photographies de nombreux champs de microscope des cellules sous épifluorescence a permis d'analyser aisément les images. L'observation à l'œil nu de la diminution progressive de l'intensité de fluorescence des cellules au cours du temps a conduit à mesurer de manière plus objective et plus précise la perte d'intensité de fluorescence. Cette mesure a été possible grâce au logiciel Olympus-DP-Soft qui permet après traitement informatique de l'image en différentes intensités de noir et blanc, de mesurer l'intensité lumineuse de différents points. Toutefois, à mesure que l'intensité de fluorescence des cellules diminue, celle du bruit de fond augmente inversement. C'est pourquoi, afin de pouvoir établir une comparaison entre les différentes photographies, une mesure moyenne de l'intensité du bruit de fond (sur une centaine de points) a été retranchée à celle des cellules. Ainsi, une mesure objective a pu être effectuée. Elle confirme les résultats visualisés à l'œil nu : la chute significative de l'intensité de fluorescence des cellules est clairement mise en évidence (figure 11). Or, l'apparition de fluorescence est due à une hydrolyse enzymatique du diacétate de fluoresceine en fluoresceine. Il semble concevable que sa chute révèle celle de l'activité d'hydrolyse des cellules, donc selon toute probabilité, une diminution de l'activité enzymatique globale des cellules et par extrapolation une diminution de la vitalité des cellules. Par conséquent, il est probable que la diminution de l'intensité de fluorescence générale puisse être mise en relation avec la diminution de l'activité des levures.

L'observation à l'œil nu des images d'épifluorescence montrait aussi une diminution de la taille des cellules. Elle a également été mesurée grâce au logiciel Olympus-DP-Soft. Cette mesure, présentée sur la figure 11, a confirmé les premières observations visuelles : la taille des cellules de levures diminue de manière significative suite à l'addition de dioxyde de soufre dans le vin. La taille chute de moitié, les cellules passant de 6  $\mu\text{m}$  à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne. La notion de diamètre est quelque peu abusive toutefois, car au fur et à mesure de l'avancement de l'élevage des vins, non seulement la taille des cellules diminue, mais en plus, la déformation des cellules s'accroît. Les mesures de taille correspondent à la partie la plus allongée des cellules. La figure 11 présente les résultats d'un lot particulier du millésime 2002. Cette observation est généralisée non seulement aux autres lots de la même année, mais aussi aux lots suivis lors des vinifications du millésime 2003.

Les deux phénomènes mis ici en évidence, diminution de l'activité générale et diminution de la taille des cellules confirment l'hypothèse de levures survivant dans les vins après addition de dioxyde de soufre dans un état physiologique similaire à l'état viable non cultivable décrit chez les bactéries. En effet, les deux caractéristiques relatées dans ce paragraphe sont les critères de distinction de cellules à l'état viable non cultivable (Oliver, 1993).

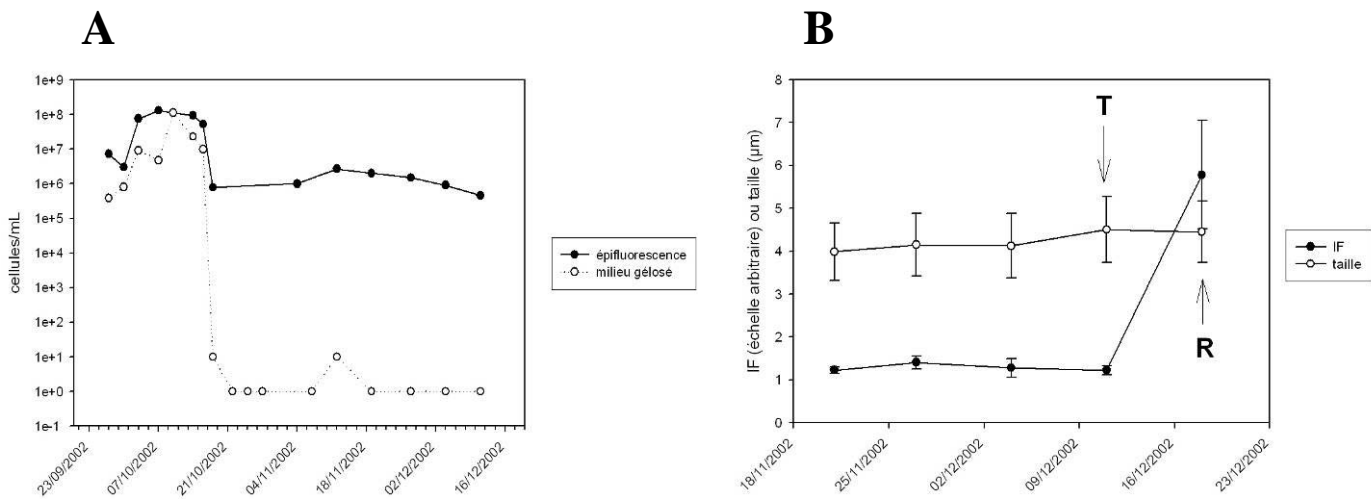
### 2.1.3. Possibilité de réversibilité du phénomène

#### • **résurrection en condition réelle**

L'affirmation de l'existence d'un l'état similaire à l'état VNC bactérien chez les levures du vin, ne peut être validée que si ces levures possèdent également une capacité de sortie de cet état. C'est-à-dire qu'elles recouvrent leur possibilité de multiplication, mise en évidence par la formation de colonies par culture sur milieu solide.

Les premières tentatives ont consisté à ajouter de l'éthanal dans le vin pour annuler le stress créé par la présence de dioxyde de soufre, en combinant sa fraction libre. Elles se sont conclues par un échec. La sortie de l'état VNC ne semble pas être si simple. Certains auteurs révèlent la difficulté de cette opération. En effet, Lleó *et al.* (2001) affirment que « plus on attend pour re-vivifier des cellules VNC, plus le nombre de cellules re-vivifiables est faible ».

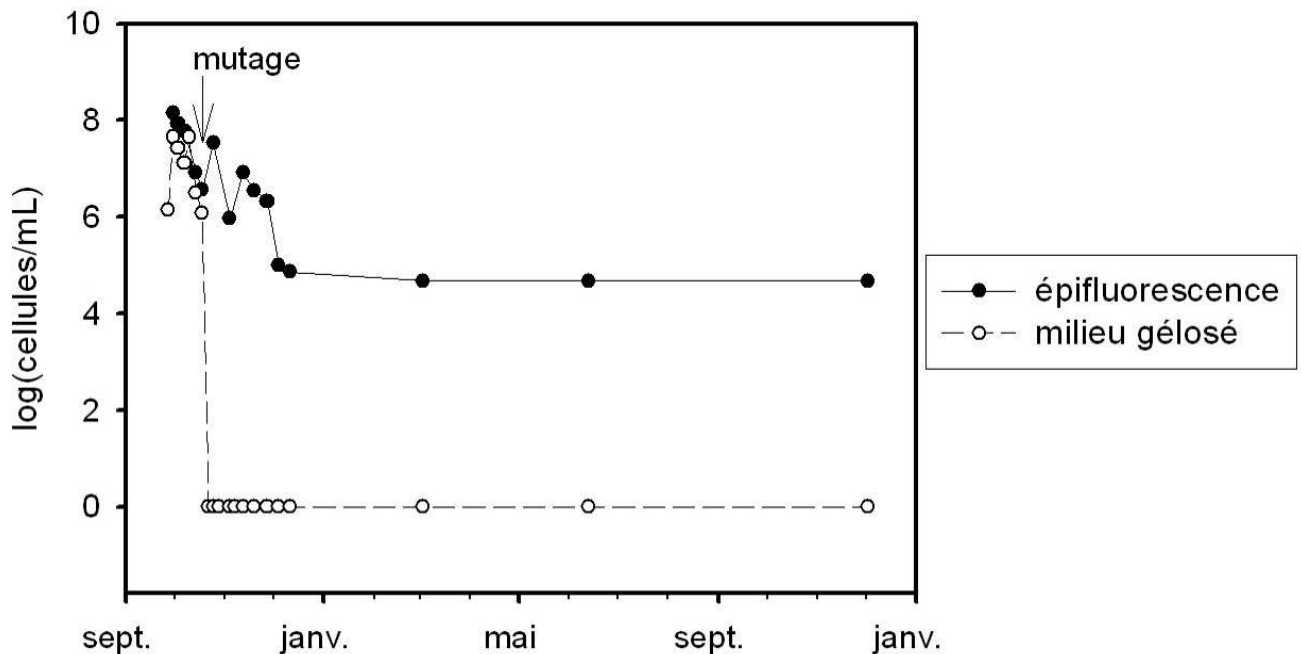
Différentes méthodes ont été tentées et toutes se sont soldées par un échec dans un premier temps : ajout d'extrait de levure (pour augmenter la concentration en azote du milieu), de sucres (glucose et/ou fructose), ou agitation. Ces échecs ont mené à la conclusion que la sortie de l'état VNC ne pourrait pas être induite par l'ajout de quelque nutriment, mais peut-être plutôt par la simplification du milieu. Il est en effet envisageable que, si le dioxyde de soufre a déclenché l'entrée en VNC, il n'est en fait qu'un stress supplémentaire dans un milieu particulièrement hostile. Les éléments les plus toxiques sont probablement l'éthanol et la pression osmotique. La sortie rapide de l'état VNC pourrait survenir si la toxicité dans son ensemble de tous ces facteurs était diminuée. Cette hypothèse est renforcée par la constatation que des levures stressées ne forment pas de colonies dans des milieux de culture trop riches ; la seule annulation du stress créé par le dioxyde de soufre ne suffit donc pas à les ramener à un état cultivable dans ces milieux. C'est d'ailleurs en cela qu'Oliver (1993) différencie les



**Figure 12** : Entrée et sortie de l'état VNC des levures d'un lot de vin.

A : Entrée en VNC : chute du nombre de levures cultivables à un seuil indétectable, chute de l'intensité de fluorescence et de la taille des cellules

B : Augmentation de l'intensité de fluorescence (IF), recouvrement de la capacité à former des colonies sur milieu solide (R), T : transfert en milieu moins stressant



**Figure 13** : Dénombrement des levures dans un lot de vin en barrique pendant 15 mois selon deux méthodes : la méthode classique de culture sur milieu solide et l'épi-fluorescence.

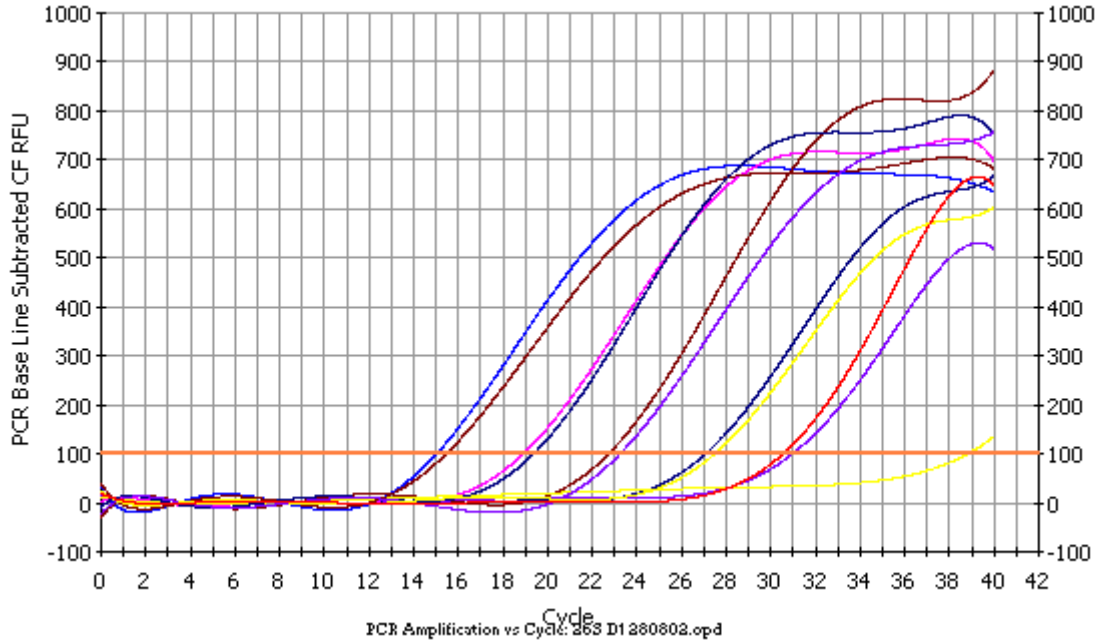
cellules carencées des cellules VNC pourtant révélées par un même symptôme ; les cellules carencées recouvrent leur capacité à se multiplier dès que la carence est levée, alors que les cellules VNC ne retrouvent pas cette capacité dès que le stress est annulé.

Mais l'importance du facteur temps est également apparue. Jamais aucune re-fermentation n'est recensée dans les premières semaines qui suivent le mutage, si celui est correctement réalisé. Un certain temps d'adaptation semble donc nécessaire. Après diverses tentatives (dilutions dans l'eau, dans du YPG dilué...), un recouvrement de la capacité à former des colonies sur milieu de culture solide est apparu après quelques jours d'attente, après dilution au cinquième du vin dans du jus de raisin lui-même dilué au demi dans de l'eau. Ce résultat n'a été possible qu'à partir du mois de décembre (soit environ deux mois après le mutage) et pas dans tous les lots. La figure 12 présente ce résultat par l'augmentation de l'intensité de fluorescence. Parallèlement, la possibilité de former à nouveau des colonies a été constatée à partir du moment où l'intensité de fluorescence a quitté sa ligne de base. Les cellules ainsi revivifiées n'augmentent pas de taille, mais les observations ont été stoppées dès que la sortie de l'état VNC a été constatée. Le facteur temps joue probablement encore un rôle dans ce phénomène, mais il n'a pas été approfondi.

D'autre part, cette re-vivification n'a été possible que sur certains lots et n'a concerné que des levures fermentaires (*Saccharomyces cerevisiae* ou *Zygosaccharomyces sp.*) et parfois des levures oxydatives (*Rhodotorula mucilaginosa*), les identifications ayant été réalisées par PCR-RFLP ciblant la région *ITS1-5,8S ARNr-ITS2* (non montrées).

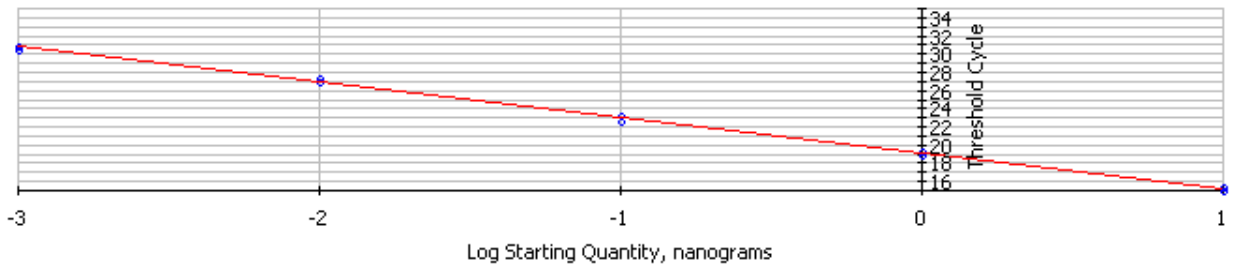
#### 2.1.4. Dénombrement sur le long terme

Une barrique d'un lot de vin du millésime 2002 a été conservée pendant 15 mois sans subir d'assemblage avec d'autres lots afin de permettre un dénombrement sur le long terme des levures. Le but était de contrôler la survie des levures VNC dans le temps. La figure 13 présente le résultat du dénombrement des cellules de ce vin pendant 15 mois selon les deux méthodes précédemment citées : la méthode classique et l'épifluorescence. D'après les résultats donnés par la méthode classique, aucune cellule n'a été capable de former une colonie quel que soit le prélèvement depuis les premiers jours qui ont suivi le mutage. L'épifluorescence donne des résultats nettement différents : des cellules conservent une certaine activité basale révélée par leur capacité à hydrolyser le diacétate de fluoresceine.

**A****B**

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,916 Intercept: 19,153  $Y = -3,916 X + 19,153$   
 PCR Efficiency: 80,0 %

□ Unknowns  
 ● Standards



**Figure 14** : Exemple d'amplification d'une gamme de concentration d'ADN composée de dilutions d'ADN au dixième successives (A). Courbe étalon correspondante (B)

Cependant, le chiffre est imprécis : globalement, une cellule par champ de microscope est visible, ce qui avoisine les  $10^4$  cellules/mL. La solution consistant à filtrer un volume de vin plus important pour accentuer la précision de la mesure se heurte en effet à un problème technique : le manque de filtrabilité des vins liquoreux sur des membranes possédant des pores de  $0,45 \mu\text{m}$ .

Néanmoins, le résultat de ces dénombrements est sans appel : de nombreuses cellules de levures restent viables mais non cultivables dans le vin, même après de nombreux mois d'élevage, avec une densité de population avoisinant les  $10^4$  cellules/mL.

## 2.2. Evolution de la diversité des espèces au cours de l'élevage

Suite aux premières observations, il a paru nécessaire d'identifier les espèces de levures survivant à l'addition massive de dioxyde de soufre dans le vin. Mais, la suspicion de levures viables mais non cultivables a conduit à envisager des techniques d'identification permettant de s'abstenir de la culture préalable des cellules.

### 2.2.1. Essai d'utilisation de la PCR en temps réel : identification des différentes espèces par température de fusion des amplifiats

Dans la PCR en temps réel, telle qu'elle a été envisagée, la cible est une région hypervariable de l'ARNr 25S. Les amorces NL1 (dépourvu de GC-clamp) et LS2 ont été utilisées pour amplifier la région D1 de toutes les levures. Cet amplifiat étant de séquence variable selon les espèces, la température de fusion de ces amplicons est variable. Elle peut être mesurée en diminuant régulièrement la température toutes les 10 s, partant de  $95^\circ\text{C}$  pour arriver à la température d'hybridation des amorces utilisées pour la PCR. A cette dernière température, tous les fragments d'ADN amplifiés sont dénaturés. La température de fusion d'un amplifiat correspond à la moitié de la phase exponentielle de chute de la fluorescence lors de la descente en température. Elle est mesurée en représentant l'opposée de la dérivée de cette courbe en fonction de la température.

Une PCR préalable sur gradient a permis de choisir la température d'hybridation des amorces à  $64,5^\circ\text{C}$ , pour un optimum d'amplification spécifique et un minimum d'amplification de produits aspécifique. Dans le même objectif, la concentration en  $\text{MgCl}_2$  a été augmentée jusqu'à 3 mM.



```

Sb      AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
Sc      AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
Zb      AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
Dh      AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
Pa      -----GGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
Bc      -AACCAACAGGGATTACCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGTAAGCTCAAATTTGAAAT
Sp      AAAATAACCATGATTCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT
Bb      AAACCAACAGGGATTGCCCAAGTAATGGCGAATGAAGCGGCAAGAGCCCAATTTGAAAT
Cs      AAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAACAGGCAAGAGCTCAGATTTGAAA-
          **** *  ***** ***** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

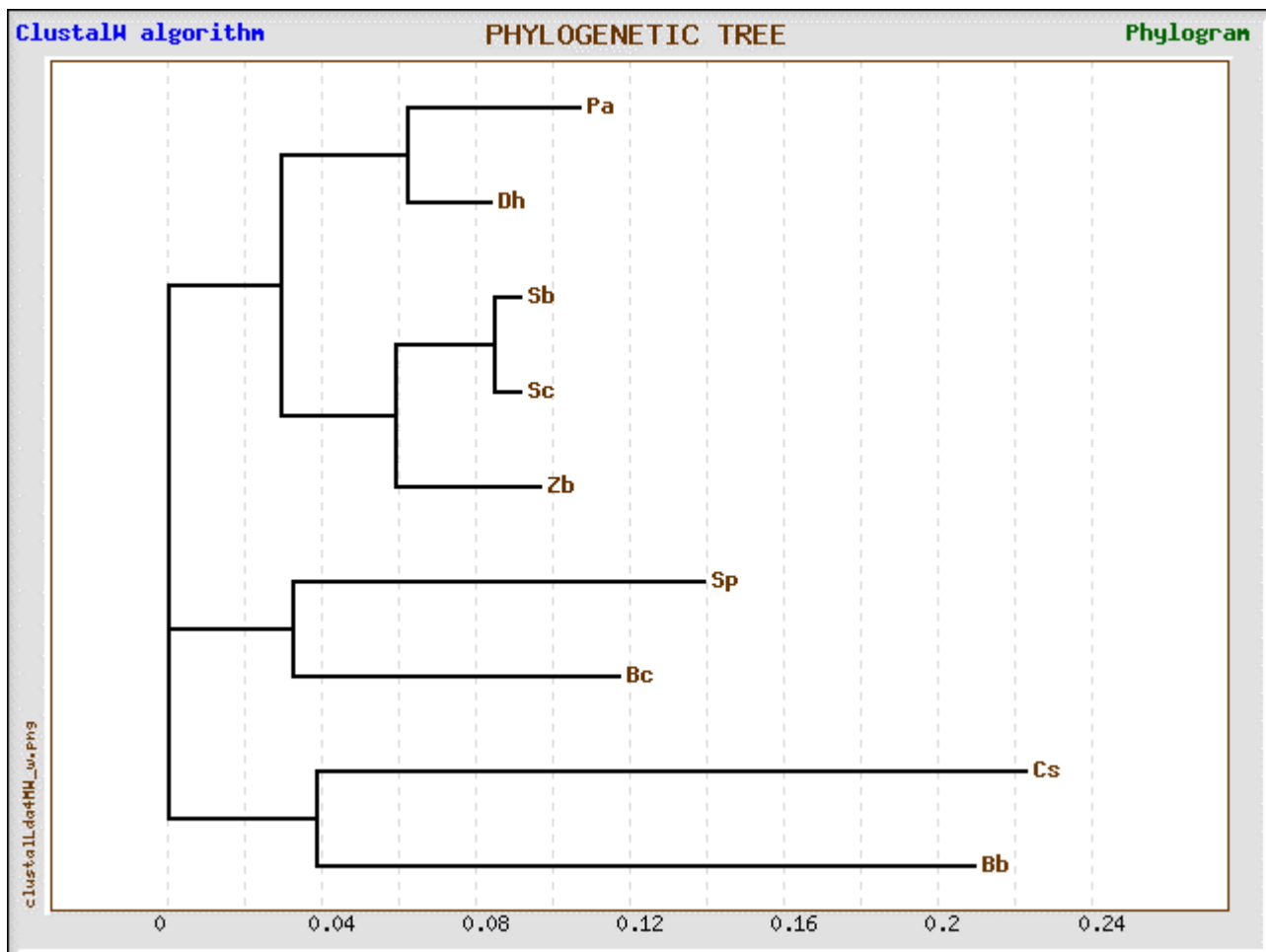
Sb      CTGGTA-----CCTTGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGACCGTT
Sc      CTGGTA-----CCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTT
Zb      CTGGTA-----CCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAAGGCGACTCTGGGGCTGGT
Dh      CTGGCA-----CCTTCGGTGTCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCTTTGGAGTTGGC
Pa      CTAGCA-----CCTTCGGTGTCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTTGGGKTTGGC
Bc      CTGGCT-----CTTTAGAGTCCGAATTTGTAATTTGTAGAAGATG-CTTCGGGTGTGGT
Sp      CTGGCAACATTTCTTTTGTGTCCGAGTTGTAATTTCAAGAAGCTG-CTTTGAGTGTAGA
Bb      CGGGCAA-----CCGAGTTGTAATTTGGAGACGG-GACACTAGAGAGGAG
Cs      --GGCA-----CTT--GTGCC---ATTGTATTCTGAAGTTAGGATTCCTTGAACCGA-
          *                               ***** *  *  *  *

Sb      C--CTTGTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGT--GTGGCG
Sc      C--CTTGTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGT--GTGGCG
Zb      C--CTTGTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGT--ATGGCG
Dh      T--CTTGTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGT--GCGATG
Pa      T--CTTGTCTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGT--CTGATG
Bc      T--CCGGTCTAAGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGTGACT
Sp      CGATCGGTCTAAGTTCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAACCCCGTCTTTGGTC
Bb      GAAGGCGATTAAAGTGCCTTGGAACAGGCTGCCGTAGAGGGTGAGAGCCCGTGAATCGCT
Cs      -----TACCTAAGTTTCTGGAAAGAAACGCCATAGAGGGTGATAGCCCGT--ACGGTA
          ** *  ***** *  *  ***** *  *  *  *

Sb      AGGAGTGCGGTTCTATGTAAGTGCCTTCGAAG
Sc      AGGAGTGCGGTTCTTTGTAAGTGCCTTCGAAG
Zb      AGGATCCCAGTTCTTTGTAGAGTGCCTTCGAAG
Dh      AGATGCCCAATTCTATGTAAGTGCCTTCGAAG
Pa      AGATGCCCAATCCTATGTAAGTGCCTATCGAAG
Bc      GGATACCTATGCTCATGTGAAGCTCTTTCGACG
Sp      GATTGGATA-TGCCATATAAAGCGCTTCGAAG
Bb      GGAGACCGA--TCAAT-TAGTGC-CCGCCGAAG
Cs      -----TTGACCCAATATAGTTTCTAACATGG
          *  *  *  *  *  *

```

**Figure 15** : Alignement des séquences de la région D1 de l'ADNr 25S pour 8 espèces de levures et *Botrytis cinerea*. Pa : *Pichia anomala*, Zb : *Zygosaccaromyces bailii*, Sp : *Schizosaccharomyces pombe*, Bb : *Brettanomyces bruxellensis*, Cs : *Candida stellata*, Sb : *Saccharomyces bayanus*, Sc : *Saccharomyces cerevisiae*, Dh : *Debaryomyces hansenii*, Bc : *Botrytis cinerea*.



**Figure 16** : arbre phylogénétique obtenu à partir de l'alignement multiple représenté sur la figure 15. Obtenu sur GeneBee services, Belozersky Institute, Moscow State University)

```

Sb      --TGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTG
Sc      --TGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTG
Zb      AGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTG
Bb      AGTGAAATAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTTGATCCGACATGGTGTGTTAG
Pa      ---TGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTGTTTA
Dh      --TGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTTG
Bc      --TTAAACAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTGCAATCAGACTTG-CACTTGG
Sp      --TTAAATAGTACGTGAAATTGCTGAAAGGGAAGCATTGAAATCAGTCTTACCTGGGTG
Cs      --TGAAATAGTACGTGAAATTGTTGAAATGGAAGGGTAGGCTGCTAACCATGTAGAACC
          ** ***** * *

Sb      C-GCCC-TCTGCTCCTTGTGGG-TGGGGGAATCTCGCAGTTCCTGAGCCAGCATCAGTT
Sc      T-GCCC-TCTGCTCCTTGTGGG-TAGGGGAATCTCGCATTTCTGAGCCAGCATCAGTT
Zb      C-GCCC-CTCGCCTCTCGTGGG-TGGGGGAATCTCGCAGTTCCTGAGCCAGCATCAGTT
Bb      CAGCGG-CCCGTTCCTCGTGGG-TGGGTGCACCTGGT-TTACACTGGGCCAGCATCGGTT
Pa      CGATTA-TCTTCTCTTCTTGAG-TTGTGCACTCGTATTTAC--TGGGCCAGCATCGATT
Dh      CGATC---CTTTCCTTCTTGGT-TGGGTTCCTCGCAGCTTAC--TGGGCCAGCATCGGTT
Bc      TGTTCA-TCAGGGTCTCGTACC-CTGTGTACTTCATCAAGTT--CAGGCCAGCATCAGTT
Sp      AGATCAGTAGTCTCTTCGCGAGACTATGCACTCTGAACCTGTGGTAGGTCAGCATCAGTT
Cs      TGTTTGGGGGAAGATAAAAAGC--TGCAGAACGTAACCTCCTC----GG--AGCATTATAG
          * * * * *

Sb      TTGGTGGCAGGATA-AATCCGTAGGAATGTAAGTT----GCTTCGGGAAGTA-----TT-
Sc      TTGGTGGCAGGATA-AATCCATAGGAATGTAGCTT----GCCTCGGTAAGTA-----TT-
Zb      TTGGCGGCAGGATA-AATCCCTGGGAATGTAGCTCTACCCTTCGTGGCGGACGAAGTT-
Bb      CTGGGAGCCATATACGGGGTTCGTGAATGTGGCCCTTCGATTCTGTCCGAGG--GTGTT-
Pa      CCGATGGCAAGATAAATGGCA-GTTGAATGTGGCTTAC---TTCGGT----GGAGTGT-
Dh      TGGATGGTAGGATAATGACT-AAGGAATGTGGCTTAC---TTCGGT----GGAGTGT-
Bc      TGAGTGGTAGATAAAGGCTTAGAGAAATGTGGCCCT-C---TTCGG----GGGTGTT-
Sp      TTCGGGGGGCGAAAAAAGAAATAGGGAAGGTGGCTTTCGGGGTTCGCTGGGGAGTGT-
Cs      CTGCAGTCCATATTCCTC-CGAGCGGAGGATCTCAGGTTCTACTAAATGGTG-GTCT
          * * * * *

Sb      ATAGCCTATGGGA--ATACTG-CCAGCTGGGACTGAGGACTGCG---ACGTA-AGTCAAG
Sc      ATAGCCTGTGGGA--ATACTG-CCAGCTGGGACTGAGGACTGCG---ACGTA-AGTCAAG
Zb      ATAGTCCAGGGGA--ATACTG-CCAGCTGGGACTGAGGAATGCG---ACTTTTAGTCAAG
Bb      ATAGCGGGACAT--CTTGTGGCTAGCCGGGACCGGGACTGCGGTGACTTGTACCAAG
Pa      ATAGCTTCTGCTG--ATATTG-CCTGTCTGGATCGAGGGC-----
Dh      ATAGCCTTGGTTG--ATACTG-CCTGTCTAGACCGAGGACTGCG---TCTTTGA--CTAG
Bc      ATAGCTCTAGGTGCAATGTAG-CCTACTTGGACTGAGGACCGCG---CTTCGG--CTAG
Sp      ATAGCCCTTGTGTAATACGT-CCACTGGGACTGAGGACTGCG---GCTTCGTGCCAAG
Cs      ACCAC-----
          *

Sb      GATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGC-----
Sc      GATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGC-----
Zb      GATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGC-----
Bb      GATGCTGGCAGAACGAGCAAAATACCAC-----
Pa      -----
Dh      GATGTTGGCATAATGATCTTAAGCCAC-----
Bc      GATGCTGGCGTAATGGTTGTAAGCGACCCGCTTGAACACCCNGCCA
Sp      GATGCTGACATAATGG-----
Cs      -----

```

**Figure 17** : Alignement multiple des séquences de la région D2 de l'ADNr 25S de 8 espèces distinctes de levures et de *Botrytis cinerea* (légende : voir figure 15)

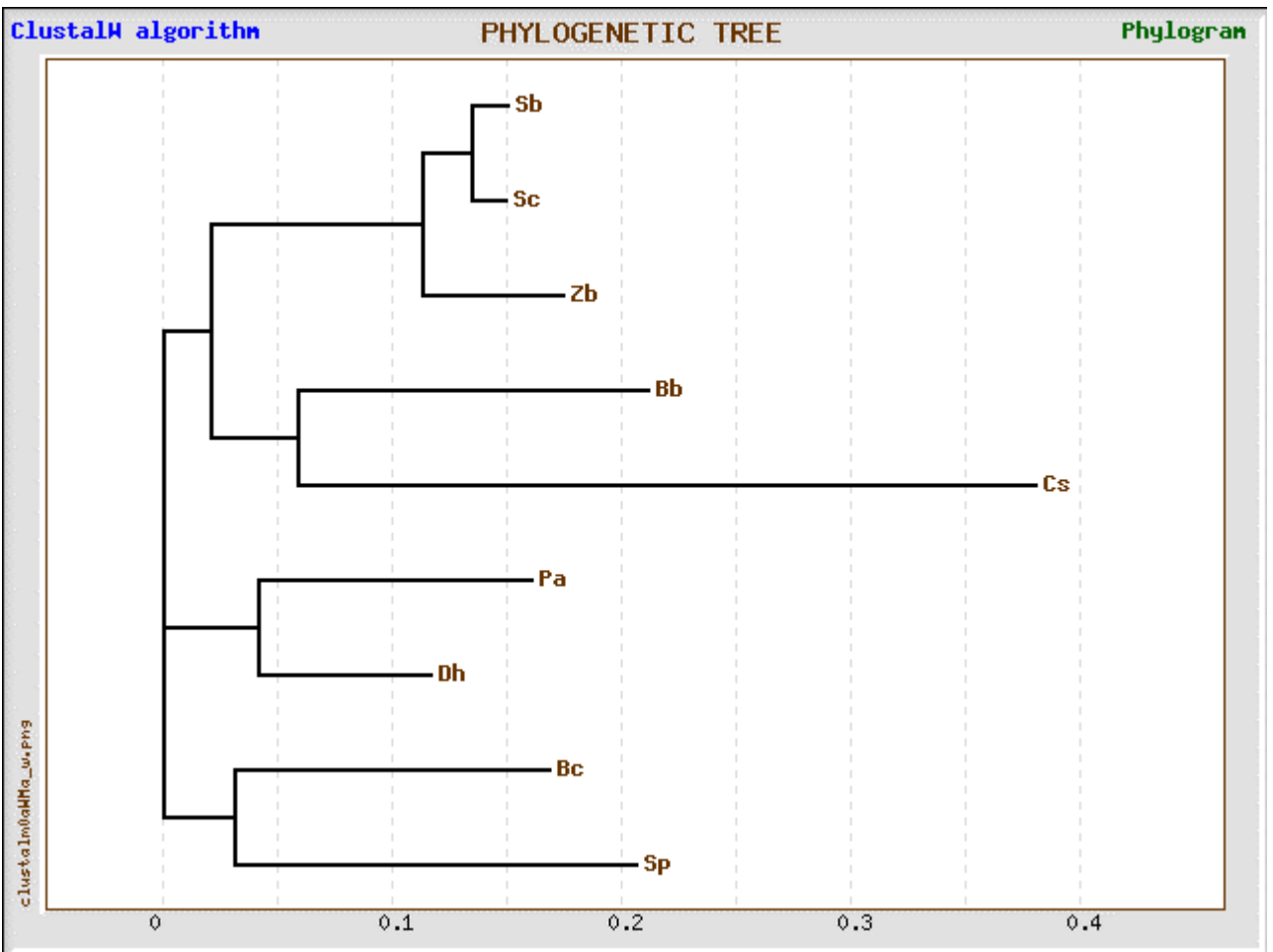
A l'aide d'une gamme étalon d'ADN connu, une possibilité de quantifier chaque ADN (donnant ainsi une idée du nombre de cellules par mL) pouvait être envisagée.

#### • Quantification de l'ADN

La figure 14 montre un exemple d'amplification d'une gamme de concentration d'ADN avec des dilutions au dixième, et la courbe standard correspondante. La température de fusion de chaque amplifiat est de  $87,6 \pm 0,3$  °C ; les écarts de 0,3 °C sont compatibles avec l'erreur possible de l'appareil entre deux mesures. Les caractéristiques de la courbe standard (coefficient de corrélation de 0,999 et une efficacité de 80 %) étant acceptables, permettaient donc d'envisager l'utilisation de cette méthode pour quantifier l'ADN des levures survivant dans le vin. L'efficacité de la PCR est un peu faible. Une diminution du temps d'élongation aurait peut-être permis de l'augmenter.

#### • Identification des espèces par amplification de la région D1

D'autres expériences ont été menées sur l'ADN de sept espèces de levures (*Pichia anomala*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces bayanus*, *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces cerevisiae*) ainsi que sur celui de *Botrytis cinerea*. L'amplification par PCR en temps réel de ces ADN avait pour but d'évaluer la température de fusion de l'amplifiat pour chaque espèce. L'alignement multiple des séquences amplifiées des huit espèces auxquelles a été ajoutée *Candida stellata* et l'arbre phylogénétique correspondant ont été représentés respectivement sur les figures 15 et 16. Pour les mêmes conditions de PCR, chaque échantillon a été triplé et les résultats de température de fusion ( $T_m$ ) ont été reportés sur le tableau XIV. Cette expérience a été répétée une seconde fois et a fourni les mêmes résultats. Trois groupes nommés arbitrairement A, B et C ont été séparés selon la température de fusion. Au sein d'un groupe pour chaque espèces, la température de fusion est identique (différence inférieure ou égale à l'erreur potentielle de la machine : 0,3°C). Le groupe A est composé de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* et *Zygosaccharomyces bailii*. Le groupe B se compose de *Pichia anomala*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaryomyces hansenii* et *Botrytis cinerea*. Enfin, le groupe C ne contient que *Brettanomyces bruxellensis*. En fait, ces regroupements correspondent parfaitement à l'éloignement phylogénétique traduit sur l'arbre représenté sur la figure 16. On peut donc penser que l'espèce *Candida stellata* se trouverait dans le groupe C. La même expérience a été réalisée sur plusieurs souches de deux espèces et



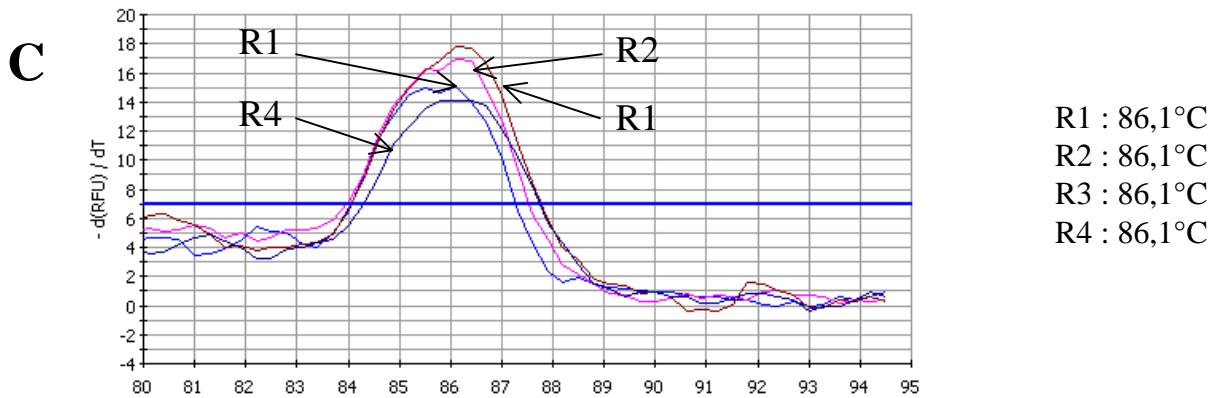
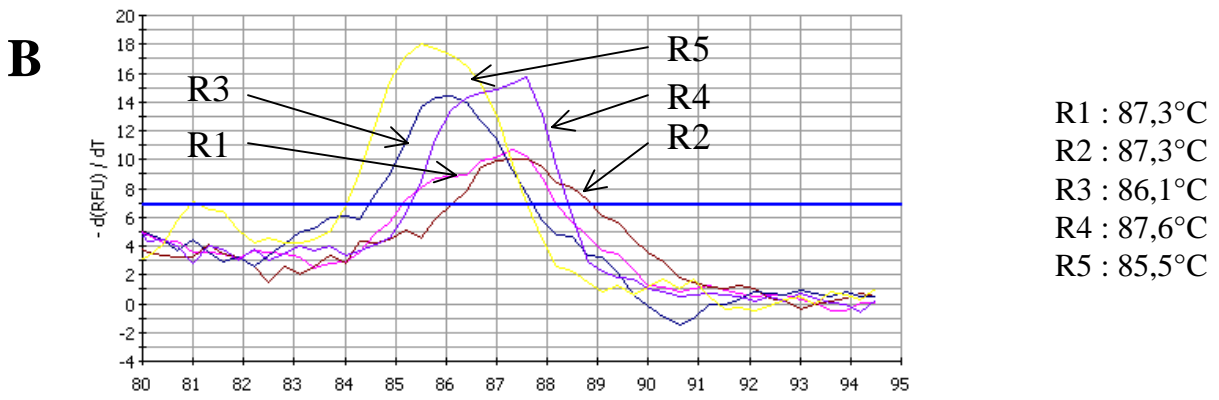
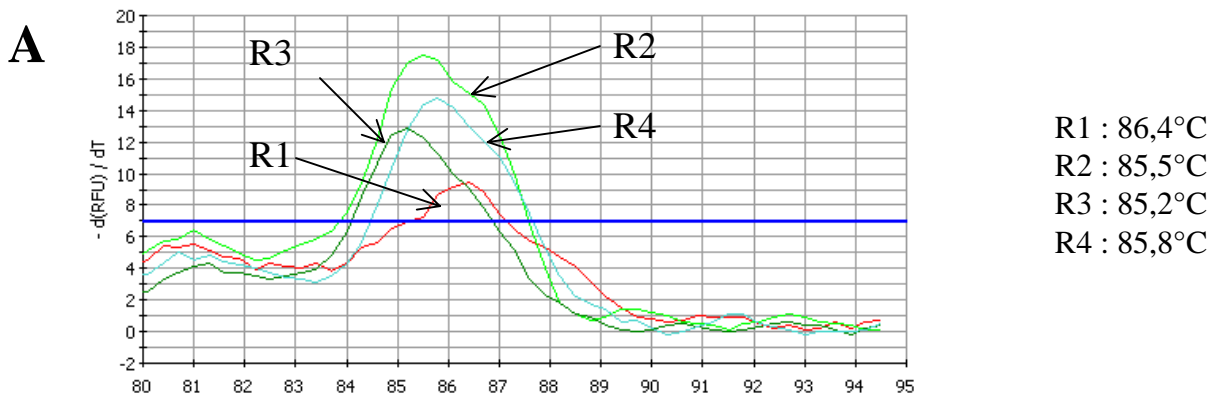
**Figure 18** : Arbre phylogénétique basé sur l'alignement multiple présenté sur la figure 17.

**Tableau XIV** : Températures de fusion des amplifiats de la PCR en temps réel ciblant la région D1 de l'ADNr 25S et regroupement des espèces par Tm obtenus.

<b>espèce</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Groupe</b>
<i>S. cerevisiae</i>	87,9	<b>A</b>
	87,9	
	87,9	
<i>S. bayanus</i>	88,2	<b>A</b>
	87,9	
	87,9	
<i>Z. bailii</i>	87,9	<b>A</b>
	87,9	
	87,9	
<i>P. anomala</i>	86,7	<b>B</b>
	86,4	
	86,4	
<i>S. pombe</i>	86,4	<b>B</b>
	86,4	
	86,4	
<i>B. cinerea</i>	86,4	<b>B</b>
	86,1	
	86,4	
<i>D. hansenii</i>	86,7	<b>B</b>
	86,4	
	86,4	
<i>B. bruxellensis</i>	89,1	<b>C</b>
	88,8	
	88,8	

**Tableau XV** : Températures de fusion des amplifiats de la PCR en temps réel ciblant la région D2 de l'ADNr 25S et regroupement des espèces par Tm obtenus.

<b>espèce</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Groupe</b>
<i>S. cerevisiae</i>	87,6	<b>A</b>
	87,6	
	87,6	
<i>S. bayanus</i>	88,2	<b>A</b>
	88,2	
	88,2	
<i>Z. bailii</i>	89,1	<b>B</b>
	89,1	
	89,1	
<i>P. anomala</i>	87,6	<b>A</b>
	87,3	
	87,3	
<i>S. pombe</i>	88,2	<b>A</b>
	88,2	
	88,2	
<i>B. cinerea</i>	88,2	<b>A</b>
	88,5	
	88,2	
<i>D. hansenii</i>	87,6	<b>A</b>
	87,6	
	87,6	
<i>B. bruxellensis</i>	90,9	<b>C</b>
	90,9	
	90,9	



**Figure 19** : Courbes de fusion des amplifiats par PCR en temps réel des ADN extraits des micro-organismes présents à la surface des baies de raisin à trois dates différentes. La figure 2.2.2. (6) présente des photographies des raisins. A droite des courbes ont été notées les températures de fusion moyenne des amplifiats. A : 27/09/02, B : 04/10/02, C : 07/11/02. En abscisse figurent les températures de fusion en °C.



**A**



**B**



**C**



**Figure 20** : Grappes de raisin de la surface desquelles ont été extraits les micro-organismes analysés à la figure 19. A : 27 septembre 2002, B : 04 octobre 2002, C : 07 novembre 2002.

les résultats sont toujours équivalents à 0,3°C près (souches de *Pichia anomala* utilisées : CBS 2499, CBS 2496 et CBS 2497, obtention d'un  $T_m = 86,4 \pm 0,3$  °C; souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées : 2056, UCD522 et ZymafloreST, obtention d'un  $T_m = 87,9 \pm 0,3$ °C).

La PCR en temps réel pourrait donc séparer les différentes espèces de levures couramment décrites dans les vins liquoreux en trois grands groupes. Cependant, elle ne permet pas d'identifier plus précisément les espèces.

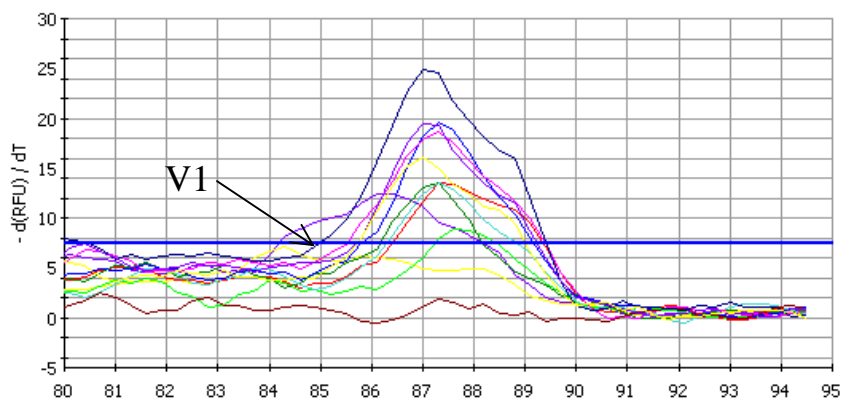
#### • Identification des espèces par amplification de la région D2

Une autre région a donc été ciblée afin d'affiner l'identification. La région D2 de l'ADNr 25S a été choisie. Les figures 17 et 18 représentent respectivement l'alignement multiple des mêmes neuf espèces et l'arbre établi. Le tableau XV montre les températures de fusion obtenues en triple pour les huit espèces étudiées, et les trois groupes qui s'en dégagent. Le groupe A est constitué de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Pichia anomala*, *Debaryomyces hansenii*, *Schizosaccharomyces pombe* et de *Botrytis cinerea*, le groupe B de *Zygosaccharomyces bailii* et le groupe C de *Brettanomyces bruxellensis*. Cette fois-ci les groupes sont peu en accord avec l'arbre phylogénétique obtenu précédemment. Les espèces *Zygosaccharomyces bailii* et *Brettanomyces bruxellensis* sont parfaitement individualisées.

En réalisant deux PCR, la première ciblant la région D1 et la deuxième ciblant la région D2, les espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *bayanus* peuvent être individualisées par rapport aux autres (tableau XVI). Le résultat est donc partiellement décevant.

#### • Essai de la méthode sur des espèces en mélange

A partir de prélèvements réalisés au cours du millésime 2002, de raisins, puis de moût et de vin en fermentation et après mutage, des extractions d'ADN ont été réalisées, suivies d'une série de PCR en temps réel afin de tester la méthode sur des levures en mélange. La figure 19 présente les courbes de fusion obtenues après PCR sur les ADN de levures présentes à la surface du raisin à trois dates, et permet d'apprécier le degré d'infection du raisin par *Botrytis cinerea*. La figure 20 montre en parallèle les photographies des raisins à chacune de ces dates. On observe globalement une évolution des  $T_m$  des amplifiats au fur et à mesure de



V1 : 86,4°C  
 V2 : 87,3°C  
 V3 : 87,6°C  
 V4 : 87,3°C  
 V5 : 87,3°C  
 V6 : 87,3°C  
 V7 : 87,3°C  
 V8 : 87,0 °C  
 V9 : 87,0°C  
 V10 : 87,0°C  
 V11 : 87,0°C

**Figure 21** : Courbes de fusion des amplifiats par PCR en temps réel des ADN extraits des micro-organismes d'un lot de vin à différentes dates. V1 : En abscisse figurent les températures de fusion en °C. V1 : 27/09, V2 : 30/09, V3 : 03/10, V4 : 10/10, V5 : 14/10, V6 : 22/10, V7 : 23/10, V8 : 04/11, V9 , 07/11, V10 : 13/11, V11 : 27/11.

**Tableau XVI** : Possibilité d'identification des espèces suivant les groupes obtenus par PCR ciblant successivement les régions D1 puis D2.

espèce	Groupe D1	Groupe D2	Identification
<i>S. cerevisiae</i>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>Saccharomyces</b>
<i>S. bayanus</i>	<b>A</b>	<b>A</b>	
<i>Z. bailii</i>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Z. bailii</b>
<i>P. anomala</i>	<b>B</b>	<b>A</b>	<b>autres</b>
<i>S. pombe</i>	<b>B</b>	<b>A</b>	
<i>B. cinerea</i>	<b>B</b>	<b>A</b>	
<i>C. stellata</i>	<b>B</b>	<b>A</b>	
<i>B. bruxellensis</i>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>B. bruxellensis</b>

---

l'avancement du temps, donc de l'infection par le champignon. Au 27/09/02, les levures présentes sur raisins non infectés présentent un Tm bas de 85,5°C en moyenne. Cela ne correspond à aucune espèce testée précédemment. Peut-être s'agit-il de *Hanseniaspora uvarum* ou de *Metschnikowia pulcherima*, espèces dominant couramment la microflore des raisins, y compris les raisins endommagés (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Puis la valeur du Tm augmente vers 87,3°C pour s'établir pour tous les échantillons à 86,1°C pour les raisins totalement infectés du 07/11/02. Cette dernière valeur correspond, à celle de *Botrytis cinerea*, ce qui paraît normal étant donné le stade d'infection avancé. Néanmoins, aucune courbe ne présente différents pics qui indiqueraient la présence de plusieurs espèces. Un seul pic à large base se dessine systématiquement, indiquant probablement un Tm moyen des amplifiats, ou bien le Tm de l'amplifiat majoritaire, comme cela semble être le cas pour la dernière date de prélèvement.

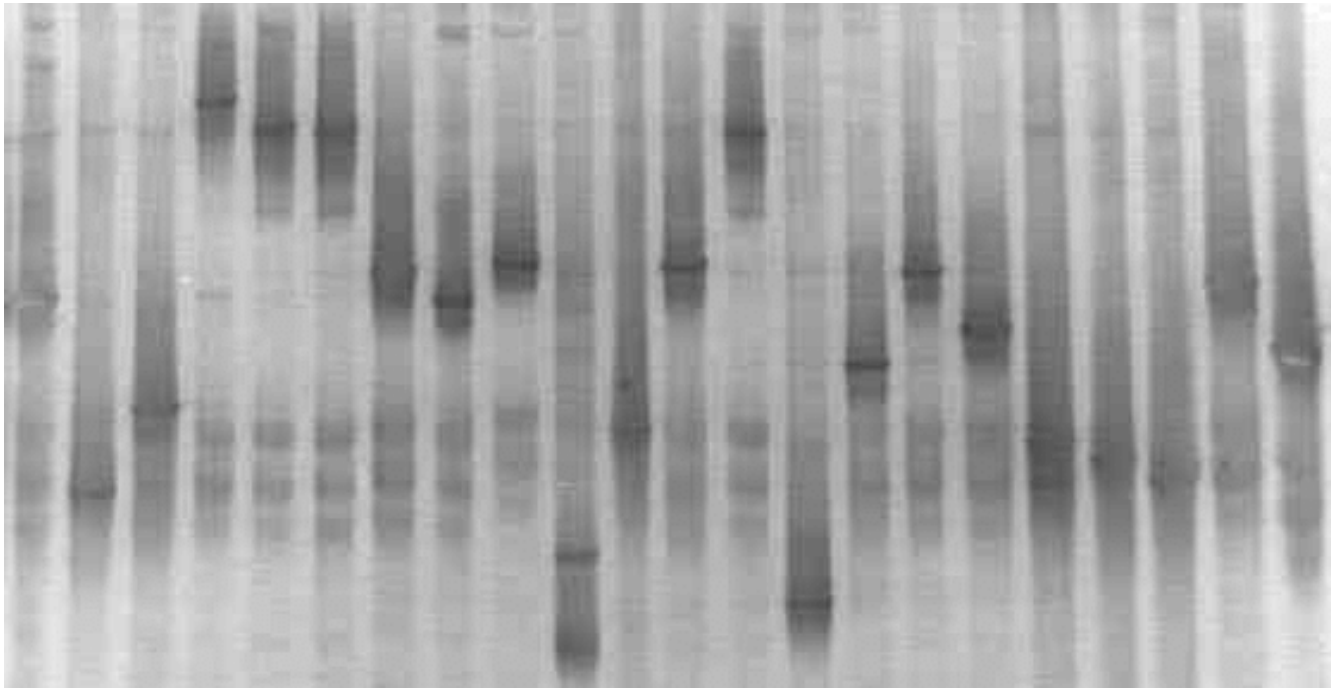
De même, pour le moût ou le vin (figure 21), un seul Tm par échantillon ressort et semble correspondre à une espèce majoritaire : non-*Saccharomyces* dans le moût et *Saccharomyces* dans le vin en fermentation.

Cette méthode ne permet donc pas de distinguer des espèces de levures en mélange dans du vin. En 2004, Casey et Dobson ont présenté un essai d'identification des levures de contaminations des jus de fruits par PCR en temps réel utilisant des amorces choisies pour la région 5,8S de l'ADNr et de la région *ITS2* adjacente. Cet amplifiat semble être globalement satisfaisant pour une série de levures. Dans leur méthode, les Tm de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Zygosaccharomyces bailii* sont identiques, mais la taille des amplifiats diffère. Cependant, si la méthode semble satisfaisante sur espèces pures (donc après culture et isolement des micro-organismes), aucun résultat n'est présenté d'identification des espèces en mélange dans un jus de fruit.

Par ailleurs, en 2003, Bleve *et al.* ont présenté un essai de quantification des levures et des champignons de contamination de produits alimentaires fermentés et pasteurisés par PCR en temps réel, en utilisant des amorces amplifiant une région du gène *ACT1*, codant pour la  $\beta$ -actine. Cette technique semble faire ses preuves, mais, elle ne permet que la quantification d'une contamination et non l'identification du ou des responsables.

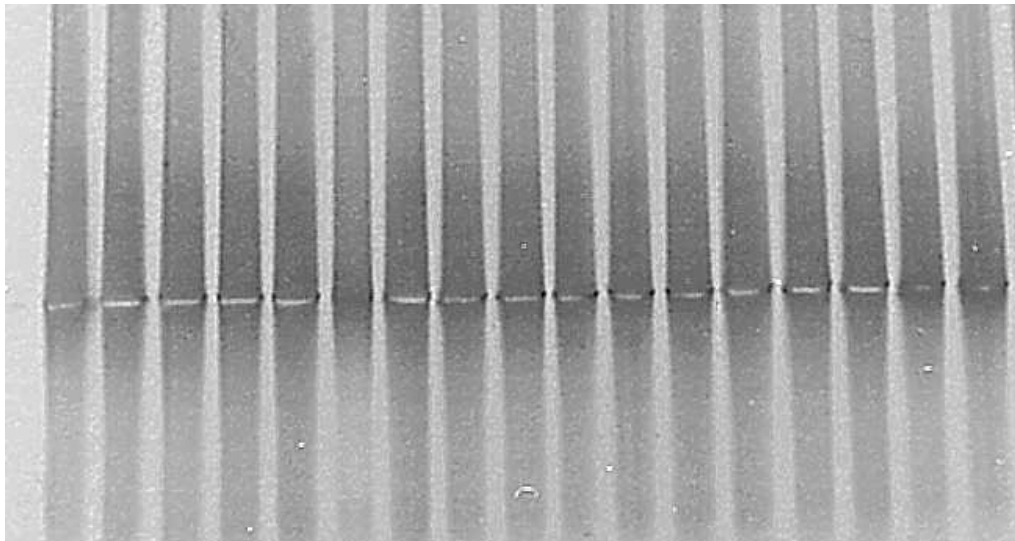
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

**A**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

**B**



**Figure 22** : **A** : Mise au point de la technique de DGGE à partir de fragments d'ADN issus de la PCR ciblant la région D1 de l'ARNr 25S ayant pour matrice l'ADN de clones d'espèces pures. Les espèces suivantes sont présentées : 1 : *Candida boidinii* L0402, 2 : *Candida cantarelli* L0403, 3 : *Trigonopsis variabilis* L0408, 4 : *Zygoascus hellenicus* L0405, 5 : *Hanseniaspora* sp. L0413, 6 : *Hanseniaspora* sp. L0414, 7 : *Trichosporon* sp. L0421, 8 : *Pichia anomala* L0426, 9 : *Schizosaccharomyces pombe* CLIB 833, 10 : *Metschnikowia pulcherrima* CLIB 403, 11 : *Cryptococcus albidus* CLIB 373, 12 : *Rhodotorula mucilaginosa* CLIB 370, 13 : *Hanseniaspora uvarum* CLIB 303, 14 : *Dekkera bruxellensis* CLIB 300, 15 : *Kluyveromyces thermotolerans* CLIB 292, 16 : *Pichia anomala* CLIB 284, 17 : *Debaryomyces hansenii* CLIB 236, 18 : *Zygosaccharomyces rouxii* CLIB 233, 19 : *Zygosaccharomyces bailii* CLIB 213, 20 : *Saccharomyces bailii* Zymaflore ST, 21 : *Botrytis cinerea* 01BRS206, 22 : *Candida stellata* L0311. **B** : Même expérience sur différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*. 1 : Zymaflore ST, 2 : UCD 522, 3 : Levuline BRG, 4 : Fermol Arôme Plus, 5 : Fermol Aromatic, 6 : CH001 Noble, 7 : Maurivin PDM, 8 : Canadivin Primeur, 9 : AWRI 796, 10 : Actiflore Bayanus, 11 : Maurivin B, 12 : Cru Blanc, 13 : Y5, 14 : VL3c, 15 : L0440, 16 : Y10, 17 : Y16

La littérature ne donne donc, à l'heure actuelle, aucune autre cible d'amplification afin d'identifier et de quantifier des micro-organismes en mélange. La technique a été abandonnée dans notre étude.

### 2.2.2. PCR-DGGE et RT-PCR-DGGE

La technique de PCR-DGGE a été tentée pour pallier aux déficiences de la PCR en temps réel. La région D1 de l'ADNr 25S a été choisie comme région hypervariable (Cocolin *et al.*, 2000). Les indications de ces auteurs ont été suivies concernant le programme PCR et les caractéristiques de la migration sur gel d'acrylamide.

#### • Mise au point

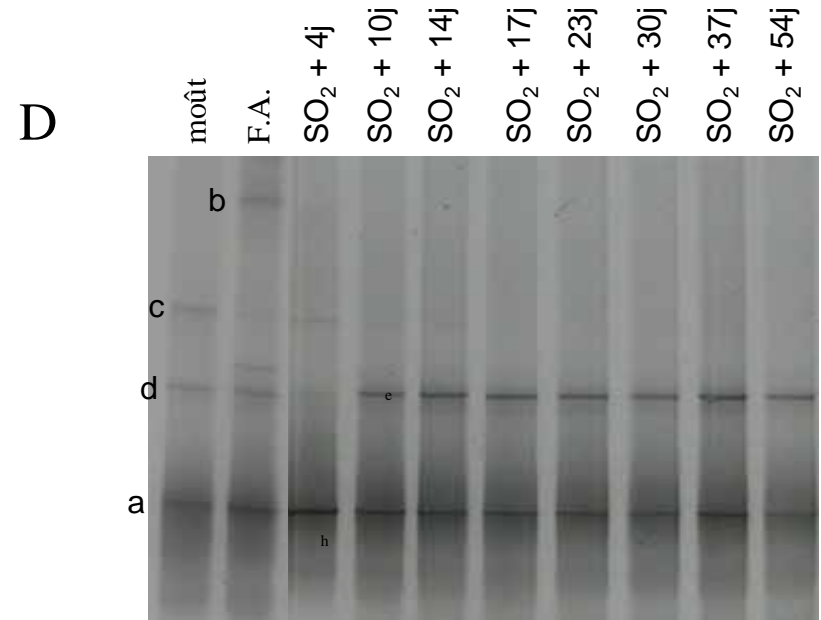
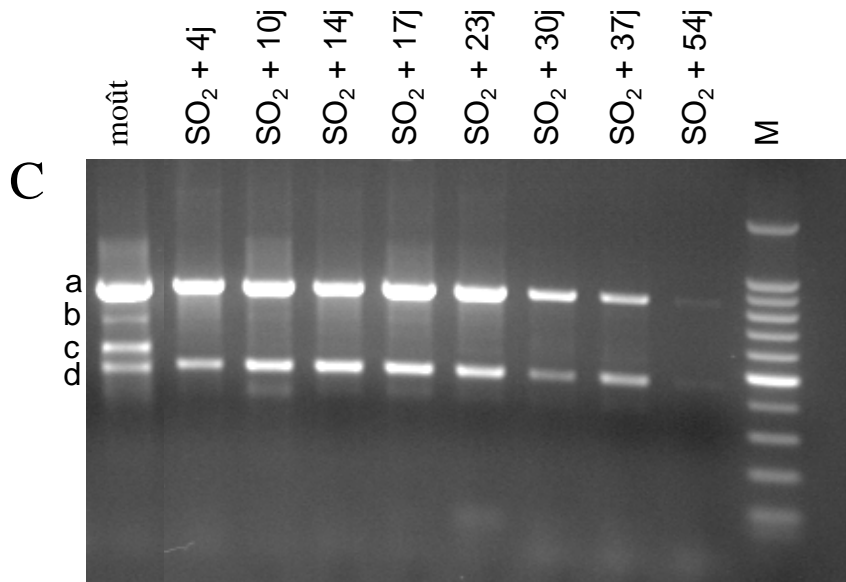
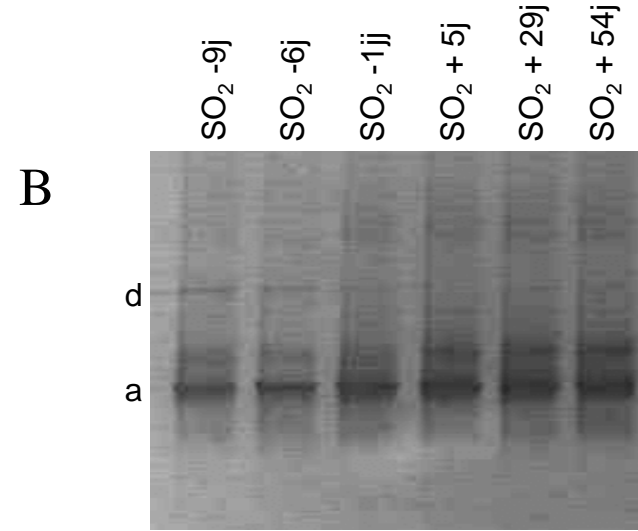
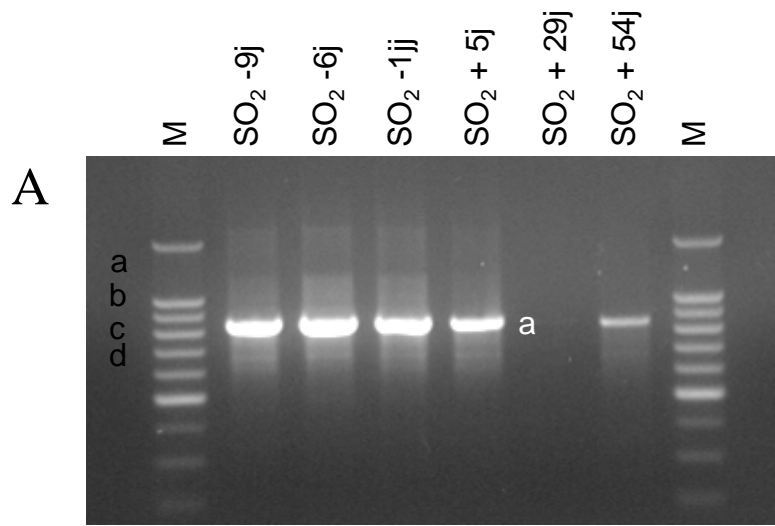
Dans un premier temps, la migration en DGGE d'amplifiats PCR issus d'ADN extraits de souches pures de quelques espèces connues trouvées classiquement dans le vin a été réalisée (figure 22A).

Malgré un certain bruit de fond, un seul amplifiat se détache clairement pour chaque espèce, à l'exception de *Zygosaccharomyces rouxii* qui présente un profil multi-bandes. Les amplifiats sont bien répartis sur le gel et permettent assez bien la distinction entre espèces. Malgré tout, quelques unes ont un amplifiat de même  $T_m$  qui migre à la même hauteur dans le gel (*Schizosaccharomyces pombe* et *Rhodotorula mucilaginosa* par exemple). Pour deux souches de *Pichia anomala* (IOEB L0426 et CLIB 284), l'amplifiat ne migre pas à la même hauteur. Il doit donc parfois exister des cas où une certaine variabilité intraspécifique est révélée. Ce n'est pas le cas usuel. En effet, la DGGE sur des amplifiats de 17 souches de *Saccharomyces cerevisiae* aboutit à une bande unique de (figure 22B). La méthode est apparue comme suffisamment adaptée. Elle a donc été souvent appliquée par la suite.

#### • Dynamique levurienne dans les premières semaines de l'élevage

Tous les lots suivis lors du millésime 2002 et dont l'évolution des populations a été présentée sur la figure 10 ont été analysés. Cependant, pour simplifier, seuls les échantillons les plus représentatifs seront montrés.

Pour chaque prélèvement, une extraction de l'ADN a été réalisée directement sur le vin sans préculture. Après purification, une PCR a été conduite sur ces ADN afin d'amplifier



**Figure 23** : Dynamique levurienne après le mutage pour deux lots représentatifs : un ensemencé (A et B) et l'autre non (C et D) selon deux techniques : la PCR sur les régions ITS1-ADNr 5,8S-ITS2 (A et C) et la PCR-DGGE (B et D). F.A. : fermentation alcoolique, M : marqueur de poids moléculaire 100 bp (Promega). A : *Saccharomyces cerevisiae*, b : *Hanseniaspora uvarum*, c : *Botrytis cinerea*, d : *Candida stellata*.

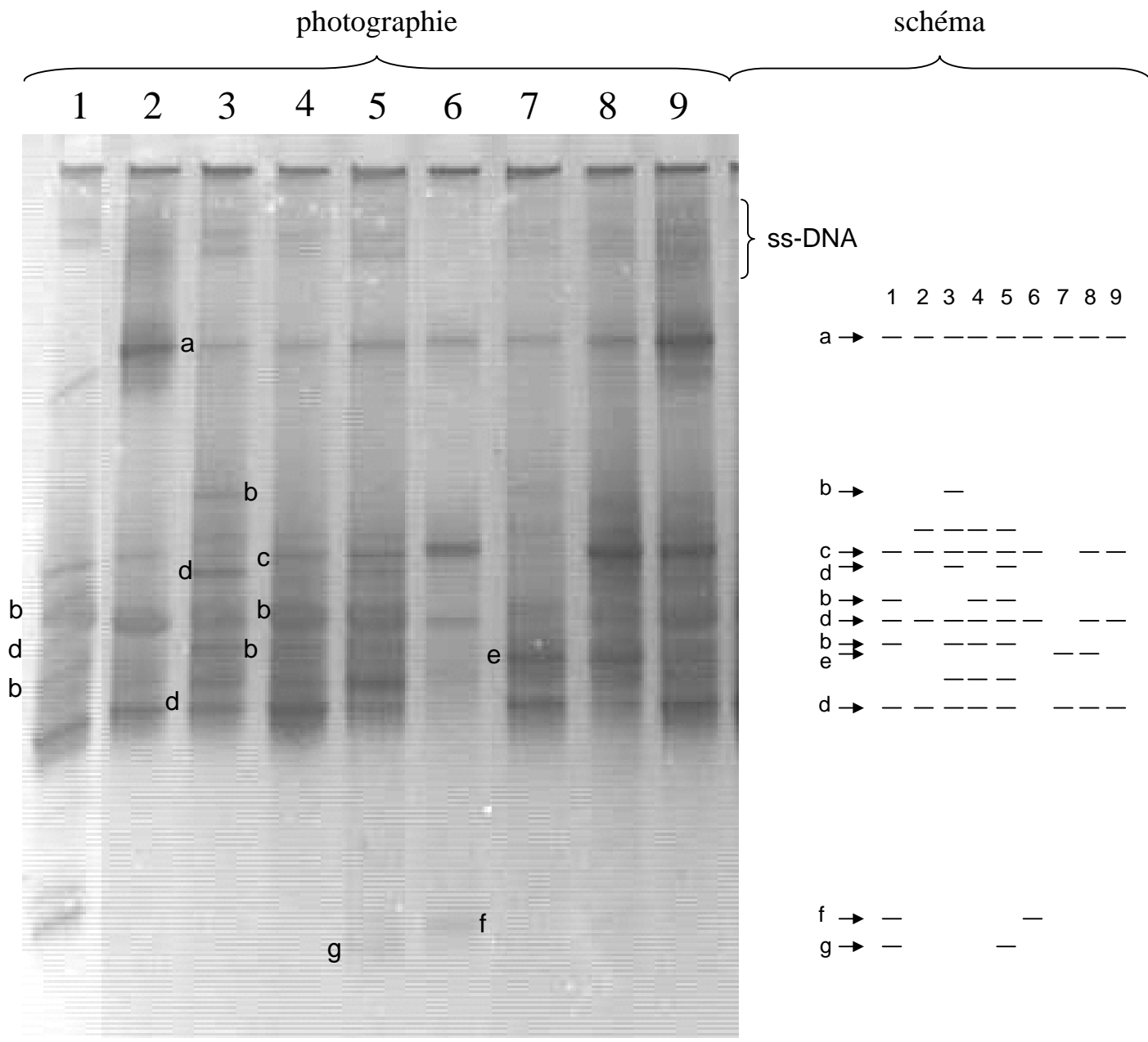
la région D1 de l'ADNr 25S. En parallèle, une PCR sur la région *ITS1*-ADNr 5,8S-*ITS2* a été menée. La figure 23 présente les résultats obtenus pour deux lots : l'un ensemencé, l'autre non. Elle montre la dynamique levurienne entre l'entonnage du moût et le mois de décembre, soit environ 3 mois.

Plusieurs conclusions s'imposent. Premièrement, pour le lot non ensemencé, deux espèces se distinguent rapidement et coexistent au cours du temps, y compris après mutage. Deuxièmement, pour le lot ensemencé, une seule espèce est rapidement mise en évidence, la deuxième, visible sur moût et en début de fermentation alcoolique sur le gel de DGGE, étant rapidement évincée. Les résultats obtenus par les deux techniques sont équivalents. Par ailleurs, une PCR spécifique permettant d'identifier *Saccharomyces cerevisiae* (selon Pearson et McKee, 1992) a montré que cette espèce était présente à chaque stade étudié par les deux techniques précédentes.

Les bandes amplifiées dans la région *ITS1*-ADNr 5,8S-*ITS2* ont été découpées dans les gels de DGGE et d'électrophorèse classique. L'ADN a été récupéré puis digéré par les enzymes *HaeIII*, *HhaI* et *HinfI* afin de les identifier selon la base de données fournie par Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Celles provenant de la PCR amplifiant la région D1 (DGGE) ont été réamplifiées puis séquencées. Les séquences obtenues ont été comparées à celles contenues dans les banques de données accessibles sur Internet. Dans les deux cas, les résultats sont identiques : l'une des bandes correspond à *Saccharomyces cerevisiae* et l'autre à *Candida stellata*. Sur moût, de l'ADN d'*Hanseniaspora uvarum* et de *Botrytis cinerea* a été amplifié. Cependant, leur trace disparaît au cours de la fermentation alcoolique. Les résultats des lots non montrés sont identiques à ceux du lot non ensemencé présenté. Aucun n'avait subi de levurage pour la réalisation de la fermentation alcoolique.

La présence de *Saccharomyces cerevisiae* n'est pas étonnante, même après mutage, étant donné que cette espèce conduit la fermentation alcoolique. La présence de *Candida stellata* l'est davantage. Plusieurs travaux dans la littérature rapportent sa présence dans le moût issu de raisins botrytisés (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 ; Rosini *et al.*, 1982 ; Jackson, 2000). Sipiczki (2003) rapporte également la découverte d'une nouvelle espèce présente dans les vins botrytisés en fermentation nommée *Candida zemplinina*. Elle serait proche de *Candida stellata* (8% de différences sur D1 de l'ADNr 25S et sur *ITS1*-ADNr 5,8S-*ITS2*) et



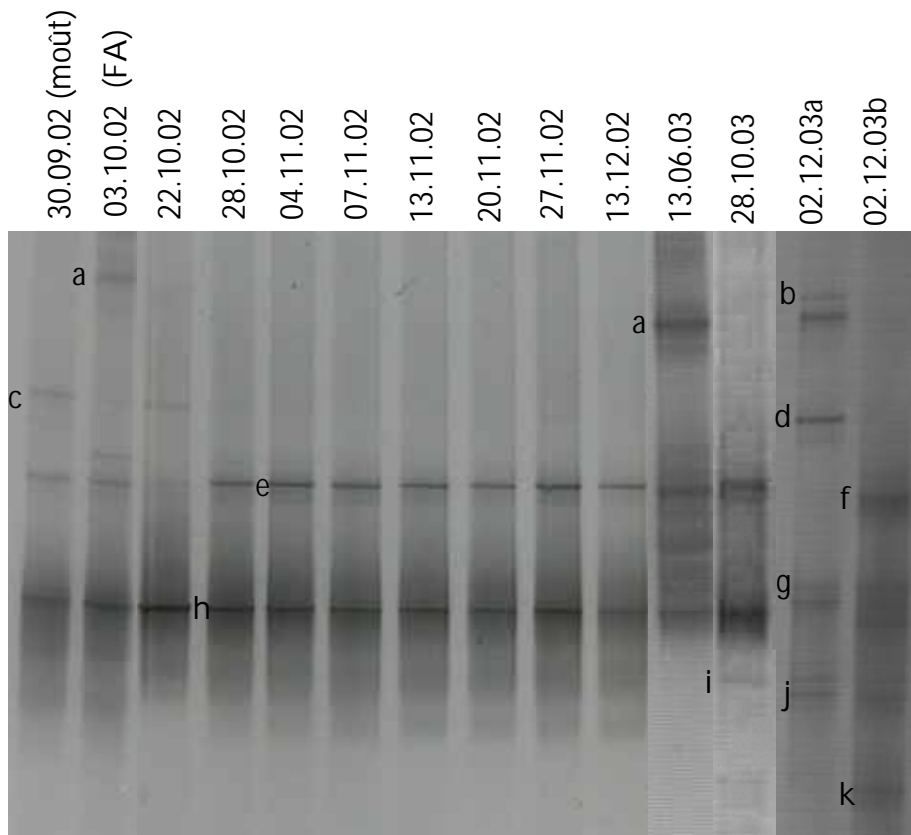


**Figure 24** : PCR-DGGE sur quelques lots de vins après 6 mois d'élevage en provenance de 4 châteaux. Pistes 1, 4 et 8 : château A, pistes 2 et 9 : château B, pistes 3 et 7 : château C, pistes 5 et 6 : château D. pistes ss-DNA : *single-stranded-DNA* (fragments d'ADN simples brins). Les bandes d'intérêt ont été séquencés. a : *Hanseniaspora sp.*, b : *Cryptococcus victoriae*, c : *Candida stellata*, d : *Saccharomyces sp.*, e : *Zygosaccharomyces bisporus*, f : *Aspergillus sp.*, g : *Penicillium sp.*

encore plus de la souche découverte par Mills *et al.* (2002) sur vins botrytisés californiens en fermentation (deux nucléotides de différence dans la région D1 de l'ADNr 25S). Il est néanmoins impossible de détecter ces levures après quelques jours de fermentation alcoolique, par les méthodes de microbiologie classique. Il est probable qu'elles entrent en état viable non cultivable au cours de la fermentation alcoolique, comme l'ont suggéré Mills *et al.* (2002). Ces auteurs ont bien prouvé que ces levures étaient vivantes (affirmation basée sur l'extraction des ARN totaux) mais incapables de former des colonies. Il a donc été mis en évidence que non seulement *Candida stellata* était une levure des moûts botrytisés, qu'elle survivait au cours de la fermentation alcoolique et que des traces étaient toujours trouvées pendant les premiers mois suivants le mutage. Sa présence dans les vins pourraient avoir une influence sur la composition finale du vin puisque Herraiz *et al.* (1985) ont montré sa capacité à former des composés ayant un impact organoleptique positif en absence de dioxyde de soufre (ce qui est généralement le cas en cours de fermentation alcoolique). En accord avec ces auteurs, les vinsensemencés par des levures sèches actives de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* pourraient être plus uniformes, du fait de l'absence de *Candida stellata*, conséquence d'un levurage par *Saccharomyces cerevisiae* (Constanti *et al.*, 1998). Selon les résultats exposés par ces auteurs, c'est surtout l'addition de levains qui élimine *Candida stellata*, plutôt que la présence de dioxyde de soufre dans le moût, lorsqu'il est ajouté.

#### • Microflore levurienne de divers lots de vins après de longs mois d'élevage

L'ADN des levures de quelques échantillons prélevés à différents stades de l'élevage a été extrait à partir de 100 mL de vin puis analysé par PCR-DGGE. La figure 24 montre le résultat de cette expérience. De l'ADN a été détecté quel que soit l'échantillon de vin, y compris après 33 mois d'élevage. Précisons que pour tous ces échantillons, aucune colonie ne se forme sur boîte de Petri. Dans des échantillons de vins d'un an prélevés d'assemblage, la présence de différentes espèces du genre *Zygosaccharomyces* (*bailii*, *rouxii*, *bisporus* et *lentus*) a souvent été notée (figure 24). La présence de ce genre n'est pas étonnante. Outre le fait qu'il ait déjà été décrit lors de refermentation de vins liquoreux (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1960), la littérature rapporte largement ses capacités de résistance à des conditions de vie proches de celles d'un vin liquoreux. *Zygosaccharomyces bailii* a en effet été découverte dans des environnements fortement sucrés présentant des activités de l'eau ( $A_w$ ) comprises entre 0,82 et 0,94 (Kaplow, 1970). L'espèce *Zygosaccharomyces rouxii* peut croître dans des milieux dont l' $A_w$  est de 0,65 (sucrose / glycérol) et de 0,62 (fructose)



**Figure 25** : Exemple de dynamique levurienne dans un lot de vin élevé en barrique pendant 15 mois. Du 30/09/02 au 02/12/03a : PCR-DGGE. Le 02/12/03b : RT-PCR-DGGE.

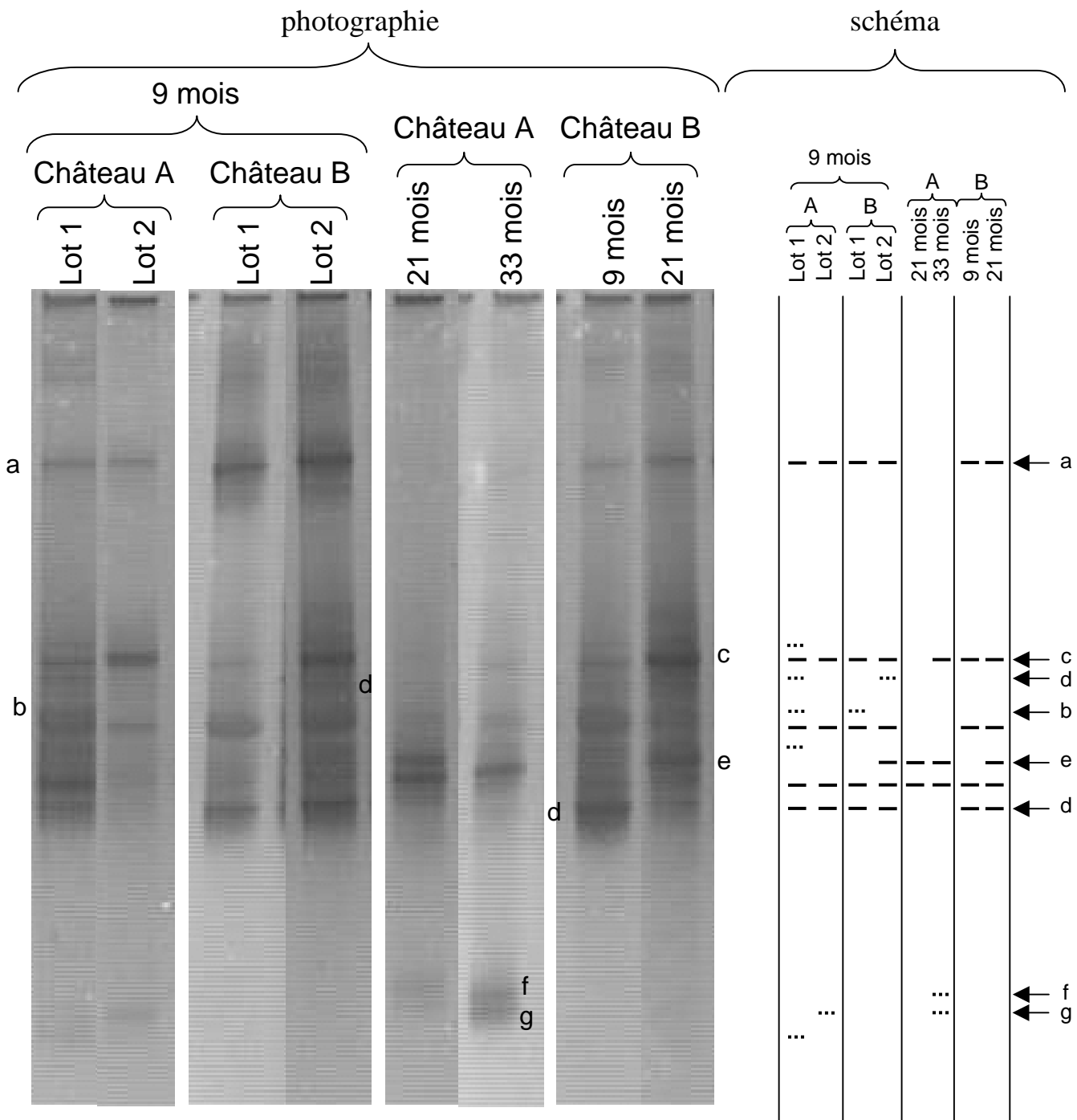
a : *Hanseniaspora sp.*, b : *Zygoascus hellenicus*, c : *Botrytis cinerea*, d : *Pichia anomala*, e : *Candida stellata*, f : *Rhodotorula sloofiae*, g : *Candida cantarelli*, h : *Saccharomyces cerevisiae*, i et j : *Dekkera bruxellensis*, k : *Penicillium sp.*

(Corry, 1978). Ces levures hautement tolérantes aux sucres ont d'ailleurs été largement décrits dans l'industrie agro-alimentaire (Ok et Hashinaga, 1997) Ce genre est donc considéré comme largement osmotolérant. Sa résistance à de nombreux fongicides est connue (Thomas, 1981 ; Pitt, 1974 ; Thomas et Davenport, 1985).

• **Dynamique levurienne sur 15 mois d'élevage**

Une barrique d'un lot a été conservée sans assemblage pendant 15 mois afin de permettre le contrôle de l'évolution des populations au cours du temps (figure 25). Si le profil obtenu reste le même pendant de nombreux mois, à partir d'un an d'élevage, il se diversifie et d'autres bandes apparaissent sur le gel, montrant ainsi que d'autres espèces de levures sont présentes. Il ne s'agit probablement pas de l'apparition de nouvelles levures dans ces vins. Il est envisageable qu'au cours de la fermentation, la forte population de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Candida stellata* dès le moût a gêné l'amplification des ADN d'espèces minoritaires. Cela fait partie intégrale des biais des méthodes de biologie moléculaire dans les études d'écologie microbienne. Head *et al.* (1998) révèlent que de nombreux auteurs ont noté une amplification préférentielle des espèces de bactéries dominantes dans un mélange, ou pour des mélanges équilibrés, des espèces possédant le plus d'opérons ribosomiques. Felske *et al.* (1998), puis Cocolin *et al.* (2000) ont fixé, lors de PCR-DGGE, un seuil limite de détection de  $10^4$  cellules/mL d'une espèce dans un mélange où *Saccharomyces cerevisiae* est largement majoritaire. Ce seuil est très élevé et explique qu'il est difficile d'établir une liste exhaustive des micro-organismes composant la microflore d'un vin. Il semble donc concevable, dans le lot de vin suivi, qu'une partie des levures ait été indétectable par cette méthode, jusqu'au moment où la proportion de chaque espèce s'est égalisée.

La révélation d'espèces traditionnellement identifiées sur moût et supposées disparaître au cours de la fermentation alcoolique, telles que des levures apiculées, a mis directement en cause l'utilisation de l'ADN comme cible d'identification des levures viables. L'amplification d'ADN de levures mortes mais non autolysées est possible. La découverte de l'existence de levures dans un état physiologique comparable à l'état VNC bactérien a conduit à l'utilisation des ARN comme marqueurs de viabilité. C'est pourquoi, sur le dernier prélèvement, une extraction d'ARN des levures du vin a été réalisée en parallèle à l'extraction d'ADN. La migration parallèle des ADN et des ADNc issus de la rétro-transcription des ARN a été réalisée par DGGE. Celle-ci a en effet montré que les levures apiculées amplifiées par



**Figure 26** : étude de la microflore de différents échantillons de vin : lots d'un même millésime, mais de château différents, lots de millésime différents dans deux châteaux. a : *Hanseniaspora sp.*, b: *Cryptococcus victoriae*, c : *Candida stellata*, d : *Saccharomyces sp.*, e : *Zygosaccharomyces bisporus*, f : *Aspergillus sp.*, g : *Penicillium sp.* En trait plein, les bandes récurrentes ; en tiret, les bandes plus anecdotiques

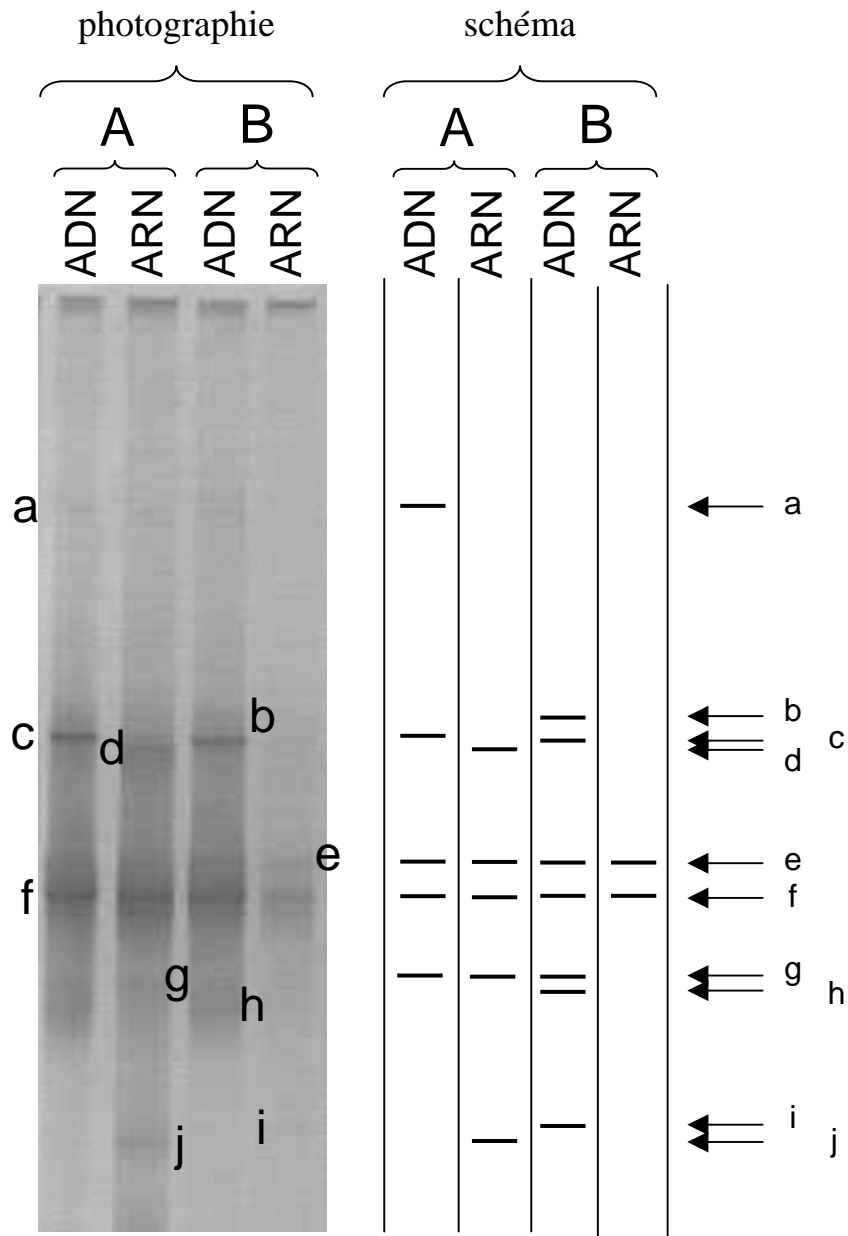
PCR-DGGE (*Pichia anomala*, *Hanseniaspora uvarum*) n'étaient que des faux positifs : aucun ARN n'est détectable. L'amplification a donc révélé, dans ce cas, des levures mortes. Cependant, la présence de levures vivantes appartenant à des espèces fermentaires est ainsi confirmée (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida cantarelli*, *Brettanomyces bruxellensis*) ainsi que des levures basidiomycètes oxydatives telles *Rhotorula sloofiae*.

Les résultats obtenus lors du millésime 2002 ont été confirmés par des techniques identiques sur différents lots du millésime 2003, montrant ainsi que ces résultats ne sont pas la caractéristique d'une année, mais sont largement généralisables (non montré).

#### • Bilan écologique après de nombreux mois d'élevage

Des prélèvements en fin d'élevage (entre 9 et 33 mois) ont été réalisés afin de contrôler la présence de levures après de nombreux mois d'élevage, et de comparer les différentes espèces présentes une même année, dans des lots différents d'un même château ou non, et entre millésimes d'un même château. Le résultat de la PCR-DGGE issu de l'amplification de la région D1 de l'ADNr 25S de l'ADN extrait directement sur 100 mL de vin, est présenté sur la figure 26. Globalement, les mêmes profils sont observés une même année dans un même château, sur des lots différents. Entre châteaux, les profils sont également assez proches une année donnée. Les principales espèces de levures sont retrouvées, seules de petites variations existent. A long terme, les vins évoluent de manière différente : certains conservent une microflore relativement diverse, d'autres non. Pour un château donné, les profils se ressemblent d'une année sur l'autre. Les conditions d'élevage doivent donc nécessairement influencer sur la microflore dans les barriques, et notamment le paramètre essentiel de conservation des vins liquoreux : la teneur en dioxyde de soufre actif.

L'influence de la teneur en dioxyde de soufre ajoutée au moment du mutage sur la microflore des vins a été étudiée en réalisant, en barrique au chai, un mutage à deux concentrations en dioxyde de soufre libre final : 50 (concentration traditionnelle après mutage) et 70 mg/L dans un même lot de vin en fermentation (figure 27). Le mutage à des teneurs fortes en dioxyde de soufre a pour effet de limiter la microflore totale à deux espèces, dans le cas présent : *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida cantarelli*. La présence de *Rhotorula sloofiae* et de *Dekkera bruxellensis* est notée pour des teneurs moindres en dioxyde de soufre libre. La présence d'autres espèces de levures n'est visible que par PCR-



**Figure 27** : Bilan écologique après trois mois d'élevage par PCR-DGGE (ADN) et RT-PCR-DGGE (ARN) d'un lot de vin muté par ajout de deux concentrations en dioxyde de soufre différentes : 50 mg/L SO<sub>2</sub> libre (A) et 70 mg/L SO<sub>2</sub> libre (B). a : *Hanseniaspora sp.*, b : *Armillaria sp.*, c : *Aureobasidium pullulans*, d : *Rhodotorula sloofiae*, e : *Candida cantarelli*, f : *Saccharomyces cerevisiae*, g et h : *Dekkera bruxellensis*, i : *Penicillium sp.*, j : *Aspergillus sp.*.

DGGE. La comparaison avec la RT-PCR-DGGE permet de distinguer les levures mortes non autolysées des levures réellement vivantes.

Dans tous les cas, il est clairement visible que les espèces fermentaires les plus résistantes se trouvent dans le vin, même après de longs mois d'élevage. On retrouve en effet, sur la figure 26, l'espèce *Zygosaccharomyces bisporus* ainsi que *Saccharomyces sp.* La RT-PCR-DGGE n'a pas été réalisée lors de cette expérience. Toutefois, au vu des résultats précédents, il semble envisageable que ces deux genres identifiés correspondent effectivement à des levures vivantes.

### 2.3. Provenance des levures d'un vin en cours d'élevage

La découverte de nombreuses espèces de levures au cours de l'élevage des vins a conduit à s'interroger sur la provenance de ces micro-organismes dans les vins liquoreux.

Des prélèvements de baies de raisin à différents stades de maturité du raisin et d'avancement de la pourriture noble ont été réalisés. En 2002, des raisins ont été prélevés à trois dates, avec pour chacune des niveaux de pourriture différents. L'utilisation de la PCR-DGGE était parfaitement indiquée dans l'étude de la microflore de ces raisins botrytisés. Après lavage des baies de raisin, l'ADN des micro-organismes récupérés de la surface des baies a été extrait et une PCR ciblant la région D1 de l'ADNr 25S réalisée. La figure 28 montre l'évolution de la microflore des raisins selon l'avancement de la contamination par *Botrytis cinerea* à une date donnée (16 septembre 2002).

Plusieurs conclusions s'imposent. Tout d'abord, la bande correspondant à *Botrytis cinerea* se retrouve dans tous les échantillons, y compris dans le A représentant un raisin sain. Pour les raisins sains ou peu botrytisés, une multitude de bandes sont clairement visibles. En revanche, plus les raisins sont pourris, moins le nombre de bandes est faible révélant soit un appauvrissement de la microflore à cause de la présence de *Botrytis cinerea*, soit un biais dans la technique, justement causé par la présence trop prépondérante de ce champignon. La première hypothèse est néanmoins tout à fait envisageable. Les bandes ont été découpées, clonées dans *Escherichia coli* et séquencées. Seules quelques unes ont abouti à l'identification. On retrouve des champignons filamenteux, notamment des deutéromycètes : *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.* et *Phoma herbarum*. Ces champignons sont responsables de





maladies de végétaux, notamment des cucurbitacées ou des céréales, mais pas particulièrement de la vigne. Plus intéressant : deux espèces de levures fermentaires ont été trouvées : *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces bisporus*. Les bandes correspondant à ces levures apparaissent sur les raisins les plus botrytisés, ce qui marque une certaine sélection en présence de *Botrytis cinerea*. La hauteur de migration des bandes est assez inattendue pour les deux espèces fermentaires. La bande correspondant à *Saccharomyces cerevisiae* a une séquence possédant 3 bases de différences avec les bases de données sur les 193 pb séquencées. Il s'agit donc ici d'une souche particulière de cette espèce, dont l'amplifiat migre naturellement à une hauteur inattendue.

Fort de ce résultat, mais également déçu de n'avoir pu trouver d'autres espèces de levures, notamment celles classiquement retrouvées dans le moût, l'expérience a été reconduite l'année suivante, en 2003. Deux prélèvements ont été réalisés : le 28 août et le 09 septembre. Pour chaque prélèvement, des grappes de raisin présentant des états d'avancement de la pourriture noble différents ont été rapportées au laboratoire. De même que l'année précédente, les baies de raisin ont été lavées et l'ADN des micro-organismes a été extrait du tampon de lavage. Afin de se rendre compte du biais induit par la trop forte présence d'ADN de *Botrytis cinerea*, un peu de tampon de lavage a été systématiquement étalé sur milieu de culture solide contenant du biphénol afin de supprimer le développement du champignon. Une fois les colonies formées, les cellules sont récoltées en mélange et leur ADN extrait. Une PCR ciblant la région D1 de l'ADNr 25S a été réalisée sur tous ces ADN, avec ou sans préculture. Une DGGE a ensuite permis de séparer les amplifiats selon leur séquence (figure 29). Les bandes ont été découpées et séquencées pour identification. Dans les échantillons d'ADN extrait des cultures, l'absence d'amplifiat correspondant à *Botrytis cinerea* est notable. Dans ces échantillons, des bandes apparaissent alors qu'elles ne sont pas présentes dans les mêmes échantillons provenant de l'ADN extrait directement du tampon de lavage : le but escompté a donc été atteint. La présence d'ADN de *Botrytis cinerea* biaise le résultat de la PCR : des espèces pourtant présentes ne sont pas amplifiées.

De nouveaux genres ont ainsi été identifiés à la surface des raisins botrytisés : notamment *Metschnikowia sp.*, dont la présence se renforce au fur et à mesure de l'avancée de la pourriture. Le champignon *Aureobasidium* apparaît également souvent, sans qu'on puisse relier sa présence à un stade d'avancement de *Botrytis* sur les grappes. Enfin, des espèces plus



anecdotiques font leur apparition de manière inopinée : *Issatchenkia orientalis* et *Rhodotorula glutinis*. Malheureusement, les espèces fermentaires *Saccharomyces sp.* et *Zygosaccharomyces sp.* n'ont pas été retrouvées. Il est possible que les stades d'avancement de *Botrytis* étudiés ici n'aient pas été suffisants pour permettre de révéler ces levures. Lors des expériences du millésime 2002, ces levures n'apparaissaient que sur raisin pourri rôti, stade ultime de la pourriture noble.

Mais, si la préculture a permis d'éliminer l'ADN de *Botrytis cinerea* et ainsi d'amplifier de nouvelles espèces de levures, cette méthode possède également un inconvénient. Il est fort probable que certaines espèces de levures présentes à la surface des raisins n'aient pas formé de colonies (cellules viables non cultivables, cellules blessées, cellules mortes dans lesquelles l'ADN est protégé de la dégradation). Elles ne sont donc pas visibles ici. Il faudrait donc s'affranchir de la préculture.

L'idéal serait de développer une PCR-DGGE ciblant une autre région hypervariable n'amplifiant pas les champignons filamenteux. Cela n'est pas aisé car les deux familles sont très proches. Des essais menés sur souche pure ont permis de montrer que la PCR ciblant la région D2 de l'ARNr 25S ne permet qu'une amplification très faible de *Botrytis cinerea*. Par ailleurs, certaines espèces telles que *Candida stellata* ont une région D2 plus courte que les autres. Faute de temps, les expériences n'ont pas pu être menées plus avant. Néanmoins, il semble acquis désormais que les recherches doivent aller dans ce sens afin d'identifier la microflore des raisins botrytisés.

#### 2.4. Discussion : survie possible d'un petit nombre d'espèces sous forme VNC

L'ensemble de cette étude écologique a montré que la survie d'un certain nombre d'espèces de levures est possible dans le vin, y compris après le mutage. L'état physiologique le plus envisageable de cette survie semble être l'état viable non cultivable, étant donnée l'apparente stérilité du vin si l'on se réfère à la microbiologie classique. Au cours des premiers mois d'élevage, comme pendant la fermentation alcoolique, seules deux espèces de levures (*Candida stellata* et *Saccharomyces cerevisiae*) sont détectées. Après quelques mois, la proportion des différentes espèces de levures change et de nouvelles espèces ont été identifiées. La viabilité de ces levures a été confirmée par RT-PCR-DGGE en ce qui concerne les levures fermentaires et oxydatives. L'apparition tardive de certaines espèces constitue sans doute le principal biais de la DGGE. L'absence d'amplification des espèces sous-représentées

pose un problème. Un travail récent a montré que l'utilisation couplée d'un fractionnement GC précédant une PCR-DGGE pouvait partiellement remédier à ce problème (Holben *et al.*, 2004). Les ADN extraits sont préalablement séparés selon leur pourcentage en GC dans un gradient de bis-benzimidazole par ultra-centrifugation. La PCR-DGGE est ensuite appliquée sur chaque fraction recueillie. Cette technique révèle des micro-organismes différents selon les fractions analysées et ainsi permet une meilleure exhaustivité lors de la description de la microflore d'un milieu. Néanmoins, la microflore des vins liquoreux semble se limiter à un petit nombre d'espèces. Les levures apiculées du moût ou du début de la fermentation alcoolique sont effectivement mortes. Cocolin et Mills (2003) ont montré que des genres de levures non-*Saccharomyces* telles que *hanseniaspora* ou *Candida* laissaient une signature moléculaire dans les vins au cours de la fermentation alcoolique, mais que leur capacité de croissance était bloquée par ajout de dioxyde de soufre ou non. Ils n'ont pas cependant caractérisé physiologiquement l'état conduisant à une absence de formation de colonies sur milieu de culture solide : viable non cultivable ou mort. L'étude suggère qu'il n'en va pas de même pour tous les genres de levures : les cellules du genre *Hanseniaspora* semblent mourir, alors que celles du genre *Candida* pourraient entrer dans un état viable non cultivable, au moins pour un certain temps. Après quelques mois, l'espèce *Candida stellata* pourtant bien représentées au cours de la fermentation alcoolique et du début de l'élevage disparaît. Sa capacité à survivre longtemps dans un état VNC serait limitée.

Par ailleurs, les levures survivant dans le vin sont déjà présentes sur raisin botrytisé et l'avancement de la pourriture noble joue un rôle dans la sélection de levures résistantes aux « botryticines », et plus tard au dioxyde de soufre, telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Zygosaccharomyces bisporus*. Fleet (2003) révèle en effet que la présence de *Botrytis cinerea* peut perturber l'écologie et la croissance des levures au cours de la fermentation alcoolique, notamment si elle est couplée avec la présence d'*Aspergillus spp.* et de *Penicillium spp.* Il est donc plausible que l'écologie à la surface de la baie de raisin endommagée soit également perturbée, à cause des métabolites inhibiteurs produits par ces champignons (Lafon-Lafourcade, 1984 ; Ribéreau-Gayon, 1985), Reed and Nagodawithana, 1988 et Donèche, 1992). Les espèces de levures les plus résistantes sont capables de survivre malgré la présence de *Botrytis* sur le raisin, puis malgré une forte pression osmotique, une forte teneur en éthanol et une forte concentration en dioxyde de soufre libre dans le vin. Leur simple présence à l'état viable non cultivable suffit-elle à expliquer les refermentations ? Comment parviennent-elles

à sortir de l'état VNC ? Sont-elles responsables de la formation lente et progressive d'éthanal ? Comment expliquer la résurrection de cellules entraînant un dégagement gazeux ? Toutes ces questions ont été étudiées et les résultats sont exposés dans le chapitre suivant.

### 3. COMMENT EXPLIQUER LA REFERMENTATION ?

« Il n'existe pas de problèmes dans la nature, mais seulement des solutions car l'état naturel est un état adaptatif donnant naissance à un système cohérent. »

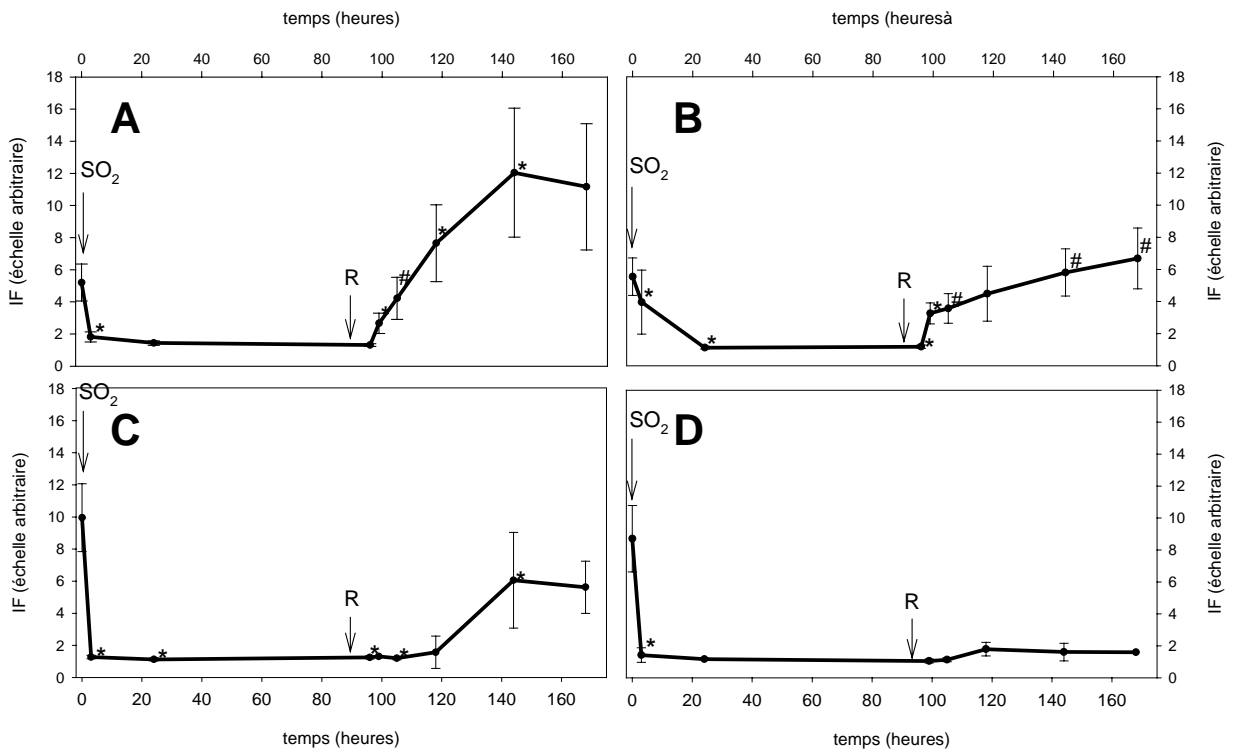
René Dubos (1980)

Lors d'une refermentation, les faibles teneurs en dioxyde de soufre libre s'accompagnent d'une forte augmentation de la concentration en éthanal, conduisant à des vins particulièrement difficiles à stabiliser. La formation de la molécule d'éthanal au cours de l'élevage des vins constitue un phénomène fondamental dans la compréhension des mécanismes de la refermentation. D'où provient cet éthanal dont la concentration augmente progressivement au cours de l'élevage ? Peynaud et Lafourcade (1952) ont proposé une source microbiologique : l'éthanal est synthétisé par des levures survivant dans les vins ; les levures vivantes se protégeant du milieu hostile par une gangue formée par des levures mortes... Cette étude nécessite un approfondissement. Est-il possible de relier survie des levures à l'état viable non cultivable et refermentation suite à la formation d'éthanal ?

#### 3.1. Possibilité de résurrection des espèces de levures survivant au cours de l'élevage

La première expérience a porté sur la vérification ultime de l'état viable non cultivable : les cellules incapables de former des colonies sur milieu de culture solide sont-elles capables de ressusciter et de recouvrer ainsi leur capacité à croître et à fermenter ? Si cette condition n'est pas validée, non seulement l'hypothèse viable non cultivable devra être rejetée, mais aussi, aucune explication de la refermentation ne peut s'appuyer sur ce phénomène décrit précédemment.

Une expérience a donc été menée en laboratoire sur quatre souches pures appartenant aux espèces suivantes : *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore ST et UCD 522), *Candida stellata* et *Zygosaccharomyces bailii*, au cours de la fermentation d'un jus de raisin dont la



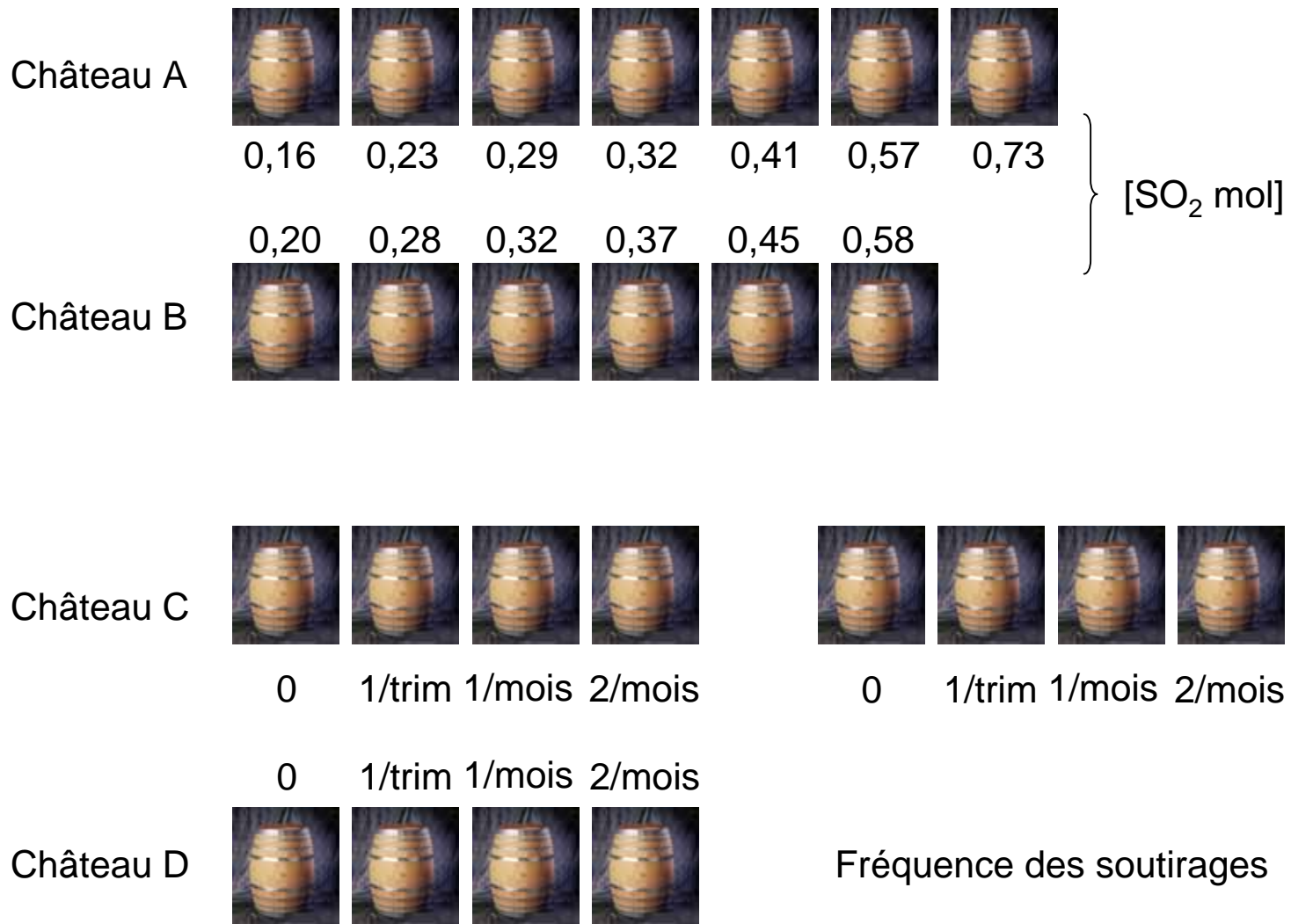
**Figure 30** : Evolution de l'intensité de fluorescence de différentes espèces de levures en culture pure après mutage (le premier point correspond au temps juste avant mutage et le deuxième juste après. La flèche indique le transfert vers un milieu plus simple (moût dilué). A : *Z. bailii*, B : *S. cerevisiae* Zymaflore ST, C : *S. cerevisiae* UCD 522, D : *C. stellata*. (IF : Intensité de fluorescence, \* : Valeur significativement différente de la précédente, # : Valeur significativement différente de celle immédiatement antérieure à la précédente, significativité déterminée par ANOVA seuil 1%).

concentration initiale en sucres a été amenée à 300 g/L par ajout d'un mélange de D-Glucose et de D-fructose (1:1), et muté par addition de 200 mg/L de dioxyde de soufre total. Après quarante-huit heures d'attente, une partie du vin est dilué cinq fois dans du moût lui-même dilué deux fois. Des prélèvements sont réalisés de manière régulière et l'intensité de fluorescence des cellules, considérée comme un marqueur de vitalité est mesurée. Le contrôle de la capacité des cellules à former des colonies est effectué par étalement sur milieu gélosé.

La figure 30 montre l'évolution de l'intensité de fluorescence des cellules au cours du temps pour les quatre souches considérées. Dans tous les cas, après ajout de dioxyde de soufre, la fluorescence des cellules diminue fortement avant d'atteindre un niveau de base identique pour toutes. A ce moment-là, aucune cellule n'est plus capable de former des colonies sur milieu gélosé. Après transfert des cellules dans un milieu plus simple, le comportement des différentes souches varie. Pour *Candida stellata*, la fluorescence n'augmente pas. Les deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que *Zygosaccharomyces bailii* recouvrent une fluorescence au moins égale à celle qu'elles avaient avant l'ajout de dioxyde de soufre, voire même plus forte. Ces cellules forment à nouveau des colonies sur milieu de culture solide : elles sont donc bien sorties de l'état viable non cultivable, puisqu'elles ont recouvré leur cultivabilité. L'apparition des colonies n'est pas progressive mais au contraire soudaine, signifiant bien qu'elle n'est pas le fait de quelques cellules cultivables.

*Zygosaccharomyces bailii* émet une fluorescence très importante, bien supérieure à celle qu'elle avait dans le jus de raisin avant ajout de dioxyde de soufre. Cela est probablement dû au transfert dans un milieu plus simple, sans alcool et avec une pression osmotique plus faible. Les deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* ne se comportent pas de la même façon : la souche Zymaflore ST réagit lentement à l'ajout de dioxyde de soufre, chute lente de l'intensité de fluorescence, et rapidement à l'annulation du stress, hausse rapide de l'intensité de fluorescence, alors que la souche UCD 522, agit de manière totalement inverse, réaction vive à l'ajout de dioxyde de soufre et lente après transfert dans du jus de raisin dilué. La capacité à entrer et à sortir de l'état viable non cultivable sous l'action du dioxyde de soufre dépend de l'espèce, mais aussi de la souche. *Candida stellata* ne recouvre pas sa capacité à former des colonies sur boîte de Petri. Deux hypothèses sont envisageables : soit sa capacité de sortie de l'état VNC nécessite plus de temps (en ce sens, elle se





**Figure 31** : Détails de l'expérience visant à expliciter les paramètres influant sur la survie des levures pendant l'élevage. Dans les châteaux A et B, différentes teneurs en dioxyde de soufre moléculaire ont été appliquées sur deux lots de vins. Dans les châteaux C et D, la fréquence d'aération des vins a été soumise à variation, via la fréquence des soutirages. 0 correspond à un entonnage sans aération, puis à une absence totale d'aération pendant six mois.

comporterait comme la souche UCD 522, mais de manière encore plus accentuée), soit les cellules sont mortes sous l'action du dioxyde de soufre et alors la fluorescence n'est due qu'à une activité enzymatique résiduelle dans les cellules non-autolysées.

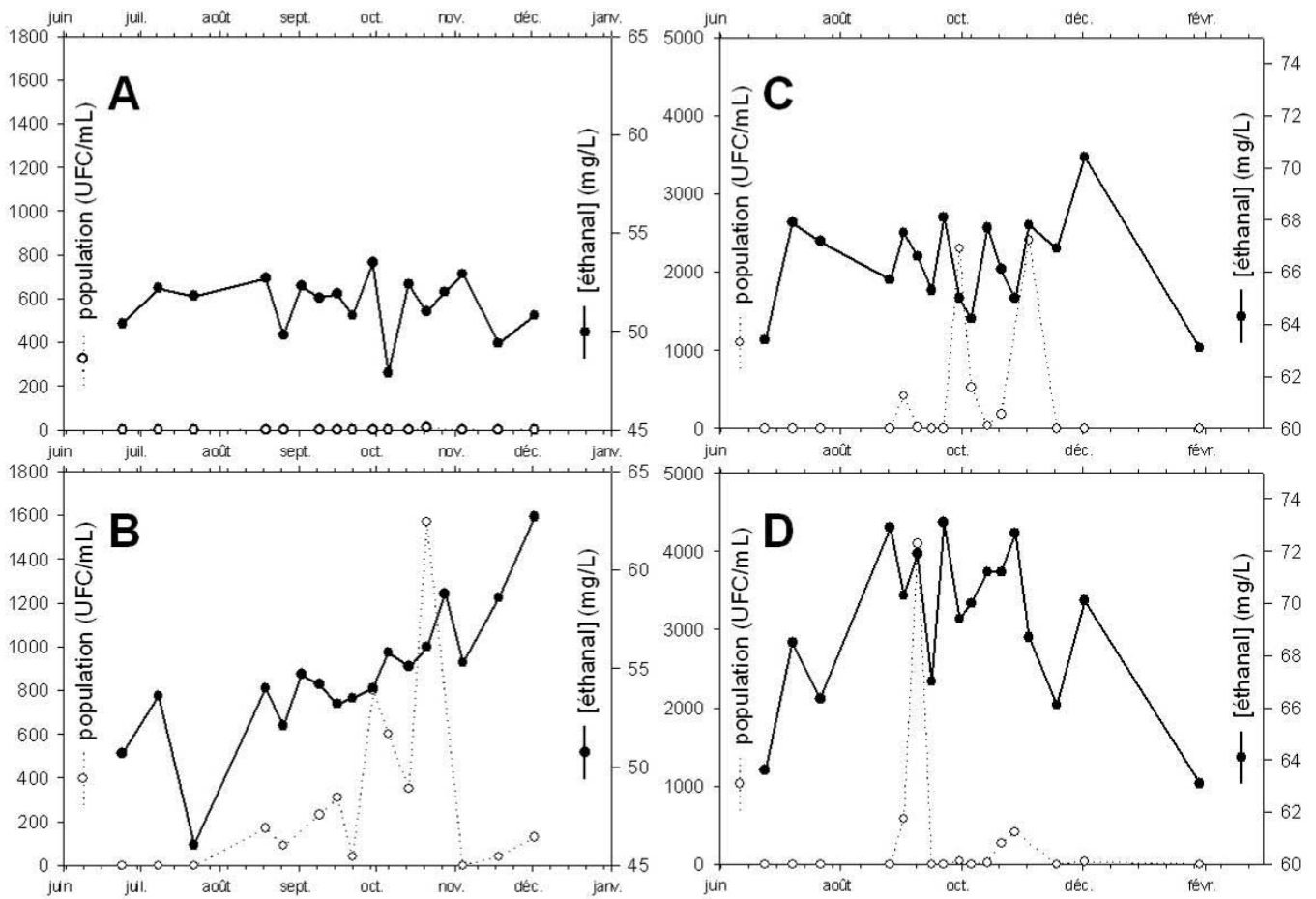
La possibilité de résurrection de certaines espèces de levures présentes dans les vins liquoreux a donc été mise en évidence : leur état de survie peut, dès à présent, être confirmé comme étant l'état viable non cultivable. Ces espèces (ou au moins certaines souches de ces espèces) sont capables d'entrer dans cet état au moment du mutage et d'en sortir lorsque le stress lié au dioxyde de soufre a disparu.

### 3.2. Mise en place d'essais dans différentes conditions de sulfitage, de pH et fréquence d'aération

Afin de mieux comprendre l'évolution de la teneur en éthanal au cours de l'élevage, des essais ont été menés directement au chai. Deux paramètres ont été étudiés : l'aération et la teneur en dioxyde de soufre actif. Le but était de vérifier l'effet de ces deux paramètres sur la survie des levures. Cette expérience a été menée pendant six à huit mois sur des lots du millésime 2002 ayant débuté leur élevage environ six mois auparavant. Dans deux châteaux, un lot de vin a été choisi. Des modifications du pH et de concentration en dioxyde de soufre ont été appliquées, de manière à faire varier la teneur en dioxyde de soufre actif. Dans deux autres châteaux, trois lots de vin ont été choisis. Les vins ont été aérés plus ou moins fréquemment afin d'envisager un effet de la teneur en oxygène dissous sur la survie des levures.

La figure 31 explicite les détails de l'expérience : teneurs en dioxyde de soufre moléculaire maintenues pendant toute la durée de l'expérience et fréquences d'aération choisies (de zéro à deux soutirages par mois, alors qu'un élevage traditionnel préconise un soutirage trimestriel). Concernant les variations de la teneur en dioxyde de soufre moléculaire, chaque lot a été triplé. Chaque prélèvement est constitué par un mélange équivolumique de chaque barrique.

Pour les lots suivis, des prélèvements réguliers ont été effectués. Pour chaque prélèvement, la teneur en éthanal a été mesurée, la population viable et cultivable a également



**Figure 32 :** Evolution de la teneur en éthanal et de la population cultivable de levures dans quatre lots distincts. A :  $[\text{SO}_2 \text{ mol}] = 0,73 \text{ mg/L}$ , B :  $[\text{SO}_2 \text{ mol}] = 0,16 \text{ mg/L}$ , C : aucune aération, D : aération bimensuelle.

été suivie. Périodiquement, la teneur en dioxyde de soufre libre a été contrôlée afin de maintenir la concentration souhaitée tout au long de l'expérimentation.

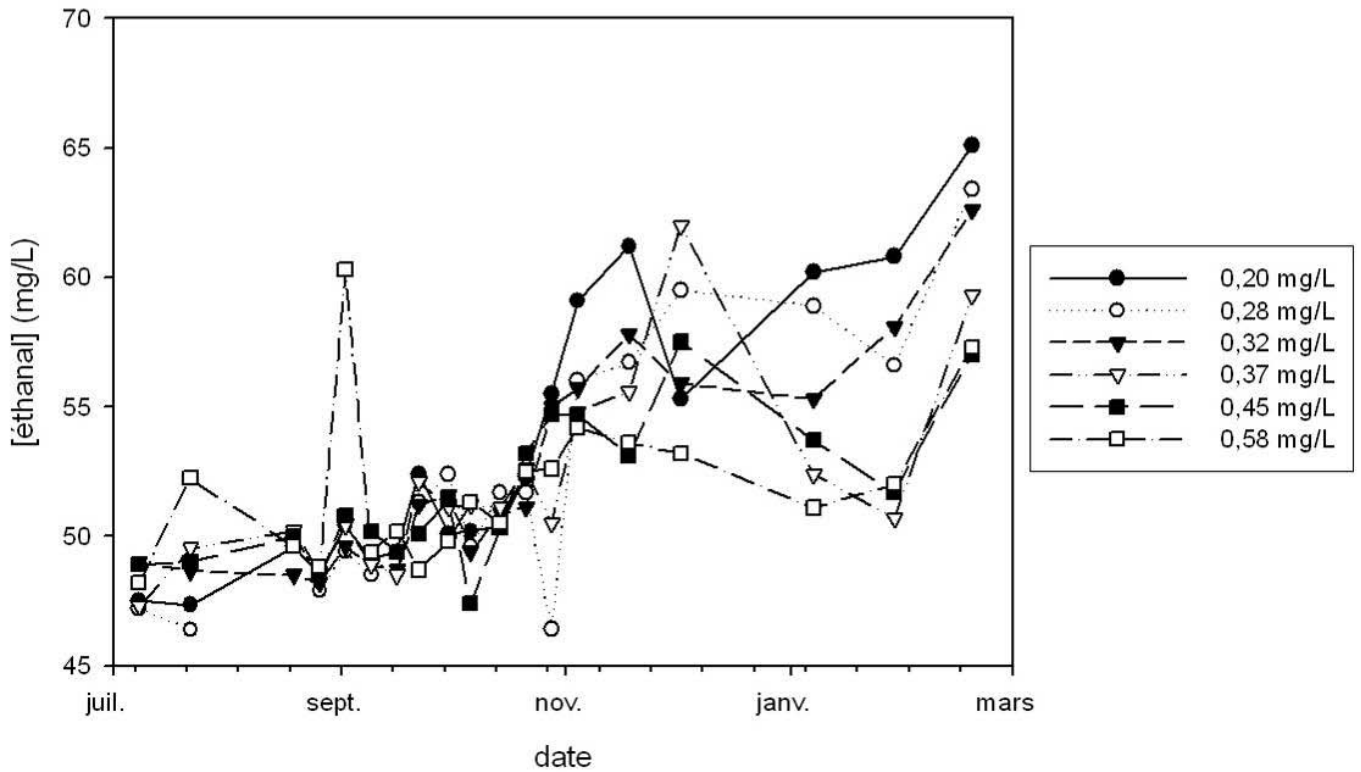
### 3.2.1. Suivi de la teneur en éthanal

L'évolution de la teneur en éthanal a été mesurée dans tous les lots. Par souci de clarté, seuls les extrêmes ont été présentés sur la figure 32 : d'une part, ceux présentant des concentrations en dioxyde de soufre moléculaire de 0,16 et de 0,73 mg/L et, d'autre part, ceux jamais aérés et ceux soutirés deux fois par mois.

La concentration en éthanal n'est pas stable. Une série de fluctuations plus ou moins régulières sont observées. Dans le cas de l'élevage du vin le plus sulfité, malgré les faibles variations ponctuelles, la teneur en éthanal varie finalement peu (coefficient directeur de la droite de régression de -0,0034 mg/L). A l'inverse, et toujours malgré les petites variations ponctuelles, lorsque l'élevage a lieu dans des conditions très peu stressantes (teneur en dioxyde de soufre moléculaire de 0,16 mg/L), la tendance globale est à une augmentation régulière visible de la teneur en éthanal (coefficient directeur de la droite de régression de + 0,0637 mg/L).

En ce qui concerne la fréquence d'aération en revanche, il n'est pas possible d'établir une différence entre l'aération très fréquente et l'absence d'aération : dans les deux cas, seules les petites fluctuations ponctuelles de la teneur en éthanal sont observées. Aucune évolution générale ne se dessine au cours du temps (coefficients directeurs des droites de régression respectivement de -0,0002 mg/L et de -0,0019 mg/L). Les petites fluctuations entre deux prélèvements sont tout de même significatives, c'est-à-dire supérieures à l'erreur du dosage. En effet, on observe de temps à autre une variation pouvant dépasser 2 mg/L, alors que l'erreur est au maximum de 1 mg/L. Par conséquent, ces variations de la teneur en éthanal constituent un phénomène réel à expliciter.

D'une manière plus globale, il est possible de comparer tous les échantillons d'un même château selon les teneurs en dioxyde de soufre moléculaire. La figure 33 présente l'évolution de la teneur en éthanal dans tous les lots du château B. Deux conclusions



**Figure 33** : Evolution de la teneur en éthanal dans les différents lots du château B. Chaque courbe correspond à un groupe de trois barriques dont le vin est conservé à une teneur en dioxyde de soufre moléculaire indiquée en légende.

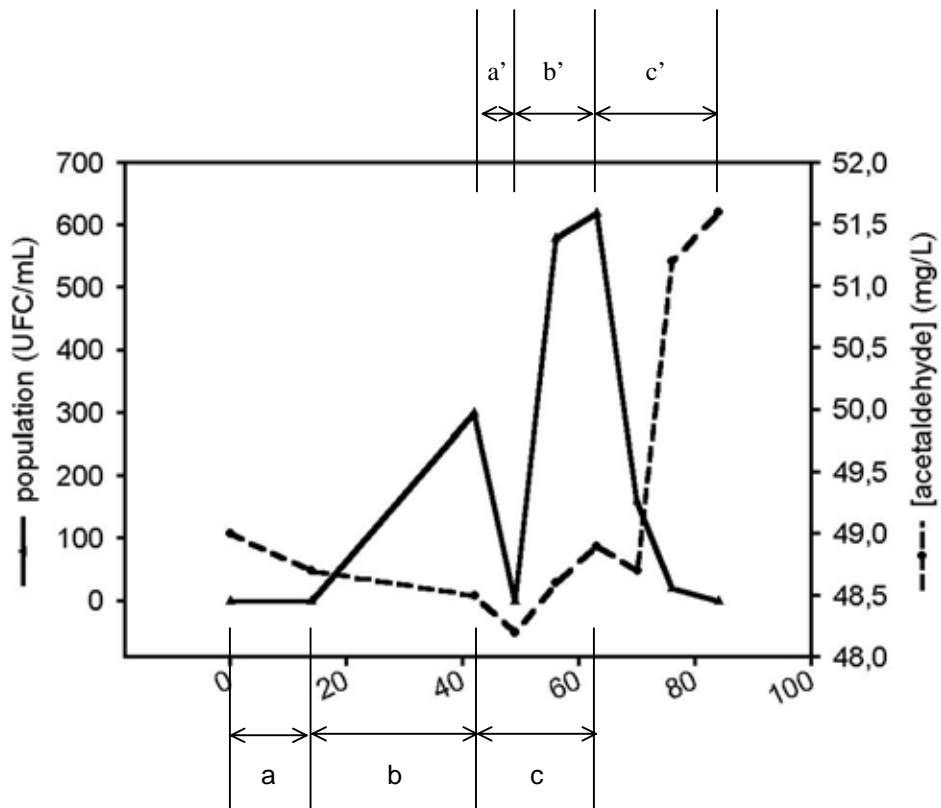
s'imposent à la lecture de ce graphique. Primo, tous les lots sont soumis aux petites variations précédemment décrites dans le temps. Elles sont souvent significatives en regard de la marge d'erreur possible du dosage. Secundo, deux phases apparaissent. La première dure environ quatre mois, au cours desquels les différentes courbes sont très voisines les unes des autres. Une deuxième phase débute alors : chaque courbe s'individualise nettement en fonction de la teneur en dioxyde de soufre moléculaire maintenue. Dans les lots où la concentration est la plus forte, la teneur en éthanal ne varie pas beaucoup. Au contraire, dans les lots où la concentration en dioxyde de soufre moléculaire est la plus faible, une forte augmentation de la teneur en éthanal est clairement visible. Les teneurs en éthanal s'échelonnent entre ces deux extrêmes en fonction de leur teneur en dioxyde de soufre moléculaire. Les lots les moins protégés initialement d'un risque microbiologique, le sont donc de moins en moins, étant donné que l'éthanal formé progressivement combine le dioxyde de soufre libre au fur et à mesure, ce qui accélère probablement le phénomène.

Le phénomène est le même pour les lots du château A (non montré) : après une période de latence de quelques mois, les courbes s'individualisent en fonction de leur teneur en dioxyde de soufre moléculaire. En revanche, selon la fréquence d'aération des vins, aucune tendance n'est évidente.

### 3.2.2. Suivi de la capacité de croissance des levures et identification de quelques colonies

Le suivi de la population ayant formé des colonies sur milieu de culture solide est présenté pour les lots les plus extrêmes. Dans les lots les plus protégés (par le dioxyde de soufre), aucune colonie n'apparaît : le vin semble stérile. En revanche, pour les lots les moins protégés, des pics de population cultivable apparaissent. Une augmentation de population formant des colonies est immédiatement suivie d'une absence totale de colonies : le vin semble tantôt pauvre en levures (les manifestations de population n'excèdent jamais  $5.10^3$  UFC/mL), tantôt totalement stérile. Les lots intermédiaires ont un comportement également intermédiaire entre les deux extrêmes : plus le vin est protégé, plus la probabilité d'apparition de colonies est faible.

En revanche, en ce qui concerne les variations de fréquence d'aération, aucun lien n'est clairement visible : la probabilité d'apparition des levures semble la même quelle que soit la fréquence de soutirage des lots. Toutefois, pour le château C, pour le lot élevé à une



**Figure 34** : Evolution de la population cultivable et de la teneur en éthanal d'un lot de vin élevé avec une concentration en  $\text{SO}_2$  moléculaire égale à 0,32 mg/L pendant 100 jours. a, b, c : les trois phases du premier cycle. a', b', c' : les trois phases du deuxième cycle.

concentration en dioxyde de soufre moléculaire de 0,41 mg/L, le coefficient de la courbe de tendance est presque nul, alors que la fréquence d'apparition de colonies augmente légèrement avec l'aération (coefficient directeur de 0,43) pour une teneur en dioxyde de soufre moléculaire de 0,24 mg/L. Pour le château D, aucune colonie n'est apparue.

Des identifications ont été réalisées par PCR-RFLP ciblant la région *ITS1*-ARNr 5,8S-*ITS2*. Deux résultats se sont imposés. D'une part, les espèces de levures formant des colonies sont toujours les mêmes pour un même lot et pour un même château. D'autre part, Il s'agit en général d'espèces fortement tolérantes au dioxyde de soufre. Ainsi pour le château A, c'est l'espèce *Zygosaccharomyces rouxii* et plus tardivement, lorsque la concentration en éthanal a fortement augmenté, *Saccharomyces cerevisiae*. Pour le château B et le château C, c'est l'espèce *Zygosaccharomyces bailii*. Toutefois, pour les échantillons fortement aérés (soutirage bimensuel), il arrive que des espèces telles que *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cryptococcus albidus* ou *Saccharomyces ludwigii* fassent leur apparition. Enfin, pour le château D, aucune colonie n'est jamais apparue sur milieu de culture solide. Or, les lots de ce château étaient élevés avec une teneur en dioxyde de soufre de 0,60 mg/L, contre 0,24 et 0,41 mg/L pour les lots du château C. Ce dernier point souligne encore l'aspect primordial de la teneur en dioxyde de soufre. L'aération joue un rôle mineur dans la survie des levures, si ce n'est dans la résurrection ponctuelle de quelques espèces et en particulier des espèces oxydatives appartenant aux basidiomycètes par exemple.

### 3.2.3. Combinaison des deux paramètres

Il a paru fondamental de tenter d'émettre des hypothèses interprétant les variations ponctuelles de la teneur en éthanal et de la population. Si l'hypothèse concernant la formation d'éthanal est juste (*ie* formation d'origine microbiologique), alors il doit exister une corrélation entre les deux paramètres : variations de la concentration en éthanal dans les vins et population.

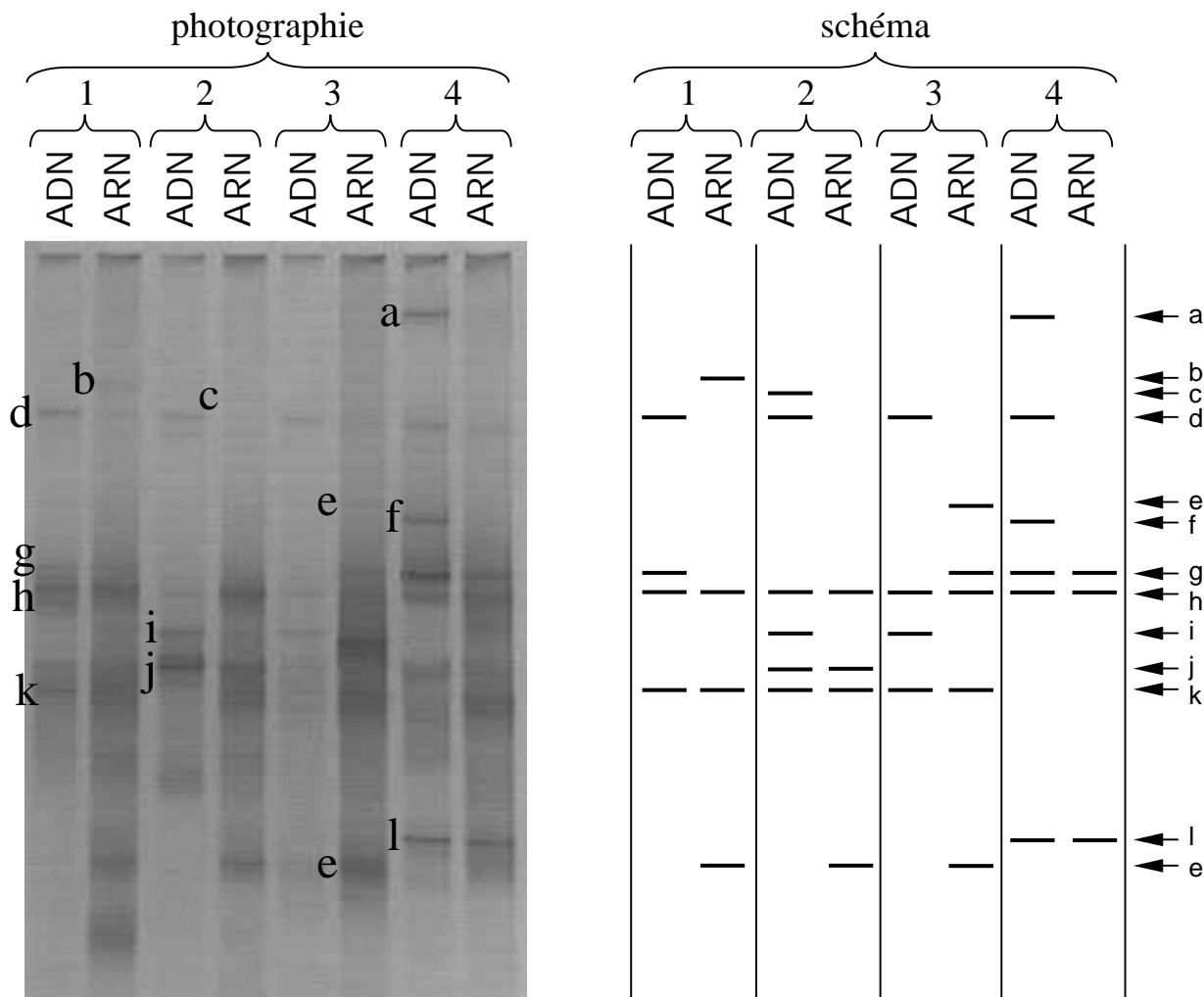
La figure 34 expose un gros plan sur une partie d'un graphique : évolution des deux paramètres pendant une centaine de jours dans le lot élevé avec une teneur en dioxyde de soufre moléculaire de 0,32 mg/L dans le château B. Deux cycles se succèdent dans ce graphique. Le premier se déroule comme suit : une faible chute de la concentration en éthanal (a) est suivi d'une croissance cellulaire pendant laquelle la teneur en éthanal diminue encore



davantage (b), avant d'augmenter après la mort des cellules (c), probablement en conséquence de l'autolyse de ces cellules. Un deuxième cycle, partiellement imbriqué dans le premier commence alors, se traduisant par une forte hausse de la teneur en éthanal. Toutes les courbes présentent une tendance similaire de manière plus ou moins prononcée selon les cas. Il existerait donc bien un lien entre la teneur en éthanal et la population.

L'hypothèse la plus vraisemblable serait la suivante. Les cellules les plus résistantes au dioxyde de soufre à l'état viable non cultivable parviennent à consommer un peu d'éthanal dans le vin, et l'utilisent dans la réoxydation du coenzyme NADH en NAD<sup>+</sup>. Il est probable que pour les espèces (et/ou les souches) de levures les plus tolérantes au dioxyde de soufre, la machinerie enzymatique soit moins endommagée que pour les autres espèces. Une sensibilité différente de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase au dioxyde de soufre a d'ailleurs été notée par Hinze et Holzer (1986) selon les espèces. Ce sont donc les coenzymes et les produits finaux ou intermédiaires de la glycolyse et de la fermentation alcoolique qui constituent le maillon faible de la chaîne. Ce NAD<sup>+</sup> n'était auparavant plus disponible pour la cellule car il réagit avec le dioxyde de soufre (Mayerhof *et al.*, 1938 ; Pfleiderer *et al.*, 1956 ; Johnston et Smith, 1976 ; Tuazon et Johnston, 1977). La consommation d'éthanal permet donc aux levures de se développer un peu, via l'utilisation de ce coenzyme oxydé dans différentes voies métaboliques. Mais le NAD<sup>+</sup>, ainsi que les produits de la glycolyse sont rapidement combinés par le dioxyde de soufre encore libre dans le vin bloquant ainsi la chaîne métabolique. Par suite, les cellules meurent (une petite partie retournant peut-être à l'état viable non cultivable). Il serait intéressant de vérifier si les levures réapparaissant sous forme de colonies sur milieu de culture solide appartenant toutes à la même espèce, appartiennent à une même souche ou non. Les cellules mortes s'autolysent et relarguent dans le vin l'éthanal formé, en plus grande quantité que la concentration initiale avant le développement de la population. Ainsi, cet éthanal vient combiner une certaine concentration de dioxyde de soufre. Ainsi des cycles peuvent se succéder. L'absence de réajustement de la teneur en dioxyde de soufre libre par le vinificateur peut entraîner une diminution importante de cette teneur, pouvant aller jusqu'à une concentration si faible que les levures fermentaires soient capables de fermenter durablement.

Ce scénario n'est qu'une hypothèse pouvant expliquer les évolutions d'éthanal et de population dans les vins pendant l'élevage, conduisant parfois à la refermentation.



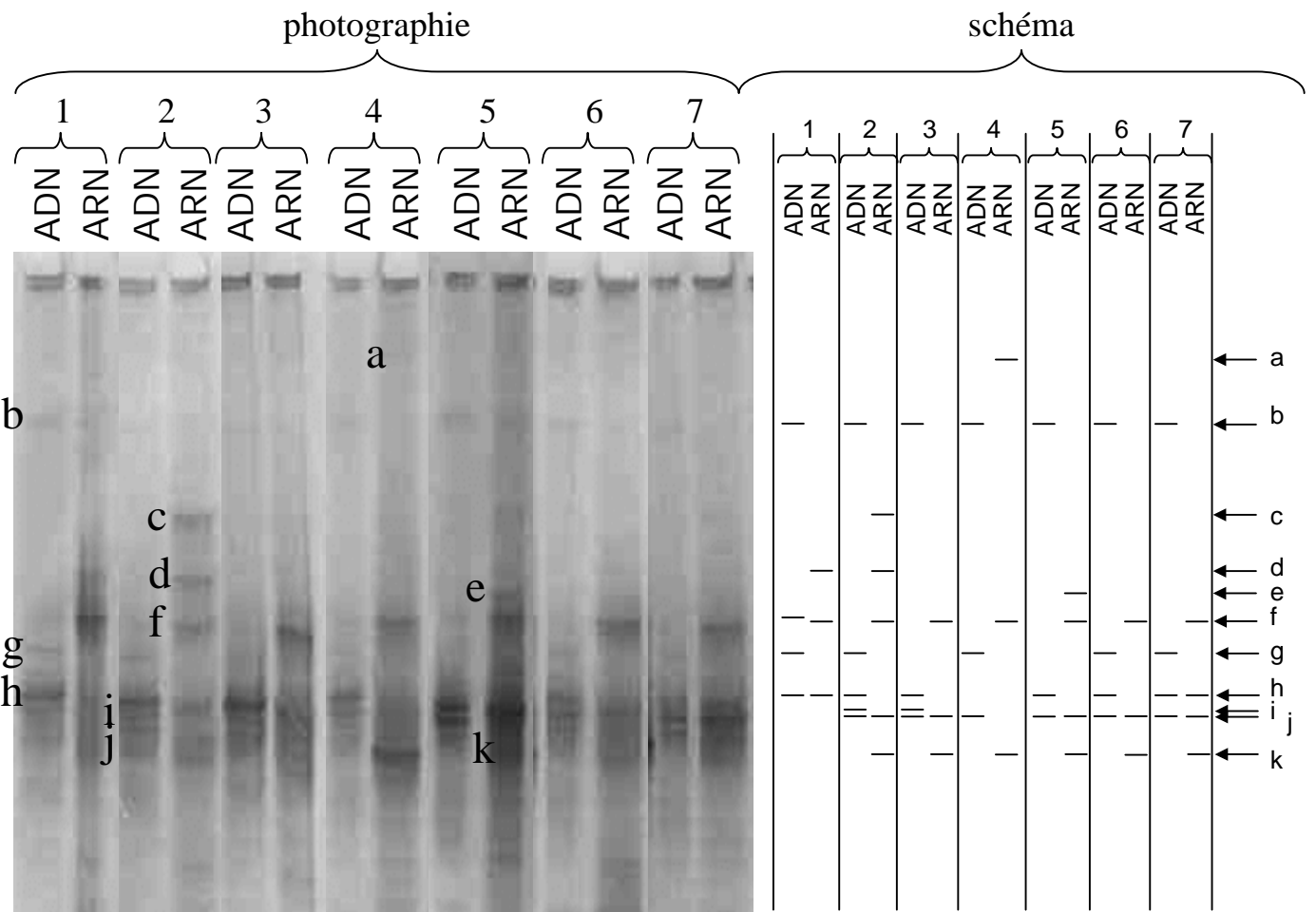
**Figure 35** : PCR-DGGE (ADN) et RT-PCR-DGGE (ARN) ayant pour matrice les acides nucléiques provenant d'une des séries du château C après 6 mois d'expérimentation selon les fréquences de soutirage (a : aucun, b : un trimestriel, c : un mensuel, d : un bimensuel). a : *Saccharomycopsis crataegensis*, b : *Symbiotaphrina kochii*, c : *Zygoascus hellenicus*, d : *Hanseniaspora sp.*, e : *Aspergillus sp.*, f : *Pichia anomala*, g : *Armillaria sp.*, h : *Aureobasidium pullulans*, i : *Zygosaccharomyces lentus*, j : *Zygosaccharomyces bisporus*, k : *Saccharomyces cerevisiae*, l : *Penicillium sp.*

### 3.3. Ecologie du vin en barrique au cours de l'élevage selon les différentes teneurs en dioxyde de soufre actif et en oxygène

On peut se demander si les levures identifiées au cours de l'expérience précédente, capables de ressusciter de temps en temps sont les seules espèces vivantes, ou bien si d'autres demeurent à l'état VNC. Elles seraient incapables de croître, car le milieu est trop riche en dioxyde de soufre actif ou ne contient pas assez d'oxygène dissous par exemple, mais pour autant capables de se re-vivifier dans le cas où les conditions viendraient à changer. Dans l'expérience précédente, *Zygosaccharomyces rouxii* est capable de croître en conditions très hostiles, pas *Saccharomyces cerevisiae*. Mais, lorsque les conditions deviennent moins défavorables, la deuxième apparaît. Cette observation semble donc aller dans le sens de l'hypothèse énoncée.

A la fin de l'expérience, après six mois, soit après un an d'élevage environ, l'ADN et les ARN totaux des levures du vin ont été extraits, sans préculture, à partir de 10 mL de vin issus des lots du château A (variation de la teneur en dioxyde de soufre moléculaire) et d'une série de lots du château C (variation de la fréquence d'aération). Une PCR et une RT-PCR ont été réalisées en ciblant la région D1 de l'ARNr 25S et la DGGE a permis de séparer les amplicons en mélange. La figure 35 présente les résultats obtenus sur les échantillons du château C (aération) et la figure 36 ceux issus du château A (dioxyde de soufre moléculaire). Tout d'abord, dans les deux cas, la comparaison entre les amplicons issus de l'ADN, et ceux issus des ARN totaux, confirme que des espèces de levures (*Hanseniaspora sp.*, *Pichia sp.*, *Zygoascus hellenicus*, *Saccharomycopsis crataegensis*...) ne sont détectées qu'après une amplification des ADN, suggérant que ces micro-organismes ne sont pas réellement vivants. Plus curieusement, plusieurs espèces (*Rhodotorula minuta*, *Penicillium sp.* par exemple) sont révélées uniquement par amplification de l'ADNc issu des ARN totaux. Il est probable que l'absence d'amplification ayant pour matrice l'ADN s'explique par une proportion faible de ces micro-organismes, l'ADN des levures mortes non autolysées pouvant gêner l'amplification d'espèces bien vivantes, mais en plus faible nombre.

Concernant l'incidence du milieu sur les populations, les conclusions diffèrent entre les deux vins. En effet, quand la fréquence d'aération varie, aucune tendance nette ne se dessine. La majorité des espèces se retrouvent dans tous les cas, et notamment *Zygosaccharomyces bisporus* et *Saccharomyces cerevisiae*. L'expérience a été réalisée sur la



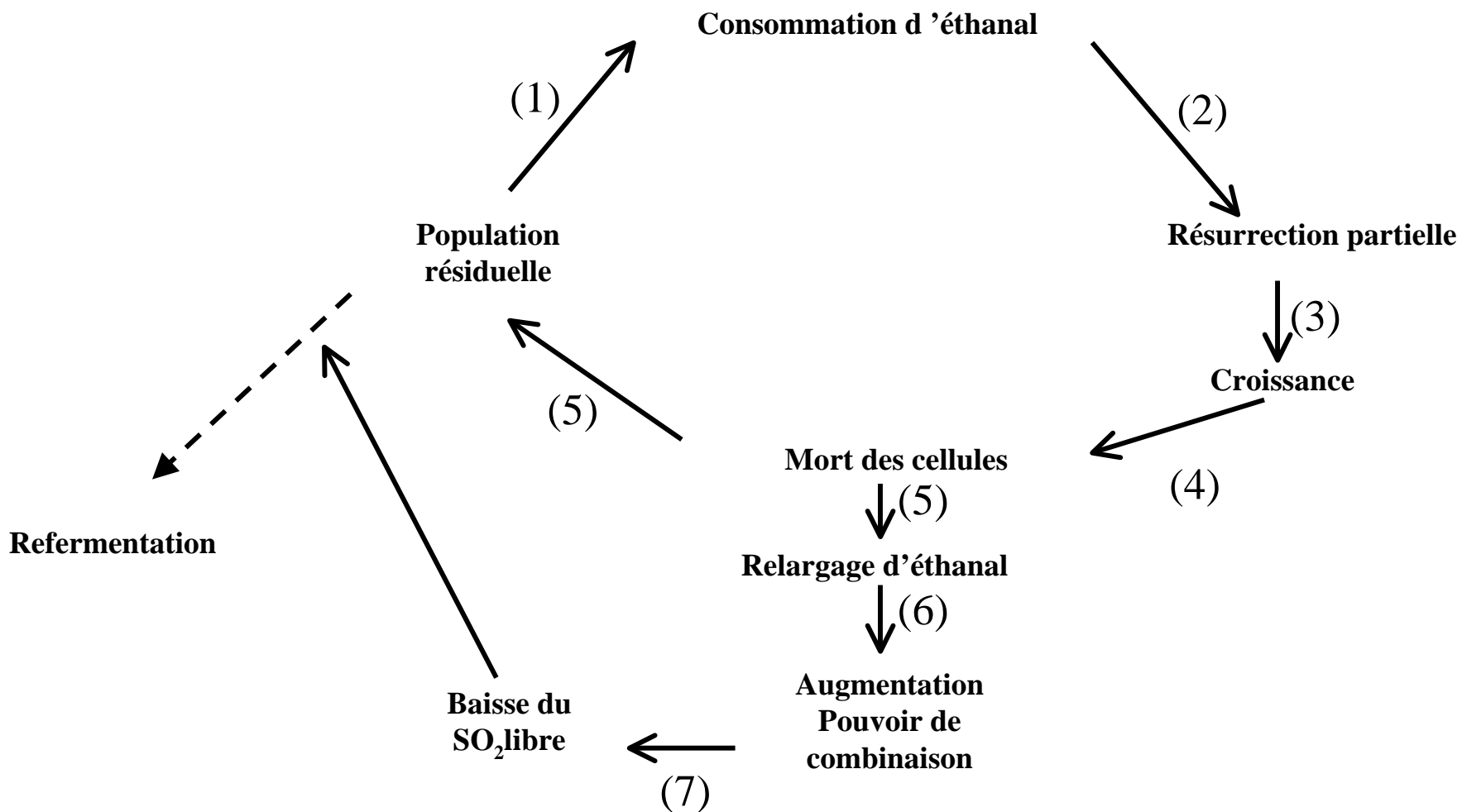
**Figure 36** : PCR-DGGE (DNA) and RT-PCR-DGGE (ARN) sur les lots de vin provenant du château A après 6 mois d'expérimentation en fonction de la teneur en dioxyde de soufre moléculaire (1 : 0,16 mg/L, 2 : 0,23 mg/L, 3 : 0,29 mg/L, 4 : 0,32 mg/L, 5 : 0,41 mg/L, 6 : 0,57 mg/L, 7 : 0,73 mg/L). a : *Malassezia globosa*, b : *Hanseniaspora sp.*, c : uncultured fungus, d : *Rhodotorula minuta*, e : *Penicillium sp.*, f : *Rhodotorula sloofiae*, g : *Saccharomyces sp.*, h : *Zygosaccharomyces rouxii*, i : uncultured fungus, j : *Candida etchellsii*, k : *Saccharomyces cerevisiae*

série dont la teneur en dioxyde de soufre moléculaire a été maintenue à 0,41 mg/l. Il aurait été plus judicieux d'analyser la série à 0,24 mg/L, où une faible influence de l'aération se dessinait. Cela aurait peut-être permis de mettre en évidence l'influence de l'aération, et de retrouver les espèces oxydatives et *Zygosaccharomyces bailii*. Pour l'étude où la teneur en dioxyde de soufre moléculaire varie, en revanche, les conclusions sont bien plus nettes. La diversité des espèces présentes est évidente en deçà de 0,24 mg/L. Au-delà, seules trois espèces semblent survivre : *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii* et *Rhodotorula slooffiae*, autrement dit les levures dont la résistance au dioxyde de soufre est la plus forte. En revanche, dans les lots conservés à des teneurs plus basses, un plus grand nombre d'espèces survit.

Par conséquent, si la teneur en dioxyde de soufre moléculaire constitue bien une forte pression de sélection, la plus ou moins grande teneur en oxygène du vin ne semble pas influencer la microflore globale. En fait, ce serait plutôt la combinaison aération forte et teneur en dioxyde de soufre moléculaire faible qui conditionnerait une éventuelle résurrection des levures oxydatives.

#### 3.4. Discussion : proposition d'un scénario expliquant le phénomène de la refermentation

L'ensemble des résultats dans cette partie amène à la proposition d'un scénario schématisé sur la figure 37 comme interprétation des phénomènes microbiologiques se produisant durant l'élevage des vins liquoreux. Une population résiduelle subsiste dans les vins après mutage, même si celle-ci se présente à l'état viable non cultivable. Plusieurs espèces de levures sont capables d'entrer dans cet état, faisant croire à une stérilité du vin lors d'un contrôle microbiologique classique. Parmi ces levures, quelques espèces sont connues pour leur résistance au dioxyde de soufre (*Zygosaccharomyces spp.* et *Saccharomyces cerevisiae*). Les plus tolérantes sont capables de ressusciter périodiquement via une consommation puis un relargage d'éthanal dans le vin, puis finissent par disparaître. Ce cycle semble se reproduire tout au long de l'élevage, augmentant progressivement la concentration en éthanal des vins, et diminuant d'autant la teneur en dioxyde de soufre libre. Le vin devient ainsi de plus en plus instable. Les mêmes levures ou d'autres moins tolérantes au dioxyde de soufre, mais ayant tout de même réussi à survivre, peuvent alors se développer à leur tour et entraîner la refermentation. Ce scénario n'est possible que si la teneur en dioxyde de soufre



**Figure 37** : Proposition de scénario pour expliquer les refermentations lors de l'élevage des vins liquoreux en conditions d'élevage souple : concentration en dioxyde de soufre moléculaire inférieure à 0,40 mg/L et aération modérée.

moléculaire est inférieure à 0,40 mg/L. En effet, au-delà, aucune levure ne se développe et les quantités d'éthanal ne varient pas significativement. L'aération, en revanche, ne semble pas jouer un grand rôle dans le phénomène de la refermentation. Néanmoins, lorsque la teneur en dioxyde de soufre moléculaire est inférieure à 0,40 mg/L, la présence de levure est d'autant plus facile que la fréquence d'aération augmente. L'aération jouerait donc un rôle seulement lorsque la teneur en dioxyde de soufre moléculaire est faible.

Mais les conditions de la refermentation sont complexes. Si ce scénario paraît concevable, d'autres paramètres facilitent ou au contraire limitent le développement levurien. La température joue un rôle important. De même, le temps constitue probablement un facteur fondamental. Les levures, sous la pression du dioxyde de soufre ont besoin de temps pour s'adapter et pour parvenir à ressusciter après leur entrée dans l'état viable non cultivable. Il est probable que le temps nécessaire à la sortie de cet état soit fonction de la concentration en dioxyde de soufre apportée.

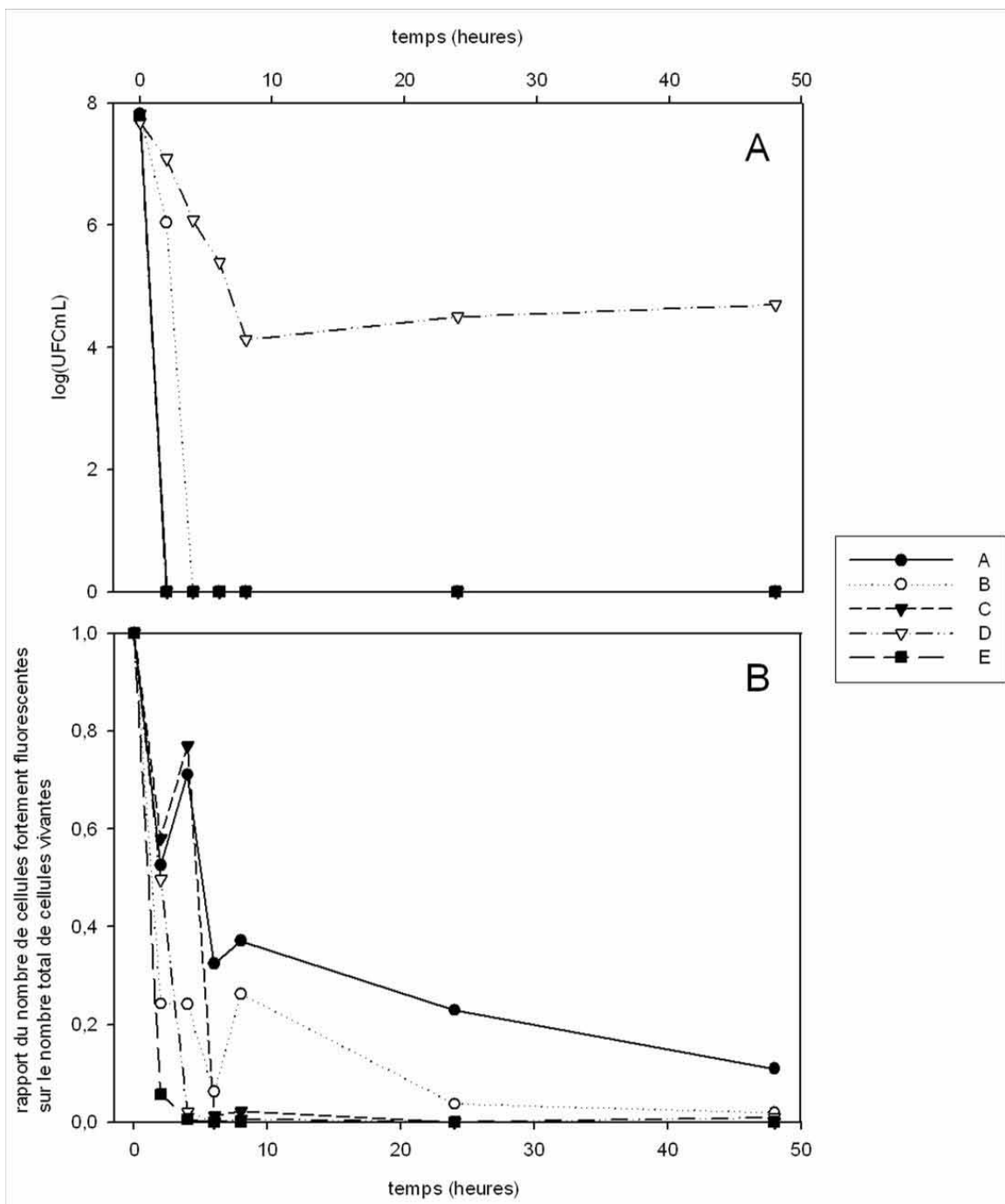
#### 4. COMMENT EVITER LES REFERMENTATIONS ?

« Nous croyons qu'il ne faut absolument y [le vin] mettre aucune mixtion qui puisse en altérer le goût naturel, parce que ce qui peut plaire sans le secours de l'art est supérieur à tout ».

Columelle

##### 4.1. Etude de la possibilité de mutage par le DMDC en remplacement partiel du dioxyde de soufre

Les problèmes de résistance des levures de vinification au dioxyde de soufre et la présence systématique de levures de contamination dans les vins liquoreux ont conduit à s'interroger sur l'utilisation d'un autre fongicide. Les décrets de l'Union Européenne qui imposent des teneurs limites en dioxyde de soufre total de 400 mg/L dans les vins liquoreux et une volonté de diminuer cette concentration limite dans les années à venir, sont une autre indication à cette étude. L'effet du diméthylcarbonate a été évalué. L'autorisation d'utilisation de cette molécule dans le vin par la *Food and Drug Administration* en 1988, puis par le *Bureau of Alcohol Tobacco and Firearms* en 1999, à la dose maximale de 200 ppm, puis enfin plus récemment par l'OIV (résolution OENO 5/2001), a permis d'envisager son



**Figure 38** : A : Evolution du nombre de cellules après différentes additions de fongicides (A : 100 mg/L DMDC, B : 200 mg/L DMDC, C : 300 mg/L DMDC, D : 200 mg/L SO<sub>2</sub>, E : 100 mg/L DMDC et 100 mg/L SO<sub>2</sub>). B: Evolution du rapport du nombre de cellules fortement fluorescentes au nombre total de levures vivantes après additions des mêmes concentrations de fongicides.



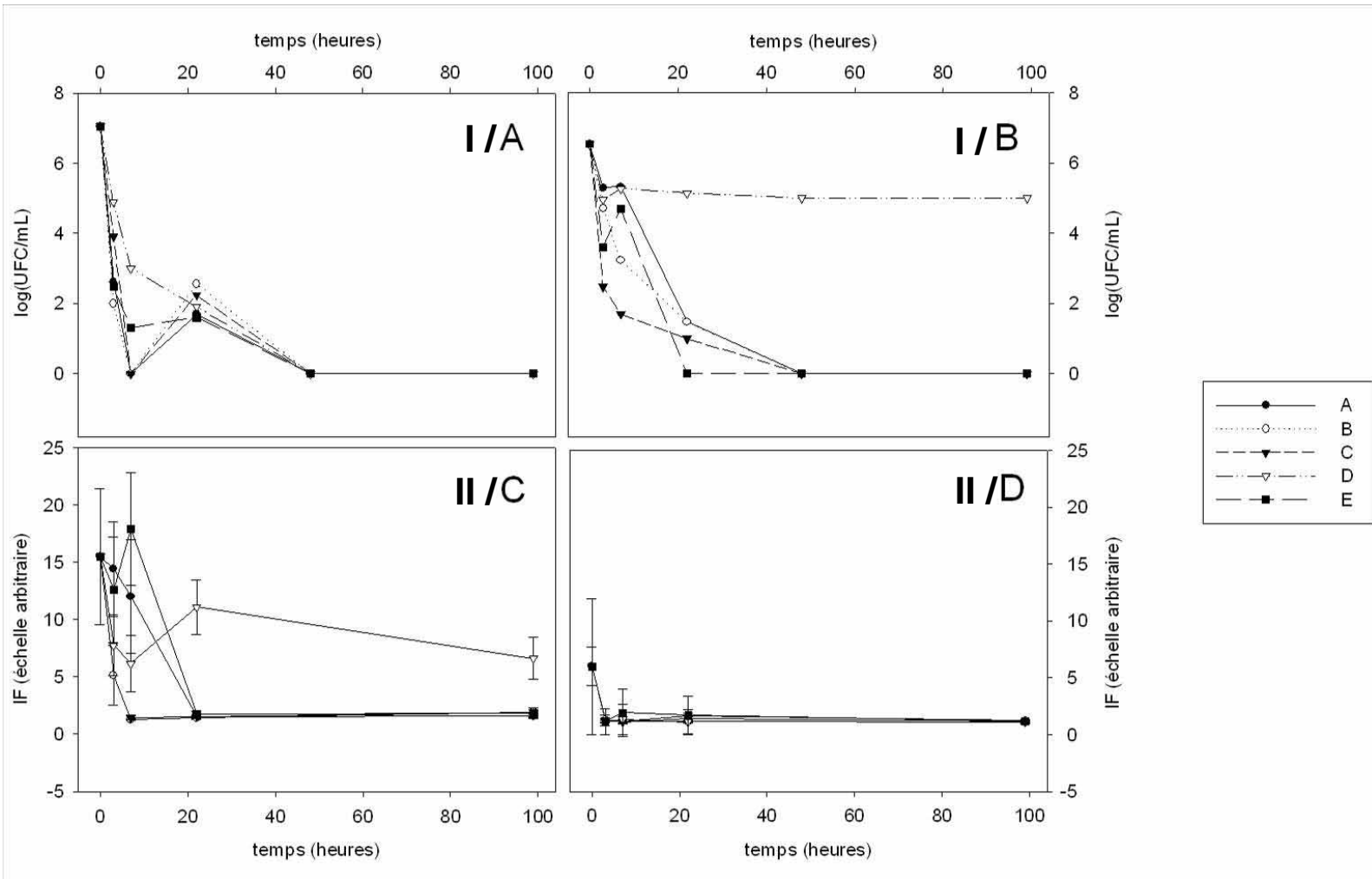
emploi lors du mutage des vins liquoreux, en remplacement total ou partiel du dioxyde de soufre.

#### 4.1.1. Action sur *Saccharomyces cerevisiae*

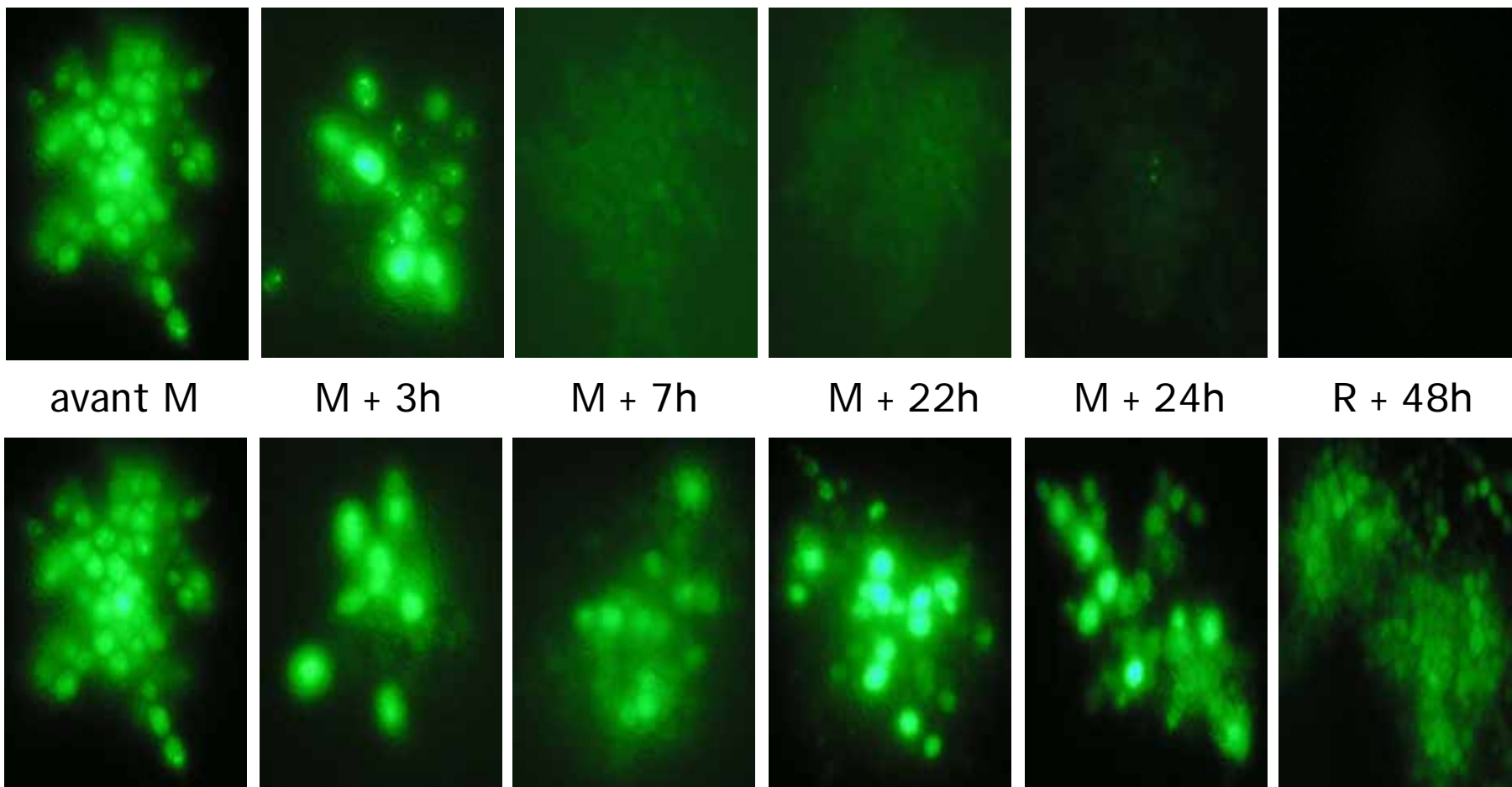
Les premières expérimentations ont été entreprises sur souches pures et plus particulièrement sur *Saccharomyces cerevisiae*. La souche Zymaflore ST a été choisie pour réaliser ces premiers essais. La figure 38A montre l'effet de différentes modalités de mutage sur cette souche. L'efficacité du DMDC est réelle : aucune cellule n'est détectée sur milieu de culture solide deux heures après l'addition de n'importe quelle concentration de DMDC. Ce n'est pas le cas avec l'addition de dioxyde de soufre, où le nombre diminue lentement avant de se stabiliser aux alentours de  $10^4$  UFC/mL. Dans le même temps, le comportement des cellules a été observé sous épifluorescence. La figure 38B montre l'évolution du rapport entre le nombre de cellules donnant une intensité de fluorescence supérieure à 2 et le nombre total de levures visualisables. Le nombre « 2 » a été choisi arbitrairement pour différencier les cellules qui ont encore une forte activité de celles qui ont atteint un niveau minimum stable en dessous duquel elles sont considérées comme mortes. Après addition de dioxyde de soufre, la diminution de l'intensité de fluorescence, représentative de l'activité cellulaire, est rapide et équivalente pour toutes les cellules. A l'inverse, après addition de DMDC, la décroissance de fluorescence est différente selon les cellules et progressive. La vitesse pour atteindre un niveau de fluorescence équivalent pour toutes les cellules dépend de la concentration de DMDC ajoutée. L'addition la plus faible ne permet pas d'éteindre totalement la fluorescence des cellules. Cette observation suggère que l'action des deux fongicides est différente. Cependant, les deux donnent des résultats complémentaires. Quelques jours après l'addition de DMDC, aucune cellule ne fluoresce plus et aucune colonie ne se développe sur milieu de culture solide.

#### 4.1.2. Action sur *Candida stellata* et *Zygosaccharomyces bailii*

La figure 39 montre les résultats obtenus après addition de différentes modalités de DMDC ou de dioxyde de soufre dans le vin en cours de fermentation alcoolique. Pour *Candida stellata*, on observe le même comportement que ce soit en présence de DMDC ou de



**Figure 39** : I : Evolution des populations dénombrées sur milieu gélosé (UFC/mL), après addition de DMDC et/ou de dioxyde de soufre (A : 100 mg/L DMDC, B : 200 mg/L DMDC, C : 300 mg/L DMDC, D : 200 mg/L SO<sub>2</sub>, E : 100 mg/L DMDC et 100 mg/L SO<sub>2</sub>) pour *Zygosaccharomyces bailii* (A) et *Candida stellata* (B). II : évolution de l'intensité de fluorescence pour les mêmes levures (respectivement C et D).



**Figure 40** : Evolution de l'intensité de fluorescence de *Zygosaccharomyces bailii* cultivée en souche pure avant et après mutage (M) à l'aide de 200 mg/L DMDC (en haut) ou de 200 mg/L de dioxyde de soufre (en bas). R : re-vivification en diluant 5 fois les cellules dans du jus de raisin lui-même dilué deux fois.

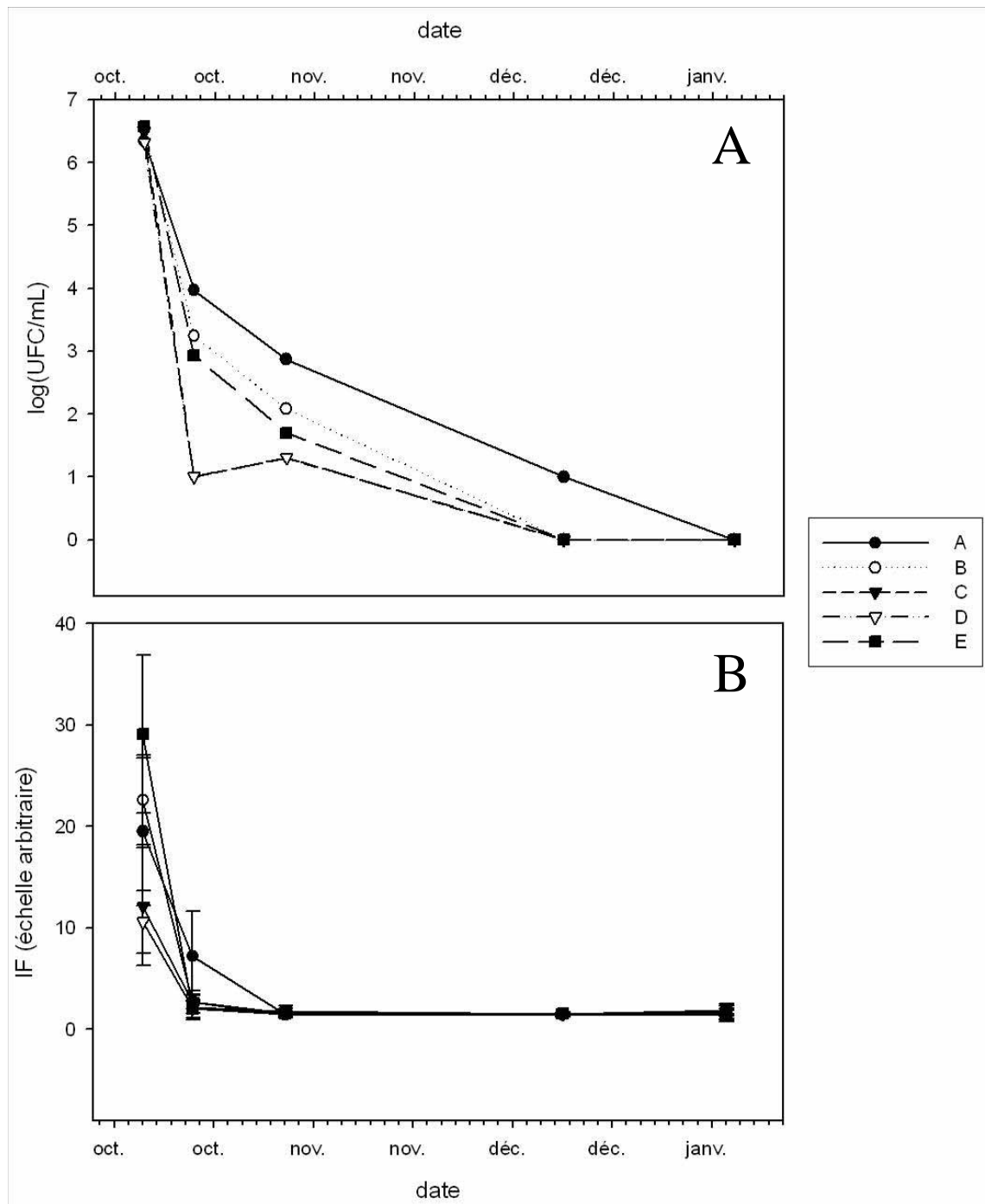
dioxyde de soufre : la fluorescence atteint rapidement un niveau minimum. En revanche, le comportement de *Zygosaccharomyces bailii* est très différent. Avec le dioxyde de soufre, *Z. bailii* ne réagit pas de manière évidente : l'intensité de fluorescence moyenne des cellules ne varie que faiblement. En fait, seul l'écart-type s'agrandit, ce qui signifie que les cellules ne réagissent pas toutes de la même manière. Néanmoins, la plupart des cellules conservent leur capacité à croître et donc à former des colonies sur milieu de culture solide. Après addition de DMDC, l'intensité de fluorescence décroît d'autant plus que la concentration en DMDC ajoutée est élevée. Après au maximum de 24 heures, elle atteint un niveau minimum stable.

Les cellules ont ensuite été diluées cinq fois dans du jus de raisin dilué deux fois. Après quelques jours, un prélèvement estensemencé sur milieu de culture solide. Pour *Candida stellata*, aucune colonie n'apparaît, alors que pour *Zygosaccharomyces bailii*, les cellules ont ressuscité dans le cas d'additions faibles de DMDC (inférieures à 200 mg/L), de même dans le cas d'une addition combinée de DMDC et de dioxyde de soufre. Après les additions de DMDC supérieures ou égales à 200 mg/L, la fluorescence des cellules s'éteint totalement (figure 40) et les colonies ne se développent pas.

Les résultats obtenus par ajout des deux fongicides suggèrent qu'après l'addition de DMDC, les cellules meurent, alors qu'après ajout de dioxyde de soufre, elles entrent dans un état viable non cultivable. La dose de 200 mg/L de DMDC est très efficace, y compris sur *Zygosaccharomyces bailii*, pourtant connue comme une espèce très résistante à la plupart des fongicides. Thomas (1981) a en effet décrit sa tolérance à plus de 3 mg/L de dioxyde de soufre moléculaire à pH 3,4. Pitt (1974) et Thomas et Davenport (1985) ont rapporté sa tolérance à 600 à 800 mg/L d'acide sorbique, à 600 à 1000 mg/L d'acide benzoïque et à 20 à 25 g/L d'acide acétique. Ces derniers ont même rapporté une tolérance à plus de 18 % (v/v) d'éthanol.

#### 4.1.3. Microvinification : action sur vin botrytisé en cours de fermentation alcoolique

Des fermentations alcooliques conduites par des levures indigènes en mélange naturel, ont été menées en volume de 1,5 L à partir de moût botrytisé, prélevé immédiatement après pressurage. Les cinq conditions précédemment utilisées ont été testées pour bloquer la fermentation alcoolique après que la densité a chuté de 0,1. Les flacons utilisés ont



**Figure 41** : A : Evolution du nombre de colonies développées sur milieu gélosé après addition de DMDC et/ou de dioxyde de soufre (A : 100 mg/L DMDC, B : 200 mg/L DMDC, C : 300 mg/L DMDC, D : 200 mg/L SO<sub>2</sub>, E : 100 mg/L DMDC et 100 mg/L SO<sub>2</sub>) sur levures indigènes (micro-vinification) B : Evolution de l'intensité de fluorescence des mêmes échantillons.

préalablement été placés 24 heures à 4°C pour mimer le refroidissement tel qu'il se pratique couramment dans les chais lors de la vinification des vins liquoreux.

Les populations sont dénombrées par culture (figure 41A) et par deux méthodes d'épifluorescence. La première utilise du diacétate de fluoresceine (Chemunex), permettant une certaine appréciation de la vitalité des levures (figure 41B). La seconde utilise le réactif Fun1® cell stain qui révèle l'intégrité membranaire pour visualiser plus précisément la proportion de cellules mortes (tableau XVII).

Le nombre de cellules cultivables devient rapidement indétectable (moins de 10 UFC/mL) seulement pour deux modalités de mutage : C et D, correspondant à l'addition de 300 mg/L de DMDC et l'addition de dioxyde de soufre (figure 41A). Pour les autres modalités (une plus faible concentration en DMDC ou un ajout combiné de dioxyde de soufre et de DMDC), l'efficacité du mutage dépend de la concentration en DMDC. Pourtant, deux mois après la fin de la fermentation alcoolique, plus aucune cellule cultivable n'est détectable.

La chute de l'intensité de fluorescence atteint rapidement un niveau minimum : le rapport entre l'intensité de fluorescence des cellules et celle du bruit de fond reste néanmoins supérieur à 1 (figure 41B). Cependant, pour la modalité A qui reçoit seulement 100 mg/L de DMDC, l'intensité de fluorescence met quelques jours de plus pour atteindre le même niveau de fluorescence. Pourtant, en dépit de cette intensité de fluorescence faible, les cellules restent vivantes puisqu'elles restent visibles sous épifluorescence.

Pour préciser la proportion de cellules vivantes et mortes, le « live-dead yeast viability kit » a été utilisé (tableau XVII). Une semaine après la fin de la fermentation alcoolique, seule la modalité 300 mg/L de DMDC permet de tuer plus de 50 % de cellules. La proportion de cellules mortes est proche pour les modalités 100 et 200 mg/L de DMDC et pour 200 mg/L de dioxyde de soufre. Le meilleur résultat est finalement celui obtenu pour un mutage à 300 mg/L de DMDC. L'ajout combiné de dioxyde de soufre et de DMDC est plus efficace avec près de 65 % de cellules tuées, en dépit de la faible concentration de chaque fongicide.

L'identification des levures survivantes cultivables a été réalisée par PCR-RFLP ciblant la région *ITS1*-ARNr 5,8S-*ITS2* trois semaines après la fin de la fermentation

**Tableau XVII :** Evolution du nombre total de levures et du pourcentage de cellules mortes visualisées par épifluorescence utilisant le “live-dead yeast viability kit » selon la modalité choisie pour bloquer la fermentation alcoolique (micro-vinification) A : 100 mg/L DMDC, B : 200 mg/L DMDC, C : 300 mg/L DMDC, D : 200 mg/L SO<sub>2</sub>, E : 100 mg/L DMDC and 100 mg/L SO<sub>2</sub>.

	Après 1 semaine		Après 12 semaines	
	dénombrement (cellules/mL)	Pourcentage de cellules mortes	dénombrement (cellules/mL)	Pourcentage de cellules mortes
A	$3,8 \times 10^7$	32,8	$1,0 \times 10^7$	58,5
B	$4,7 \times 10^7$	39,3	$9,5 \times 10^6$	58,3
C	$6,6 \times 10^7$	52,6	$1,4 \times 10^7$	66,0
D	$3,9 \times 10^7$	34,2	$6,8 \times 10^6$	57,3
E	$3,4 \times 10^7$	34,6	$6,7 \times 10^6$	63,8

**Tableau XVIII :** Identification des levures survivant dans le vin trois semaines après addition des fongicides suivants : A : 100 mg/L DMDC, B : 200 mg/L DMDC, C : 300 mg/L DMDC, D : 200 mg/L SO<sub>2</sub>, E : 100 mg/L DMDC et 100 mg/L SO<sub>2</sub>. Les nombres représentent les pourcentages de cellules vivantes totales.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>Z. rouxii</i>
A	100	0	0
B	9.1	27.3	63.6
C	0	50	50
D	0	0	100
E	0	0	100

alcoolique. Les résultats sont présentés sur le tableau XVIII. A faible concentration de DMDC, *Saccharomyces cerevisiae* domine nettement. Lorsque la concentration augmente, trois espèces cohabitent : *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Enfin, le dioxyde de soufre, avec ou sans DMDC ne laisse plus survivre que *Z. rouxii*.

Trois mois après la fin de la fermentation alcoolique, aucune cellule n'est capable de former des colonies sur milieu de culture solide quelle que soit la modalité de mutage appliquée. Pourtant, en raison du nombre important de cellules conservant une certaine fluorescence, la présence de cellules à l'état viable non cultivable ne doit pas être négligée. Pour tous ces échantillons, une tentative de résurrection a été tentée par la technique déjà explicitée. Dix jours après dilution, un prélèvement de chaque lot a étéensemencé sur milieu de culture solide. Seules les cellules des modalités 200 et 300 mg/L de DMDC n'ont pas pu retrouver leur capacité à former des colonies. Les colonies formées pour les autres lots ont été identifiées par PCR-RFLP. L'espèce *Zygosaccharomyces bailii* a été identifiée pour la modalité 100 mg/L et l'espèce *Candida stellata* pour les deux modalités où le dioxyde de soufre était présent. C'est la seule fois où l'espèce *Candida stellata* a été ressuscitée tout au long de cette étude. Cette espèce est donc bien « ressuscitable » comme les autres espèces fermentaires. Cela renforce l'hypothèse de son état viable non cultivable et non mort après mutage dans des conditions réelles de vinification. Les doses de dioxyde de soufre utilisées dans la réalité au moment du mutage, ainsi que les ajouts répétés au cours de l'élevage doivent l'empêcher de sortir de cet état de résistance. Comme l'identification par RT-PCR après plus d'un an d'élevage ne permet plus d'identifier cette espèce, après un long moment d'état VNC, les cellules finissent par mourir définitivement.

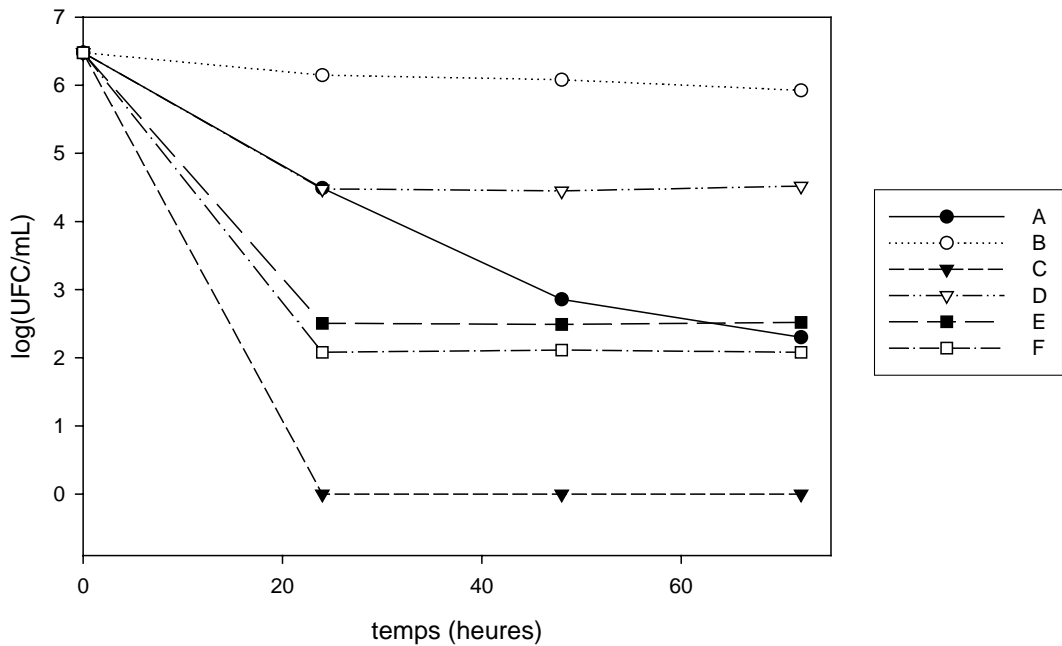
Les résultats obtenus sur vin botrytisé sont bien différents de ceux obtenus sur culture pure. Même si l'intensité de fluorescence des cellules se stabilise rapidement à un niveau minimum après addition de DMDC, la plupart restent vivantes. Plus la concentration en DMDC ajoutée est faible, plus le nombre de cellules vivantes est élevé. Comme le DMDC est rapidement hydrolysé par l'éthanol, son efficacité dépend de la concentration ajoutée. Pour une concentration de 300 mg/L de DMDC, le nombre d'UFC/mL décroît très rapidement et aucune colonie n'est détectée après quelques jours. Cependant, cette concentration est trop importante pour être envisagée dans le vin en raison de la quantité de méthanol formée.



Une semaine après l'addition en mélange des deux fongicides, le pourcentage de levures mortes dépend également de la concentration de DMDC ajoutée. Pour 200 mg/L, les résultats sont très proches de ceux obtenus par addition de 200 mg/L de dioxyde de soufre et de ceux obtenus par addition combinée dioxyde de soufre et DMDC. Ce résultat suggère que le DMDC est aussi efficace que le dioxyde de soufre pour une même concentration utilisée. Certaines cellules peuvent néanmoins survivre quelques heures ou entrer dans l'état VNC. L'efficacité du DMDC à 200 mg/L est confirmée par l'absence de cellules ressuscitées trois mois après la fin de la fermentation alcoolique. Cela ne confirme pas les résultats obtenus sur cultures pures. Il est possible que la microflore diverse, composée de nombreuses espèces de levures en compétition, et le milieu vin également complexe soient des facteurs importants à prendre en compte. Leur croissance lente dans le milieu naturel hostile rend probablement les levures plus résistantes aux fongicides, même au DMDC. Dans les essais sur culture pure, les mutages ont été réalisés après des fermentations alcooliques rapides et bien plus incomplètes. Par conséquent, au moment du mutage, la concentration en éthanol était probablement bien plus faible que dans un vin liquoreux, de sorte que le DMDC a été plus efficace que dans une vinification classique, car il n'a été que partiellement hydrolysé par l'éthanol. Le DMDC a donc pu agir longtemps après son ajout, ce qui n'est pas le cas lors d'une addition dans du vin botrytisé.

Trois mois après l'addition des deux fongicides, le pourcentage de cellules mortes augmente dans tous les cas ; en particulier lors d'une addition combinée de dioxyde de soufre et de DMDC, il atteint le niveau de celui observé avec une addition de 300 mg/L de DMDC.

Finalement, l'emploi du DMDC pour arrêter la fermentation alcoolique des vins liquoreux a les mêmes conséquences microbiologiques que l'emploi du dioxyde de soufre. Les cellules entrent d'abord dans un état VNC et sont parfois capables de ressusciter lorsque les conditions de vie deviennent plus favorables. La sortie de cet état semble plus facile aux faibles concentrations de DMDC ou après sulfitage. L'addition combinée de DMDC et de dioxyde de soufre paraît être toujours la meilleure solution pour tuer rapidement un grand nombre de cellules. De toutes façons, l'addition de DMDC sans dioxyde de soufre est inconcevable. L'activité antioxydante du dioxyde de soufre reste indispensable. Les vins mutés sans dioxyde de soufre sont très altérés par oxydation. Même à 100 mg/L de dioxyde



**Figure 42** : Evolution du nombre de colonies des levures indigènes (fermentation alcoolique en barrique avec population de levures indigènes) après additions de DMDC et/ou de dioxyde de soufre (A : 250 mg/L SO<sub>2</sub>, B : 125 mg/L SO<sub>2</sub>, C : 125 mg/L SO<sub>2</sub> + 100 mg/L DMDC, D : 50 mg/L DMDC, E : 75 mg/L DMDC, F : 100 mg/L DMDC).

de soufre avec le DMDC, une forte oxydation est visible. Par conséquent, le sulfitage demeure obligatoire et sa teneur dépend probablement du millésime, du pouvoir d'oxydation et de combinaison du vin.

#### 4.1.4. Action sur du vin issu de fermentation alcoolique en barrique

L'efficacité du DMDC a été testée sur la microflore indigène après une fermentation alcoolique en barrique. Dans cette expérience, différentes modalités de mutage ont été appliquées. L'efficacité du DMDC et du dioxyde de soufre a été contrôlée par simple ensemencement sur milieu de culture solide (figure 42). L'action du dioxyde de soufre est beaucoup plus progressive que celle du DMDC qui est brève et rapide. L'action destructrice la plus efficace relève à nouveau de l'addition simultanée des deux fongicides. Après quelques heures, plus aucune cellule n'est capable de former des colonies.

#### 4.2. Conclusion sur les possibilités d'éviter les refermentations

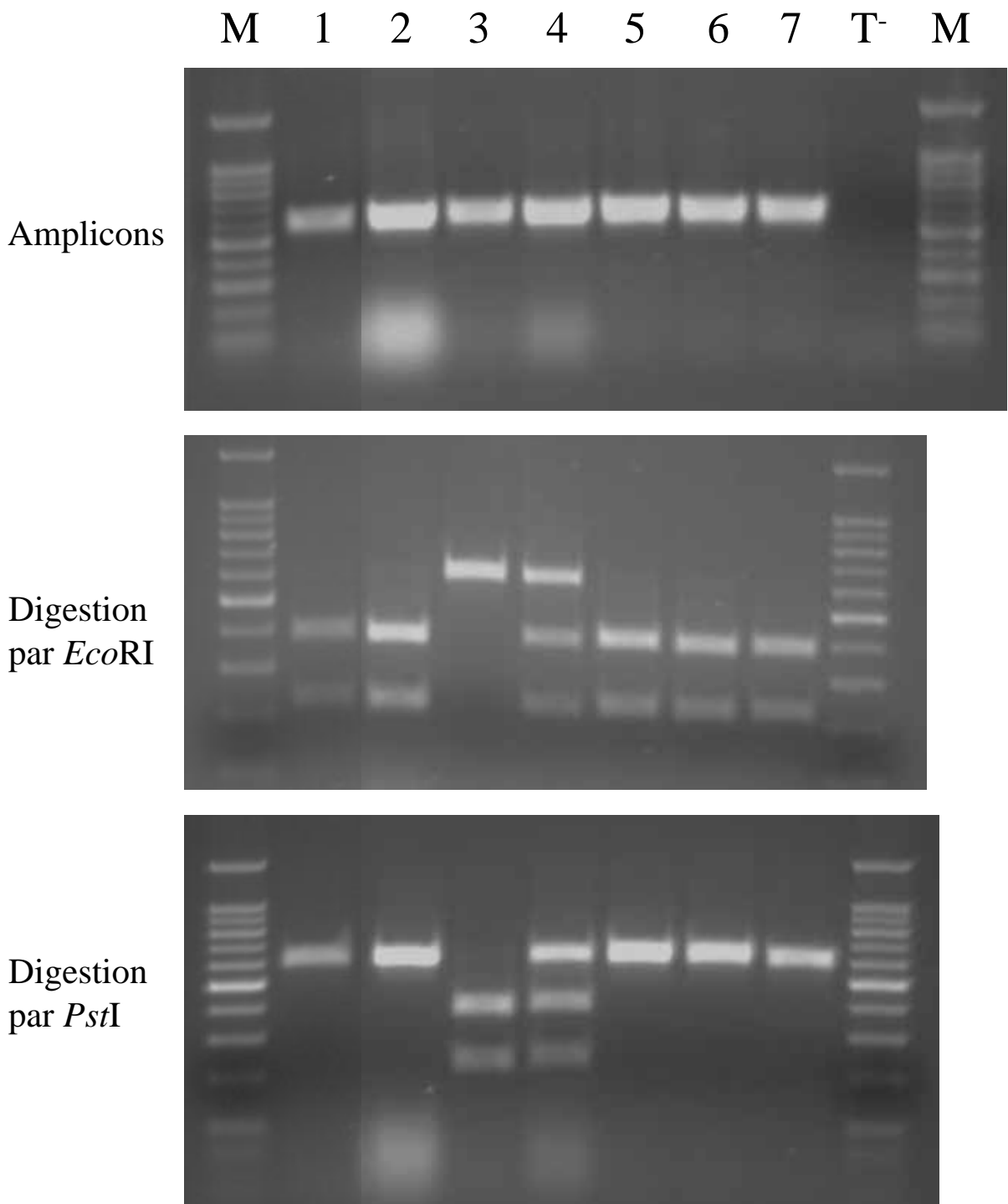
Au cours de l'élevage du vin, le maintien d'une teneur en dioxyde de soufre actif supérieure à 0,40 mg/L est indispensable. La notion de pH est donc primordiale et doit venir compléter celle de concentration en dioxyde de soufre libre. Une aération minimum doit être observée pour éviter le développement de levures dont le métabolisme oxydatif est connu, même si l'incidence de leur présence n'a pas été mise en évidence. Un soutirage trimestriel, comme il est recommandé à l'heure actuelle, convient.

Le DMDC pourrait être utilisé pour stopper la fermentation alcoolique, même à faible concentration (100 mg/L). Néanmoins, pour une stabilité microbiologique durable, et une action antioxydante, l'ajout combiné de DMDC et de dioxyde de soufre est la solution la plus envisageable. L'utilisation du DMDC dans la vinification des vins liquoreux pourrait donc apparaître comme une solution pour diminuer les concentrations très élevées de dioxyde de soufre, notamment les années où les moûts combinent facilement cette molécule. Aujourd'hui, si l'emploi de DMDC est autorisé par l'OIV, son utilisation reste interdite dans les vins au sein de l'Union Européenne.

En raison des difficultés pour éliminer les levures telles que *Zygosaccharomyces spp.*, particulièrement résistante à de nombreux fongicides, Fugelsang (1998) a suggéré l'emploi de

**Tableau XIX** : Population de levure et caractéristiques de trois vins en cours de refermentation (après environ un an d'élevage)

<b>château</b>	<b>Date</b>	<b>Dénombrement (UFC/mL)</b>	<b>[SO<sub>2</sub> libre] (mg/L)</b>	<b>[éthanal] (mg/L)</b>
Y	Fin août 2003	880	14	89
		940	10	101
		7830	10	113
Y (lies)		2580		
		5820		
G	Fin août 2003	8920	27	136
TB	Début janvier 2004			128



**Figure 43** : PCR ciblant le gène *MET2*, puis RFLP par *EcoRI* et *PstI*, permettant la différenciation de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. M : Marqueur de taille 100 bp (Promega). 1 : *Saccharomyces cerevisiae* ZymafloreST, 2 : *Saccharomyces cerevisiae* VL3C, 3 : *Saccharomyces uvarum* P3, 4 : hybride *S. cerevisiae* × *S. uvarum* S6U, 5 : L0431, 6 : L0432, 7 : L0433.

monoxyde de carbone qui agirait comme le dioxyde de soufre sur les cellules et aurait pour avantage d'être totalement converti en hydrogène et dioxyde de carbone. *Zygosaccharomyces spp.* y serait sensible à des niveaux de 480 mg/L., contrairement à *Saccharomyces* qui résiste même à des teneurs de plus de 1000 mg/l. De plus, il ne possède pas d'effet à long terme. Si une nouvelle contamination intervient, il faut traiter à nouveau le vin.

Pour la mise en bouteille, la teneur en dioxyde de soufre moléculaire doit absolument être supérieure à 0,40 mg/L. De plus, il est probable, que les levures à l'état VNC sont capables de passer au travers de filtres non stérilisants. Il est donc recommandé d'utiliser des filtres suffisamment serrés afin de garantir la stérilité du vin.

## 5. FINALEMENT, QU'EST-CE QU'UNE LEVURE DE REFERMENTATION ?

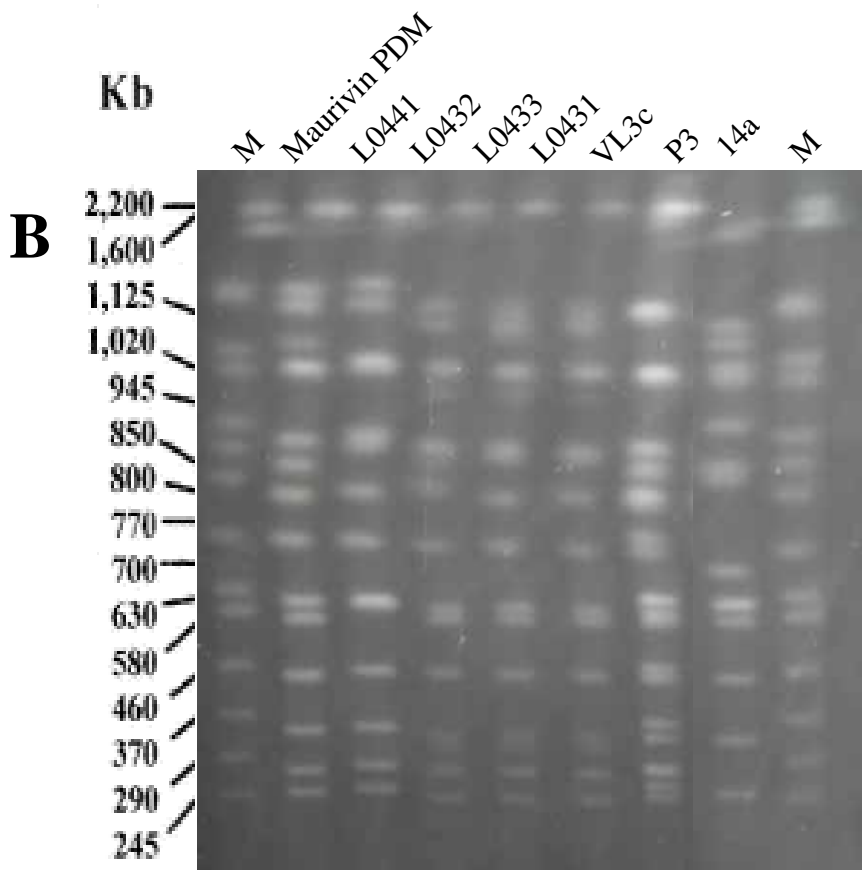
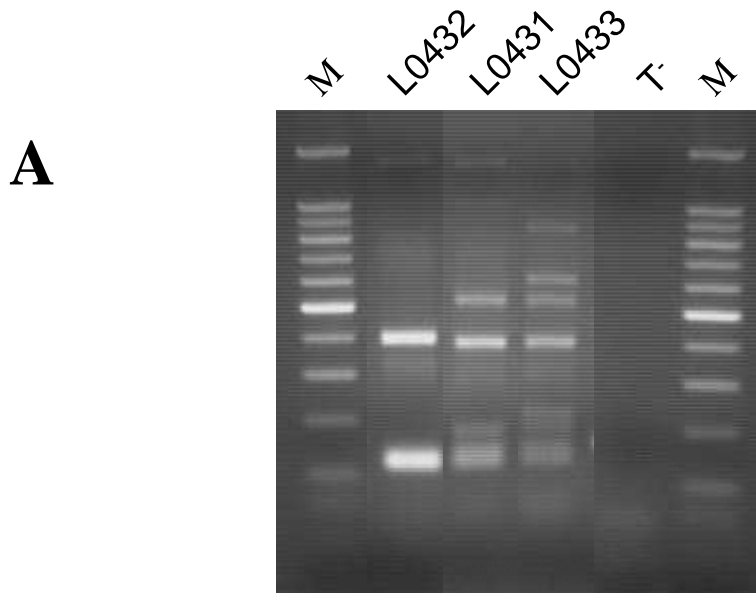
« Les "comment" m'intéressent assez pour que je renonce sans regret à la vaine recherche des "pourquoi". »

Roger Martin du Gard (1922-1940)

L'objectif est de comprendre en quoi certaines souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de survivre au dioxyde de soufre. Ont-elles des particularités singulières qui les distingueraient des autres souches de *S. cerevisiae* ? Peut-on mettre en évidence des facteurs physiologiques et/ou génétiques favorisant son adaptation à un milieu particulièrement hostile (présence de dioxyde de soufre) ?

### 5.1. Isolement de levures de refermentation

Trois refermentations, dans trois châteaux distincts, ont été constatées un peu avant, ou un peu après les vendanges 2003, sur des vins du millésime 2002. Les principales caractéristiques de ces vins sont rapportées dans le tableau XIX. Après isolement de trois clones, les levures responsables de ces refermentations ont été identifiées par PCR-RFLP ciblées sur la région *ITS1-5,8S ARNr-ITS2*, comme appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Une PCR ciblant le gène *MET2* (Masneuf *et al.*, 1998) a été effectuée comme dernier contrôle d'identification (figure 43). Un fragment de 580 pb a donc été généré puis digéré par les enzymes *EcoRI* et *PstI*. La coupure des fragments de chaque clone isolé L0431,



**Figure 44** : A : PCR sur les régions inter $\delta$  des trois souches de *Saccharomyces cerevisiae* isolées de fermentation. M : marqueur de taille (100 bp Promega), T<sup>-</sup> : Témoin négatif  
 B : Caryotypage de différentes souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. M : souche YNN 295. les tailles de bandes sont indiquées par rapport à ce marqueur.

L0432 et L0433 par l'enzyme *EcoRI* et non par *PstI* a permis de confirmer l'appartenance des souches à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Une coupure par *PstI* et non par *EcoRI* aurait identifié des *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. Cette technique a permis d'affirmer également que les espèces isolées n'étaient pas non plus des hybrides entre ces deux espèces.

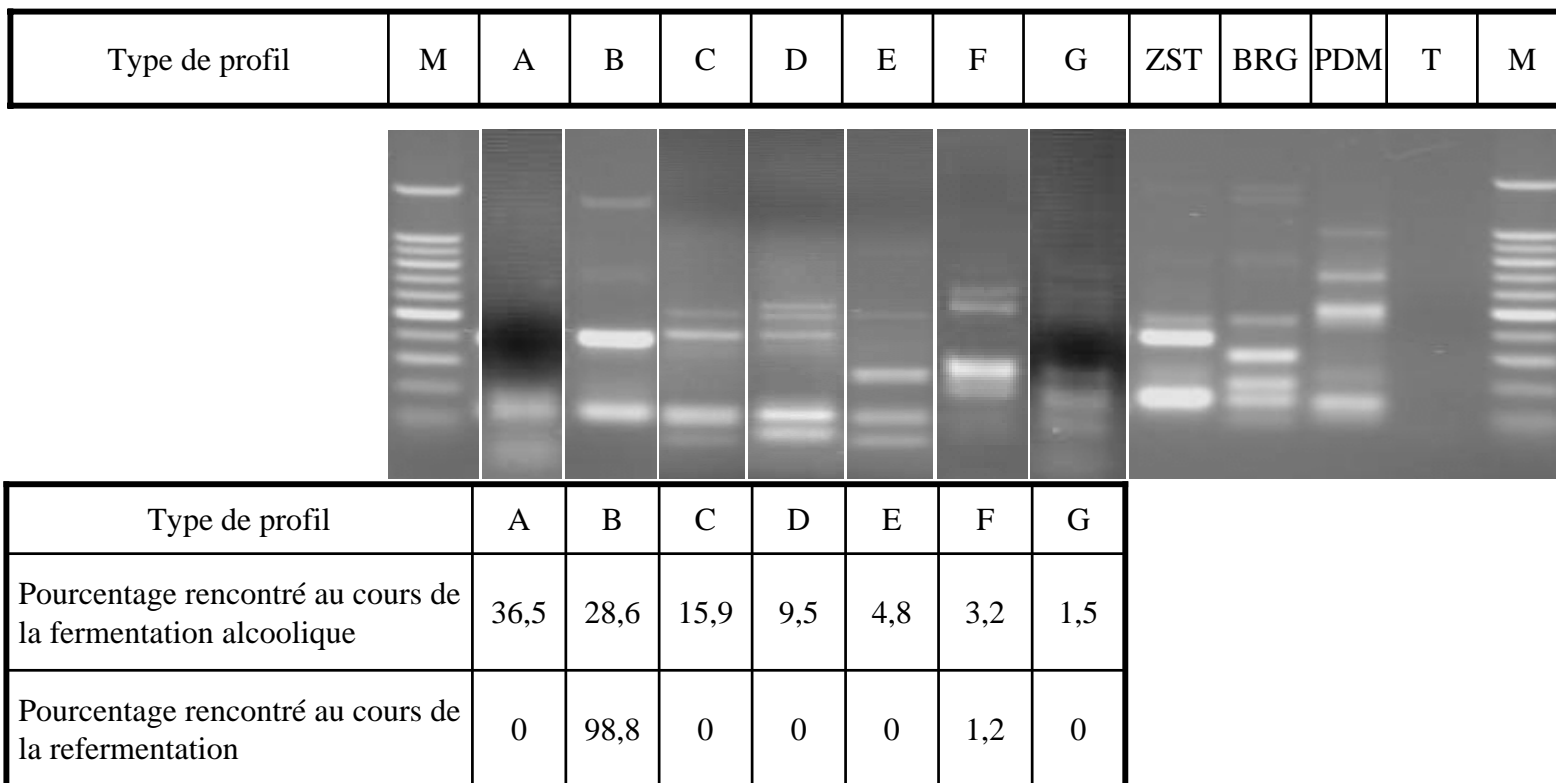
La PCR sur les régions inter $\delta$ , réalisée sur les trois isolats a révélé que chaque château avait une souche de refermentation distincte (figure 44A). Le caryotype de ces levures a été réalisé parallèlement par électrophorèse en champ pulsé (figure 44B). Les souches sont bien distinctes entre elles en raison de leurs profils génétique inter $\delta$  différents, cependant, leur caryotype identique indique une parenté phylogénétique indéniable.

Par ailleurs, ces cellules, bien qu'appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, ont une taille significativement plus importante que la normale mesurée en cours de fermentation alcoolique classique, selon un test de Student à 0,1%. Pour la souche L0432, la taille moyenne est de 6,94  $\mu\text{m}$  (écart-type : 0,80  $\mu\text{m}$ ) contre une moyenne de 5,84  $\mu\text{m}$  (écart-type : 1,18  $\mu\text{m}$ ) lors des fermentations dans ce château. Pour la souche L0433, la taille moyenne est de 6,87  $\mu\text{m}$  (écart-type : 0,46  $\mu\text{m}$ ) contre une moyenne de 5,45  $\mu\text{m}$  (écart-type : 0,87  $\mu\text{m}$ ) lors des fermentations dans ce château.

## 5.2. Ecologie des souches de *S. cerevisiae* en fermentation et en refermentation

D'après les premières identifications réalisées sur quelques clones, chaque château a sa propre souche de refermentation, et tous les clones identifiés pour un même lot de vin sont identiques. Or, lors d'une fermentation alcoolique réalisée par des levures indigènes, plusieurs souches interviennent. Il a donc paru opportun de réaliser une étude écologique de la variabilité des souches au sein d'un même lot, en comparant la biodiversité en cours de fermentation alcoolique initiale et en cours de refermentation. Cela a été possible car le lot du château Y avait été suivi lors de la fermentation alcoolique initiale. Plus précisément, le lot en refermentation était issu de l'assemblage de quatre lots de vendange : le premierensemencé par la souche commerciale ZymafloreST, le deuxièmeensemencé par la souche Maurivin PDM, le troisième par la souche Levuline BRG et le dernier nonensemencé. C'est ce dernier lot qui avait fait l'objet d'un suivi régulier au cours de la fermentation alcoolique.





**Figure 45** : Profils génétiques obtenus par PCR sur les régions inter $\delta$  et pourcentages de la population totale au cours de la fermentation alcoolique et au cours de la refermentation, pour 7 clones identifiés. Les profils génétiques des trois souches commerciales issues des lots assemblés sont également présentés. A à G : clones isolés dans la fermentation sur levures indigènes, M : marqueur de taille (100 bp, Promega), ZST : Zymaflore ST, BRG : Levuline BRG, PDM : Maurivin PDM.

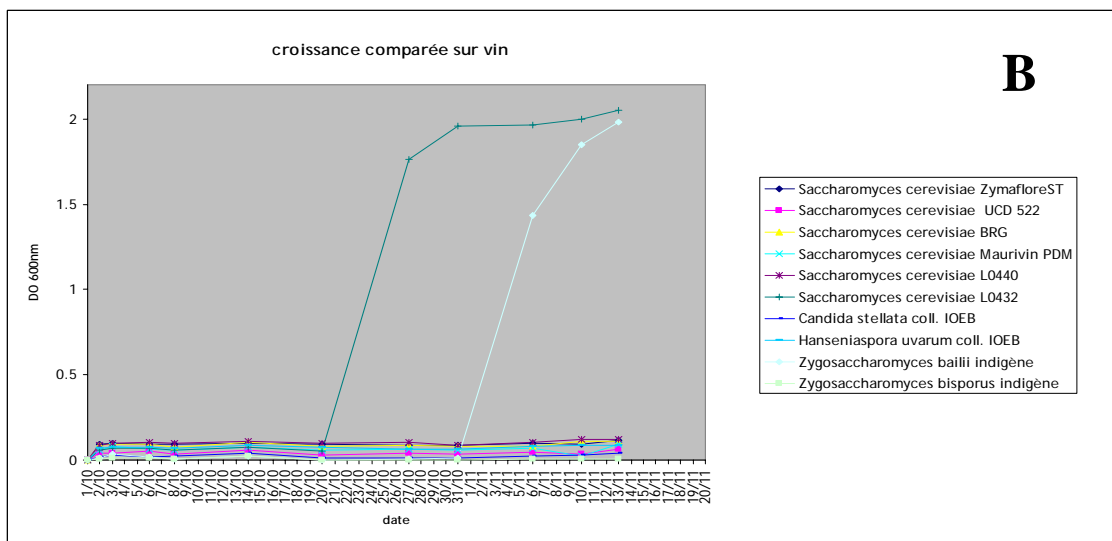
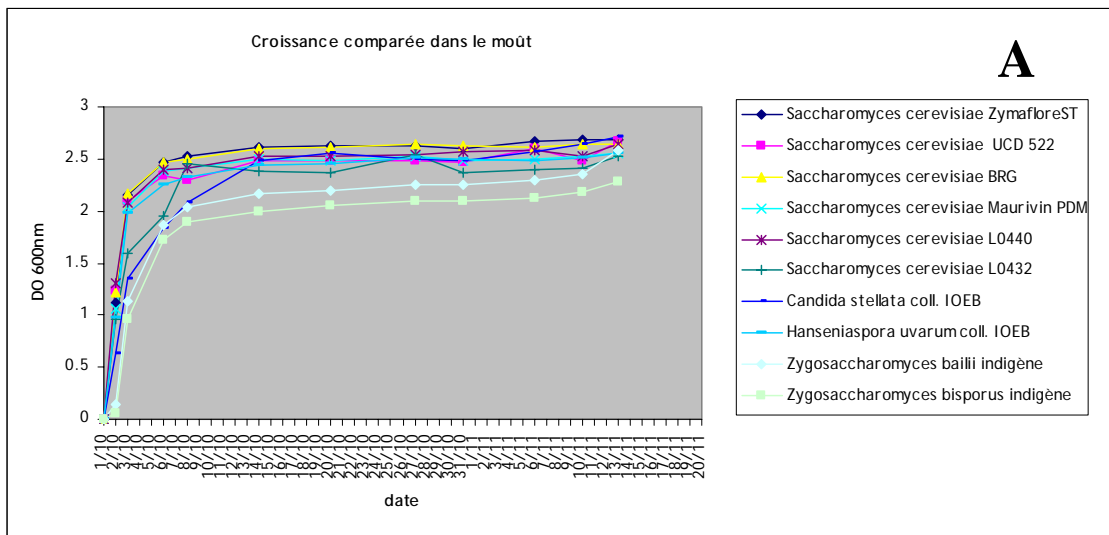
L'étude écologique a été menée par PCR interδ afin d'établir un profil génétique de chaque clone. Quatre-vingt-neuf clones de refermentation ont ainsi été comparés aux trois souches commerciales utilisées et à quatre-vingt-seize clones de la fermentation alcoolique spontanée. Le bilan de ces comparaisons est présenté sur la figure 45. La refermentation est le fait d'une souche quasiment unique (seul 1 clone sur 89 présente un profil différent), alors que la fermentation alcoolique initiale avait été réalisée par 7 souches de *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, la souche principale de la refermentation a un profil différent des souches commerciales, et elle était présente lors de la fermentation spontanée, mais n'était pas majoritaire.

Au cours d'une fermentation alcoolique initiale d'un vin liquoreux, de nombreuses souches cohabitent. Compte tenu de la lenteur et la difficulté des fermentations alcooliques des moûts botrytisés, il est concevable qu'une diversité des souches de *Saccharomyces cerevisiae* soit nécessaire. En revanche, la refermentation n'est imputée qu'à une seule souche. Par conséquent, une sélection drastique au sein même de l'espèce s'est opérée suite au mutage et durant un an, au profit de cette seule souche particulièrement résistante aux conditions hostiles du milieu. Ce résultat est conforme avec des observations préalables (sélection des souches de *Saccharomyces cerevisiae* après mutage) réalisées sur des vins du millésime 2001 suite au mutage.

### 5.3. Capacité à croître dans le vin désulfité

Plusieurs hypothèses sont envisageables quant aux raisons de la survie de cette souche : capacité à entrer et à sortir de l'état VNC accrue comme stratégie de survie en milieu hostile, capacité de résistance accrue à la pression osmotique, à l'éthanol et surtout au dioxyde de soufre.

La capacité des souches de refermentation à croître dans du vin contenant une importante concentration, en sucres résiduels, en éthanol et en dioxyde de soufre est surprenante, même si elle est limitée (jamais plus de  $10^4$  UFC/mL lors d'une refermentation). La comparaison des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et de quelques espèces de levures couramment rencontrées dans les vins liquoreux a donc été réalisée.



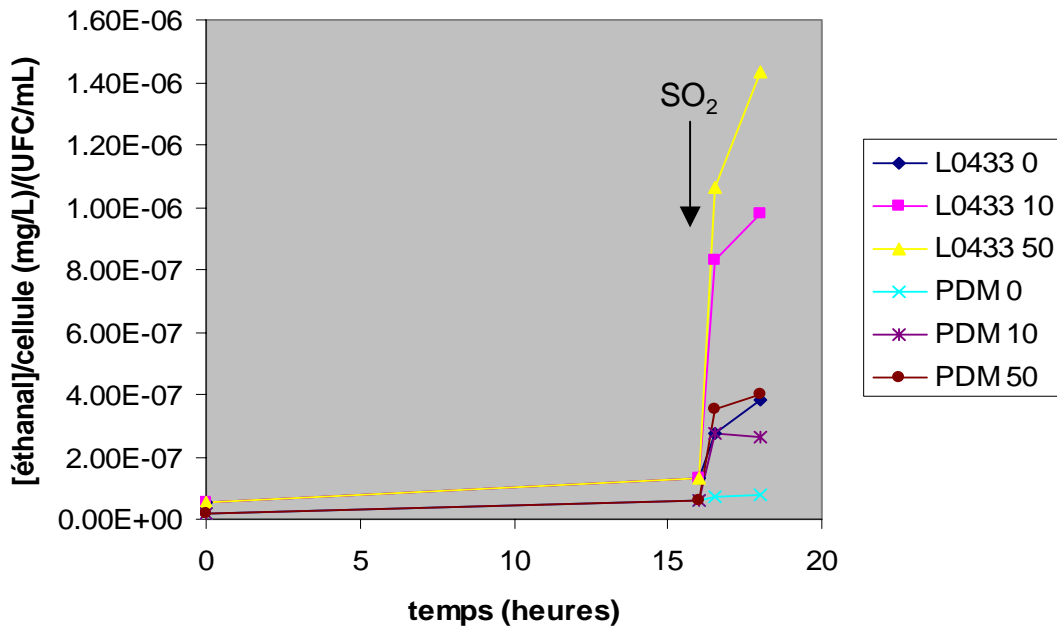
**Figure 46** : Suivi de la croissance de 10 souches de levures dans du jus de raisin (A) et dans du vin botrytisé désulfité par ajout d'éthanal (B) en cultures pures.

Un vin botrytisé, dont la concentration en dioxyde de soufre libre a été ramenée à 0 mg/L par ajout d'éthanal, a été ensemencé en culture pure par différentes souches de levures : *Saccharomyces cerevisiae* ZymafloreST, UCD 522, Levuline BRG, Maurivin PDM, L0440, L0432, *Candida stellata* (CBS 2649), *Zygosaccharomyces bailii* (L0310), *Hanseniaspora uvarum* (CBS 5914) et *Zygosaccharomyces bisporus* (L0444). Il en a été de même avec du jus de raisin dont la concentration en sucres résiduels a été amenée à 300 g/L (50% glucose, 50% fructose). Ces souches ont été précédemment cultivées dans 10 mL de YPG liquide pendant 48 heures. L'ensemencement a été réalisé dans 50 mL avec environ  $10^6$  cellules par mL et la croissance suivie par l'absorbance à 600 nm (figure 46).

Dans le jus de raisin, la croissance de toutes les souches est rapide, cependant, la souche de refermentation L0432 est plus lente que les autres souches de *Saccharomyces cerevisiae* et sa courbe de croissance, tout étant proche des autres *S. cerevisiae*, tend vers celle de *Zygosaccharomyces spp.* Dans tous les cas, le début de phase stationnaire se profile après 8 jours de culture.

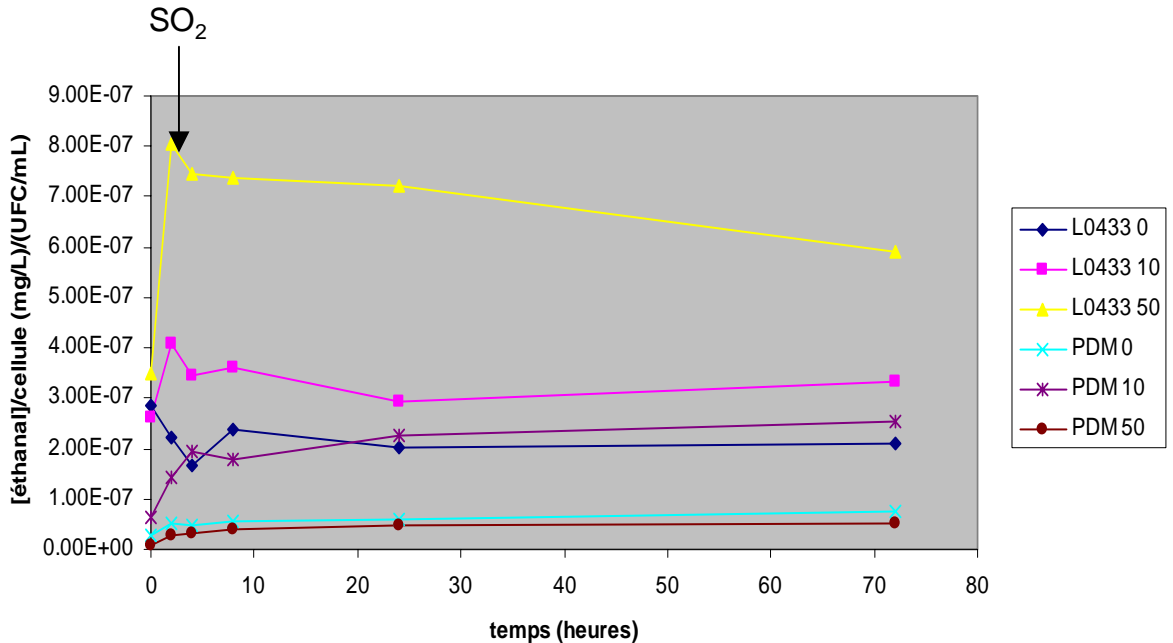
En croissance dans du vin, les souches se comportent différemment. Dans un premier temps, aucune souche ne se multiplie. Cependant, après 20 jours de phase de latence, la souche de refermentation commence à croître. Puis, après 31 jours, c'est la souche appartenant à l'espèce *Zygosaccharomyces bailii*. Aucune autre souche de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* n'a été capable de se multiplier dans ce vin. Tout se passe comme si la souche de refermentation adoptait un comportement similaire à celui de l'espèce *Zygosaccharomyces bailii*, espèce connue pour sa résistance élevée à un grand nombre de stress (notamment la pression osmotique, la concentration en éthanol, la concentration en fongicide...), l'une des principales levures de contamination d'un certain nombre de boissons sucrées (vin, cidre, jus d'orange...). Dans cette expérience, comme le dioxyde de soufre libre a été totalement éliminé, on peut émettre l'hypothèse que la souche de refermentation est plutôt résistante à l'éthanol et à la pression osmotique. La longue phase d'attente correspond probablement à une phase d'adaptation à un environnement hostile, en particulier aux stress pression osmotique et éthanol.

La croissance plus faible de la souche de refermentation dans le jus de raisin par rapport aux autres souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* a été observée à d'autres



**Figure 47** : Evolution de la teneur en éthanal par cellule suite à un ajout de différentes concentrations en dioxyde de soufre après 16 heures de culture pour 2 souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

En légende, le chiffre suivant le nom de la souche indique la concentration en dioxyde de soufre libre dans le milieu, juste après l'ajout de dioxyde de soufre.



**Figure 48** : idem figure 5.4. (1) . Suivi de la teneur en éthanal par cellule pendant 72 heures après l'ajout de dioxyde de soufre dans le milieu de culture.

occasions (figure 46A en croissance dans du YPG liquide par exemple). Cette observation est peut-être à relier avec le fait que la population nécessaire pour les re fermentations est faible (environ  $10^4$  UFC/mL). Ces souches semblent capables de croître dans des conditions de stress important, mais la multiplication reste limitée.

#### 5.4. Capacité à former de l'éthanal suite à un choc au dioxyde de soufre

Deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* (L0433 et Maurivin PDM) ont été cultivées dans 50 mL de YPG. La première souche a été choisie pour sa résistance supposée au dioxyde de soufre, et la deuxième pour sa sensibilité connue au dioxyde de soufre. Après 16 heures de culture, du dioxyde de soufre est ajouté de manière à obtenir des teneurs en dioxyde de soufre libre de 0 (témoin), 10 et 50 mg/L. Juste avant ajout de dioxyde de soufre, les populations sont respectivement de  $4,3 \cdot 10^7$  UFC/mL et  $1,2 \cdot 10^8$  UFC/mL. La teneur en éthanal a été mesurée 30 minutes, puis 2 heures, après l'ajout de dioxyde de soufre. La figure 47 présente l'évolution de la teneur en éthanal dans les différents flacons.

Plus la teneur en dioxyde de soufre augmente, plus la teneur en éthanal formée augmente quelle que soit la souche considérée. Ce résultat a déjà été décrit comme correspondant à une réponse au stress induit par la présence de dioxyde de soufre (Peypaud et Lafourcade, 1952). Plus précisément, la quantité d'éthanal formées par cellule est nettement plus importante pour la souche isolée de re fermentation que pour la souche Maurivin PDM. Notons également que la souche L0433 continue à former de l'éthanal après 30 minutes alors que la souche Maurivin PDM arrête.

Ce résultat a été confirmé lors d'une deuxième expérience prolongée pendant 72 heures après l'ajout de dioxyde de soufre (figure 48). Dans cette expérience, la concentration de dioxyde de soufre libre de 10 mg/L, ne gêne pas beaucoup la levure dans la mesure où aucune augmentation de la teneur en éthanal n'est notée. Avec un ajout de 50 mg/L de dioxyde de soufre libre, l'éthanal augmente pour les deux souches, mais de façon beaucoup plus importante à nouveau pour la souche de re fermentation.

Les différences de capacités des souches de *Saccharomyces cerevisiae* ont déjà été rapportées par Romano *et al.* (1994) qui classent ces souches en deux catégories : les faibles et les fortes productrices d'éthanal. Stratford *et al.* (1987) avaient déjà remarqué que les

souches résistantes au dioxyde de soufre formaient plus d'éthanal que les souches sensibles. La souche L0433 semble donc appartenir au groupe des *S. cerevisiae* résistantes au dioxyde de soufre.

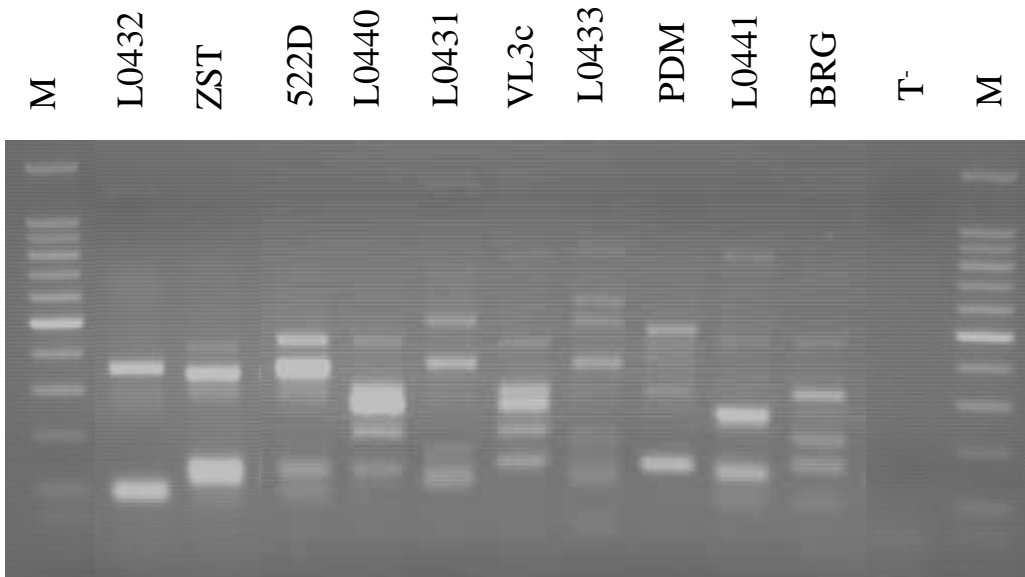
### 5.5. Caractéristiques génétiques de la résistance au dioxyde de soufre des levures de refermentation

Les souches de refermentation semblent donc plus « combattives » face au stress induit par la présence de dioxyde de soufre, et réagissent par une production d'éthanal qui combine le dioxyde de soufre libre. Cependant, la synthèse d'éthanal n'est pas la seule réponse connue. L'expulsion du dioxyde de soufre à l'extérieur de la cellule est un phénomène déjà observé et l'équipement moléculaire a été décrit récemment. Le but de cette partie est de savoir si ces souches sont programmées génétiquement pour avoir une réponse rapide et efficace à la présence de dioxyde de soufre dans le milieu.

#### 5.5.1. Discrimination des souches selon leur potentiel d'expression du gène *SSU1*

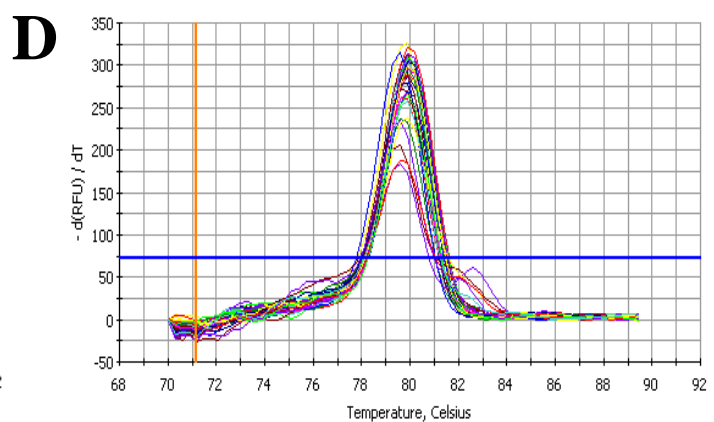
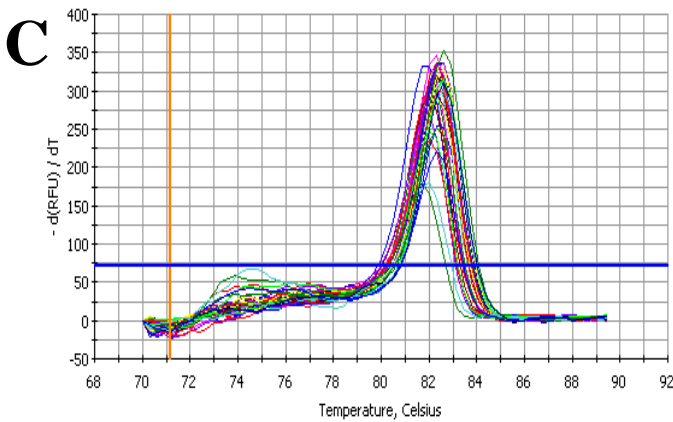
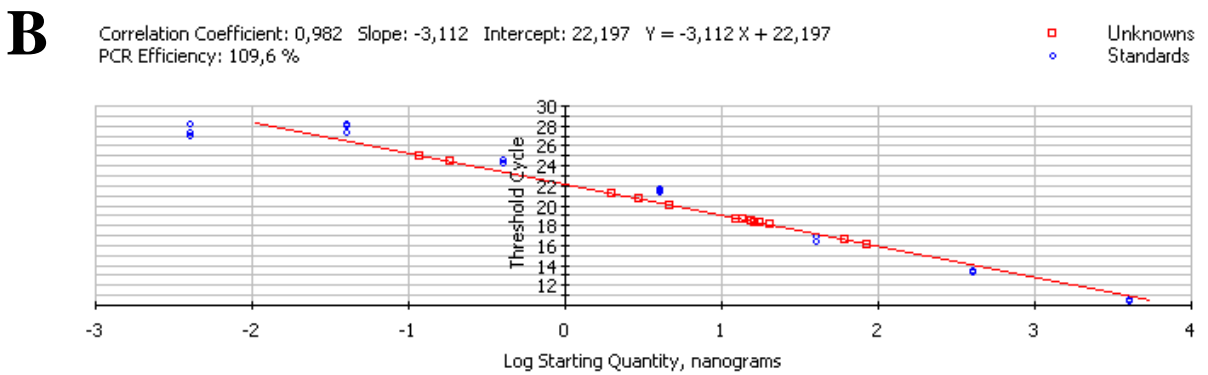
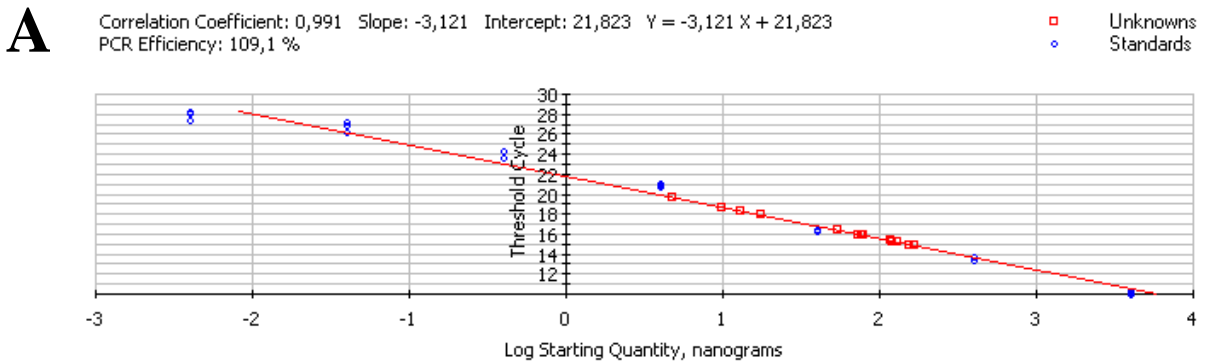
Une expérience a été réalisée pour comparer l'intensité d'expression du gène *SSU1* sur différentes souches de *S. cerevisiae*, en l'absence de dioxyde de soufre dans le milieu de culture. La différence d'expression a été appréciée par rapport à celle du gène *ACT1*, largement décrit dans la littérature comme ayant une expression stable au cours du cycle cellulaire et pouvant ainsi servir de « gène de ménage » (Giulletti *et al.*, 2001). Le niveau d'expression d'*ACT1* peut éventuellement varier en fonction des souches, mais l'important est de mesurer l'expression de *SSU1* par rapport à *ACT1*. De plus, Bleve *et al.* (2003) ont prouvé que ce gène pouvait servir de marqueur de quantification en PCR en temps réel, puisque le cycle seuil de détection du gène est proportionnel au nombre initial de cellules. *ACT1* peut donc être utilisé comme gène contrôle pour la comparaison des souches entre elles.

Après 24 heures de culture en milieu YPG à pH 5 ou pH 3,9, les ARN totaux de 10 souches sont extraits. Les souches choisies sont les suivantes : les trois souches isolées de refermentation (L0431, L0432 et L0433), quatre souches commerciales couramment utilisées pour l'ensemencement des moûts botrytisés dans la région de Sauternes (ZymafloreST (Masneuf et Dubourdiou, 2000), UCD 522, Levuline BRG et Maurivin PDM), la souche

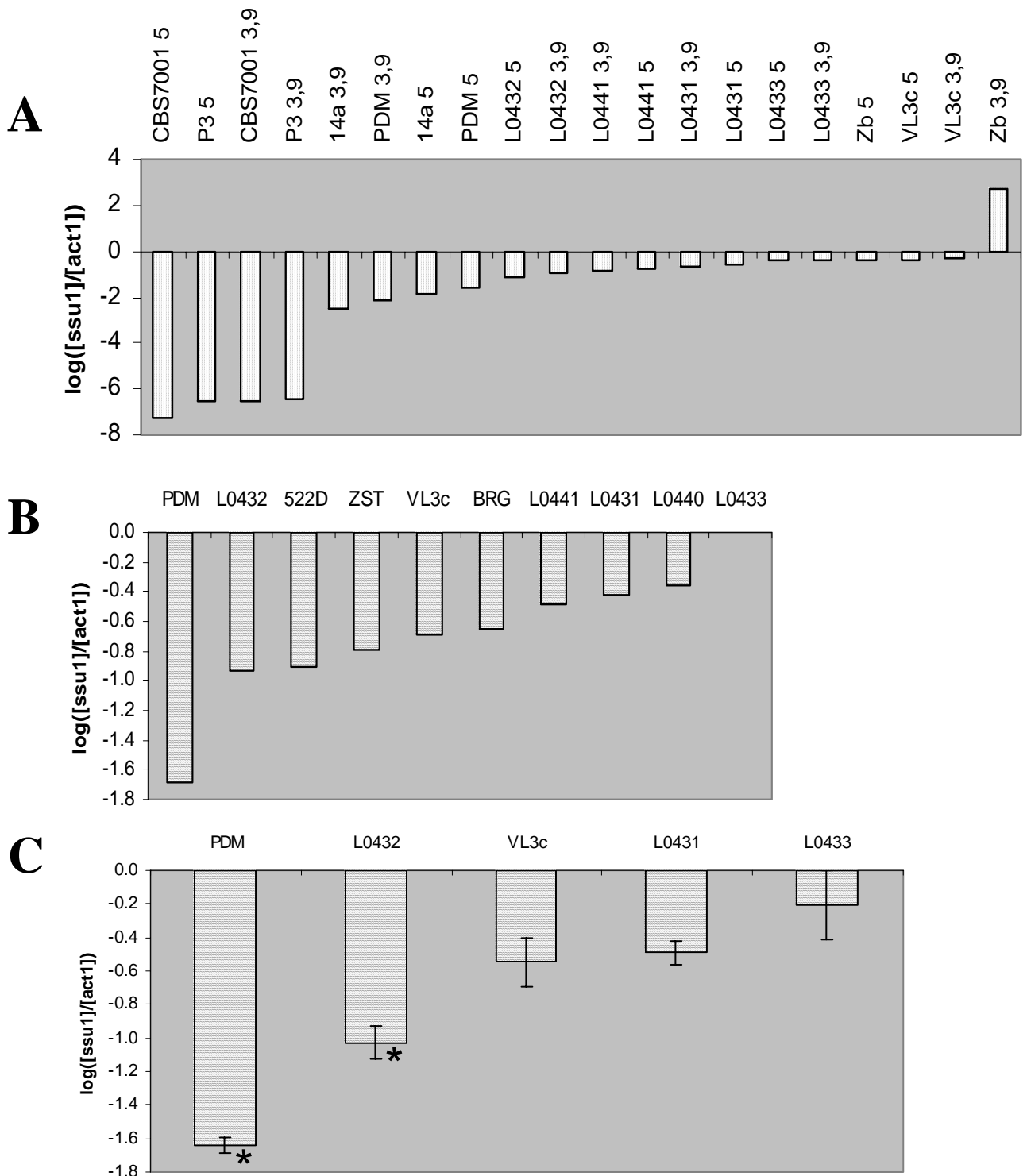


**Figure 49** : Profils génétiques obtenus par PCR ciblant les régions inter $\delta$  de 10 souches de *Saccharomyces cerevisiae*





**Figure 50** : PCR quantitative ciblant le gène *SSU1* par comparaison avec le gène *ACT1* chez *Saccharomyces cerevisiae*. A et B : Courbes standards obtenues respectivement pour *ACT1* et *SSU1* avec une valeur seuil fixée à 135,7 RFU. C et D : Dérivés des courbes de fusion respectivement pour *ACT1* et *SSU1*.



**Figure 51** : Logarithme du rapport des concentrations initiales en ARNm des gènes *SSU1* et *ACT1* après 24 heures de culture sans dioxyde de soufre. **A** : pour différentes espèces et souches. CBS7001 et P3 : *Saccharomyces uvarum*, PDM, L0431, L0432, L0433, L0441, VL3c : *Saccharomyces cerevisiae*, 14a : hybrides entre P3 et VL3c., Zb : *Zygosaccharomyces bailii*. Expérience menée après culture à deux pH différents : 5 et 3,9. **B** : pour différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Après culture à pH 5. **C** : Comparaison statistique des écarts entre différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae* après culture à pH 5. Les résultats présentant une astérisque sont significativement différents des autres.

---

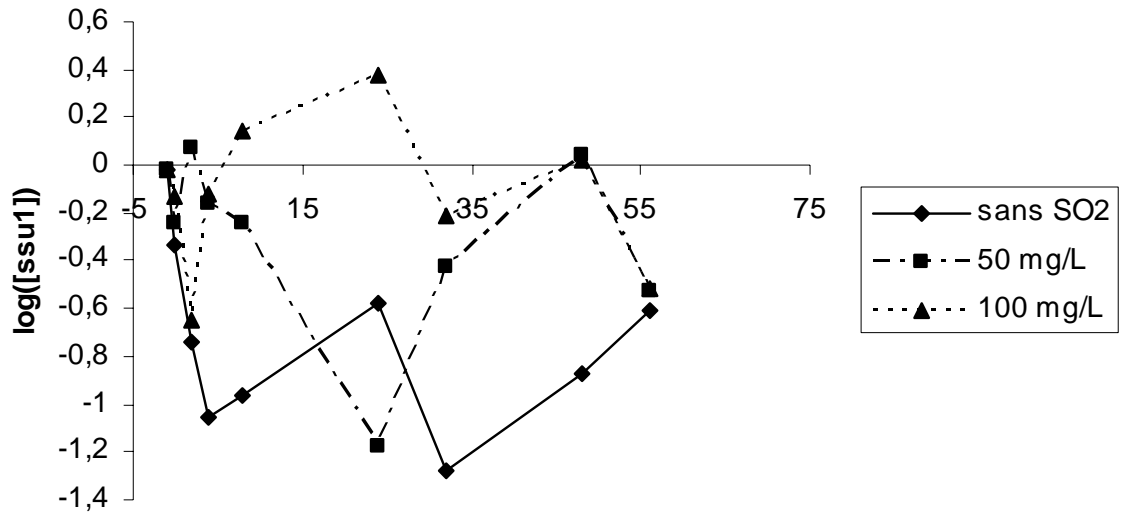
VL3c, et enfin, une souche L0441 isolée de fermentation alcoolique au cours des vinifications du millésime 2002. Deux souches de *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* (CBS 7001 et P3) et l'hybride 14a entre VL3c et P3 (Masneuf *et al.*, 2002) ont été ajoutés. Enfin, une souche de *Zygosaccharomyces bailii* a été étudiée parallèlement. Les profils génétiques des souches de *Saccharomyces cerevisiae* étudiées sont présentés sur la figure 49. Les ARN extraits ont été rétrotranscrits en ADNc. Ces derniers ont été amplifiés par PCR quantitative ciblant *ACT1* et *SSU1*. La figure 50 présente les résultats obtenus par PCR quantitative sur ces 10 souches. Une valeur seuil de 159,2 RFU a été choisie pour comparer toutes les courbes d'amplification d'ADN. Les droites de régression des cycles seuil ont des caractéristiques satisfaisantes et les dérivées des courbes de fusion présentent des valeurs de  $82,0^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  pour *ACT1* et  $79,9 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  pour *SSU1*. La valeur de  $0,3^{\circ}\text{C}$  correspond à l'erreur de mesure de l'appareil et est conforme avec les résultats observés.

Les résultats de comparaison entre le niveau d'expression d'*ACT1* et de *SSU1* sont présentés sur la figure 51. Une échelle s'établit entre les différentes souches : de celles qui expriment peu *SSU1* à celles qui l'expriment fortement. Ainsi, les souches de *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* expriment peu *SSU1*. Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* l'expriment davantage, la souche hybride formant approximativement la frontière entre les deux espèces. Enfin, *Zygosaccharomyces bailii* se distingue nettement, notamment à pH 3,9. Finalement, l'incidence du pH est faible, sauf pour *Zygosaccharomyces bailii*, où l'expression de *SSU1* est bien plus importante à pH 3,9 qu'à pH 5. L'expérience a été renouvelée uniquement sur les souches de *Saccharomyces cerevisiae* afin de mettre ou non en évidence une particularité des souches isolées de refermentation par rapport aux autres. Deux de ces souches se distinguent : L0433 et L0431. Elles expriment *SSU1* bien plus fortement que les autres souches, de même que L0441, une souche indigène de la fermentation alcoolique. A l'inverse, la souche Maurivin PDM exprime peu le gène *SSU1* par rapport à *ACT1*.

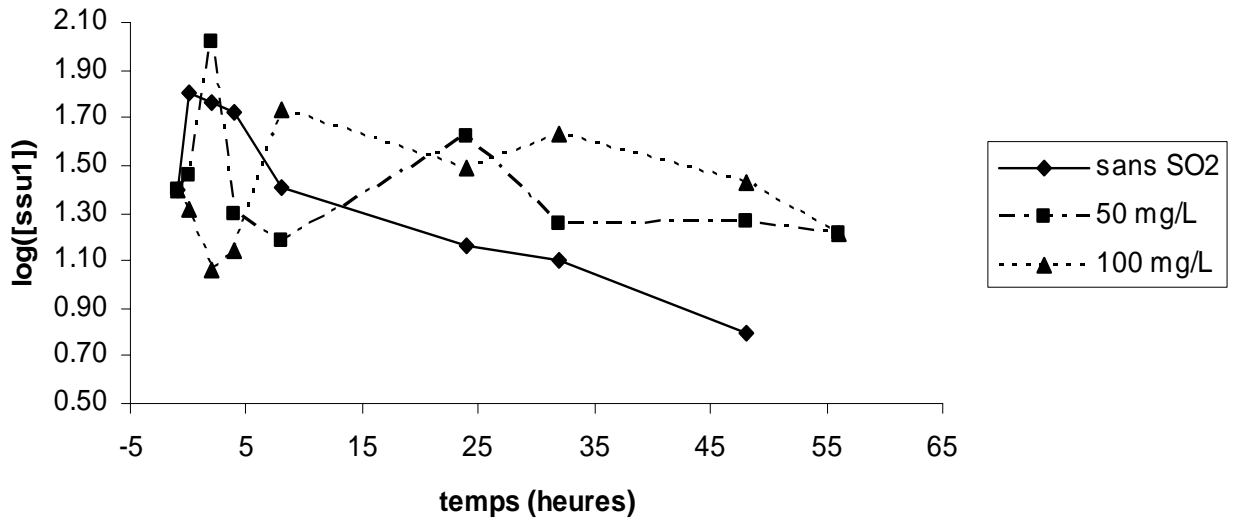
La figure 51C précise que les souches Maurivin PDM et L0432 expriment significativement moins *SSU1* par rapport à *ACT1* que les souches L0431, L0433 et VL3c. L'analyse statistique a considéré un test de Student avec un seuil de significativité de 5%.

Globalement, deux souches de refermentation sur trois expriment davantage le gène *SSU1*, même en l'absence de dioxyde de soufre. Leur comportement se rapproche donc de

A



B

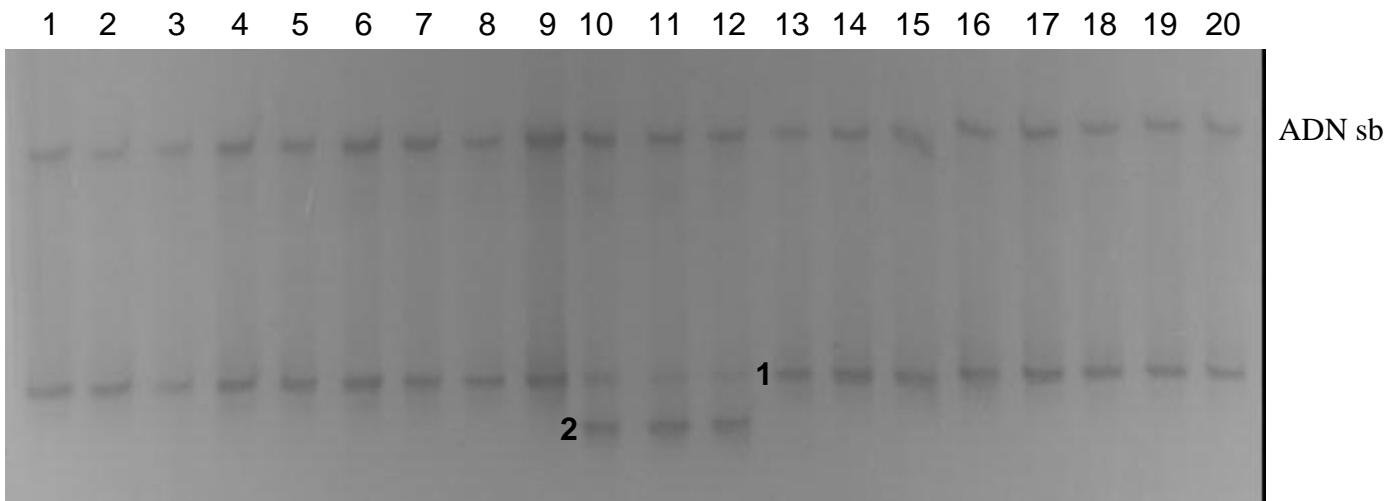


**Figure 52** : Evolution sur cinquante-six heures du niveau d'expression de *SSU1* (PCR normalisée en ADNc pour deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* : Maurivin PDM (A) et L0433 (B) en réponse à différents teneurs en dioxyde de soufre ajoutées dans le milieu de culture à pH 3,9.

celui de *Zygosaccharomyces bailii*, même si celui-ci est bien plus exacerbé. La souche L0432 ne se comporte pas comme les deux autres souches de refermentation. La surexpression de *SSUI* est probablement un atout pour les souches L0431 et L0433 pour leur survie dans un milieu fortement sulfité, mais il n'est probablement pas le seul élément en faveur de leur survie.

#### 5.5.2. Comparaison de l'expression du gène *SSUI* en réponse à la l'addition de dioxyde de soufre pour une souche résistante et une souche sensible au dioxyde de soufre

la mesure d'expression a été réalisée pour une souche de refermentation exprimant particulièrement fortement le gène *SSUI* en l'absence de dioxyde de soufre et une souche commerciale exprimant très peu le gène *SSUI* après l'ajout de dioxyde de soufre. Les levures avaient été incubées pendant 24 heures dans 200 mL de milieu YPG pH 3,9. L'expression de *SSUI* a été suivie à partir de l'ajout de dioxyde de soufre, pendant 56 heures. Les temps de prélèvements sont les suivants : 0, 2h, 4h, 8h, 24h, 32h, 48h et 56h. 10 mL sont prélevés à chaque prélèvement et les ARNm sont extraits de ces volumes. La figure 52 présente les résultats obtenus par PCR quantitative. Pour pouvoir comparer l'expression dans le temps, il fallait rechercher une référence ou « gène de ménage », dont l'expression n'est pas affectée par les conditions extérieures. L'utilisation du gène codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase en tant que gène contrôle est citée dans la littérature. Mais, le dioxyde de soufre agit sur les enzymes de la glycolyse (Beech et Thomas, 1985). Par conséquent, il est possible que la transcription de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase soit affectée. L'utilisation de ce gène en tant que gène de ménage a donc été rejetée. Un essai avec le gène *ACT1* à cet effet a été entrepris. L'étude de validité de ce gène a été réalisée grâce à la méthode de calcul du  $2^{-\Delta C^t}$  décrite par Schmittgen et Zakrajsek (2000) et par Livak et Schmittgen (2001). Il s'avère que l'expression de ce gène est significativement stable sans ajout de dioxyde de soufre, mais instable dès l'ajout de dioxyde de soufre dans le milieu. L'analyse statistique a été menée par analyse de variance à un facteur avec un seuil de significativité de 5%. Finalement, le gène 25S a été testé. La conclusion est la même. En définitive, aucun des gènes testés n'est utilisable comme référence. Après ajout de dioxyde de soufre, les cellules subissent un stress très important. Il est donc concevable que l'expression de tous les gènes, même les plus essentiels à la survie de la cellule, soit affectée. Tous les « gènes de ménage » décrits dans la littérature n'ont pas été



**Figure 53** : PCR-DGGE sur 20 souches de *Saccharomyces cerevisiae* ciblant la région D1 de l'ARNr 25S. Le gradient dénaturant est de 20-45% afin de séparer davantage les bandes proches. 1 :ZymafloreST, 2 : UCD 522, 3 : Levuline BRG, 4 : Fermol Arôme Plus, 5 : Fermol Aromatic, 6 : CH001 Noble, 7 : Maurivin PDM, 8 : Canadivin Primeur, 9 : AWRI 796, 10 : L0433, 11 : L0431 12 : L0432, 13 : Actiflore Bayanus, 14 : Maurivin B, 15 : Cru Blanc, 16 : Y5, 17 : VL3c, 18 : L0440, 19 : Y10 et 20 : Y16. ADN sb : ADN simple brin ; il s'agit d'artéfacts générés lors de la PCR et migrant à une hauteur aberrante.

1 et 2 (sur la photographie) : bandes découpées et séquencées.

testés, mais il est vraisemblable qu'aucun ne soit valable. C'est pourquoi, l'expression de *SSUI* a été représentée directement, après normalisation de la concentration en ADNc avant réaction.

Aucun comportement bien net n'est observé dans le temps. La différence du niveau d'expression constitutif entre les deux souches étudiées, avant ajout de dioxyde de soufre, est retrouvée. Mais dans le temps, l'évolution paraît aléatoire. Même sans ajout de dioxyde de soufre, l'expression de *SSUI* varie, peut-être en raison des changements de flacons puis des prélèvements répétés, source d'aérations fréquentes qui pourraient modifier les transcriptions. Il est à remarquer, toutefois, que le témoin sans ajout de dioxyde de soufre possède systématiquement un taux d'expression de *SSUI* plus faible que les autres après quelques heures. La présence de dioxyde de soufre maintient donc probablement un certain niveau de transcription de *SSUI*.

Cette expérience n'est donc pas très concluante. C'est probablement le niveau d'expression constitutif du gène *SSUI* qui dicte l'importance de la résistance au dioxyde de soufre des souches de *Saccharomyces cerevisiae*. La variation d'expression en réponse à un ajout de fongicide n'est pas significative.

### 5.6. Quelques singularités génétiques

La résistance au dioxyde de soufre est considérée comme le résultat d'une adaptation et d'une sélection naturelle. La possibilité pour les cellules « adaptées » à former davantage d'éthanal que les autres en réponse à la présence de dioxyde de soufre et l'expression constitutivement plus forte du gène *SSUI* par rapport aux cellules « inadaptées » font probablement partie des mécanismes de cette sélection naturelle. Mais, il est alors concevable que ces levures diffèrent par d'autres régions de leur génome. Pour cette raison, la région codant pour les ARN ribosomiques a été étudiée.

#### 5.6.1. DGGE sur différentes souches de levures

Une PCR-DGGE a été réalisée sur 20 souches de *Saccharomyces cerevisiae* en ciblant la région D1 du gène codant pour la sous-unité 25S des ARNr. Cette technique a été développée à l'origine pour mettre en évidence les mutations dans une séquence donnée

Bande 1 CTTCGAAGGCAC TTTACAAAGAACCGCACTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCCTCTATG  
 Bande 2 CTTCGAGGGCAC TTTACAAAGAACCGCACTCCTCGCCACACGGGATTCTCACCCCTCTATG  
 \*\*\*\*\*

Bande 1 ACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGAACGGCCCCAAAGTTGCCCTCTCCAAATTAC  
 Bande 2 ACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGAACGGCCCCAAAGTTGCCCTCTCCAAATTAC  
 \*\*\*\*\*

Bande 1 AACTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTT  
 Bande 2 AACTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTT  
 \*\*\*\*\*

Bande 1 ACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTT  
 Bande 2 ACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTT  
 \*\*\*\*\*

**Figure 54** : Alignement des deux séquences correspondant aux bandes découpées dans le gel de DGGE (voir figure 54). \* : identité de nucléotides.



**Figure 55** : DGGE permettant la migration des amplicons de la PCR ciblant les ADNr 25S de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*. 1 : souche de refermentation L04.39, 2 : Maurivin PDM, 3 : Levuline BRG, 4 à 7 : souches de refermentation L0431 à L0433, 7 : souche de voile L0437.

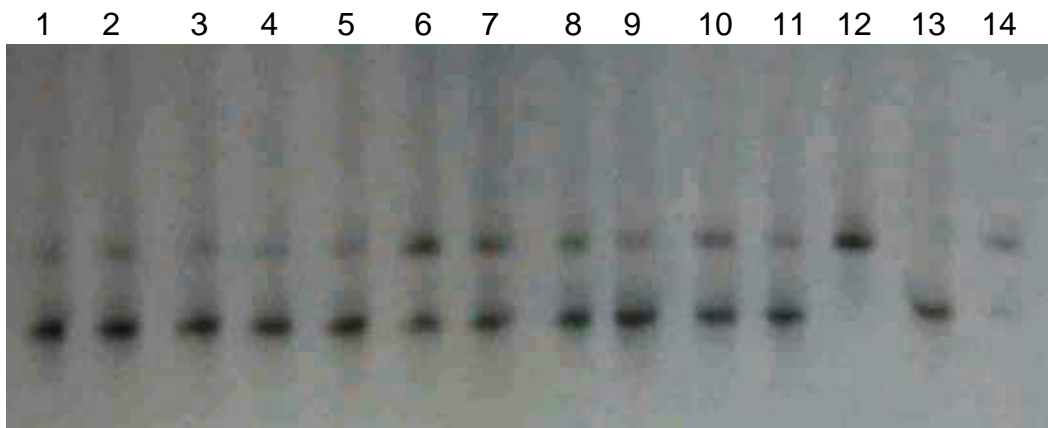


---

pouvant être réduites à une seule base. Un gradient dénaturant de 20-45% a été utilisé afin d'augmenter les différences de hauteur de migration entre les différentes bandes. La figure 53 présente le résultat de cette migration dans un gel de polyacrylamide à gradient dénaturant. Toutes les souches forment un amplifiat migrant à la même hauteur dans le gel de polyacrylamide, signe d'une séquence nucléotidique commune. Cependant, les trois souches isolées de refermentation forment une bande supplémentaire, légèrement décalée vers le bas, signe de la présence d'un nouvel amplifiat dont la séquence est très sensiblement différente de la précédente. Ce résultat a été répété deux fois et la même particularité a été observée. L'amplifiat supplémentaire indique une deuxième sous-unité ARNr 25S d'une séquence légèrement différente du premier.

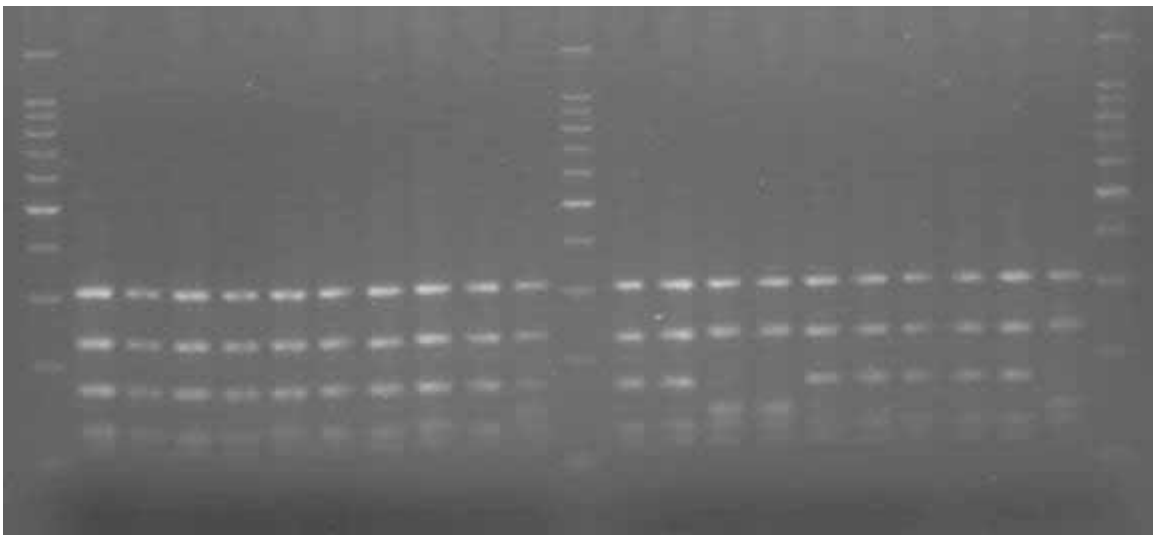
Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* issues du vin sont souvent aneuploïdes ou diploïdes (Bakalinsky et Snow, 1990). Il est donc concevable que certaines soient hétérozygotes au niveau du locus *RDN*. Les deux bandes ont été découpées puis séquencées. Les séquences obtenues ont été comparées entre elles et à deux autres souches dont les séquences ont été publiées. Les deux séquences sont très proches et ne présentent qu'une base d'écart. La première (celle correspondant à la bande migrant le moins loin dans le gel) présente une adénine en position 7 contre une guanine pour la deuxième (figure 54). La première est identique à 100% à celle de la plupart des *Saccharomyces cerevisiae*. La seconde présente une identité parfaite avec les *S. cerevisiae* formant les voiles de vins de Xérès isolées par Esteve-Zarzoso *et al.* (2004) (numéros d'accèsion : AJ 544256, AJ 545159, AJ 544260 et AJ 544261). Une PCR-DGGE a été menée sur des levures fermentaires classiques, des levures de refermentation et une levure de voile (figure 55). Le résultat confirme que la levure de voile produit un amplifiat différent des levures fermentaires (piste 7). Les levures de refermentation L0431 à L0433 isolées à Sauternes possèdent les deux amplifiats (pistes 4 à 6). La levure de voile isolée dans un vin moelleux édulcoré (piste 1) possède le même amplifiat que la levure de voile.

La différence de séquence entre deux ARNr 25S ne devrait pas être l'explication directe d'un avantage particulier de ces souches. Toutefois, cette singularité est troublante. L'existence de deux chromosomes XII (porteurs du locus *RDNI*) différents a déjà été notée chez un même clone de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que des variations de taille de ce chromosome (Chindamporn *et al.*, 1993 ; Puig *et al.*, 2000). Il est envisageable qu'une



**Figure 56** : DGGE représentant la migration des amplifiats de la PCR ciblant la région D1 de l'ADNr 25S de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*. 1 à 5 : culture issue de l'isolement d'une cellule de L0432. 6 à 8 : isolement d'une cellule de L0431. 9 : L0431. 10 : L0432, 11 L0433. 12 : Maurivin PDM, 13 : L0437, 14 : Lallemand L43.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

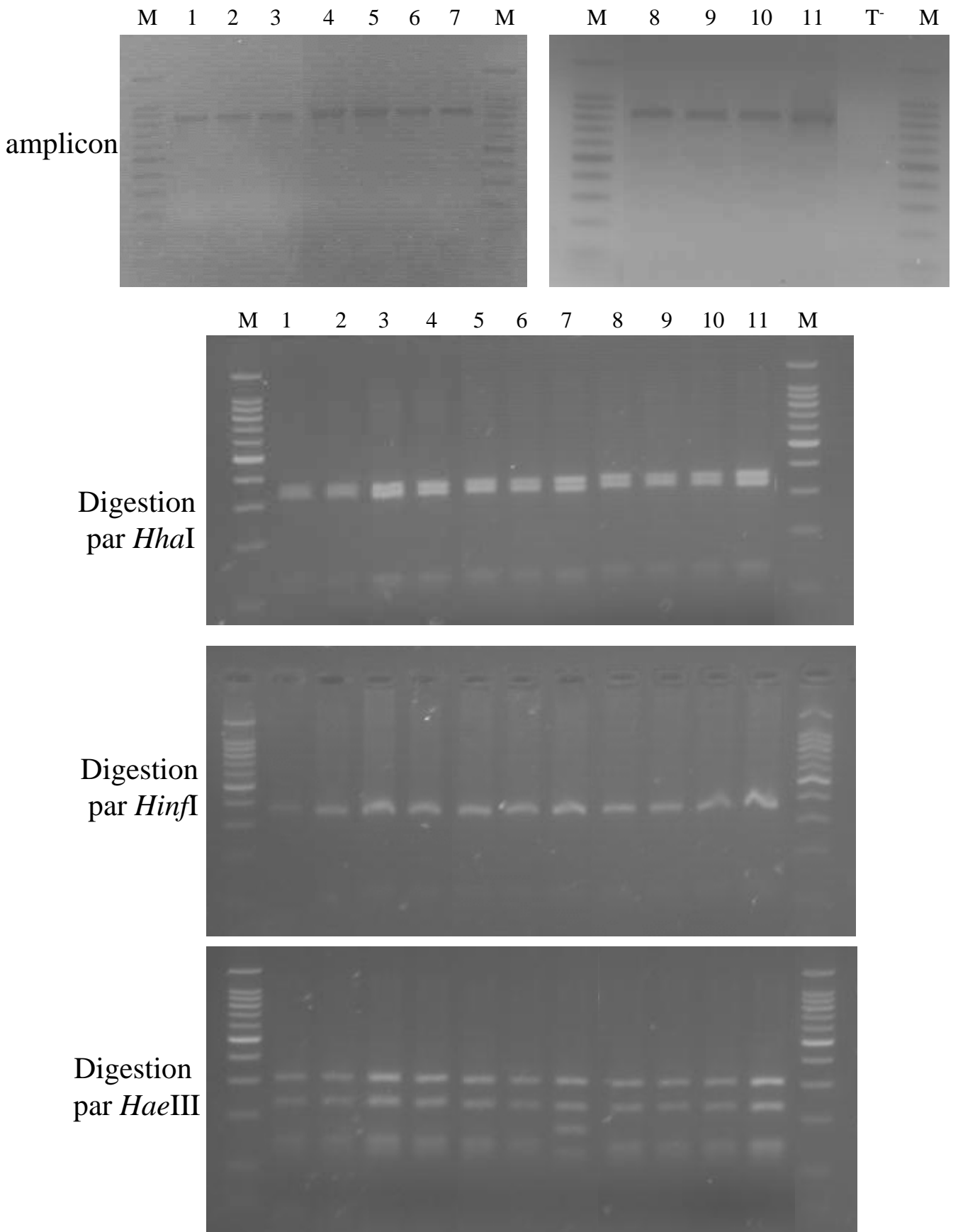


**Figure 57** : Digestion enzymatique par l'enzyme *HaeIII* de l'amplifiat par PCR de la région ITS1-5,8S ADNr-ITS2 de 20 souches de *Saccharomyces cerevisiae*. 1 : ZymafloreST, 2 : UCD 522, 3 : Levuline BRG, 4 : Fermol Arôme Plus, 5 : Fermol Aromatic, 6 : CH001 Noble, 7 : Maurivin PDM, 8 : Canadivin Primeur, 9 : AWRI 796, 10 : Actiflore Bayanus, 11 : Maurivin B, 12 : Cru Blanc, 13 : L0433, 14 : L0431, 15 : Y5, 16 : VL3c, 17 : L0440, 18 : Y10, 19 : Y16 et 20 : L0432

variation de séquence soit également probable, par mutation ponctuelle ou par recombinaison. Cependant, aucune évidence n'est jamais apparue de l'existence de méiose et de sporulation dans le vin en fermentation. Il s'agit donc plutôt de conversion génique mitotique ou de crossing-over également mitotique. Des réarrangements chromosomiques et des aneuploïdies seraient possibles au cours des divisions successives, conduisant à une sélection naturelle des levures les mieux adaptées à leur environnement, et éliminant les mutations léthales. L'hypothèse d'une perte des polymorphismes et des aneuploïdies si les conversions géniques s'opéraient par sporulation renforce celle de réarrangements par voie mitotique (Puig *et al.*, 2000).

Enfin, des tentatives de sporulation ont été conduites par étalement de colonies fraîches sur milieu acétate de potassium. Les trois souches isolées sont incapables de sporuler, même après deux semaines d'incubation à 30°C ou à 4°C. Ce phénomène est assez rare.

Par micromanipulation, des cellules des souches L0432 et L0433 ont été isolées afin de vérifier que l'obtention de deux bandes en DGGE n'était pas due à une contamination. Les cellules sont mises en culture sur milieu YPG solide. Après 4 jours à 30°C, les colonies sont récoltées et la PCR sur la région D1 de l'ADNr 25S est réalisée. La figure 56 présente le résultat obtenu. Chaque colonie issue de l'isolement d'une cellule unique fournit le même résultat. Aucune contamination n'est donc responsable de ce résultat. Les deux bandes obtenues par DGGE semblent donc être la preuve d'une hétérozygotie de la région D1 chez ces souches. Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* Lallemand 43 connue pour sa capacité à redémarrer une fermentation alcoolique arrêtée et à croître dans des vins fortement alcoolisés (14,3 % vol.) et fortement sulfités (35 mg/L SO<sub>2</sub> libre) a été testée parallèlement. Cette souche est également hétérozygote pour cette région. Cela semble donc être une caractéristique des souches de *Saccharomyces cerevisiae* adaptées aux environnements difficiles de vie. De même, une DGGE a été conduite sur vingt-neuf souches commerciales supplémentaires de *Saccharomyces cerevisiae*. Les souches Levuline killer, Levuline primeur, Actiflore PM et Fermol sauvignon sont hétérozygotes. La souche Zymasil bayanus possède le même amplifiat que la levure de voile L0437. Une PCR-RFLP sur le gène *MET2* a permis de vérifier que ces souches appartenaient effectivement à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Par conséquent, sur 42 souches testées, 8 sont hétérozygotes, 3 possèdent un amplifiat singulier et 31 l'amplifiat traditionnel.



**Figure 58** : Résultat de la PCR ciblant la région *ITS1*-ADNr 5,8S-*ITS2* puis de la RFLP pour 11 souches de *Saccharomyces cerevisiae*. M : marqueur de taille 100 bp (Promega). 1 à 6 : levures isolées de voiles. 7 : Maurivin PDM, 8 à 11 : souches de refermentation ; 8 : L0431, 9 : L0432, 10 : L0433, 11 : L0439

L0433 -----ATTTGAAA-TGGATTTTTTTTGTGGCAAGAG  
L0431 -----ATTTGAAA-TGGATTTTTTTTGTGGCAAGAG  
L0437 -----TTTGAAG-TGGATTTTTTTTGTGGCAAGAG  
BRG AAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAGTGGATTTTTTTT--GTTTTGGCAAGAG  
PDM AAGGATCATTAAGAAATTTAATAATTTTGAAGTGGATTTTTTTT--GTTTTGGCAAGAG  
\*\*\*\*\*

L0433 CATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTT  
L0431 CATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTT  
L0437 CATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTT  
BRG CATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTT  
PDM CATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTT  
\*\*\*\*\*

L0433 AAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCCTTGTAAGTTTCTTCTTGCTATTCCAAACGGTGANAGA  
L0431 AAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCCTTGTAAGTTTCTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGA  
L0437 AAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCCTTGTAAGTTTCTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGA  
BRG AAGTGCGCGGTCTTGCTAGGC--TTGTAAGTTTCTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGA  
PDM AAGTGCGCGGTCTTGCTAGGC--TTGTAAGTTTCTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAGAGA  
\*\*\*\*\*

L0433 TTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTT  
L0431 TTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTT  
L0437 TTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTT  
BRG TTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTT  
PDM TTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTTAAACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTT  
\*\*\*\*\*

L0433 TCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAAC  
L0431 TCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAAC  
L0437 TCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAAC  
BRG TCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAAC  
PDM TCATATCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCGGGGCCAGAGGTAACAAAC  
\*\*\*\*\*

L0433 ACAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAA  
L0431 ACAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAA  
L0437 ACAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAA  
BRG ACAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAA  
PDM ACAACAATTTTATCTATTCATTAATTTTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAACCTGGAA  
\*\*\*\*\*

L0433 ATTTTAAATATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAAC  
L0431 ATTTTAAATATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAAC  
L0437 ATTTTAAATATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAAC  
BRG ATTTTAAATATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAAC  
PDM ATTTTAAATATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAAC  
\*\*\*\*\*

L0433 GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
L0431 GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
L0437 GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
BRG GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
PDM GCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAA  
\*\*\*\*\*

L0433 CGCACATGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC  
L0431 CGCACATGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC  
L0437 CGCACATGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC  
BRG CGCACATGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC  
PDM CGCACATGCGCCCCTTGGTATTCAGGGGGCATGCCGTTTGAGCGTCATTTCTTCTC  
\*\*\*\*\*

L0433 AAACATCTGTTTGGNAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATGCTGGCCTTT  
L0431 AAACATCTGTTTGGTGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATGCTGGCCTTT  
L0437 AAACATCTGTTTGGTGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATGCTGGCCTTT  
BRG AAACATCTGTTTGGTGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATGCTGGCCTTT  
PDM AAACATCTGTTTGGTGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTAACTTGAAATGCTGGCCTTT  
\*\*\*\*\*

L0433 TCATTGGATGTTTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCA  
L0431 TCATTGGATGTTTTTTTTTTTCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCA  
L0437 TCATTGGATGTTTTTTTTTT--CCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCA  
BRG TCATTGGATGTTTTTTTTTT--CCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCA  
PDM TCATTGGATGTTTTTTTTTT--CCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCA  
\*\*\*\*\*

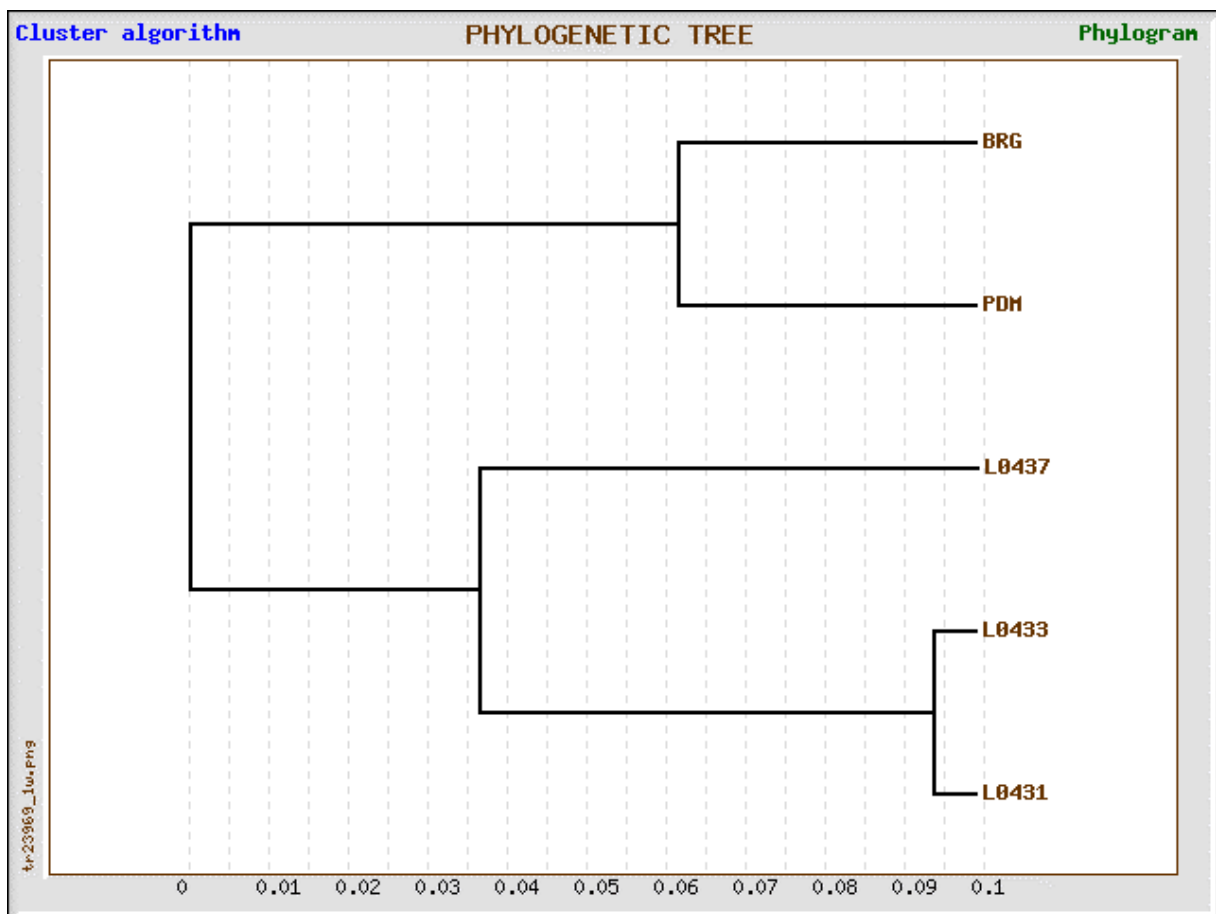
```

L0433      AGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT-ATACTGAGCGTATTG
L0431      AGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT-ATACTGAGCGTATTG
L0437      AGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT-ATACTGAGCGTATTG
BRG        AGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTG
PDM        AGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTTT-ATACTGAGCGTATTG
*****

L0433      GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAA
L0431      GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAA
L0437      GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACA-----
BRG        GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCTCAA
PDM        GAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCTTAAAGTTTGACCT---
*****

L0433      ATCAG-----
L0431      ATCAG-----
L0437      -----
BRG        ATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAA
PDM        -----

```



**Figure 59** : Alignement multiple et arbre phylogénétique correspondant établi à partir des séquençages des régions *ITS1-5,8S ADNr-ITS2* de différentes souches de *Saccharomyces cerevisiae*. PDM et BRG : levures commercialisées, L0437 : levure de voile, L0431 et L0433 : levures de refermentation.

Même s'il est difficile de comprendre l'impact d'une simple mutation dans la région D1 de l'ADNr 25S sur la capacité de ces souches à survivre dans des conditions particulièrement stressantes, il est concevable que cela présente un atout supplémentaire pour ces souches.

#### 5.6.2. PCR-RFLP sur la région *ITS1*-5.8S ARNr-*ITS2*

L'amplification de la région *ITS1*-5.8S ARNr-*ITS2* par PCR a été réalisée sur l'ADN extrait de 20 souches de *Saccharomyces cerevisiae*, dont les trois souches de refermentation. Toutes les souches fournissent un amplifiat de taille identique entre 800 et 900 pb. Après digestion par l'enzyme *HaeIII*, tous les amplifiats ont un profil identique, sauf les trois souches de refermentation, qui peuvent ainsi être mises en exergue (figure 57). Ainsi, l'un des sites de coupure de l'enzyme *HaeIII* présente une mutation. D'autres enzymes ont été testées, telles que *PstI*, *DraI*, *EcoRI*, *HincII*, *HinfI* et *HhaI*. Pour toutes ces enzymes, le profil de restriction est le même pour les vingt souches considérées.

Esteve-Zarzoso *et al.* (2004) affirment que les souches de *Saccharomyces cerevisiae* formant les voiles au cours de l'élaboration des vins de Xérès pouvaient être différenciées des autres souches de la même espèce par une délétion de 24 pb dans la région *ITS1* traduisant une modification sur les sites de coupure de l'enzyme *HhaI*. Cependant, ils n'ont pas relié cette différence avec d'autres observations physiologiques ou métaboliques.

Une souche de *Saccharomyces cerevisiae* isolée d'un voile de surface d'un vin rouge en élevage en barrique et nommée L0437 a été étudiée par PCR-RFLP. Elle présente la même particularité que les trois souches isolées de refermentation dans le Sauternais, de même que la souche de refermentation isolée d'un vin blanc édulcoré avec de moût concentré rectifié (figure 58).

Le séquençage de la région *ITS1*-5.8S ARNr-*ITS2* a été réalisé pour les souches suivantes : L0431, L0433, Levuline BRG, Maurivin PDM et L0437. Le résultat de l'alignement multiple est présenté figure 59. Seul l'ajout d'un nucléotide en position 305 pour les souches de refermentation et la souche de voile est remarquable. Cette insertion s'effectue donc entre les positions 128 et 129 de la région *ITS1*. Les autres ajouts de Tyrosine suite à des séquences polyT sont probablement liés à des erreurs (phénomène de slippage avec décalage de la *Taq* polymérase puis lors du séquençage) dont il ne faut pas tenir compte. Un arbre phylogénétique suit cette analyse nucléique en ignorant les erreurs. Il illustre clairement la

**Tableau XX** : Digestion enzymatique *in silico* de l'amplifiat PCR théorique de la région *ITS1-5,8S ADNr-ITS2* pour trois souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae*. En gras, figure le fragment généré chez la souche PDM coupé par un nouveau site de restriction en deux fragments plus courts chez L0431 et E10.

souche	<i>HhaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HaeIII</i>
L0433	10 135 336 364	8 117 357 363	<b>29</b> 129 <b>144</b> 232 311
Maurivin PDM	10 134 334 363	8 116 355 362	128 <b>172</b> 230 311
E10	10 135 335 364	8 117 356 363	<b>29</b> 129 <b>144</b> 231 311



proche parenté des levures de refermentation avec la levure de voile. Toutes ces levures isolées au cours de l'élevage des vins se distinguent aisément des souches de la fermentation alcoolique. Le tableau XX expose les cartes de restriction obtenues avec les trois enzymes *in silico* en extrapolant les bases nucléotidiques manquantes dans le séquençage pour l'obtention des tailles des fragments générés. Ce résultat explique la différence obtenue lors de la digestion *in vitro* par *HaeIII* entre les souches de l'élevage et les souches fermentaires. L'apparition d'un nouveau site de coupure en position 302 est mise en évidence chez les souches d'élevage. En effet, une cytosine, absente chez les souches fermentaires vient dessiner un nouveau site de coupure pour *HaeIII*, sans modifier les profils de restriction obtenus avec les autres enzymes considérées. La levure de voile ne possède pas la délétion décrite par Esteve-Zarzoso *et al.* (2004) pour les levures de voile espagnoles isolées dans des vins de Xérès.

Les levures de refermentation présentent, avec cette insertion, une séquence qui les distingue des autres *Saccharomyces cerevisiae*. Dans les bases de données, de telles séquences sont rares. Seules deux souches de cette espèce ont une séquence identique. Il s'agit de souches isolées en 2004 par Nisiotou et Gibson, dans des vins grecs (YM 1.6 isolée d'un vin de Boiotia, Sterea Hella, Grèce et YM 3 isolée d'un vin de Nemea, Péloponnèse, Grèce ; numéro d'accession : respectivement AY529200 et AY529199). L'absence de publication relative à ces séquences n'apporte pas de renseignements complémentaires quant notamment le type de vin dans lesquels elles ont été isolées. Des quarante-deux souches de *Saccharomyces cerevisiae*, seules les souches de refermentation, la levure de voile et les souches Zymasil bayanus et Lallemand 43 possèdent le profil rare.

Encore une fois, les souches de refermentation exhibent une singularité dans leur locus ADNr par rapport aux autres souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, aucune conclusion quant à l'avantage qu'elles pourraient en tirer n'est possible à ce jour, d'autant plus que cette insertion a lieu dans la région *ITS1*, région non codante de l'ADNr.

#### 5.7. Discussion : souches de *S. cerevisiae* avec capacités de survie et d'adaptation supérieures aux autres.

Les observations réalisées sur les souches de refermentation de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, en comparaison avec d'autres de la même espèce utilisées, ou isolées dans des vins de Sauternes pendant la fermentation alcoolique montrent qu'elles

possèdent un avantage certain dans leur capacité de survie dans un milieu hostile : leur capacité de croissance dans un milieu fortement alcoolisé et fortement sucré est supérieure, leur résistance au dioxyde de soufre génétiquement programmée, leur forte capacité à former de l'éthanal et à expulser le dioxyde de soufre hors de la cellule, sont également supérieures. D'autre part, la présence d'un ARNr 25S supplémentaire de séquence légèrement différente à celui rencontré généralement manque également un atout pour les cellules le possédant.

Il a été montré dans cette étude qu'une sélection s'opérait au sein même de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* dès le mutage et que seules les souches de refermentation ont été capables de survivre, puis de sortir de leur état VNC. A l'issue de ces dernières expériences, il semble indéniable que ces souches ont un ensemble de caractéristiques génétiques leur permettant ce tour de force.

D'après l'analyse de la séquence des ARN ribosomiques des *Saccharomyces cerevisiae* de refermentation, ces levures présentent les mêmes curiosités génomiques que les levures de voile. L'analyse du locus *RDNI* permet en effet d'établir une approche phylogénétique pertinente. D'ailleurs, il n'est pas étonnant de trouver des particularités intraspécifiques dans cette région. Récemment, Manzano *et al.* (2004) ont montré que l'amplification de la région *ITS2* pouvait permettre, après DGGE, non seulement de ne faire apparaître que *Saccharomyces sensu stricto*, mais également de différencier les espèces de ce groupe, et même des différences entre souches d'une même espèce. Les levures de voile sont très résistantes à l'éthanal, à l'éthanol et aux stress oxydatifs. La variabilité de leur ADN mitochondrial (Ristow *et al.*, 1995 ; Castrejón *et al.*, 2002), induite par les teneurs élevées en éthanal et en éthanol et de leur caryotype a été décrit par Martinez *et al.* (1995), Ibeas *et al.* (1997) et Mesa *et al.* (1999, 2000).

La surexpression de certains gènes chez les levures de voile par rapport aux autres souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* a été notée par différents auteurs. Ainsi, la surexpression de *SSUI* est connue (Pérez-Ortín *et al.*, 2002), de même que celle de *MUC1* codant pour une glycoprotéine de surface (Reynolds et Fink, 2001), probablement à la base de la formation des voiles, et celle du gène *HYR1* codant pour un peroxydase glutathione hydroperoxyde, enzyme principale de la défense contre les dommages membranaires oxydatifs (Avery et Avery, 2001). De plus, Infante *et al.* (2003) ont observé que les gènes

surexprimés étaient tous proches de lieu de translocation. Il est parfaitement concevable que les levures de refermentation, comme les levures de voile, aient subi des réarrangements génétiques, probablement induits par la forte présence d'éthanol et d'éthanal. Ces réarrangements auraient permis à ces levures, sous la pression de leur environnement, d'adapter leur métabolisme.

Il est évident, qu'à plus d'un titre, les souches de refermentation et les souches de voile sont proches et ont subi une évolution similaire. Elles sont différentes des autres souches de *Sacharomyces cerevisiae*. Mesa *et al.* (1999) ont déjà noté que certaines souches, responsables de la formation des voiles dans les vins de Xérès appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, pouvaient posséder des caryotypes identiques, mais des profils de restriction de leur ADN mitochondrial différent. Pour les souches de refermentation, il semble que la situation soit proche : caryotype identique, mais profil inter $\delta$  différent. Cette constatation renforce la parenté de ces deux groupes. Une approche par puces à ADN, comme envisagée par Infante *et al.* (2003) pourrait apporter davantage de renseignements sur ces réarrangements et leurs impacts sur le métabolisme de ces levures. Elle pourrait également permettre de savoir jusqu'à quel point les levures de voile et de refermentation sont proches.

**CONCLUSION GENERALE**

**PERSPECTIVES**

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

« Le nectar descend en vous.  
Fermez un instant les yeux.  
Vous voilà de l'autre côté de la vie. »

Frédéric Dard

Les problèmes de stabilisation microbiologique des vins, au cours de leur élevage ou même parfois de leur vieillissement en bouteille, préoccupent les vinificateurs depuis les découvertes de Pasteur (1866). Les vins liquoreux de la région de Sauternes ont été relativement peu étudiés jusqu'à présent, notamment au niveau microbiologique, probablement en raison de leur grande stabilité dans le temps. En effet, peu de maladies sont recensées. Toutefois, il arrive que ces vins refermentent, et perdent l'équilibre organoleptique savamment établi par le vinificateur en bloquant la fermentation initiale par l'ajout massif de dioxyde de soufre. Ce fongicide est ensuite ajouté régulièrement au cours de l'élevage afin de prévenir toute contamination microbienne et tout développement levurien. L'opération de mutage a pour but de bloquer la fermentation alcoolique en tuant les levures. Les soutirages successifs trimestriels viennent ensuite éliminer les levures qui sédimentent au fond des barriques. Les contrôles microbiologiques basés sur la culture des micro-organismes sur milieu de culture solide fournissent en général des résultats négatifs, témoignant d'une apparente stérilité du vin.

L'étude de la survie des levures après mutage a constitué une part essentielle de ce travail. Comment expliquer l'apparente stérilité des vins, alors que ceux-ci peuvent subir une refermentation au cours de leur élevage ? L'utilisation de l'épifluorescence comparée à la méthode traditionnelle de culture des cellules sur milieu solide a permis d'affirmer que des populations, dont le nombre se stabilise entre  $10^3$  et  $10^4$  par mL survivent dans un état similaire à l'état viable non cultivable décrit dans la littérature chez les bactéries. Cet état permet à la levure de réduire son métabolisme, de survivre sans sporulation dans un environnement défavorable et d'attendre un changement des conditions de milieu.

D'après l'étude d'écologie levurienne au cours de l'élevage, la microflore de ce type particulier de vin est relativement pauvre. Peu d'espèces sont capables de survivre dans cet environnement contenant des teneurs en éthanol, dioxyde de soufre et sucres si élevées. Les principales espèces se résument donc à *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata*, *Zygosaccharomyces spp.* et à des basidiomycètes tels que *Rhodotorula spp.* ou *Cryptococcus spp.*. Si toutes ces espèces semblent capables d'adopter l'état VNC, seules *S. cerevisiae* et *Zygosaccharomyces spp.* sont capables d'en sortir véritablement et durablement, jusqu'à induire potentiellement des refermentations. Une étude, menée au chai au cours de l'élevage, a montré que la concentration en éthanal augmentait progressivement au cours de l'élevage en relation avec l'activité ponctuelle des levures les plus résistantes au dioxyde de soufre. Cette molécule permet probablement aux levures de relancer leur métabolisme endormi. L'éthanal vient également combiner le dioxyde de soufre libre, rendant les vins de plus en plus difficiles à stabiliser. Ces montées de la concentration en éthanal ne se produisent que lorsque les vins sont élevés à des teneurs en dioxyde de soufre actif inférieures à 0,40 mg/L. Cette teneur semble être le minimum garantissant une absence de reprise d'activité levurienne.

Le maintien des teneurs en dioxyde de soufre dans les vins liquoreux en cours d'élevage est donc fondamental. Or, ces teneurs sont réglementées à 400 mg/L de dioxyde de soufre total. Le vinificateur est donc tenté de diminuer les doses utilisées afin de garantir la fin de la période d'élevage, ce qui est dangereux. L'utilisation du diméthylcarbonate pour le mutage des vins a donc été envisagé dans ce travail. Il en résulte que son emploi conviendrait pour diminuer les doses de dioxyde de soufre employées au moment du mutage. Cependant, l'ajout de dioxyde de soufre reste indispensable en raison de ses propriétés antioxydantes et fongicides à long terme, le DMDC ne garantissant pas d'éventuelles contaminations ultérieures. De plus, aux doses utilisables, le DMDC n'est pas beaucoup plus efficace que le dioxyde de soufre. L'ajout combiné des deux fongicides se révèle la meilleure des solutions pour détruire un maximum de levures.

Au cours de ce travail, trois souches de levures responsables de refermentation ont été isolées. Ce sont des *Saccharomyces cerevisiae*. Leur étude a permis de mieux comprendre le phénomène de la refermentation. A l'issue du mutage, une sélection parmi les souches de la fermentation alcoolique se produit, favorisant la survie d'un petit nombre d'entre elles. Au

sein de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, il est courant qu'une seule souche y parvienne. Il s'agit rarement de la souche majoritaire lors de la fermentation initiale. Ces souches ont une capacité de résistance à l'environnement stressant du vin liquoreux particulière. Elle se matérialise généralement par une possibilité de formation d'éthanal accrue en présence de dioxyde de soufre et une surexpression du gène *SSU1* codant pour une pompe expulsant le dioxyde de soufre à l'extérieur de la cellule. A plus d'un titre, ces levures de refermentation ont un comportement qui tend vers celui de *Zygosaccharomyces bailii*.

Mais, elles possèdent également d'autres singularités qui les distinguent des autres souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Génétiquement, au niveau du locus *RDNI* contenant les régions codant pour les ARN ribosomiques, elles présentent au moins une insertion d'un nucléotide dans la région *ITS1*. De plus, la région D1 de l'ADNr 25S est hétérozygote : ces souches possèdent à la fois un exemplaire correspondant à la séquence traditionnelle et un autre présentant une mutation d'un nucléotide. Ce deuxième exemplaire se rapproche de la séquence trouvée chez une levure de voile isolée dans le bordelais, ainsi qu'une levure de refermentation d'un vin additionné de moût concentré rectifié. Cette hétérozygotie a été retrouvée chez quelques rares souches commerciales connues pour leurs capacités de résistance et de croissance en conditions difficiles dans les vins. Toutes ces souches possèdent la même singularité au niveau de la région *ITS1*. Il est difficile de comprendre immédiatement l'influence de ces particularités de séquence sur la capacité de survie des cellules. Cependant, toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* retrouvées au cours de l'élevage des vins, parvenant à survivre, voire à croître dans des conditions de vie difficiles, présentent les mêmes particularités génétiques. Il est donc probable que ces singularités aient un rôle dans l'évolution adaptative de ces souches, ou du moins elles en témoignent.

Puisque les souches de refermentation isolées dans des vins liquoreux semblent avoir une parenté avec les levures de voile, il faudrait poursuivre, afin de mieux comprendre les mécanismes de survie de ces souches. La littérature décrit un certain nombre de caractéristiques des souches de voile et notamment la surexpression de certains gènes. L'étude de l'expression de ces gènes chez les souches de refermentation pourrait confirmer ou non la parenté de toutes ces souches. Une approche par puces à ADN serait d'ailleurs envisageable afin d'avoir une vision plus globale et établir ainsi une comparaison plus précise entre souches.

Dans les mécanismes de survie, ce travail a contribué à réaffirmer l'existence chez les levures d'un état similaire à celui de viable non cultivable décrit chez les bactéries. Toutefois, les mécanismes moléculaires de cet état particulier sont inconnus. Une approche par puces à ADN pourrait peut-être également permettre de mettre en évidence un certain nombre de gènes caractéristiques de cet état et ainsi d'avancer dans la compréhension du phénomène et de le relier avec la capacité de survie des souches de refermentation.

En ce qui concerne la vinification des vins de Sauternes, il semble que l'élément essentiel de la stabilité microbiologique soit la teneur en dioxyde de soufre moléculaire des vins au cours de l'élevage. Une dose de 0,40 mg/L doit nécessairement être maintenue afin de garantir l'absence d'activité microbiologique. L'utilisation du diméthylcarbonate pourrait être envisagée les années où les moûts combinent le dioxyde de soufre afin de limiter les doses de dioxyde de soufre au moment du mutage, sous réserve d'une autorisation légale. Le vinificateur ne peut que subir la sélection des levures, aboutissant à des souches adaptées à ce type de vin et particulièrement résistantes. Les expressions différentielles du gène *SSU1* entre souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont néanmoins indicatrices de leur capacité de survie dans le vin. Par conséquent, lors d'ensemencement, l'utilisation de souches ayant des taux d'expression faibles est recommandée. De plus, il semble que certaines souches commerciales possèdent des caractéristiques de résistance, les rendant proches des levures de refermentation. Leur emploi lors de la fermentation alcoolique doit impérativement être évité. La découverte d'un certain nombre de critères permettant d'identifier les levures de refermentation parmi toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae* pourraient permettre, par contrôle microbiologique, de diagnostiquer rapidement un risque potentiel de refermentation dans un vin, justifiant ainsi une filtration plus serrée ou même l'utilisation de diméthylcarbonate avant mise en bouteille afin d'en garantir la stabilité.



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

« Les hommes même cultivés ne se rendent pas compte des puissances cachées dans les livres de science. Dans ces volumes, il y a des merveilles, des miracles. »

Herbert George Wells

**A**mann R.I., Ludwig W. and Schleifer K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.

**Amerine M.A.** (1954) Composition of wine. I. Organic constituents. *Adv. In food research*, 5, 354-510.

**Anacleto J. and van Uden N.** (1982) Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2477-2486.

**Anon. Toxic. Substances List**, 1001 p. O.S. Dept. Health, Education and Welfare (1973).

**Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K.** (1995) *Short Protocols in molecular biology*. John Wiley and sons, Inc., New-York.

**Asakura H., Makino S.-I., Takagi T., Kuri A., Kurazono T., Watarai M. and Shirahata T.** (2002) Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serevar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol. Lett.*, 212, 87-93.

**Avery A.M. and Avery S.V.** (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.*, 276, 33730-33735.

**Avram D. and Bakalinsky A.T.** (1996) Multicopy FZF1 (SUL1) suppresses the sulfite sensitivity but not the glucose derepression or aberrant cell morphology of a *grr1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 144, 511-521.

**Avram D. and Bakalinsky A.T.** (1997) *SSUI* encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 179, 5971-5974.

**Avram D., Leid M. and Bakalinsky A.T.** (1999) FZF1p of *Saccharomyces cerevisiae* is a positive regulator of *SSUI* transcription and its first zinc finger region is required for DNA binding. *Yeast*, 15, 473-480.

**B**akalinsky A.T. and Snow R. (1990) The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6, 367-382.

**Baker H.** (1753) Employment for the microscope.

- Baleiras Couto M.M., Eijsma B., Hofstra H., Huis in't Veld J.H., van der Vossen J.M.** (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 41-46.
- Baleiras Couto M.M., van der Vossen J.M.B.M., Hofstra H. and Huis in't Veld J.H.J.** (1994) RAPD analysis; a rapid technique for differentiation of spoilage yeast. *Int. J. Food Microbiol.*, 24, 249-260.
- Baleiras Couto M.M., Vogels J.T.W.E., Hofstra H., Huis in't Veld J.H.J. and van der Vossen J.M.B.M.** (1995) Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR rDNA in taxonomy : two identification techniques for food-borne yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, 79, 525-535.
- Barbe J.-C.** (2000) La combinaison du dioxyde de soufre dans les moûts et vins issus de raisins botrytisés. Rôle des bactéries acétiques. Thèse de doctorat n°745 de l'université Victor Segalen Bordeaux II.
- Barbe J.C. et Bertrand A.** (2000) Essais de mutage à l'aide de Velcorin® en alternative ou complément du dioxyde de soufre. Communication personnelle.
- Beech F.W. et Thomas S.** (1985) Action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. *Bull. OIV*, 652-653, 564-581.
- Beimford C., Krause A., Amman R., Ludwig W. and Schleifer K.H.** (1993) In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci. *System. Appl. Microbiol.*, 16, 450-456.
- Belloch C., Barrio E., Uruburu F., Garcia M.D. and Querol A.** (1997) Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20, 397-408.
- Belloch C., Barrio E., Garcia M.D. and Querol A.** (1998) Phylogenetic reconstruction of the genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Syst. Appl. Microbiol.*, 21, 266-273.
- Benda I.** (1982) Wine and brandy. In *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*. Ed. G. Reed 4<sup>th</sup> edn. AVI Publishing Co. Westport, Conn., pp. 310-311.
- Besnard V., Federighi M., Declercq E., Jugiau F. and Cappelier J.M.** (2002) Environmental and physico-chemical factors induce viable but nonculturable state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.*, 33, 359-370.
- Bidet M.** (1759) *Traité sur la nature de la culture de la vigne*, seconde édition, Paris.
- Bleve G., Rizzotti L., Dellaglio F. and Torriani S.** (2003) Development of reverse-transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4116-4122.
- Blondin B. and Vezinhet F.** (1988) Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus en électrophorèse en champ pulsé. *Rev. Fr. Œnologie.*, 28, 7-19.

- Boehm T. and Mehta D.** (1938) Ester der Pyrokohlensäure. Berichte, 17, 1797.
- Booth I.R.** (2002) Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. Int. J. Food Microbiol., 16,365-375.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. and Davis R.W.** (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Human Genet., 32, 314-331.
- Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J. and Desjardins R.** (1999) LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J. Microbiol. Methods, 37, 77-86.
- Brock T.D.** (1966) Principles of microbial ecology. Prentice Hall, Englewood cliffs, NJ.
- Brock T.D.** (1987) The study of microorganisms in situ: progress and problems. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 41, 1-17.
- Cai J., Roberts I.N. and Collins M.D.** (1996) Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera* and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 542-549.
- Cameron J.R., Loh E.Y. and Davis R.W.** (1979) Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. Cell, 16, 739-751.
- Capece A., Salzano G. and Romano P.** (2003) Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. Int. J. Food Microbiol., 84, 33-39.
- Carlotti A., Srikantha T., Schroppel K., Kvaal C., Villard J. and Soll D.R.** (1997). A novel repeat sequence (CKRS-1) containing a tandemly repeated sub-element (kre) accounts for differences between *Candida krusei* strains fingerprinted with the probe CkF1,2. Curr. Genet., 31, 339-344.
- Caruso M., Capece A., Salzano G. and Romano P.** (2002) Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. Lett. Appl. Microbiol., 34, 323-328.
- Casalone E., Colella C.M., Daly S., Gallori E., Moriani L. and Polsinelli M.** (1992) Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet., 22, 435-440.
- Casalone E., Colella C.M., Daly S., Fontana S., Torricelli I. and Polsinelli M.** (1994) Cloning and characterization of a sulfite resistant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 10, 1101-1110.
- Casey GD, Dobson AD.** (2004) Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice--a preliminary study. Int. J. Food Microbiol. 91, 327-335.
- Castrejon F, Codon AC, Cubero B, Benitez T.** (2002) Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. Syst. Appl. Microbiol., 25, 462-467.
- Chaptal J.** (1807) L'art de faire le vin, Paris, 1807, in-8°, pp. 248-250.

**Chauvet S., Sudraud P. and Jouan T.** (1986). La cryoextraction selective, premières observations et perspectives. Bull. OIV, 667-668, 1021-1043.

**Chindamporn A., Iwaguchi S., Nakagawa Y., Homna M. and Tanaka K.** (1993) Clonal size-variation of rDNA cluster region on chromosome XII of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., 139, 1409-1415.

**Ciani M. and Ferraro L.** (1996) Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. Appl. Environ. Microbiol., 62, 128-132.

**Ciani M. and Ferraro L.** (1998) Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. J. Appl. Microbiol., 85, 247-254.

**Ciani M., Ferraro L. and Fatichenti F.** (2000) Influence of glycerol production on the aerobic and anaerobic growth of the wine yeast *Candida stellata*. Enzyme Microb. Technol., 27, 698-703.

**Claisse O. and Lonvaud-Funel A.** (2001) Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. J. Food Prot., 64, 833-837.

**Cobbold D.** (2001) Sauternes et Barsac. Coll. Autour d'un vin. Ed. Flammarion.

**Cocolin L., Bisson L.F. and Mills D.A.** (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. FEMS Microbiol. Lett., 189, 81-87.

**Cocolin L., Heisey A., Mills D.A.** (2001a) Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. Am. J. Enol. Vitic., 52, 49-53.

**Cocolin L., Manzano M., Cantoni C. and Comi G.** (2001b) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. Appl. Environ. Microbiol., 67, 5113-5121.

**Cocolin L., Manzano M., Rebecca S. and Comi G.** (2002a) Monitoring of yeast population changes during a continuous wine fermentation by molecular methods. Am. J. Enol. Vitic., 53, 24-27.

**Cocolin L. and Mills D.A.** (2003) Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: a comparison of culture-dependent and independent methods. Am. J. Enol. Vitic., 54, 125-130.

**Cocolin L., Aggio D., Manzano M., Cantoni C. and Comi G.** (2002b) An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. Int. Dairy J., 12, 407-411.

**Cocolin L., Rantsiou K, Iacumin L., Cantoni C. and Comi G.** (2002c) Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. Appl. Environ. Microbiol., 68, 6273-6282.

**Cocolin L., Innocente N., Biasutti M. and Comi G.** (2004a) The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. Int. J. Food Microbiol. 90, 83-91.

- Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R. and Comi G.** (2004b) Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1347-1355.
- Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Urso R., Cantoni C. and Comi G.** (2004c) Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1883-94.
- Codón A.C., Benitez T. and Korhola M.** (1997) Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Curr. Genet.*, 32, 247-259.
- Columelle L.J.M.** (1<sup>er</sup> siècle après J.C.) In *De l'agriculture*. Ed. Errance.
- Constanti M., Reguant C., Poblet M., Zamora F., Mas A. and Guillamón J.M.** (1998) Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 169-175.
- Cootes R.L. and Johnson R.** (1980) A fluorescent straining technique for determination of viable and non-viable yeasts and bacteria in wineries. *Food Technology in Australia*, 32, 522-524.
- Corry J.E.L.** (1978) Relationships of water activity to fungal growth. In : *Food and Beverage Mycology*. L.R. Beuchat, ed. Avi Publishing Co., Westport, Conn. pp. 45-83.
- Crowell E.A. and Guymon M.F.** (1975) Wine constituents arising from sorbic acid addition and identification of 2-ethoxyhexa-3,5-diene as a source of geranium-like off-odor. *Am. J. Enol. Vitic.*, 26, 97-102.
- Dahllof I., Baillie H. and Kjelleberg S.** (2000) *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3376-3380.
- Daudt C.E. and Ough C.S.** (1980) Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 31, 21-23.
- De Barros Lopes M., Rainieri S., Henschke P.A. and Langridge P.** (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 915-924.
- De Barros Lopes M., Soden A., Martens A.L., Henschke P.A. and Langridge P.** (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 279-286.
- De Barros Lopes M., Soden A., Henschke P.A. and Langridge P.** (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4514-4520.
- Debrauwere H., Gendrel C.G., Lechat S. and Dutreix M.** (1997) Differences and similarities between various tandem repeat sequences: minisatellites and microsatellites. *Biochimie*, 79, 577-286.
- De La Torre M.J., Millan M.C., Perez-Juan P., Morales J., Ortega J.M.** (1999) Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. *Microbios.*, 100:27-40.

- Delfini C., Gaia P., Schellino R., Strano M., Pagliara A. and Ambrò S.** (2002) Fermentability of grape must after inhibition with Dimethyl Dicarbonate (DMDC). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5605-5611.
- De Llanos-Frutos S., Fernandez-Espinar M.T. and Querol A.** (2004) Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 175-185.
- Del Mar Lleó, Pierobon S., Tafi M.C., Signoretto C. and Canepari P.** (2000) mRNA detection by reverse-transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4564-4567.
- Dias L., Pereira-da-Silva S., Tavares M., Malfeito-Ferreira M. and Loureiro V.** (2003) Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol.*, 20, 377-384.
- Divol B., Tonon T., Morichon S., Gindreau E. and Lonvaud-Funel A.** (2003) Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 738-746.
- Donèche B.J.** (1987) Etude biochimique de la relation hôte-parasite dans le cas du raisin et de *Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat es sciences. Bordeaux. France.
- Donèche B.J.** (1992) Botrytized wines. in *Wine Microbiology and Biotechnology*, G.H. Fleet ed., Harwood Academic Publishers, Chur.
- Dorange J.-L. et Dupuy P.** (1972) Mise en évidence d'une action mutagène du sulfite de sodium sur la levure. *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D*, 274, 2798-2800.
- Dott W. and Trüper H.G.** (1978) Sulfite formation by wine yeasts. VI. Regulation of biosynthesis of NADPH- and BV-dependent sulfite reductases. *Arch. Microbiol.*, 118, 249-251.
- Dow C.S., Whittenbury R. and Carr N.G.** (1983) The 'shut-down' or 'growth precursor' cell – an adaptation for survival in a potentially hostile environment. In *Microbes in their natural environment* (Symp. Soc. Gen. Microbiol.) pp. 187-247. Ed. J.H. Slater, R. Whittenbury and J.W.T. Wimpenny, Cambridge: Cambridge University Press.
- Dubos R.** (1980) in *Courtisons la terre*. Ed. Stock, Paris.
- Dubourdieu D.** (1978) Etude des polysaccharides secretes par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. Incidence sur les difficultés de clarification des vins de vendanges pourries. Thèse de doctorat 3<sup>ème</sup> cycle, Bordeaux, France.
- Duffy G., Sheridan J.J., Hofstra H., McDoxell D.A. and Blair L.S.** (1997) A comparison of immunomagnetic and surface adhesion immunofluorescent techniques for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in meat. *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 445-450.
- Duineveld B.M., Kowalchuk G.A., Keijzer A., van Elsas J.D. and van Veen J.A.** (2001) Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of

chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 172-178.

**Du Toit W.J., Pretorius I.S. and Lonvaud-Funel A.** (2004) 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.*, sous presse.

**Espinosa J.C., Fernandez-Gonzalez M., Ubeda J. and Briones A.** (2002) Identification of wine yeasts by PCR-RFLP. *Food Technol. Biotechnol.*, 40, 157-160.

**Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. and Querol A.** (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 329-337.

**Esteve-Zarzoso B., Fernandez-Espinar M.T. and Querol A.** (2004) Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 151-158.

**Esteve-Zarzaso B., Gostíncar A., Bobet R., Uruburu F. and Querol A.** (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedes' area (Spain). *Hood Microbiol.*, 17, 553-562.

**Fan N., Chen L.C., Ragan M.A., Gutell R.R., Warner J.R., Currie B.P. and Casadevall A.** (1995) The 5S rRNA and the rRNA intergenic spacer of the two

varieties of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 33, 215-221.

**Felske A., Akkermans A.D.L. and DeVos W.M.** (1998) Quantification of 16S rRNAs in complex gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4581-4587.

**Fernández-González M., Espinosa J.C., Ubeda J.F. and Briones A.I.** (2001) Yeasts present during wine fermentation: comparative analysis of conventional plating and PCR-TTGE. *System. Appl. Microbiol.*, 24, 634-638.

**Ferraro L., Fatichenti F. and Ciani M.** (2000) Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.*, 35, 1125-1129.

**Ferris M.J., Muyzer G. and Ward D.M.** (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 340-346.

**Fischer S.G. and Lerman L.S.** (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Ell*, 16, 191-200.

**Fleet G.H.** (1999) Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 15, 101-117.

**Fleet G.H.** (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 87-99.

**Fleet G.H., Lafon-Lafourcade S. and Ribéreau-Gayon P.** (1984) Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of



Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 1034-1038.

**Frezier V. and Dubourdiou D.** (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43,375-380.

**Froudière I., Larue F. et Lonvaud A.** (1990) Utilisation de l'épifluorescence pour la détection des micro-organismes du vin. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 24, 43-46.

**Freese E., Sheu C.W. and Galliers E.** (1973) Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321-325.

**Fugelsang K.C.** (1998) *Zygosaccharomyces*, a spoilage yeast isolated from grape juice. CATI publications #980902.

**Gallego F.J., Perez M.A., Martinez I and Hidalgo P.** (1998) Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 350-351.

**Genth H.** (1972) communication personnelle citée par Ough C.S. (1993) Dimethyl dicarbonate and diethyl dicarbonate. In *Antimicrobials in Foods*, 2nd edn (ed. Davidson P.M. and Branen A.L.), pp. 343-368. New-York : Marcel Dekker Inc.

**Genth H.** (1980) Dimethyldicarbonat ein neuer Verschwindestoff. *Braueri J.*, 6, 129.

**Gindreau E., Walling E. and Lonvaud-Funel A.** (2001) Direct polymerase chain reaction detection

of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 535-42.

**Giraffa G.** (2004) Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 251-260.

**Giulletti A., Overbergh L., Valck D., Decallonne B., Bouillon R. and Mathieu C.** (2001) An overview of real-time quantitative PCR : applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25, 386-401.

**Gonzalez Techera A., Jubany S., Carrau F.M. and Gaggero C.** (2001) Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 71-75.

**Goto-Yamamoto N., Kitano K., Shiki K., Yoshida Y., Suzuki T., Twata T., Yamane Y. and Hara S.** (1998) *SSUI-R*, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of *SSUI* with a different upstream sequence. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 127-133.

**Graça da Silveira M., Vitória San Romão M., Loureiro-Dias M.C., Rombouts F.S. and Abee T.** (2002) Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Enococcus æni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6087-6093.

**Granchi L., Bosco M., Messini A. and Vincenzini M.** (1999) Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 949-956.

**Granchi L., Ganucci D., Viti C., Giovannetti L. and Vincenzini M.** (2003) *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial

fermentations of grape musts with 'adequate' and 'inadequate' assimilable-nitrogen content. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36, 54-58.

**Griffiths BS, Kuan HL, Ritz K, Glover LA, McCaig AE, Fenwick C.** (2003) The Relationship between Microbial Community Structure and Functional Stability, Tested Experimentally in an Upland Pasture Soil. *Microb. Ecol.*, sous-presse.

**Guillamón J.M., Sabaté J., Barrio E., Cano J. and Querol A.** (1998) Rapide identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal ITS regions. *Arch. Microbiol.*, 169, 387-392.

**Guillou S., Besnard V., El Murr N. and Federighi M.** (2003) Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. *Int. J. Food Microbiol.*, 88, 85-89.

**Gunnison A.F.** (1981) Sulphite toxicity: a critical review of *in vitro* and *in vivo* data. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19,667-682.

**Gutell R.R., Larsen N. and Woese C.R.** (1994) Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.*, 58, 10-26.

**H**ayatsu H. and Miura A. (1970) The mutagenic action of sodium bisulfite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 156-160.

**Head I.M., Saunders J.R. and Pickup R.W.** (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of

uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.*, 35, 1-21.

**Heilig H.G.H.J., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D.L. and de Vos W.M.** (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 114-123.

**Heimberg M., Fridovich I. and Handler P.** (1953) The enzymatic oxidation of sulfite. *J. Biol. Chem.*, 204, 904-926.

**Hennequin C., Thierry A., Richard G.F., Lecointre G., Nguyen H.V., Gaillardin C., Dujon B.** (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 551-559.

**Henriques M., Sá-Nogueira I., Giménez-Jurado G. and van Uden N.** (1991) Ribosomal DNA spacer proves for yeast identification: studies in the genus *Metschnikowia*. *Yeast*, 7, 167-172.

**Heresztyn T.** (1986) Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 127-132.

**Hernan-Gomez S., Espinosa J.C. and Ubeda J.F.** (2000) Characterization of wine yeast by temperature gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 193, 45-50.

**Herraiz T., Martín-Alvarez P.J., Reglero G., Herraiz M. and Babzudo M.D.** (1989) Differences between wines fermented with and without sulphur

dioxide using various selected yeast. *J. Sci. Food Agric.*, 49, 249-258.

**Herrero M., Garcia L.A. and Diaz M.** (2003) The effect of SO<sub>2</sub> on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids, and flavour volatiles during industrial cider fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3455-3459.

**Hicks RE, Amann RI, Stahl DA.** (1992) Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2158-2163.

**Hinze H. and Holzer H.** (1986) Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Arch. Microbiol.*, 145, 27-31.

**Hobbie J.E., Daley R.J. and Jasper S.** (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1225-1228.

**Hohmann S. and Mager W.H.** (2003) Yeast stress responses. Eds Hohmann and Mayer. Springer Ed., Berlin, Heidelberg, New-York.

**Holben W.E., Feris K.P., Kettunen A. and Apajalahti J.H.A.** (2004) GC fractionation enhances microbial community diversity assessment and detection of minority populations of bacteria by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 2263-2270.

**Holloway P., van Twest R.A., Subden R.E. and Lachance M.-A.** (1992) A strain of *Candida*

*stellata* of special interest to oenologists. *Food Res. Intern.*, 25, 147-149.

**Huffman J.L., Molina F.I. and Jong S.C.** (1992) Authentication of ATCC strains in the *Saccharomyces cerevisiae* complex by PCR fingerprinting. *Exp. Mycol.*, 16, 316-319.

**Hugel J.** (1981) Production et vinification des vins de vendange tradive et de selection de grains nobles. *Rev. Franç. Oenol.*, 82, 57-60.

**Ibeas J.I. and Jimenez J.** (1997) Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeast., *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 7-12.

**Infante J.J., Dombek K.M., Rebordinos L., Cantoral J.M., Young E.T.** (2003) Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics*, 165, 1745-1759.

**Ingram M.** (1948) The germicidal effect of free and combined sulphur dioxide. *J. Soc. Chem. Ind. Lond.*, 67, 18-21.

**Ishii K. and Takii S.** (2003) Comparison of microbial communities in four different composting processes as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 109-119.

**Jackson R.S.** (2000) Wine science. Principles, Practice, Perception. San Diego, CA: Academic Press.

**Johnston M, Hillier L, Riles L, Albermann K, Andre B, Ansorge W, Benes V, Bruckner M,**

**Delius H, Dubois E, Dusterhoft A, Entian KD, Floeth M, Goffeau A, Hebling U, Heumann K, Heuss-Neitzel D, Hilbert H, Hilger F, Kleine K, Kotter P, Louis EJ, Messenguy F, Mewes HW, Hoheisel JD, et al.** (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature*, 387(6632 Suppl), 87-90.

**James S.A., Collins M.D. and Roberts I.N.** (1996) Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 189-194.

**Johnson H. and Robinson J.** (2001) The world atlas of wine. Edition Française (2002) L'atlas mondial du vin. 5<sup>e</sup> édition. Flammarion.

**Johnston S.L. and Smith K.W.** (1976) *Biochemistry*, 15, 553-559.

**Jolly N.P., Augustyn O.P.H. and Pretorius I.S.** (2003) The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 24, 55-62.

**Joyeux A., Lafon-Lafourcade S. and Ribéreau-Gayon P.** (1984) Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ Microbiol.*, 48, 153-156.

**Kaplow M.** (1970) Commercial development of intermediate moisture foods. *Food Technol.*, 24, 889-893.

**Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R. and Barer M.R.** (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 169-187.

**Kielhöfer E. und Würdig G.** (1960) Die unbekannte Weinbestandteile gebundene schweflige Säure (Rest SO<sub>2</sub>) und ihre Bedeutung für den Wein. *Weinburg u. Keller*, 7, 313-328.

**Kroemer K. und Krumbholz G.** (1931) *Archiv Mikrobiol.*, 2, 232.

**Kurtzman C.P.** (1992) rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 1-6.

**Kurtzman C.P.** (1993) Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63, 165-174.

**Kurtzman C.P., Robnett C.J. and Basehoar-Powers E.** (2001) *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, a new ascosporegenous yeast from 'Kombucha tea'. *FEMS yeast res.*, 1, 177-185.

**Laville P. et Dubreuilh J.** (1987) Le terroir des environs de Sauternes et Barsac. In *Barsac Sauternes*, Bernard Ginestet, Jacques Legrand. Ed. Nathan.

**Lafon-Lafourcade S.** (1955) Contribution à l'étude des activateurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisins. Thèse de doctorat de 3<sup>ème</sup> cycle. Bordeaux. France.

**Lafon-Lafourcade S.** (1984) Souches de levures. *Bull. OIV*, 367, 185-203.

**Lafon-Lafourcade S., Larue F. and Ribéreau-Gayon P.** (1979) Evidence for the existence of « survival factors » as an explanation for some

peculiarities of yeast growth especially in grape must of high sugar concentration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 1069-1073.

**Lafon-Lafourcade S., Lucmaret V., Joyeux A. et Ribéreau-Gayon P.** (1981) Utilisation de levains mixtes dans l'élaboration des vins de pourriture noble en vue de réduire l'acidité volatile. *Comptes-rendus de l'académie d'agriculture*, 67, 616-622.

**Las Heras-Vazquez F.J., Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez J.M., Rodriguez-Vico F.** (2003) Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res.*, 3, 3-9.

**Lázaro B., Cárcamo J., Audicana A., Perales I. and Fernández-astorga A.** (1999) Viability and DNA maintenance in culturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4677-4681.

**Legras J.-L. and Karst F.** (2003) Optimization of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.*, 221, 249-255.

**Lenoir J.** (1998) *Le nez du vin*. Ed. Jean Lenoir, Chaintre, France.

**Le Roux G., Eschenbruch R. and De Bruin S.I.** (1973) The microbiology of South African wine making. Part VIII – The microflora of healthy and *Botrytis cinerea* infected grapes. *Phytophylactica*, 5, 51-54.

**Li W.H.** (1997) *Molecular evolution*. Sunderland, MA: Sinauer associates.

**Lieckfeldt E., Meyer W. and Borner T.** (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic. Microbiol.*, 33, 413-426.

**Linder K. and Oliver J.D.** (1989) Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2837-2842.

**Livak K.J. and Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25, 402-408.

**Lleó M.M., Bonato B., Tafi M.C., Signoretto C., Boaretti M. and Canapari P.** (2001) Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 1095-1102.

**Lonvaud-Funel A. et Joyeux A.** (1988) Une altération bactérienne des vins : la « maladie des vins filants ». *Sciences des aliments*, 8, 33-49.

**Lonvaud-Funel A., Joyeux A. and Ledoux O.** (1991) Speciation of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 501-508.

**Lonvaud-Funel and Joyeux A.** (1994) Histamine production by wine lactic acid bacteria. Isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 401-407.

**Lopes C.A., van Brook M., Querol A. and Cabarello A.C.** (2002) *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different

fermentation scales. *J. Appl. Microbiol.*, 93, 608-615.

**Lopez I., Ruiz-Larrea F., Cocolin L., Orr E., Phister T., Marshall M., VanderGheynst J. and Mills D.A.** (2003) Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6801-6807.

**Loureiro V. and Malfeito-Ferreira M.** (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 23-50.

**Lucas P. and Lonvaud-Funel A.** (2002) Purification and partial gene sequence of the tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809. *FEMS Microbiol. Lett.*, 211, 85-89.

**Lucas P., Landete J., Coton M., Coton E. and Lonvaud-Funel A.** (2003) The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 229, 65-71.

**Lundquist F.** (1974) in *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer H.U. ed.) 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 3 pp. 1509-1513. Verlage Chemie, Weinheim/Academic press, Inc., New-York and London.

**Macris B.J. and Markakis P.** (1974) Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *J. Sci. Food Agric.*, 25, 21-29.

**Manzano M., Cocolin L., Longo B. and Comi G.** (2004) PCR-DGGE differentiation of strains of

*Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 23-27.

**Marshall M.N., Cocolin L., Mills D.A. and VenderGheynst J.S.** (2003) Evaluation of PCR primers for denaturing analysis of fungal communities in compost. *J. Appl. Microbiol.*, 95, 934-948.

**Martin du Gard R.** (1922-1940) in *Les Thibault*.

**Martinez P., Codon A.C., Perez L., Benitez T.** (1995) Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast*, 11, 1399-1411.

**Masneuf I. and Dubourdieu D.** (1994) Comparaison de deux techniques d'identification des souches de levures de vinification basées sur le polymorphisme de l'ADN génomique: réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse des caryotypes (électrophorèse en champ pulsé). *J. Int. Sci. Vignes Vin*, 28, 153-160.

**Masneuf I et Dubourdieu D.** (2000) Rôle de la souche de levure sur les combinaisons du dioxyde de soufre des vins issus de raisins botrytisés et passerillés. *J. Int. Sci. Vigne vin*, 34, n°1, 27-31.

**Masneuf I., Hansen J., Groth C., Piskur J. and Dubourdieu D.** (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3887-3892.

**Masneuf I., Murat M. L., Naumov G., Tominaga T. and Dubourdieu D.** (2002) Hybrids *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* having a high liberating ability of some sulfur varietal aromas of *Vitis*

*vinifera* Sauvignon blanc wines. J. Int. Sci. Vigne Vin, 36, 205-212.

**Mayerhof O., Ohlmeyer P und Mahle W.** (1938) Über die Koppelung zwischen Oxyreduktion und Phosphatveresterung bei der anaeroben Kohlenhydratspaltung. 2. Die Hoppelung als Gleichgewichtsreaktion. Biochem. Z., 297, 113-133.

**McDougald D., Rice S.A., Weichart D. and Kjelleberg S.** (1998) Nonculturability: adaptation or debilitation? FEMS Microbiol. Ecol., 25, 1-9.

**Meroth CB, Hammes WP, Hertel C.** (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol., 69, 7453-7461.

**Mesa J.J., Infante J.J., Rebordinos L. and Cantoral J.M.** (1999) Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. Lebensm.-Wiss. U.-technol., 21, 114-120.

**Mesa J.J., Infante J.J., Rebordinos L., Sanchez J.A. and Cantoral J.M.** (2000) Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. Am. J. Enol. Vitic., 51, 15-21.

**Millet V.** (2001) Dynamique et survie des populations bactériennes dans les vins rouges au cours de l'élevage : interactions et équilibres. Thèse de doctorat de l'université Victor Segalen Bordeaux II.

**Millet V. and Lonvaud-Funel A.** (2000) The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Lett. Appl. Microbiol., 30, 136-141.

**Mills D.A., Johannsen E.A. and Cocolin L.** (2002) Yeast diversity and persistence in *Botrytis*-affected wine fermentations. Appl. Environ. Microbiol., 68, 4884-4893.

**Molina F.I., Inoue T. and Jong S.C.** (1992) Ribosomal DNA restriction analysis reveals genetic heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen. Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 499-502.

**Möller E.M., Bahnweg G., Sandermann H. and Geiger H.H.** (1992) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nuc. Acids Res., 20, 6115-6116.

**Molnár O., Messner R., Prillinger H., Stahl U. and Slavikova E.** (1995) Genotypic identification of *Saccharomyces species* using random amplified polymorphic DNA analysis. System. Appl. Microbiol., 18, 136-145.

**Moore K.J., Johnson M.G. and Morris J.R.** (1988) Indigenous yeast microflora on Arkansas White Riesling (*Vitis vinifera*) grapes and in model systems. J. Food Sci., 53, 1725-1728.

**Morakile G., Koch J.L.F., van Zyl W., Pohl C.H. and Viljoen B.C.** (2002) Differentiation of brewing and related yeasts based on PCR amplification and restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA. J. Inst. Brew., 108, 164-168.

**Morgan J.A.W., Cranwell P.A. and Pickup R.W.** (1991) Survival of the virulence of *Aeromonas salmonicida* in lake water. Appl. Environ. Microbiol., 57, 1777-1782.

**Mortimer R. and Polsinelli M.** (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.*, 150, 199-204.

**Mukai F., Hawryluk I. and Shapiro R.** (1970) The mutagenic specificity of sodium bisulfite. *Biophys. Res. Commun.*, 39, 983-988.

**Müller-Thurgau H.** (1888) Die Edeläule der Trauben. *Landwirt Jahrbücher*, 17, 83-90.

**Myers R.M., Maniatis T. and Lerman L.S.** (1987) Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods enzymol.*, 155, 501-527.

**Naumov G. I., Masneuf I., Naumova H., Aigle M. and Dubourdieu D.** (2000) Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines : genetic analysis of yeast populations. *Res. Microbiol.*, 151, 683-691.

**Naumov G. I., Naumova H., Antunovics Z. and Sipiczki M.** (2002) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 727-730.

**Ness F., Lavallee F., Dubourdieu D., Aigle M. and Dulau L.** (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.*, 62, 89-94.

**Nisiotou A.A. and Gibson G.R.** (2004) Identification of yeasts isolated from Greek market wines. Unpublished.

**Nyström T. and Kjelleberg S.** (1989) Role of protein synthesis in the cell division and starvation

induced resistance to autolysis of a marine *Vibrio* during the initial phases of starvation. *J. Gen. Microbiol.*, 74, 129-140.

**IV (Organisation internationale de la vigne et du vin)** (1990) Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Complément n°1 à l'édition officielle de juin 1990. Organisation internationale de la vigne et du vin, S. 97-100.

**Ok T. and Hashinaga F.** (1997) Identification of sugar-tolerant yeasts from high-sugar fermented vegetable extracts. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43, 39-47.

**Oliver J.D.** (1989) *Vibrio vulnificus*, in Foodborne bacterial pathogens (M.P. Doyle, ed.) Dekker, New-York, pp. 569-600.

**Oliver J.D.** (1993) Formation of viable but nonculturable cells. In Starvation in bacteria, pp. 239-272. Ed. Kjelleberg S., New-York: Plenum Press.

**Oliver J.D., Hita F., McDougald D., Andon N.L. and Simpson L.M.** (1995) Entry into and resuscitation from the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2624-2630.

**Olney R.** (2003) Yquem. Ed. Flammarion.

**Östling J., Holmquist L., Flärdh K. Svenblad B., Jouper-Jaan È. And Kjelleberg S.** (1993) Starvation and recovery of marine *Vibrio*. In Starvation in bacteria, pp. 103-127. Ed. S. Kjelleberg. New-York: Plenum Press.



**Ough C.S.** (1975) Dimethyldicarbonate as a wine sterilant. *Am. J. Enol. Vitic.*, 26, 130-133.

**Ough C.S., Crowell E.A. and Mooley L.A.** (1988) Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 244-250.

**Ough C.S. and Ingraham J.L.** (1961) The diethylester of pyrocarbonic acid as a bottled-wine sterilizing agent. *Am. J. Enol. Vitic.*, 12, 149-151.

**Ough C.S., Kunkee R.E., Vilas M.R., Bordeu E. and Hunang M.C.** (1988) The interaction of sulfur dioxide, pH and dimethyl dicarbonate on the growth *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 279-282.

**Pardo I., Garcia M.I., Zuniga M. Uruburu F.** (1989) Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 539-541.

**Park H. and Bakalinsky A.T.** (2000) *SSU1* mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16, 881-888.

**Pasteur L.** (1972) Nouvelles expériences pour démontrer que le germe de la levure qui fait le vin provient de l'extérieur des grains de raisin. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 75, 781-793.

**Pasteur L.** (1866) Etudes sur le vin. Imprimerie impériale. Paris.

**Pearson B.M. and McKee R.A.** (1992) Rapid identification of *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int. J. Food Microbiol.*, 16, 63-67.

**Peixoto R.S., da Costa Coutinho H.L., Rumjanek N.G., Macrae A. and Rosado A.S.** (2002) Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35, 316-320.

**Perez M.A., Gallego F.J., Martinez I. and Hidalgo P.** (2001) Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a molecular marker. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33, 461-466.

**Petering J., Langridge P. and Henschke P.** (1988) Fingerprinting wine yeasts. *Australian New Zealand Wine Industry Journal*, 3, 48-52.

**Peterson S.W. and Kurtzman C.P.** (1991) Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.*, 14, 124-129.

**Pettipher G.L., Fulford R.J. and Mabbitt L.A.** (1983) Collaborative trial of the direct epifluorescent filter technique (DEFT), a rapid method for counting bacteria in milk. *J. Appl. Bacteriol.*, 54, 177-182.

**Peynaud E. et Domercq S.** (1959). A review of microbiological problems in wine-making in France. *Am. J. Enol. Vitic.*, 10, 69-77.

**Peynaud E. et Lafourcade S.** (1952) Les conditions d'emploi de l'anhydride sulfureux dans les vins liquoreux. *Bull OIV*, 252, 110-120.

**Pfleiderer G., Jekel D. and Weiland T.** (1956) Biochem. Z., 328, 187-194.

**Phister TG, Mills DA.** (2003) Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7430-7434.

**Pitt J.I.** (1974) Resistance of some spoilage yeasts to preservatives. Food Tech. Australia, 16, 238-241.

**Poincaré H.** (1902) La science et l'hypothèse. p. 170. Ed. Flammarion (réédition de 1994).

**Polarkis E.S. and Bartley W.** (1965) J. Biochem., 97, 284-297.

**Postgate J.R.** (1969) Viable counts and viability. Meth. Microbiol., 1, 611-628.

**Prakitchaiwattana C.J., Fleet G.H., Heard G.M.** (2004) Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Res., 4, 865-877.

**Pramateftaki P.V., Lanaridis P., Typas M.A.** (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. J. Appl. Microbiol., 89, 236-248.

**Puig S., Querol A., Barrio E. and Pérez-Ortín J.E;** (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 66, 2057-2061.

**Querol A., Barrio E. and Ramón D.** (1992a) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. System. Appl. Microbiol., 15, 439-446.

**Querol A., Barrio E., Huerta T., Ramón D.** (1992b) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol., 58, 2948-2953.

**Quesada M.P. and Cenis J.L.** (1995) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic., 46, 204-208.

**Rahman I., Shahamat M; Chowdhury M.A.R. and Colwell R.R.** (1996) Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1. Appl. Environ. Microbiol., 62, 115-120.

**Rahn O. and Conn J.E.** (1944) Ind. Engng. Chem. Ind. Ed., 36, 185.

**Randazzo C.L., Torriani S., Akkermans A.D., de Vos W.M. and Vaughan E.E.** (2002) Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. Appl. Environ. Microbiol., 68, 1882-1892.

**Reed G. and Nagodawithana T.W.** (1988) Technology of yeast usage in winemaking. Am. J. Enol. Vitic., 39, 83-90.

**Rehm J.H. und Wittmann H.** (1962) Z. Lebensmittelunters u.-Forsch., 118, 413-429.

- Rehm J.H. und Wittmann H.** (1963) Z. Lebensmittelunters u.-Forsch., 120, 465.
- Rementería A., Rodríguez J.A., Cadaval A., Amenabar R., Muguruza J.R., Hernando F.L. and Sevilla M.J.** (2003) Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Twakoli de Bizkaria” region (Basque country, North Spain). Int. J. Food Microbiol., 86, 201-217.
- Reynolds T.B. and Fink G.R.** (2001) Baker’s yeast, a model for fungal biofilm formation. Science, 219, 878-881.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. and Ribéreau-Gayon P.** (1982) Sciences et techniques du vin. Tome I, analyse et contrôle du vin, 2<sup>e</sup> ed., Ed. Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P. et Sudraud P.** (1975) Sciences et techniques du vin. Tome II : Caractères des vins, maturation du raisin, levures et bactéries. Ed. Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon J. et Peynaud E.** (1960) Traité d’œnologie tome I. pp. 217-223.
- Ribéreau-Gayon P.** (1985) New developments in wine microbiology. Am. J. Enol. Vitic., 36, 1-10.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B. et Lonvaud A.** (1998) Traité d’œnologie. Tome I : Microbiologie du vin – Vinifications. Ed. Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon P., Lafon-Lafourcade S., Dubourdiou D., Lucmaret V. and Larue F.** (1979) Métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae* dans le moût de raisins parasités par *Botrytis cinerea*. Inhibition de la fermentation. Formation d’acide acétique et de glycérol. Comptes-rendus de l’académie de sciences. Paris, 289D, 441-444.
- Richard G.-F., Hennequin C., Thierry A. and Dujon B.** (1999) Trinucleotides repeats and other microsatellites in yeasts. Res. Microbiol., 150, 589-602.
- Ripper M.** (1892) J. Prakt. Chem., 46, 428.
- Ristow H., Seyfarth A. and Lochmann E.R.** (1995) Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. Mutat. Res., 326, 165-170.
- Robertson G.L., Eschenbruch R. and Cresswell K.L.** (1980) Seasonal changes in the pectic substances of grapes and their implication in juice extraction. Am. J. Enol. Vitic., 31, 162-166.
- Rollins D.M. and Colwell R.R.** (1986) Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol., 52, 531-538.
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A.** (2003) Function of yeast species and strains in wine flavour. Int. J. Food Microbiol., 86, 169-180.
- Romano P. and Suzzi G.** (1992) Sulfur dioxide and wine microorganisms. In Wine technology and Biotechnology, pp. 373-393, G.H. Fleet. Ed. Harwood, Academic Publishers, Chur, Suisse.
- Romano P., Suzzi G., Lurbanti L. and Polsinelli M.** (1994) Acetaldehyde production in

*Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. FEMS Microbiol. Lett., 118, 213-218.

**Romano P. and Tini V.** (1975) RIV SCI Tecnol. Alimenti. Nutr. Um., 5, 245-246.

**Rosini G., Federici F. and Martini A.** (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. Microb. Ecol., 8, 83-89.

**Roth W.G., Leckie M.P. and Dietzler D.N.** (1988) Restoration of colony-forming activity osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. Appl. Environ. Microbiol., 54, 3142-3146.

**Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A.** (1985) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science, 239, 487-491.

**Schanderl H.** (1959) Die Mikrobiologie des Mostes und Weines, 1<sup>st</sup> ed., pp 242-252. Stuttgart: Eugen Uhrer.

**Schimz K.-L.** (1980) The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol., 125, 89-95.

**Schimz K.-L., Holzer H.** (1979) Low concentration of sulfite lead to a rapid decrease of ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae* X2180 by activating an ATP hydrolyzing enzyme system located on the cell surface. Abstr. Intern. Congr. Microbiol. XII, Abstr. No. G51, p. 164, München.

**Schlatter J. and Lutz W.K.** (1990) The carcinogenesis potential of ethyl carbamate: risk

assessment at human dietary exposure levels. Food Chem. and Toxic., 28, 205-221.

**Schmittgen T.D. and Zakrajsek B.A.** (2000) Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR.

**Sheridan G.E.C., Masters C.I., Shallcross J.A. and Mackey B.M.** (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. Appl. Environ. Microbiol., 64, 1313-1318.

**Signoretto C., Lleò M.M., Tafi M.C. and Canepari P.** (2000) Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but non culturable state. Appl. Environ. Microbiol., 66, 1953-1959.

**Sipiczki M.** (2003) *Candida zemplinina* sp. Nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. Int. J. System. Evol. Microbiol., 53, 2079-2083.

**Sohier D. and Lonvaud-Funel A.** (1998) Rapid and sensitive in situ hybridization method for detectinf, identifying lactic acid bacteria in wine. Food Microbiol., 15, 391-397.

**Stafford P.A. and Ough C.S.** (1976) Formation of methanol and ethylmethylcarbonate by dimethyldicarbonate in wine and model solutions. Am. J. Enol. Vitic., 26, 130-133.

**Steels H., James S.A., Roberts I.M. and Stratford M.** (2000) Sorbic acid resistance: the inoculum effect. Yeast, 16, 1173-1183.

**Stratford M., Morgan P. and Rose A.I.I.** (1987) Sulphur dioxide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., 133, 2173-2179.

**Stratford M. and Rose I.M.** (1986) Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., 132, 1-6.

**Stubbs S., Hutson R., James S. and Collins M.D.** (1994) Differentiation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* from other *Zygosaccharomyces* species using 18S rDNA as target for a non-radioactive ligase detection reaction. Lett. Appl. Microbiol., 19, 268-272.

**Suzuki T., Higgins A.J. and Crawford D.R.** (2000) Control selection for RNA quantification. Biotechniques, 29, 221-337.

**Suzzi G. and Romano P.** (1982) Induced changes by SO<sub>2</sub> on the population of *Saccharomyces* as agents of the natural fermentation of musts. Vini d'Italia, 24, 138-145.

**Tautz D.** (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA marker. Nucl. Acids Res., 17, 6463-6471.

**Taylor M.W., Schupp P.J., Dahllorf I., Kjelleberg S. and Steinberg P.D.** (2004) Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. Environ. Microbiol., 6, 121-130.

**Terrel F.R., Moris J.R., Johnson M.G. and Gbur E.E.** (1993) Yeast inhibition in grape juice containing sulfur dioxide, sorbic acid and dimethyldicarbonate. J. Food Sci., 58, 1132-1134.

**Thomas D., Barbey R., Henry D. and Surdin-Kerjan Y.** (1992) Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. J. Gen. Micro., 138, 2021-2028.

**Thomas D.S.** (1981) Microbial spoilage in wine. Long Ashton Res. Station report.

**Thomas D.S.** (1983) Susceptibility of wines to yeast spoilage/ Long Ashton Res. Station Report.

**Thomas D.S. and Davenport R.R.** (1985) *Zygosaccharomyces bailii* – a profile of characteristics and spoilage activities. Food Microbiol., 2, 157-169.

**Threlfall R. and Morris J.R.** (2002) Using dimethyldicarbonate to minimize sulfur dioxide for prevention of fermentation from excessive yeast contamination in juice and semi-sweet wine. J. Food. Sci., 67, 2758-2762.

**Tonon T.** (2000) Etude du catabolisme de l'arginine par les bactéries lactiques du vin. Aspects physiologique, enzymatique et génétique chez *Ænococcus œni*. Thèse de doctorat de l'université Victor Segalen Bordeaux II.

**Tuazon P.T. and Johnston S.L.** (1977) Free radical and ionic reaction of bisulfite with reduced nicotinamide adenine dinucleotide and its analogs. Biochemistry, 16, 1183-1188.

**Ussaglio-Tomasset L.** (1989) Chimie œnologique, collection Tec et Doc, Ed. Lavoisier, Paris.

**Vaitilingem J.D., Gendre F. and Brignon P.** (1998) Direct detection of viable bacteria, molds and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1157-1160.

**Valente P., Gouvela F.C., de Lemos G.A., Pimentel D., van Elsas J.D., Mendona-Hagler L.C. and Hagler A.N.** (1996) PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiol. Lett.*, 137, 253-256.

**Van Beek S. and Priest D.G.** (2002) Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 297-305.

**Van de Peer Y., Chapelle S. and De Wachter R.** (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucl. Acids Res.*, 24, 3381-3391.

**Van der Aa Kühle A., Jesperen L., Glover R.L., Diawara B., Jakobsen M.** (2001) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeast*, 18, 1069-1079.

**Van Leeuwenhoek A.** (1702) *in* une lettre datée du 25 décembre.

**Vaughan-Martini A., Martini A.** (1985) Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 508-511.

**Veinhet F., Blondin B. and Hallet J.N.** (1990) Chromosomal DNA patterns and mitochondrial

DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 568-571.

**Viti C, Giovannetti L, Granchi L, Ventura S.** (1996) Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Res Microbiol.*, 147, 651-60.

**Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M.** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414.

**Walter J., Hertel C., Tannock G.W., Lis C.M., Munro K. and Hammes W.P.** (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2578-2585.

**Warth A.D.** (1977) *J. Appl. Bacteriol.*, 43, 215-230.

**Wedzicka B.L.** (1984) Chemistry of sulphur dioxide in foods. London: Elsevier Applied Science Publishers.

**Weeks C.** (1969) Production of sulphur dioxide-binding compounds and of sulphur dioxide by two *Saccharomyces* yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 20, 32-39.

**Weising K, Atkinson R.G. and Gardner R.C.** (1995) Genomic fingerprinting by microsatellite-

primed PCR: a critical evaluation. PCR methods Appl., 4, 249-255.

**White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J.** (1990) PCR protocols. A guide to methods and applications. In Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. Ed. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J. San Diego: Academic Press.

**Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey J.V.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18, 6531-6535.

**Wyder M.T. and Puhán Z.** (1997) A rapid method for identification of yeasts from kefir at species level. Michwissenschaft, 52, 327-330.

**Xu H.S., Roberts N.C., Singleton F.L., Atwell R.W., Grimes D.J. and Colwell R.R.** (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and

*Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microb. Evol., 8, 313-323.

**Xu X., Wightman J.D., Geller B.L., Avram D. and Bakalinsky A.T.** (1994) Isolation and characterization of sulfite mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet., 25, 488-496.

**Yamamoto N., Amemiya H., Tokomori X., Shimizu K. and Totsuka A.** (1991) Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic., 42, 359-363.

**Zietkiewicz E., Rafalski A. and Labuda D.** (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20, 176-183.

**Zuckerlandl E. and Pauling L.** (1965) Molecules as documents of evolutionary history. J. Theor. Biol., 8, 357-366.

**COMMUNICATIONS  
SCIENTIFIQUES**



---

# COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

« Il y a plus de philosophie dans une bouteille de vin que dans tous les livres... »

Louis Pasteur

**Divol B., Miot-Sertier C. and Lonvaud-Funel A.** (2005) Isolation and genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'Refermentation' in *Botrytis*-affected wines. (manuscrit soumis in *J. Appl. Microbiol.*).

**Divol B. and Lonvaud-Funel A.** (2005) Evidence for viable but nonculturable yeast in *Botrytis*-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* sous presse.

**Divol B., Strehaiano P. and Lonvaud-Funel A.** (2005) Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiol.*, 22, 169-178.

**Divol B. and Lonvaud-Funel A.** (2004) Observations sur la refermentation des vins liquoreux botrytisés. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 38(3), 181-190.

**Divol B. et Lonvaud-Funel A.** (2004) Survie de levures du vin au cours de l'élevage des vins liquoreux. Poster présenté au VI<sup>ème</sup> congrès de

la Société Française de Microbiologie (Bordeaux, mai 2004).

**Divol B. et Lonvaud-Funel A.** (2003) Essai d'utilisation du Velcorin<sup>®</sup> comme agent de mutage des vins liquoreux. In *Œnologie 2003*. Tec et Doc ed. pp 462-465.

**Divol B. et Lonvaud-Funel A.** (2003) Essai d'utilisation du Velcorin<sup>®</sup> comme agent de mutage des vins liquoreux. Poster présenté au VII<sup>ème</sup> symposium d'oenologie de Bordeaux (Arcachon, juin 2003).

**Divol B. et Lonvaud-Funel A.** (2003) Mise en évidence de levures viables non cultivables dans les vins liquoreux mutés au dioxyde de soufre. Poster présenté aux rencontres 2003 des microbiologistes de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) (Dourdan, mai 2003).

La fermentation alcoolique des vins liquoreux français issus de raisin botrytisés est arrêtée brutalement par ajout massif de dioxyde de soufre après qu'un certain équilibre est atteint entre la teneur en alcool formé et la concentration en sucres résiduels. Certaines souches de levures fermentaires survivent et parfois se multiplient provoquant une nouvelle fermentation alcoolique indésirable ; c'est la refermentation. Le suivi microbiologique de nombreux lots de vin a permis de montrer que des levures sont dans un état physiologique similaire à celui décrit chez les bactéries sous l'appellation de viable non cultivable. Cet état explique l'apparente stérilité du vin après le mutage. Au sein de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, une sélection naturelle se produit, ne laissant souvent la place qu'à une seule souche de refermentation, tolérante au dioxyde de soufre.

Une étude écologique a montré que seules certaines espèces fermentaires et oxydatives survivent. Les plus tolérantes au dioxyde de soufre forment de l'éthanal au cours de l'élevage, malgré un métabolisme ralenti, et augmente la combinaison du dioxyde de soufre libre. Cet éthanal vient progressivement combiner le dioxyde de soufre libre. La sortie de l'état viable non cultivable est probablement la clef des mécanismes engendrant les refermentations.

L'utilisation du diméthylcarbonate au moment du mutage a été étudiée en couplage avec le dioxyde de soufre.

Des souches de *Saccharomyces cerevisiae* de refermentation ont été isolées. Elles exhibent des singularités de séquence de leur ADNr, les apparentant aux souches de voile de certains vins spéciaux. Ces souches surexpriment constitutivement le gène *SSUI* et synthétisent rapidement une forte concentration d'éthanal en réponse à la présence de dioxyde de soufre.

La présence de fortes concentrations de dioxyde de soufre sélectionne les souches les plus résistantes. La refermentation est donc le résultat d'une adaptation génétique et d'une sélection, fruit d'une multitude de paramètres microbiologiques, physico-chimiques et humains.

---

*Botrytis*-affected wines microbiology during maturation. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains responsible for refermentation.

The alcoholic fermentation of *Botrytis*-affected wines is stopped by addition of sulphur dioxide. Some fermenting yeast species can survive during maturation and grow in spite of high ethanol, sugars and sulphur dioxide concentrations. An undesirable new fermentation, named "refermentation", can sometimes occur.

In this study, it was proved that some yeast species were able to survive in a viable but non-culturable-like state. This state explains the apparent sterility of wines during maturation. Within *Saccharomyces cerevisiae* species, an intraspecific selection was spontaneously operated. After some weeks, only one strain could often survive.

An ecological study was realized. Some highly fermentative and oxidative species could survive. In spite of slower metabolism, they synthesized acetaldehyde during maturation. The exit from the VBNC state and the high sulphur dioxide binding power were the keys of refermentations.

The use of dimethylcarbonate to stop alcoholic fermentation was studied. The most efficient action was observed for the mixed sulphur dioxide and DMDC addition.

Some *Saccharomyces cerevisiae* strains responsible for refermentations were isolated. These strains exhibited rDNA sequence singularities, showing that they were close to flor strains, responsible for velum formation in some special wines. Moreover, those strains constitutively over-expressed *SSUI* gene and could rapidly synthesize high concentrations of acetaldehyde in response to sulphur dioxide addition. High sulphur dioxide concentrations had probably selected the most resistant strains. Refermentation is the result of genetic adaptation and selection, under the influence of microbiological, physical, chemical and human parameters.

---

Mots-clefs : vins liquoreux, levures, refermentation, VNC, SO<sub>2</sub>, DMDC

---