

**N° Ordre : 2424**

**THESE**

présentée

pour obtenir

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

Ecole doctorale : **Sciences des Procédés**

Spécialité : **Génie des procédés et de l'environnement**

Par M. **Vincent RENOUF**

**DESCRIPTION ET CARACTERISATION DE LA DIVERSITE MICROBIENNE DURANT  
L'ELABORATION DU VIN : INTERACTIONS ET EQUILIBRES  
– RELATION AVEC LA QUALITE DU VIN.**

Soutenue le **Vendredi 8 décembre 2006** devant le jury composé de:

**M<sup>me</sup> Marie-Christine Montel** – Rapporteur - Directeur de Recherche INRA Clermont-Ferrand.

**M. Philippe Darriet** - Rapporteur - Maître de conférences Université Bordeaux 2.

**M<sup>me</sup> Danièle Sohier** – Examinateur - Responsable d'unité ADRIA Quimper.

**M. Claude Gaillardin** – Président du Jury - Professeur à l'INA-PG Chef du département MICA à l'INRA.

**M. Jean-Claude Berrouet** – Invité - Directeur technique des Vignobles Jean-Pierre Moueix.

**M<sup>me</sup> Aline Lonvaud-Funel** - Co-directeur de thèse - Professeur Université Bordeaux 2.

**M. Pierre Strehaiano** - Co-directeur de thèse - Professeur ENSIACET – INP Toulouse.

*« Comment définir ce que l'on veut infinir... »*

**Jean-Louis Aubert, 1997 .**

*Pour Maman et Papa, pour tout votre amour, votre soutien et votre stimulante fierté. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments et la reconnaissance que je vous porte.*

*Pour Julie, ma petite sœur, avec tout mon amour et pour toutes les chances que tu m'as confiées. Elles m'ont permis d'apprécier les opportunités qui m'étaient offertes et de surmonter les moments moins faciles de la vie.*

*A Nicolas, avec toute mon estime. Ta présence dans les bons et les mauvais moments et ceci depuis tellement d'années est une réelle définition de l'amitié.*

*Merci également à tous ceux qui ont, un jour ou l'autre, m'ont offert leurs amitiés et des moments inoubliables : Annie, Cathy, Céline, Christian, Elise, Jérôme, Patrice, Paul, et Stéphane(s).*

*Malgré tout, je n'oublierai jamais **ces cils** et ce regard qui ont guidé mon esprit vers un nouvel horizon, même si depuis tout est un peu plus flou...*

---

*Table des matières*

# **TABLE DES MATIERES.**

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>GLOSSAIRE ET ABREVIATIONS UTILISEES.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>15</b>
 <i>PARTIE I. L'ELABORATION DU VIN DE LA PARCELLE DE VIGNE A LA MISE EN</i>	
<i>BOUTEILLES. ....</i>	<i>17</i>
<b>I LA MATIERE PREMIERE : LE RAISIN.....</b>	<b>17</b>
I.1    Physiologie de la vigne et développement du raisin.....	18
I.2    Les pratiques viticoles.....	18
I.3    Les vendanges.....	20
<b>II LES VINIFICATIONS EN ROUGE.....</b>	<b>22</b>
II.1    Le foulage-égrappage.....	22
II.2    La Mise en cuve et le traitement des moûts.....	23
II.3    La fermentation alcoolique.....	25
II.4    La macération.....	26
II.5    L'écoulage.....	27
II.6    La fermentation malolactique.....	27
II.7    Le sulfitage post-fermentaire.....	29
<b>III L'ELEVAGE.....</b>	<b>32</b>
III.1    L'entonnage.....	32
III.2    Les soutirages.....	33
III.3    Le collage.....	33
III.4    La mise en bouteilles.....	34

*Table des matières*

<b>IV LES PRINCIPALES DIFFERENCES ENTRE LA VINIFICATION DES VINS ROUGES ET CELLE DES VINS BLANCS.....</b>	<b>35</b>
<b><i>PARTIE II. LES MICRO-ORGANISMES ŒNOLOGIQUES. ....</i></b>	<b>37</b>
<b>I LES LEVURES.....</b>	<b>37</b>
I.1 Les levures totales. ....	37
I.2 Les levures non- <i>Saccharomyces</i> . ....	37
<b>II LES BACTERIES.....</b>	<b>38</b>
II.1 Les bactéries à Gram positif.....	40
II.2 Les bactéries à Gram négatif. ....	42
<b>III LES ETATS PHYSIOLOGIQUES DES MICRO-ORGANISMES. ....</b>	<b>43</b>
<b>IV LES INTERACTIONS ENTRE LES MICRO-ORGANISMES.....</b>	<b>45</b>
IV.1 La nature des interactions.....	45
IV.2 Les moyens d'études des interactions. ....	46
<b>V LES ALTERATIONS MICROBIENNES. ....</b>	<b>48</b>
V.1 Les altérations physiques du vin. ....	48
V.2 Les altérations aromatiques du vin.....	49
V.3 Les altérations toxicologiques du vin.....	50
V.4 La problématique <i>Brettanomyces</i> .....	51
V.5 Les moyens de lutte contre les micro-organismes d'altération. ....	53
V.5.1 Les méthodes physiques.....	54
V.5.2 Les méthodes chimiques. ....	57
<b><i>PARTIE III. LES METHODES D'ETUDES EN ECOLOGIE MICROBIENNE. ....</i></b>	<b>60</b>
<b>I LES METHODES CULTURE-DEPENDANTES. ....</b>	<b>60</b>
<b>II LES METHODES CULTURE-INDEPENDANTES. ....</b>	<b>61</b>
II.1 Les apports de la biologie moléculaire.....	61
II.2 L'amplification des séquences d'intérêt.....	62
II.3 La résolution des complexes microbiens par la PCR-DGGE. ....	65
II.4 Utilisation de la PCR en temps en réel.....	72
II.4.1 L'analyse des courbes de fusion.....	74
II.4.2 L'utilisation des sondes <i>Taqman</i> ®.....	77

<b>III LA COMBINAISON DES TECHNIQUES POUR UNE VISION SYSTEMIQUE DE L'ÉCOLOGIE MICROBIENNE. ....</b>	<b>78</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>81</b>
<b><i>PARTIE I. LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES. ....</i></b>	<b>83</b>
<b>I LE MATERIEL BIOLOGIQUE. ....</b>	<b>83</b>
I.1    Les prélèvements des échantillons. ....	85
I.1.1    Les domaines d'expérimentations. ....	85
I.1.2    Les analyses du raisin. ....	88
I.1.3    Les analyses du moût et du vin. ....	89
<b>II LA CULTURE DES MICRO-ORGANISMES. ....</b>	<b>91</b>
II.1    Les milieux de cultures liquides. ....	91
II.2    Les milieux de culture solides. ....	91
II.3    La composition des milieux liquides d'enrichissement. ....	93
II.4    La composition des milieux liquides d'adaptation. ....	97
II.5    La composition des milieux utilisés pour les micro-vinifications. ....	98
II.6    La conservation des micro-organismes. ....	99
II.7    L'observation des cellules viables par épifluorescence. ....	99
II.7.1    L'observation de la microflore viable. ....	99
II.7.2    La distinction des levures viables et des levures vivantes. ....	100
<b>III LA CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DES MICRO-ORGANISMES.....</b>	<b>100</b>
III.1    La détermination des Concentrations Minimum d'Inhibition (CMI).....	101
III.1.1    Les CMI en milieu solide. ....	101
III.1.2    Les CMI en milieu liquide. ....	104
III.2    La résistance à l'inoculation directe. ....	105
III.3    L'évaluation des cinétiques de croissance. ....	106
III.4    La détermination de certaines propriétés métaboliques. ....	107
III.4.1    La production des phénols volatils. ....	107
III.4.2    La dégradation de l'acide-L-malique. ....	108
<b><i>PARTIE II. LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE. ....</i></b>	<b>109</b>
<b>I L'EXTRACTION DE L'ADN. ....</b>	<b>109</b>
I.1    L'extraction directe sur colonies. ....	111
I.2    L'extraction par le kit FTA (Whatman®). ....	111
I.3    L'extraction de l'ADN chromosomique des levures. ....	111

## Table des matières

I.4	L'extraction directe de l'ADN microbien - méthode Promega®.....	112
<b>II</b>	<b>L'ANALYSE DE L'ADN. ....</b>	<b>114</b>
II.1	Le dosage et la conservation des ADN extraits.....	114
II.2	La PCR classique. ....	114
II.3	La PCR en temps réel et l'analyse des courbes de fusion. ....	115
II.4	Les électrophorèses. ....	116
II.4.1	L'électrophorèse sur gel d'agarose. ....	116
II.4.2	L'électrophorèse sur gel d'acrylamide à gradient dénaturant (DGGE). ....	118
II.4.3	L'électrophorèse en champ pulsé (ECP). ....	119
II.4.4	La comparaison des profils des électrophorèses. ....	119
II.5	L'analyse des produits PCR. ....	120
II.5.1	La récupération des bandes d'ADN après l'électrophorèse. ....	120
II.5.2	La purification et le séquençage de l'ADN. ....	121
II.5.3	L'alignement et analyse bioinformatique des séquences d'ADN. ....	122
<b>III</b>	<b>L'IDENTIFICATION DES ESPECES. ....</b>	<b>123</b>
III.1	Les PCR spécifiques d'espèces. ....	123
III.2	L'identification des espèces dans un mélange. ....	124
<b>IV</b>	<b>L'IDENTIFICATION DES SOUCHES. ....</b>	<b>128</b>
IV.1	L'identification des souches d' <i>Oenococcus oeni</i> . ....	128
IV.2	L'identification des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	130
IV.3	L'identification des souches de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . ....	131
<b>PARTIE III. L'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES VINS. ....</b>	<b>133</b>	
<b>I</b>	<b>LES METHODES ENZYMATIQUES DE DOSAGE DES PRINCIPAUX COMPOSES DU VIN. ....</b>	<b>133</b>
<b>II</b>	<b>LE DOSAGE DU DIOXYDE DE SOUFRE.....</b>	<b>134</b>
<b>III</b>	<b>LE DOSAGE DES PHENOLS VOLATILS. ....</b>	<b>135</b>
<b>IV</b>	<b>LES MESURES DES PARAMETRES PHYSIQUES DU VIN.....</b>	<b>135</b>
IV.1	La mesure de la couleur des vins. ....	135
IV.2	La mesure de la turbidité des vins. ....	137
<b>PARTIE IV. LE TRAITEMENT MATHEMATIQUE DES DONNEES. ....</b>	<b>138</b>	

---

*Table des matières*

<b>I LE CALCUL DE LA POPULATION ACCUMULEE DURANT UN INTERVALLE DE TEMPS <math>\Delta T</math>.</b> .....	<b>138</b>
<b>II LA COMPARAISON STATISTIQUE DES DONNEES.</b> .....	<b>141</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>143</b>
<b><i>PARTIE I. LA FLORE MICROBIENNE SUR LE RAISIN.</i></b> .....	<b>145</b>
<b>I LA DIVERSITE MICROBIENNE A LA SURFACE DE LA BAIE DE RAISIN</b> .....	<b>145</b>
<b>II LES NIVEAUX DE POPULATIONS MICROBIENNES SUR LA BAIE DE RAISINS</b> ...	<b>155</b>
II.1    L'effet du stade de développement. ....	155
II.2    L'effet du cépage.....	162
II.3    L'effet des millésimes. ....	164
II.4    L'effet du terroir et la spécificité de la microflore indigène. ....	166
<b>III DISCUSSION : L'ETABLISSEMENT D'UN MODELE D'ORGANISATION DES MICRO-ORGANISMES.</b> .....	<b>170</b>
III.1    Les interactions à la surface de la baie de raisin. ....	170
III.2    L'équilibre du consortium microbien.....	173
<b>CONCLUSIONS.</b> .....	<b>177</b>
<b><i>PARTIE II. LES VAGUES MICROBIENNES DURANT LES VINIFICATIONS.</i></b> .....	<b>179</b>
<b>I LA MICROFLORE DU MOUT.</b> .....	<b>179</b>
<b>II LA FERMENTATION ALCOOLIQUE</b> .....	<b>181</b>
II.1    Les cinétiques microbiennes durant une fermentation alcoolique « classique »....	181
II.2    Les interactions entre les micro-organismes durant la fermentation alcoolique - Observations de cultures mixtes au laboratoire.....	186
II.2.1    Les co-cultures bactéries lactiques / <i>S. cerevisiae</i> .....	186
II.2.2    L'interaction <i>S. cerevisiae</i> – <i>B. bruxellensis</i> .....	188



## *Table des matières*

II.3	Les risques d'altération - La problématique <i>Brettanomyces</i> durant la FA.....	191
II.4	L'effet de la macération initiale à froid et de l'utilisation de levain. ....	193
II.5	L'effet du contenant. ....	200
II.6	Les fermentations alcooliques languissantes.....	201
<b>III LA COMPARAISON AVEC LES VINIFICATIONS EN BLANCS. ....</b>		<b>205</b>
<b>IV LA MICROFLORE DU VIN ENTRE LES DEUX FERMENTATIONS. ....</b>		<b>207</b>
IV.1	L'effet de la macération et de l'écouage. ....	207
IV.2	Les différences entre le vin de goutte et les vins de presse.....	208
<b>V LA FERMENTATION MALOLACTIQUE. ....</b>		<b>209</b>
V.1	L'évolution de la microflore durant la fermentation malolactique. ....	209
V.2	L'interaction entre <i>O. oeni</i> et <i>B. bruxellensis</i> .....	213
V.3	Les essais de levains malolactiques. ....	226
V.4	L'inoculation après un traitement thermique. ....	229
V.5	L'effet du contenant sur la MLF. ....	232
V.6	La diversité intraspécifique de l'espèce <i>O. oeni</i> durant les fermentations.....	235
<b>CONCLUSIONS. ....</b>		<b>245</b>
 <b>PARTIE III. L'ELEVAGE ET LA STABILISATION MICROBIOLOGIQUE DU VIN. ....</b>		<b>249</b>
<b>I LA FIN DES FERMENTATIONS : ACTION DU SULFITAGE POST-FERMENTAIRE.</b> .....		<b>249</b>
<b>II LES EFFETS DES PRATIQUES GENOTECHNIQUES DURANT L'ELEVAGE. ....</b>		<b>252</b>
II.1	L'entonnage.....	252
II.2	Les soutirages.....	254
II.3	L'effet du collage au blanc d'œuf. ....	259
II.4	La filtration sur terre des lies.....	263
II.5	Les essais de flash-pasteurisation.....	264
II.6	Les essais de stabilisation au DMDC.....	267
II.6.1	La détermination de la CMI du DMDC en milieu liquide. ....	267
II.6.2	L'utilisation du DMDC dans le moût avant la fermentation alcoolique.....	269
II.6.3	L'utilisation du DMDC dans le vin après la FA et avant la FML.....	273
II.6.4	L'utilisation du DMDC dans le vin après les fermentations.....	274
<b>CONCLUSIONS. ....</b>		<b>277</b>

*Table des matières*

***PARTIE IV. LA MICROFLORE DANS LE CHAI. .... 279***

***I LA FLORE MICROBIENNE DU MATERIEL VINICOLE. .... 279***

- I.1 L'inventaire des espèces microbiennes détectées à la surface des cuves..... 279
- I.2 Les populations microbiennes à la surface du bois des barriques..... 280
  - I.2.1 Le dénombrement des populations microbiennes à la surface du bois des barriques..... 282
  - I.2.2 L'inventaire des espèces microbiennes détectées à la surface des barriques. .... 283
  - I.2.3 Les essais de contamination du vin par les micro-organismes du bois des barriques..... 288

***II LA MICROFLORE DU VIN EN BOUTEILLES. .... 293***

- II.1 L'évolution de la microflore durant les premiers mois qui suivent la mise en bouteilles ..... 293
- II.2 L'inventaire des micro-organismes dans les vieux millésimes..... 295
- II.3 Impact a posteriori de la filtration pratiquée au moment de l'embouteillage. .... 298
- II.4 La comparaison des espèces et des souches dans les chais et les bouteilles de chaque domaine révèle une composante microbiologique du terroir. .... 302\*

***CONCLUSIONS. .... 307***

***PARTIE V. CARACTERISATION TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DE DEUX***

***GROUPES D'O. OENI. .... 311***

***I ETUDE PAR PCR-DGGE DE SOUCHES D'O. OENI ISOLEES PENDANT LA VINIFICATION. .... 311***

***II LES ETUDES PHYSIOLOGIQUES DES DEUX GROUPES D'O. OENI..... 316***

- II.1 Les mesures de CMI vis-à-vis de composés inhibiteurs. .... 316
- II.2 La résistance aux fortes concentrations en sucres..... 322
- II.3 La tolérance aux pH acides. .... 323
- II.4 La résistance à l'éthanol..... 324
- II.5 La résistance au dioxyde de soufre. .... 326

***III ETUDES GENETIQUES DES DEUX GROUPES D'O. OENI. .... 327***

- III.1 Description taxonomique des souches des deux groupes..... 327
- III.2 Analyse de la présence de marqueurs génétiques chez les souches des deux groupes. 330
- III.3 Analyse MLST des deux groupes. .... 331

---

*Table des matières*

<b>CONCLUSIONS. ....</b>	<b>341</b>
<b><i>PARTIE VI. BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS ET LES PHENOLS VOLATILS. ....</i></b>	<b>344</b>
<b>I ETUDE DE LA PRODUCTION DES PHENOLS VOLATILS.....</b>	<b>344</b>
I.1    La production de phénols volatils durant les fermentations au chai. ....	344
I.2    La production de phénols volatils durant l'élevage au chai. ....	347
I.3    La production de phénols volatils dans la bouteille. ....	350
<b>II PRODUCTION DES PHENOLS VOLATILS EN CONDITION DE LABORATOIRE..</b>	<b>351</b>
II.1    La production des phénols volatils par différentes espèces microbiennes.....	351
II.2    Les différences entre les souches de <i>B. bruxellensis</i> .....	358
<b>CONCLUSIONS. ....</b>	<b>364</b>
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>368</b>
<b>RÉERENCES BIBLIOGRAPHIQUES. ....</b>	<b>375</b>
<b>ARTICLES ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>404</b>
<b><i>I ARTICLES</i> .....</b>	<b>406</b>
I.1    Reuves scientifiques à comité de lecture.....	406
I.2    Reuves professionnelles. ....	408
<b><i>II COMMUNICATIONS AFFICHEES</i> .....</b>	<b>408</b>
<b><i>III COMMUNICATIONS ORALES</i> .....</b>	<b>410</b>

# **REMERCIEMENTS.**

---

*Remerciements*

---

### *Remerciements*

Je remercie Madame Marie Christine Montel, Directeur de Recherche, et Messieurs les Professeurs Philippe Darriet et Claude Gaillardin d'avoir accepté la charge de juger ce travail.

Je remercie vivement Madame Danièle Sohier de s'être intéressée à mes travaux. Sa disponibilité, son attention, ses conseils et ses encouragements pour la suite de mes activités m'ont été très précieux. Je lui exprime toute ma reconnaissance.

J'exprime ma respectueuse gratitude à Monsieur Jean-Claude Berrouet. Il s'est toujours intéressé à mes travaux qu'il a considérablement favorisés. Je le remercie de sa participation à ce jury.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame le Professeur Aline Lonvaud-Funel pour l'opportunité qu'elle m'a offerte et la confiance qu'elle m'a démontrée durant les années passées au sein de son laboratoire, ainsi que pour son soutien moral et sa disponibilité. Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de ma respectueuse gratitude et de ma sincère amitié.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Professeur Pierre Strehaiano d'avoir accepté d'encadrer cette thèse et de permettre ainsi sa réalisation.

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien du « Club des Huit » composé des huit plus prestigieux châteaux des différentes appellations du Bordelais : Château Ausone, Château Cheval-Blanc, Château Haut-Brion, Château Lafite-Rothschild, Château Latour, Château Margaux, Château Mouton-Rothschild et Château Petrus. J'exprime tout mon respect et mes infinis remerciements pour leur accompagnement et leur soutien durant ces années à leur propriétaire et à leur directeur technique, Messieurs Alain Vauthier, Philippe Baillarguet, Pierre Lurton, Kees Van Leeuwen, Olivier Berrouet, Jean-Philippe Delmas, Jean-Philippe Masclef, Charles Chevalier, Christophe Congé, Frédéric Ardouin, Paul Pontallier, Philippe Bascaules, Philippe Dalhuin, Eric Tourbier, Jean-Claude Berrouet, François Veyssièrre et Virginie Roux.

J'exprime plus particulièrement mes remerciements à Jean-Philippe Masclef, Vincent Millet et Alain Vauthier pour m'avoir grand ouvert les portes de leurs chais. Leur intérêt

---

### *Remerciements*

continu et assidu à mes travaux a été très motivant. Je les remercie du temps passé à m'enseigner un peu de leur savoir œnologique et de m'avoir fait déguster leurs meilleurs crus.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur Kees Van Leeuwen pour son intérêt pour mon travail et ses conseils personnels, professionnels et sportifs ainsi que pour l'opportunité offerte de poursuivre mes activités dans un domaine qui me passionne : le domaine viticole.

Je remercie infiniment Madame Cécile Miot-Sertier, Messieurs Olivier Claisse et Emmanuel Gindreau pour leur participation à ce travail. Leurs conseils scientifiques avisés et leur savoir-faire m'ont considérablement aidé. Leur soutien a accompagné l'ensemble de ce travail. Je leur suis infiniment reconnaissant.

Je remercie également Madame Marie-Claire Perello pour son aide technique et Monsieur Gilles de Revel de m'avoir accueilli dans son laboratoire et permis ainsi le dosage des phénols volatils nécessaires à ce travail.

Enfin, je n'oublierai pas les bons moments passés au laboratoire en compagnie d'Arnaud, Joana, Joaquin, Lorely, Lou et Marion.

# **GLOSSAIRE ET ABREVIATIONS UTILISEES.**



---

*Glossaire et abréviations utilisées*

---

## Glossaire et abréviations utilisées

**A** *Acetobacter aceti* *A. aceti*

ADN acide désoxyribonucléique

AGN (bactéries) aérobies et à Gram négatif

ANGN (bactéries) anaérobies et anaérobies facultatives et à Gram négatif

ANGP (bactéries) anaérobies et anaérobies facultatives et à Gram positif

ARN acide ribonucléique

ATP adénosine triphosphate

**B**A bactéries acétiques

*Brettanomyces bruxellensis* *B. bruxellensis*

BET bromure d'éthyldium

BL bactéries lactiques

BT bactéries totales

**C**l centilitre

CMI concentration minimale d'inhibition

°C degré celcius

ϕ cellule DC densité colorante

**D**GGGE *denaturing gradient gel electrophoresis* (électrophorèse en gradient dénaturant)

DMDC diméthylcarbonate

dNTP désoxyribonucléotide 5'-triphosphate

DO densité optique

**E**BB Enrichissement de *Brettanomyces bruxellensis*

EBL Enrichissement des bactéries lactiques

EDTA éthylène diamine tétra-acétate

**F**A fermentation alcoolique

FML fermentation malolactique

**G** accélération de la pesanteur

*Gluconobacter oxydans* *G. oxydans*

**H** heure

**I**C intensité colorante

IOEB institut d'œnologie de Bordeaux

IPT indice des polyphénols totaux

ITS *intergenic transcribed spacer* (espace transcrit intergénique)

**L**P *length polymorphism* (polymorphisme de longueur)

LT levures totales

**M** 1 mol par litre

MIF macération initiale à froid

min minutes

mL millilitre

MLST *multilocus sequence typing* (différenciation de séquences de plusieurs loci)

MRS *Man Rogosa Sharpe*

**N**S (levures) non-*Saccharomyces*

NTU unité de turbidité néphélométrique

*Oenococcus oeni* *O. oeni*

## Glossaire et abréviations utilisées

- P<sub>b</sub>** paires de bases  
PCR *polymerase chain reaction* (réaction de polymérisation en chaîne)  
*Pediococcus damnosus* *P. damnosus*  
*Pediococcus parvulus* *P. parvulus*  
PFGE *pulsed field gel electrophoresis* (électrophorèse en champs pulsé)  
pH potentiel hydrogène  
PPI pour préparation injectable  
p/v poids par volume  
PVP polyvinylpyrrolidine
- Q<sub>sp</sub>** quantité suffisante pour
- RAPD** *random amplified polymorphic DNA* (Polymorphisme de l'ADN amplifié aléatoirement)  
REA *restriction endonucleases analysis* (analyse des restrictions endonucléasiques)  
RFLP *restriction fragment length polymorphism* (polymorphisme de la longueur des fragments de restriction)  
RNase ribonucléase  
rpm révolution par minute  
*rpoB* sous-unité Bêta de l'ARN polymérase
- Saccharomyces cerevisiae** *S. cerevisiae*  
SDS dodécyl sulfate de sodium
- T** teinte  
TAE tampon tris-acétate-EDTA  
TAV titre alcoométrique volumique  
TBE tampon tris-acide borique- EDTA  
TE tampon tris-EDTA  
TGGE *temperature gradient gel electrophoresis* (électrophorèse en gel à gradient dénaturant)  
T<sub>m</sub> température de fusion  
Tris trihydroxyméthylaminométhane  
Tween polyoxyéthylène-sorbitane-monooléate
- UDO** unité de densité optique  
UFC unité formant des colonies  
UPGMA *unweighted pair group method with arithmetic averaging* (méthode de regroupement par paire et par estimation des liens moyens)  
UV ultraviolet
- V<sub>NC</sub>** viable non cultivable  
v/v volume par volume
- YPG** *yeast extract peptone glucose* (extrait de levure - peptone - glucose)

# **INTRODUCTION.**

*« ...trop souvent,  
il n'y a que le commencement qui soit enivrant...»  
Damien Saez, 2001.*

---

*Introduction*

## **INTRODUCTION.**

La transformation du jus de raisin en vin est un processus rigoureusement microbiologique. Les levures, principalement l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) transforment les sucres en éthanol et dioxyde de carbone durant la fermentation alcoolique (FA). Puis dans les vins rouges et dans certains vins blancs secs de garde et / ou très acides, les bactéries lactiques, principalement l'espèce *Oenococcus oeni* (*O. oeni*), dégradent l'acide-L-malique en acide-L-lactique, avec un dégagement de CO<sub>2</sub>, durant la fermentation malolactique (FML). Ces métabolismes microbiens déterminent les caractéristiques physico-chimiques du vin (teneur en alcool, pH, intensité colorante...) et concourent à la formation de métabolites (glycérol, acides gras, esters, composés d'arômes variés...) qui participent à la structure du vin et révèlent les potentialités aromatiques du raisin. Afin d'exploiter au mieux les innombrables capacités des micro-organismes, le vinificateur doit donc veiller au bon déroulement des fermentations.

Mais la contribution microbienne ne se résume pas uniquement à l'intervention de la levure *S. cerevisiae* et de la bactérie *O. oeni*. En effet, la diversité microbienne œnologique est très importante. Les qualités du vin intègrent l'ensemble des développements microbiens qui se succèdent depuis les vendanges jusqu'à la dégustation. Certains sont recommandés, mais d'autres, au contraire, doivent être évités, car ils altèrent significativement les caractéristiques organoleptiques du produit. Pour favoriser les espèces d'intérêt et contrôler les espèces néfastes, les études microbiologiques pour la connaissance du comportement des unes et des autres sont nécessaires.

Depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle et les premières observations de Pasteur, les microbiologistes se sont efforcés de développer des méthodes d'analyses de plus en plus fines afin d'étudier et d'améliorer la compréhension de ces phénomènes. Les premières analyses impliquaient l'utilisation d'une étape de culture. Elles étaient longues et laborieuses. Les résultats obtenus ne renvoyaient qu'une vision simplifiée de l'écosystème. Seuls les phénomènes majoritaires étaient perçus.

Récemment, le développement de la biologie moléculaire a offert de nouvelles techniques d'identification des micro-organismes et de résolution des complexes microbiens

---

## *Introduction*

en éludant l'étape de culture. Les analyses sont basées sur les critères sensibles et spécifiques que sont les séquences nucléotidiques. Ces techniques sont de remarquables outils. Leur utilisation en œnologie est une opportunité qui devrait permettre de repositionner l'écosystème œnologique dans une approche systémique et dynamique. L'amélioration de la description taxonomique et fonctionnelle des dynamiques microbiennes prises dans leur globalité devrait servir de fondement à des thématiques de recherches plus fondamentales qui pourraient constituer les véritables challenges de l'œnologie moderne.

Le principal objectif de ce travail est de réaliser une étude de l'ensemble des populations microbiennes depuis la baie de raisin, au début de son développement, jusqu'à la dégustation du vin, plusieurs années après son conditionnement. Ces expérimentations ont été réalisées dans plusieurs propriétés réparties sur l'ensemble du vignoble bordelais : Pomerol, Saint-Emilion, Pessac-Léognan, Margaux et Pauillac. Les principaux cépages rouges : Merlot, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon et Petit-Verdot, et blancs : Sémillon et Sauvignon, du vignoble bordelais, ont été étudiés. Différentes pratiques vinicoles et œnotechniques ont été prises en compte. Ces travaux ont alterné les suivis à l'échelle du chai et les manipulations au laboratoire. Ils ont nécessité l'utilisation et l'amélioration de méthodes classiques de microbiologie: observation, isolement et numération des différentes populations microbiennes sur des milieux de culture sélectifs. Des méthodes de biologie moléculaire ont du être adaptées et maîtrisées pour réaliser les inventaires des espèces et des souches de levures et de bactéries les plus exhaustifs possibles. Enfin, l'évaluation des interactions entre les différentes espèces microbiennes au long de l'élaboration du vin et en fonction des pratiques œnotechniques mises en œuvre a fait l'objet d'une attention particulière.

Pour la présentation de ces travaux, l'ordre chronologique de la vinification a été retenu. Il permet d'illustrer l'évolution de l'écosystème microbien tout le long de l'élaboration du vin et de souligner les étapes décisives.

La flore microbienne à la surface de la baie de raisin au cours de son développement est présentée dans la première partie. Des inventaires exhaustifs des différentes espèces de levures et de bactéries présentes à la surface de la baie sont proposés. La mise en évidence des espèces minoritaires sur la baie de raisins, mais qui sont susceptibles d'influencer ultérieurement les vinifications, fait l'objet d'études approfondies. Les données quantitatives accumulées lors de l'étude de différents terroirs, cépages et de différentes pratiques vinicoles

---

## Introduction

mettent en évidence l'effet significatif de certains de ces paramètres. La comparaison avec des travaux réalisés sur d'autres fruits permet l'élaboration d'un modèle d'organisation des micro-organismes à la surface de la baie. La question de l'influence de la microflore indigène du raisin sur la vinification à venir est posée.

La seconde partie du travail décrit les développements microbiens observés lors des vinifications. Différentes conduites de fermentations sont étudiées. Les phénomènes constatés à l'échelle du chai sont confirmés par des expériences au laboratoire (micro-vinification, expériences de co-cultures). L'accent est mis sur les cinétiques fermentaires et les interactions entre les différentes espèces de levures lors de la fermentation alcoolique, puis entre les bactéries lactiques et les levures résiduelles lors de la fermentation malolactique.

La troisième partie porte sur le devenir des micro-organismes au cours de l'élevage du vin. Les différentes pratiques œnotechniques font l'objet d'études ciblées et répétées sur les différents domaines durant plusieurs millésimes. Les espèces et les souches microbiennes détectées sur chacun des domaines et dans des millésimes anciens sont comparées. Ces résultats soulèvent l'hypothèse innovante de l'existence d'une composante microbienne du terroir des vins.

Ces études intègrent également l'analyse de la microflore du matériel du chai et de son entretien. Ces thèmes convergent vers la problématique de la stabilisation microbiologique du vin dès la fin des fermentations, pendant l'élevage au chai et plus encore avant le conditionnement du vin et son vieillissement.

La survie de certaines espèces de levures et de bactéries durant le vieillissement des vins en bouteilles, qui représente la plus longue partie de la vie d'un vin rouge de garde est évoquée. L'impact microbiologique des pratiques qui précèdent la mise en bouteilles est évalué sur des vins vieux. L'utilisation d'agents antimicrobiens est proposée pour éliminer la microflore d'altération lors des cas les plus difficiles.

Le suivi des bactéries au cours de l'élaboration du vin a été réalisé en développant une méthode de PCR-DGGE ciblant une région du gène codant pour la sous unité Bêta de l'ARN polymérase, *rpoB*. Contre toute attente, ces analyses ont mis en évidence deux groupes d'*O. oeni* qui coexistent au cours de l'élaboration du vin. L'un est majoritaire durant les



---

### *Introduction*

fermentations tandis que l'autre domine pendant l'élevage. Des tests phénotypiques, et génétiques ainsi que des travaux de caractérisation taxonomique ont été réalisés pour approfondir cette particularité et tenter de corrélérer la mutation du gène *rpoB* avec d'autres particularités des souches de chacun des deux groupes. Ces travaux révèlent l'importance de la diversité intraspécifique chez *O. oeni*.

Parmi les altérations microbiennes possibles, l'accent est mis sur la levure d'altération *B. bruxellensis* responsable de défauts aromatiques. Les observations de terrain et les essais de laboratoire permettent de critiquer la pertinence de certains concepts établis lors d'études antérieures. L'objectif est de recadrer la problématique *Brettanomyces* dans une approche systémique qui intègre les possibles interactions avec les autres micro-organismes œnologiques, les paramètres intrinsèques du raisin et ceux qui résultent de pratiques œnotechniques particulières. Ces travaux ont pour ambition d'orienter les futures expérimentations de caractérisation moléculaire du phénomène qui seront nécessaires pour enfin appréhender cette problématique concrète qui préoccupe les vinificateurs.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.**

*«...définir les possibles  
pour se prendre à défier l'impossible... »*  
**Damien Saez, 2003.**



## **PARTIE I. L'ÉLABORATION DU VIN DE LA PARCELLE DE VIGNE A LA MISE EN BOUTEILLES.**

L'élaboration du vin débute au vignoble avec la plantation puis culture de la vigne. Elle apporte la matière première : le raisin et le jus qu'il contient. Mais comme toute composante de la biosphère, la baie de raisin est naturellement recouverte d'une flore microbienne indigène considérablement diversifiée. L'ambition d'une étude globale de l'écologie microbienne œnologique nécessite de débiter les observations et les analyses dès le vignoble.

### **I La matière première : le raisin.**

La botanique classe les vignes dans la famille des vitacées. Toutes les vignes cultivées, ou sauvages, appartiennent au genre *Vitis*. En Europe, le réarrangement des territoires ruraux et les épidémies de mildiou ou du phylloxéra ont provoqué la disparition des vignes sauvages. Les vignes cultivées sont issues d'une unique espèce : *Vitis vinifera*, au sein de laquelle il existe différents cépages. Un cépage est une variété de vigne qui produit soit du raisin de table (Italia, Chasselas...) soit du raisin de cuve (Merlot, Chardonnay...). L'identification des cépages est basée sur l'observation des caractères morphologiques comme la couleur des baies et la forme des feuilles. Cette étude s'appelle l'ampélogie.

Dans la région bordelaise, les principaux cépages de raisins rouges sont le Merlot, le Cabernet-Franc, le Cabernet-Sauvignon et le Petit-Verdot, et les principaux cépages de raisins blancs sont le Semillon et le Sauvignon. Bien que la notion de vin de cépage jouisse d'une faveur de plus en plus notable, principalement liée à l'essor des vins étrangers, les vinificateurs bordelais privilégient l'assemblage et la complémentarité des cépages. En rouge, l'assemblage classique allie le Merlot et le Cabernet-Sauvignon. Le premier est plus précoce, plus abondant en jus et confère la souplesse au vin, tandis que le second est généralement plus tardif et moins généreux en terme de rendement. Il procure les tanins et les potentialités de garde au vin. Pour les vins blancs, le Sauvignon apporte les principales notes aromatiques, tandis que le Sémillon fournit le gras et le charnu.

## **I.1 Physiologie de la vigne et développement du raisin.**

Le développement des baies commence à la pollinisation et se poursuit jusqu'à l'état de maturité. Il se traduit par une croissance en volume des baies s'accompagnant d'une évolution de la composition chimique du raisin (sucres, acides et composés phénoliques) et de modifications des propriétés physiques de la baie. La variation de la teneur en composés phénoliques provoque le changement de la couleur et les modifications des structures pariétales des cellules, le ramollissement de la baie (Coombe 1992). On distingue deux périodes lors du développement du raisin. Tout d'abord, pendant la période herbacée, la baie est verte et dure. Il s'agit d'un organe chlorophyllien en croissance qui accumule de l'acidité (acide tartrique et acide malique). Cette période s'étend de la nouaison à la véraison. Puis durant, la période de maturation, la baie se ramollit et se colore, elle devient un organe de stockage. L'acidité diminue et les sucres (glucose et fructose) s'accumulent, ainsi que les composés phénoliques. Cette période s'étend de la véraison aux vendanges.

La baie de raisin est composée par la pellicule, la pulpe et les pépins. La pellicule comprend plusieurs enveloppes formées de cellules aplaties. A maturité, elle est recouverte par la pruine, ou fleur qui présente l'aspect d'une fine poussière cireuse adhérente. La pulpe constitue la partie la plus importante de la grappe. Elle représente 85 à 90% du poids du raisin. C'est la partie gonflée de la baie, située à l'intérieur de la pellicule et autour des pépins. Elle est constituée de grandes cellules lâches, formant un tissu fragile et peu résistant qui se déchire facilement à l'écrasement. Il en sort alors le liquide, appelé moût, dont la fermentation va donner le vin. Les pépins occupent la région centrale et sont noyés dans la pulpe. Ils contiennent surtout des tanins, des matières grasses sous forme d'acides gras ou à l'état de phospholipides.

## **I.2 Les pratiques viticoles.**

Au vignoble, il faut favoriser la production de raisins en quantité et en qualité satisfaisantes et donc éviter le développement des maladies et des pourritures. Cela nécessite un entretien continu. La plupart des maladies du raisin sont causées par des moisissures particulièrement actives dans un environnement chaud et humide. Elles sont la cible des traitements phytosanitaires.

## *Etude bibliographique*

Les traitements phytosanitaires possèdent des composés très actifs. Parmi ces composés, ceux dirigés contre les pourritures doivent aussi agir, dans une certaine mesure, sur les levures qui sont assez proches d'un point de vue physiologique des moisissures ciblées (Griffiths et *al.* 1998, Ochiai et *al.* 2002). Certains auteurs considèrent même que l'utilisation récurrente de certains produits participe à la sélection de la flore microbienne indigène susceptible d'intervenir au début de la vinification (Calhelha et *al.* 2006).

L'incidence des traitements phytosanitaires est étudiée durant ce travail. Néanmoins, du fait de l'importante quantité de produits proposés aux chefs de culture et de la diversité des pratiques viticoles, l'étude s'est concentrée uniquement sur les produits les plus communément employés et dont l'on soupçonnait l'innocuité sur les micro-organismes (Tableau I).

**Tableau I.** Liste des principaux produits phytosanitaires appliqués sur les parcelles étudiées.

<b>Composés</b>	<b>Quadris max®</b>	<b>Mikal flash®</b>	<b>HéliosoufreS®</b>	<b>Bouillie Bordelaise RSR disperss®</b>
<b>Stade de l'application</b>	Fermeture de grappe	Fermeture de grappe	Nouaison	Mi-véraison
<b>Cible(s)</b>	Mildiou, oïdium, rougeot, excoriose, pourriture crise	Mildiou, oïdium, pourriture crise	Erinose, Acariose, oïdium	Mildiou
<b>Composés majoritaires</b>	Folpel, Azoxystrobine	Folpel, Foséthyl aluminium	Soufre, Dérivés terpéniques	Sulfate de cuivre, Chaux
<b>Dose de produit appliquée</b>	2 L/ha	5 L/ha	8 L/ha	7,5 g/L
<b>Equivalent en composé actif</b>	Folpel 1 Kg/L	Folpel 1,5 Kg/L	Soufre 5,6 Kg/L	Cuivre métal 1,5 Kg/L

La plupart des produits phytosanitaires ont un réel impact sur l'environnement et sur la santé des manipulateurs, mais aussi sur celle des consommateurs lorsque des traces de ces composés persistent dans le produit fini. Pour limiter leur utilisation, des alternatives doivent être trouvées. Des travaux rapportent l'inhibition des moisissures par l'action antagoniste de bactéries (Krechel et *al.* 2002) et de levures (Janisiewicz et *al.* 1998). Ces dernières pourraient être utilisées pour contrôler l'apparition des moisissures à la surface des pommes (Vero et *al.* 2002), des tomates (Schena et *al.* 1999) mais aussi des raisins de table (Droby et *al.* 1999).

Leur utilisation en viticulture n'a pas encore été évaluée. Néanmoins cela laisse supposer que des interactions entre les différents occupants de la baie existent.

Les viticulteurs de l'hémisphère sud utilisent, sur les baies de raisins, les propriétés insecticides de certaines bactéries (*Bacillus thuringiensis*) (Glare et O'Callaghan 2000). Cette pratique peut influencer l'écosystème microbien de la baie car, outre la limitation de l'apport des micro-organismes véhiculés par les insectes (Lahance et *al.* 1999), ces bactéries interagissent directement avec les levures et les bactéries indigènes (Bae et *al.* 2004).

Les travaux de la vigne débutent l'hiver afin d'organiser l'orientation des rameaux et le nombre de bourgeons susceptibles de produire les raisins de la prochaine récolte. Après la floraison, certaines pratiques viticoles pourraient affecter la flore microbienne au vignoble. Par exemple, l'éclaircissage qui contribue à diminuer le nombre de grappes portées par le pied pourrait réduire la surface disponible à l'adhésion des micro-organismes. L'effeuillage favorise l'ensoleillement des baies et donc l'exposition aux UV des micro-organismes qui y adhèrent en surface. Enfin, le griffage du sol, pratiqué essentiellement sur les parcelles à sols légers (sables...), peut mettre en suspension dans l'air des particules du sol, y compris d'éventuelles cellules microbiennes, qui peuvent alors se déposer sur les baies.

### **I.3 Les vendanges.**

La détermination de la date des vendanges est un choix décisif. Il conditionne le déroulement des vinifications à venir et la qualité du produit fini. Dans toutes les grandes régions viticoles, il existe une organisation collective qui suit l'évolution de la maturation du raisin. Les mesures effectuées concernent le sucre et l'acidité totale. Elles permettent de ne pas récolter prématurément des raisins qui peuvent encore gagner du sucre et perdre de l'acidité. Normalement, tant que le cycle végétatif n'est pas terminé, le sucre augmente de façon régulière et l'acidité diminue, mais parfois avec des variations d'intensité ou des stagnations liées à des circonstances climatiques atypiques.

L'obtention d'un bon vin suppose la vendange de raisins parfaitement mûrs. Cette maturité est étroitement corrélée aux conditions climatiques. Dans nos régions tempérées,

elles sont très variables d'une année à l'autre et participent intégralement à la notion de millésime.

La constitution du raisin au moment de sa récolte conditionne en partie les développements microbiologiques durant les vinifications. Par exemple, une carence en azote provoque des difficultés fermentaires. Une maturation excessive et une concentration en sucres élevée conduisent à de forts degrés alcooliques et des fins de fermentations problématiques.

Par ailleurs, certaines pratiques viticoles peuvent également influencer les qualités biochimiques du raisin. Par exemple, l'emploi excessif de certains engrais entraîne une augmentation du pH (Cadet et Garcia 2003). Paramètre fondamental du vin d'un point de vue sensoriel, le pH influence de façon très significative les développements microbiens. Cette augmentation du pH s'explique par la capacité d'absorption, de transit et de stockage du potassium par les pieds de vigne. Plus la solution nutritive est riche en cet élément, plus il est absorbé et moins les raisins, les moûts et les vins sont acides (Garcia et al. 2001). Les pH des vins produits dans la région bordelaise ont fait l'objet d'une constante augmentation, pour passer de valeurs généralement comprises entre 3,0 et 3,2 au début du siècle dernier aux valeurs actuelles comprises entre 3,6 et 3,8, voire même supérieures ces dernières années. Ce phénomène s'explique bien entendu par la généralisation de la fermentation malolactique durant la seconde moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, mais aussi et surtout, par l'accumulation d'engrais potassiques et azotés (Maigre et al. 1995, Spring 2003) dans les sols et les changements climatiques subis ces dernières années. L'enherbement associé à une fertilisation raisonnée, notamment des apports restreints de fumure potassique, est un moyen de contenir le pH du jus des raisins (Sicher et al. 1991, Spring 2002) produits sur les parcelles d'argiles notamment (Wheeler et Pickering 2003).

Enfin, le risque de pourriture est un autre paramètre à prendre en compte pour fixer la date de vendanges car ses conséquences sont toujours préjudiciables sur la qualité de raisins rouges. Le développement de la pourriture consomme le sucre et les vitamines du raisin. Il s'accompagne d'une production d'acidité volatile et d'acide gluconique (acidité totale) et d'une dégradation des composés phénoliques et aromatiques.



## **II Les vinifications en rouge.**

L'œnologie est l'une des plus anciennes biotechnologies. C'est-à-dire l'utilisation de cellules vivantes (les levures et les bactéries) pour la transformation d'une production agricole (le raisin) en produit fini (le vin), intervenant dans l'alimentation des hommes. Par définition, le vin est « le produit obtenu exclusivement par la fermentation alcoolique, totale ou partielle, de raisins frais, foulés ou non, ou de moûts de raisin » (Ribereau-Gayon 1991). Mais en fonction de la nature et de l'origine du raisin et des techniques de vinification, les produits sont très différents.

A l'arrivée de la vendange au cuvier, on procède généralement à une détermination de la richesse en sucres (mesure de la densité ou de l'indice de réfraction) et de l'acidité. Ce premier contrôle permet une appréciation de la qualité des raisins vendangés. Il est nécessaire pour adapter les modalités de la vinification.

### **II.1 Le foulage-égrappage.**

L'égrappage et le foulage sont les deux premières opérations de la vinification. Dans l'ordre chronologique, l'égrappage (ou éraflage), séparation du raisin de la rafle constitue la phase initiale. Il ne revêt pas un caractère obligatoire, mais il améliore nettement la qualité du vin. En revanche, le foulage est l'étape indispensable d'écrasement de la pellicule et de la chair qui fournit le moût.

A la sortie de la pompe à vendange, la première addition de SO<sub>2</sub> est couramment pratiquée. La dose ajoutée varie généralement entre 3 et 8 g/hL de moût. Elle dépend principalement de l'état sanitaire de la vendange, de la température et de l'acidité du moût. L'intérêt du sulfitage de la vendange repose sur les actions anti-oxydantes, anti-oxydasiques et dissolvantes du SO<sub>2</sub> (Tableau II). Il permet de préserver et entretenir la couleur du moût fraîchement extrait. Le SO<sub>2</sub> possède également une activité antimicrobienne. Néanmoins, l'efficacité de cette activité dans le moût à la sortie du fouloir peut-être mise en doute car les activités chimiques et biochimiques précédemment évoquées réduisent la disponibilité du SO<sub>2</sub> vis-à-vis des cellules microbiennes. En outre, les quantités utilisées à ce stade sont nettement inférieures aux quantités nécessaires à l'action antiseptique du SO<sub>2</sub>.

**Tableau II.** Principales actions physicochimiques du SO<sub>2</sub> ajouté dans le moût à la sortie du fouloir.

<b>Actions du SO<sub>2</sub></b>	<b>Principe</b>
<b>Actions anti-oxydantes du SO<sub>2</sub></b>	Le SO <sub>2</sub> piège l'oxygène dissous : $SO_2 \rightarrow H_2SO_3 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2SO_4$ , et, diminue l'oxydation des composés hydroxylés et carbonylés du moût, ce qui préserve la couleur et les arômes fruités. La production d'acide sulfurique induit une légère baisse du pH.
<b>Actions anti-oxydasiques du SO<sub>2</sub></b>	Le SO <sub>2</sub> inhibe l'activité d'enzymes oxydatives comme la tyrosinase et la laccase. Cette action est donc particulièrement appréciable lors de la récolte de raisins botrytisés.
<b>Actions dissolvantes du SO<sub>2</sub></b>	Le SO <sub>2</sub> favorise la lyse des cellules du raisin et la libération de leur contenu (tanins, arômes...)

## II.2 La Mise en cuve et le traitement des moûts.

A la sortie du fouloir-égrappoir, la vendange est transférée par une pompe dans la cuve de fermentation. Les différences de constitution des raisins, notamment en fonction des conditions climatiques, peuvent inciter à une correction de la vendange. Ces interventions portent principalement sur le réglage de l'acidité et / ou l'augmentation de la richesse en sucre (chaptalisation). Elles sont soumises à une réglementation très stricte destinée à éviter les abus. Ces palliatifs destinés à compenser une maturité naturelle insuffisante ; et en aucun cas, cela ne saurait prétendre donner aux raisins toutes les caractéristiques liées à une parfaite maturation qui doit rester l'objectif de la viticulture.

Une forte maturité se traduit quelquefois par une acidité trop faible qui peut être corrigée par addition d'acide tartrique. Inversement, une maturité insuffisante conduit à un excès d'acidité. Dans ce cas, la précipitation de l'acide tartrique par le carbonate de calcium entraîne son élimination.

L'azote assimilable, c'est-à-dire l'ensemble de l'azote ammoniacal et des divers acides aminés du moût disponibles pour le développement des micro-organismes, peut être corrigé au moment du remplissage de la cuve afin d'assurer le développement des levures notamment (Bely et *al.* 1990). Classiquement, lorsque le moût contient moins de 150 mg/L d'azote assimilable on procède à son enrichissement en ajoutant du sulfate d'ammonium par exemple. Généralement dans les cas de raisins surmûris et/ou partiellement pourris, les carences azotées sont associées aux carences vitaminiques, notamment en thiamine (vitamine B1)

---

### *Etude bibliographique*

indispensable au développement et à l'activité fermentaire des levures (Bataillon et *al.* 1996). Là encore, il est possible de combiner l'apport de chlorhydrate de thiamine avec l'ajout d'azote ammoniacal.

Le pH, la concentration en sucres fermentescibles, en azote assimilable et en vitamines sont des paramètres biochimiques essentiels. Leurs modifications se répercuteront nécessairement sur les croissances et les activités microbiennes à venir.

Lorsque la cuve est remplie, on procède au premier remontage d'homogénéisation. Cette étape assure les échanges entre le jus et les particules solides (pellicules, pépins). Dans la majorité des cas, elle est répétée quotidiennement jusqu'au milieu de la fermentation alcoolique. Au début, les remontages sont couramment associés à une aération pour assurer l'apport d'oxygène nécessaire au développement des levures (Visser et *al.* 1990). Cette aération empêche aussi les odeurs de réduit. Elle favorise également les réactions entre les anthocyanes et les tanins qui assurent l'intensité et la stabilité de la couleur. La décision d'arrêter les remontages est le résultat des dégustations régulières et permet d'éviter une sur-extraction des tanins des pépins notamment.

Pour contrôler l'extraction des anthocyanes et des tanins, il est possible d'utiliser des préparations enzymatiques commerciales. Elles ciblent les parois des cellules du raisin et accélèrent ainsi la libération de tanins localisés essentiellement au niveau de la vacuole. Il s'agit principalement de préparations de pectinases avec des activités bêta-glucosidases. Elles assurent la libération des composés phénoliques colorés et la transformation de précurseurs glycosylés accentuant la couleur du vin et l'enrichissement en molécules odorantes.

Parmi les molécules libérées par les préparations enzymatiques certains composés phénoliques sont transformés par certains micro-organismes en molécules qui altèrent les qualités aromatiques du vin. L'activité enzymatique incriminée est une activité cinnamyl estérase qui clive les liens entre l'acide tartrique et les acides hydroxycinnamiques eux-mêmes décarboxylés par des micro-organismes et responsables de l'apparition de mauvaises odeurs (Partie II, Chapitre II. 4). Des travaux de purification ont été nécessaires afin d'accroître la spécificité des préparations enzymatiques et limiter ainsi ces problèmes (Canal-Llauberes et Barbe 1995). Par ailleurs, les préparations enzymatiques peuvent participer à une

clarification précoce du vin jeune en déstabilisant les systèmes colloïdaux entre les composés phénoliques et les protéines du vin (Canal-Llauberes 2002).

### II.3 La fermentation alcoolique.

La première phase microbiologique importante est la transformation des sucres (glucose et fructose) en éthanol et en dioxyde de carbone durant la fermentation alcoolique (FA) par les levures. La voie métabolique mise en jeu débute par la glycolyse. En anaérobiose, la levure utilise la glycolyse pour transformer les sucres en énergie directement utilisable par la cellule. Deux molécules d'ATP sont produites par molécule de glucose consommée. La conversion du cofacteur  $\text{NAD}^+$  en NADH est requise. La production d'éthanol est l'effet de la ré-oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  nécessaire à la poursuite de l'activité glycolytique. A ce métabolisme carboné central s'ajoute de nombreuses voies métaboliques secondaires qui participent à la maintenance et la multiplication cellulaire. Ces métabolismes produisent des composés (glycérol, alcools supérieurs, acides gras, esters...) d'intérêt œnologique car ils influencent significativement les caractéristiques organoleptiques du vin (Ribéreau-Gayon 1971, Romano et al. 2003) (Tableau III).

**Tableau III.**Liste des principaux arômes fermentaires et leur descriptif aromatique.

Nom de la molécule	Classe de la molécule	Impact aromatique
Alcool isoamylique	Alcool supérieur	Huile de fusel
Phényl-éthanol	Alcool supérieur	Rose
Acétate d'isoamyle	Ester d'alcool supérieur	Banane
Acétate de phényléthyle	Ester d'alcool supérieur	Rose
Hexanoate d'éthyle	Ester éthylique d'acides gras	Pomme
Octanoate d'éthyle	Ester éthylique d'acides gras	Ananas

L'espèce de levure principalement responsable de la FA est *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Elle est naturellement présente à la surface de la baie de raisin (Mortimer et Polsinelli 1999). Mais, la mise en œuvre de la FA utilise souvent des levains commerciaux de souches de *S. cerevisiae* sélectionnées pour leur aptitude fermentaire et leur contribution aromatique (Delteil et Aizac 1989, Regodon et al. 1997, Esteve-Zarzoso et al. 2000, Nikolaou et al. 2006). Cet argument de contribution aromatique est sans cesse débattu. En réalité, il est souvent préférable d'évoquer la neutralité aromatique des souches commerciales. En effet, si

le vinificateur désire encourager la typicité de son vin il semble qu'il soit préférable de laisser agir la flore indigène (Lema et *al.* 1996, Epifanio et *al.* 1999).

Quelle que soit la méthodologie choisie, la FA doit être rapide. La multiplication des levures dans le vin doit être suffisante : i) pour assurer la consommation effective des sucres et doit aboutir à occuper et monopoliser l'écosystème microbien, ii) pour limiter le développement des autres micro-organismes, notamment celui des bactéries lactiques.

L'utilisation de levains commerciaux n'est pas toujours satisfaisante. Il est possible de rencontrer des échecs d'inoculation et des fins de FA languissantes. Ces dernières concernent également les fermentations indigènes. La plupart des explications proposées s'appuient sur des données physico-chimiques du moût, concentration en sucres fermentescibles, teneur en azote assimilable, carence en vitamines, et les conditions mises en œuvre, limitation en oxygène, mauvaise gestion de la température...En ce qui concerne les études microbiologiques, elles sont concentrées uniquement sur l'espèce *S. cerevisiae*. Elles éludent la complexité de l'écosystème microbien. Les réponses ainsi suggérées sont insuffisantes pour apporter des explications satisfaisantes aux vinificateurs. La compréhension des FA languissantes et des arrêts de fermentation demeure un enjeu fondamental des recherches œnologiques modernes (Alexandre et Charpentier 1998, Bisson 1999). Une partie de ce travail tente d'apporter une vision systémique des fins de fermentations problématiques en élargissant l'étude à l'ensemble de la microflore œnologique.

#### **II.4 La macération.**

La macération *sensu stricto*, c'est-à-dire le contact prolongé du moût et du marc, débute en réalité dès la sortie du fouloir et se poursuit lors de la FA. Le démarrage de la FA provoque la formation d'un chapeau à la surface de la cuve. Le marc, composé par les parties solides du moût. En effet, le CO<sub>2</sub> dégagé par la FA, crée une pression à l'intérieur de la cuve qui rassemble tous les éléments solides à la partie supérieure. Le principe de la macération est l'extraction de la couleur et des tanins contenu dans le marc, pour parvenir à un vin plus ou moins charpenté. Plus la macération est importante plus le vin sera coloré et puissant.

Une macération initiale à froid (MIF) peut précéder la FA. Dans ce cas, le violent choc thermique engendré par le refroidissement rapide de la vendange (de 20-25°C à 12°C et même

jusqu'à 5°C) favorise l'éclatement des cellules de la pellicule du raisin, et l'extraction des composés colorants aromatiques. Les basses températures, maintenues par ajout de gaz carbonique, pendant une durée variable de trois à douze jours, influencent nécessairement l'activité et la viabilité des cellules microbiennes (Sharf et Margalith 1983). Lors de la combinaison de macération initiale à froid et de levurage, il est possible d'ajouter le levain avant l'abaissement de la température, ou bien d'ensemencer le moût uniquement lors du réchauffage de la cuve. Ces opérations doivent probablement avoir une répercussion différente, plus ou moins notable, sur le développement de la microflore œnologique indigène et exogène.

## **II.5 L'écoulage.**

Lorsque la fermentation - macération est terminée, on procède au décuvage, aussi appelé écoulage, afin de transférer le moût, qui est devenu du vin (le vin de goutte), dans un autre contenant et de séparer le marc. Ce dernier est pressé pour donner les vins de presse. Plus riches en extraits divers, notamment en matière colorante, ces derniers pourront être éventuellement assemblés par la suite avec le vin de goutte en fonction des besoins du millésime. Cette séparation physique des vins issus d'une même cuve doit provoquer une répartition de la microflore dans les vins obtenus, car, outre la contrainte physique imposée par la presse, la composition physico-chimique du vin de goutte et celle des vins de presse sont plus favorables, l'une ou l'autre, à certaines espèces microbiennes.

## **II.6 La fermentation malolactique.**

Les deux vins, de goutte et de presse, vont ensuite subir séparément une seconde fermentation, appelée fermentation malolactique (FML). Elle correspond à la transformation de l'acide-L-malique (un diacide) en acide-L-lactique (un monoacide) et en gaz carbonique par l'action des bactéries lactiques, et principalement de l'espèce *Oenococcus oeni* (*O. oeni*). Cette décarboxylation entraîne une désacidification du vin. Elle permet d'éliminer l'acide-L-malique qui conférait une « verneur » indésirable au vin. L'acide lactique qui en résulte est moins agressif et possède une attaque plus douce et aigrelette (de Revel 1999). Elle s'accompagne d'une légère augmentation de l'acidité volatile principalement due au métabolisme des sucres résiduels et de l'acide citrique. Mais la transformation de l'acide

### Etude bibliographique

citrique aboutit aussi au diacétyle dont l'arôme de beurre influence l'équilibre aromatique du vin (Nielsen et Richelieu 1999, Bartowski et Henscke 2004). Il est diversement apprécié selon les dégustateurs. Le diacétyle est naturellement présent en équilibre avec ses formes réduites : l'acétoïne et le butane-2,3-diol qui sont aussi produit par le métabolisme levurien pendant la FA.

Comme pour la FA, le vinificateur a le choix entre la flore bactérienne indigène et le recours aux préparations commerciales de souches d'*O. oeni* sélectionnées (Gindreauet et al. 1997). D'autre part, l'interaction reconnue des bactéries lactiques et de certains composés du bois des barriques (de Revel et al. 2005) peut amener le vinificateur à privilégier la réalisation d'une FML en barriques plutôt qu'en cuve. Le choix de la barrique ou de la cuve repose sur l'appréciation des avantages et des inconvénients des deux contenants (Tableau IV), mais il influence la cinétique fermentaire. La neutralité aromatique de la cuve peut également être considérée comme un avantage car cela facilite l'appréciation gustative de la FML. Pour le vin logé en barriques, notamment dans les fûts neufs, l'apport de caractère boisé masque l'appréciation des changements organoleptiques liés à l'activité des bactéries lactiques.

**Tableau IV.** Principaux avantages et inconvénients d'une FML en cuve ou en barriques.

Contenant	Avantages	Inconvénients
<b>Cuve</b>	La température et l'aération sont facilement contrôlées. Les conditions d'hygiène sont plus facilement assurées. Les pertes de vin sont réduites. L'investissement est limité. Le besoin de main d'œuvre est faible.	La cuverie doit être adaptée au volume de vins de goutte et de presse récupéré. L'élimination du CO <sub>2</sub> est très lente.
<b>Barrique</b>	Des composés du bois réagissent avec les produits du métabolisme bactérien, ou sont transformés par les bactéries. Les lies peuvent être bâtonnées pour encourager le départ de la fermentation. Le CO <sub>2</sub> est progressivement éliminé.	L'apport de boisé altère l'appréciation gustative du déroulement de la fermentation. La température est difficile à contrôler L'investissement est élevé. Les besoins de main d'œuvre sont importants.

## II.7 Le sulfitage post-fermentaire.

Après les fermentations, l'élaboration du vin n'est pas encore terminée. Le vin nouveau brut, trouble et gazeux, nécessite la phase d'élevage. Elle sera plus ou moins longue selon le style recherché. Pour les grands vins, elle peut durer près de deux ans.

Aussitôt les fermentations achevées, il est d'usage de sulfiter le vin. En plus des propriétés chimiques et biochimiques protectrices du SO<sub>2</sub> précédemment évoquées, c'est son action antimicrobienne qui est désormais recherchée. Basée sur différents mécanismes cellulaires et moléculaires, l'activité anti-microbienne du SO<sub>2</sub> affecte aussi bien les levures que les bactéries (Figure 1).



**Figure 1:** Schéma des différents modes d'action du SO<sub>2</sub> sur les micro-organismes.



### Etude bibliographique

Le sulfitage doit donc permettre de réduire les populations résiduelles des fermentations et prévenir le développement des micro-organismes d'altération durant l'élevage du vin. Mais seul le SO<sub>2</sub> moléculaire est actif sur les micro-organismes (Sudraut et Chauvet 1985). Sa proportion varie selon le pH qui régule l'équilibre entre la forme moléculaire et la forme ionique du SO<sub>2</sub> (Figure 2):

- SO<sub>2</sub>(g) + H<sub>2</sub>O ⇌ H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(aq) (Équilibre de solubilisation du dioxyde de soufre gazeux)
- H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(aq) + H<sub>2</sub>O ⇌ HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> pK<sub>A1</sub> (1<sup>er</sup> équilibre acido-basique entre l'acide sulfureux, appelé dioxyde de soufre moléculaire, et de son ion bisulfite)
- HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O ⇌ SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> + H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> pK<sub>A2</sub> (2<sup>nd</sup> équilibre acido-basique entre l'ion bisulfite et l'ion sulfite).

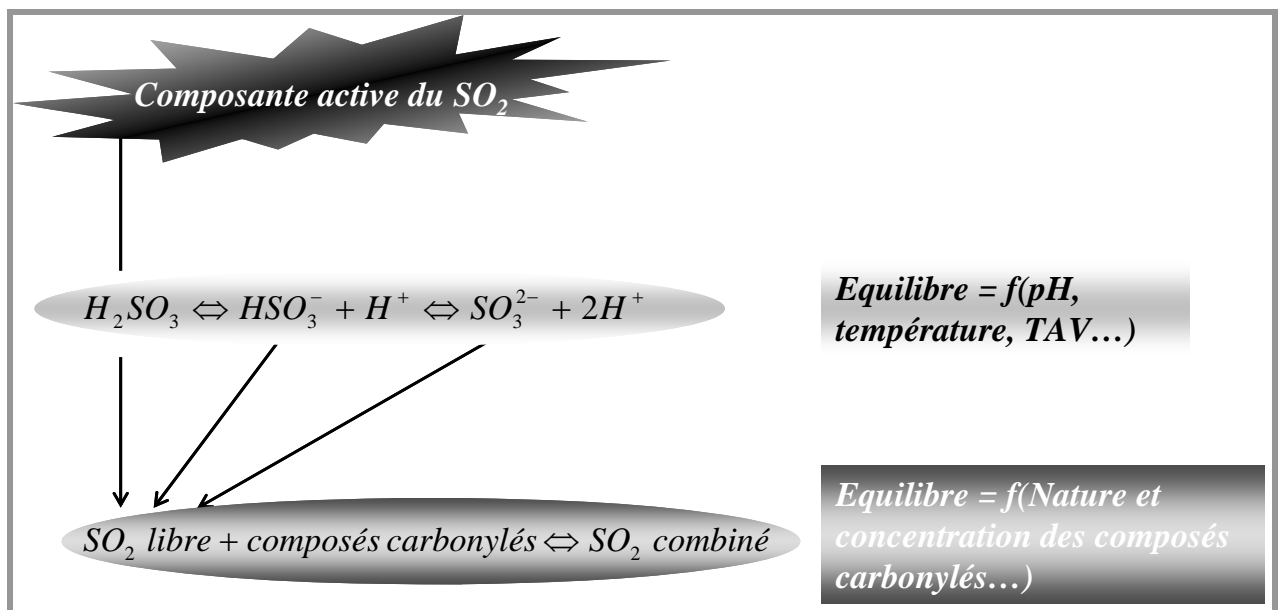


Figure 2: Les différentes formes du SO<sub>2</sub> dans le vin.

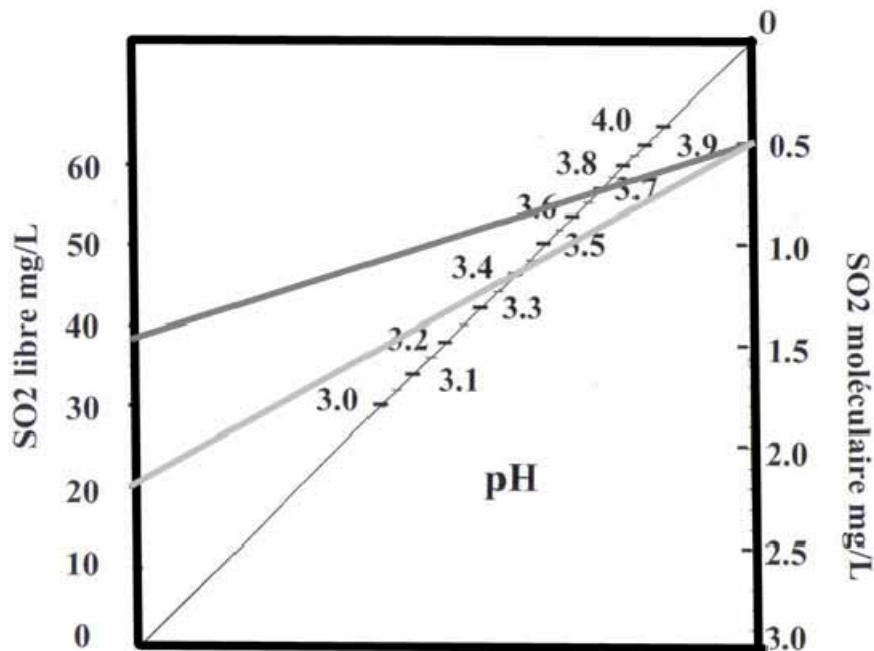
Les constantes pK<sub>A</sub> sont les constantes de dissociation acido-basique de l'acide sulfureux. Les valeurs varient selon les paramètres physico-chimiques du milieu : température, titre alcoométrique volumique (TAV)...Elles sont respectivement de 1,9 et 7,2 à 20°C et pour un TAV de 12 % v/v. Donc dans les gammes de pH œnologiques (entre 3,3 et 4,0), l'équilibre majoritaire concerne l'acide sulfureux et l'ion bisulfite.

### Etude bibliographique

Mais les formes moléculaires et ioniques du dioxyde soufre ne sont pas nécessairement libres dans le vin, car elles peuvent se combiner avec toutes les fonctions carbonylés et les anthocyanes présents. On parle de SO<sub>2</sub> libre et de SO<sub>2</sub> combiné. En définitive seule la partie moléculaire du SO<sub>2</sub> libre est véritablement active sur les micro-organismes. Mais durant toute la période d'élevage, c'est le SO<sub>2</sub> total qui permettra de préserver la couleur du vin.

Les mesures chimiques déterminent le SO<sub>2</sub> total et le SO<sub>2</sub> libre. Il est important de retranscrire cette dernière mesure en SO<sub>2</sub> moléculaire afin de s'assurer d'une action effective sur les micro-organismes pour cela une formule mathématique existe :

$$\text{SO}_2 \text{ actif (\% SO}_2 \text{ libre)} = \frac{100}{(1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{A1}})})}$$
, ainsi qu'une abaque (Figure 3).



**Figure 3:** Corrélation entre le SO<sub>2</sub> libre, le SO<sub>2</sub> moléculaire et le pH dans le vin.

Par exemple, à un pH de 3,4 pour s'assurer d'un SO<sub>2</sub> moléculaire de 0,5 mg/L, il faut une concentration de SO<sub>2</sub> libre proche de 20 mg/L. Tandis qu'à un pH de 3,7 il faut atteindre une dose de SO<sub>2</sub> libre environ deux fois plus élevée (40 mg/L).

### **III L'élevage.**

#### **III.1 L'entonnage.**

Une fois les fermentations achevées, l'élevage des vins rouges en barrique est une pratique courante pour permettre aux arômes du vin d'évoluer sous l'influence de l'oxydation ménagée et des interactions avec les composés du bois. Toutefois, l'impact aromatique est différent selon les composés extraits du bois. Par exemple, la vanilline est considérée comme positive, tandis que le furfural et du 5-méthylfurfural sont plus discutés (Boidron *et al.* 1988).

L'origine géographique du bois, chêne français ou chêne américain (Cerdan *et al.* 2002), la flore fongique présente dans le bois (Vivas et Glories 1993) et les différents procédés de séchage et de fabrication des barriques (Chatonnet *et al.* 1989a) influencent la diversité des composés susceptibles d'être extraits. Le vinificateur dispose d'un large choix de barriques sur lequel il peut jouer, en proportion et en durée d'utilisation, afin d'améliorer les spécificités aromatiques de son vin. Certains privilégient l'emploi de barriques neuves, qui apportent un maximum de boisé, d'autres celui de barriques usagées « d'un vin » (c'est-à-dire utilisée une fois généralement lors du millésime précédent). Dans ce cas, les quantités de vanilline et des autres composés disponibles sont moins importantes. Elles conviennent mieux aux vins dont la structure ne supporte pas un trop fort boisé et permettent une évolution plus douce des vins.

D'un point de vue microbiologique, le logement du vin nouveau en barrique, n'est pas un événement anodin et sa répercussion sur la microflore est redoutée. Dans le cas de l'élaboration des vins rouges, l'entonnage intervient soit avant la FML soit une fois les fermentations achevées, lors d'un transvasement depuis la cuve. D'un point de vue microbiologique, l'emploi de barriques déjà utilisées, barriques de 2<sup>nd</sup>, 3<sup>ème</sup> ... vin, peut sembler risqué. Les contaminations microbiennes inhérentes à l'utilisation d'un matériel ayant déjà eu un contact prolongé avec le vin paraissent plus probables qu'avec un matériel neuf. Ces considérations sont discutées par la suite à partir d'observations répétées sur le terrain. En prévision de leur réutilisation les barriques usagées doivent être correctement lavées puis séchées et méchées.

Dans la barrique, le volume occupé diminue du fait de l'évaporation, de l'absorption et de la « contraction » du vin. Pour compenser cette perte de volume et éviter les processus d'oxydation, il faut conserver les vins dans des récipients maintenus pleins, en compensant ces pertes par des apports périodiques de vin. Cette pratique, appelée ouillage, peut influencer la flore microbienne. En effet, il faut veiller à ne pas réintroduire une flore microbienne viable avec le vin d'ouillage alors que le vin logé dans la barrique est en cours de stabilisation. Pour cela le soin apporté à la conservation du vin d'ouillage est primordiale (inertage avec des gaz inertes, cuverie variée avec des unités de moindre capacité maintenues pleines, sur-sulfitage ...).

### **III.2 Les soutirages.**

Les soutirages sont des étapes essentielles qui rythment la période d'élevage du vin nouveau. Ils sont l'occasion pour le vinificateur d'apprécier l'évolution du vin, de réaliser des assemblages, d'apporter au vin une aération essentielle à son évolution, de réajuster la teneur en dioxyde de soufre, et d'éliminer l'excès de CO<sub>2</sub>. Toutefois le rôle fondamental des soutirages est de séparer le vin de la lie, ensemble des particules colloïdales qui sédimentent et se déposent au fond de la barrique. Cette élimination des sédiments, de tartre, de casses évite leur dissolution ultérieure possible et prévient le développement de goûts putrides ou de lies. Afin de préserver les arômes fermentaires de jeunesse et de fruité des vins, il peut-être indiqué de limiter les apports d'oxygène lors des soutirages. Plusieurs techniques sont donc possibles : soutirages à l'abri de l'air, soutirage avec légère aération et soutirage avec aération forte (Vivas et Glories 1994).

Parce qu'ils impliquent la manipulation et l'aération du vin et qu'ils sont systématiquement mis en œuvre durant l'élevage des vins rouges, les soutirages et leur impact microbiologique seront l'objet d'une attention particulière dans ce travail.

### **III.3 Le collage.**

Le collage, opération pratiquée en fin d'élevage, consiste à « ajouter à un vin un produit clarifiant capable de s'y coaguler et de donner des flocons ; la formation des flocons et leur sédimentation entraîne les particules du trouble et clarifie le vin » (Ribéreau-Gayon et *al.*

1977). Les principaux agents collants sont des protéines chargées positivement qui neutralisent les particules colloïdales chargées négativement provoquant leur précipitation puis leur sédimentation. Plusieurs colles naturelles (albumine d'œuf, gélatine...) ou de synthèse (polyvinylpyrrolidone, PolyclarAT®...) sont proposées au vinificateur (Marchal et *al.* 2000, Lataste 2004). Dans les domaines bordelais soucieux de préserver les méthodes de vinification traditionnelles le collage au blanc d'œuf frais battu est encore couramment pratiqué.

Parce que les cellules microbiennes peuvent être physiquement assimilées à des particules colloïdales, mais aussi parce que les agents de collage possèdent des composés actifs, comme par exemple le lysozyme (Gerbaux et *al.* 1997) contenu dans le blanc d'œuf, le collage doit avoir une répercussion sur les micro-organismes.

#### **III.4 La mise en bouteilles.**

Après les vinifications et l'élevage, le vin nouveau doit être conditionné en bouteilles. C'est l'ultime manipulation du vin avant son vieillissement et sa consommation. Elle doit donc respecter un cahier de charges très strict pour éviter les contaminations toujours possibles et évidemment très préjudiciables car elles seraient révélées uniquement lors de la dégustation.

L'accent est mis sur la traçabilité des bouchons, des bouteilles, des capsules, des tireuses, des boucheuses. En ce qui concerne le vin embouteillé, une dernière série d'analyses doit être effectuée pour contrôler certaines caractéristiques physico-chimiques du vin (titre alcoométrique volumique, pH, turbidité...) et les teneurs en divers composés (plomb, méthanol, amines biogènes, carbamate d'éthyle...) retenus par les réglementations dépendantes des marchés et des clients. D'un point de vue microbiologique, afin de réduire la viabilité des cellules résiduelles, il est possible de réaliser un tirage à chaud : le vin est embouteillé à 45-47°C, bouché puis se refroidit naturellement (Blouin et Peynaud 2001).

#### **IV Les principales différences entre la vinification des vins rouges et celle des vins blancs.**

Pour la grande majorité des vins blancs secs produits dans la région bordelaise, la fermentation malolactique n'est pas recherchée. La seule intervention microbiologique est la fermentation alcoolique. Plus encore que dans les vins rouges, il s'agit de trouver l'équilibre parfait entre l'alcool et l'acidité, et, de développer un ensemble complémentaire d'arômes variétaux et fermentaires. Pour cela, les premières étapes de la vinification sont l'objet de toutes les attentions. Par comparaison avec les vins rouges, il faut séparer très rapidement le moût et les pellicules, pépins et rafles (Blouin et Peynaud 2001). Généralement lors des pressurages seuls les premiers jus, 70 à 80% du moût extrait, sont vinifiés. C'est après le pressurage que le sulfitage de la vendange intervient. Il est impératif afin d'éviter les phénomènes d'oxydation qui sont encore plus dommageables que pour les vins rouges.

L'élaboration des vins blancs est, contrairement aux vins rouges, une vinification en jus clair. C'est-à-dire que le moût doit être clarifié par un débourage. Cette opération consiste à soustraire l'ensemble des débris solides (rafles, pépins, particules colloïdales et floculées). Elle doit nécessairement se répercuter sur les populations microbiennes puisqu'elle entraîne l'élimination de certains composés fondamentaux des moûts comme notamment les acides gras de la pruline. Un débourage trop prononcé peut également entraîner une diminution des caractères aromatiques propres au cépage et produire des vins avec des arômes fermentaires trop prononcés.

Afin de s'assurer d'un départ rapide de la FA, l'emploi du levurage est dorénavant quasi-systématique dans l'élaboration des vins blancs secs. Les souches sélectionnées sont généralement différentes de celles des vinifications en rouge. Elles doivent privilégier la révélation des arômes variétaux et ne pas imposer des arômes fermentaires trop violents. Pratiquement, la FA des vins blancs secs s'effectue en trois phases successives. Les deux premières ont lieu en cuve, dans un premier temps la température est maintenue en deçà de 20°C pour favoriser l'apparition des arômes levuriens. Puis, lorsque la densité est proche de 1,03 (vers la mi-fermentation), la température est légèrement relevée entre 20 et 22°C pour améliorer la cinétique fermentaire. Enfin, avant que la fermentation ne soit réellement achevée, le vin est logé en barriques, où il est régulièrement bâtonné ce qui permet

---

### *Etude bibliographique*

l'élimination de CO<sub>2</sub> et la fin progressive de la fermentation par la remise en suspension des levures.

Un pressurage rapide, le débouillage et la cinétique fermentaire, et certaines caractéristiques physico-chimiques particulières des moûts de raisins blancs (absence de composés phénoliques colorés, pH légèrement plus faible...) supposent des développements microbiens significativement différents de ceux observés dans les vins rouges.

## **PARTIE II. LES MICRO-ORGANISMES ŒNOLOGIQUES.**

Pour les vins rouges comme pour les vins blancs, chaque étape de l'élaboration est strictement liée à des considérations microbiologiques. Plusieurs types de micro-organismes, les levures et les bactéries, bénéfiques ou préjudiciables sont susceptibles d'intervenir.

### **I Les levures.**

La systématique microbienne répartie les levures, moisissures unicellulaires, en trois familles : les Ascomycètes, Basidiomycètes et les Deutéromycètes (Barnett et *al.* 1990). Classiquement, en œnologie on sépare les levures en deux principaux groupes : les levures totales et les levures non-*Saccharomyces* (Lafon-Lafourcade et Joyeux 1979).

#### **I.1 Les levures totales.**

Les "Levures Totales" (LT) rassemblent les espèces de levures oxydatives dépourvues d'activité fermentaire (*Cryptococcus* sp.) et les levures fermentaires: *S. cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* (*B. bruxellensis*)...La forme des cellules est différente selon les espèces. Les *S. cerevisiae* sont rondes, les *B. bruxellensis* allongées et les *Cryptococcus* sp. ont une forme de citrons. Mais elles diffèrent surtout par leurs fonctions. L'espèce *S. cerevisiae* est sans conteste la mieux adaptée au moût pour réaliser la fermentation alcoolique, tandis que certaines espèces (*Rhodotorula* sp...) interviennent avant, et d'autres (*B. bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*) plutôt après, en provoquant les altérations microbiennes.

#### **I.2 Les levures non-*Saccharomyces*.**

Les Levures "non-*Saccharomyces*" (NS) rassemblent toutes les levures à l'exception des espèces du genre *Saccharomyces* et constituent un groupe vaste et très divers. Leur importance n'a été reconnue que récemment par l'intérêt porté sur les altérations microbiennes, mais pas uniquement. En effet, il est important de ne pas assimiler les levures non-*Saccharomyces* et les levures dites "d'altération". Car sous la qualification de non-*Saccharomyces* on évoque aussi bien les levures des genres *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*



## *Etude bibliographique*

qui contribuent favorablement à la typicité aromatique du vin (Romano *et al.* 2003, Jolly *et al.* 2003) que les *Brettanomyces* et les *Zygosaccharomyces* qui sont fortement préjudiciables (Tableau V).

**Tableau V.** Principaux métabolismes des levures non-*Saccharomyces* avec des incidences œnologiques bénéfiques ou non.

<b>Genre</b>	<b>Activités métaboliques reconnues</b>
<i>Brettanomyces</i> sp.	Production d'acide acétique (Peynaud et Domercq 1956), de phénols volatils (Chatonnet <i>et al.</i> 1999) et de tétrahydropyridines (Heresztyn 1986, Snowdon <i>et al.</i> 2006).
<i>Candida</i> sp.	Activités glucanase, $\beta$ -glucosidase et protéase (Dizy et Bisson 2001). Production de glycérol (Soden <i>et al.</i> 2000), d'esters éthylique, d'alcool supérieurs (Clemente-Jimenez <i>et al.</i> 2004) et d'acide acétique (Zorhe et Erten 2002).
<i>Debaryomyces</i> sp.	Activités $\beta$ -glucosidase (Charoenchai <i>et al.</i> 1997) et protéase (Dizy et Bisson 2001).
<i>Hanseniaspora</i> sp.	Activités $\beta$ -glucosidase (Charoenchai <i>et al.</i> 1997, $\beta$ -xylosidase (Manzanares <i>et al.</i> 1999) et protéase (Dizy et Bisson 2001). Production d'alcools supérieurs (Clemente-Jimenez <i>et al.</i> 2004), d'esters volatils (Rojas <i>et al.</i> 2003), d'acide acétique (Romano <i>et al.</i> 1992), d'acétoïne, d'acétaldéhyde (Granchi <i>et al.</i> 2002).
<i>Kluyveromyces</i> sp.	Production d'acétaldéhyde (Plata <i>et al.</i> 2003).
<i>Mestchnikowia</i> sp.	Activités $\beta$ -glucosidase (Fernandez <i>et al.</i> 2000 et protéase (Dizy et Bisson 2001). Production d'alcools supérieurs (Clemente-Jimenez <i>et al.</i> 2004)
<i>Pichia</i> sp.	Activités $\beta$ -glucosidase (Charoenchai <i>et al.</i> 1997), $\beta$ -xylosidase (Manzanares <i>et al.</i> 1999) et protéase (Dizy et Bisson 2001). Production d'alcools supérieurs (Clemente-Jimenez <i>et al.</i> 2004), d'esters volatils (Rojas <i>et al.</i> 2003) et d'acétaldéhyde (Plata <i>et al.</i> 2003).
<i>Rhodotorula</i> sp.	Activités estérases (Lee <i>et al.</i> 1987) Production d'exopolysaccharides (Petersen <i>et al.</i> 1990)
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	Production d'un voile augmentant la turbidité (Martínez <i>et al.</i> 1989) Refermentation (Divol 2004) Production d'acétaldéhyde (Beech et Thomas 1985)

## II Les bactéries.

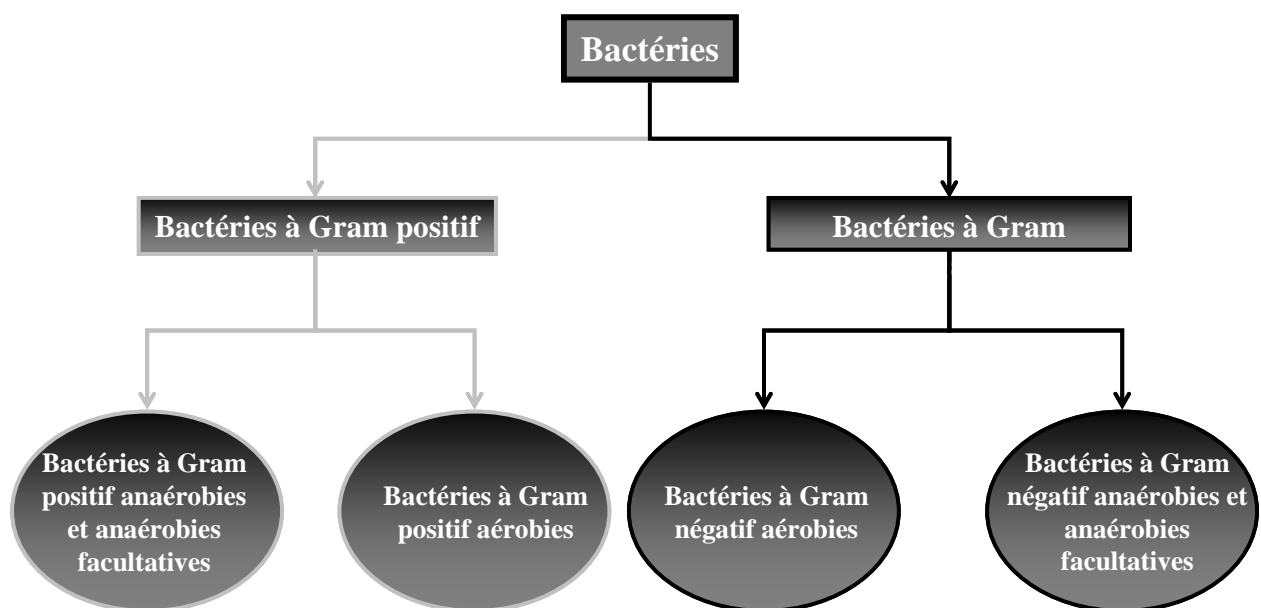
Comme pour les levures, la systématique bactérienne fait régulièrement l'objet de re-classifications grâce au développement de méthodes d'identification de plus en plus performantes. En 1923, la première édition de la classification de Bergey se basait sur des caractères morphologiques, écologiques et biochimiques pour fournir une référence de taxonomie bactérienne. La méthodologie hiérarchique alors retenue s'appuyait sur les

### *Etude bibliographique*

différences de structure pariétale révélées par la coloration de Gram, des différences morphologiques facilement remarquables, comme par exemple la distinction entre les coques et les bacilles, et sur des caractères biochimiques essentiels comme les qualités respiratoires et la faculté à sporuler (Buchanan et Gibbons 1974).

La pertinence de ces critères phénotypiques a été par la suite remise en cause avec le développement de la biologie moléculaire. En 1987, une définition officielle de l'espèce bactérienne est établit : « deux bactéries appartiennent à la même espèce si elles ont un pourcentage d'hybridation de leur ADN supérieur à 70 % avec une différence de stabilité thermique des hybrides formés inférieure à 5°C ».

La classification des espèces bactériennes couramment retenue en œnologie est relativement simple. Elle est basée sur les propriétés métaboliques des bactéries lactiques et des bactéries acétiques de produire, respectivement, l'acide lactique et l'acide acétique. L'étude en amont du chai de la flore bactérienne présente sur la baie de raisin amène à élargir cette classification. Une classification hiérarchique basée dans un premier temps sur la coloration de Gram, et dans un second temps sur les qualités respiratoires a été retenue pour ce travail. L'avantage de cette classification est de correspondre avec les critères de pression de sélection utilisés lors de l'isolement des populations (Figure 4).



**Figure 4:** Principaux groupes bactériens suivis dans cette étude.

## II.1 Les bactéries à Gram positif.

### - Les bactéries à Gram positif anaérobies et anaérobies facultatives.

Les principales bactéries à Gram positif rencontrées en œnologie sont capables de se développer en absence d'oxygène (bactéries à Gram positif anaérobies et anaérobies facultatives). Ce sont dans la majorité des bactéries lactiques (BL), c'est-à-dire des bactéries dont le métabolisme carboné central conduit à la formation d'acide lactique.

On distingue des cellules arrondies, les coques, et des cellules allongées, les bacilles. Deux types de métabolismes fermentaires sont rencontrés. Un métabolisme aboutit de façon quasi-exclusive à la production d'acide lactique (caractère homofermentaire). L'autre peut produire de l'acide lactique, mais également de l'éthanol et de l'acide acétique suivant les conditions de cultures (caractère hétérofermentaire).

Les principaux genres décrits en bactériologie œnologique sont les genres : *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*. La grande majorité des espèces rencontrées présentent la capacité de dégrader l'acide-L-malique et participer ainsi à la FML. Malgré leur relative spécificité, les BL ont un champ d'action très vaste qui entraîne des modifications organoleptiques plus ou moins conséquentes. Il peut s'agir d'activités bénéfiques comme la FML mais aussi préjudiciables. Parmi les espèces d'intérêt, une espèce prédomine nettement : *O. oeni*. Anciennement *Leuconostoc oenos*, *O. oeni* a été séparée des genres *Weissella* (Collins et al. 1993) et *Leuconostoc* (Dicks et al. 1995) à la suite d'une compilation de propriétés fermentaires et d'analyses phylogénétiques. *O. oeni* est la principale espèce impliquée dans la fermentation malolactique.

La reconnaissance des qualités de cette seconde fermentation (Lonvaud-Funel 1999), et son adoption graduelle par les vinificateurs du monde entier, amène les producteurs industriels de levains à s'intéresser à la sélection et au développement de souches d'*O. oeni* efficaces. Les critères de sélection des souches d'*O. oeni* sont semblables aux critères retenus pour *S. cerevisiae* (Tableau VI). Néanmoins, les études sur les bactéries lactiques sont plus récentes et moins fournies que celles de *S. cerevisiae*. En outre, les bactéries interviennent dans un environnement que les activités levuriennes et les diverses pratiques œnotechniques ont rendu plus hostile et moins standardisé, de sorte que le développement de levains

### *Etude bibliographique*

d'*O. oeni* efficaces pour tous les vins est plus problématique. C'est un défi majeur pour l'œnologie moderne (Nielsen et al. 1996, Gindreau et al. 1997). Pour cela les études portent aussi bien sur la méthode d'inoculation (Maicas et al. 2000) que sur la sélection de souches par des tests physiologiques (Guzzo et al. 1998) et génétiques (Zé-Zé et al. 2000).

**Tableau VI.** Principaux critères de sélection des souches de *S. cerevisiae* et d'*O. oeni* pour l'élaboration des levains œnologiques.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>O. oeni</i>
<b>Capacité d'implantation</b>	Tolérance aux fortes concentrations aux sucres. Activité « killer » c'est-à-dire la production de toxines sur les cellules indigènes sensibles.	Tolérance à l'éthanol, au SO <sub>2</sub> , aux composés phénoliques et à des faibles pH.
<b>Capacité fermentaire</b>	Cinétique régulière et rendement fermentaire élevé. Epuisement complet sucres fermentescibles	Conversion rapide et complète de l'acide-L-lactique en acide-L-malique
<b>Propriétés métaboliques recherchées</b>	Production de glycérol, d'alcools supérieurs, d'acides gras et d'esters volatils. Faible production de vinylphénol (souches POF-), d'éthylcarbamate, d'acide acétique, de diacétyl, de SO <sub>2</sub> , de composés soufrés volatils et d'excrétion d'urée. Bonne capacité à flocculer qui facilite la clarification du vin	Activité β-glucosidase. Production limitée de diacétyl. Faible production des amines biogènes, d'exopolysaccharides, de carbamate d'éthyle Absence de phage facilement inductible Faible production de composés susceptibles de combiner le SO <sub>2</sub> .

Les progrès récents réalisés dans le domaine de la manipulation génétique des organismes vivants ont permis de combiner au sein d'une même entité microbienne les activités de fermentation alcoolique et de fermentation malolactique. Le gène *mleS* codant pour l'enzyme malolactique isolé des bactéries *O. oeni* (Labarre et al. 1996) et *Lactococcus lactis* (Denayrolles et al. 1994), du gène *mae1* codant pour une perméase membranaire de malate isolé de la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Sousa et al. 1992), tous les deux nécessaires au catabolisme de l'acide-L-malique, ont été clonés et exprimés dans des souches d'intérêt œnologique de *S. cerevisiae* (Husnik et al. 2006). Ces gènes placés sous le contrôle des mêmes éléments de régulation que l'alcool déshydrogénase (Ansanay et al. 1996) permettent, en anaérobiose, la réalisation de la conversion des sucres en éthanol et de l'acide malique en acide lactique. L'objectif est de faciliter le déroulement de la FML en utilisant la capacité de croissance des levures, mais aussi pour limiter le développement des bactéries

lactiques dont certains métabolismes peuvent être préjudiciables pour la qualité du vin. L'utilisation industrielle de telles souches est soumise aux réglementations liées à la mise en oeuvre d'organismes génétiquement modifiés dans l'élaboration de produits destinés à l'alimentation humaine. Selon les états, les législations sont encore trop disparates pour permettre un réel développement de ces projets et restreignent leur mise en oeuvre à certains pays.

- **Les bactéries à Gram positif aérobies.**

Les espèces de bactéries à Gram positif aérobies décrites en microbiologie œnologique sont beaucoup plus rares. Elles appartiennent aux genres *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Sporolactobacillus* sp.... Leurs habitats naturels sont principalement l'air et le sol et on les retrouve de ce fait principalement au vignoble (Kitahara et Susuki 1963, Chen et al. 2005, Bae et al. 2006) où leur capacité à sporuler leur permet probablement de résister aux fréquentes agressions environnementales. Cette résistance doit également leur permettre de jouer un rôle de premier plan dans le maintien de l'écosystème microbien de la baie de raisin. Mais leur persistance dans le moût durant les fermentations puis dans le vin fini est beaucoup plus anodine.

## **II.2 Les bactéries à Gram négatif.**

- **Les bactéries à Gram négatif aérobies.**

Les Bactéries Acétiques (BA) sont les principales bactéries œnologiques à Gram négatif aérobies (Joyeux et al. 1984, Gonzalez et al. 2005). Elles sont plus volumineuses que les BL et mobiles. Les BA du vin appartiennent à deux genres principaux : *Gluconobacter* et *Acetobacter*. Les *Gluconobacter* sont représentées par l'espèce *Gluconobacter oxydans* (*G. oxydans*). Elles sont principalement détectées à la surface de la baie de raisin et dans le moût. Leur substrat privilégié est le sucre tandis que les *Acetobacter*, essentiellement composées des espèces *Acetobacter aceti* (*A. aceti*) et *Acetobacter pasteurianus*, interviennent dans le vin fini en cours d'élevage en utilisant l'éthanol comme source de carbone organique et d'énergie. Les *Acetobacter* peuvent toutefois être détectées sur les raisins abîmés. Dans ce cas, la baie laisse échapper une quantité de jus que les autres micro-organismes utilisent pour synthétiser de l'éthanol qui peut être aussitôt utilisé par les *Acetobacter*. En présence d'air, elles oxydent

l'éthanol en acide acétique qui dans le cas des raisins très altérés se traduit par une odeur acescente perceptible même dans le vignoble. Dans ce cas, le moût de raisin récolté présente une acidité volatile déjà conséquente.

- **Les bactéries à Gram négatif anaérobies et anaérobies facultatives.**

A l'image des études réalisées sur d'autres végétaux (Jacques et *al.* 1995, Salles et *al.* 2006), les autres bactéries à Gram négatif susceptibles d'intervenir en oenologie appartiennent essentiellement à l'écosystème de la baie de raisin. Lors des vinifications, elles sont très rapidement éliminées probablement à cause d'une tolérance limitée à l'éthanol, ce qui a conduit les microbiologistes du vin à les ignorer. Néanmoins certaines espèces (*Zymomonas* sp., *Enterobacter* sp.) sont connues pour résister aux fermentations alcooliques lors de l'élaboration du cidre (Coton et coton 2003) et de la bière et influencer les caractéristiques aromatiques de ces produits (Bauduin et *al.* 2006). Bien que les degrés alcooliques atteints soient plus faibles dans la bière ou le cidre, il est possible que d'autres facteurs, que l'éthanol, limitent leur persistance dans le vin rouge. La comparaison des phénomènes observés lors des vinifications en rouge et en blanc permettra d'ébaucher certaines hypothèses concernant ces micro-organismes d'ordinaire occultés des études œnologiques classiques.

### **III Les états physiologiques des micro-organismes.**

Longtemps, un micro-organisme a été considéré comme viable uniquement s'il était cultivable, c'est-à-dire que placé dans des conditions optimales il forme un trouble cultivé en milieu liquide, ou des colonies cultivé sur milieu nutritif gélosé (Postgate 1969). Selon ce principe, un micro-organisme incapable de se cultiver au laboratoire est dit mort. Mais ce concept a été remis en cause par l'acquisition de nouvelles techniques d'observation comme l'épifluorescence. Elles sont basées sur l'utilisation de substrats colorés qui rendent compte d'une activité cellulaire réelle malgré l'absence de cultivabilité. La biologie moléculaire a renforcé la divergence entre la cultivabilité et la viabilité : des ADN et ARN microbiens peuvent être détectés tandis qu'aucune population n'est cultivable. Pour décrire ces micro-organismes incapables de former des colonies sur les milieux de culture nutritifs, mais dont les cellules demeurent biochimiquement actives, l'état « Viable Non Cultivable » a été défini.

---

### *Etude bibliographique*

Dans le cas des contrôles microbiologiques, l'état VNC est problématique car la population microbienne n'est ni détectable ni dénombrable par simple étalement sur milieu gélosé. Pourtant elle reste susceptible d'influencer les qualités du vin du fait de la préservation de son activité métabolique. Par exemple, des cellules d'*O. oeni* non cultivables mais toujours actives et productrices d'histamine ont été décrites par Coton et *al.* (1998). La microflore VNC, systématiquement occultée par le recours à étape de culture préalable, représenterait dans certains écosystèmes microbiens jusqu'à 90% (Ultee et *al.* 2003) de la microflore totale.

Le passage de l'état viable et cultivable à l'état VNC découle principalement d'une réaction de défense des cellules contre des stress environnementaux comme un changement de température ou une carence nutritionnelle (Olivier et Bockian 1995). Dans ce cas, la non-équivalence entre la cultivabilité observée et la viabilité peut s'expliquer par la transition d'un milieu liquide très pauvre en nutriments à un milieu gélosé très riche, qui peut être létale (Dukan 2004).

L'état VNC pose également la question du recouvrement du caractère cultivable qui rend problématique l'interprétation des contrôles microbiologiques. Cet aspect est encore très largement débattu, mais la remise en cause de l'axiome cultivabilité / viabilité est évidente.

Finalement, une étude d'écologie microbienne doit nécessairement se baser sur des analyses moléculaires et des critères statistiques afin de fournir la vision la plus exhaustive possible de l'écosystème étudié (Magurran 1995, Watve et Gangal 1996, Hughes et *al.* 2001). Ceci est indispensable notamment dans le cas des écosystèmes complexes pour lesquels il est nécessaire d'identifier le maximum de populations différentes afin de pouvoir intégrer les interactions possibles.

## **IV Les interactions entre les micro-organismes.**

### **IV.1 La nature des interactions.**

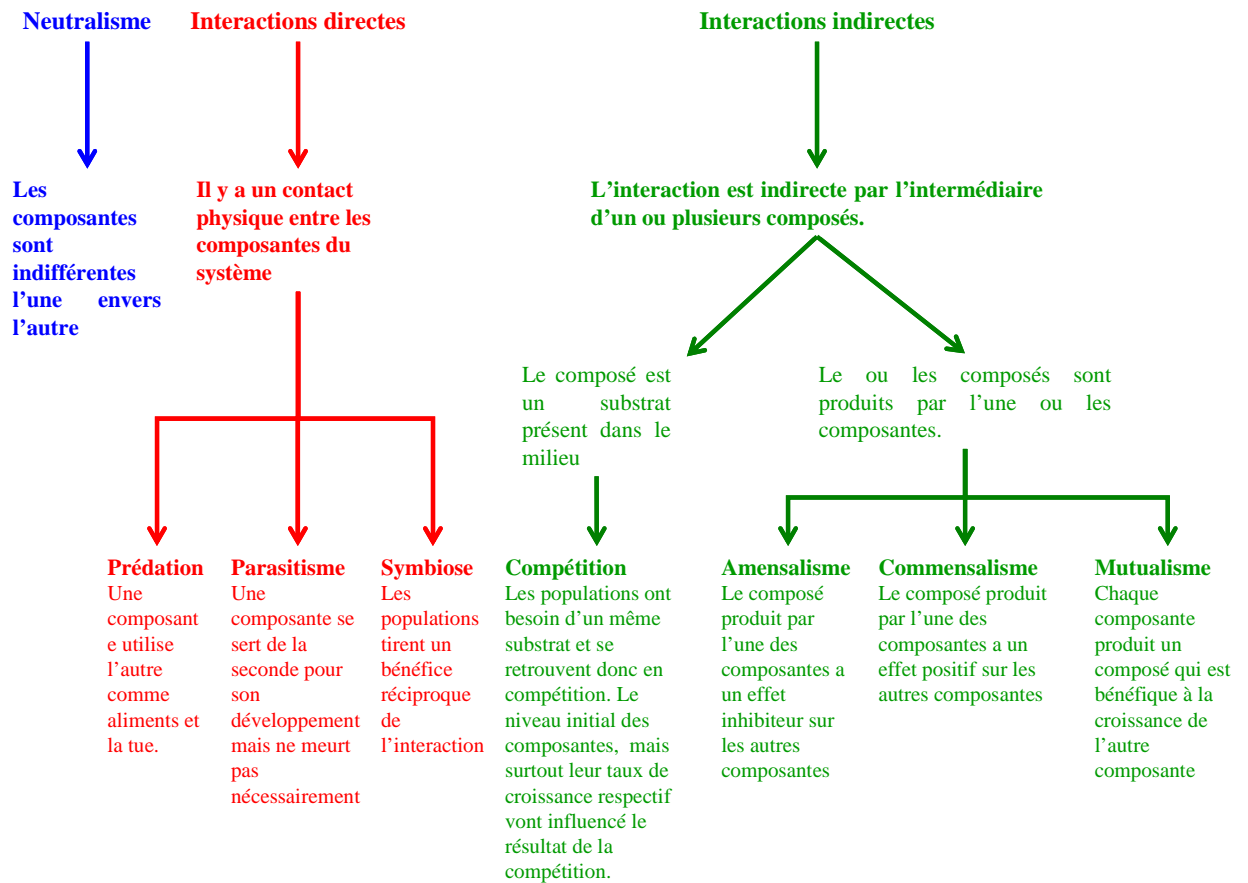
Lorsque plusieurs groupes de micro-organismes partagent un environnement, comme c'est le cas dans la plupart des situations naturelles, il s'établit nécessairement des interactions entre ces différents groupes qui constituent chacun une composante d'un système. Généralement à connotation abiotique, le terme de composante peut sembler mal approprié, mais il permet de ne pas présager la nature des groupes étudiés. En effet, les interactions peuvent aussi bien s'établir entre des populations différentes, moisissures et bactéries par exemple, qu'au sein même d'une population entre différentes espèces, mais également entre différentes souches d'une même espèce. Selon leur nature, ces interactions diffèrent et peuvent être classées selon deux principaux critères : la présence ou l'absence de contact physique entre les composantes et la conséquence de l'interaction : (inhibitrice, activatrice...) sur chacune des composantes (Figure 5).

Dans le cadre œnologique les principales interactions décrites sont des interactions indirectes de type amensalisme (Pommier et *al.* 2005) ou de type compétitive (Yap et *al.* 2000, Comitini et *al.* 2004), mais aussi des interactions directes de type parasitisme (Nissen et *al.* 2003a). Néanmoins, il est probable, compte tenu de l'importante diversité microbienne, que d'autres types d'interactions soient également impliqués et encore inconnus.

La connaissance des interactions est en effet limitée par les méthodes d'analyses utilisées. Les principales difficultés sont de reproduire, au laboratoire, le plus fidèlement possible les conditions environnementales réelles de l'interaction et de pouvoir discriminer facilement les composantes étudiées sans biaiser l'interaction.



## Etude bibliographique



**Figure 5:** Classification des différentes interactions microbiennes possibles.

### IV.2 Les moyens d'études des interactions.

Lors de l'étude des interactions, l'utilisation des milieux solides permet de faciliter la distinction entre les populations mises en jeu. D'un point de vue pratique, cette méthode consiste à appliquer une population sur la boîte, en tapis à la surface, ou, bien directement dans la gélose, puis d'appliquer l'autre composante sur la boîte. Cette méthode est basée sur le même principe que les antibiogrammes. Les interactions peuvent être estimées par l'évaluation du halot qui entoure chaque application de la seconde population (Lemaesquier 1987). Mais la neutralité du milieu « solide » qui agit nécessairement sur la diffusion des cellules et des composés produits est loin d'être évidente. De plus, cette analyse ne peut être envisagée que pour une description du phénomène. Il est quasiment impossible de pouvoir déterminer la nature exacte de l'interaction. Cela élude également tout critère cinétique. Finalement, dans la plupart des cas les résultats ainsi obtenus sont difficilement reproductibles.

---

### *Etude bibliographique*

Les interactions en milieux liquides sont plus proches de la réalité, mais leur utilisation peut être limitée par la capacité de discerner chacune des populations, notamment lorsque l'on travaille au niveau des souches d'une même espèce. Pour s'affranchir de cette difficulté il est possible de séparer temporellement ou physiquement les composantes. Ces méthodes excluent évidemment l'étude des interactions directes.

Les croissances séquentielles ont pour avantage de ne faire intervenir qu'une composante en même temps. Il s'agit d'étudier l'impact de la croissance préalable d'une composante sur celle de la seconde introduite après la première. Cette méthode est particulièrement intéressante en œnologie lorsque l'on étudie des interactions entre des populations qui interviennent à différents moments de la vinification. C'est par exemple le cas pour l'étude de compatibilité des souches de *S. cerevisiae* et des souches d'*O. oeni* susceptibles d'être utilisées comme levains pour effectuer, respectivement, la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique.

Lorsque la présence simultanée des deux composantes est requise, la séparation peut se faire à l'aide d'une membrane filtrante qui assure le passage des composés chimiques et l'homogénéité du milieu dans les deux compartiments, tout en retenant de part et d'autre les populations mises en jeu (Albasi et al. 2002). Mais ce procédé ne permet pas d'obtenir des paramètres de croissance globaux pour les deux compartiments. Les paramètres cinétiques restent spécifiques de chaque élément réactionnel (Salgado et al. 2000).

Pour ce qui concerne l'étude des interactions directes, les méthodes d'identification des souches et des espèces par la biologie moléculaire fournissent des alternatives possibles pour discerner et caractériser les composantes du système. L'idéal est de mettre simultanément les différentes composantes étudiées en culture dans un milieu liquide correspondant à l'environnement naturel de l'interaction étudiée tout en pouvant identifier, dénombrer et caractériser individuellement chaque population.

Les efforts portés sur l'étude des interactions microbiennes sont fondamentaux car il est plus pertinent d'apprécier les activités microbiennes prises dans leur ensemble, comme cela est le cas dans la réalité, plutôt que séparément. Même les altérations microbiennes peuvent résulter d'une action conjointe de plusieurs populations.

## **V Les altérations microbiennes.**

Toutes les interventions microbiennes ne sont pas bénéfiques à la qualité du vin. Certaines conduisent à des modifications physiques (couleur, viscosité, limpidité) et / ou aromatiques préjudiciables. Elles peuvent aussi agir sur l'innocuité du vin vis-à-vis de la santé des consommateurs. Ces altérations peuvent résulter de l'action de bactéries et de levures. Elles confirment l'importance des suivis microbiologiques globaux durant le processus d'élaboration du vin.

### **V.1 Les altérations physiques du vin.**

La production d'une quantité importante d'exopolysaccharides par certaines espèces et souches de BL donne un aspect visqueux au vin très facilement observable. Ce phénomène est appelé « maladie de la graisse ou des vins filants » (Lonvaud-Funel et Joyeux 1988). Il concerne également la plupart des boissons fermentées comme la bière (Williamson 1959) et le cidre (Whiting 1975), mais aussi des produits de l'industrie laitière (Cerning 1995). Il est la conséquence du développement d'espèces bactériennes aussi diverses que *Lactobacillus brevis* (Pidoux et al. 1988), bacille hétérofermentaire, et que *Pediococcus pentosaceus*, coque homofermentaire (Manca de Nadra et Strasser de Saad 1995). Dans le vin, les principales espèces incriminées sont *Pediococcus parvulus* (*P. parvulus*) et *Pediococcus damnosus* (*P. damnosus*). La composition des polysaccharides synthétisés dépend de l'espèce microbienne et de la source de carbone utilisée (Smitinont et al. 1999). Des études génétiques ont démontré que chez *P. damnosus*, des souches productrices d'exopolysaccharides portent un plasmide dont la présence et la conservation sont fonction des conditions environnementales. Sa détection par des techniques d'hybridations ou de PCR permet d'estimer la proportion des souches d'altération parmi la microflore totale du vin (Walling et al. 2001). Les autres altérations physiques des vins imputables au développement microbien concernent la couleur des vins. Par exemple, la levure *B. bruxellensis* (Mansfield 2002) et certaines bactéries lactiques (Vaquero et al. 2004) présentent une activité hydrolytique envers les tanins.

## V.2 Les altérations aromatiques du vin.

Outre la production d'acide acétique, se traduisant par une dureté et un goût de « piqué », de nombreuses et diverses activités microbiennes altèrent les qualités aromatiques du vin. Les plus notables concernent les BL (Figure 6). Mais les levures ne sont pas en reste (Figure 7). Les efforts d'hygiène, le développement des méthodes de détection ont diminué la plupart de ces accidents microbiens autrefois courants et redoutés. Mais certains deviennent plus fréquents, ou sont moins bien tolérés par les dégustateurs. Ils sont alors la cible des études microbiologiques.

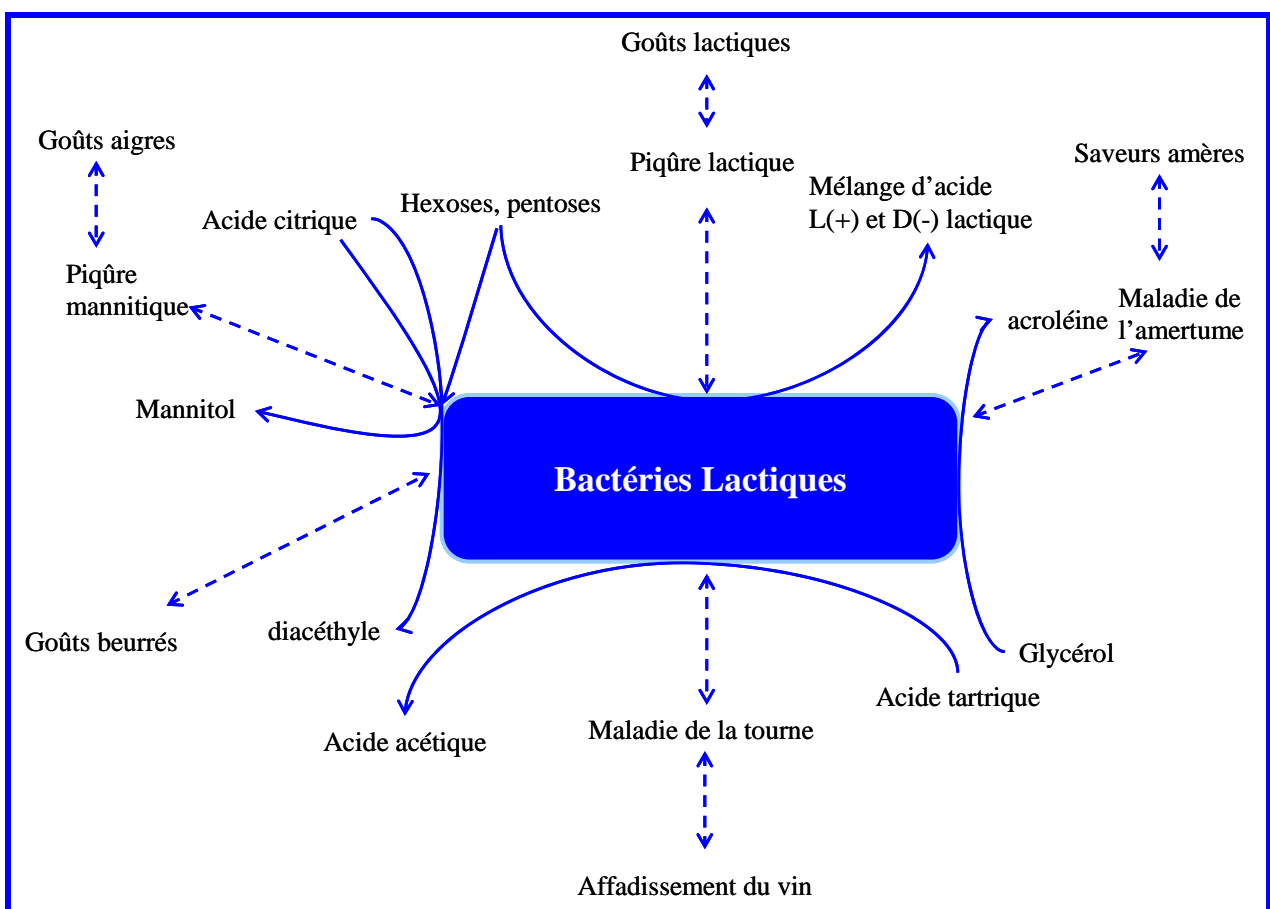
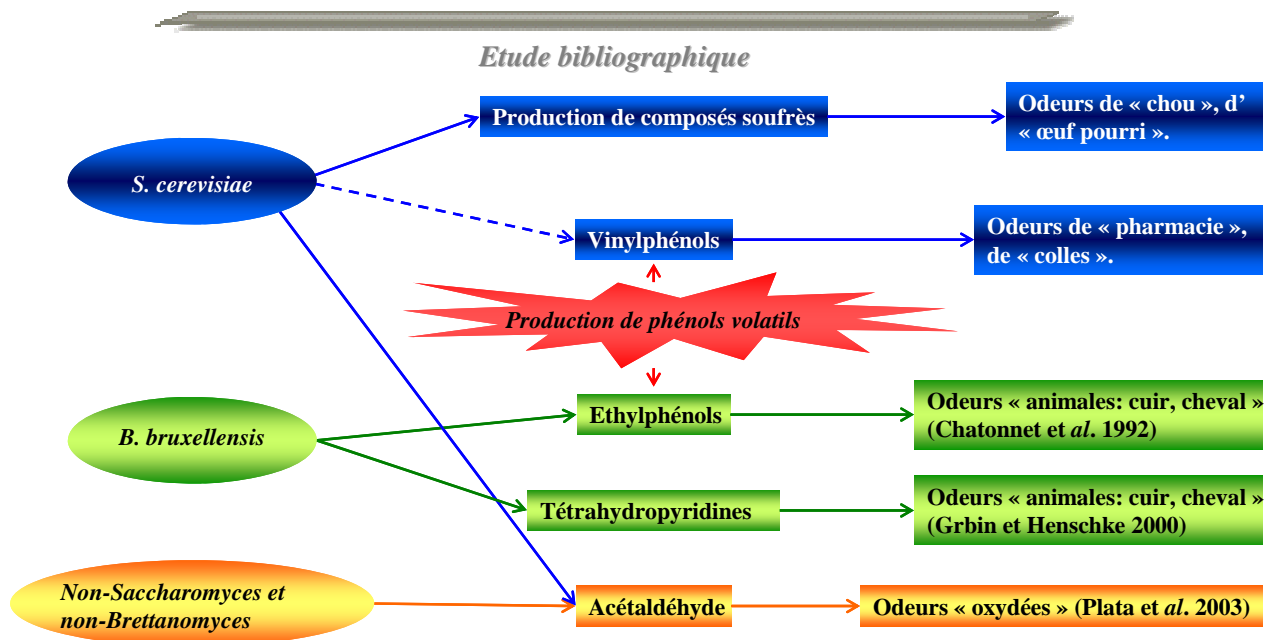


Figure 6: Principales activités préjudiciables des bactéries lactiques du vin.



**Figure 7:** Altérations des vins par les levures.

### V.3 Les altérations toxicologiques du vin.

Certains métabolismes microbiens sont à l'origine de composés susceptibles d'affecter la santé du consommateur. C'est le cas des amines biogènes, produites par décarboxylation de certains acides aminés. Chez les sujets sensibles, elles provoquent des maux de têtes, des complications respiratoires, des palpitations cardiaques, des réactions allergiques et des problèmes de tensions artérielles. Dans le vin les principales amines biogènes détectées sont l'histamine, la tyramine et la putrescine. Leurs teneurs varient selon la région de production (Souffleros et *al.* 1998), le pH du vin (Lonvaud-Funel et Joyeux 1994), les substrats disponibles (Konings et *al.* 1997) et surtout des espèces et des souches de bactéries lactiques (Coton et *al.* 1998). Les connaissances moléculaires (Lonvaud-Funel 2001) ont permis la mise au point de tests d'identification des espèces et souches de BL productrices d'amines biogènes. Ils permettent le cas échéant d'agir et de limiter la production de ces composés dont la teneur maximale autorisée est soumise à la réglementation.

Bien que les doses mesurées dans les vins soient régulièrement en deçà des quantités carcinogènes (Bertrand et Barros 1988), le carbamate d'éthyle est le second composé produit dans le vin par les micro-organismes susceptible d'affecter la santé des consommateurs (Pound et Lawon 1976). Il peut être produit notamment par la bactérie *O. oeni* à partir d'arginine, mais surtout par la levure *S. cerevisiae* à partir de l'urée.

#### **V.4 La problématique *Brettanomyces*.**

Décrite dans la plupart des boissons fermentées comme le cidre (Le Quere et Drilleau 1996), la bière (Gilliland 1961), le kéfir (Wyder et *al.* 1997), le kombucha (Ai et *al.* 2004), l'Haipao (thé fermenté) (Liu et *al.* 1996), l'espèce *B. bruxellensis* a été détectée dans le vin dès le début de l'œnologie moderne (Peynaud et Domercq 1956). Mais ce n'est que récemment que la microbiologie œnologique s'intéresse au problème des *B. bruxellensis* et des phénols volatils. Dès les premières investigations menées dans les vins rouges sur ces composés désagréables, *B. bruxellensis* a été la principale espèce microbienne incriminée. Elle a, par la suite, attirée toutes les attentions des microbiologistes du vin.

Dans le vin, les principaux produits de *B. bruxellensis* influençant les qualités sensorielles sont les phénols volatils : le 4-vinylphénol, le 4-vinylgâïacol, le 4-ethyphénol et le 4-ethylgâïacol (Suárez et *al.* 2006). Des descripteurs aussi variés que « médicinal », « fumé », « animal », « épicé » sont utilisés pour qualifier les odeurs conférées ces composés. Mais dans tous les cas il est admis qu'ils provoquent une perte du caractère fruité et des arômes variétaux, ce qui est toujours regrettable.

La production de ces molécules implique l'activité séquentielle de deux enzymes sur les principaux acides hydroxycinnamiques : l'acide férulique et l'acide p-coumarique, naturellement présents dans la vacuole des cellules de raisins. La première enzyme, l'hydroxycinnamate décarboxylase transforme ces acides en hydroxystyrènes, les composés vinyloxy, qui sont ensuite réduits en composés éthyles sous l'effet de la vinylphénol réductase.

D'un point de vue physiologique, l'intérêt de ces transformations est encore l'objet d'interrogations. Deux hypothèses principales tentent d'expliquer pourquoi *B. bruxellensis* catabolise les acides hydroxycinnamiques. La première affirme que la levure puise de l'énergie à partir de cette décarboxylation / réduction sous la forme d'un gradient d'électrons permettant la production d'ATP. La seconde théorie plaide pour une réaction de détoxification. Il est fréquent que les cellules microbiennes dégradent des composés inhibiteurs pour se protéger. *B. bruxellensis* dégraderait les acides phénoliques par décarboxylation pour les éliminer car ces composés sont toxiques pour la cellule puisqu'ils altèrent la membrane plasmique en s'intercalant entre les phospholipides et diminuent les

fonctions essentielles de cette dernière. Une combinaison de ces deux hypothèses peut également être suggérée.

Les seuils de perception des phénols volatils décrits sont très variables, généralement entre 450 et 620 µg/L (Chatonnet et *al.* 1999). Mais il est difficile de définir une concentration critique pour tous les vins car la perception des caractères « *Brett* » dépend de la structure aromatique globale du vin et de son âge. Les vins jeunes sont les plus sensibles à l'inverse des grands vins rouges (Arvik et Henick-Kling 2005).

Des études sur le métabolisme de certaines espèces de bactéries lactiques (van Beek et Priest 2000, Barthemebs et *al.* 2001) et de levures (Thurston et Tubb 1981) laissent supposer que d'autres espèces peuvent aussi participer à la production de phénols volatils dans le vin.

En fait de nombreux préjugés établis lors des premiers travaux réalisés sur le sujet ont semble-il occulté de nombreuses interrogations fondamentales sur les phénols volatils. Il est probable que de nombreuses pistes ont été délaissées en privilégiant uniquement *B. bruxellensis*, et en considérant son développement comme la conséquence exclusive d'un manque d'hygiène au chai. En effet même si *B. bruxellensis* est la principale espèce productrice de phénols volatils, elle évolue rarement seule. Des interactions sont possibles avec les autres micro-organismes et avec la matière première. Certaines pratiques oenotechniques peuvent également favoriser, ou au contraire restreindre, la multiplication de *B. bruxellensis* et donc son activité de production. Tous ces paramètres doivent être pris en compte pour améliorer la compréhension de la « problématique *Brett* » et permettre de proposer des réponses précises et efficaces aux interrogations des vinificateurs (Figure 8).

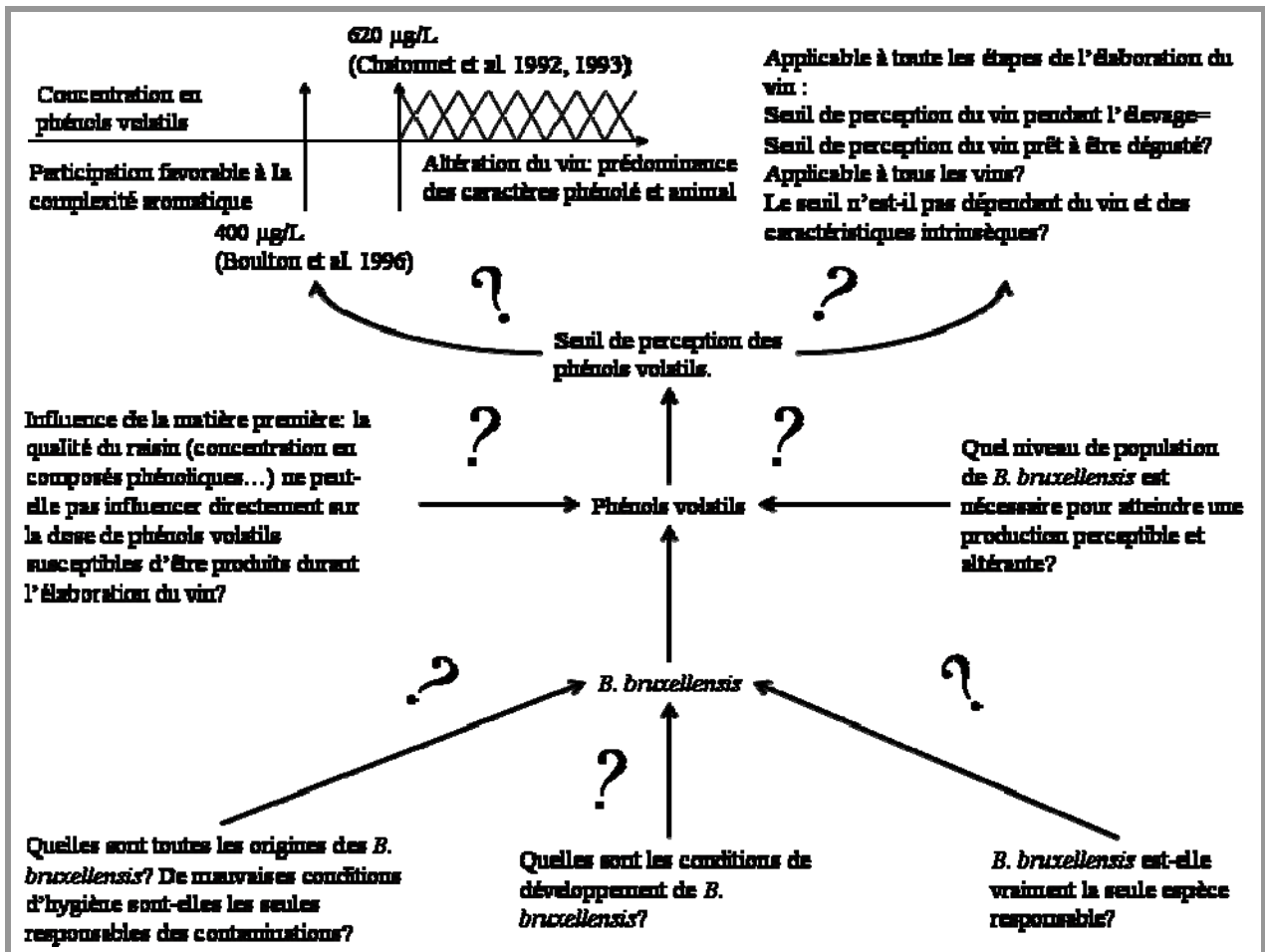


Figure 8 : Bilan des problématiques laissées en suspens au sujet des phénols volatils et la levure *B. bruxellensis* dans les vins rouges.

## V.5 Les moyens de lutte contre les micro-organismes d'altération.

Outre l'évolution aromatique, un objectif fondamental de l'élevage est la diminution progressive de la charge microbienne du vin pour réduire les risques d'altération et de stabiliser le produit.

Les opérations de sulfitage, de soutirage et de collage doivent permettre d'éliminer les espèces fermentaires résiduelles et de prévenir le développement des micro-organismes d'altération. Ces opérations conventionnelles ne sont pas toujours suffisantes. Elles sont complétées dans les cas les plus difficiles par des traitements appropriés. Il peut s'agir de traitements physiques ou de traitements chimiques. L'avancement des connaissances de la physiologie microbienne participe à l'optimisation de ces traitements dont l'efficacité



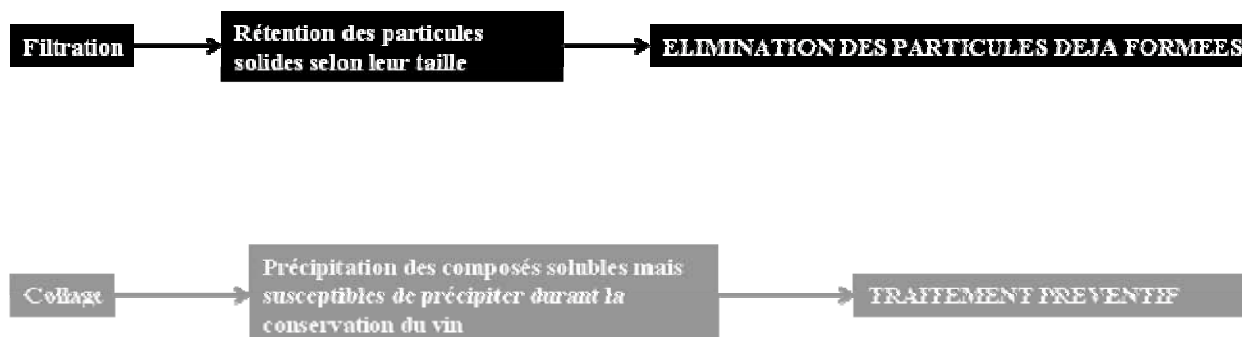
antimicrobienne est primordiale, mais qui doivent également faire preuve de neutralité aromatique. Pour certains, les traitements chimiques sont préférables aux traitements physiques suspectés être trop agressifs et moins spécifiques.

### V.5.1 Les méthodes physiques.

Parmi les méthodes physiques, la filtration permet une soustraction des micro-organismes en se basant sur la taille des cellules microbiennes tandis, que les traitements thermiques ont pour but d'inactiver et de tuer les cellules microbiennes par chauffage.

#### - Les filtrations.

L'objectif principal de la filtration est de clarifier le vin. Elle favorise la limpidité en éliminant les particules colloïdales déjà formées. Pour cela elle est fréquemment associée au collage (Figure 9).



**Figure 9:** Le collage et la filtration sont initialement des méthodes de clarification des vins.

L'état physique d'une cellule microbienne est difficilement caractérisable : solide, liquide, fluide ou cristal-liquide... Mais les micro-organismes peuvent être considérés comme des particules colloïdales dont la taille varie selon le type, l'espèce, le cycle et l'état cellulaire entre quelques dizaines de nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres. Ils peuvent être retenus lors des opérations de filtrations.

Les filtrations les plus courantes au chai sont la filtration sur terres et la filtration à plaques (Figure 10). La filtration sur terre utilise des minéraux fossiles, lavés, broyés, calcinés et calibrés. Ils constituent des tamis de granulométrie variable. Le principe est la diffusion frontale du vin à travers la terre. Selon sa nature, la quantité de terre utilisée et les barèmes de pression appliqués, elle est caractérisée par sa perméabilité mesurée par le débit du filtre et à sa capacité de rétention. La filtration sur terre est traditionnellement utilisée pour accélérer la clarification naturelle des vins les plus troubles, comme les vins de presse et les vins de lies, durant la période d'élevage, et notamment avant leur réincorporation dans le vin de goutte naturellement plus limpide.

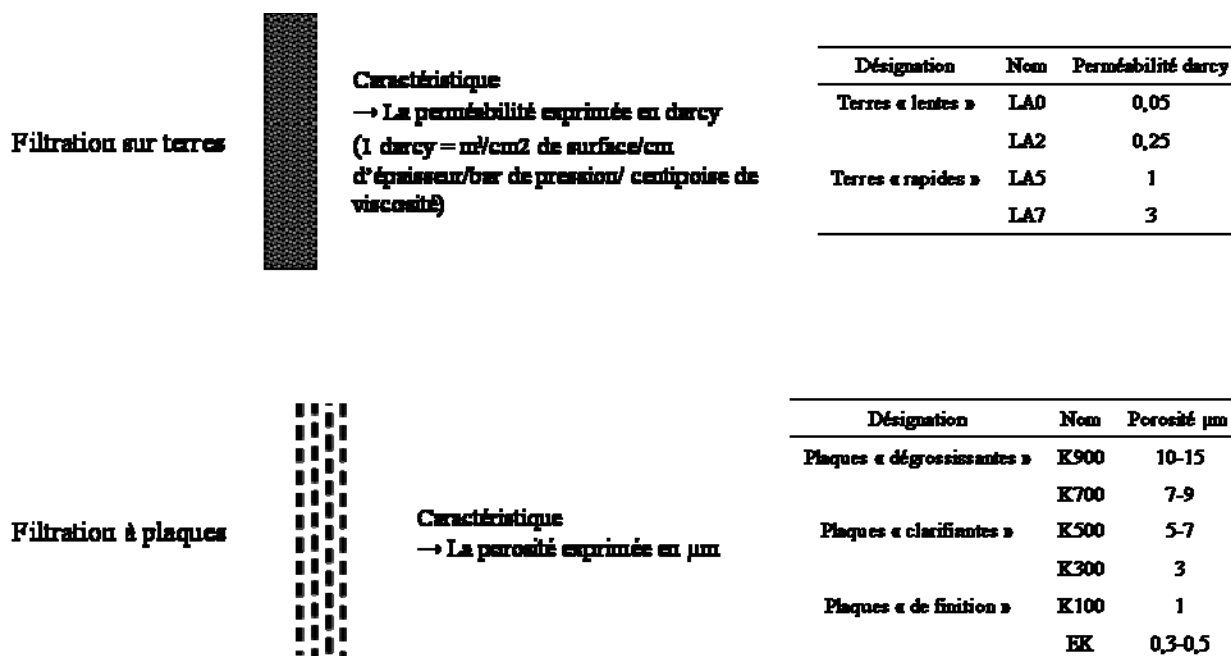


Figure 10: Nature et caractéristiques des filtrations rencontrées.

Le principe de la filtration sur plaque est totalement différent. Les plaques sont constituées de fibres de cellulose, caractérisées par leur porosité. C'est la taille réelle des pores qui les constituent. La porosité détermine la finesse de la filtration. Le diamètre maximal des pores d'une plaque définit le seuil de rétention de celle-ci. C'est la plus petite particule susceptible de diffuser au travers. L'avantage de la filtration sur plaques est de proposer une gamme très large de plaques amovibles de porosité différentes qui permettent de répondre à des besoins très divers. Par exemple, la filtration sur plaques est fréquemment pratiquée en fin d'élevage avant la mise en bouteilles comme ultime étape de clarification.

- **Le traitement thermique.**

La sensibilité des micro-organismes à la chaleur est connue depuis longtemps. Elle est utilisée dans divers procédés (flash-pasteurisation, thermolyse...) de stabilisation microbiologique des produits alimentaires (Denis *et al.* 2006), notamment pour les produits laitiers et les jus de fruits. Au niveau cellulaire, l'augmentation brutale de la température se traduit par une modification des propriétés de fluidité de la membrane plasmique essentielle à certaines activités vitales pour la cellule (transporteurs, synthèse d'ATP...).

En augmentant fortement la température du vin (entre 65 et 75°C) pendant quelques dizaines de secondes, il est possible de réduire la population en micro-organismes. Quelques travaux ont été réalisés sur la résistance thermique des principaux micro-organismes œnologiques comme les bactéries lactiques (Lonvaud-Funel 1998) et certaines levures (Deveze et Ribéreau-Gayon 1977, Couto *et al.* 2005). Cette résistance s'exprime par le calcul de deux paramètres. Le temps de réduction décimale, D, qui est le temps nécessaire pour réduire de 90% le nombre initial de micro-organismes à une température donnée. Le paramètre z est la différence de température qui permet de diviser la valeur de D par dix. Une souche microbienne sera d'autant plus thermorésistante que ses paramètres D et z seront importants. Evidemment, ces paramètres sont fonction de l'espèce, de la souche, de son état physiologique mais aussi des propriétés physico-chimique du vin comme le pH (Farkas 1997), le TAV (Leao et Van Uden 1982), la présence de sucres résiduels (Splittstoesser *et al.* 1975) et la teneur en acides phénoliques du vin (Stead 1995). Pour les micro-organismes œnologiques, les valeurs trouvées dans la littérature sont très variables. Par exemple le paramètre  $D_{46^{\circ}\text{C}}$  (78,8 min dans une solution de NaCl) de l'espèce *Lactobacillus hilgardii* est plus de cinq fois plus important que celui de l'espèce *Lactobacillus fructivorans* (14,2 min) (Lonvaud-Funel 1998). Pour l'espèce *B. bruxellensis*, Couto *et al.* (2005) ont remarqué que suivant le stade de croissance des cellules, le paramètre  $D_{45^{\circ}\text{C}}$  pouvait varier du simple au triple et être maximal en fin de phase stationnaire. Enfin il semblerait que plus le TAV du vin est élevé plus la thermosensibilité des cellules est réduite. L'effet destructurant de l'éthanol vis-à-vis de la membrane des cellules microbiennes s'ajouterait à l'agression par la chaleur.

Ces variations font que les réelles conditions de mises en œuvre de la pasteurisation à l'échelle du chai (température, temps de passage, nombre d'échangeurs...) sont encore l'objet d'expérimentations. Il n'existe pas à l'heure actuelle de protocole uniformément adopté par

les professionnels. Des essais sont tout de même réalisés. La technique du traitement thermique peut-être mise en place pour traiter une contamination ponctuelle pendant l'élevage, pour stabiliser les vins sucrés, mais également avant la mise en bouteilles en remplacement d'une filtration stérile par exemple.

D'un point de vue organoleptique, la «flash-pasteurisation» ne semble pas avoir d'incidence négative. Elle aurait même quelques avantages car elle contribuerait à la stabilité tartrique par dissolution des microcristaux et à la destruction des polyphénols oxydases.

### **V.5.2 Les méthodes chimiques.**

Le recours à des composés chimiques, comparables aux conservateurs couramment utilisés en agro-alimentaire, peut également être envisagé pour limiter le développement des micro-organismes dans le vin.

Le SO<sub>2</sub>, précédemment évoqué, est incontournable en œnologie. Son action est fortement dépendante du pH et de la combinaison avec les composés carbonylés du vin. Utilisé de façon abusive, il confère au vin des odeurs désagréables et provoque des risques d'allergies chez le consommateur (Stevenson et Simon 1981). Par conséquent sa dose maximale d'utilisation est réglementée (Tableau VII).

**Tableau VII.** Doses maximales de SO<sub>2</sub> total autorisées.

<b>Concentration en sucres</b>	<b>Inférieure à 5 g/L</b>	<b>Supérieure à 5 g/L</b>
Vins rouges	160 mg/L	210 mg/L
Vins rosés	210 mg/L	260 mg/L
Vins blancs	210 mg/L	260 mg/L

Des alternatives doivent être étudiées pour limiter les doses de SO<sub>2</sub> mais aussi pour assurer la stabilisation microbiologique dans les cas les plus difficiles lorsqu'il n'est pas suffisant aux doses limites légales.

Le vinificateur peut utiliser l'acide sorbique. La dose maximale d'acide sorbique autorisée est de 200 mg/L. Mais son activité est limitée aux levures, et sa dégradation possible

---

### *Etude bibliographique*

par les bactéries lactiques en 2-éthoxy-3,5-hexandiène confère une odeur de géranium peu appréciée (Crowell et Guymon 1975).

Dans les jus de fruits, le chitosan (Roller et Covill 1999) et la vanilline (Cerrutti et Alzamora 1996) se sont révélés particulièrement efficaces pour contrôler le développement des levures d'altération.

Le chitosan est un polysaccharide dérivé de la chitine. Il interagit avec les résidus anioniques de la surface externe de la structure pariétale et limite la diffusion de solutés essentiels comme les sucres et les métaux indispensables (Ralston et *al.* 1964). Lors d'essais sur *B. bruxellensis* il s'est avéré efficace, mais à des doses élevées comprises entre 3 et 6 g/L (Gomez-Rivas et *al.* 2004). De plus, l'action antimicrobienne du chitosan est fortement réduite par la présence d'éthanol dans le vin, bien qu'il puisse être bénéfique d'un point de vue physico-chimique (Bornet et Tesseidre 2005).

La vanilline, composé naturellement présent dans le bois des barriques (Barbe et Bertrand 1996), qui présente une fonction phénolique interagissant avec les enzymes impliquées dans les réactions d'oxydoréduction essentielles à la production d'énergie cellulaire (Conner et *al.* 1984). Ses propriétés amphiphiles perturbent aussi l'organisation de la membrane cytoplasmique en s'intercalant entre les phospholipides membranaires (Rico-Munoz et *al.* 1987). Cependant, la vanilline peut être dégradée par certaines bactéries et levures (De Wulf et *al.* 1986) qui lui sont donc plus résistantes. C'est notamment le cas des espèces du genre *Brettanomyces* (Eldin et *al.* 1995). D'autre part, la vanilline est un composé hautement volatile dont l'ajout à des doses susceptibles d'inhiber les micro-organismes (30 à 100 mg/L), près de mille fois supérieures aux doses naturellement présentes dans le vin (entre 20 et 200 µg/L), modifierait fortement les caractères aromatiques du vin.

L'emploi d'antibiotiques fait également l'objet d'expérimentations. C'est le cas de la nisine qui est naturellement produit par la bactérie *Lactococcus lactis* (Hurst 1981). Elle inhibe les bactéries lactiques d'altération (Ogden et Waites 1986) en perforant leur membrane cytoplasmique (Delves-Broughton 2005). Mais certaines souches sont particulièrement résistantes car elles possèdent une activité nisinase (Thompson et *al.* 1985). De ce fait, l'emploi de nisine doit être envisagé plutôt comme une pression de sélection que comme un

---

### *Etude bibliographique*

réel agent de stabilisation (Daeschel et *al.* 1991). En outre son action est plus que réduite chez les levures (Radler 1990).

L'action antimicrobienne des esters d'acides pyrocarboniques est reconnue depuis plusieurs années. Ils agissent en inhibant les principales enzymes du métabolisme énergétique (Ovadi et Keleti 1969). Le diéthylpyrocarbonate (DEPC), ou diéthylidcarbonate (DEDC), a été le premier étudié. Malgré sa remarquable efficacité sur les levures et sur les bactéries son utilisation a été interdite par la *Food and Drug Administration* dès 1972 à cause des quantités élevées de carbamate d'éthyle qu'il formait.

Le diméthylidcarbonate (DMDC), commercialisé sous le nom de Velcorin® et répertorié sous la désignation du conservateur E242, semble présenter le même champ d'action que le DEPC. Les quantités de méthanol et de carbamate d'éthyle sont nettement moins importantes et inoffensives pour le consommateur. Le DMDC agit sur les enzymes glycolytiques, principalement l'alcool déshydrogénase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase par méthoxycarbonylation des résidus nucléophile (imidazoles, amines, thiols) de ces enzymes (Temple 1978). L'utilisation modérée de DMDC ne présenterait pas de désavantage aromatique (Ough 1983).

## **PARTIE III. LES METHODES D'ETUDES EN ECOLOGIE MICROBIENNE.**

### **I Les méthodes culture-dépendantes.**

Depuis les premières observations de Pasteur (1866), le suivi microbiologique des vinifications et de l'élevage des vins a fait l'objet de nombreux travaux de recherches. Les méthodes classiques, observation microscopique et isolement sur milieux de culture sélectifs, ont permis de visualiser les cellules et de dénombrer les différentes populations microbiennes (Lafon-Lafourcade et Joyeux 1979). Classiquement ce suivi porte sur les populations de levures totales (LT), de levures non-*Saccharomyces* (NS), de bactéries lactiques (BL) et de bactéries acétiques (BA) et l'utilisation de milieux nutritifs sélectifs. Des milieux de culture plus performants sont développés pour permettre l'enrichissement des espèces minoritaires (Van der Westhuzen et *al.* 2000, Redezepovic et *al.* 2002). L'utilisation des techniques de bioluminescence (Lonvaud-Funel et Joyeux 1982) et d'épifluorescence (Froudière et *al.* 1990) a permis de révéler l'existence de populations Viables Non Cultivables (VNC) dans le vin (Millet 2001).

Concernant l'identification des espèces, des tests phénotypiques (consommation de certains sucres, qualités respiratoires...), notamment par l'utilisation de milieux commerciaux miniaturisés compilant une série de tests normalisés (API, BIOLOG), ont permis d'identifier les principales espèces microbiennes du vin. Mais les résultats de ces tests sont directement liés à l'état physiologique des cellules et donc souvent peu reproductibles. En effet, une souche répond différemment aux tests phénotypiques suivant son stade de croissance et les conditions de culture. De plus, lors de la résolution des complexes microbiens, outre l'exclusion des cellules VNC, le passage par une étape de culture favorise les espèces les mieux adaptées aux conditions de croissance.

En fait, la comparaison de l'identification des micro-organismes par l'intermédiaire de méthodes « culture-dépendantes » et de techniques « culture-indépendantes » montre que les espèces détectées et identifiées diffèrent. Le passage par une étape préliminaire de culture entraîne, dans la plupart des cas, une sous estimation de la diversité microbienne (Masco et *al.* 2005).

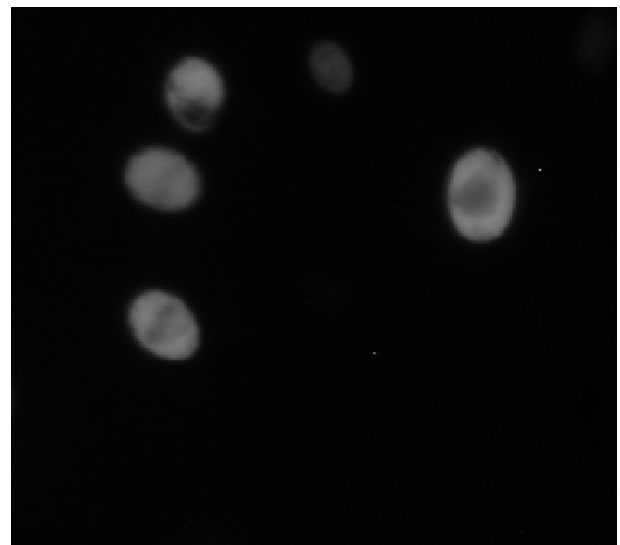
## II Les méthodes culture-indépendantes.

### II.1 Les apports de la biologie moléculaire.

L'épifluorescence est une méthode rapide, qui ne nécessite pas de culture préalable, très efficace pour visualiser et dénombrer les cellules viables. Mais, malgré la forme typique de certaines espèces, comme la forme ronde des *Saccharomyces* ou ovales des *Brettanomyces* (Larue et *al.* 1991) (Figure 11), les critères morphologiques ne sont pas suffisamment discriminants pour assurer l'identification. De plus le seuil d'observation des cellules microbiennes viables dans le vin par épifluorescence est relativement élevé :  $10^2$ - $10^3$   $\phi$ /mL. Il ne peut pas être abaissé car les composés phénoliques colorés masquent la visualisation des cellules viables et des particules colloïdales du raisin perturbent l'étape de filtration préalable à l'observation.



*Brettanomyces bruxellensis*



*Saccharomyces cerevisiae*

**Figure 11:** Observation des cellules de formes caractéristiques : allongées et fines pour *B. bruxellensis* (à gauche) et arrondies et plus volumineuses pour *S. cerevisiae* (à droite).



---

### *Etude bibliographique*

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de s'affranchir des inconvénients des méthodes dépendant des cultures et des méthodes phénotypiques en basant l'identification des espèces microbiennes sur des similitudes, ou des dissimilitudes, de séquences spécifiques d'ADN. Ce sont des paramètres intrinsèques et caractéristiques d'une l'espèce. Ils sont indépendants de l'état physiologique des populations.

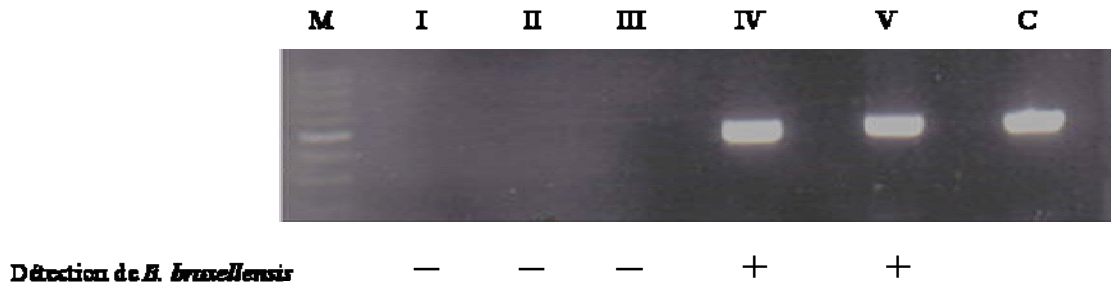
Le caractère évolutif des gènes ribosomiaux (faible taux de transfert latéral) est reconnu. Leur qualité phylogénétique (alternance de régions conservées et de régions variables) est couramment utilisée lors des études taxonomiques et d'identification des espèces microbiennes (Amann et Ludwig 2000). Des sondes marquées s'hybridant à une séquence d'ADN ribosomal spécifique d'une espèce ont été développées afin d'identifier les bactéries lactiques du vin (Lonvaud-Funel et *al.* 1991, Sohier et Lonvaud-Funel 1998). Mais la sensibilité de cette méthode est limitée. Des problèmes d'hybridations croisées entre certaines espèces existent notamment entre les différentes espèces du genre *Pediococcus* et *Lactobacillus*.

## **II.2 L'amplification des séquences d'intérêt.**

En 1985 Saiki et *al.* ont révolutionné les études de biologie moléculaire en développant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR: *Polymerase Chain Reaction*). Basée sur l'utilisation d'une polymérase thermostable, la *Taq* polymérase, la méthode consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN afin de le rendre détectable. Ce fragment doit être encadré par deux séquences consensus qui servent d'amorces pour la polymérase.

Les séquences consensus spécifiques d'une espèce permettent de mettre en évidence cette espèce au sein d'un mélange. Des couples d'amorces ont été dessinés pour détecter les principales espèces œnologiques : *S. cerevisiae* (Pearson et McKee 1992), *O. oeni* (Divol et *al.* 2003), et *B. bruxellensis* (Ibeas et *al.* 1996) (Figure 12).

*Etude bibliographique*



**Figure 12:** Exemple de détection de *B. bruxellensis* par PCR spécifique d'espèce sur des ADN extraits du vin en cours de fermentation alcoolique (I, II, III, IV et V). C : ADN de la souche IOEB 0447 de *B. bruxellensis*.

La PCR peut également être utilisée pour identifier toutes les espèces présentes dans un mélange. Elle fournit, alors, une estimation qualitative (nature des espèces) et quantitative (nombre d'espèces) de la diversité microbienne. Pour cela, l'amplification est basée sur l'utilisation de courtes séquences consensus présentes chez toutes les espèces qui assurent l'amplification d'une séquence divergente selon l'espèce. Cette divergence peut s'exprimer en terme de taille, de séquence nucléotidique, ou bien une combinaison de ces deux paramètres (Figure 13).

	Exemples	Avantages	Inconvénients
<b>Séquence</b> DGGE <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> TGGE <i>Temperature Gradient Gel electrophoresis</i>	Levures: Cocolin et al. 2000 Bactéries: Ercolini 2004	Méthodes très sensibles (des différences d'une base peuvent être détectée sur des fragments de plusieurs centaines de paire de bases) pour l'étude des mélanges complexes d'espèces (Muyzer 1999).	Temps de l'analyse: PCR (≈2 h) et migration (jusqu'à 16 h)
<b>Taille</b> RFLP <i>Restriction Length Polymorphism</i> LP <i>Length Polymorphism</i>	Levures: Esteve-Zarzoso et al. 1999 Bactéries acétiques: Gonzalez et al. 2006 Bactéries lactiques: Claisse et al. 2006  Levures: Valente et al. 1996 Bactéries: Lazzi et al. 2004	La combinaison des deux critères discriminants élargit le pool d'espèces identifiables (limitation du problème de co-migration)  Méthode rapide : temps de la PCR (≈2 h) et temps de la migration (≈30 min)	A une espèce correspond un profil de plusieurs bandes. Lors de l'analyse de mélange complexes d'espèces les profils sont très difficilement interprétables. En outre, cela ne permet pas d'identifier des espèces inconnues car on ne peut extraire du gel que les produits de la digestion  La méthode est limitée à quelques espèces. Au sein d'un même genre, plusieurs espèces peuvent présenter des amplicons de longueurs similaires ou très proches. Elle convient au mélange simple d'espèces (co-culture <i>S. cerevisiae</i> / <i>B. bruxellensis</i> ). Pour des mélanges plus complexes les profils sont difficilement interprétables.

**Figure 13:** Références, avantages et inconvénients des principales méthodes moléculaires d'identification des micro-organismes.

---

### *Etude bibliographique*

Lorsque le paramètre discriminant est la taille de la séquence (méthode LP : *Length polymorphism*) (Lazzi et al. 2004), la résolution des produits PCR et donc la différenciation des espèces nécessite un simple gel d'agarose en électrophorèse classique. Le pourcentage d'agarose doit être adapté à la taille des produits PCR mais aussi à la différence de taille entre chacun d'entre eux. Plus cette différence est faible, plus la teneur en agarose sera élevée pour accentuer leur séparation. Généralement pour des amplicons dont la taille est comprise entre 300 et 700 pb, un gel à 2 % (p/v) en agarose est suffisamment résolutif pour observer des différences de migration de fragments variant de quelques dizaines de paire de base. Des gels d'acrylamide peuvent également être utilisés lorsque la taille des produits PCR et leurs différences respectives sont plus faibles (Teaupaisan et Dahlen 2006), mais la mise en œuvre est plus délicate. La méthode LP est limitée lorsque le mélange des espèces est très complexe, car les fragments les plus proches peuvent se superposer et rendre ininterprétable le gel.

Il est également possible de baser l'identification sur une combinaison des critères de tailles et de séquences en utilisant le polymorphisme engendré par la répartition de sites de restriction spécifique. La restriction des gènes codant pour les ARN ribosomiaux (méthode RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*) a permis de définir des profils caractéristiques de la plupart des espèces bactériennes (Le Jeune et Lonvaud-Funel 1994) et de levures (Guillamon et al. 1998) rencontrées dans le vin. Mais l'inconvénient est qu'il faut travailler sur des colonies isolées car l'application à des mélanges microbiens complexes conduit à des profils électrophorétiques trop confus. Les produits de restriction des différentes espèces peuvent se superposer et se confondre. C'est également l'inconvénient majeur de la technique de PCR-RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) (Quesada et Cenis 1995), qui basée sur l'utilisation de courtes amorces non-spécifiques et des conditions pour l'amplification aléatoire de fragments d'ADN (Booyesen 2002) conduit à des profils ambigus lorsque l'on travaille sur des mélanges microbiens. De plus, dans ce cas, la flexibilité des amorces utilisées et des conditions d'amplification peu contraignantes limitent la reproductibilité de la méthode (Olive et Bean 1999).

Ces méthodes moléculaires permettent de s'affranchir de l'influence de l'état physiologique et de l'expression phénotypique. Mais elles restent limitées pour la résolution de mélanges microbiens complexes comme le moût de raisin en fermentation par exemple. La solution est de combiner l'amplification de séquences spécifiques et uniques pour une espèce donnée puis leur séparation par d'une méthode très sensible. Pour cela deux méthodes

moléculaires basent la discrimination des espèces uniquement sur des différences de séquence nucléotidique. Il s'agit de la PCR-TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) (Riesner et al. 1992) et de la PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer et Smalla 1998).

La stabilité d'un fragment d'ADN dépend de sa séquence nucléotidique. Selon la nature et l'enchaînement des bases azotées le double brin d'ADN est plus ou moins stable. Il est donc possible de distinguer des fragments de taille identique, mais de séquences différentes, en jouant sur leur résistance à des contraintes dénaturantes comme l'augmentation de la température (méthode TGGE) ou de la concentration en agents dénaturants (méthode DGGE).

La méthode de PCR-TGGE a été utilisée pour l'étude des levures (Herman-Gómez et al. 2000) et des bactéries (Ogier et al. 2002) d'intérêt œnologique. Dans les deux cas, elle ne s'est pas révélée suffisamment discriminante. Des cas de co-migration entre des espèces du genre *Lactobacillus* chez les bactéries (Henri-Dubernet et al. 2004) et des espèces des genres *Pichia*, *Rhodotorula*, et *Brettanomyces* chez les levures (Herman-Gómez et al. 2000) dissuadent d'une exploitation œnologique de la TGGE, à l'inverse de la DGGE qui présente de nombreux avantages.

### **II.3 La résolution des complexes microbiens par la PCR-DGGE.**

Le principe de la PCR-DGGE est de cibler des régions de taille identique mais de séquences nucléotidiques différentes encadrées par de courtes séquences consensus qui servent d'amorces pour l'amplification.

Lors de l'électrophorèse, la migration s'arrête lorsque les doubles brins d'ADN se dénaturent par la contrainte physico-chimique engendrée par le gradient urée-formamide présent dans le gel d'acrylamide. Le comportement vis-à-vis de cette contrainte est directement corrélé aux interactions stabilisatrices de la double hélice qui s'établissent selon la nature et l'enchaînement des bases azotées. Une solution dénaturante de 100% est définie par un mélange de 40% (v/v) de formamide et d'urée 7M. Pratiquement, deux solutions, l'une fortement et l'autre faiblement dénaturante, sont préparées séparément. Puis au moment de couler le gel, la solution la moins dénaturante est mélangée, par pompage, à la solution la plus dénaturante, de façon à créer un gradient dénaturant linéaire (Fisher et Lerman 1983). L'ajout

---

### *Etude bibliographique*

d'une répétition de bases guanine et cytosine (*GC clamp*) sur l'extrémité 5' de l'une des amorces permet d'éviter la dénaturation totale des produits PCR et donc leur élution du gel (Myers et *al.* 1985).

En fait, la dénaturation des doubles brins d'ADN lors de la migration dans le gel d'acrylamide ne s'effectue pas en une seule étape mais par fusion successive de petites régions, appelées domaines de fusion (Figure 14). Les régions les moins stables se dénaturent le plus rapidement. Elles ouvrent localement le double brin d'ADN ce qui fragilise les régions environnantes et modifie la conformation de la molécule. La dénaturation des doubles brins d'ADN est donc un processus coopératif qui engendre une séquence de variations d'encombrement stérique. Ce sont ces variations qui conditionnent la migration. Des séquences différentes de fragments d'ADN qui ont des domaines de fusion avec des  $T_m$  « locaux » différents, mais un  $T_m$  « global » identique, ont des distances de migration différentes. L'alternance de domaine de fusion stables et de domaine de fusion plus flexibles est une propriété déterminante des séquences ciblées en DGGE (Shopek et *al.* 1999). La migration en gradient dénaturant ne prend pas en compte la structure des amplicons mais le positionnement de domaines flexibles, qui se dénaturent les premiers, et de domaines plus stables qui se dénaturent plus tardivement. Ces caractéristiques de fusion peuvent être prédites par analyse de la séquence primaire, et des algorithmes informatiques sont disponibles (Lerman et *al.* 1984).

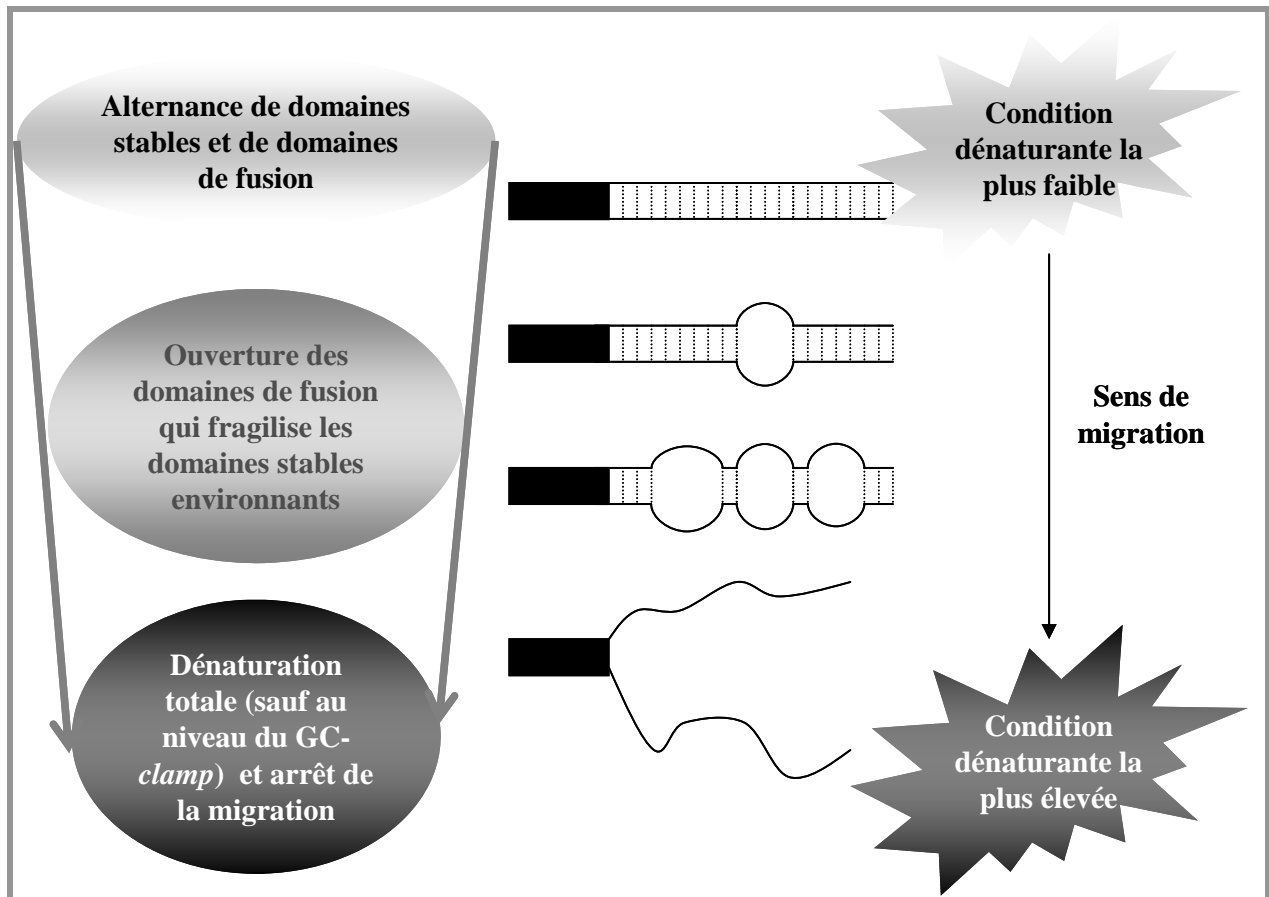


Figure 14: Principe de la migration sur le gel de DGGE.

Outre la dénaturation imposée par le gradient de formamide et d'urée, la contrainte de migration est également très importante. Elle est représentée par le couple voltage appliqué / durée de migration. Pour améliorer le pouvoir résolutif de la DGGE il faut considérer aussi bien le couple  $V \cdot h$  que le ratio  $V/h$  (Sigler et *al.* 2004). Après avoir choisi un voltage, généralement compris entre 100 (Gejman et *al.* 1998) et 150 volts (Skopek et *al.* 1999), la méthode la plus efficace pour optimiser le temps de migration consiste à charger sur des gels en parallèle les mêmes produits PCR à des intervalles de temps constant.

La température du bain de migration est également un paramètre important. Après avoir coulé le gel, il est nécessaire de l'incuber au préalable dans le tampon de migration à la température de migration. Cette étape d'incubation à haute température joue un rôle prépondérant dans le pouvoir séparatif du gel. Bien que les raisons de ce phénomène ne soient pas encore déterminées, il semblerait que des diffusions internes du gradient dénaturant

---

### Etude bibliographique

interviennent dans le gel à la suite de sa polymérisation (Sigler et al. 2004). A la fin de la migration, la révélation d'un gel d'acrylamide de DGGE se fait sous UV après marquage de l'ADN au bromure d'éthidium (BET) ou au *SYBER Green I*. Ce dernier donne moins de bruits de fond que le BET et les quantités d'agents intercalant, fortement carcinogènes, à utiliser sont moins importantes.

Pour permettre de résoudre les complexes microbiens et éviter les limitations de la RFLP et de la RAPD, la PCR-DGGE doit cibler des fragments à séquence monocopie: sur le gel d'acrylamide à une espèce doit correspondre une bande et une seule. Pour les levures, la région couramment ciblée correspond aux domaines D1/D2 du gène de l'ARNr 26S (Cocolin et al. 2000). Cette région est un remarquable marqueur phylogénétique (Kurtzman et Robnett 1998). Il a permis le repositionnement de nombreuses espèces mais aussi l'identification de nouvelles (Peter et al. 2005). Son étude phylogénétique est parfaitement concordante avec les principaux critères phénotypiques de classification (Middelhoven et Kurtzman 2003). Sur l'arbre phylogénétique (Figure 15) la séparation des Ascomycètes, au sommet, et des Basidiomycètes, en bas de l'arbre est remarquable. Au sein de ces groupes, on retrouve des *clusters* représentatifs des différentes familles de la classification des levures proposée par Barnett et al. (1990). Par exemple, la séparation entre les *Saccharomycetaceae* (*Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp.), les *Saccharomycodaceae* (*Hanseniaspora* sp.) et les *Candidaceae* (*Candida* sp., *Debaryomyces* sp.) parmi l'ordre des Ascomycètes et la distinction entre les *Tremellaceae* (*Bulleromyces* sp., *Cryptococcus* sp....) et des *Sporidiobolaceae* (*Rhodotorula* sp., *Sporobolomyces* sp., *Sporidiobolus* sp....) sont significatives. Au sein de la famille des *Sporidiobolaceae*, qui regroupe les levures possédant des pigments caroténoïdes rouges, on distingue deux groupes. Le premier comprend les genres *Rhodotorula* et *Rhodosporidium*, le second les genres *Sporobolomyces* et *Sporidiobolus*. Cette séparation s'exprime concrètement par une différence morphologique : les cellules du premier groupe sont caractérisées par la formation de ballistoconidies aux niveaux des stérigmates lors de la séparation des basides, alors que les secondes en sont dépourvues.

Les domaines D1/D2 du gène de l'ARN 26S sont la cible privilégiée des études de DGGE car l'alternance de régions divergentes et de régions conservées répartie sur un fragment de 250 paires de bases offre un compromis idéal pour la distinction des différentes espèces et le rapprochement des plus proches par phylogénie. Ceci est appréciable lorsque

---

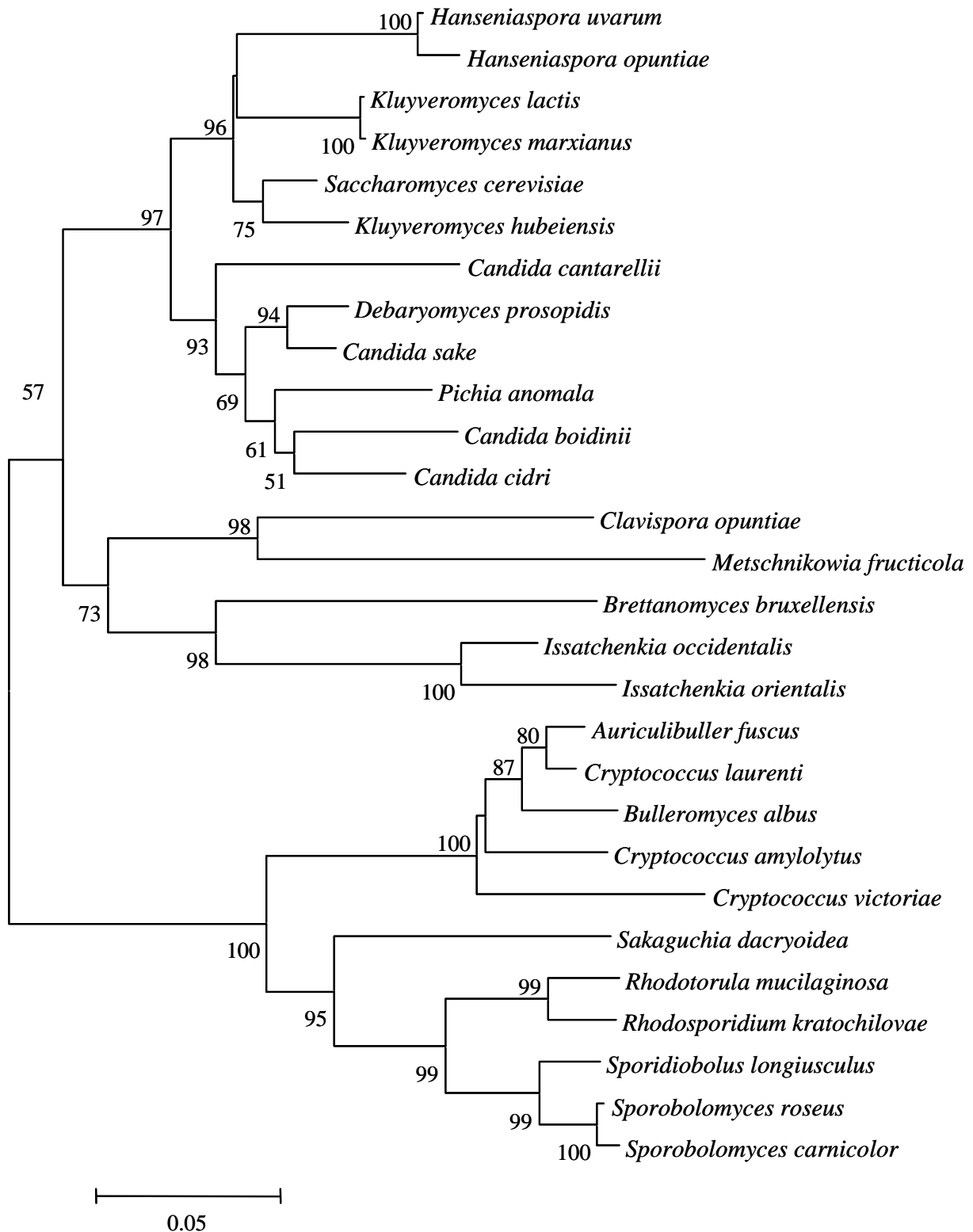
### *Etude bibliographique*

qu'on extrait du gel de DGGE des séquences inconnues qui peuvent être rapprochées phylogénétiquement des séquences de référence.

Le gène codant pour l'ARNr 18S a également été testé (Ampe et *al.* 2001). Mais des bandes d'ADN non microbien apparaissaient. Une étape d'enrichissement dans des milieux culture est nécessaire (Röling et *al.* 2001). On retombe alors dans les limitations des méthodes d'identification « culture-dépendantes ».



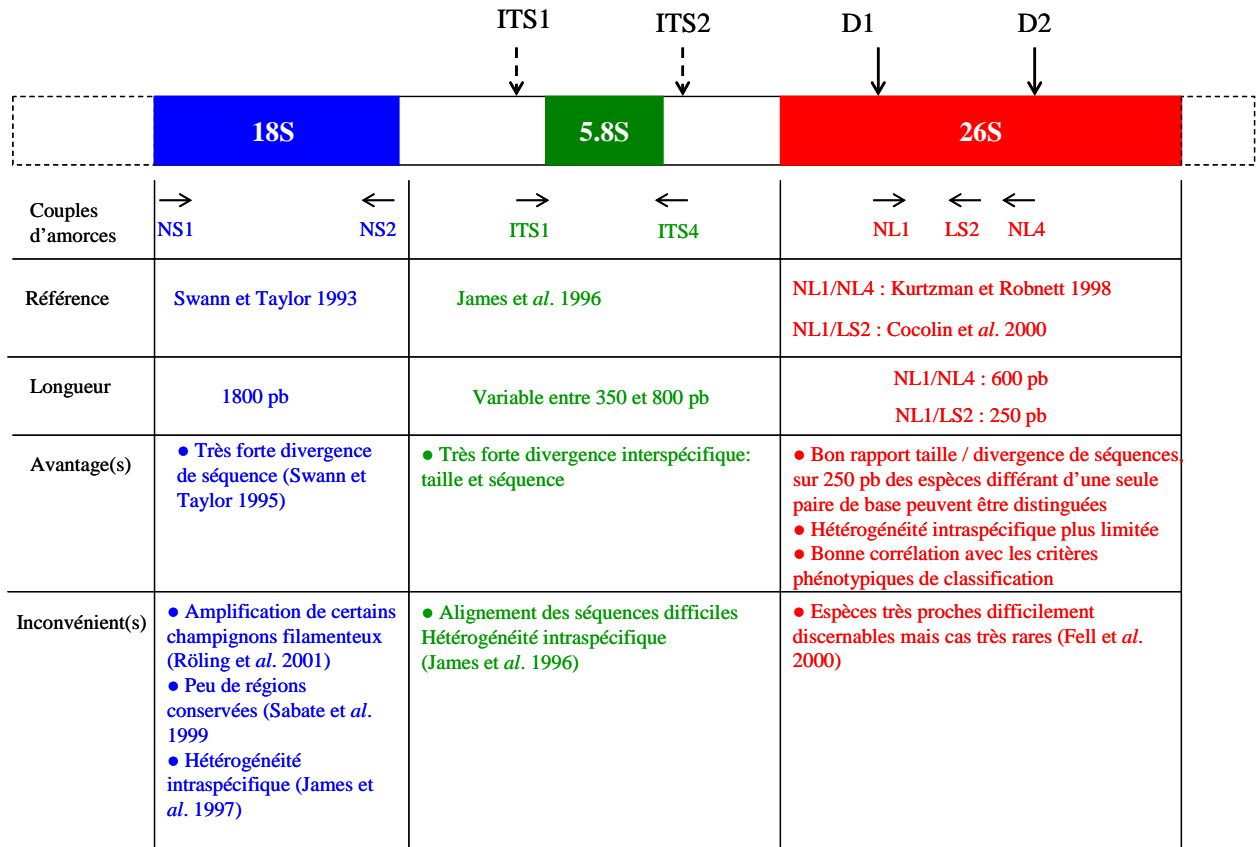
*Etude bibliographique*



**Figure 15:** Arbre phylogénétique construit selon la méthode des plus proches voisins et après 1000 répétitions de *bootstrap* à partir des séquences des domaines D1/D2 du gène de l'ARN 26S pour plusieurs espèces disponibles dans les banques de données.

### Etude bibliographique

En fait, les différents gènes ribosomaux couramment ciblés présentent chacun des avantages et des inconvénients (Figure 16), si bien que, la combinaison des différentes analyses est souvent très pertinente (Gácsér et *al.* 2001, Scorzetti et *al.* 2002).



**Figure 16:** Représentation des gènes ribosomaux ciblés dans les identifications de levures par PCR.

Le gène de l'ARN 5,8S est plus approprié à la méthode RFLP car les fragments ciblés sont de tailles différentes chez la plupart des espèces selon le repositionnement des éléments ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Les différences de séquences au sein même des fragments génèrent des profils de restriction caractéristiques des principales espèces de levures œnologiques (Guillamon et *al.* 1998).

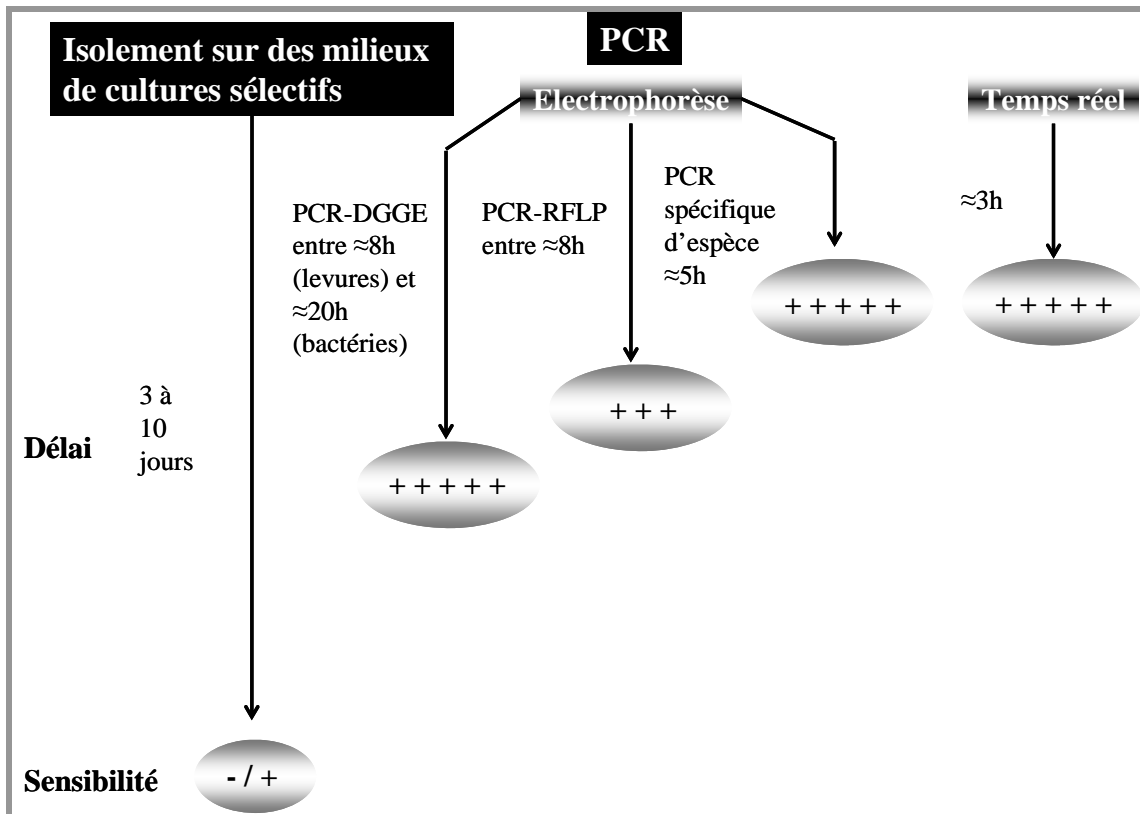
Concernant l'étude des bactéries, les régions du chromosome couramment ciblées sont les régions V1 (Cocolin et *al.* 2004), V3 (Masco et *al.* 2005), V6 et V8 (Lopez et *al.* 2003) du gène de l'ARNr 16S. Mais ce gène est présent en plusieurs copies qui ne sont pas forcément identiques au sein d'une même espèce (Nüble et *al.* 1996). Cette hétérogénéité intraspécifique est principalement rencontrée au niveau des régions variables V1 et V6 qui étaient

susceptibles d'être ciblées pour l'analyse par PCR-DGGE (Coenye et Vandamme 2003). Un autre inconvénient avec les domaines V3, V6 et V8 est l'amplification d'ADN de levures (*Saccharomyces* sp. et *Candida* sp.), de moisissures (*Botrytis cinerea*, *Fusarium laterium*) (Lopez et al. 2003) et de cellules eucaryotes de plantes (Dent et al. 2004). Il faut donc chercher d'autres cibles mieux adaptées.

La propriété idéale d'un gène susceptible de servir de cible pour l'analyse par PCR-DGGE est d'être composé d'une mosaïque de régions conservées, pouvant servir d'amorces pour la réaction d'amplification, et de régions variables pour l'étape de séparation. Chez les bactéries, le gène codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*) possède ces qualités. Ce gène universel, et en une seule copie, présente un caractère évolutif suffisamment discriminant pour distinguer les espèces. Une méthode d'identification des bactéries utilisant ce gène a été mise au point durant ce travail.

#### **II.4 Utilisation de la PCR en temps en réel.**

En plus de la sensibilité, la suppression de l'étape de culture par les méthodes moléculaires permet un gain de temps considérable par rapport aux analyses microbiologiques classiques (Figure 17). Une PCR classique dure entre deux et trois heures. La durée totale des analyses est imposée par l'étape de migration et de séparation des produits PCR. Celle-ci peut être relativement longue et lourde à mettre en œuvre, notamment lors de la DGGE.



**Figure 17:** Représentation schématique de la comparaison du temps et de la sensibilité des méthodes d'analyses utilisées en écologie microbienne.

Pour réduire le temps nécessaire au traitement du produit de l'amplification, il est possible de combiner l'amplification de l'ADN et sa détection. C'est le principe de la PCR en temps réel. Elle nécessite l'utilisation d'un marqueur fluorescent, le *SYBR Green I*, qui s'intercale entre les bases azotées de l'ADN. La fluorescence émise peut-être immédiatement mesurée. L'automate de PCR possède un bloc classique assurant les cycles de PCR et un bloc de détection capable de mesurer l'intensité de fluorescence émise (appareillage de type *iCycler iQ Real-Time PCR Detection System*, Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis). Lorsque l'amplification atteint un seuil supérieur au bruit de fond, la fluorescence émise est directement corrélée à la quantité d'ADN. Le *SYBR green I* émet une fluorescence maximale lorsque l'ADN est sous forme double brin lors des étapes d'hybridation et d'élongation. Lorsque les deux brins sont dissociés et dénaturés, lors de l'étape de dénaturation, la fluorescence chute. C'est donc l'évolution de l'inverse de la dérivée de la fluorescence en fonction du temps qui rend compte de l'évolution de la quantité d'ADN amplifiée :  $-\frac{d(\text{UFR})}{dt}$  (UFR : unité relative de fluorescence). Le traitement de gammes étalons avec des concentrations initiales connues de matrice PCR permet de relier le cycle seuil (Ct) et la

quantité initiale de matrice ADN. Dans ce cas, la PCR en temps réel est qualifiée de quantitative, car elle permet d'estimer la quantité initiale d'ADN qui peut à son tour être corrélée aux nombres de cellules contenues dans l'échantillon.

Des protocoles de PCR quantitative en temps réel ont été développés pour identifier et dénombrer spécifiquement certaines espèces d'intérêt œnologique. La sensibilité de la détection apportée par le ciblage moléculaire associée à la rapidité et la quantification fournies par l'utilisation du *iCycler* est particulièrement appréciable lors des contrôles d'implantation de *S. cerevisiae* et d'*O. oeni*, mais aussi pour la détection des micro-organismes d'altération comme *B. bruxellensis* (Delaherche et al. 2004) et les bactéries acétiques (Gonzalez et al. 2006b). Les informations fournies par la PCR quantitative en temps réel : nature des espèces et niveaux de populations, sont des données fondamentales pour une réactivité efficace : réintroduction du levain en cas d'échec d'implantation, traitement préventif pour limiter la contamination par les espèces d'altération. Néanmoins, à l'heure actuelle la technologie mise en œuvre (appareillage, réactif...) engendre des coûts importants. Ils ne peuvent pas être raisonnablement envisagés pour une utilisation de routine à l'échelle du chai où des suivis continus doivent être réalisés afin d'être significatifs et convenablement exploités.

#### **II.4.1 L'analyse des courbes de fusion.**

La PCR en temps réel peut donc détecter spécifiquement une espèce, mais elle peut également être utilisée comme une méthode rapide d'identification. Pour cela, il faut cibler des régions de taille identique chez les différentes espèces mais de séquences nucléotidiques suffisamment divergentes pour engendrer des différences notables de température de fusion (Monis et al. 2005).

Cela laisse présager que la méthode serait moins performante que la DGGE si ce sont les  $T_m$  globaux des séquences qui assurent la distinction. Mais il n'en est rien car les fragments ciblés sont généralement plus courts, et surtout la sensibilité de la détection automatisée de la fluorescence est très performante. Des différences de  $T_m$  de l'ordre de  $0,1^\circ\text{C}$  sont mesurées par la PCR en temps réel, alors qu'en DGGE les différences de  $T_m$  évoquées sont de l'ordre de grandeur de l'unité de degré Celsius. Une espèce A dont la séquence ciblée a une température de fusion  $T_A$  inférieure à la température de fusion  $T_B$  de la séquence homologue de l'espèce B est amplifiée avant, c'est-à-dire qu'elle aura un Ct plus

faible (Figure 18). Cette technique a été développée pour identifier différentes bactéries appartenant au genre *Borella* (Mommert et al. 2001) et *Salmonella* (Nam et al. 2005) notamment.

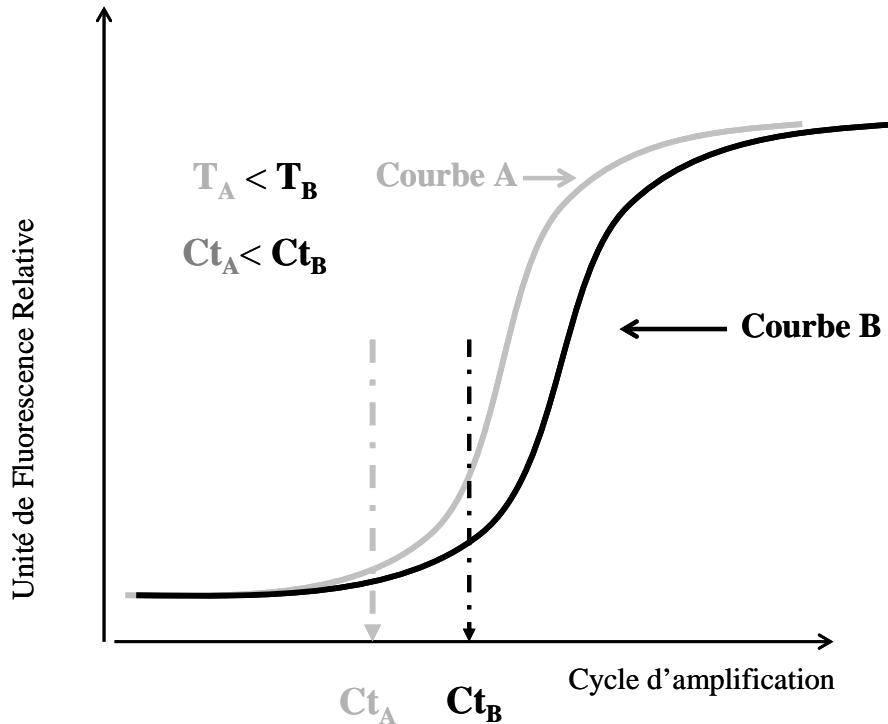
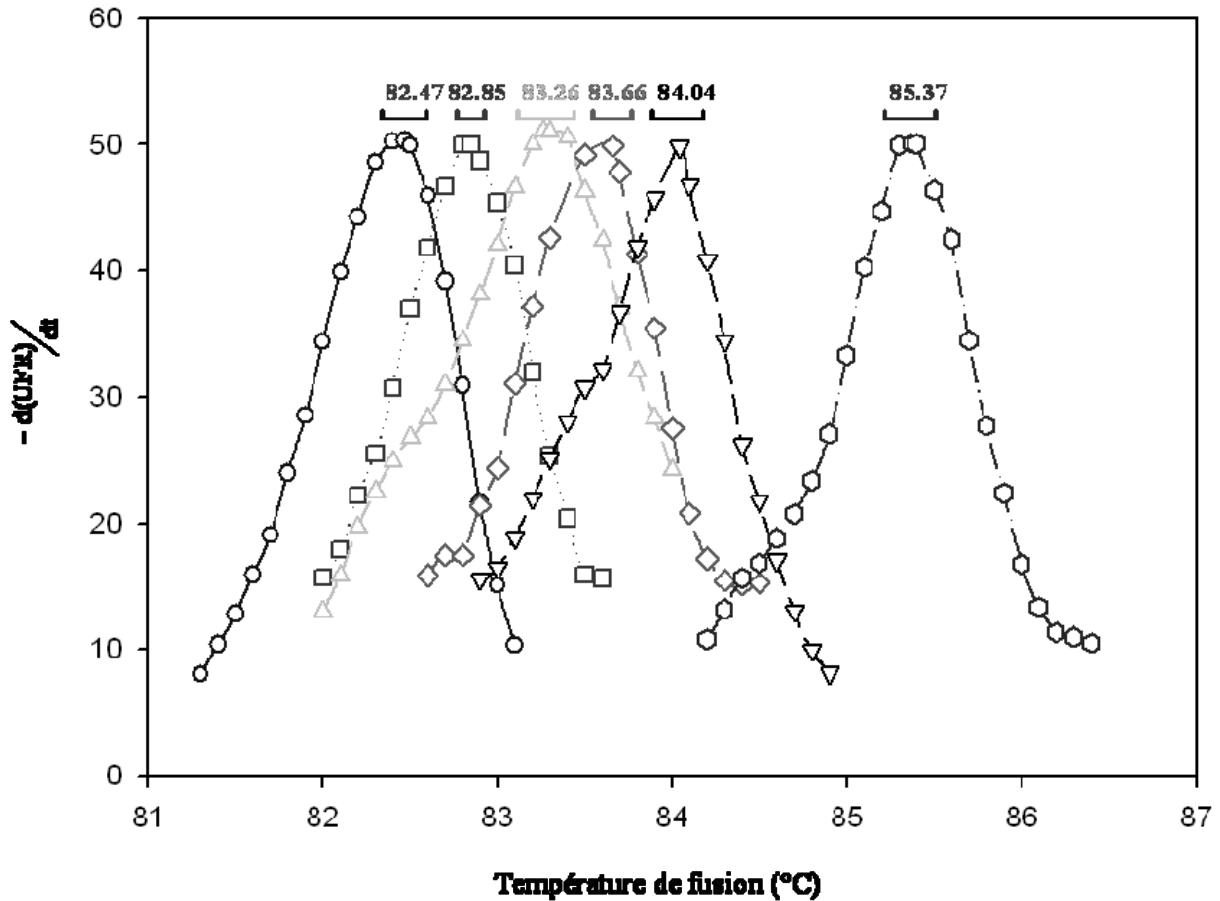


Figure 18: Principe de la distinction de deux séquences par PCR en temps réel.

L'analyse du gène *rpoB*, réalisée durant ce travail, a permis de développer une méthode de PCR en temps réel d'identification des principales espèces de bactéries lactiques rencontrées dans le vin. Elle utilise les mêmes amorces que celle la DGGE *rpoB* (mais sans GC clamp) et le programme de PCR est adapté à la PCR en temps réel, avec notamment l'ajout du *SYBR Green I* directement dans le mélange réactionnel. Plusieurs souches des différentes espèces ont été testées. Une température de fusion moyenne ( $T_m$ ) a été attribuée à chaque espèce. La répétition des souches et des essais pour une même espèce a permis de calculer l'écart-type ( $S$ ) de cette valeur moyenne, caractéristique de chaque espèce. Un intervalle de confiance ( $IC_{0,99}$ ) calculé selon la formule :  $IC_{0,99} = T_m + t_{0,99} \times \frac{S}{\sqrt{N}}$  permet de déterminer les valeurs maximales et minimales de  $T_m$  nécessaires pour identifier avec 99% de chance l'espèce testée (Figure 19).



**Figure 19:** Exemples des températures de fusion moyennes obtenues pour les espèces : *Leuconostoc mesenteroides* ( $Tm_{moyen}=84,04^{\circ}C$ ), *O. oeni* ( $Tm_{moyen}=85,37^{\circ}C$ ), *Pediococcus pentosaceus* ( $Tm_{moyen}=83,66^{\circ}C$ ), *Pediococcus dextrinicus* ( $Tm_{moyen}=83,26^{\circ}C$ ), *P. parvulus* ( $Tm_{moyen}= 82,85^{\circ}C$ ) et *P. damnosus* ( $Tm_{moyen}=82,47^{\circ}C$ ) et les intervalles de confiance à 99% correspondant.

Par exemple, pour l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*, 30 répétitions ont été réalisées. L'intervalle de confiance est de  $83,98^{\circ}C < Tm < 84,10^{\circ}C$ . Si une colonie testée présente un  $Tm$  compris dans cet intervalle, elle peut-être identifiée à 99% de chance à l'espèce *Leuconostoc mesenteroides*. Mais, malgré la remarquable variabilité de la séquence du gène *rpoB* ciblée, les intervalles de confiance sont relativement proches des autres. Cette méthode peut donc être appliquée uniquement à des colonies isolées, ou des cultures pures, car dans le cas des mélanges, les courbes peuvent se superposer.

#### II.4.2 L'utilisation des sondes *Taqman*®.

Lorsque deux séquences sont très proches, et qu'elles ne diffèrent entre elles que par une seule base azotée par exemple, la PCR en temps réel fait la différence sur une région d'environ une vingtaine de nucléotides qui contient la mutation. C'est le principe de la discrimination allélique (Livak 1999). Elle repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques pour l'une et l'autre séquence. Ces sondes sont appelées sondes *TaqMan*®. Une sonde est constituée d'un oligonucléotide qui s'hybride spécifiquement à la mutation ciblée. Elle est marquée par un fluorophore et un masque (*quencher*).

Lorsque la sonde est intacte et hybridée à la séquence cible, la proximité du masque réduit la fluorescence. Mais lors de l'étape de la polymérisation, l'activité 5' nucléasique de la *Taq* polymérase clive la sonde et libère le fluorophore de son masque, ce qui provoque une augmentation de la fluorescence. L'utilisation de deux fluorophores différents chacun dirigé à l'encontre d'une séquence spécifique permet ainsi la distinction des deux séquences au sein d'un mélange. Par comparaison avec une gamme étalon où l'une et l'autre séquence sont initialement présentes à des concentrations différentes, il est possible d'estimer le rapport entre les deux séquences selon l'intensité de fluorescence émise par chaque fluorophore. D'un point de vue technique, cette méthode requiert la vérification de certains paramètres listés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII.** Conditions d'utilisation des sondes *TaqMan*® pour la discrimination allélique en PCR en temps réel.

<b>Température de fusion</b>	Les températures de fusion des amorces doivent être comprises entre 58 et 60°C. La température de fusion des sondes <i>TaqMan</i> ® doit être supérieure d'au moins 10°C à la température de fusion des amorces. Il est en effet nécessaire que l'hybridation soit plus probable que l'hybridation des amorces
<b>Taille des sondes</b>	Entre 18 et 22 pb.
<b>Taille des amorces</b>	Entre 15 et 30 pb.
<b>Pourcentage de GC</b>	Le G+C% de la sonde doit être compris entre 30 et 80%.
<b>Le nombre de GC</b>	Pour les cinq dernières bases, le nombre de GC ne doit pas excéder deux afin d'introduire une relative instabilité dans la région 3' du primer réduisant l'hybridation non-spécifique.
<b>Taille de la séquence amplifiée</b>	Elle ne doit pas excéder 400 pb. (dans l'idéal 50-150 pb)



### **III La combinaison des techniques pour une vision systémique de l'écologie microbienne.**

Finalement, pour étudier un mélange microbien complexe comme le moût de raisin au début de la fermentation, la PCR-DGGE apparaît jusqu'ici comme la meilleure méthode moléculaire pour l'estimation la plus exhaustive possible de la diversité microbienne. Néanmoins quelques artefacts techniques peuvent altérer l'analyse par PCR-DGGE.

En effet, lors de l'étape d'amplification, pendant les cycles d'hybridation les produits PCR de plusieurs matrices qui ne diffèrent entre eux que par de faibles mutations peuvent se croiser, c'est à dire s'hybrider avec les produits issus de l'amplification d'une matrice différente. De tels mésappariements sont appelés *hétéroduplex* (Ruano et Kidd 1992). Leur formation peut également intervenir lorsque l'élongation des produits PCR est incomplète. Ces derniers servent alors d'amorces pour l'amplification de séquences hétérologues (Wang et Wang 1997). La stabilité et la structure conformationnelle des *hétéroduplex* sont imprévisibles et non reproductibles, car ils sont formés aléatoirement lors de la PCR. Ces artefacts altèrent la lisibilité du gel d'acrylamide, en conduisant à une surestimation de la diversité microbienne. Ils peuvent être en partie éliminés par l'ajout d'une seconde étape de PCR où les produits PCR de la première sont dilués et servent de matrice pour la seconde a plus faible nombre de cycle d'amplification (Thompson et *al.* 2002). De plus, les *hétéroduplex* sont moins stables que les *homoduplex*, ils peuvent donc être également exclus du gel de DGGE en choisissant des concentrations en agents dénaturants suffisamment stringentes.

Sur le gel, il est courant d'observer, à proximité immédiate des bandes de forte intensité, des bandes de plus faible intensité. Ces artefacts sont appelés « doubles bandes ». Ils proviendraient de la position de bases dégénérées et du GC-clamp au sein des amorces qui engendrent des combinaisons particulières entre la séquence ciblée et les amorces. Mais ces artefacts sont également observés lors de l'utilisation d'amorces non dégénérées et sur des cultures pures. Le processus de formation des doubles bandes n'est donc pas résolu et il peut aussi conduire à une surestimation de la diversité microbienne. Toutefois, d'après Janse et *al.* (2004) il est possible de réduire leur formation en augmentant le temps d'élongation finale à 72°C. Au lieu des 5 minutes couramment programmées en PCR, il est préconisé de finir par une élongation à 72 °C de 30 minutes.

---

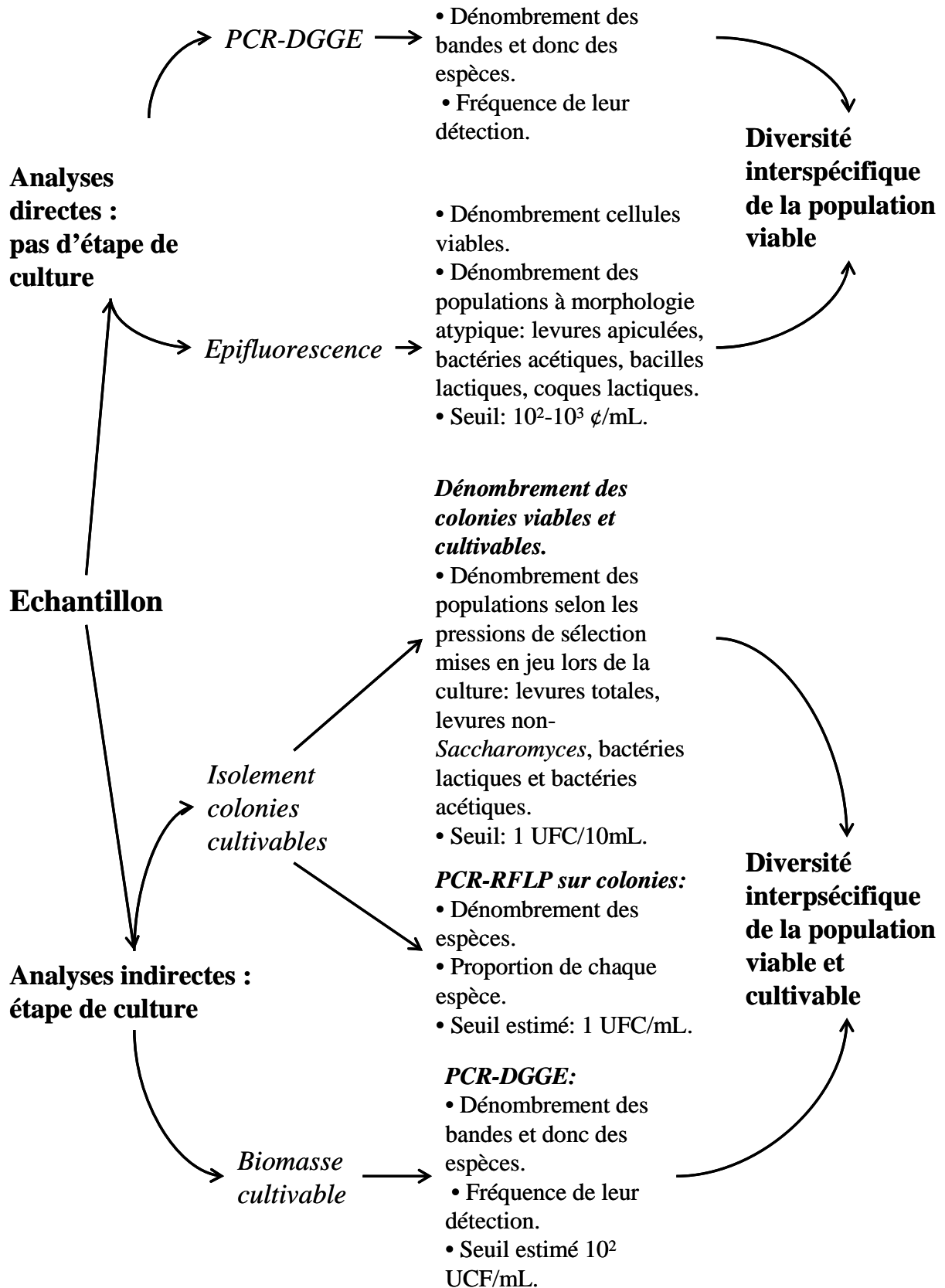
### *Etude bibliographique*

Plus problématique, le seuil de détection par PCR-DGGE des espèces est l'objet de controverses. Certains auteurs estiment qu'il dépend du niveau des populations. Pour Cocolin et *al.* 2000 une population minimum de  $10^4$  cellules par mL est nécessaire pour rendre détectable l'espèce considérée. D'autres auteurs avancent que le seuil de détection d'une espèce est fonction du rapport entre les concentrations de chaque espèce. Ainsi Prakitchaiwattana et *al.* (2004) avancent qu'un rapport de concentrations excédant 1 pour 1000 entre plusieurs espèces limite la détection aux espèces majoritaires uniquement. De tels rapports biaisent l'étape de PCR. En effet lors de la PCR la probabilité d'amplification d'une séquence est d'autant plus forte que sa concentration initiale est élevée. Les matrices majoritaires sont forcément aussi les plus amplifiées. Sous la loi exponentielle qui régit l'amplification par PCR, des rapports initiaux de populations mêmes relativement faibles entraînent nécessairement des rapports importants entre les produits PCR de sorte que seuls les produits majoritaires sont détectés sur le gel d'acrylamide. En fait, il est probable que le seuil de détection d'une espèce au sein d'un mélange résulte de la combinaison du niveau de la population totale, du nombre d'espèces présentes et de sa concentration spécifique au sein du mélange. Mais dans tous les cas, il est important de souligner que l'absence de détection sur gel DGGE d'une espèce après l'analyse directe ne signifie pas nécessairement son absence de l'échantillon.

Il faut garder en mémoire que ces biais quantitatifs restreignent l'exhaustivité des inventaires des espèces. Donc, afin d'obtenir le maximum de renseignements, il est judicieux d'associer l'analyse directe par PCR-DGGE à des analyses indirectes qui permettent, en outre, d'ajouter des données quantitatives aux informations qualitatives apportées par la DGGE. Le passage par une étape de culture d'enrichissement rend possible la détection des espèces minoritaires. Cela permet d'évaluer les niveaux de populations, information complémentaire et nécessaire lorsque l'on s'intéresse aux espèces actives dans le déroulement des vinifications et l'évolution aromatique du vin. Pour l'identification de certaines espèces, la PCR-DGGE peut également être associée à d'autres méthodes moléculaires plus sensibles (PCR-RFLP-ITS, PCR en temps réel...).

Cette approche combinatoire des analyses directes (culture-indépendantes) et des analyses indirectes (culture-dépendantes) est indispensable pour une étude à vision systémique de l'écologie microbienne (Figure 20).

*Etude bibliographique*



**Figure 20:** Protocole de traitement des échantillons combinant les analyses directes et les analyses indirectes (avec une étape de culture).

# **MATERIELS ET METHODES.**

*« Tellement de choses à reconstruire,  
des matériaux, ils nous en faut ! »*  
**Jean Louis Aubert, 1987.**



## **PARTIE I. LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES.**

### **I Le matériel biologique.**

Les différentes souches de bactéries et de levures utilisées sont respectivement listées dans les tableaux IX et X. Durant ce travail, les différents prélèvements réalisés aux vignobles et aux chais ont alimenté la collection des souches présentes au laboratoire. Les essais réalisés par la suite ont intégré ces nouvelles souches au fur et à mesure de leur isolement.

**Tableau IX.** Souches de bactéries utilisées (ATCC : *American Type Culture Collection*, Manassas, USA ; CIP : Collection de l'Institut Pasteur, Paris, France ; IOEB : Institut d'Œnologie de Bordeaux, Talence, France).

<b>Espèces</b>	<b>Collection</b>	<b>Numéro d'identification</b>
<i>Acetobacter aceti</i>	ATCC	15973
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ATCC	6033
<i>Acetobacter pomorum</i>	CIP	694
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	CIP	10587
<i>Gluconoacetobacter hansenii</i>	CIP	103110
<i>Gluconobacter oxydans</i>	ATCC	621
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC	367
<i>Lactobacillus buchneri</i>	ATCC	11305
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC	334
<i>Lactobacillus collinoides</i>	IOEB	0203
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	IOEB	0004
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC	9338
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	ATCC	8290
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IOEB	0001
<i>Lactobacillus mali</i>	ATCC	27651
<i>Lactobacillus paracasei</i>	IOEB	0020
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC	8014
<i>Lactobacillus plantarum</i>	IOEB	8512
<i>Lactobacillus plantarum</i>	IOEB	8605
<i>Lactobacillus sakei</i>	ATCC	15521
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ATCC	8293
<i>Oenococcus oeni</i>	ATCC	23277
<i>Oenococcus oeni</i>	IOEB	9807
<i>Oenococcus oeni</i>	IOEB	8406
<i>Oenococcus oeni</i>	IOEB	8413
<i>Oenococcus oeni</i>	Levain	SB3
<i>Oenococcus oeni</i>	Levain	Vitilactic F
<i>Pediococcus damnosus</i>	ATCC	25248
<i>Pediococcus dextrinicus</i>	ATCC	33087
<i>Pediococcus parvulus</i>	ATCC	19371
<i>Pediococcus parvulus</i>	IOEB	8801
<i>Pediococcus parvulus</i>	IOEB	8514
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	ATCC	33316

*Matériels et méthodes*

**Tableau X.** Souches de levures (CLIB : Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique, INRA, Thiverval Grignon, France ; IOEB : Institut d'Œnologie de Bordeaux, Talence, France).

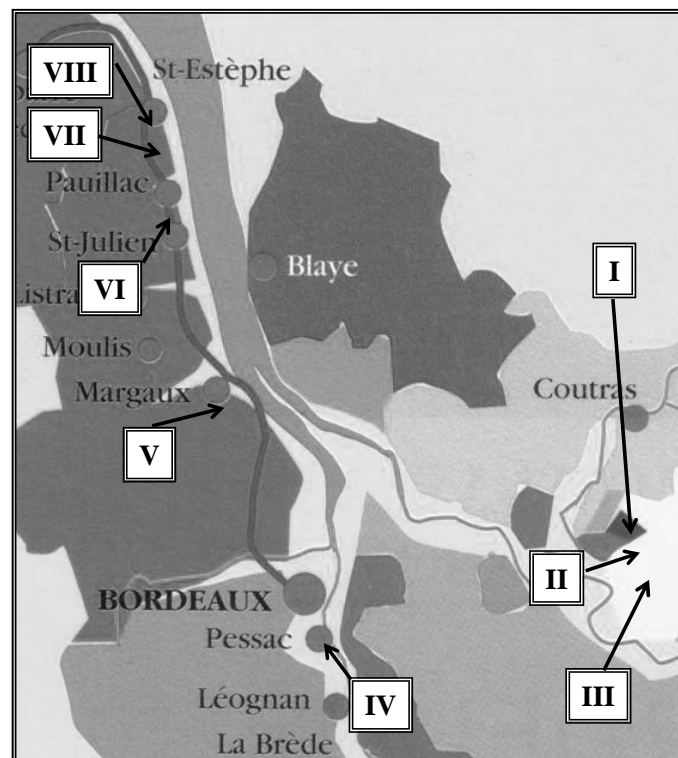
	<b>Espèces</b>	<b>Collection</b>	<b>Numéro d'identification</b>
<b>Levures</b>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	IOEB	0448
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0407
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0411
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0417
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0447
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0448
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0452
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0453
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0462
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0468
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0469
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0506
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0514
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	IOEB	0522
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	CLIB	300
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	CLIB	316
	<i>Candida albidus</i>	IOEB	0457
	<i>Candida cantarelli</i>	IOEB	0416
	<i>Candida ethanolica</i>	IOEB	0504
	<i>Cryptococcus albidus</i>	CLIB	373
	<i>Cryptococcus albidus</i>	IOEB	0457
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	IOEB	0455
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	IOEB	0457
	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	CLIB	292
	<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	IOEB	0450
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	IOEB	0530
	<i>Pichia anomala</i>	IOEB	0426
	<i>Pichia anomala</i>	IOEB	0534
	<i>Pichia anomala</i>	IOEB	0451
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	CLIB	370
	<i>Rhodospiridium babjevae</i>	IOEB	0449
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	0434
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	0437
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IOEB	0440
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levain	522Davis
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levain	LTM01
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levain	LTM03
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levain	LTCS09
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levain	LTCS18
	<i>Sporodibolus pararoseus</i>	IOEB	0454
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IOEB	0310

## **I.1 Les prélèvements des échantillons.**

### **I.1.1 Les domaines d'expérimentations.**

Les expérimentations ont été menées sur huit prestigieux domaines du vignoble Bordelais (Figure 21 et Tableau XI).

Dans le Libournais, le domaine situé sur l'appellation Pomerol est désigné domaine I dans la suite de ce travail. Il cultive sur un terroir d'argile exclusivement le cépage Merlot. Les deux autres domaines du Libournais sont localisés sur l'appellation de Saint-Emilion (domaine II et domaine III). Le premier est situé sur un terroir d'une grande hétérogénéité sédimentaire : sol sableux sur sous-sol argileux, sol graveleux sur sous-sol argileux et sol graveleux profond, ce qui lui permet de se distinguer des autres grandes propriétés de l'appellation à dominantes argilo-calcaire et de proposer des vins de transition entre les vins de Pomerol et les vins de côte de Saint-Emilion. Le second doté de minces sols argilo-calcaires en forte pente est l'archétype de l'excellent vin de côte de Saint-Emilion offrant une très grande puissance et une formidable complexité.



**Figure 21:** Le vignoble bordelais et les domaines d'expérimentation.



---

### *Matériels et méthodes*

Dans la région des Graves, le domaine étudié (domaine IV) est situé sur l'appellation Pessac-Léognan. C'est un vaste de domaine où l'ensemble des cépages rouges et blancs étudiés durant ce travail sont cultivés pour exprimer pleinement les potentialités d'un terroir de graves blanches sur argiles.

Dans le Médoc, le domaine V est localisé sur l'appellation Margaux. Les trois autres domaines VI, VII et VIII sont situés sur l'appellation Pauillac. Le premier (VI) est situé à proximité immédiate de la Gironde. Il profite d'un emplacement privilégié car les types de temps excessifs et en particulier les vagues de froid hivernales se trouvent tempérées par l'humidité du fleuve. Ce domaine dispose d'un sol de grosses graves anciennes d'origine Günzienne qui ont été transportées depuis les Pyrénées lors de la fonte des glaces du début de l'ère quaternaire. Elles assurent un généreux écoulement des eaux et une bonne alimentation souterraine de la vigne. Ces grosses graves anciennes se retrouvent également sur les parcelles des domaines VII et VIII pourtant situés à l'opposé de l'une de l'autre par rapport à la commune de Pauillac. Mais là, la profondeur des graves peut atteindre jusqu'à douze mètres d'épaisseur. Elles reposent sur un sous-sol mélangé d'argile et d'alias.

*Matériels et méthodes*

**Tableau XI.** Principales caractéristiques des domaines viticoles étudiés.

	DOMAINE I	DOMAINE II	DOMAINE III	DOMAINE IV	DOMAINE V	DOMAINE VI	DOMAINE VII	DOMAINE VIII
<b>Appellation</b>	Pomerol	Saint-Emilion	Saint-Emilion	Pessac-Léognan	Margaux	Pauillac	Pauillac	Pauillac
<b>Taille du vignoble (ha)</b>	11,4	36	7,3	45,9	90	65	90	75
		57	15	18	2	4	10	13
<b>Encépagement rouge (%)</b>		1	30	45	75	80	80	70
		3						
	100	39	50	35	20	15	8	15
				2	3	1	2	2
<b>Encépagement blanc (%)</b>				52				
				28				
				10				
<b>Densité moyenne (pieds/ha)</b>	55 00	6 000	6 000	8 000	10 000	10 000	8 5000	7 500
<b>Production moyenne (nombre de bouteilles)</b>	54 000	180 000	24 000	192 000 (rouge) 96 000 (blanc)	390 000	380 000	380 000	420 000
<b>Sol et sous-sol</b>	Argiles noires	Graveleux, argileux et sableux à sous-sol argileux	Calcaires à astéries et molasses argile-calcaire	Graveleux avec sous-sol argilo-sableux	Graves, argilo-calcaire	Graves anciennes günziennes	Graves anciennes günziennes	Grosses graves sur calcaire
<b>Age moyen des vignes (ans)</b>	35	38	50	40	35	50	42	40

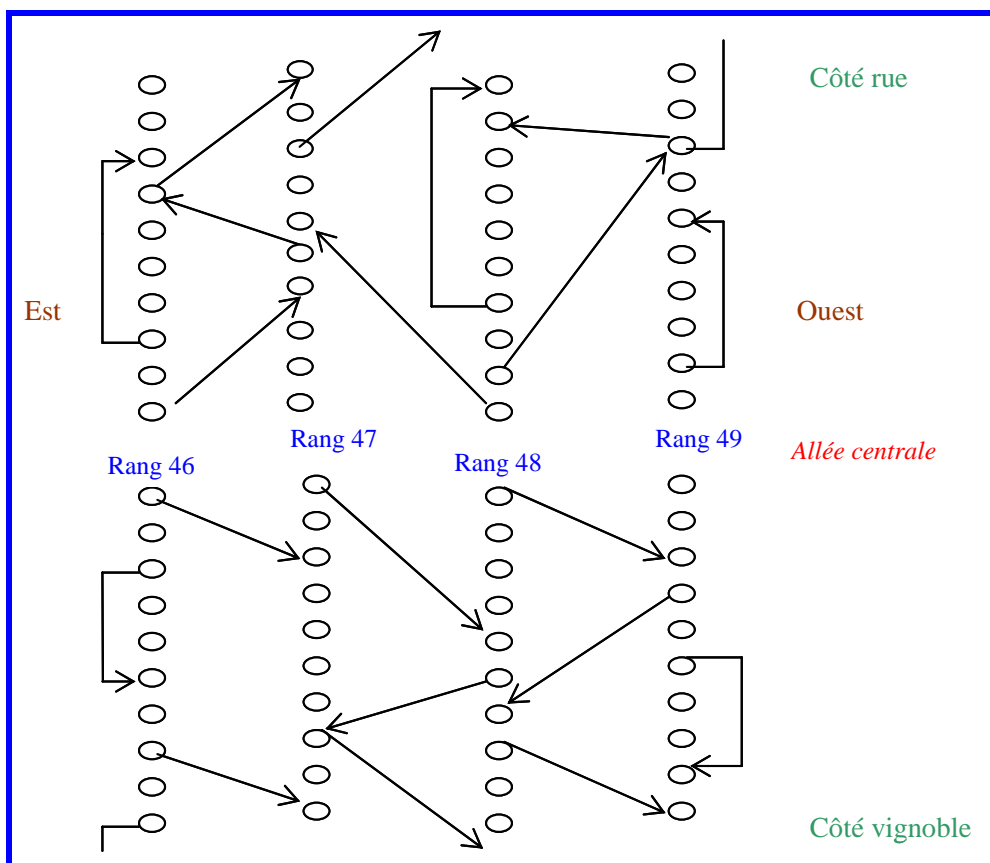
### **I.1.2 Les analyses du raisin.**

Malgré les efforts réalisés pour maintenir une homogénéité entre ses pieds de vigne (cépage, âge des pieds...), une même parcelle de vigne est une entité relativement hétérogène d'un point de vue de l'état des grappes et des baies à un instant,  $t$ , donné. La principale difficulté des prélèvements de raisin sur parcelle réside donc dans la variabilité des baies. En effet, par simple observation, on constate que leurs caractères physiques varient selon plusieurs facteurs :

- la position du rang dans le vignoble (exposition par rapport au soleil...).
- la position du pied de vigne au sein du rang (proximité de la rue, de l'allée centrale, de pieds malades).
- la position de la grappe sur le pied de vigne (sur une tige principale ou sur les ramifications secondaires).
- la position des baies au sein de la grappe.

Lors de l'étude d'une parcelle, cinq cents grammes de raisins sont prélevés sur environ vingt-cinq pieds de vigne. Pour s'affranchir de ces problèmes et collecter un échantillon représentatif de l'ensemble de la parcelle, il est nécessaire de se fixer des conditions d'échantillonnage :

- les baies testées sont des bouts de grappes avec une vingtaine de baies.
- les grappes sélectionnées sont portées par les tiges principales.
- les grappes sélectionnées sont saines et propres (absence de pourriture, d'insectes, de terre...).
- une marche aléatoire est mise en place selon la disposition de chaque parcelle et respectée à chaque série de mesure (Figure 22).
- lors des suivis les pieds prélevés sont repérés.



**Figure 22:** Exemple de la marche aléatoire pratiquée lors de l'échantillonnage des baies sur une parcelle de Merlot du domaine I.

### I.1.3 Les analyses du moût et du vin.

Afin de permettre une comparaison significative et un suivi longitudinal entre les analyses réalisées au vignoble et celles effectuées durant l'élaboration du vin au chai, les lots de vinification analysés sont nécessairement issus de raisins homogènes et de parcelles préalablement étudiées et bien caractérisées. Cette contrainte s'adapte parfaitement à la vinification parcellaire couramment pratiquée dans les grands domaines bordelais qui vise à préserver les singularités de chaque parcelle avant les assemblages finaux. Au moment des assemblages, chaque lot destiné à être mélangé est l'objet d'une analyse individuelle, puis une analyse globale a lieu juste après l'assemblage pour pouvoir faire abstraction d'une brusque variation des données liée à l'association avec un lot atypique.

Au chai, les prélèvements d'échantillons destinés à l'analyse microbiologique doivent être réalisés dans les meilleures conditions d'hygiène possibles afin de préserver l'échantillon de contaminations qui fausseraient le résultat. Le récipient utilisé pour le prélèvement est une

---

### *Matériels et méthodes*

bouteille en verre à bouchon à vis qui est préalablement autoclavée et fermée au laboratoire. La bouteille n'est ouverte, rapidement, qu'au moment du prélèvement. Pour le prélèvement en cuve, on peut prélever au niveau du chapeau supérieur à l'aide d'un plongeur, soit au robinet de dégustation. Les plongeurs servent généralement à plusieurs cuves et le chapeau supérieur n'est pas représentatif de la masse du vin présent plus en profondeur ; par conséquent, il est plus judicieux de privilégier les prélèvements au niveau du robinet de dégustation, que l'on peut désinfecter à l'aide de solutions sulfureuses, mais également ouvrir à proximité de la flamme d'un brûleur portable de type Camping-gaz®. Il est nécessaire de purger le robinet dégustateur en laissant couler quelques litres de vin avant de procéder au prélèvement. La bouteille est alors entièrement remplie afin de limiter le volume d'air disponible. Pour les vins conservés dans les barriques, le prélèvement se fait à l'aide d'une pipette stérile de laboratoire au niveau de la bonde, lorsque la barrique est conservée bonde dessus. Dans la masse du vin, le prélèvement à la pipette atteint une profondeur d'environ trente centimètres. L'effet de la profondeur du prélèvement suivant le stade de la vinification est discutée dans la suite de ce travail. Mais pour un souci d'homogénéité avec les premiers prélèvements, tous les prélèvements dans la barrique ont été réalisés selon ce mode opératoire. Lorsque les barriques sont bondes de côté, la barrique est percée et le prélèvement se fait par aspiration au niveau du fausset.

Lorsque le vin est en cuve, à chaque prélèvement, trois bouteilles sont analysées afin de pondérer les résultats obtenus d'une moyenne et d'un écart-type. Lorsque l'analyse porte sur du vin logé en barrique, à chaque prélèvement, un échantillonnage de plusieurs barriques (entre 3 et 5) représentatif du lot complet est pratiqué : barriques de début, de milieu et de fin d'entonnage, barriques neuves et barriques usagées, barriques de différents tonneliers. Au laboratoire, chaque échantillon est analysé séparément et les résultats obtenus permettent de calculer une moyenne et un écart-type pour chaque paramètre mesuré. Les barriques prélevées sont notées à la craie en vue du prochain prélèvement. Lors des soutirages, la numérotation des barriques permet de tracer les lots suivis.

Une fois les échantillons prélevés, ils sont traités le plus rapidement possible. Lors du transport, les bouteilles sont conservées dans un contenant isotherme à température ambiante.

## **II La culture des micro-organismes.**

### **II.1 Les milieux de cultures liquides.**

Pour les levures, le milieu de culture couramment utilisé pour entretenir les micro-organismes est le milieu YPG : 20 g/L de glucose, 10 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de peptone. Le pH ajusté à 5,0 avec de l'acide orthophosphorique. Pour les bactéries, le milieu est du MRS (De Man et al. 1960): 27,5 g/L de bouillon MRS difco®, 5 g/L d'acide malique, pH ajusté à 4,8. Généralement les cultures cellulaires sont réalisées dans des tubes à essais dans un volume de 10 mL. L'incubation est réalisée à 25°C et seule la culture des bactéries acétiques nécessite une agitation douce et continue.

Dans ces milieux liquides, il peut être nécessaire d'évaluer la densité cellulaire en mesurant la turbidité d'une fraction de culture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. Dans la bibliographie, des corrélations relient cette densité optique et le nombre de cellules par millilitre. Pour les levures la corrélation moyenne retenue est  $1 \text{ UDO} = 5 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$  dans le milieu YPG et pour les bactéries  $1 \text{ UDO} = 10^9 \text{ UFC/mL}$  dans le milieu MRS.

### **II.2 Les milieux de culture solides.**

Les échantillons de moût, de vin, d'eau de lavage de raisins et du matériel vinicole sont utilisés pour ensemercer différents milieux nutritifs sélectifs gélosés qui permettent le dénombrement des cinq grandes populations microbiennes précédemment évoquées : les levures totales, les levures non-*Saccharomyces*, les bactéries à Gram positif anaérobies et anaérobies facultatives (en œnologie elles sont principalement constituées des bactéries lactiques, les bactéries à Gram négatif aérobies (principalement constituées des bactéries acétiques) et des bactéries à Gram négatif anaérobies et anaérobies facultatives. Les compositions des ces cinq milieux sont listées dans le tableau XII. Le pouvoir sélectif de ces milieux réside dans l'utilisation d'antibiotiques et les conditions d'incubation (aérobie / anaérobie).

## Matériels et méthodes

**Tableau XII.** Compositions des milieux sélectifs de cultures.

Cible	LEVURES			BACTERIES		
Population	LT*	NS*	ANGP*	AGN*	ANGN*	
<b>Composition</b>	glucose 20 g/L, extrait de levure 10 g/L, bactotryptone 10 g/L, pH = 5,0 (H <sub>3</sub> P0 <sub>4</sub> )	glucose 20 g/L, extrait de levure 10 g/L, bactotryptone 10 g/L, pH = 5,0 (H <sub>3</sub> P0 <sub>4</sub> )	Extrait de levure 5 g/L, Tween 80 1 mL/L, jus de raisin 500 mL/L, pH = 4,8 (NaOH 10N)	Extrait de levure 5 g/L, Tween 80 1 mL /L, jus de raisin 500 mL/L, pH = 4,8 (NaOH 10N)	glucose 20g/L, peptone 5 g/L, extrait de levure 3 g/L, extrait de malt 3 g/L, pH = 5,0 (NaOH 10N)	
<b>Agent(s) de sélection</b>	Biphényl : 150 mg/L Chloramphénicol :100 mg/L	Biphényl :150 mg/L Chloramphénicol :100 mg/L Cycloheximide 500 mg/L	Pimaricine : 100 mg/L	Pimaricine : 100 mg/L Penicilline : 15 mg/L	Pimaricine : 100 mg/L Penicilline : 30 mg/L	
<b>Conditions d'incubation</b>	25°C 5 jours aérobie	25°C 10 jours aérobie	25°C 10 jours anaérobie	25°C 5 jours aérobie	25°C 5 jours anaérobie	

\*LT : levures totales, NS : (levures) non-*Saccharomyces*, ANGP : (bactéries) anaérobies et anaérobies facultatives à Gram positif, AGN : (bactéries) aérobies à Gram négatif, ANGN : (bactéries) anaérobies et anaérobies facultatives à Gram négatif.

Pour les levures, le milieu est additionné de biphényl et de chloramphénicol. Ils permettent d'inhiber respectivement la croissance des champignons et celle des bactéries. La distinction entre les levures totales et les levures non-*Saccharomyces* est réalisée en inhibant la croissance des levures du genre *Saccharomyces* par l'ajout de cycloheximide (ou actidione). Pour le comptage des bactéries, les moisissures (levures et champignons) sont éliminées par l'addition de pimaricine.

Pour les bactéries anaérobies et anaérobies facultatives les boîtes de Petri sont incubées en atmosphère CO<sub>2</sub> + N<sub>2</sub> obtenue à l'aide d'un catalyseur (palladium) et d'un générateur de gaz carbonique et d'hydrogène (BBL *Microbiology System* BioMérieux) au sein de jarres. Pour le dénombrement des bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif sont éliminées en ajoutant de la pénicilline.

Tous les milieux solides sont additionnés avec 20 g/L d'agar. Les milieux sont stérilisés par autoclave pendant 15 minutes à 1 bar de pression et à une température de 120°C. A la sortie de l'autoclave, la température des milieux est abaissée à 55°C dans un bain marie et les quantités adéquates d'antibiotiques sont ajoutées après la filtration (0,45 µm) des solutions

mères. Pour la pimaricine et la pénicilline, les solutions mères sont préparées avec de l'eau distillée stérile. Pour le biphényl et le chloramphenicol le solvant utilisé est de l'éthanol, tandis que pour la cycloheximide c'est de l'acétone.

Cent microlitres de chaque échantillon et plusieurs dilutions décimales successives sont étalés sur les différents milieux gélosés. L'ensemencement des boîtes de Petri s'effectue par un étalement homogène en surface avec des micro-billes stériles. Les résultats des dénombrements sont exprimés en Unité Formant des Colonies par mL (UFC/mL).

### **II.3 La composition des milieux liquides d'enrichissement.**

Pour révéler l'existence des espèces minoritaires, il est pertinent de recourir à des milieux liquides spécifiques et des conditions de culture permettant l'enrichissement de ces espèces afin de les rendre détectables. Ces milieux doivent être suffisamment sélectifs pour favoriser le développement des espèces minoritaires, mais uniquement de celles-ci.

La détection de plusieurs levures œnologiques, et notamment de l'espèce d'altération *B. bruxellensis*, à la surface de la baie de raisins est possible grâce au développement du milieu EBB réalisé durant ce travail (*Enrichment Brettanomyces Bruxellensis*) (Renouf et Lonvaud-Funel 2006) :

- 200 mL/L de jus commercial de raisins rouges. Les jus de raisins utilisés avaient une concentration moyenne en glucose et fructose de 190 g/L, une concentration moyenne en acide-L-malique de 4,2 g/L, un pH moyen de 3,5 et un IPT moyen de 35.
- 1,5 g/L d'extrait de levure
- 1,5 g/L d'extrait de malt
- 0,5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 mL/L de tween 80
- le pH est ajusté à 5,0 avec de la soude 5N

Après autoclavage 40 mL/L d'éthanol filtré (0,45  $\mu\text{m}$ ) sont ajoutés ainsi que du biphényl (0,02 % p/v dans de l'éthanol) et du chloramphénicol (0,005 % p/v dans de



---

### Matériels et méthodes

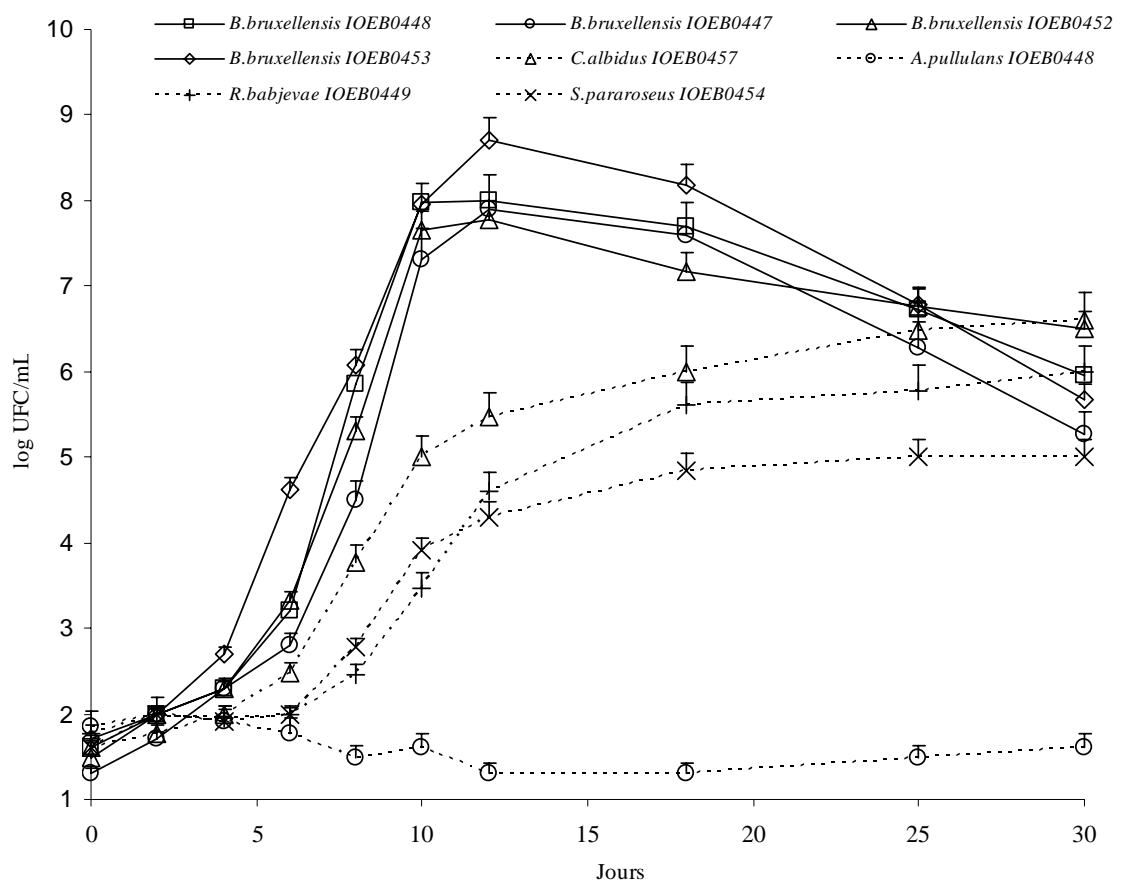
l'éthanol). Le milieu estensemencé avec l'échantillon dans un erlenmeyer et incubé à 30°C pendant dix jours sous légère agitation. Lorsque l'enrichissement porte sur la microflore des baies de raisins celles-ci sont directement incubées dans le milieu (Figure 23). Mais la technique de l'enrichissement spécifique est évidemment applicable à tous les échantillons susceptibles de contenir une faible quantité de l'espèce recherchée (eaux de lavage du matériel vinicole...).

Les composants du milieu EBB ont été choisis afin de favoriser le développement des *B. bruxellensis* au détriment des levures majoritaires à la surface de la baie de raisins. Dans le milieu, la concentration en sucre fermentescible est environ de 40 g/L soit près de cinq fois moins que dans un moût classique afin de ne pas favoriser les levures *Saccharomyces*. L'éthanol permet d'inhiber les levures majoritaires de la baie de raisins qui présentent une tolérance limitée vis-à-vis de l'éthanol (Kunkee 1984). Les extraits de malt et de levure contiennent des vitamines, comme la pyridoxine, indispensables à la croissance de *B. bruxellensis* (Rose et Harrison 1971). L'extrait de levure apporte une quantité importante d'azote assimilable dont l'effet bénéfique sur *B. bruxellensis* est reconnu (Uscanga et al. 2000). Enfin, le Tween apporte des acides gras insaturés essentiels. Il assure aussi le rôle de détergent nécessaire pour laver les baies et détacher les cellules microbiennes qui y sont adhérees. Le milieu EBB est plus favorable à la croissance de *B. bruxellensis* qu'à celle des autres espèces de levures susceptibles d'être majoritaires sur la baie de raisin (Figure 24). Au bout de dix jours, *B. bruxellensis* atteint une population d'environ  $10^8$  UFC/mL alors que les autres espèces atteignent uniquement  $10^5$  UFC/mL. Ce rapport de 1000 doit être suffisant pour inverser les proportions initiales sur la baie de raisins et permettre la détection des *B. bruxellensis* le cas échéant.

## Matériels et méthodes



**Figure 23:** Exemple de baies directement incubées dans un erlenmeyer contenant du milieu d'enrichissement, ici le milieu EBB pour la détection de *B. bruxellensis*.



**Figure 24:** Comparaison de la croissance de différentes espèces et souches de levures dans le milieu EBB.

---

### *Matériels et méthodes*

Pour les bactéries deux milieux d'enrichissement ont été utilisés suivant que l'on s'intéresse aux bactéries à Gram positif ou aux bactéries à Gram négatif.

Pour les bactéries à Gram positif le milieu EBL (Enrichissement des Bactéries Lactiques) est composé de :

- 250 mL/L de jus commercial de raisins rouges
- 10 g/L de glucose
- 10 g/L de peptone de soja
- 5 g/L d'extrait de levure
- 0,2 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,05 g/L de  $MnSO_4 \cdot H_2O$
- le pH est ajusté à 4,8 avec du KOH 5N.

Après autoclavage, 0,05 % (p/v dans de l'eau distillée) de pimaricine sont ajoutés. Les bactéries à Gram positif d'intérêt œnologique sont des bactéries lactiques dont la multiplication est favorisée par l'absence d'oxygène. Dix millilitres de milieu dans des tubes de verre stériles sontensemencés avec l'échantillon puis placés dans des jarres d'anaérobiose à 25°C. L'incubation dure 14 jours.

Pour les bactéries à Gram négatif (Morris et *al.* 1997) le milieu est composé de :

- 1,7 g/L de tryptone
- 0,3 g/L de peptone de soja
- 0,25 g/L de glucose
- 0,5 g/L de NaCl
- 0,25 g/L de  $K_2HPO_4$
- le pH est ajusté à 7,0 avec du KOH 5N

Après autoclavage, 0,05 % (p/v dans de l'eau distillée) de pimaricine et 0,01 % (p/v dans de l'eau distillée) de pénicilline sont ajoutés. Le milieu estensemencé avec l'échantillon dans un erlenmeyer et incubé à 25°C pendant cinq jours sous légère agitation.

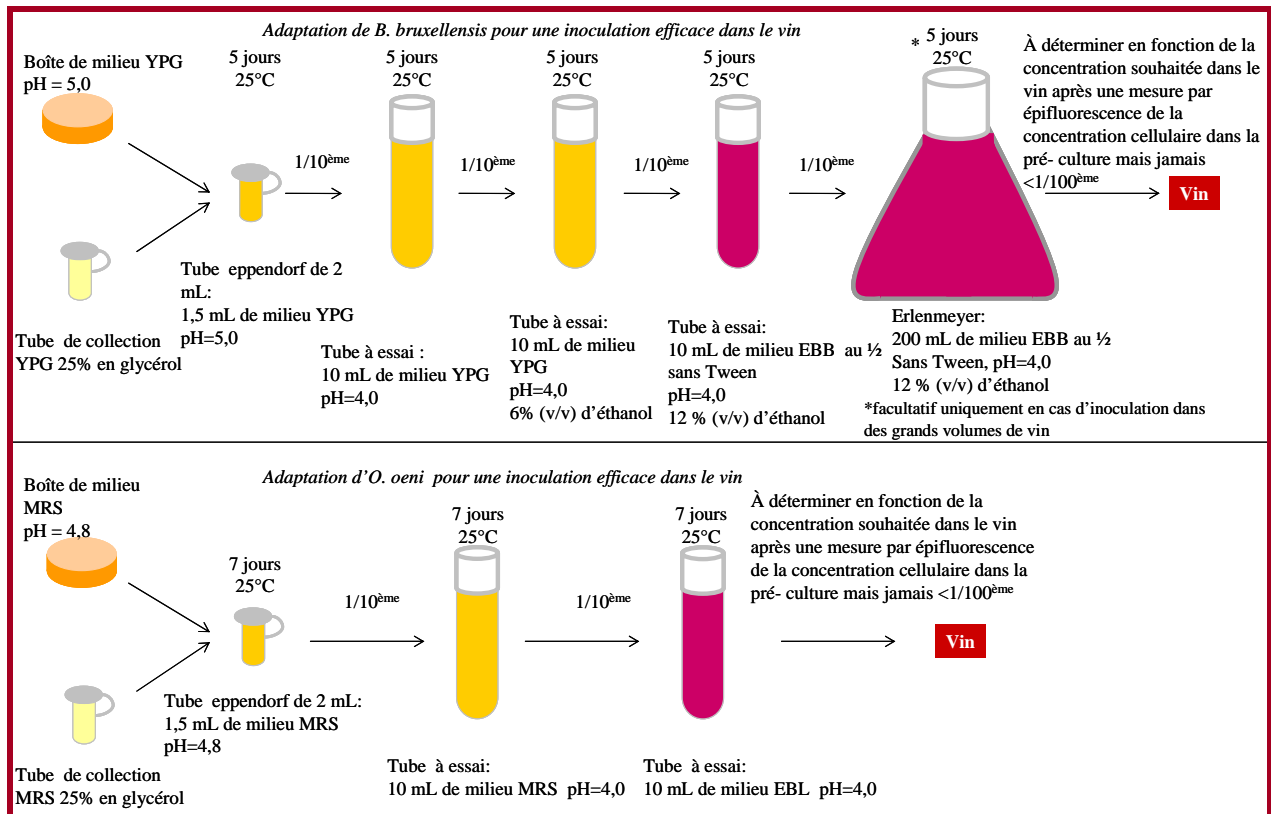
Afin de détecter les espèces minoritaires présentes sur la baie de raisins, les baies doivent être incubées directement dans le milieu de culture (Figure 23). Généralement, une cinquantaine de baie sont incubées dans 200 mL. Pour s'assurer que la détection des espèces recherchées, qui sont couramment manipulées au laboratoire, ne soit pas le résultat d'une contamination lors des prélèvements nécessaires au suivi par exemple, le contrôle en parallèle de témoins négatifs, sans baie, est indispensable.

#### **II.4 La composition des milieux liquides d'adaptation.**

Lorsque l'expérimentation nécessite l'inoculation d'un vin afin de simuler le développement d'une ou plusieurs espèces naturellement présentes, il est souvent difficile de ré-acclimater au vin les micro-organismes entretenus dans les conditions de laboratoire. En effet, le passage direct d'un milieu de culture pour lequel les conditions de croissance sont optimales (substrats carbonés, azotés et facteurs de croissance en excès, absence d'éthanol, faibles quantités de composés phénoliques et pH favorable) au vin qui au contraire impose des conditions environnementales plus délicates, constitue un stress important pour les cellules. Cela est encore plus vrai lorsque les souches sont issues de collections conservées au froid (-20°C ou -80°C). En fait, tout ce passe comme si les cellules perdaient leur faculté d'adaptation au vin lorsqu'elles sont cultivées au laboratoire. Cela est particulièrement vrai pour la levure *B. bruxellensis* et la bactérie *O. oeni*. Des difficultés d'inoculation de ces micro-organismes sont dommageables, car il est par conséquent difficile de simuler et d'étudier leur développement naturel dans le vin.

Pour s'assurer d'une inoculation satisfaisante et introduire dans le vin des cellules actives à la concentration désirée, il faut réadapter progressivement les cellules. Cela impose des repiquages successifs des cellules dans des milieux adaptés à l'espèce et se rapprochant de plus en plus des conditions de la culture finale dans le vin (Figure 25).

## Matériels et méthodes



**Figure 25:** Protocoles d'adaptation de *B. bruxellensis* et d'*O. oeni*, entretenues dans des conditions de laboratoire, pour une inoculation efficace dans le vin.

### II.5 La composition des milieux utilisés pour les micro-vinifications.

Les études de physiologie microbienne des espèces œnologiques sont d'autant plus pertinentes qu'elles sont réalisées dans des conditions mimant le plus fidèlement possible les conditions rencontrées sur le terrain. Pour simuler le moût, du jus commercial de raisins rouges est utilisé. Il est complété en glucose et en fructose pour obtenir une concentration équivalente en hexoses fermentescibles de 200 g/L. La concentration en acide-L-malique est ajustée à 4,2 g/L (concentration maximale observée dans les jus commerciaux de raisins). Suivant les expérimentations, le pH est abaissé avec de l'acide orthophosphorique ou augmenté avec du KOH 5N. Le milieu est systématiquement stérilisé par filtration (0,22 µm) plutôt que par autoclavage, afin d'éviter la détérioration des composés du raisin par le chauffage et la pression.

Les micro-vinifications sont réalisées dans une chambre à 25°C. Les contenants sont des flacons Schott®. Durant les fermentations alcooliques le volume réactionnel représente les deux tiers du volume intérieur de la bouteille qui est fermée par un bouchon silicone percé par

une seringue. Pour les essais post FA, le milieu liquide représente la totalité du volume intérieur de la bouteille. Après un prélèvement, le volume de milieu soustrait est remplacé par l'ajout de billes préalablement autoclavées. Chaque essai de micro-vinifications est répété trois fois.

## **II.6 La conservation des micro-organismes.**

En milieu liquide, les micro-organismes sont repiqués tous les quinze jours. Les micro-organismes cultivés sur boîte peuvent être conservés plus longtemps à 4°C avec la boîte « paraffilmée », mais pour des durées inférieures à un mois. Pour des conservations à plus long terme, les souches sont mises en culture liquide à partir d'une colonie prélevée sur milieu solide, puis conservées dans du milieu YPG à 25% (p/v) de glycérol stérile à -20°C.

## **II.7 L'observation des cellules viables par épifluorescence.**

### **II.7.1 L'observation de la microflore viable.**

Les micro-organismes viables sont dénombrés à partir d'un protocole et de matériels développés par la société Chemunex. Selon la charge microbienne suspectée, entre 0,1 mL et 10 mL d'échantillon sont filtrés à travers une membrane (*Chemfilter* CB04) qui est ensuite incubée (30 minutes à l'obscurité et à 30°C) en présence des réactifs (550 µL de tampon, *Chemsol* B16, additionné de 15 µL de substrat, l'acétate de fluorescéine, *ChemChrome* V6). Le substrat initialement non-fluorescent est clivé par un système enzymatique cellulaire et libère un fluorochrome. Ce dernier excité par un rayonnement lumineux de longueur d'onde appropriée (ultraviolets à 480 nm) émet une fluorescence verte. Le niveau d'intensité de fluorescence est directement lié à l'intégrité des membranes cellulaires et à l'activité métabolique des cellules. Lorsque les cellules sont mortes aucune fluorescence n'est émise. Placée entre lame et lamelles, la membrane est observée à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus BX51), en utilisant le grossissement de 1000 et un filtre approprié (Olympus 467803). Cette technique permet de compter les cellules vivantes. Les résultats sont obtenus en calculant le nombre moyen de micro-organismes visualisés dans cinq champs différents. Chaque champ doit comprendre entre 10 et 100 cellules. Les dénombrements sont exprimés en cellules viables par mL (ç/mL).

## **II.7.2 La distinction des levures viables et des levures vivantes.**

Pour les levures, une seconde méthode permet de colorer différemment les cellules vivantes et mortes. Elle est particulièrement appréciable dans le cas de suivis des traitements de stabilisation microbienne puisqu'elle permet d'évaluer la proportion de levures mortes et celle de levures survivantes. Cette méthode est commercialisée sous la dénomination de *Live-Dead Yeast Viability Kit* (Molecular Probes). Dix millilitres d'échantillon sont centrifugés (6 000g, 5min). Le culot est repris dans 1 mL de tampon Glucose-Hepes (2% p/v Glucose – 10 mM Na-Hepes, pH= 7.0). Un microlitre de colorant *Fun1*® est ajouté avant une incubation de 30 minutes à 30°C et à l'obscurité. Dix microlitres du mélange réactionnel sont placés sous lame et lamelle avant l'observation microscopique. Cette technique implique trois fluorochromes différents : le 4,6-diamidino-2-phényl-indole, le fluoresceinisocyanate et le tetramethylrhodamine-isothiocyanate, et requiert l'utilisation d'un filtre interférentiel à triple bande (Olympus E0197412). Les levures vivantes apparaissent vertes et les mortes sont rouges.

## **III La caractérisation physiologique des micro-organismes.**

Différentes caractères phénotypiques ont été comparés pour des souches et des espèces. Parmi eux la tolérance vis-à-vis de molécules toxiques et / ou sa résistance à des conditions de stress environnementaux a été estimée. En outre les cinétiques de croissance et les principales activités métaboliques (production de phénols volatils pour *B. bruxellensis*, dégradation de l'acide-L-malique pour *O. oeni*) ont été étudiées. Les techniques d'analyses mises en œuvre sont relativement simples et elles ont pour avantage de pouvoir pondérer par des mesures quantitatives (concentration minimum d'inhibition, taux de survie...) des caractéristiques phénotypiques observables et physiologiquement pertinentes.

### **III.1 La détermination des Concentrations Minimum d'Inhibition (CMI).**

#### **III.1.1 Les CMI en milieu solide.**

Pour pouvoir comparer les CMI de différents micro-organismes il est indispensable de travailler sur des cellules à des stades de croissance et à des concentrations similaires. Pour cela, les mesures de CMI doivent être réalisées sur des biomasses microbiennes fraîches. Les souches sélectionnées pour l'étude sont donc remises en culture la semaine qui précède l'expérimentation sur des boîtes de milieux YPG et MRS pour, respectivement, les levures et les bactéries. Le jour de l'expérience, la biomasse microbienne est mise en suspension dans de l'eau isotonique (NaCl 10 g/L) stérile. La densité cellulaire est ajustée à une unité Mc Ferland. Puis après homogénéisation, cinq et trois dilutions décimales sont respectivement réalisées pour les levures et bactéries afin d'obtenir des concentrations cellulaires proches de  $10^3$  UFC/mL. Deux cent microlitres de chaque solution cellulaire sont introduits dans les puits d'une plaque Elisa stérile.

Les milieux solides utilisés sont coulés le jour de l'expérimentation dans des boîtes de Petri carrées de 100 mm de côté. Après l'autoclavage, les milieux sont placés dans un bain-marie à une température de 60°C pour être maintenus liquides le temps de la préparation des solutions de la molécule à tester.

Ces solutions sont préparées à partir d'une solution mère à la concentration de 156,25 g/L. Selon la molécule, le solvant utilisé est soit de l'eau, soit de l'éthanol (70 % p/v), soit de l'acétone. Puis une série de dilution résumée dans le Tableau XIII permet, après une addition à 10% (v/v) dans 45 mL de milieu gélosé, d'obtenir une gamme de concentrations finales dans la gélose comprises entre 10 g/L et 1,2 mg/L. Le mélange par homogénéisation lente est réalisé au moment du coulage des boîtes qui sont ensuite séchées. Afin d'opérer dans des conditions de stérilité optimales, les boîtes et la suite de l'expérimentation sont réalisées sous une hôte aspirante à flux laminaire.



**Tableau XIII.** Protocole de préparation des boîtes pour la mesure des CMI en milieu solide.

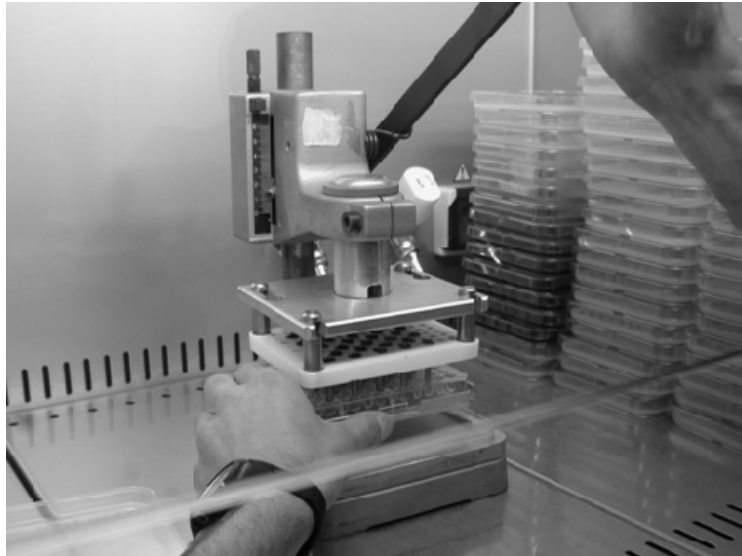
	<b>Solution</b>	<b>Solvant (mL)</b>	<b>Concentration dans la solution (g/L)</b>	<b>Concentration finale dans la boîte (g/L)</b>
<b>Mère</b>	3,125 g de produit pur	20	156,25	-
<b>Solution I</b>	12,8 mL de solution mère	7,2	100	10
<b>Solution II</b>	4 mL de solution I	4	50	5
<b>Solution III</b>	2 mL de solution I	6	25	2,5
<b>Solution IV</b>	1 mL de solution I	7	12,5	1,25
<b>Solution V</b>	1 mL de solution I	15	6,25	0,625
<b>Solution VI</b>	4 mL de solution V	4	3,125	0,3125
<b>Solution VII</b>	2 mL de solution V	6	1,563	0,1563
<b>Solution VIII</b>	1 mL de solution V	7	0,782	0,0782
<b>Solution IX</b>	1 mL de solution V	15	0,391	0,0391
<b>Solution X</b>	4 mL de solution IX	4	0,196	0,0196
<b>Solution XI</b>	2 mL de solution IX	6	0,098	0,0098
<b>Solution XII</b>	1 mL de solution IX	7	0,049	0,0049
<b>Solution XIII</b>	1 mL de solution IX	15	0,0245	0,0024
<b>Solution XIV</b>	4 mL de solution XIII	4	0,0123	0,0012

L'ensemencement est réalisé en utilisant un appareil de Steers comme illustré sur la figure 26. Le volume déposé est environ de 10  $\mu$ L à la concentration de  $10^3$  UFC/mL. Après le dépôt, les boîtes sont de nouveau séchées jusqu'à disparition des halots de liquide observables aux endroits des dépôts. Puis elles sont incubées à 25°C. A chaque fois, trois boîtes témoins sont réalisées. La première est réalisée en appliquant les dépôts cellulaires à la surface d'une boîte composée uniquement de milieu de culture sans molécule inhibitrice (témoin positif). La seconde permet de s'assurer de l'innocuité du solvant utilisé pour dissoudre la molécule inhibitrice. Elle est réalisée en déposant les cellules à la surface d'une boîte contenant 10 % du solvant. Une dernière boîte sans molécule, sans solvant et avec comme dépôt uniquement l'eau utilisée pour la préparation des solutions cellulaires permet de s'assurer des conditions de stérilité de l'opération.

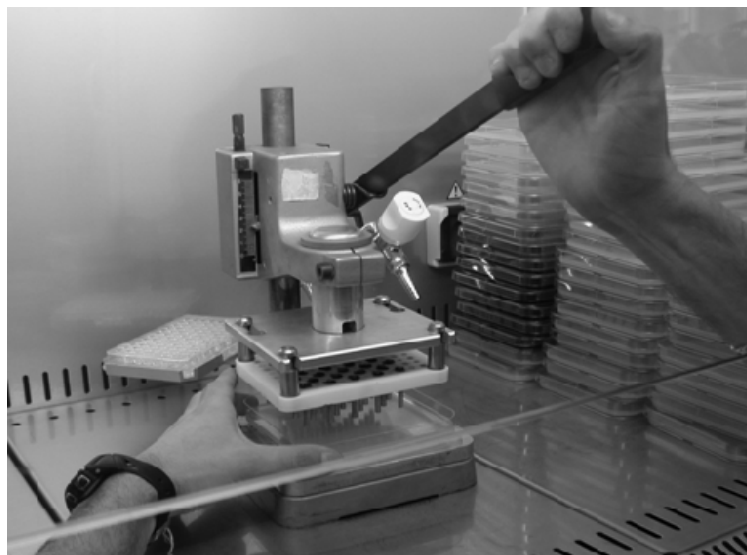
---

## Matériels et méthodes

### 1: Prélèvement des différentes solutions cellulaires

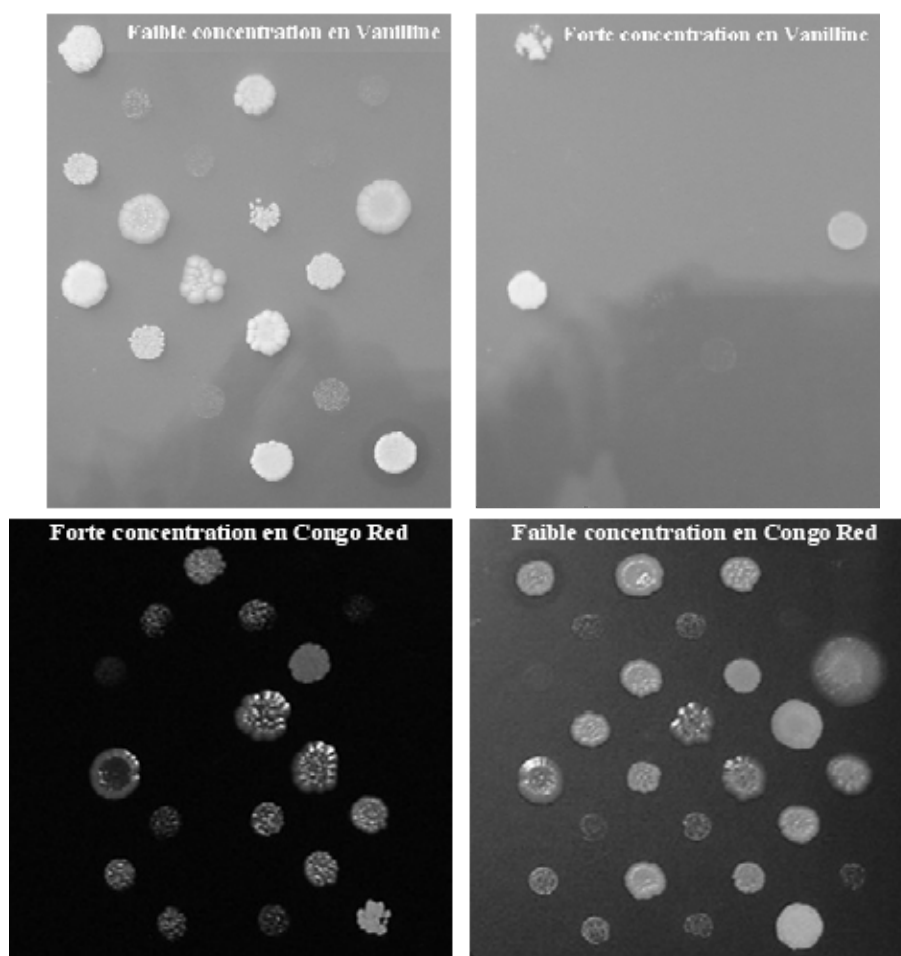


### 2: Application des solutions cellulaires sur les boîtes



**Figure 26:** Illustration de l'appareil de Steers utilisé pour les mesures de CMI en milieu solide.

Les boîtes sont lues lorsque la totalité des souches testées se sont développées à la surface de la boîte de témoin positif. Les résultats, développement de colonies ou pas, sont observables à l'œil nu (Figure 27). Par définition, une souche a une CMI égale à  $n$  g/L lorsque les colonies se sont développées sur la boîte contenant  $\frac{n}{2}$  g/L et pas sur la boîte avec  $n$  g/L de la molécule testée.



**Figure 27:** Illustration du type de résultats obtenus lors des expériences de CMI en milieu solide.

### **III.1.2 Les CMI en milieu liquide.**

La pertinence des tests de CMI en milieu solide est l'objet de plusieurs critiques. La solidité du milieu est suspectée affecter le contact entre les molécules inhibitrices et les cellules microbiennes à cause de la diffusion au sein de la gélose (Brown et Brown 1991, Speakman et *al.* 1997). De plus certains composés n'ont qu'un effet immédiat car ils s'hydrolysent naturellement dès qu'ils sont dissous dans des solutions aqueuses. La persistance à la surface de la boîte de cellules qui ne sont directement en contact avec la molécule au moment où celle-ci est active peut fausser la mesure. Les micro-organismes peuvent en effet se re-multiplier dès que les molécules inhibitrices seront hydrolysées. C'est notamment le cas du DMDC qui sera l'objet d'une étude approfondie durant ce travail. Par conséquent, l'étude de ces molécules requiert une analyse en milieu en liquide.

---

### *Matériels et méthodes*

Les suspensions cellulaires et la solution de la molécule inhibitrice sont préparées comme dans la méthode précédente. Mais le milieu est directement placé dans des macrocuves de spectrophotomètre préalablement stérilisées par une exposition de 20 min aux UV. Pour éviter le phénomène d'hydrolyse précédemment évoqué, la suspension cellulaire (10 % v/v) est ajoutée la première, puis la solution de la molécule inhibitrice (10 % v/v).

Deux témoins sont réalisés. Le premier, qualifié de témoin positif, est réalisé en ensemençant le milieu avec 10 % de suspension cellulaire et 10 % de solvant pur. Le second, qualifié de témoin négatif, est préparé avec 10 % d'eau stérile et 10 % de solvant. Chaque cuve est fermée avec un bouchon en plastique prévu à cet effet et également stérilisé aux UV. Le volume réactionnel total est de 3 mL ce qui permet un vide suffisant au dessus du liquide pour éviter l'expulsion du bouchon lors des dégagements gazeux qui accompagnent les développements microbiens. Après homogénéisation, la densité optique à 600 nm de chaque mélange réactionnel est mesurée. Ces mesures sont répétées 7 jours après l'incubation. C'est l'augmentation de la densité optique qui rend compte de la capacité de croissance malgré la présence de la molécule inhibitrice. Puisque ici la lecture est soumise aux variations liées à la mesure, chaque essai de concentration est triplé. Lorsque la DO a progressé avec une variation moyenne significativement supérieure à celle du témoin négatif, la croissance microbienne est considérée comme caractéristique de l'absence d'inhibition. Une souche a une CMI liquide de  $n$  g/L dès lors qu'elle se développe dans les cuves contenant  $\frac{n}{2}$  g/L alors qu'elle est totalement inhibée dans les cuves avec  $n$  g/L.

### **III.2 La résistance à l'inoculation directe.**

Afin de pouvoir comparer simplement les capacités intrinsèques des espèces et des souches à résister aux conditions physico-chimiques particulières du vin, il est possible de déterminer le taux ( $\tau$ ) défini par le rapport entre la population dénombrée 48 h après l'inoculation ( $pop_{48}$ ) et la population dénombrée juste après l'inoculation et l'homogénéisation ( $pop_0$ ). Dans ce cas il ne faut pas adapter les cellules au vin comme cela était présenté dans la figure 25 mais il faut passer directement du milieu de laboratoire (YPG pour les levures et MRS pour les bactéries) au vin, tout en veillant à récupérer les cellules à des stades de croissance identiques. Pour cela des cinétiques de croissance doivent être au préalable réalisées et les cellules sont récoltées en fin de phase exponentielle. Chaque essai est

triplé. Pour étudier l'effet d'un paramètre, les taux obtenus pour différentes valeurs du paramètre considéré sont comparés statistiquement (Partie IV, Chapitre II).

Dans la pratique, l'ordre de grandeur de  $\tau$  peut considérablement varier selon les conditions expérimentales. Par définition, lorsqu'il est inférieur à 0,1, il est appelé taux de survie, mais lorsqu'il est compris entre 0,1 et 10 il est préférable de parler de taux d'implantation. Enfin,  $\tau$  sera qualifié de taux de développement pour des valeurs supérieures à 10.

### **III.3 L'évaluation des cinétiques de croissance.**

Il est également possible de comparer les capacités d'adaptation des micro-organismes à différentes conditions environnementales en étudiant leur cinétique de développement. La comparaison porte sur les trois principaux paramètres caractéristiques d'une croissance microbienne : le taux de latence, le taux de croissance maximal durant la phase exponentielle et la population maximale. Un micro-organisme qui présente de bonnes capacités d'adaptation aux conditions mises en jeu a un temps de latence faible, et/ou un taux de croissance maximal élevé et/ou une population maximale élevée. Cette méthode peut également être utilisée pour comparer l'effet d'un paramètre sur la croissance d'une souche en particulier. L'effet du paramètre est apprécié selon son incidence sur les critères cinétiques. Afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus chaque essai est triplé.

Ces expérimentations sont simples à réaliser. Elles renseignent sur les caractéristiques phénotypiques des micro-organismes, mais elles sont évidemment pertinentes uniquement si les cellules sont mises en oeuvre dans des conditions (cycle de croissance, concentration initiale) semblables dans les différentes modalités comparées. Par conséquent, des suivis de croissance dans des conditions standardisées (milieu YPG à pH 5,0 pour les levures et milieu à MRS à pH 4,8 pour les bactéries lactiques) sont, au préalable, indispensables.

### **III.4 La détermination de certaines propriétés métaboliques.**

Dans ce travail, deux propriétés métaboliques sont évaluées. La première est la capacité de production des phénols volatils par différentes espèces et souches de levures et de bactéries, la seconde est la capacité de dégradation de l'acide-L-malique par des souches d'*O. oeni*.

#### **III.4.1 La production des phénols volatils.**

La capacité de production des 4-vinylphénol, 4-vinylgâïacol, 4-éthylphénol et 4-éthylgâïacol est évaluée lors de cultures dans du jus de raisin et directement dans du vin. La première situation permet de reproduire les conditions du moût et d'étudier la production lors des premières étapes de la vinification. La seconde permet d'étudier plus particulièrement la période d'élevage. Ces deux modalités sont complémentaires car l'activité de décarboxylation des micro-organismes nécessaire à la production des phénols est peut être soumise à des régulations. Il semble donc approprié de comparer la production dans un milieu qui contient des substrats carbonés classiques à des concentrations non limitantes comme dans le moût, et la production dans le vin fini où les substrats énergétiques sont nettement moins abondants. Dans ce dernier cas, la voie de production des phénols volatils pourrait être favorisée. Par contre, si la production des phénols volatils est un processus de détoxification par la dégradation des acides hydroxycinnamiques, il est intéressant de combiner des suivis où les doses naturelles de précurseurs dans le moût et dans le vin sont laissées telles qu'elles et des suivis où l'on complètera ces concentrations à des niveaux beaucoup plus élevés : 100 mg/L pour l'acide coumarique et 40 mg/L pour l'acide férulique.

Avant chaque essai, les caractéristiques du vin et du jus de raisin sont standardisées (Tableau XIV). Puis ils sont filtrés stérilement (0,22 µm). Avant l'inoculation du micro-organisme testé, l'absence de contamination est vérifiée par un étalement sur boîte. Dans un essai préalable, le vin ou le jus de raisin sont supplémentés en acide coumarique (100 mg/L) et en acide férulique (40 mg/L), préparés dans de l'éthanol puis filtrés avant l'ajout. Après une vérification de la production avec ces composés en excès, l'essai est répété en absence d'ajout.

**Tableau XIV.** Caractéristiques analytiques du jus de raisin et du vin utilisés pour tester la production des phénols volatils.

Paramètres	Jus de raisin	Vin
pH	3,6	3,6
[glucose+fructose] (g/L)	200	<1
[Acide-L-malique] (g/L)	4,2	<0,2
IPT	35	75
TAV (% v/v)	0*	12,5
	*1 % lors d'ajout d'acide phénoliques	

Dans le jus de raisin, les phénols volatils sont dosés après la fin de la FA et trente jours après la fin de la FA. Dans le vin ils sont dosés une première fois quatorze jours après l'inoculation, puis toutes les deux semaines pendant 3 mois. Chaque essai est triplé et une production par voie chimique des phénols volatils est exclue par les contrôles négatifs qui ne sont pas inoculés en micro-organismes.

#### **III.4.2 La dégradation de l'acide-L-malique.**

Ces essais ont pour but d'évaluer la population d'*O. oeni* nécessaire pour dégrader une certaine concentration d'acide-L-malique, mais aussi pour caractériser des différences cinétiques de l'activité fermentaire de différentes souches. Ils sont réalisés dans le cadre de micro-vinifications dans des vins récupérés après FA. Avant leur utilisation, les paramètres du vin sont contrôlés, notamment la concentration en acide-L-malique qui doit être au minimum de 1,2 g/L. Dans le cas contraire, elle est complétée par l'ajout d'acide malique jusqu'à cette concentration. Puis ils sont filtrés stérilement 0,22 µm.

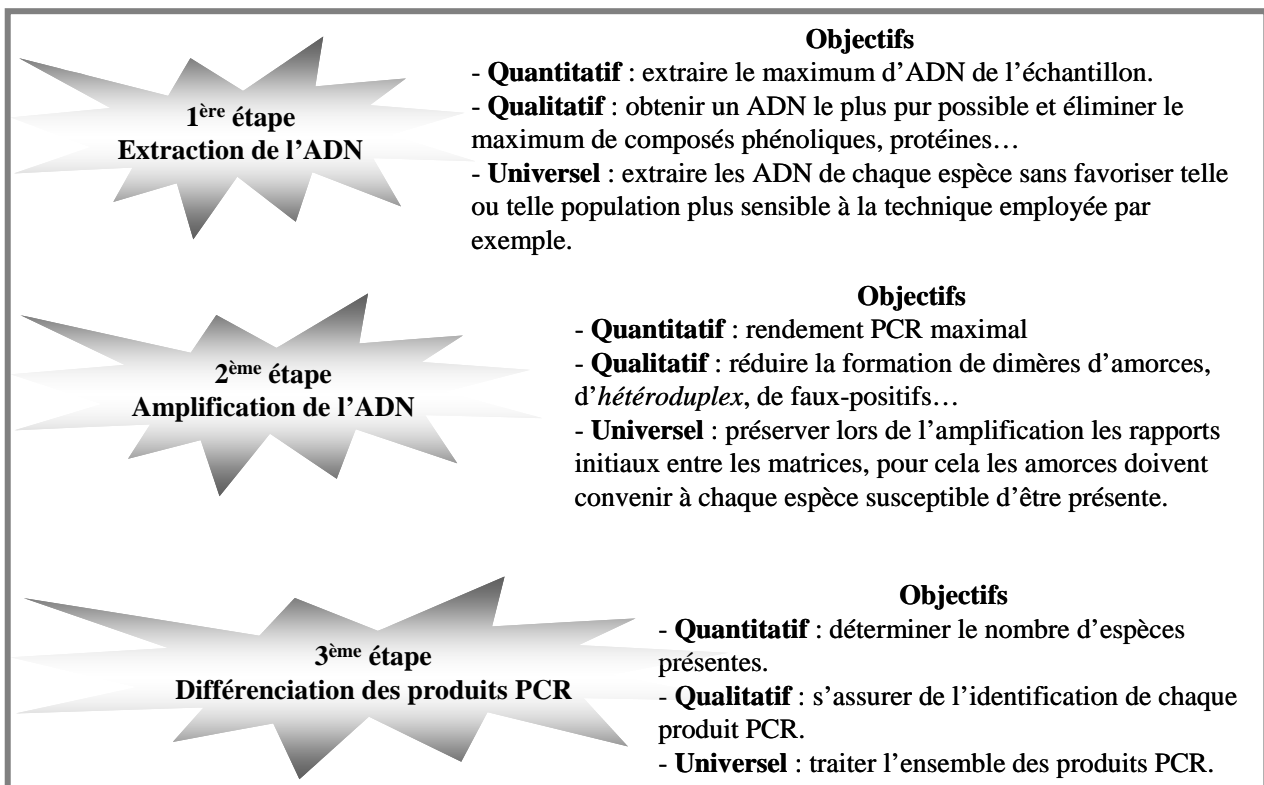
Dans une première série d'essais, c'est l'effet de la quantité initiale d'acide-L-malique sur le temps nécessaire à la FML et la population d'*O. oeni* nécessaire à la FML qui a été évalué en suivant des vins avec des concentrations initiales variables en acide-L-malique. Pour cela les FML sont suivies par un dosage régulier de l'acide-L-malique et par un dénombrement quotidien de la population d'*O. oeni* en utilisant le milieu ANGP.

Dans les seconds essais, il s'agissait d'étudier la diversité intraspécifique et les différences d'aptitude des souches d'*O. oeni* à réaliser la FML. Dans ce cas, seule la cinétique de dégradation de l'acide-L-malique est mesurée.

## PARTIE II. LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

Les méthodes d'étude de l'écologie microbienne suivent un schéma commun qui peut-être divisé en trois étapes. Chacune doit être la plus performante possible pour assurer le meilleur seuil de détection de la méthode prise dans sa globalité.

Toutes ces méthodes débutent par une extraction de l'ADN. Cette étape est essentielle car la quantité et la qualité de l'ADN microbien récupéré conditionne les deux étapes qui constituent la suite de l'analyse (Figure 28).



**Figure 28:** Les trois principales étapes d'étude de l'écologie microbienne par méthode moléculaire.

### I L'extraction de l'ADN.

Plusieurs techniques d'extraction d'ADN sont possibles. Certaines permettent une extraction rapide et directe de l'ADN à partir des cellules. D'autres indirectes nécessitent de recourir à un protocole en plusieurs étapes. Le choix de ces méthodes dépend de la nature de l'ADN ciblé (ADN chromosomique des bactéries, ADN génomique des levures), de l'origine



*Matériels et méthodes*

des cellules (échantillon de vin, eau de lavage des baies de raisins, eau de lavage du matériel vinicole, culture liquide, colonie isolée sur milieu gélosé) et de l'objectif de la manipulation (identification interspécifique ou intraspécifique d'une culture pure, résolution de mélange microbien) (Figure 29).

	<b>Méthodes directes</b>		<b>Méthodes indirectes</b>	
<b>Rendement</b>	+		+++	
<b>Pureté de l'ADN extrait</b>	+/-		+++	
<b>Sélectivité de l'extraction</b>	-		+	
<b>Temps de l'extraction</b>	+++ entre 15 à 30 min		- ≈12 h	
<b>Standardisation de l'ADN pour traitement en aval</b>	+/-		+++	
	<b>Méthode "choc thermique"</b>	<b>Méthode FTA</b>	<b>Méthode "Anusobol"</b>	<b>Méthode "Promega®"</b>
<b>Cultures</b>	solide	liquide et solide	liquide et solide	liquide et solide
<b>Cultures pures</b>	+++	+++	+++	+++
<b>Mélanges</b>	---	-	+++	+++
<b>Nature des cellules</b>	Levures et bactéries	Levures et bactéries	Levures	Bactéries
<b>Coût de l'extraction (+++ : faible)</b>	+++	---	+	-
<b>Conservation de l'ADN extrait</b>	---	+++	+	+

Figure 29: Conditions opératoires des différentes méthodes d'extraction d'ADN.

### **I.1 L'extraction directe sur colonies.**

Lorsqu'on travaille sur les colonies isolées de boîtes, il est possible de réaliser directement les PCR à partir de la biomasse présente à la surface de la gélose. Lorsqu'elle est relativement fraîche (maximum quinze jours), une toute petite quantité de biomasse est collectée avec la pointe d'un cure-dents préalablement autoclavé, puis directement mise en suspension dans le mélange réactionnel utilisé pour la PCR. Un cycle initial à 95°C pendant 10 min est rajouté pour fragiliser les cellules et faciliter l'accession des réactifs à l'ADN.

### **I.2 L'extraction par le kit FTA (*Whatman*®).**

Lorsque les colonies isolées sont plus âgées, la méthode précédente n'est pas satisfaisante. Il est nécessaire de passer par une étape d'adsorption de la biomasse sur une membrane afin de pouvoir la réhydrater, la laver et amorcer sa déstructuration. Dans ce cas, la biomasse collectée à l'aide du cure-dent est mise en suspension dans 25 µL d'eau PPI. Ensuite 7,5 µL de la suspension cellulaire sont déposés sur une membrane FTA (*Whatman*®). Les membranes FTA sont imprégnées avec une formule chimique brevetée qui lyse les membranes cellulaires et dénature les protéines. Les acides nucléiques sont ainsi immobilisés et stabilisés pour un stockage à température ambiante. Les cartes FTA protègent les acides nucléiques des nucléases, de l'oxydation, des dommages causés par les UV, mais aussi des attaques microbiologiques et fongiques. Des disques de 1,2mm de diamètre sont poinçonnés sur la carte comme échantillons. Puis ils sont déposés directement dans le tube PCR. Après deux lavages successifs avec du Tris-HCl 10mM et un séchage à 60°C durant la préparation du mélange réactionnel de la PCR (environ 15 min), la PCR est réalisée directement à partir du disque FTA comme s'il s'agissait d'une solution d'ADN classique.

### **I.3 L'extraction de l'ADN chromosomique des levures.**

La technique développée par Ausubel et *al.* 1995 permet d'extraire efficacement l'ADN chromosomique des levures dans le cas des cultures pures liquides mais aussi des suspensions cellulaires collectées à la surface des boîtes de Petri.

Dans tous les cas, les cellules sont collectées après centrifugation (10 000 g, 15 min), puis le culot cellulaire est lavé avec 500 µL de TE. Une fois le surnageant éliminé

---

### *Matériels et méthodes*

(centrifugation 10 000g, 5 min), les cellules sont mélangées à 200 µL de tampon de lyse (Triton X-100 2 % v/v, SDS 1% p/v, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH=8 10 mM, EDTA 1mM), puis transférées dans un microtube à vis. Trois cents milligrammes de billes de verre (de diamètre entre 0,45 et 0,52 mm) sont ajoutés ainsi que 200 µL de mélange phénol/Chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1 v/v/v). Le mélange est agité vigoureusement au vortex pendant 5 min afin de casser les cellules. Puis 200 µL de TE sont ajoutés. Une centrifugation (10 000 g, 5 min) permet de séparer les débris cellulaires et le surnageant. Ce dernier est transféré dans un microtube contenant 1 mL d'éthanol absolu. Le mélange est homogénéisé par inversion du tube, puis placé 30 min à -20°C, ce qui permet la précipitation de l'ADN. Après une centrifugation (10 000 g, 5 min) et l'élimination du surnageant, le culot d'ADN est dissous dans 400 µL de TE avec 30 µg de RNase afin d'éliminer les ARNs. Après une incubation de 15 min à 37°C, 10 µL d'acétate d'ammonium sont ajoutés afin de stopper la réaction d'hydrolyse 1 mL d'éthanol 100 % est ajouté. Le mélange est de nouveau homogénéisé par inversion du tube. Une dernière centrifugation de 15 min à 10 000 g permet de récupérer le culot d'ADN génomique qui est ensuite parfaitement séché sous une cloche à vide avant d'être dissous dans un volume d'eau PPI compris entre 25 et 100 µL, selon la masse d'ADN, visibles sur la paroi du microtube.

#### **I.4 L'extraction directe de l'ADN microbien - méthode *Promega*®.**

Un protocole d'extraction de l'ADN microbien applicable à l'ensemble des échantillons susceptibles d'être traités (eau de lavage des baies de raisin, moût en fermentation, vin en période d'élevage ou embouteillé, eau de lavage du matériel vinicole) (Figure 30) a été mis au point durant ce travail afin de rendre universelle (levures et bactéries) cette première étape de l'analyse directe des échantillons en vue des analyses directes par PCR-DGGE.

### Matériels et méthodes

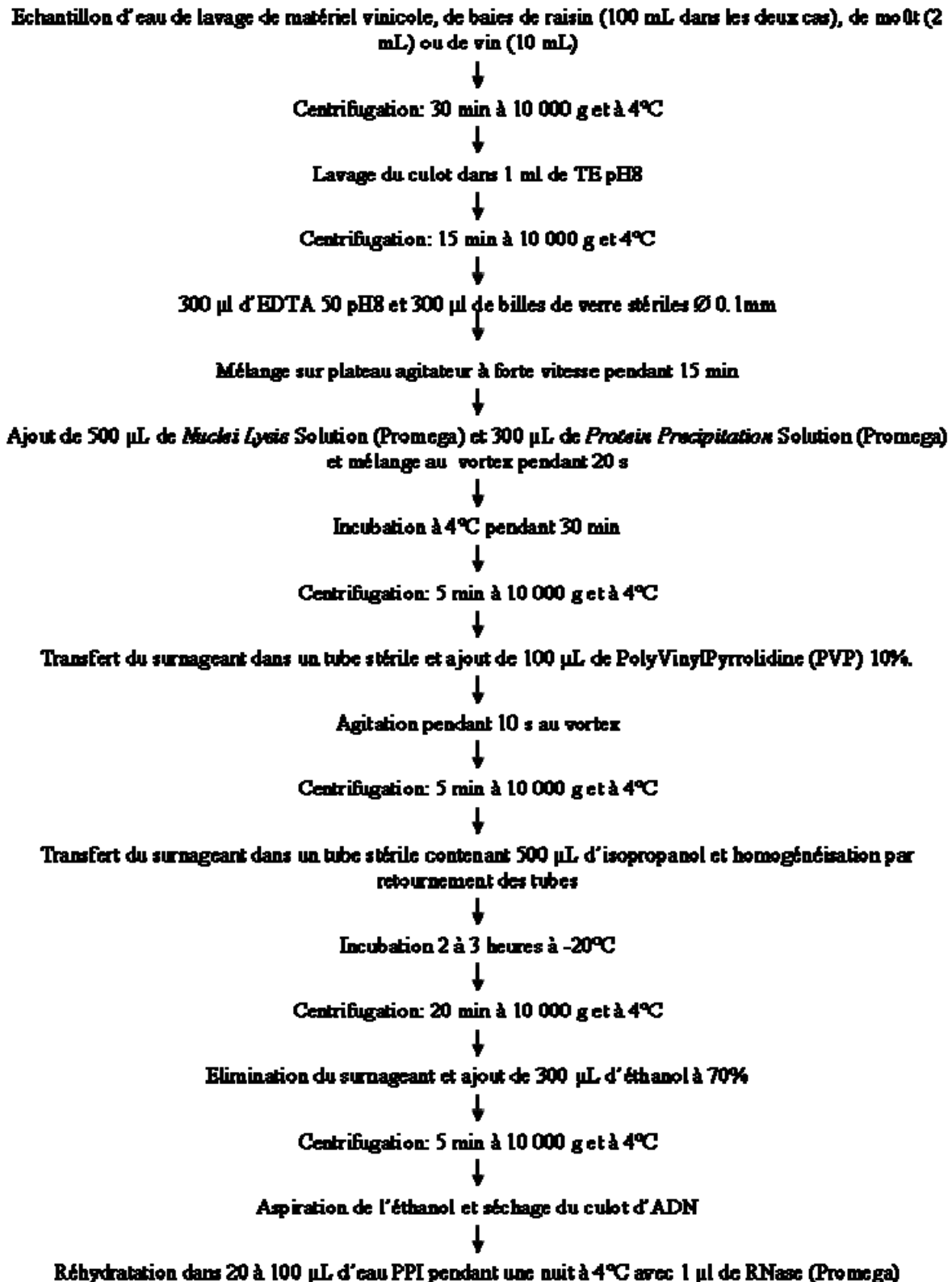


Figure 30: Protocole universel d'extraction de l'ADN microbien des échantillons.

## II L'Analyse de l'ADN.

### II.1 Le dosage et la conservation des ADN extraits.

A la fin de l'extraction les ADN sont généralement réhydratés une nuit à 4°C dans de l'eau PPI contenant de l'ARNase (hormis pour le protocole d'Ausubel et *al.* 1995 qui intègre le traitement à l'ARNase). Puis ils sont dosés au spectrophotomètre *SmartSpec* (+) Bio Rad® par mesure de la densité optique à 260 nm dans des cuves en quartz. La mesure de la densité optique à 280 nm permet d'estimer la quantité de protéines résiduelles. Le rapport  $\frac{DO_{260nm}}{DO_{280}}$  permet d'évaluer la pureté de l'ADN. Un rapport proche de 2 reflète une pureté satisfaisante. Les ADN sont ensuite conservés au congélateur à - 20°C jusqu'à l'analyse.

### II.2 La PCR classique.

Différentes PCR peuvent être réalisées pour la détection spécifique d'espèces et l'identification des espèces et des souches sur des colonies isolées ou lors des traitements des mélanges. Elles ont en commun les appareillages : un *thermocycler* PTC200 (MJ Research, Watertown, MA, USA) et un *thermocycler iCycler iQ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) lorsqu'un programme *touchdown* est requis et lors des PCR en temps réel.

Pour les PCR classiques, un mélange réactionnel standardisé, appelé *Custom -Made PCR Master mix* est couramment utilisé. Il contient un tampon de réaction (Tris-HCl : 10 mM, KCl : 50 mM, Triton X100 0,1 % v/v, BSA 0,2 mg/mL, glycérol 3,12 % v/v), du MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), des desoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 200 µM chacun) et de la *Taq* polymérase (0,1 U/µL). Ce mélange réactionnel est disponible concentré 12,5 X (*Custom made PCR master mix*, Qbiogene). La dilution de ce mélange s'effectue dans de l'eau PPI. La quantité d'ADN utilisée comme matrice est contenue dans 1 µL de la préparation d'ADN dont la concentration a préalablement été ajustée à 50 ng/µL. Les amorces reçues sèches sont au préalable réhydratées dans un volume de d'eau PPI déterminé pour qu'une dilution au 1/200<sup>ème</sup> permette d'obtenir la bonne concentration dans le mélange réactionnel final de la PCR. Classiquement le volume total est de 50 µL. Pratiquement, les différents volumes

d'amorces, de *mix* PCR et d'eau PPI sont calculés en fonction du nombre,  $n$ , d'échantillons à amplifier, de la prévision d'un témoin négatif et d'une réaction supplémentaire selon le mode opératoire suivant:

$$V_{\text{ADN}} = n + 2,$$

$$V_{\text{total}} = (n + 2) \times 50,$$

$$V_{\text{mix}} = \frac{V_{\text{total}}}{12,5},$$

$$V_{\text{amorce}} = \frac{V_{\text{total}}}{200}$$

$$\text{et } V_{\text{H}_2\text{O}} = V_{\text{total}} - V_{\text{mix}} - V_{\text{ADN}} - 2V_{\text{amorce}}$$

Les amorces sont les premières à être diluées, puis le *mix* PCR est ajouté. Pendant sa préparation, le mélange réactionnel est conservé dans de la glace. L'ADN est ajouté lorsque le mélange réactionnel est complet et aliquoté dans les puits PCR. Lors de l'usage des membranes FTA un patch FTA est assimilé à 1  $\mu\text{L}$  d'ADN. Mais lorsque la PCR est réalisée sur des cellules entières, le calcul ne prend pas en compte le volume d'ADN. Les cellules collectées stérilement sont directement mises en suspension dans le mélange réactionnel.

### **II.3 La PCR en temps réel et l'analyse des courbes de fusion.**

La PCR en temps réel nécessite l'utilisation d'un kit spécifique appelé Bio-Rad® *IQ SYBR Green Supermix* contenant un tampon de réaction (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM, pH=8,4), des désoxyribonucléotides : dATP, dTTP, dCTP, et dGTP (400  $\mu\text{M}$  de chaque), une *iTaq DNA polymerase*, du  $\text{MgCl}_2$  (6 mM), du *SYBR Green I* et de la fluorescéine (20 nM). La réaction de PCR est réalisée dans un volume final de 25  $\mu\text{L}$  contenant 0,01  $\mu\text{M}$  de chaque amorce, 50 ng d'ADN et 12,5  $\mu\text{L}$  du *mix* précédemment évoqué.

Le programme PCR utilisé se divise en deux phases. La première est une phase d'amplification proprement dite. Elle comprend une dénaturation initiale de 3 min à 95°C puis 35 cycles avec une étape de dénaturation (1 min à 95°C), une étape d'hybridation (1 min à 45°C) et une étape d'extension (1 min à 72°C). Cette première partie s'achève par une élongation de 10 min à 72°C. La seconde partie permet la détermination de la température de fusion. Il s'agit de réaliser des tests de dénaturation des doubles brins néosynthétisés en passant de 80°C à 90°C avec des incréments de 0,1 °C toutes les 10 secondes. Le  $T_m$  est ensuite déterminé à partir de l'évolution de la fluorescence émise dans le temps en traçant la

courbe  $-dURF/dT = f(T)$ . Le  $T_m$  est la valeur de la température pour laquelle cette courbe a atteint son maximum. C'est à dire la température à partir de laquelle la chute de fluorescence émise est la plus rapide.

## **II.4 Les électrophorèses.**

### **II.4.1 L'électrophorèse sur gel d'agarose.**

Les électrophorèses sur gel d'agarose permettent la séparation selon leur taille des produits PCR. Elles sont couramment utilisées pour s'assurer de la détection d'une espèce spécifiquement ciblée (PCR spécifique d'espèce), ou d'un marqueur génétique, mais également pour confirmer l'amplification lorsque la PCR n'est que la première étape de l'analyse par PCR-DGGE. Dans ces cas une seule bande doit être observée sur le gel. Des profils plus complexes sont obtenus en PCR-RAPD et PCR-RFLP. Leur résolution nécessite un effort de séparation. Par conséquent, le pourcentage d'agarose dissous à la chaleur dans du tampon TAE 1X, le voltage appliqué, le temps de migration et le marqueur de taille utilisé doivent être adaptés à chaque type de PCR et à la taille de la séquence ciblée (Tableau XV).

Les produits PCR sont chargés dans les puits du gel après l'addition de 10 % (v/v) de bleu de charge. Il assure l'intégration du produit PCR dans le gel et la visualisation du front de migration. La révélation de l'ADN dans le gel est assurée par l'incorporation de bromure d'éthidium (BET) dans le gel au moment de son coulage dans la plaque à électrophorèse, puis exposition aux UV après la migration.

## Matériels et méthodes

**Tableau XV.** Conditions des différentes électrophorèses en gel d'agarose en fonction des PCR réalisées.

Type de profil	Type de PCR	Cible	Taille du produit PCR (pb)	Agarose (%)	Voltage	Temps	marqueur
PCR à profil simple (1 bande par puits)	PCR spécifique d'espèce	<i>B. bruxellensis</i>	1 <sup>ère</sup> PCR : 471 pb et 2 <sup>nd</sup> PCR : 321 pb	1%	110 V	20 min	100 pb
		<i>O. oeni</i>	430 pb	1%	110 V	20 min	100 pb
	Confirmation de l'amplification avant les analyses de DGGE	Levures	250 pb	1%	110 V	20 min	100 pb
		Bactéries	294 pb	1%	110 V	20 min	100 pb
		Détection d'une séquence nucléotidique spécifique (présence de marqueurs génétiques, analyses MLST)	Entre 100 pb et 700 pb	1,5 %	90 V	30 min	100pb
PCR à profil complexe (plusieurs bandes par puits)	PCR-RFLP	Produit PCR	Entre 300 et 800 pb avec des différences d'environ 50 pb entre chaque produit	2 %	90 V	30 min.	100 pb
		Levures	Produit de restriction	Entre 40 pb et 800 pb avec des différences d'environ 20 pb entre chaque produit	3%	90 V	45 min
	Bactéries lactiques	Produit PCR	294 pb	1 %	110 V	20 min.	100 pb
		Produit de restriction	Entre 25 et 294 pb avec des différences d'environ 10 pb entre chaque produit	3 %	90 V	45 min	25 pb
	Bactéries acétiques	Produit PCR	700 et 750 pb	0,8 %	90 v	30 min	100pb
		Produit de restriction	Entre 125 et 750 pb	3%	90 V	45 min	100pb
	PCR-RAPD	<i>O. oeni</i>	Entre 700 et 50 pb	1,5 %	90 V	30 min	100pb
	PCR $\delta 12/\delta 21$	<i>S. cerevisiae</i>	Entre 700 et 50 pb	1,5 %	90 V	30 min	100pb



## II.4.2 L'électrophorèse sur gel d'acrylamide à gradient dénaturant (DGGE).

Les PCR-DGGE utilisées sont issues des protocoles développés par Cocolin *et al.* (2000) pour les levures et durant ce travail (Renouf *et al.* 2006) pour les bactéries. En ce qui concerne, le premier protocole, le gradient d'urée-formamide a été abaissé : 20 à 45 % au lieu de 30 à 60 % et le temps et le voltage de migration ont été modifiés suivant les recommandations de Sigler *et al.* (2004) afin d'augmenter le pouvoir résolutif de la migration. Ces conditions opératoires sont reportées dans le tableau XVI.

**Tableau XVI.** Conditions de PCR-DGGE mises au point pour les bactéries (PCR-DGGE *rpoB*) (Renouf *et al.* 2006) et pour les levures (PCR-DGGE *NLI/LS2*) (Cocolin *et al.* 2000).

	<b>BACTERIES : PCR-DGGE <i>rpoB</i></b>	<b>LEVURES : PCR-DGGE <i>NLI/LS2</i></b>
<b>Amorces</b>	<i>rpoB1</i> (ATTGACCACTTGGGTAACCGTCG), <i>rpoB1o</i> (ATCGATCACTTAGGCAATCGTCG), <i>rpoB2</i> (ACGATCACGGGTCAAACCACC).	<i>NLI</i> (GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) <i>LS2</i> (ATTCCCAAACAACCTCGACTC)
	10 min à 95°C 1 min à 95°C 45 s à une température diminuant de 1°C à chaque cycle pour passer de 59°C à 45°C	7 min à 95°C 1 min à 95°C 45s à 52°C
	15 cycles	
<b>PCR</b>	1 min à 72°C 1 min à 95°C 45 s à 45°C 1min à 72°C 15 cycles 1 min à 95°C 45 s à 45°C 1 min à 72°C 10 min à 72°C	40 cycles 1 min à 72°C 7 min à 72°C
<b>Confirmation de la PCR (gel d'agarose)</b>	1% agarose pendant 20 min à 110 mV	
<b>Longueur des produits PCR</b>	250 pb 294 pb	
	10 µL de produit PCR standardisé à la concentration de 50 ng/µL avec 4 µL d'un tampon de charge constitué de glycérol (80% v/v), de TE (20% v/v) et de bleu de bromophénol.	
		20-45%
<b>DGGE</b>	Gradient dénaturant d'urée formamide 20-55%	
		TAE 1X
		60°C
	Voltage 85V	200V
	Temps de migration 16 h	4 h
	Révélation 15 min dans 300 mL d'un bain de tampon TAE 1X contenant 50 µL de <i>SYBR green I.</i>	

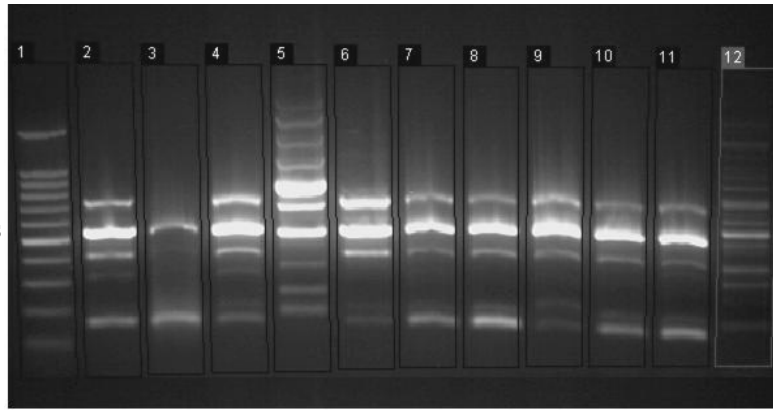
### **II.4.3 L'électrophorèse en champ pulsé (ECP).**

La méthode d'ECP est utilisée pour différencier les souches au sein des espèces *B. bruxellensis* et *O. oeni*. Les gels d'électrophorèse en champ pulsé sont préparés à partir d'agarose spéciale (*Pulse Fiel Certified Agarose*, Biorad) qui est dissous dans du tampon TBE 0,5 X (0,1 mol/L de Tris, 0,09 mol/L d'acide borique ; 0,01 mol/L d'EDTA, pH=8). Que ce soit pour différencier les souches de *B. bruxellensis*, ou celles d'*O. oeni*, la concentration d'agarose dans le gel est de 0,1 % p/v. Mais les conditions de l'électrophorèse diffèrent pour les deux espèces. Pour *O. oeni*, le temps de pulse est de 1 à 25 s sous un voltage de 6 V et un angle de 120°. La durée totale de la migration est de 22 h. Tandis que pour *B. bruxellensis*, le temps de pulse est dans un premier temps de 70 s pendant 15 h, puis il passe à 120 s pendant 11 h sous un voltage de 6 V et un angle de 120°.

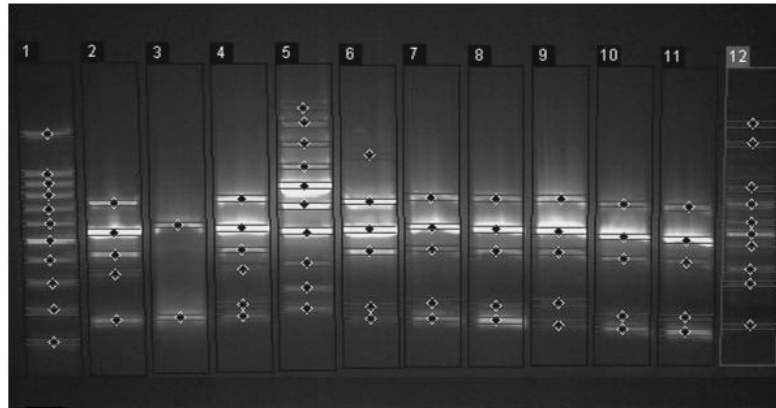
### **II.4.4 La comparaison des profils des électrophorèses.**

Lors des PCR-RAPD, PCR-RFLP, et PCR-DGGE, et lors des électrophorèses en champ pulsé, les profils sur les gels comportent généralement plusieurs bandes. Chaque profil obtenu se caractérise par le nombre de bandes et par la distance qui les sépare. Pour évaluer la similitude entre plusieurs profils il faut combiner et comparer ces deux paramètres. Cela se fait par construction de dendrogrammes UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averaging*) avec le logiciel *Phoretix® 1D database V 1.12* qui évalue les différences de distances moyennes entre les bandes prises deux à deux sur le gel (Figure 31) par la méthode de calcul du coefficient de Dice (méthode des liens moyens).

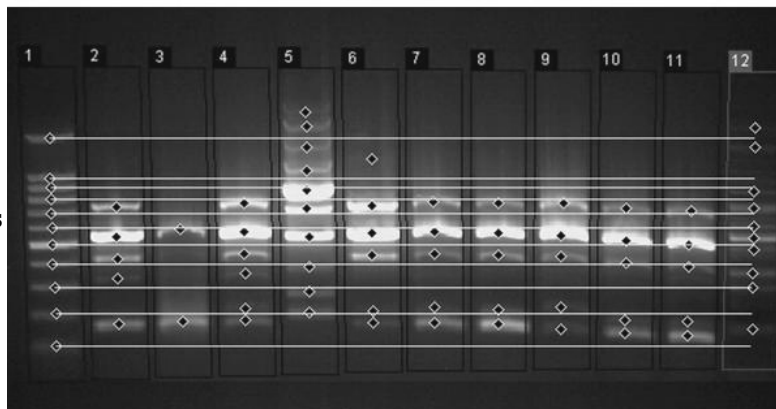
**Première étape:**  
**Définition des puits**



**Deuxième étape:**  
**Définition des bandes**



**Troisième étape:**  
**Alignement des fronts de migration**



**Figure 31:** Principe de traitement des gels de PCR-RAPD par le logiciel *Phoretix® 1D database V 1.12* pour la construction des dendrogrammes.

## II.5 L'analyse des produits PCR.

### II.5.1 La récupération des bandes d'ADN après l'électrophorèse.

La migration électrophorétique assure la séparation des produits PCR qui peuvent ensuite être récupérés pour être analysés. La séquence ciblée est prélevée par pipetage direct dans le gel d'agarose, avec des cônes stériles, au niveau du front de migration révélé par

l'incubation au BET et l'exposition aux UV. Le volume pipeté est placé dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau PPI, puis conservé à 4°C pendant 12 h.

Lors des électrophorèses sur gel d'acrylamide, le fragment d'ADN est extrait du gel en découpant délicatement le gel au niveau du front de migration à l'aide d'une lame de scalpel préalablement plongée dans de l'eau portée à ébullition. Puis le bloc d'acrylamide contenant l'ADN est placé dans 200  $\mu\text{L}$  d'eau PPI pendant une nuit à 4°C, pour permettre la diffusion de l'ADN dans l'eau. Les solutions d'ADN ainsi récupérées sont utilisées comme matrice (2  $\mu\text{L}$ ) pour une nouvelle PCR identique à la PCR initiale, mais avec des amorces ne possédant pas de GC-clamp. Après la confirmation de la ré-amplification, les produits PCR sont purifiés.

### **II.5.2 La purification et le séquençage de l'ADN.**

Les produits PCR sont purifiés en utilisant le kit *Quiaquick purification kit* de Qiagen®. Il s'agit d'une purification sur des colonnes de silicates. Ces dernières permettent l'adsorption des acides nucléotidiques en solution aqueuse à pH acide ou neutre. L'ADN accroché aux silicates est ensuite lavé pour éliminer les restes d'amorces et les diverses impuretés : enzymes, agarose, BET, détergents...qui ne sont pas adsorbés à la colonne. La solution de lavage contient de la guanidine hydrochlorique, de l'isopropanol et de l'éthanol. Elle permet de soustraire toutes les impuretés en préservant sur la colonne la grande majorité des fragments d'ADN double ou simple brins de taille supérieure à 40 pb. L'éluion de l'ADN est basée sur un balancement de l'équilibre acido-basique avec une solution à pH basique (8,5) composé de Tris (10mM) et faiblement concentrée en sels. Il n'y a pas d'EDTA connu pour son inhibition des réactions enzymatiques et dont la présence altérerait le rendement des réactions d'analyse de l'ADN purifié.

Les produits PCR sont séquencés selon le protocole *Bygdye* (versions 1.1 et 1.3). Après la PCR et la purification, l'ADN est dilué pour obtenir une concentration de 25 ng/ $\mu\text{L}$ . Pour chaque produit PCR, deux réactions de séquences sont réalisées, chacune à partir d'une amorce. La réaction de séquence contient : 3,5  $\mu\text{L}$  de tampon de séquençage 5X, 1  $\mu\text{L}$  de *BigDye Terminator 2,5X*, 1  $\mu\text{L}$  d'ADN, 3,2 pmol d'amorce, et de l'eau PPI pour un volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Les cycles de séquence comportent un cycle initial de dénaturation à 96°C pendant 1 min puis un enchaînement de 25 cycles de dénaturation (10 s), d'hybridation (5 s), et de polymérisation (4 min). Les ADN sont ensuite précipités dans un tampon éthanol (50

---

### *Matériels et méthodes*

$\mu\text{L}$ ), EDTA (2  $\mu\text{L}$  à 125 mM) et acétate de sodium (2  $\mu\text{L}$  à 3 M) pendant 15 min à température ambiante. Après une centrifugation (30 min, 3 000g, 4°C), le surnageant est éliminé. Cent microlitres d'éthanol à 70 % sont ajoutés. Après une centrifugation (15 min, 2 000g, 4°C) et l'élimination du surnageant, les ADN sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière. Puis les échantillons sont traités par un séquenceur capillaire *ABI PRISM 3130xl*.

Les chromatogrammes sont ensuite analysés à l'aide du logiciel *Bioedit Sequence Alignment Editor*.

#### **II.5.3 L'alignement et analyse bioinformatique des séquences d'ADN.**

Les séquences obtenues sont comparées par alignement (Corpet 1998) aux séquences disponibles dans les banques de données (*GenBank*). Le logiciel d'alignement est le logiciel *multialin* disponible sur internet : [www.multialin.inra.fr](http://www.multialin.inra.fr).

Lorsque les séquences sont totalement identiques, l'identification de l'espèce est clairement établie. Lorsque ce n'est pas le cas, la séquence référencée qui présente le pourcentage de similitude le plus élevé avec la séquence étudiée est retenue pour une comparaison phylogénétique.

La phylogénie permet la comparaison et le rapprochement des séquences en se basant à la fois sur des paramètres purement mathématiques et statistiques et sur des données biologiques d'évolution. Les comparaisons phylogénétiques des séquences de même taille sont réalisées à partir du logiciel *MEGA version 2.1* (Kumar et al. 2001) selon la fonction des plus proches voisins (Saitou et Nei 1987). Les distances phylogénétiques sont consolidées par 1000 répétitions de *bootstrap* (Felsenstein 1985).

### III L'identification des espèces.

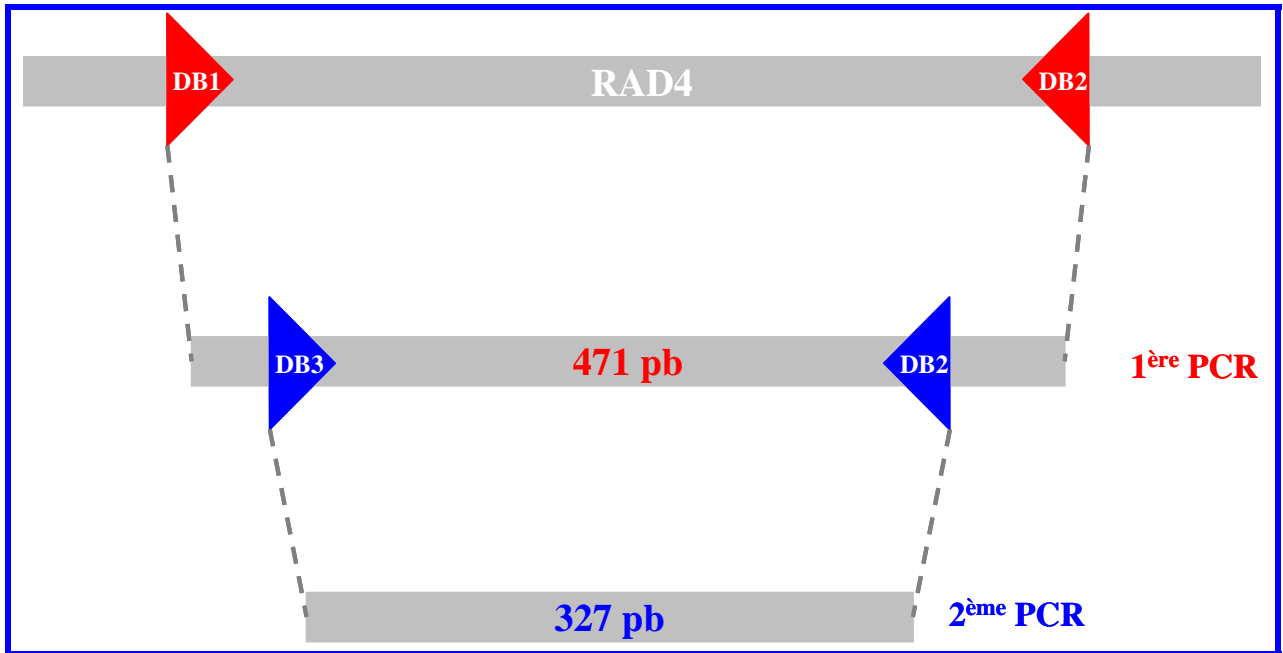
#### III.1 Les PCR spécifiques d'espèces.

Les PCR spécifiques d'espèces utilisées pour détecter l'espèce *B. bruxellensis* et l'espèce *O. oeni* (Tableau XVII), permettent de mettre en évidence la présence de l'espèce ciblée au sein du mélange.

**Tableau XVII.** Amorces et taille de l'amplicon pour les PCR spécifiques d'espèce utilisées pour détecter *O. oeni* et *B. bruxellensis*.

Espèce	Référence	Gène ciblé	Amorces	Taille du produit PCR (pb)
<i>O. oeni</i>	Divol et al. 2003	<i>mleA</i>	OO1 : 5'-GTGCCGCTTTTTTGGATATTA-3' OO2 : 5'-AGCAATTTTATCTTTATAGCT-3'	430
<i>B. bruxellensis</i>	Ibeas et al. 1996	<i>rad4</i>	<b>1<sup>ère</sup> PCR :</b> DB1 : 5'-AGAAGTTGAACGGCCGCATTTGCAC-3' DB2 : 5'-AGGATTGTTGACACTCTCGCGGAGG-3' <b>2<sup>nd</sup> PCR :</b> DB3 : 5'-CGGCATATCGAAGACAG-3' DB4 : 5'-CATCCTCGCCATAACAAC-3'	471    327

Pour la détection de *B. bruxellensis*, il s'agit d'une *nested-PCR* (Ibeas et al. 1996) (Figure 32). Deux couples d'amorces sont successivement utilisés. Lors de la première PCR, les amorces DB1 et DB2 spécifiques de l'espèce permettent l'amplification d'un fragment de 471 pb. Lors de la seconde PCR, les amorces DB3 et DB4, également spécifiques de *B. bruxellensis*, ciblent une région interne de l'amplicon de la première. Cette seconde PCR est réalisée en utilisant les produits PCR de la première comme matrice. Cela permet d'augmenter la sensibilité de la méthode de détection. Lorsque l'espèce *B. bruxellensis* est présente, mais en très faible quantité et/ou au sein d'une diversité interspécifique très complexe, il se peut que la première PCR ne soit pas suffisante pour que l'ADN soit détecté mais elle permet d'augmenter sa concentration. Il faut donc répéter l'opération d'amplification une seconde fois.



**Figure 32:** Principe de la *Nested-PCR* développée par Ibeas et *al.* (1996) pour détecter spécifiquement l'espèce *B. bruxellensis*.

### III.2 L'identification des espèces dans un mélange.

Les méthodes de PCR-DGGE et de PCR-RFLP assurent une vision globale de la diversité interspécifique en permettant l'identification de l'ensemble des espèces présentes.

Lors des analyses directes, l'identification des espèces est basée sur les séquences obtenues par les analyses de DGGE qui sont, comme évoqué précédemment, comparées par un simple alignement ou par des analyses phylogénétiques aux séquences de référence.

Lors des analyses indirectes, l'identification est réalisée par PCR-RFLP sur un échantillon de colonies isolées sur les milieux nutritifs sélectifs utilisés. Pour être représentatif et apporter des données quantitatives (proportions de chaque espèce) significatives, le nombre de colonies analysées doit être au minimum égal à la racine carrée du nombre de colonies présentes sur la boîte possédant entre 30 et 300 colonies. Pour les levures et bactéries acétiques, les PCR-RFLP utilisées correspondent aux protocoles développés respectivement par Guillamon et *al.* (1998) et Ruiz et *al.* (2000). Les longueurs des produits PCR et des produits de restriction caractéristiques des espèces rencontrées durant ce travail sont listées dans les tableaux XVIII et XIX.

*Matériels et méthodes*

**Tableau XVIII.** Taille en pb des produits PCR et des fragments de restriction des espèces de bactéries acétiques identifiées durant ce travail.

<b>PCR-RFLP ITS 16S-23S ADN<sub>r</sub></b>			
<b>Amorces</b>	<b>ITS1 : 5'-ACCTGCGGCTGGATCACCTCC-3'</b> <b>ITS2 : 5'-CCGAATGCCCTTATCGCGCTC-3'</b>		
<b>Espèces</b>	<b>Produit PCR (pb)</b>	<b>TaqI (pb)</b>	<b>MspI (pb)</b>
<i>Acetobacter aceti</i>	750	375+325	750
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	750	375+325	440+310
<i>Acetobacter pomorum</i>	750	390+190+160	700
<i>Gluconoacetobacter hansenii</i>	780	425+190+160	450+160+100
<i>Gluconobacter oxydans</i>	700	410+290	350+210+140

**Tableau XIX.** Taille en pb des produits PCR et des fragments de restriction des espèces de levures identifiées durant ce travail.

<b>PCR-RFLP ITS 5,8S ADN<sub>r</sub></b>				
<b>Amorces</b>	<b>ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'</b> <b>ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'</b>			
<b>Espèces</b>	<b>Produit PCR (pb)</b>	<b>HinfI (pb)</b>	<b>HaeIII (pb)</b>	<b>CfoI (pb)</b>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	580	270+180+130	440+140	190+180+110+100
<i>B. bruxellensis</i>	490	270+220	390+90	250+150+90
<i>Bulleromyces albus</i>	520	230+230+60	430+50+40	270+250
<i>Candida boidinii</i>	750	390+190+160	700	350+310+90
<i>Candida bombi</i>	470	250+110+110	400+70	200+180+55+35
<i>Candida cantarelli</i>	720	360+180+180	310+310+100	430+190+100
<i>Candida intermedia</i>	420	220+200	420	220+200
<i>Candida fructus</i>	510	270+240	430+80	270+240
<i>Candida membranifaciens</i>	620	310+310	420+200	300+300
<i>Candida stellata</i>	490	250+240	470+20	210+200
<i>Cryptococcus albidus</i>	520	270+250+140	500+90+60	350+300
<i>Cryptococcus laurenti</i>	600	340+260	600	600
<i>Cryptococcus flavescens</i>	650	290+260	550+100	350+300
<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	330+220	280+100	300+300+50
<i>Hanseniaspora guillermondi</i>	750	370+200+180	750	320+320+110
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	720	250+220+150+100	720	600+120
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	350+210+190	750	320+310+120
<i>Issatchenkia orientalis</i>	520	220+160+140	380+90+50	200+180+80+60
<i>Issatchenkia terricola</i>	420	230+100+90	290+120	120+100+80+65+55
<i>Lipomyces spencermartinsiae</i>	570	330	570	570
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	380	200+180	280+100	210+90+80
<i>Pichia anomala</i>	650	350+300	650	650
<i>Pichia fermentans</i>	450	250+200	340+100	170+100+100+80
<i>Rhodospiridium babjevae</i>	620	250+170+150	620	300+220+100
<i>Rhodotorula glutinis</i>	640	340+230+70	430+210	320+240+80
<i>Rhodotorula graminis</i>	660	230+220+200	400+220	310+300
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	640	340+230+70	430+210	320+240+80
<i>S. cerevisiae</i>	880	360+350+180	320+230+180+130	390+370
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	630	250+240+140	410+220	320+310
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	650	300+250+100	410+140+100	400+240
<i>Sporobolomyces roseus</i>	600	280+120+100+100	600	350+250
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	790	340+230+160+60	700+90	320+270+100+100



### *Matériels et méthodes*

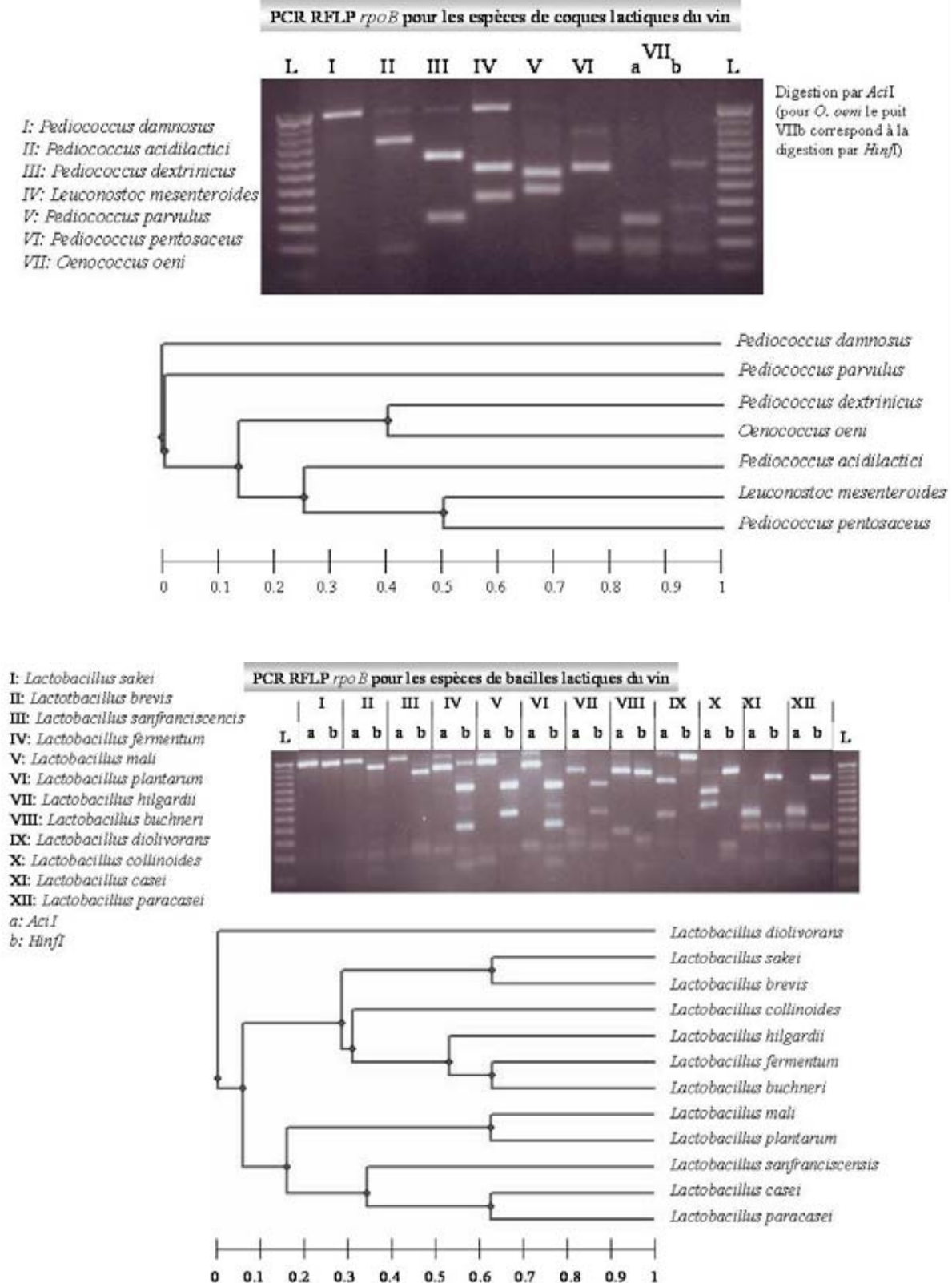
Une méthode similaire pour les bactéries lactiques a été mise au point durant ce travail. La région ciblée est la même que celle ciblée en PCR-DGGE. Une démarche de digestion par trois enzymes (*HinfI*, *AciI*, et *MseI*) permet d'identifier les principales espèces de coques et bacilles des bactéries lactiques rencontrées dans le vin (Tableau XX, Figure 33).

Lorsque les résultats des PCR-RFLP fournissent des profils inconnus, l'ADN est ré-amplifié avec les amorces utilisées pour la DGGE. Après purification, les produits PCR sont séquencés puis analysés de manière analogue aux séquences extraites des gels de DGGE.

**Tableau XX.** Taille en pb des produits PCR et des fragments de restriction des espèces de bactéries lactiques identifiées durant ce travail (Claisse et al. 2007).

<b>PCR-RFLP <i>rpoB</i></b>			
<b>Amorces</b>	<i>rpoB1</i> : 5'ATTGACCACTTGGGTAACCGTCG-3' <i>rpoB1o</i> : 5'ATCGATCACTTAGGCAATCGTCG-3' <i>rpoB2</i> : 5'-ACGATCACGGGTCAAACCACC-3'		
<b>Groupe</b>	<b>Espèces</b>	<b>AciI (pb)</b>	<b>HinfI(pb)</b>
Bacilles	<i>Lactobacillus brevis</i>	294	269
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	226+68	223+53
	<i>Lactobacillus casei</i>	117+93+68	196+70
	<i>Lactobacillus collinoides</i>	161+119	231
	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	190+104	294
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	253	183+73
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	226+68	223+63
	<i>Lactobacillus mali</i>	267	185+109
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	123+73	196+70
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	249	185+84
	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	294	294
Coques	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	294	291
	<i>Oenococcus oeni</i>	93+68+59	179+109
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	226+98	269
	<i>Pediococcus damnosus</i>	294	294
	<i>Pediococcus dextrinicus</i>	195+99	294
	<i>Pediococcus parvulus</i>	161+133	294
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	166+68	294

## Matériels et méthodes



**Figure 33:** Identification des principales espèces de coques et de bacilles lactiques rencontrées dans le vin par PCR-RFLP ciblant le gène *rpoB*. Les images des gels montrent la séparation des produits de restriction avec les enzymes *AciI* et *HinfI*. Elles sont ensuite analysées par un traitement informatique pour construire un dendrogramme UPGMA (Claisse et al. 2007).

## IV L'identification des souches.

### IV.1 L'identification des souches d'*Oenococcus oeni*.

Dans la littérature, trois techniques sont décrites pour différencier les souches d'*O. oeni*. Il s'agit de la restriction enzymatique des espaces intergéniques (PCR-RFLP-ITS) présents entre le gène de l'ARN 16S et celui de l'ARN 23S (Viti et al. 1996) ou bien entre ce dernier et le gène de l'ARN 5S (Hirschhäuser et al. 2005), de l'analyse de restriction endonucléasique couplée à une électrophorèse en champ pulsé (REA-PFGE) (Gindreau et al. 1997) et de l'amplification aléatoire de l'ADN révélant un polymorphisme (PCR-RAPD) (Reguant et Bordons 2003). Ces deux dernières techniques ont été retenues car ce sont les plus reproductibles et les plus discriminantes (Lechiancole et al. 2006).

La PCR-RAPD est facile à mettre en œuvre. Il s'agit d'une PCR utilisant une seule amorce peu spécifique et des conditions peu contraignantes de PCR (température de fusion inférieure à 45°C). L'amorce s'hybride, plus ou moins aléatoirement, à différentes positions du chromosome bactérien. Cela génère un profil particulier révélé par une électrophorèse sur gel d'agarose (Rossetti et Giraffa 2005). Les principales amorces utilisées pour différencier les souches bactériennes et les conditions d'amplification lors de ces PCR-RAPD sont listées dans le tableau XXI.

**Tableau XXI.** Liste des amorces RAPD utilisées pour la comparaison des souches d'*O. oeni*.

Amorce Séquence 5'-3'	Conditions d'amplification	Référence
<b>M13</b> :GAGGGTGGCGGTTCT	94°C×5min ; 45 cycles : 94°C×30s ; 35°C×30s, 72°C×1min et 72°C×7min	Stendid et al. 1994
<b>M14</b> :GAGGGTGGGGCCGTT	94°C×5min ; 45 cycles : 94°C×30s ; 35°C×30s, et 72°C×7min	Stendid et al. 1994
<b>1283</b> :GCGATCCCCA	94°C×5min ; 40 cycles : 94°C×1min ; 36°C×30s, 72°C×2min et 72°C×7min	Akopyanz et al. 1995
<b>Coc</b> :AGCAGCGTGG		Cocconcelli et al. 1995
<b>OPA9</b> :GGGTAACGCC	94°C×5min ; 40 cycles : 94°C×1min ; 36°C×1min, 72°C×2min; et 72°C×7min	Zavaleta et al. 1997
<b>OPB7</b> :GGTGACGCAG	94°C×5min ; 40 cycles : 95°C×1min ;	Lechiancole et
<b>OPB14</b> :TCCGCTCTGG	50°C×1min, 74°C×2min; et 72°C×10min	al. 2006
<b>XD8</b> :CAAGGCATCC	94°C×5min ; 40 cycles : 94°C×1min ;	Moschetti et al.
<b>XD9</b> :GAAGTCGTCC	33°C×1min, 74°C×2min; et 72°C×7min	1998

---

### Matériels et méthodes

Mais c'est dans le principe même de la PCR-RAPD que réside son principal inconvénient. En effet, il est difficile de s'assurer de la pertinence d'une méthode aléatoire pour une analyse aussi fine que la discrimination des souches. Les profils obtenus sont en fait peu reproductibles. Il est donc impossible de constituer, à l'avance, une banque de données de profils RAPD. Il faut répéter à chaque fois l'analyse des souches de référence pour pouvoir les comparer aux souches échantillonnées. De plus, la sensibilité de certaines amorces RAPD est limitée. Elles ne génèrent pas toujours des profils différents pour les souches les plus proches.

Une méthode de RAPD plus discriminante a été mise au point par Reguant et Bordons (2003). C'est une PCR-RAPD multiplex. Elle est basée sur l'utilisation de deux amorces afin d'augmenter la reproductibilité et la spécificité de l'analyse. La première amorce est universelle. C'est la plus courte : *Coc* (5'-AGCAGCGTGG-3'). C'est une amorce classiquement utilisée seule en PCR-RAPD conventionnelle (Cocconelli et al. 1995). Dans le cas de la PCR-RAPD multiplex elle est associée à une seconde amorce plus longue qui cible une région spécifique d'*O. oeni* du gène *mleA* codant l'enzyme malolactique : *On2* (5'-ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT-3') (Zapparoli et al. 1998). Cette technique assure une meilleure reproductibilité de l'amplification que les amorces couramment utilisées seules durant les RAPD classiques. Le programme d'amplification qui débute par un cycle initial de 7 min à 94°C comprend 30 cycles avec 1 min de dénaturation à 94°C, 1 min d'hybridation à 40°C et 2 min d'élongation à 72°C. Il s'achève par un dernier cycle d'élongation à 7 min à 72°C.

La seconde méthode de différenciation des souches d'*O. oeni* est plus longue. Elle est aussi plus lourde à mettre en œuvre. Mais elle est beaucoup plus sensible et fiable. C'est une électrophorèse en champ pulsé couplée à une restriction endonucléasique (REA-PFGE : *Restriction Endonuclease Analysis Pulse – Field Gel Electrophoresis*). Un volume de solution cellulaire égale à  $\frac{5}{D_{0600}} \times 10 \mu\text{L}$  est dissous dans 50  $\mu\text{L}$  de T100E (Tris 10 mM, EDTA 100 mM, pH=7,5). Les cellules sont ensuite emprisonnées avec 50  $\mu\text{L}$  de T100E contenant 1% p/v d'agarose à bas point de fusion (*Chromosomal grade*®, Bio-Rad) maintenu à 50°C. Après homogénéisation, et coulage dans un moule, les inserts sont solidifiés à 4°C (30 min) puis démoulés et conservés à 4°C dans 200  $\mu\text{L}$  de T100E jusqu'au traitement. Dans un premier temps les cellules bactériennes sont lysées en incubant les inserts 8h à 37°C dans 1 mL de

---

### Matériels et méthodes

T100E contenant 10 mg de lysozyme, puis une nuit à 37°C dans 1 mL de T100E contenant 2 mg de pronase E de *Streptomyces griseus* (Roche) et 1,5% p/v de N-laurylsarcosine (Sigma-Aldrich). Ensuite les inserts sont coupés en deux dans le sens de la largeur. Une moitié est conservée à 4°C dans de T100E. L'autre est utilisée pour digérer l'ADN. Après quatre lavages successifs des demi-inserts dans du TE, la digestion endonucléasique est réalisée avec l'enzyme *NotI* (New England Biolabs) dans un mélange réactionnel contenant pour une digestion : 12 µL du tampon spécifique de *NotI*, 1,2 µL de BSA, 2 µL d'enzyme et 104,8 µL d'eau PPI. La digestion s'effectue à 25°C pendant environ 16 h. Puis les demi-inserts sont lavés avec du TE. Le gel d'électrophorèse de 100 mL est préparé avec de l'agarose spécial champ pulsé (Bio-Rad) (1 % p/v). Les demi-inserts sont scellés dans les puits du gel avec de l'agarose réservé à 60°C. La migration s'effectue dans du tampon TBE 0,5X.

Le choix entre la PCR-RAPD multiplex et la REA-PFGE se fait selon l'objectif de l'expérimentation. Lorsqu'il s'agit d'obtenir un aperçu global de la diversité intraspécifique des *O. oeni*, la PCR RAPD est utilisée sur un échantillon de colonies isolées sur les boîtes de milieu ANGP. Cela permet de dénombrer les différents profils et d'estimer leur proportion respective. Lorsque l'objectif est de discriminer le plus sensiblement possible des souches entre elles la méthode de REA-PFGE est privilégiée. Elle est également utilisée lors des contrôles d'implantation réalisés lors des essais de FML par inoculation avec des levains malolactiques. Dans ce cas, le profil majoritaire, obtenu en traitant la biomasse totale collectée sur la boîte de milieu ANGP possédant entre 30 et 300 colonies, est comparé au profil de référence de la souche inoculée et au profil majoritaire indigène issu de la modalité témoin non-inoculée.

Lorsqu'on travaille sur des colonies isolées pour la PCR-RAPD, comme pour la REA-PFGE, il est préférable de s'assurer à l'avance de l'appartenance des colonies testées à l'espèce *O. oeni* en réalisant au préalable la PCR spécifique d'espèce de Divol *et al.* (2003).

#### IV.2 L'identification des souches de *Saccharomyces cerevisiae*.

Le typage des souches de *S. cerevisiae* est réalisée par PCR selon la méthode développée par Legras et Karst (2003) avec les amorces  $\delta 12$  (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') et  $\delta 21$  (5'-CATCATTAACACCGTATATGA-3'). La PCR  $\delta 12/\delta 21$  peut être effectuée sur l'ADN extrait directement de la biomasse totale collectée

sur les boîtes de milieu LT, ce qui donne un aperçu du profil majoritaire. Elle peut également être réalisée sur un échantillon de colonies isolées sur milieu LT. Dans ce cas il est possible de déterminer la proportion de chaque souche et le cas échéant leur dynamique au fur et à mesure de la fermentation.

### **IV.3 L'identification des souches de *Brettanomyces bruxellensis*.**

La méthode de discrimination des souches de *B. bruxellensis* a été développée au laboratoire par Miot-Sertier et Lonvaud-Funel (2006). D'autres méthodes moléculaires ont été testées pour différencier les souches de *B. bruxellensis* et notamment la PCR-RAPD. Mais comme pour d'autres levures comme *Cryptococcus neoformans* (Sarcali et al. 2006) par exemple, et comme pour les bactéries *O. oeni* comme évoqué précédemment ou bien encore *L. plantarum* (Pepe et al. 2004), l'utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé offre la meilleure discrimination possible entre les souches de *B. bruxellensis*.

La méthode utilisée est une méthode de REA-PFGE comparable à celle utilisée pour *O. oeni*. Les inserts d'agarose contenant les cellules de *B. bruxellensis* sont préparés de façon similaire. Les cellules sont lysées en plaçant ces inserts dans 2 mL d'un tampon de lyse constitué de NaCl 0,5 M, EDTA 0,25 M, Tris-HCl 0,125 M,  $\beta$ -mercaptoethanol 0,5 M et de pH égal à 7,5. Après 5h d'incubation à 37°C, le tampon de lyse est remplacé par 1 mL de T100E contenant 1 mg de Pronase E de *Streptomyces griseus* (Roche), 1 mg de N-laurylsarcosine (Sigma-Aldrich), 0,45 mol d'EDTA et 10 mmol de Tris-HCl. pour une incubation de 40h à 42°C. Les inserts subissent alors deux lavages au TE pendant 30 min chacun à 50°C, puis deux lavages au TE également pendant 30 min mais cette fois à température ambiante. Enfin les inserts sont coupés et soumis comme ceux d'*O. oeni* à la digestion par l'endonucléase *NotI* (New England Biolabs) dans un volume réactionnel total de 120  $\mu$ L à 25°C pendant 18h. Après des lavages brefs au TE, les demi-inserts sont soumis à l'électrophorèse.

L'électrophorèse est réalisée à 10°C avec un gel d'agarose spécial champ pulsé (Bio-Rad) à 1% p/v dans un tampon de TBE 0,5X (0,1 M de Tris, 0,09 M d'acide borique, 0,01 M d'EDTA, pH=8). Le voltage est de 6 V/cm et les temps de pulses sont de 70 s pendant les quinze premiers heures puis de 120 s les onze suivantes. Le chromosome de la souche YNNN295 de *S. cerevisiae* est généralement utilisé comme marqueur de taille.

---

### *Matériels et méthodes*

La révélation du gel se fait dans un bain d'eau contenant 0,7 µg/mL de bormure d'éthidium pendant 15 min sous une légère agitation à température ambiante suivi d'une décoloration pendant 4 heures à 4°C.

## PARTIE III. L'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUE DES VINS.

### I Les méthodes enzymatiques de dosage des principaux composés du vin.

Les suivis des vinifications et des expérimentations au laboratoire nécessitent de doser les réactifs (glucose, fructose, acide-L-malique) et les produits (éthanol, acide-L-lactique) des fermentations alcoolique et malolactique. Ces concentrations sont mesurées par des méthodes enzymatiques en utilisant des kits Boehringer Mannheim (Roche) basées sur l'apparition de NADH par le jeu de réactions d'oxydo-réductions. Le nombre de molécules de substrat transformées est relié de façon stœchiométrique au nombre de coenzymes réduits et oxydés qui peut être caractérisé par la mesure de la densité optique à 340 nm (Tableaux XXII et XXIII).

**Tableau XXII.** Principes des dosages enzymatiques de l'acide-L-malique et de l'acide-L-lactique

<b>Acide-L-Malique</b>			
$L - \text{malate} + \text{NAD}^+ \xleftarrow{\text{L-MDH}} \text{oxaloacétate} + \text{NADH} + \text{H}^+$			
$\text{Oxaloacétate} + L - \text{glutamate} \xleftarrow{\text{GOT}} L - \text{aspartate} + 2 - \text{oxoglutarate}$			
	Blanc ( $\mu\text{L}$ )	Echantillon (vin dilué au 1/10 <sup>ème</sup> ) ( $\mu\text{L}$ )	Standard ( $\mu\text{L}$ )
Solution 1 : Tampon (L-glutamate)	500	500	500
Solution 2 : NAD (35 mg/mL)	100	100	100
Eau distillée	500	450	450
Solution 3 : glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT)	5	5	5
Echantillon	-	50	50
Attendre 3 min			
Mesure de la DO à 340 nm : A <sub>1</sub>			
Solution 4 : L-malate déhydrogénase(L-MDH)	5	5	5
Attendre 20 min			
Mesure de la DO à 340 nm : A <sub>2</sub>			
[Acide-L-malique] en g/L = 4,725 × (A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> .ΔA <sub>blanc</sub> )			
<b>Acide-L-Lactique</b>			
$L - \text{lactate} + \text{NAD}^+ \xleftarrow{\text{L-LDH}} \text{pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+$			
$\text{Pyruvate} + L - \text{glutamate} \xleftarrow{\text{GTP}} L - \text{alanine} + 2 - \text{oxoglutarate}$			
	Blanc ( $\mu\text{L}$ )	Echantillon (vin dilué au 1/10 <sup>ème</sup> ) ( $\mu\text{L}$ )	Standard ( $\mu\text{L}$ )
Solution 1 : Tampon (L-glutamate)	500	500	500
Solution 2 : NAD (35 mg/mL)	100	100	100
Eau distillée	500	450	450
Solution 3 : glutamate-pyruvate transaminase (GTP)	10	10	10
Echantillon	-	50	50
Attendre 3 min			
Mesure de la DO à 340 nm: A <sub>1</sub>			
Solution 4 : L-lactate déhydrogénase (L-LDH)	10	10	10
Attendre 20 min			
Mesure de la DO à 340 nm: A <sub>2</sub>			
[Acide-L-lactique] en g/L = 3,23 × (A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> .ΔA <sub>blanc</sub> )			



## Matériels et méthodes

**Tableau XXIII.** Principe des dosages enzymatiques du glucose et de l'éthanol.

<b>Glucose/ fructose</b>			
$\text{D - glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G - 6 - P} + \text{ADP}$ $\text{D - fuctose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{F - 6 - P} + \text{ADP}$ $\text{F - 6 - P} \xrightleftharpoons{\text{PGI}} \text{G - 6 - P}$ $\text{G - 6 - P} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{G6P - DH}} \text{D - gluconate - 6 - phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+$			
	Blanc ( $\mu\text{L}$ )	Echantillon ( $\mu\text{L}$ ) (moût dilué au 1/250 <sup>ème</sup> , vin dilué au 1/10 <sup>ème</sup> )	Standard ( $\mu\text{L}$ )
Solution 1 : Tampon (NADP :2 mg/mL, ATP 6 mg/mL)	500	500	500
Echantillon	-	50	50
Eau distillée	1000	950	950
Attendre 3 min			
Mesure de la DO à 340 nm : A <sub>1</sub>			
Solution 2 : glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6P-DH) et hexokinase (HK)	10	10	10
Attendre 3 min			
Mesure de la DO à 340 nm : A <sub>2</sub>			
Solution 3 : phosphogluconase isomérase (PGI)	10	10	10
Attendre 15 min			
Mesure de la DO à 340 nm : A <sub>3</sub>			
	10	10	10
Attendre 15 min			
[Glucose] = 0,863 × (A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> ΔA <sub>blanc</sub> ) × dil.			
[Fructose] = 0,869 × (A <sub>3</sub> -A <sub>2</sub> ΔA <sub>blanc</sub> ) × dil.			
<b>Ethanol</b>			
$\text{Ethanol} + \text{NAD}^+ \xleftarrow{\text{ADH}} \text{acétaldéhyde} + \text{NADH} + \text{H}^+$ $\text{Acétaldéhyde} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{AI - DH}} \text{acide acétique} + \text{NADH} + \text{H}^+$			
	Blanc ( $\mu\text{L}$ )	Echantillon ( $\mu\text{L}$ ) (moût dilué au 1/250 <sup>ème</sup> , vin dilué au 1/10 <sup>ème</sup> )	Standard ( $\mu\text{L}$ )
Solution 1 : Tampon (NAD et aldéhyde déhydrogénase, AI-DH))	3000	3000	3000
Eau distillée	100	0	0
Echantillon	0	100	100
Attendre 3 min et Mesure de la DO à 340 nm : A <sub>1</sub>			
Solution 2 : alcool dehydrogénase (ADH)	50	50	50
Attendre 10 min et Mesure de la DO à 340 nm : A <sub>2</sub>			
[Ethanol] = 0,115 × (A <sub>2</sub> -A <sub>1</sub> ΔA <sub>blanc</sub> ) × dil.			

## II Le dosage du dioxyde de soufre.

Les concentrations de dioxyde de soufre libre et total sont mesurées selon la méthode colorimétrique de Ripper basée sur l'oxydation du dioxyde de soufre par l'iode  $\text{SO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{I}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4 + 2\text{HI}$ . La différence de couleur entre les réactifs et les produits iodés de cette réaction permet de déterminer visuellement le point d'équivalence, marqué par l'apparition de la couleur bleue. Dans les vins rouges la visualisation de ce virage coloré est délicate. Il est nécessaire de répéter plusieurs fois l'opération. Par rapport au dosage

du SO<sub>2</sub> libre, une étape d'alcalinisation du milieu permettant de saturer les composés carbonylés et décomposer le SO<sub>2</sub> est ajoutée lors du dosage du SO<sub>2</sub> total.

**- Dosage du SO<sub>2</sub> libre :**

- 20 mL de vin
- 2 mL d'H<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> au 1/3
- dosage avec une solution d'iode N/100

**- Dosage du SO<sub>2</sub> total :**

- 20 mL de vin
- 10 mL de NaOH 1N
- 6 mL d'H<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> au 1/3
- dosage avec une solution d'iode N/100

### **III Le dosage des phénols volatils.**

Les concentrations en phénols volatils (4-vinylphénol, 4-vinylgâïacol, 4-éthylphénol et 4-éthylgâïacol) sont déterminées après l'ajout d'un étalon interne de dodécanol et d'une extraction liquide / liquide de 50 mL d'échantillons au dichlorométhane, en chromatographie en phase gazeuse avec détection en spectrométrie de masse (Chatonnet et Boidron 1988). La concentration (en µg/L) de ces composés est calculée par comparaison des surfaces des pics de la référence et de l'échantillon. Pour chaque échantillon, les mesures sont triplées.

### **IV Les mesures des paramètres physiques du vin.**

#### **IV.1 La mesure de la couleur des vins.**

Pour les vins rouges, les mesures de spectrophotométries et de la couleur sont des mesures simples et rapides qui, outre la caractérisation du produit nécessaire à l'élaboration d'un vin de qualité, permettent d'évaluer la teneur en composés phénoliques dont l'action sur la viabilité de certains micro-organismes est reconnue (Vivas et *al.* 1997). De plus les acides hydroxycinnamiques sont les précurseurs naturels des phénols volatils appartiennent à la

### *Matériels et méthodes*

famille des acides phénoliques. Il donc important d'associer ces mesures à la description du milieu naturel (pH, TAV, SO<sub>2</sub> libre...) dans lequel les micro-organismes étudiés évoluent.

Les critères d'étude de la couleur des vins sont définis dans le tableau XXIV. Chaque mesure s'exprime en unité de densité optique (UDO) pour un centimètre de trajet optique de vin pur. A partir de ces mesures, trois autres paramètres sont définis pour caractériser la couleur naturelle du vin :

- l'intensité colorante (IC), c'est la somme des densités optiques à 420, 520, et 620 nm
- la densité colorante (DC), c'est la somme des densités optiques à 420 et 520 nm
- la teinte (T), c'est le rapport entre les densités optiques à 420 nm et à 520 nm exprimées pour un même trajet optique de vin pur.

**Tableau XXIV.** Définition des critères d'étude de la couleur des vins.

DO à 280 nm	DO à 320 nm	DO à 420 nm	DO à 520 nm	DO à 620 nm
<b>Indice des polyphénols totaux : IPT</b> Estimation de l'ensemble des composés phénoliques du vin : les composés non-flavonoïdes (acides phénoliques et des stilbènes et les composés flavonoïdes (les flavonols, les anthocyanes et les les flavan-3-ols).	<b>Indice des composés hydroxycinnamiques : TH</b> Estimation des composés flavonoïdes.	<b>DO<sub>420</sub></b> Estimation de la teneur en pigments jaunes : évaluation l'oxydation des flavonols.	<b>DO<sub>520</sub></b> Estimation de la teneur en pigments rouges, principalement les anthocyanes dont les composés majoritaires sont la malvidine et la delphinidine.	<b>DO<sub>620</sub></b> Estimation de la teneur en pigments bleus.

## **IV.2 La mesure de la turbidité des vins.**

Le trouble du vin est dû à la rétention de l'intensité lumineuse par les particules colloïdales en suspension dont font partie les micro-organismes mais pas uniquement. Ce trouble, ou turbidité, est mesuré avec un néphélomètre. Les résultats sont exprimés en NTU (unité de turbidité néphélométrique). Classiquement un vin rouge est qualifié de brillant pour des valeurs inférieures à 2,0 NTU. Il est clair à voilé pour des valeurs comprises entre 2 et 8 NTU. Au-delà de 8 NTU, le vin est trouble.

## **PARTIE IV. LE TRAITEMENT MATHÉMATIQUE DES DONNÉES.**

### **I Le calcul de la population accumulée durant un intervalle de temps $\Delta t$ .**

A un instant,  $t$ , donné, le dénombrement d'une population microbienne sur les milieux gélosés informe sur le nombre de cellules cultivables présentes dans l'échantillon au moment de l'analyse. Si l'objectif de la mesure est un contrôle ponctuel du niveau de population, comme cela peut-être le cas pour s'assurer d'une inoculation ou au contraire évaluer l'efficacité d'un traitement de stabilisation, l'information obtenue est suffisante. Mais lorsqu'il s'agit de corrélérer la population microbienne aux concentrations en métabolites produits par cette population, comme cela est le cas pour la levure *B. bruxellensis* et la production de phénols volatils, il est indispensable de considérer le système d'un point de vue dynamique. Il est dans ce cas nécessaire de réaliser un suivi continu des populations en analysant à intervalle de temps régulier des échantillons issus d'un même lot homogène de vin. Dans ce cas, il peut-être intéressant de calculer la totalité de la biomasse microbienne accumulée entre deux mesures de concentrations en métabolites.

La cinétique de production d'un produit  $P$  est déterminée à partir de l'évolution de la concentration de  $P$  en fonction du temps. Dans un système réactionnel, la densité volumique de réaction de production de  $P$  ( $r_p$ ), est déduite de l'équation de bilan massique décrivant le

flux d'accumulation  $\frac{d\left(\int_v [P].dV\right)}{dt}$  en fonction du flux de conversion  $\int_v ([P].dV$  et du flux d'échange entre le système et l'extérieur  $\int_v \varphi_p .dV$  pour lequel  $\varphi_p$  est le flux d'échange

spécifique : 
$$\frac{d\left(\int_v [P].dV\right)}{dt} = \int_v r_p .dV + \int_v \varphi_v .dV .$$

Pour simplifier cette expression, il est nécessaire de considérer que le lot de vin étudié est homogène. Cette hypothèse est cohérente avec le principe d'échantillonnage. Dans ce cas, l'équation devient :  $\frac{d([P]V)}{dt} = r_p .V + \varphi_v .V$  . Si l'on néglige les variations de volume réactionnel, ce qui est le cas pour une cuve ou un échantillon de plusieurs barriques pour

lesquelles les variations de volume sont bien entendu négligeables par rapport au volume total : la relation devient :  $\frac{d[P]}{dt} = r_p + \phi_p$  . Une dernière approximation considère les

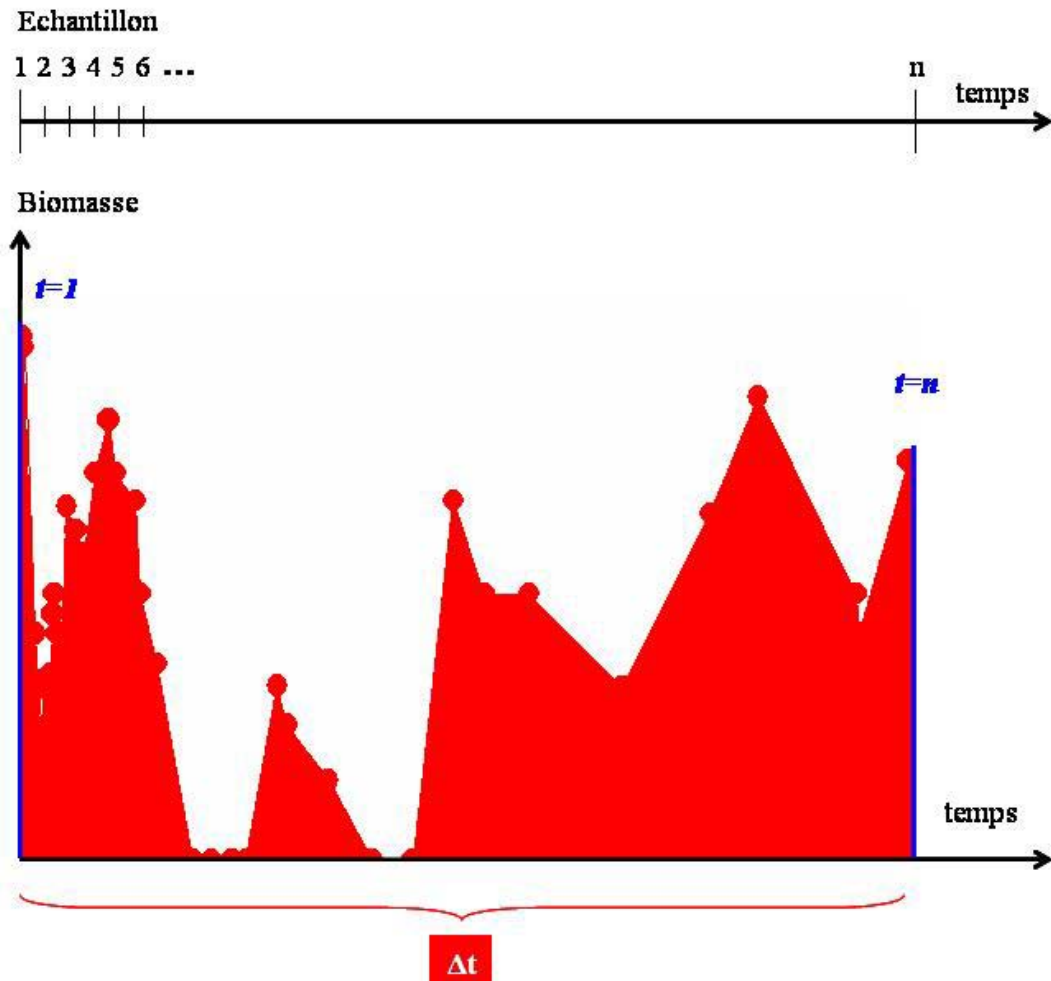
échanges extérieurs comme négligeables:  $\frac{d[P]}{dt} = r_p$  .

La vitesse de réaction de production peut-être reliée à la biomasse microbienne X :  $r_p = q_p \cdot [X]$ ,  $q_p$  est le taux de production qui caractérise la capacité unitaire de production de la biomasse. Elle peut-être considérée comme constante. Dans ce cas on obtient finalement :

$$\frac{d[P]}{dt} = q_p \cdot [X] \text{ et donc } [P]_{\Delta t} = q_p \cdot \int_{\Delta t} [X].$$

Il faut donc calculer l'intégrale de la population microbienne durant l'intervalle de temps  $\Delta t$ . C'est-à-dire la somme des populations présentes à tous instants durant cet intervalle

$\Delta t : \int_{\Delta t} [X] = \sum_{i=1}^n X_i$ , ce qui sur la courbe représentant l'évolution de la biomasse en fonction de temps correspond à la surface délimitée par la courbe  $X = f(t)$ , les droites  $t = 1$  et  $t = n$  et l'axe des abscisses (Figure 34).



**Figure 34:** Principe du calcul de la biomasse accumulée durant un intervalle de temps  $\Delta t$ . Exemple du suivi de levures non-*Saccharomyces* (NS).

Le calcul de cette surface peut se faire par pesée à l'aide d'une balance de précision. La surface délimitée est découpée puis pesée. Sa masse est comparée à celle d'une surface de référence qui sert d'étalon. Cette méthode empirique s'accompagne nécessairement d'une incertitude due au découpage et à la précision des pesées. Elle peut-être estimée en triplant chaque mesure. Le résultat obtenu s'exprime en UFC. $\Delta t$ /mL.

Ce calcul peut également être réalisé par des logiciels informatiques (*Sigmaplot*®...). Dans ce cas, les écart-types sont calculés en mesurant les intégrales des courbes tracées avec respectivement les valeurs maximales, moyennes et minimales de chaque dénombrement des populations.

## **II La comparaison statistique des données.**

L'intérêt des données quantitatives accumulées durant le suivi des vinifications ne se limite pas à une description du système. Elles peuvent également permettre de caractériser l'effet d'un paramètre sur le niveau des populations et sur leur évolution. Pour consolider ces interprétations un traitement statistique est nécessaire. C'est pour cette raison que les mesures sont répétées pour qu'à chaque estimation soit associée une valeur moyenne et un écart-type exploités pour réaliser des tests statistiques qui diffèrent selon l'expérimentation.

Lorsque l'effet d'un paramètre est évalué sur une grandeur, les moyennes des mesures répétées de cette grandeur sont comparées en utilisant un test de Student de deux moyennes de mesures répétées après l'estimation combinée de la variance avec un  $\alpha=0,05$  par défaut et en test bilatéral.

Lorsqu'il s'agit de comparer une moyenne d'une mesure répétée avec une grandeur déterminée, comme par exemple l'identification des espèces de coques lactiques par analyse des courbes de fusion précédemment évoquée, c'est le calcul de l'intervalle de confiance à  $\alpha=0,01$  qui est retenu.

Enfin, la comparaison simultanée de l'effet de plusieurs groupes de valeurs, comme par exemple l'effet du  $\text{SO}_2$  et du pH sur la population de levures dans le moût, est réalisée en utilisant le logiciel de traitement statistique *Sigmstat*® en utilisant l'analyse des covariances pour estimer l'effet d'un paramètre sur la grandeur mesurée. En deçà de  $p=0,05$ , on admet que le paramètre testé a un effet significatif sur les valeurs mesurées. Des analyses de régression et de corrélation pour évaluer la dépendances entre les paramètres testés doivent être réalisées (*Anova one ou two way*).





# **RESULTATS ET DISCUSSION.**

*« Une recherche efficace  
doit trouver des solutions fonctionnelles,  
puis les proposer à des utilisateurs résolus»*

**Jacques Poly, 1986**



## **PARTIE I. LA FLORE MICROBIENNE SUR LE RAISIN.**

### **I La diversité microbienne à la surface de la baie de raisin.**

La compilation de la totalité des séquences obtenues lors des analyses directes et indirectes (étapes d'enrichissement) par PCR-DGGE de l'ensemble des échantillons de baies de raisins permet d'obtenir une vision relativement exhaustive de la diversité microbienne présente à la surface de la baie de raisin. Quarante neuf séquences différentes de levures et trente deux séquences différentes de bactéries sont isolées. Certaines correspondent parfaitement aux séquences disponibles dans les banques de données, ce qui permet une identification précise des espèces. C'est le cas de certaines levures Basidiomycètes (*Rhodosporidium babjevae*) et Ascomycètes (*Metschnikowia fructicola*) et de quelques bactéries (*O. oeni*). D'autres séquences ne peuvent être que comparées aux séquences les plus proches. Dans ce cas la pertinence phylogénétique de la région ciblée est primordiale afin que la comparaison reflète de réelles similitudes taxonomiques.

#### **- La microflore des levures**

L'étude est réalisée par PCR-DGGE de la région D1/D2. Sur l'arbre phylogénétique des levures (Figure 35), la distinction entre les Basidiomycètes et les Ascomycètes est remarquable. De plus, l'espèce *Aureobasidium pullulans*, unique représentante de la famille des Deuteromycètes, est révélée. Dans la plupart des cas, les espèces d'un même genre sont regroupées. C'est le cas des espèces des genres *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* et *Pichia*. Le groupe du genre *Candida* intègre l'espèce *Debaryomyces hansenii*. Néanmoins d'autres études (Kurtzman et Robnett 1998 ; Diezmann et al. 2004) confirment le rapprochement phylogénétique de ces espèces très proches.

Par conséquent, il est possible de pouvoir estimer l'appartenance des séquences inconnues à tel ou tel genre. Par exemple, la séquence XXXXV doit probablement appartenir au genre *Metschnikowia* puisqu'elle appartient au *cluster* défini par les séquences de référence des espèces *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia audauensis* et *Metschnikowia fructicola*. Pour la séquence XIII, l'identification est plus problématique. Elle se situe entre la branche de l'espèce *Cryptococcus albidus* et celle de l'espèce *Bulleromyces albus*.

Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin

L'identification du genre n'est pas possible ; par contre cette séquence appartient très probablement à la famille des Tremellaceae qui regroupe les genres *Cryptococcus* et *Bulleromyces* (Barnett et al. 1990).

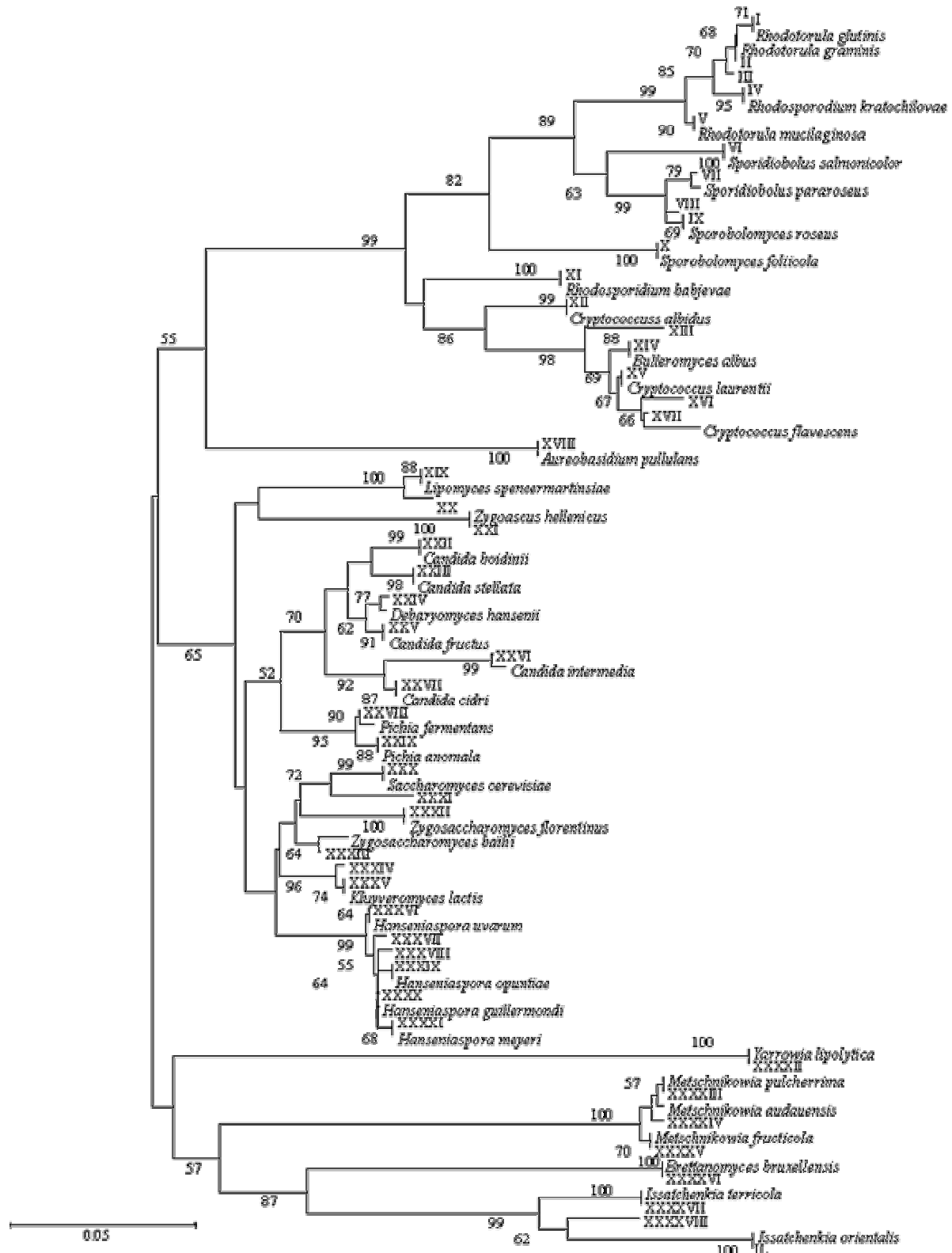


Figure 35: Arbre phylogénétique des séquences de levures obtenues lors de l'ensemble des analyses de PCR-DGGE NLI/LS2 réalisées directement sur les eaux de lavages des baies et après une étape d'enrichissement.

- **La microflore bactérienne**

• **Mise au point de la méthode de PCR-DGGE sur la région *rpoB***

Les protocoles de PCR-DGGE développés pour l'étude des bactéries qui ciblent généralement le 16S rADN ont montré des limites pour les bactéries lactiques du vin et nous avons donc choisis de le remplacer par le gène *rpoB*, qui est un gène monocopie (Dahllöf et al. 2000) et suffisamment discriminant entre les espèces (Mollet et al. 1997, Mota et al. 2004). Sur l'arbre phylogénétique de la figure 36, les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif sont clairement séparées. Ce parallélisme entre la coloration de Gram et l'analyse phylogénétique du gène *rpoB*, pris dans sa globalité, est particulièrement remarquable. Au sein des espèces à Gram positif, les coques hétérofermentaires : *O. oeni*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Weisella paramesenteroides* sont rapprochés. Tandis que l'espèce *Pediococcus pentosaceus*, coque homofermentaire est plus proche des lactobacilles.

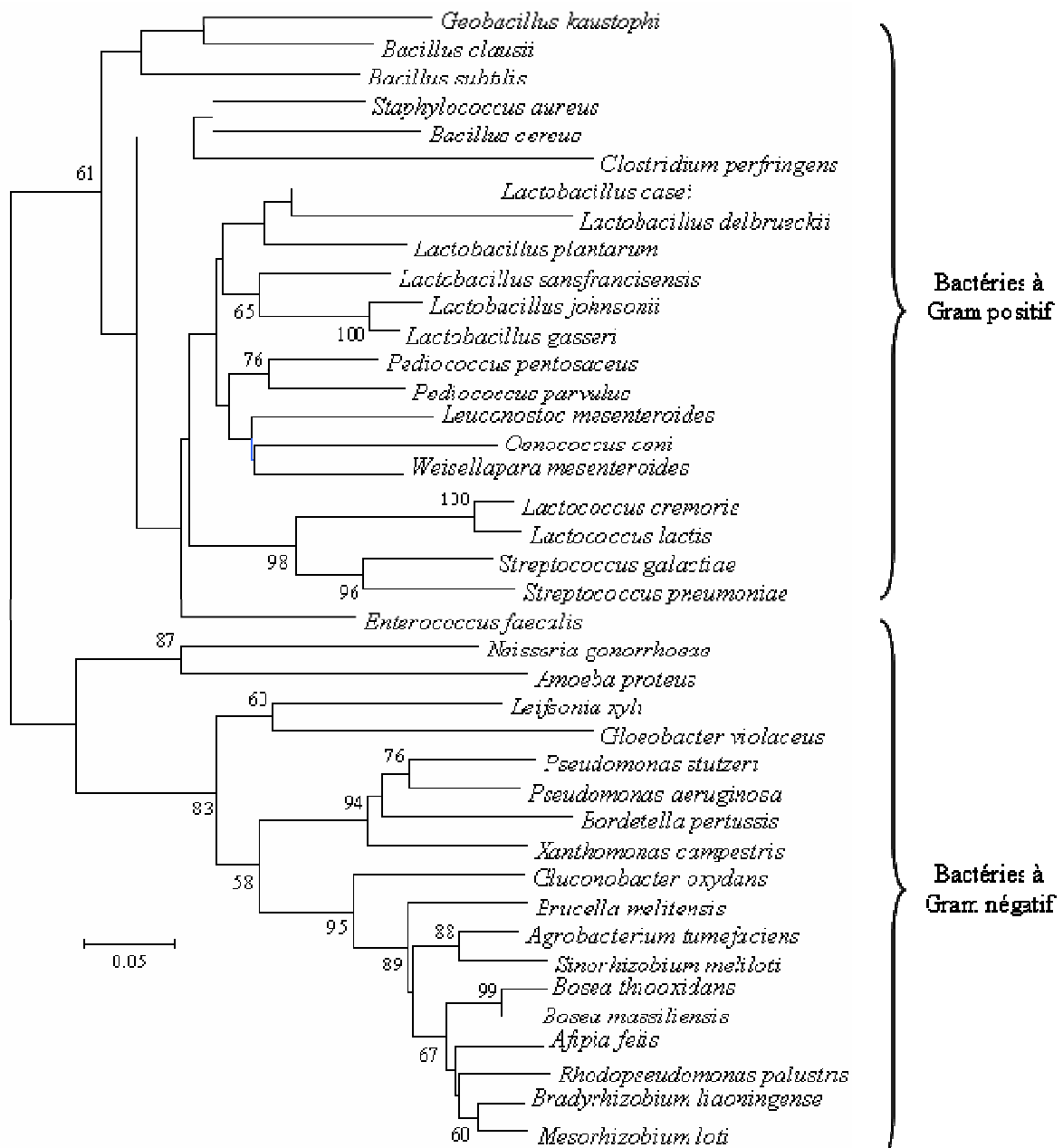
Le gène *rpoB* sépare les espèces selon des différences de séquence mais les regroupe d'un point de vue phylogénétique au sein de groupes concordant avec d'autres critères taxonomiques; ce n'est pas toujours le cas avec l'analyse du gène de l'ARN 16S (Mollet et al. 1997). Comme évoqué précédemment, les qualités phylogénétiques des régions ciblées en PCR-DGGE sont fondamentales car elles permettent de caractériser les espèces inconnues et non décrites que l'on peut détecter sur gel d'acrylamide.

La taille des séquences ciblées lors des analyses par PCR-DGGE doit être comprise entre 200 et 600 pb (Ercolini 2004). Or le gène *rpoB* comprend plusieurs milliers de nucléotides. Il faut donc choisir au sein du gène les régions présentant les mutations les plus pertinentes. Cela se fait par alignement des séquences disponibles dans les banques de données. Les amorces sont choisies par analyse des séquences consensus qui encadrent les régions variables. Dahllöf et al. (2000) avaient précédemment dessiné le couple d'amorces *rpoB1698f* et *rpoB2014r*. Mais la région ciblée par ces amorces ne différencie pas plusieurs espèces de *Lactobacillus* entre-elles et les espèces de *Pediococcus* se confondent avec *O. oeni* (Rantsiou et al. 2004). Leur intérêt pour le suivi des bactéries lactiques du vin est donc limité.

Ce n'est pas le cas des amorces *rpoB1*, *rpoB1o* et *rpoB2* (Tableau XVI) élaborées durant ce travail (Renouf et al. 2006) Elles permettent de séparer clairement les principales espèces

*Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin*

de bactéries lactiques rencontrées dans le vin (Figure 37). Deux amorces (*rpoB1*, *rpoB1o*) sont utilisées en amont de la séquence amplifiée afin d'être plus spécifiques sans pour autant biaiser l'amplification. Sur la figure 38, on constate que plus le pourcentage de bases guanine et cytosine (GC%) est élevé, plus la température de fusion (Tm) est importante et plus la migration sur gel de DGGE est longue. Mais que des séquences avec des GC% et des Tm similaires présentent cependant des distances de migrations significativement différentes, ce qui confirme l'intérêt de processus de dénaturation locale précédemment évoqué.



**Figure 36:** Arbre phylogénétique construit à partir des séquences totales du gène *rpoB* disponibles dans les banques de données.

Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin

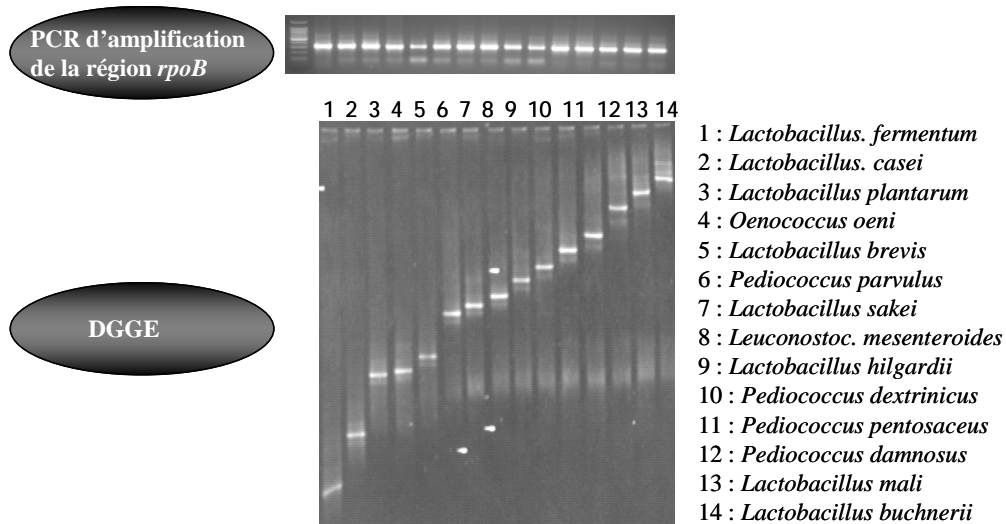


Figure 37: La PCR-DGGE *rpoB* développée durant ce travail pour les principales espèces de bactéries lactiques du vin.

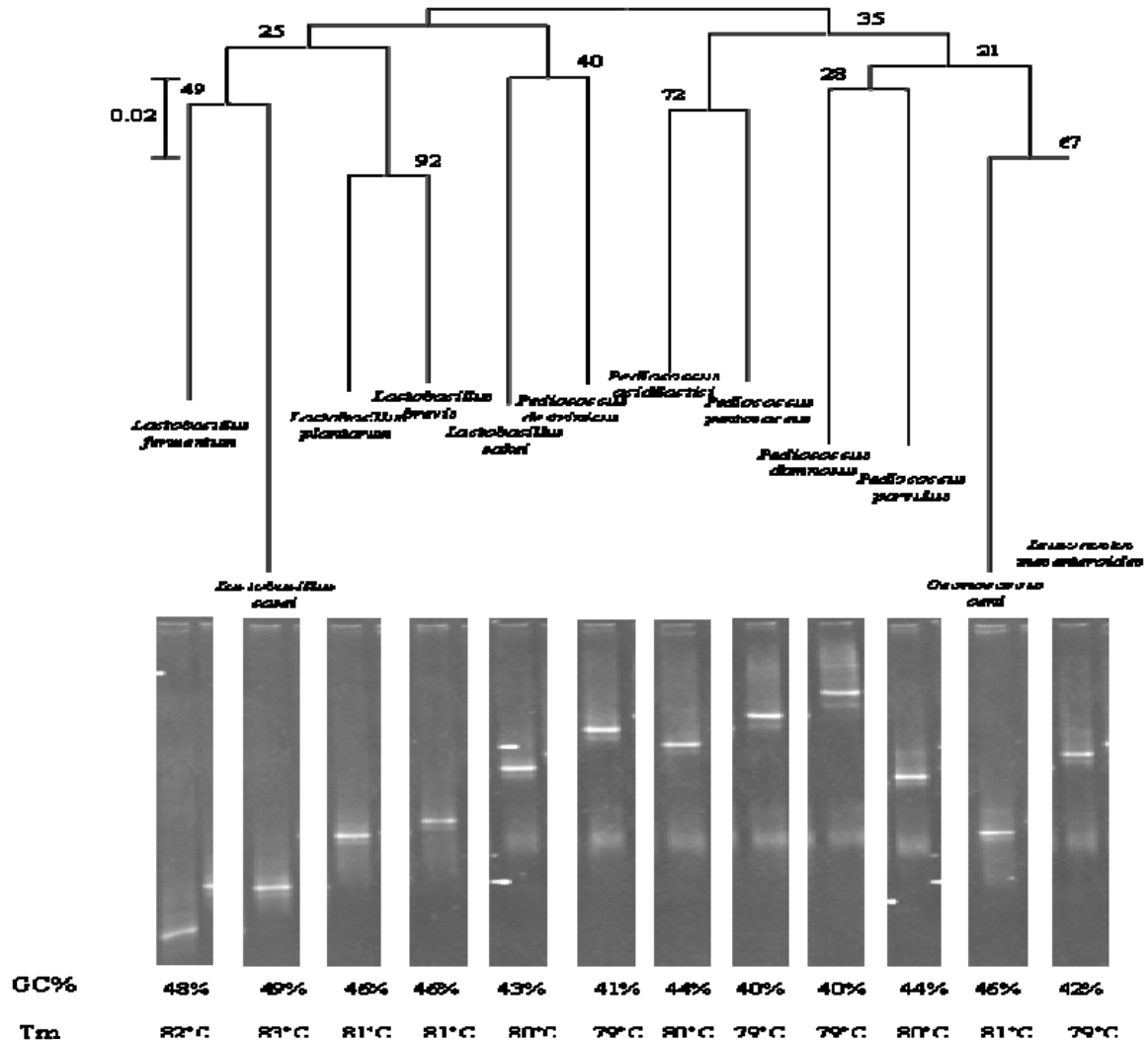
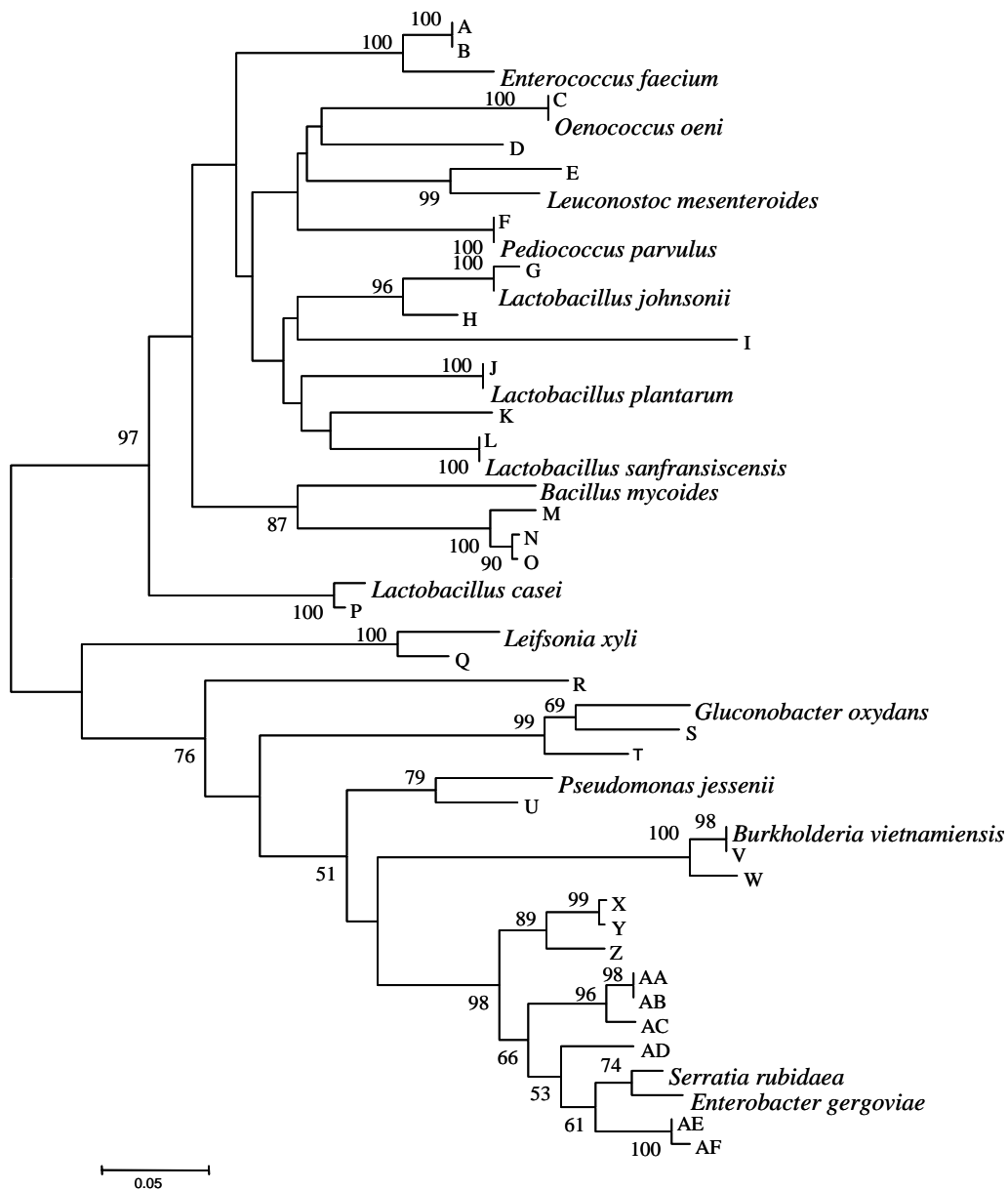


Figure 38: Arbre phylogénétique des séquences ciblées par les amorces *rpoB1*, *rpoB1o*, *rpoB2*, le GC%, le Tm de ces séquences et le profil DGGE pour les principales espèces de bactéries lactiques rencontrées dans le vin.



• Résultats

En ce qui concerne les bactéries (Figure 39), les espèces à Gram positif et à Gram négatif sont phylogénétiquement nettement séparées en deux grands groupes. Au sein du premier, la distinction entre les bacilles et les coques est évidente. Parmi les coques lactiques, l'espèce homofermentaire *Pediococcus parvulus* est séparée des espèces hétérofermentaires (*O. oeni*, *Leuconostoc mesenteroides*). La correspondance entre ces critères physiologiques et taxonomiques fondamentaux consolide la pertinence du rapprochement phylogénétique des séquences inconnues et des séquences de référence, et donc la validité de la cible *rpoB*.

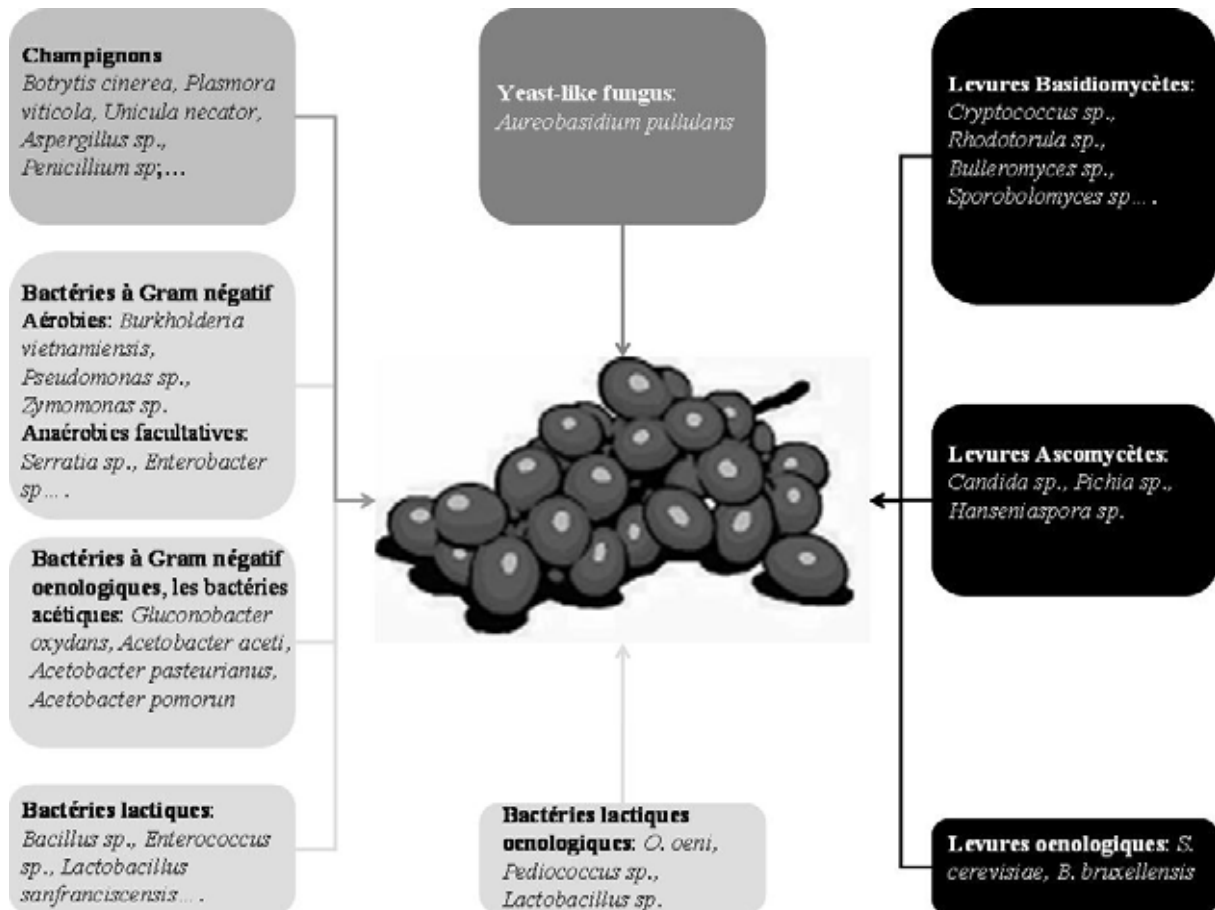


**Figure 39:** Arbre phylogénétique des séquences de bactéries obtenues lors de l'ensemble des analyses de PCR-DGGE *rpoB* réalisées directement sur les eaux de lavages des baies et après utilisation d'une étape d'enrichissement.

L'observation des deux arbres suggère une diversité supérieure (nombre de branches des arbres phylogénétiques) pour les levures. Mais cette complexité apparente s'explique en partie car les séquences chez les levures sont plus abondantes dans les banques de données disponibles. La région des domaines D1/D2 de l'ARN 26S est une région couramment ciblée depuis plusieurs années. Elle a fait l'objet de nombreux travaux de taxonomie qui ont alimenté les banques de données. Ce n'est pas le cas de la région du gène *rpoB* dont l'intérêt a été démontré durant ce travail pour proposer une alternative aux limitations du gène de l'ARN 16S. La banque de séquences *rpoB* est nettement moins riche. Elle comprend les espèces modèles couramment étudiées comme *Escherichia coli* et *Helicobacter pylori*, mais pas d'espèces d'intérêt œnologique hormis *O. oeni*. Une banque de données a donc été constituée en séquençant la région du gène *rpoB* des principales espèces œnologiques disponibles dans la collection du laboratoire. Certaines de ces séquences avaient été utilisées pour dessiner les amorces *rpoB1*, *rpoB1o* et *rpoB2*. A leur tour ces séquences ont alimenté les banques de données consultables sur *internet* (GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Mais cette banque de donnée est insuffisante pour identifier toutes les espèces spécifiques de la niche écologique de la baie de raisin. Alors qu'à chaque séquence correspond une espèce de référence relativement proche pour les levures, pour les bactéries plusieurs séquences (X, Y, Z, AB, AC, AD et AE par exemple) restent isolées au sein de petits groupes relativement éloignés de séquences connues. Néanmoins la pertinence taxonomique du gène *rpoB* précédemment évoquée permet de classer sûrement ces séquences au sein des bactéries à Gram négatif anaérobies, ou anaérobies facultatives, puisqu'elles sont rapprochées phylogénétiquement des genres *Serratia* et *Enterobacter*.

Ces arbres phylogénétiques illustrent remarquablement la diversité des espèces microbiennes présentes à la surface de la baie de raisins. En plus des moisissures observées à l'œil nu et couramment décrites dans la littérature (McClellan et Hewitt 1973, Coertze et al. 2001, Doaré-Lebrun et al. 2006), la baie de raisin se révèle donc être colonisée par des micro-organismes très divers (Figure 40). On y retrouve les espèces œnologiques bien connues, ce qui confirme que la première source de micro-organismes est bien la baie de raisin elle-même, mais aussi des espèces inconnues lors de la vinification. Cette diversité s'illustre également de données quantitatives.

## Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin



**Figure 40:** Bilan de la composition en micro-organismes du système établi à la surface de la baie de raisin, accessibles par les méthodes utilisées.

### - Détermination des espèces minoritaires

Au moment des vendanges, les populations dénombrées sont comprises entre  $10^3$ - $10^5$  UFC/baie pour les levures et  $10^2$ - $10^3$  UFC/baie pour les bactéries. Les populations de levures totales et de levures non-*Saccharomyces* ne sont pas significativement différentes. Il en est de même des niveaux de populations des groupes bactériens (Figure 41). D'un point de vue plus général, au moment des vendanges, la baie de raisin supporte une population viable et dénombrable en levures totales significativement ( $p=0,006$ ) plus importante que la population en bactéries totales. Compte tenu de la diversité interspécifique, des niveaux élevés de population, et des seuils de détection des méthodes, la détection des espèces minoritaires sur la baie de raisin est incertaine. Pour pouvoir accéder aux espèces minoritaires, il faut privilégier la sélectivité de l'analyse. Le recours aux étapes d'enrichissement est donc nécessaire.

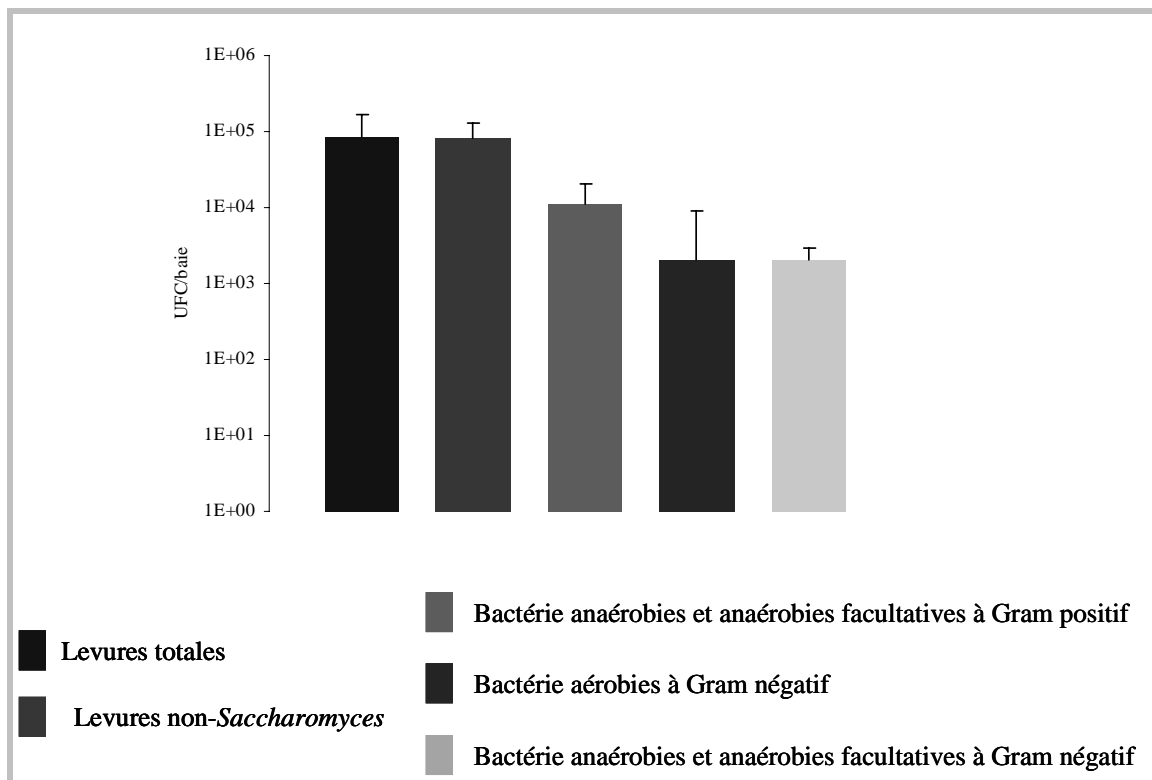
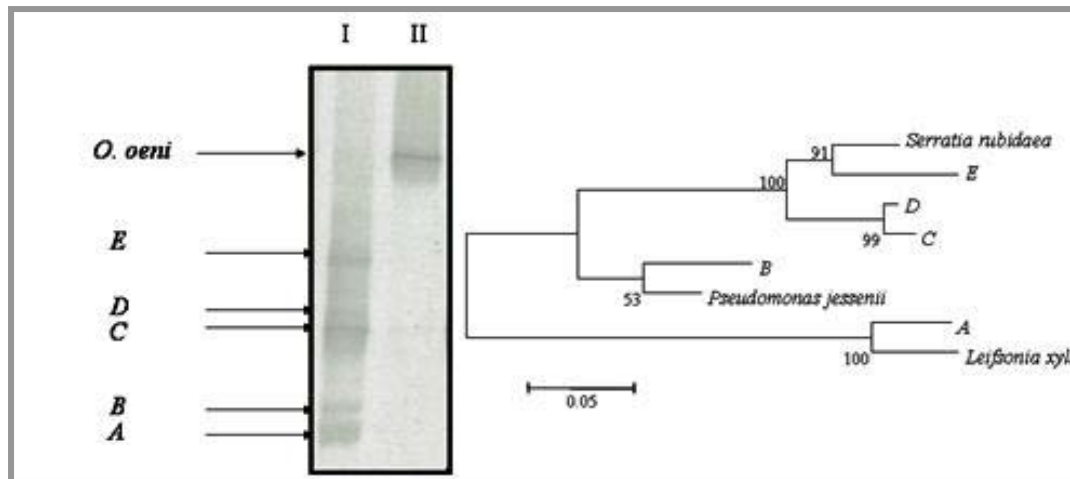


Figure 41: Populations moyennes à la surface des baies lors des vendanges 2004.

Par exemple, la détection de l'espèce *O. oeni* à la surface de la baie de raisins dès la nouaison, malgré l'absence de détection après l'analyse directe des eaux de lavage des baies, est possible en incubant directement et stérilement les baies dans le milieu d'enrichissement EBL. Bien évidemment, l'enrichissement dirigé vers *O. oeni* entraîne une perte d'information au niveau de l'estimation de la diversité (Figure 42). Les bandes A, B, C, D et E ne sont plus détectées après l'enrichissement. Mais la présence sur la baie de raisin dès les premiers stades de son développement de la principale bactérie lactique œnologique *O. oeni* est ainsi démontrée. En fait, les deux analyses directes et indirectes sont complémentaires. Elles doivent être réalisées en parallèle pour obtenir le maximum d'information.



**Figure 42:** PCR-DGGE *rpoB* d'un échantillon de baies de Merlot du domaine VIII lors du millésime 2005 après l'analyse directe de l'eau de lavage des baies (I) et après 10 jours d'incubation des baies dans le milieu d'enrichissement (II).

Cette même méthodologie a été utilisée pour évaluer la présence de la levure *B. bruxellensis* à la surface de la baie de raisin qui était suspectée par plusieurs auteurs mais jamais clairement établie. Jusqu'à présent, les sources de contamination par *B. bruxellensis* évoquées étaient la surface des cuves de fermentations et des barriques, mais aussi les effluents vinicoles (Chatonnet *et al.* 1999) et les circuits d'aération des chais (Connel *et al.* 2002), mais jamais la baie de raisins.

L'incubation de 10 jours des baies de raisins dans le milieu d'enrichissement EBB est nécessaire pour établir, ou non, l'existence de *B. bruxellensis* à leur surface. Lorsque l'espèce *B. bruxellensis* est présente l'enrichissement doit lui permettre de devenir dominante dans le milieu de culture, pour être facilement détectée par PCR. Compte tenu de la manipulation fréquente des *B. bruxellensis* au laboratoire et de la qualité du milieu pour ces levures, un témoin négatif sans ajouter de baie est indispensable.

Le tableau XXV regroupe les résultats obtenus lors du millésime 2004. Lorsque *B. bruxellensis* est détectée après 10 jours d'incubation, elle représente au minimum 40% des colonies isolées. Cette proportion est considérable compte tenu de la diversité initiale, d'autant plus que *B. bruxellensis* n'était jamais isolée après l'analyse directe des échantillons de raisins. Ces résultats suggèrent que *B. bruxellensis* est initialement présente mais en deçà du seuil de détection de l'analyse directe. L'incubation de 10 jours dans le milieu EBB permet de la rendre majoritaire et donc détectable par PCR spécifique d'espèce (Figure 43) et par

PCR-DGGE (Figure 44). Par contre si *B. bruxellensis* n'est pas détectée après les 10 jours d'incubation, il est hautement probable qu'elle soit initialement absente de l'échantillon. La figure 44 montre que *B. bruxellensis* n'est pas la seule espèce susceptible d'être favorisée puis détectée par l'incubation dans le milieu EBB. Parmi ces espèces, on retrouve *S. cerevisiae* dont la détection sur la baie de raisin par enrichissement est bien décrite dans la littérature (Rosini et al. 1982, Mortimer et Posinelli 1999, Le Jeune et al. 2006). Le passage par une étape d'enrichissement mimant les conditions œnologiques démontre que les principaux micro-organismes œnologiques sont déjà présents à la surface du raisin au vignoble, même s'ils ne sont que minoritaires.

**Tableau XXV.** Essais de détection de *B. bruxellensis* après l'utilisation du milieu EBB au moment des vendanges 2004 (le signe + rend compte d'une amplification positive et inversement – signifie l'absence d'amplification).

Domaines	IV			II		VI
Cépages	Cabernet-Sauvignon	Cabernet-Franc	Merlot	Cabernet-Franc	Merlot	Cabernet-Sauvignon
<b>PCR DB1/DB2</b>	+	+	-	-	+	-
<b>% de <i>B. bruxellensis</i> sur vingt colonies isolées</b>	60%	40%	0%	0%	45%	0%

## II Les niveaux de populations microbiennes sur la baie de raisins.

L'écosystème microbien du raisin est donc encore plus complexe que ne le laissait apparaître les analyses directes des eaux de lavage des baies. De plus, outre des rapports entre les espèces majoritaires et les espèces minoritaires, la comparaison de l'ensemble des échantillons traités montre que la diversité qualitative, mais aussi quantitative, des espèces est fonction de plusieurs facteurs environnementaux.

### II.1 L'effet du stade de développement.

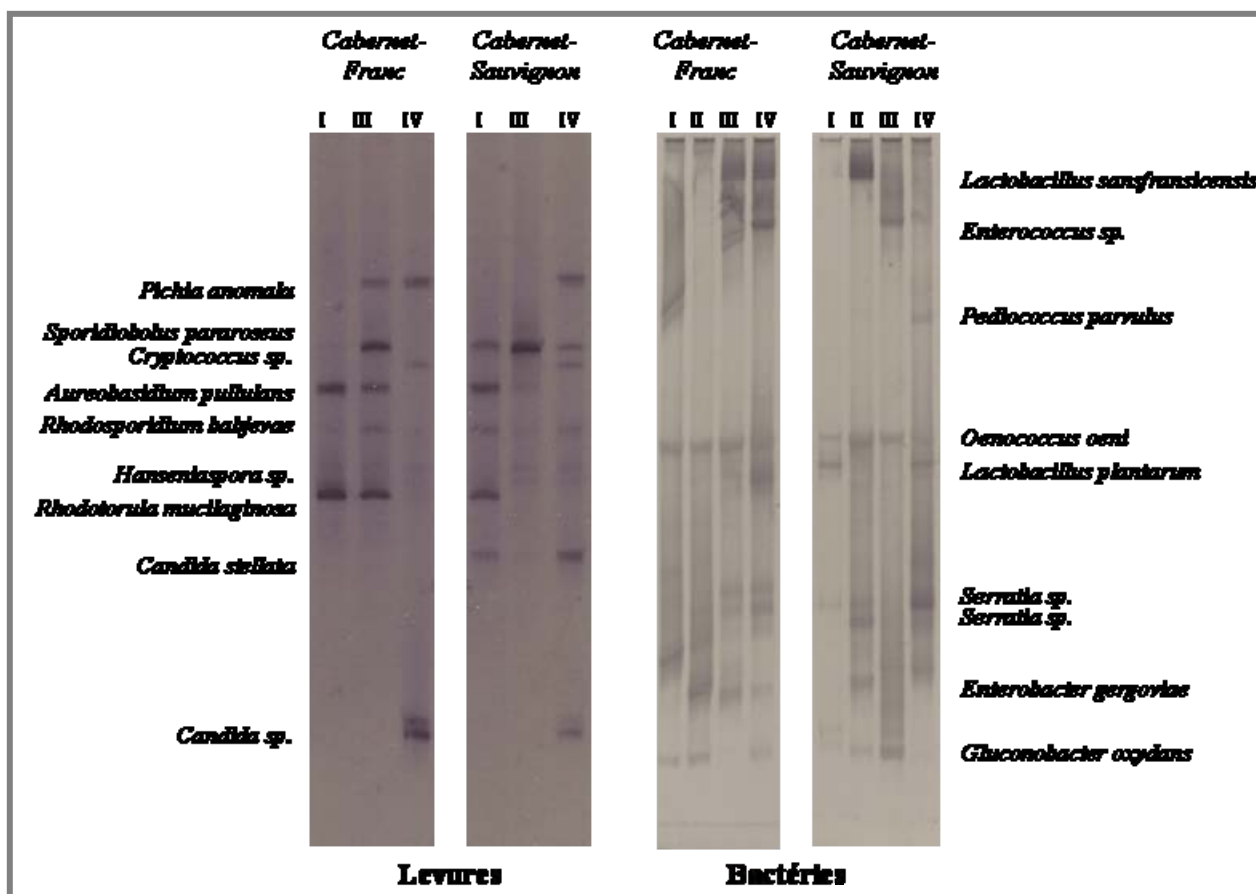
Le suivi des parcelles depuis le premier stade de développement de la baie de raisin, la nouaison, jusqu'aux vendanges révèle une augmentation des populations microbiennes

*Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin*

(Tableau XXVI), mais aussi une variation de la proportion des espèces durant la maturation des baies (Figure 45).

**Tableau XXVI.** Evolution des populations de bactéries dénombrées sur les boites de milieu ANGP (UFC/baie) en fonction du stade de développement de la baie de raisin sur deux vignobles et deux cépages (Merlot et Cabernet-Sauvignon) au cours du millésime 2004.

Domaine	IV		VII	
	Merlot	Cabernet-Sauvignon	Merlot	Cabernet-Sauvignon
<b>Nouaison</b>	$7,7 \times 10^1$ $\pm 2,5 \times 10^1$	$5,7 \times 10^1$ $\pm 4,0 \times 10^1$	$2,2 \times 10^2$ $\pm 1,9 \times 10^2$	$7,3 \times 10^1$ $\pm 4,6 \times 10^1$
<b>Véraison</b>	$1,1 \times 10^2$ $\pm 0,4 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$ $\pm 3,6 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$ $\pm 3,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$ $\pm 0,8 \times 10^2$
<b>Vendanges</b>	$8,3 \times 10^3$ $\pm 2,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$ $\pm 0,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$ $\pm 2,8 \times 10^3$	$5,7 \times 10^3$ $\pm 3,8 \times 10^3$



**Figure 45:** Analyses directes par PCR-DGGE *NLI/LS2* pour les levures et PCR-DGGE *rpoB* d'une parcelle de Cabernet-Franc et une parcelle de Cabernet-Sauvignon à différents stades de développement du raisin (I : nouaison, II : véraison, III : fin des traitements phytosanitaires, IV : vendanges) au domaine IV lors du millésime 2005.

- **Les levures**

Parmi les levures, sur le gel de DGGE *NLI/LS2*, l'évolution des bandes au fur et à mesure de la maturation du raisin est remarquable. Certaines bandes sont détectées uniquement au début du suivi (*Aureobasidium pullulans* et *Rhodotorula mucilaginosa*), alors que d'autres n'apparaissent que sur les raisins vendangés (*Pichia anomala*, *Candida stellata*). Une estimation de la proportion des espèces majoritaires isolées sur boîtes LT lors du traitement de l'eau de lavage des baies au fur et à mesure de leur développement par PCR-RFLP-ITS confirme ces variations (Tableau XXVII).

La majorité des espèces de levures identifiées par la DGGE le sont également par les PCR-RFLP-ITS. Par cette méthode, compte tenu de l'échantillonnage des colonies, une espèce minoritaire ne peut être détectée que si sa concentration représente au minimum de 1 % de la concentration de l'espèce majoritaire. Par conséquent, on peut estimer que la détection par PCR-DGGE impose un rapport entre les espèces du même ordre de grandeur. Cette estimation est légèrement supérieure aux observations de Prakitchaiwattana et *al.* (2004) pour qui un rapport de 1‰ entre plusieurs espèces suffit à empêcher la détection des espèces minoritaires.

**Tableau XXVII.** Proportion des espèces de levures identifiées par PCR-RFLP-ITS sur les colonies isolées sur boîtes LT (levures totales) à partir d'échantillons de baies de raisin au cours de l'été 2003 sur des parcelles de Merlot (domaine I), Cabernet-Franc (domaine IV) et Cabernet-Sauvignon (VI).

<b>Stade de développement du raisin</b>	<b>Proportion des espèces identifiées</b>
<b>Nouaison</b>	<i>Aureobasidium pullulans</i> : 62%, <i>Cryptococcus</i> sp. : 14%, <i>Rhodotorula</i> sp. :12%, <i>Rhodospiridium babjevae</i> : 10%, <i>Candida</i> sp., <i>Sporobolomyces</i> sp., <i>Hanseniaspora</i> sp., <i>Yarrowia lipolytica</i> : 2%.
<b>Véraison</b>	<i>Candida</i> sp. : 24%, <i>Sporobolomyces</i> sp. : 18%, <i>Cryptococcus</i> sp. : 16%, <i>Rhodotorula</i> sp. 16%, <i>Aureobasidium pullulans</i> : 14% ; <i>Rhodospiridium babjevae</i> : 10%, <i>Metschnikowia</i> sp., <i>Bulleromyces albus</i> , <i>Lipomyces spencermartinsaie</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia</i> sp. : 2%.
<b>Vendange</b>	<i>Cryptococcus</i> sp. : 34%, <i>Candida</i> sp. : 30%, <i>Pichia</i> sp. : 16%, <i>Rhodotorula</i> sp. 10%, <i>Hanseniaspora</i> sp. : 8%, <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Sporobolomyces</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Lipomyces spencermartinsaie</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Issatchenkia</i> sp. : 2%.



### Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin

Dans le cas de l'écosystème microbien du raisin, l'analyse culture-indépendante ne révèle pas une diversité interspécifique plus importante que l'analyse utilisant une étape d'isolation sur boîtes. Il est probable que compte tenu de l'importance et de l'hétérogénéité du nombre d'espèces présentes seules les espèces majoritaires sont détectées dans les deux cas. Dans le premier cas, sans culture préalable, cela s'explique par une compétition entre les matrices d'ADN lors des premiers cycles d'amplification : la probabilité d'amplification et donc de détection d'une séquence est plus importante pour les espèces majoritaires. Tout au long de la PCR, la coopérativité du procédé d'amplification creuse l'écart entre les séquences initialement majoritaires et les minoritaires si bien qu'à la fin, seules les premières sont détectables. Dans le second cas, c'est l'étape de culture qui, via les dilutions imposées pour obtenir des colonies isolées, élude les espèces minoritaires. Pour accéder à ces dernières l'étape d'enrichissement est donc nécessaire (Figure 46). En outre, cette comparaison permet d'établir l'absence d'état VNC pour les espèces majoritaires, confirmé par la comparaison entre le comptage en épifluorescence des eaux de lavages et les dénombrements sur boîtes.

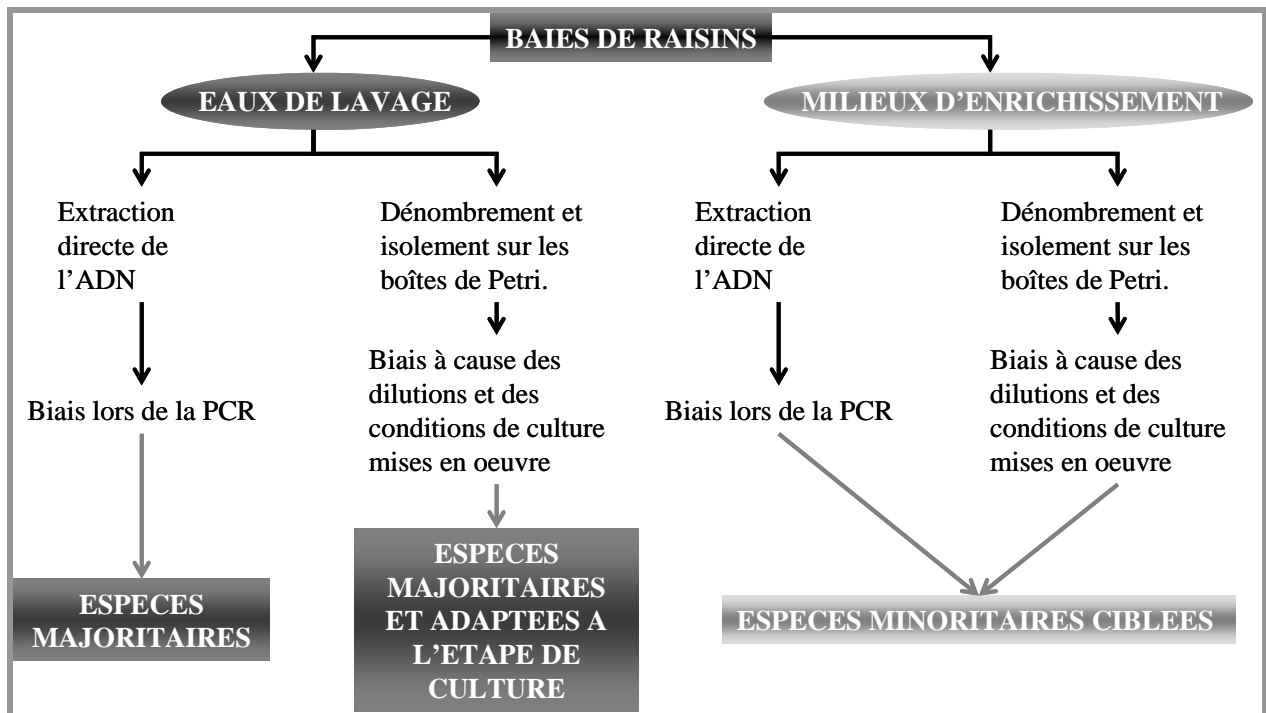
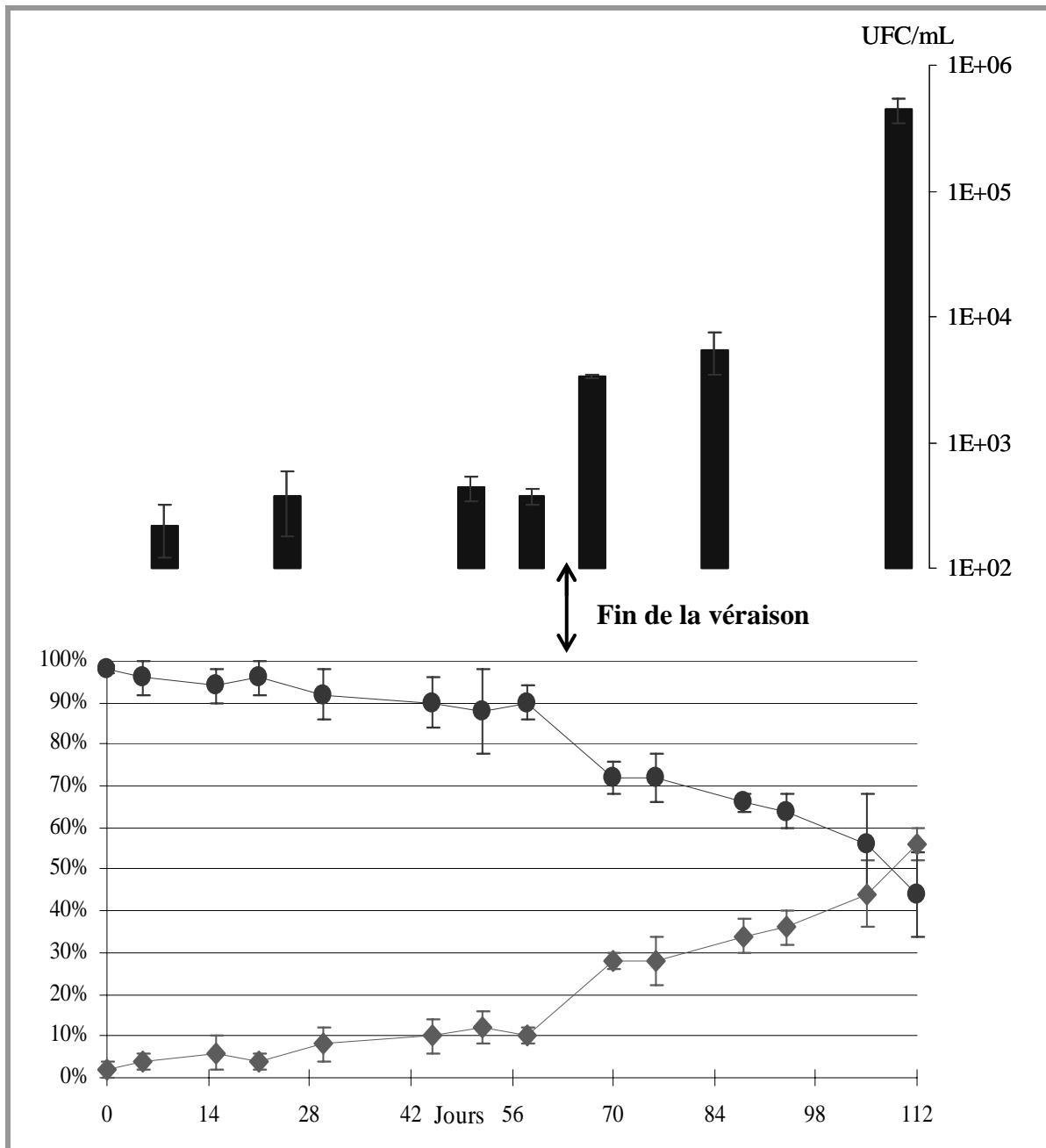


Figure 46: Méthodes complémentaires pour l'étude de la microflore des baies de raisins

*Aureobasidium pullulans* est l'espèce de levure majoritaire présente à la surface des baies à la nouaison. Sa proportion diminue au fur et à mesure de la maturation du raisin (Tableau XXVII). Au moment des vendanges, elle est indétectable. Sur les baies mures, les espèces majoritaires appartiennent au genre *Cryptococcus* et au genre *Candida*. Ces dernières étaient initialement largement minoritaires. Les levures *Saccharomyces* sont indétectables directement sur la baie de raisins au début de son développement. Elles représentent aussi qu'une très faible proportion des espèces présentes au moment des vendanges. A ce moment comme évoqué précédemment, la population de levures totales est représentée par les levures non-*Saccharomyces*. Plus généralement, les espèces qualifiées de fermentaires par Barnett et al. (1990) sont minoritaires sur les baies immatures. Leur proportion augmente progressivement jusqu'aux vendanges avec un net saut au moment de la véraison (Figure 47).



**Figure 47:** Evolution de la proportion des espèces fermentaires (◆) et des espèces non-fermentaires (●) de levures lors du suivi réalisé au domaine I en 2005 (en bas) et évolution de la population de levures totales (■) dénombrée à la surface de la baie de raisins (en haut).

La proportion de chaque espèce de levures et le niveau des populations évoluent donc au fur et à mesure de la maturation du raisin. La véraison est une étape décisive dans ces évolutions. Cet effet significatif, puisqu'il s'est répété sur les deux millésimes 2004 et 2005 étudiés en continu ( $p < 0,001$ ). Il concerne également les bactéries.

- **Les bactéries**

La population de bactéries totales sur la baie de raisin est maximale sur le raisin arrivé à maturité. Mais du point de vue des espèces, les profils de DGGE (Figure 45) sont plus hétérogènes. Certaines bandes sont constamment présentes sur le gel. C'est notamment le cas de l'espèce *O. oeni*, pour l'exemple présenté. D'autres ne sont détectées que sur les baies immatures (*Lactobacillus sansfrancisensis*) et d'autres qu'au moment des vendanges (*P. parvulus*). Enfin certaines bandes sont présentes sur le gel au début du suivi, puis disparaissent pour réapparaître sur les baies matures (*G. oxydans*). Ces variations reflètent probablement des changements de proportions entre les espèces majoritaires (détectées) et minoritaires (non détectées), plutôt que l'apparition ou la disparition des espèces.

Néanmoins, il faut souligner ici la principale limitation oenologique de la PCR-DGGE *rpoB* telle qu'elle a été développée durant ce travail. En effet malgré les nombreux essais réalisés pour optimiser la résolution en jouant sur le gradient d'urée-formamide, le temps de migration et le voltage appliqué, les conditions qui ont été retenues étaient celles qui offraient le meilleur compromis entre le nombre d'espèces susceptibles d'être identifiées et la séparation des bandes. Elles excluent tout de même du gel certaines espèces de bactéries acétiques et notamment le genre *Acetobacter*.

Pour combler cette lacune, les colonies isolées sur les boîtes AGN sont identifiées par PCR-RFLP. Par cette méthode deux espèces du genre *Acetobacter*, *A. aceti* et *Acetobacter pomorum* sont identifiées à la surface de la baie de raisins. Au sein des BA isolées, la proportion des *Acetobacter* augmente lors de la maturation. Elles sont indétectables à la surface des baies immatures. Puis elles représentent près du quart des BA isolées sur les baies arrivées à maturité. Dans ce cas, il est intéressant de noter que la proportion maximale de BA (Tableau XXVIII) au moment des vendanges a été observée lors de la vendange de raisins de Sauvignon gris, sur lesquels l'espèce *A. aceti* représentait jusqu'à 60 % des colonies isolées sur boîte, même sur des baies de raisins sains.

**Tableau XXVIII.** Evolution de la proportion des différentes espèces de BA identifiées par PCR-RFLP sur des échantillons de colonies isolées sur les boîtes AGN lors des suivis réalisés en 2005.

	<b>Nouaison</b>	<b>Véraison</b>	<b>Vendanges</b>
<i>Gluconobacter oxydans</i>	70 %	55 %	45 %
<i>Gluconoacetobacter hansenii</i>	30 %	35 %	25 %
<i>Acetobacter aceti</i>	-	10 %	20 %
<i>Acetobacter pomorum</i>	-	-	10 %

La compensation par PCR-RFLP en ce qui concerne les bactéries du genre *Acetobacter* ne doit pas masquer le défaut de la PCR-DGGE *rpoB* telle qu'elle a été utilisée. Cette méthode ne peut pas être qualifiée d'universelle. Même si cela est le cas de l'amplification de la séquence ciblée, la migration en gradient dénaturant pose encore problème. L'absence de détection des bactéries *Acetobacter* a été évidente car leur présence est bien connue d'après la littérature œnologique (Joyeux et al. 1984), mais il se peut que d'autres espèces de bactéries à Gram négatif, qui sont systématiquement dans la partie basse du gel, aient échappée à l'analyse.

Néanmoins, la PCR-DGGE *rpoB* a permis une avancée importante dans la description d'un domaine jusqu'ici peu étudié : la niche bactérienne du raisin. Elle a confirmé la présence des principales bactéries lactiques œnologiques et révélé des bactéries jamais décrites jusqu'à présent, comme *Burkholderia vietnamiensis*, et qui doivent pourtant jouer un rôle à la surface de la baie de raisins.

## **II.2 L'effet du cépage.**

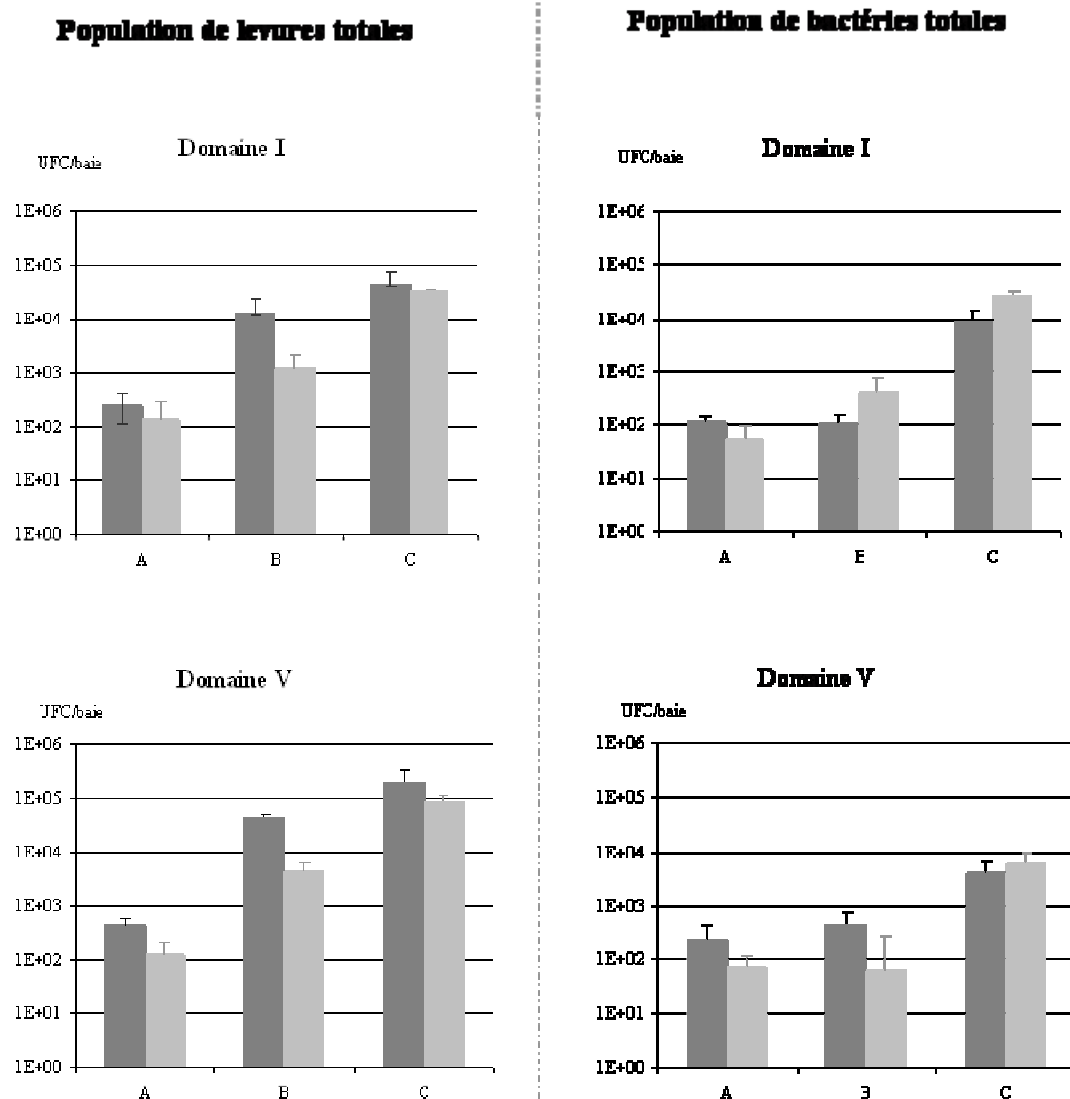
Dans un même domaine, le suivi de différents cépages sur plusieurs parcelles permet d'estimer cet effet sur les populations microbiennes. Dans un premier temps, des baies de Merlot ont été comparées, tout au long de leur développement, aux baies de Cabernet-Sauvignon sur deux domaines (I et IV). Puis dans un second temps, la comparaison portait sur l'ensemble des cépages rouges (Merlot, Cabernet-Franc, Cabernet-Sauvignon, Petit-Verdot) et des cépages blancs (Sauvignon, Sémillon) des parcelles du domaine IV.

Dans le premier cas (Figure 48), l'effet du cépage n'est significatif ( $p=0,023$ ) que pour la population de levures totales. Elle est plus élevée sur les baies de Merlot que sur les baies

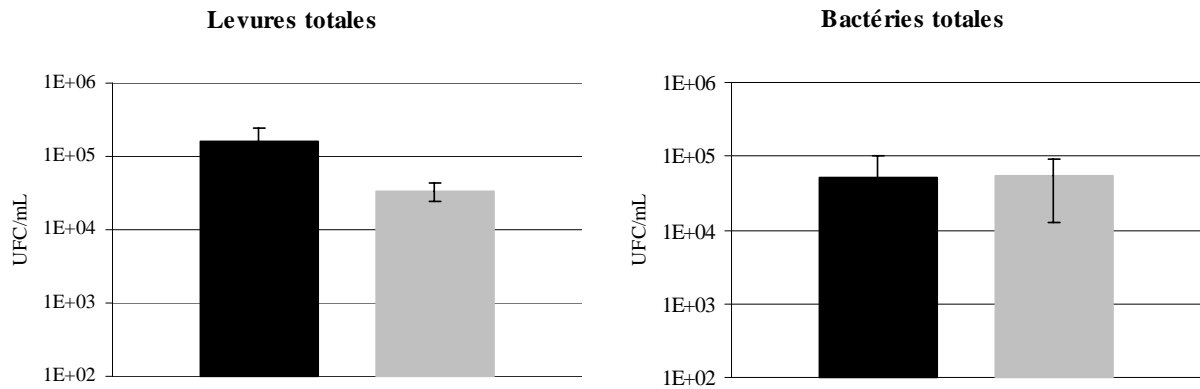
### Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin

de Cabernet-Sauvignon et ceci quel que soit le stade de la maturation ( $p=0,04$ ). En ce qui concerne les bactéries, il n'y a pas de différence significative ( $p>0,05$ ).

Les résultats sont les mêmes entre les raisins rouges et les raisins blancs (Figure 49). Les premiers supportent une population significativement plus importante de levures ( $p=0,004$ ), mais pas pour les bactéries pour lesquelles la variabilité des niveaux de populations est plus importante selon les parcelles. Cette variabilité n'indique pas d'effet statistiquement significatif du phénomène observé.



**Figure 48:** Population de levures totales et de bactéries totales sur des parcelles de Merlot (■) et des parcelles de Cabernet-Sauvignon (□) à différents stades de la maturation du raisin (A : nouaison, B : véraison, C : vendanges) lors du millésime 2004.

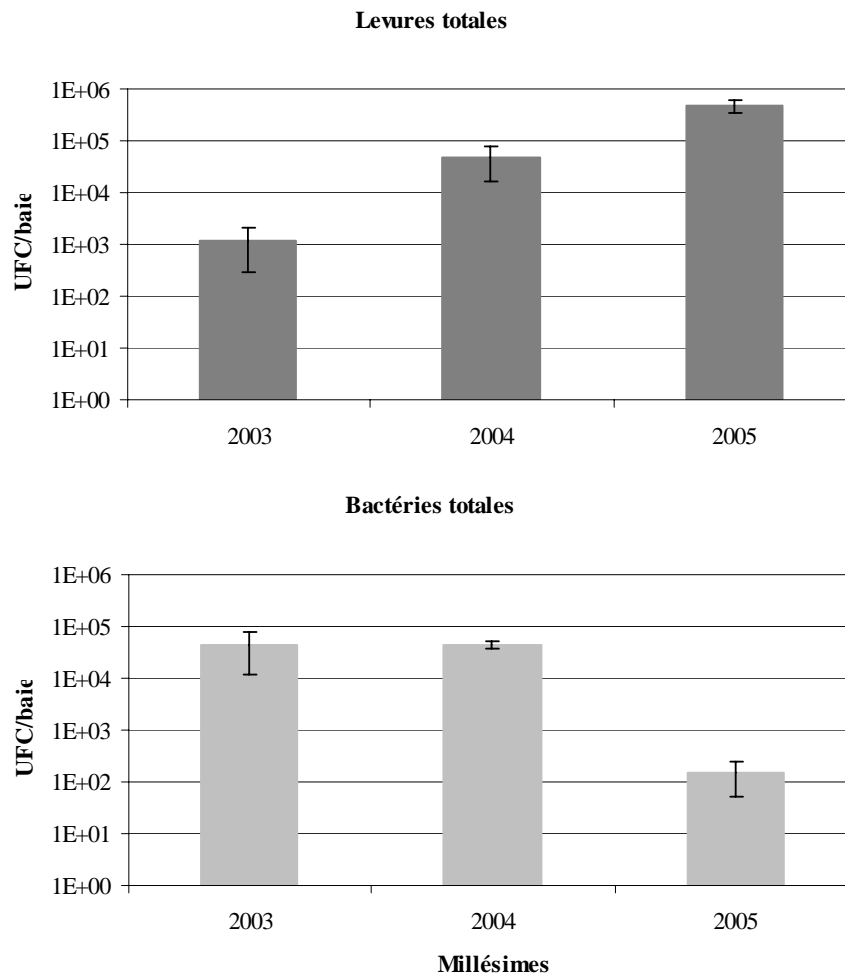


**Figure 49:** Comparaisons des populations dénombrées sur les parcelles de raisins rouges (Merlot, Cabernet-Franc et Cabernet-Sauvignon) (■) et sur les parcelles de raisins blancs (Sémillon et Sauvignon) (□) du domaine IV lors des vendanges 2005.

### **II.3 L'effet des millésimes.**

Les données recueillies lors des vendanges durant les trois millésimes étudiés (2003, 2004, 2005) témoignent d'un effet significatif du millésime sur le niveau de population et mais aussi sur la diversité des levures.

Lors des vendanges 2005, la population moyenne de levures est supérieure à celle dénombrée en 2004, qui est supérieure à celle de 2003 ( $p < 0,001$ ) (Figure 50). Les populations moyennes de bactéries varient également, mais on note une variation opposée à celle des levures. Au moment des vendanges, plus les populations de levures sont élevées plus les populations de bactéries sont faibles. Mais la forte variabilité des bactériennes ne permet pas d'attribuer un poids statistique à cette évolution.



**Figure 50:** Populations moyennes de levures totales (■) et de bactéries totales (■) sur l'ensemble des parcelles de raisins rouges suivis lors des trois millésimes.

La diversité des espèces de levures détectées varie également en fonction du millésime. En 2005 les levures avec des aptitudes fermentaires représentaient près de la moitié des espèces identifiées par PCR-RFLP-ITS, alors qu'en 2003 et 2004 les levures non-fermentaires dominaient nettement avec une supériorité des levures du genre *Cryptococcus* sp. (Tableau XXIX). Dans les deux catégories, la proportion de chaque genre fluctue également. En 2004, les levures du genre *Candida* représentaient plus d'un cinquième des espèces détectées. En 2005, elles sont dix fois moins importantes. Il est probable que la nature et les capacités fermentaires des levures de la baie lors des vendanges joueront un rôle déterminant après le foulage des baies et lors des premiers stades de la vinification.



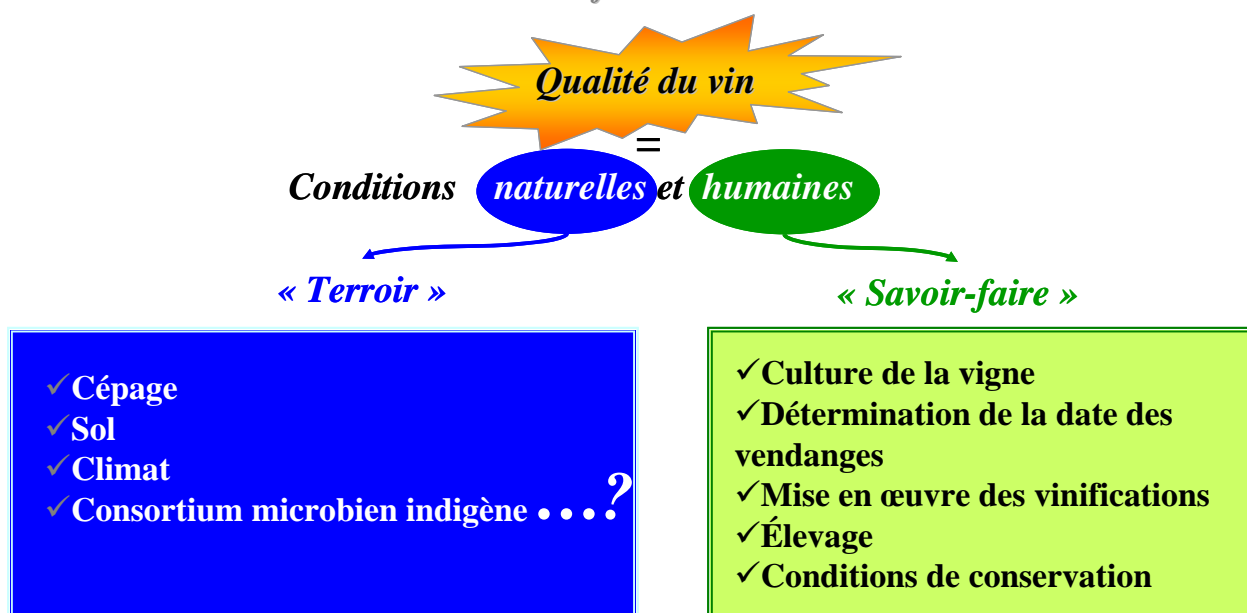
**Tableau XXIX.** Proportion des espèces de levures identifiées par PCR-RFLP-ITS sur les colonies isolées sur boîtes LT (levures totales) à partir des échantillons sur les baies de raisin vendangées en 2003, 2004 et 2005 sur l'ensemble des parcelles et des domaines étudiés.

	<b>Famille</b>	<b>Genre</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>
<b>Levures non-fermentaires</b>	<i>Sporiodiobolaceae</i>	<i>Rhodosporidium</i> sp.	12%	8%	4%
		<i>Rhodotorula</i> sp.	6%	10%	6%
		<i>Sporobolomyces</i> sp.	-	6%	-
	<i>Tremellaceae</i>	<i>Cryptococcus</i> sp.	44%	34%	38%
		<i>Bulleromyces</i> sp.	10%	4%	4%
	<i>Dothioraceae</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	8%	-	-
		<b>TOTAL</b>	<b>80%</b>	<b>62%</b>	<b>52%</b>
<b>Levures fermentaires</b>	<i>Candidaceae</i>	<i>Candida</i> sp.	6%	22%	2%
	<i>Dipodascaceae</i>	<i>Yarrowia</i> sp.	2%	2%	-
	<i>Lipomycetaceae</i>	<i>Lipomyces</i> sp.	-	2%	-
	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Debaryomyces</i> sp.	6%	2%	4%
		<i>Issatchenkia</i> sp.	2%	-	-
		<i>Pichia</i> sp.	-	6%	16%
		<i>Saccharomyces</i> sp.	-	2%	2%
	<i>Saccharomycodaceae</i>	<i>Kluyveromyces</i> sp.	-	-	-
		<i>Hansenispora</i> sp.	4%	2%	6%
		<i>Metschnikowia</i> sp.	-	-	18%
	<b>TOTAL</b>	<b>20%</b>	<b>38%</b>	<b>48%</b>	

#### **II.4 L'effet du terroir et la spécificité de la microflore indigène.**

Selon Ribéreau-Gayon (1991) la qualité des vins résulte « de conditions naturelles et humaines ». Les premières regroupent la combinaison des cépages, du sol et du climat, et les secondes de l'art et la manière de les mettre en oeuvre. Ce sont les composantes déterminantes d'un terroir.

Ce travail a confirmé la présence des principaux micro-organismes œnologiques sur la baie de raisin. Mais très peu d'études ont été menées pour évaluer la dépendance du consortium microbien et de la localisation géographique des parcelles (Figure 51). Les résultats obtenus sur chaque domaine ont été comparés.



**Figure 51:** Les principaux facteurs de la qualité des vins.

Parmi les espèces identifiées sur la baie, certaines sont détectées de façon homogène sur tous les domaines étudiés (Tableau XXX). C'est notamment le cas de levures et de bactéries couramment décrites durant l'élaboration du vin comme la levure *Pichia anomala* et la bactérie *G. oxydans* mais également des espèces qui sont beaucoup plus rarement détectées dans le moût et dans le vin comme les espèces *Rhodotorula graminis* et *Burkholderia vietnamiensis*. Mais l'espèce *Bulleromyces albus* qui n'est pas non plus connue pour intervenir après le foulage n'est détectée que sur les domaines IV et VIII. La levure *Metschnikowia fructicola* n'est détectée uniquement sur le domaine III à une fréquence relativement élevée. Sa présence sur le raisin est mise en évidence dans près d'un tiers des prélèvements réalisés dans ce domaine alors qu'elle n'est jamais détectée sur les autres vignobles. Plus intéressante car il s'agit d'une espèce d'altération, *P. parvulus* est nettement détectée plus fréquemment sur le domaine VIII. Concernant *B. bruxellensis* il n'a pas été possible d'établir de telles différences. Il semblerait qu'elle soit uniformément présente sur les domaines étudiés.

*Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin*

**Tableau XXX.** Fréquence de détection de différentes espèces de levures et de bactéries à la surface des raisins sur des parcelles de Merlot de différents domaines lors du millésime 2005.

		<b>Domaine III</b>	<b>Domaine IV</b>	<b>Domaine VI</b>	<b>Domaine VIII</b>
<b>Levures</b>	<i>Candida cantarelli</i>	0 %	60 %	5 %	0 %
	<i>Pichia anomala</i>	50 %	30 %	35 %	40 %
	<i>Metschnikowia fructicola</i>	30 %	0 %	0 %	0 %
	<i>Rhodotorula graminis</i>	20 %	15 %	20 %	25 %
	<i>Bulleromyces albus</i>	0 %	10 %	0 %	40 %
<b>Bactéries</b>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	40 %	40 %	50 %	35 %
	<i>Pediococcus parvulus</i>	0 %	10 %	0 %	90 %
	<i>Burkholderia</i>	60 %	50 %	30 %	40 %
	<i>vietnamiensis</i>				

D'un point de vue quantitatif, la localisation géographique influence aussi significativement ( $p < 0,001$ ) le niveau de population de levures sur la baie de raisins (Figure 52). Les levures sont plus nombreuses au domaine VIII qu'au domaine III. Elles mêmes plus nombreuses qu'au domaine IV. C'est finalement le domaine VI qui présente le plus faible niveau de population de levures. Cet effet s'est reproduit sur les trois millésimes ( $p < 0,001$ ). L'effet quantitatif de la localisation géographique est moins significatif en ce qui concerne la population de bactéries. Mais cette population est systématiquement la plus faible au domaine VI.

Ces observations montrent l'effet significatif du domaine sur la présence de certaines espèces de levures et de bactéries à la surface de la baie de raisin. Ces dernières peuvent être considérées comme des caractéristiques propres de chaque vignoble au même titre que la nature du sol et des données climatiques. Ce qui soulève l'hypothèse d'une spécificité microbiologique des domaines.

Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin

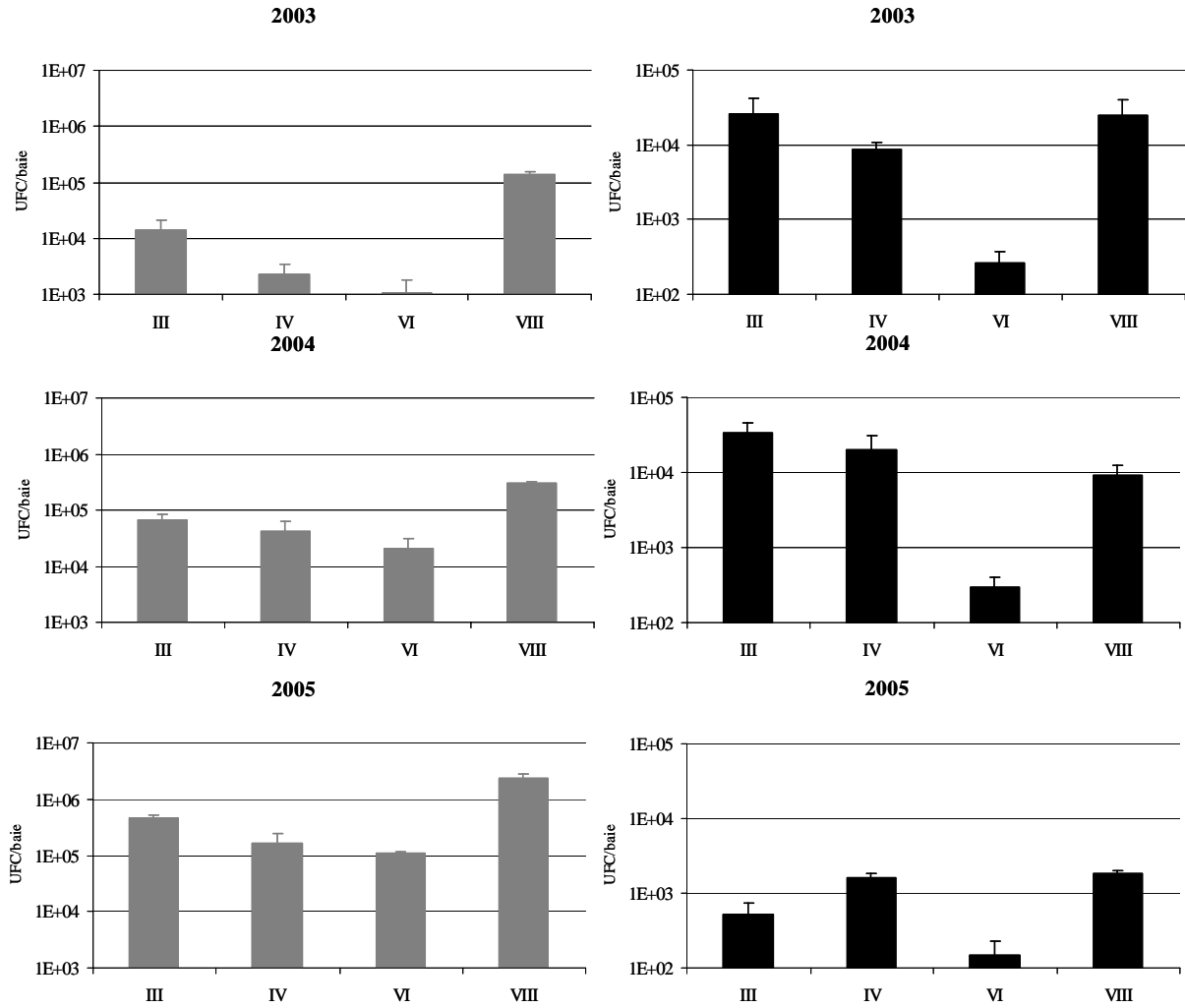


Figure 52: Population de levures totales (■) et de bactéries totales (■) sur le raisin au moment des vendanges sur quatre parcelles de merlot des domaines III, IV, VI et VIII pendant trois millésimes (2003, 2004, 2005).

### III Discussion : L'établissement d'un modèle d'organisation des micro-organismes.

L'ensemble de ces résultats illustre la diversité qualitative et quantitative des levures et des bactéries sur la baie de raisin. Bien que l'écosystème microbien ne soit probablement pas décrit dans son intégralité, les précisions acquises dans ce travail éclairent les connaissances dans ce domaine. Les données bibliographiques issues de travaux réalisés sur d'autres végétaux informent sur les propriétés des micro-organismes impliqués et permet d'établir un modèle d'organisation des micro-organismes à la surface de la baie de raisin.

#### III.1 Les interactions à la surface de la baie de raisin.

L'importance des fermentations a amené les chercheurs à se focaliser jusqu'ici sur la recherche des principales espèces d'intérêt œnologique, comme *S. cerevisiae* (Le Jeune et al. 2006) et *O. oeni* (Bae et al. 2006) lors des études de l'écosystème microbien de la baie de raisin. Mais ces espèces ne sont pas majoritaires au vignoble. Leur détection n'est pas toujours possible par les analyses directes et quelques fois même après enrichissement. La surface de la baie de raisin et le moût sont en fait deux milieux complètement différents. Mais il est probable que les espèces du vin, même minoritaires résident sur le raisin grâce aux espèces majoritaires qui régulent le consortium microbien de la baie.

Pour imaginer une telle organisation, le rôle de chaque espèce microbienne dans le maintien de l'écosystème doit être pris en compte. C'est notamment le cas d'*Aureobasidium pullulans*, de *Sporobolomyces* sp. et de *Rhodotorula* sp., décrites à la surface de nombreux autres végétaux (Hamamoto et Nakase 1995, Wang et Bai 2004). Elles sont bien connues pour leur production d'exopolysaccharides (Petersen et al. 1990). Cette qualité est aussi partagée par les bactéries *Pediococcus parvulus* (Llaubères et al. 1990), *Leuconostoc mesenteroides* (Richard et al. 2005), *Lactobacillus sanfranciscensis* (Korakli et al. 2003) et *Burkholderia vietnamiensis* (Gaur et Wilkinson 1996). Il est probable que ce gel glucidique extracellulaire assure un lien physique entre les cellules microbiennes et la surface à coloniser (Zottola 1994). Cette matrice peut également piéger les nutriments (Costerbon 1995). Elle constitue aussi une barrière de protection contre les agressions environnementales

car elle limite la diffusion des agents antagonistes possibles comme les traitements phytosanitaires (Guerra 1999). Mah et O'Toole (2001) suggèrent même que la synthèse de cette matrice extracellulaire peut être favorisée par l'application de composés antimicrobiens. Certains de ces polymères glucidiques extracellulaires s'avèrent tellement denses qu'ils peuvent être imperméable à la diffusion de l'oxygène (Yuen 1974), ce qui peut expliquer la détection d'espèces anaérobies strictes à la surface de la baie de raisin, environnement a priori oxydatif. Un tel schéma d'organisation de plusieurs micro-organismes sur une surface colonisée est appelé biofilm.

L'importance des biofilms est considérable dans le milieu hospitalier et dans les usines de productions agroalimentaires, car ils favorisent le maintien d'une flore microbienne malgré les efforts d'hygiène et l'application de produits antiseptiques. Une organisation semblable des micro-organismes à la surface de la baie est hautement probable dans le maintien d'un écosystème très diversifié. Au sein de ce biofilm, outre les espèces productrices d'exopolysaccharides, certaines espèces sont fondamentales. Ce sont les espèces productrices d'enzymes lytiques extracellulaires. Elles doivent l'aider à l'approvisionnement de la communauté microbienne en nutriments. C'est le cas des espèces de levures *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus laurentii* et *Aureobasidium pullulans* (Frederici et al. 1998) et des bactéries du genre *Serratia*. Chez *Aureobasidium pullulans*, Biely et al. (1996) ont remarqué que l'activité du système pectolytique était maximale lorsque la pectine était la seule source de carbone organique possible. Les levures *Debaryomyces hansenii* (Welthagen et Viljoen 1999) et *Yarrowia lipolytica* (Barth et Gaillardin 1997) possèdent également des activités lipolytiques. Elles pourraient s'attaquer à la cuticule externe de la baie principalement composée d'acides gras. Cette dégradation de la couche externe de la baie faciliterait l'adhésion des cellules microbiennes en réduisant l'hydrophobicité de la surface du tissu végétal (Van Loosdrecht et al. 1987).

Comme cela est évoqué précédemment, la population et la diversité des micro-organismes changent durant la maturation des baies. La véraison semble être une étape déterminante. A cette étape, la baie verte qui est un organe végétatif constitué principalement de pectine change de couleur, mais aussi de composition chimique. Elle devient un organe de réserve qui accumule les sucres. A ce moment la proportion des espèces avec une activité pectolytique et/ ou cellulolytique comme *Aureobasidium pullulans* diminue tandis que les espèces fermentaires augmentent. A la véraison, la cuticule de la baie change également. La

baie devient plus déformable et plus élastique (Coombe et Bishop 1980), ce qui doit probablement la rendre plus propice à l'adhésion des cellules microbiennes. Durant la maturation, le diamètre de la baie augmente également. Au moment des vendanges il est maximal (Coombe et Bishop 1980) et offre donc une surface à coloniser plus importante.

En outre, à ce stade, Mortimer et Polsinelli (1999) suggèrent que les baies abîmées sont plus favorables au développement de certains micro-organismes. Les lésions de la pellicule facilitent l'accès à la pulpe du raisin favorable aux espèces avides de sucres. Cela explique notamment la prédominance, lors des vendanges, chez les bactéries, de l'espèce *G. oxydans* qui tire son énergie de l'oxydation du glucose. De même la détection des levures *Saccharomyces* est plus fréquente sur les baies abîmées. Mais cela ne semble pas être le cas pour *B. bruxellensis* même si sa détection est nettement plus fréquente sur les baies arrivées à maturité que sur les baies en cours de développement. Enfin, les insectes, principaux vecteurs naturels de micro-organismes au vignoble (Sergent et Rougebief 1960, Phaff et al. 1978) sont naturellement attirés par le jus de raisin libéré lors de l'éclatement des baies abîmées. Ils participent à enrichir la surface de ces dernières en micro-organismes.

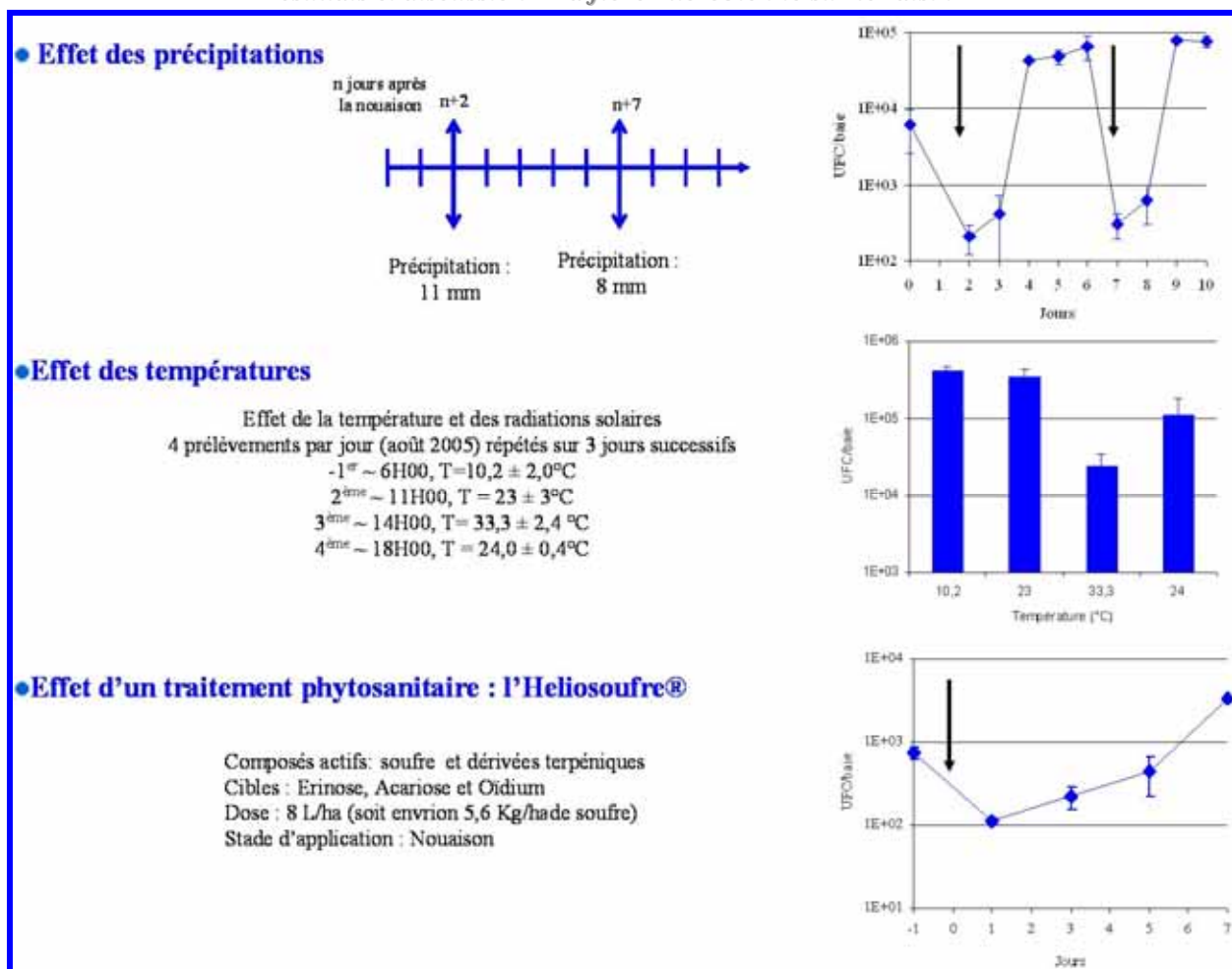
Les levures et les bactéries ne sont pas les seuls hôtes de la surface de la baie de raisins. Elles cohabitent avec les champignons. Des interactions mutualistes doivent s'établir dans le maintien du consortium microbien. Mais des interactions de natures compétitives sont également probables pour l'utilisation des nutriments et l'occupation de la surface d'adhésion. Cela peut se traduire par la production de toxines. Par exemple, les levures *Rhodotorula glutinis* (Tian et al. 2004), *Pichia anomala* (Reyes et al. 2004), *Cryptococcus albidus* (Fan et Tian 2001) et les bactéries *Bacillus* sp. et *Lactobacillus casei* (Krechel et al. 2002) sont connues pour leur faculté à inhiber certaines moisissures. Certaines font l'objet d'études approfondies pour l'élaboration de produits d'agents de bio-contrôle des pourritures, qui pourraient être utilisés dans le cadre d'une limitation de l'utilisation des produits chimiques néfastes à l'environnement (Droby et al. 1998, Spotts et al. 2002). De leur côté, les moisissures possèdent également la faculté de se défendre en produisant des mannoprotéines et des toxines qui inhibent notamment les levures (Darriet et al. 2002).

### **III.2 L'équilibre du consortium microbien.**

Le consortium microbien présent à la surface de la baie de raisin est soumis à de nombreuses contraintes environnementales comme les conditions climatiques. La température et l'activité de l'eau sont les deux paramètres physico-chimiques fondamentaux de la maintenance cellulaire de tous les êtres vivants, y compris les microbes. Sur la baie, ils dépendent des fluctuations de température à l'échelle de la journée, mais aussi tout le long de la maturation du raisin, ainsi que des pluies. Outre ces facteurs naturels, l'application des traitements phytosanitaires est un stress supplémentaire (Monteil *et al.* 1986).

Des exemples de chacun de ces cas sont présentés dans la figure 53. La population de levures varie significativement en fonction des précipitations, de la température et de l'application de composés actifs. Par exemple, le nombre de levures sur la baie de raisin chute immédiatement après une précipitation. Cela peut s'expliquer par un processus de dilution, mais aussi par un phénomène de lavage de la baie. Néanmoins la population retrouve très rapidement sa valeur d'origine. De même après l'application d'Heliosoufre®, la population chute significativement, mais l'effet est transitoire. Cette diminution du nombre de levures s'explique probablement par la forte teneur en soufre du composé testé (environ 700g/L de produit). De plus les dérivés terpéniques (environ 120 g/L) auxquels il est associé pour améliorer la mouillabilité et d'adhésivité du produit sur la baie sont également connus pour agir sur les levures.

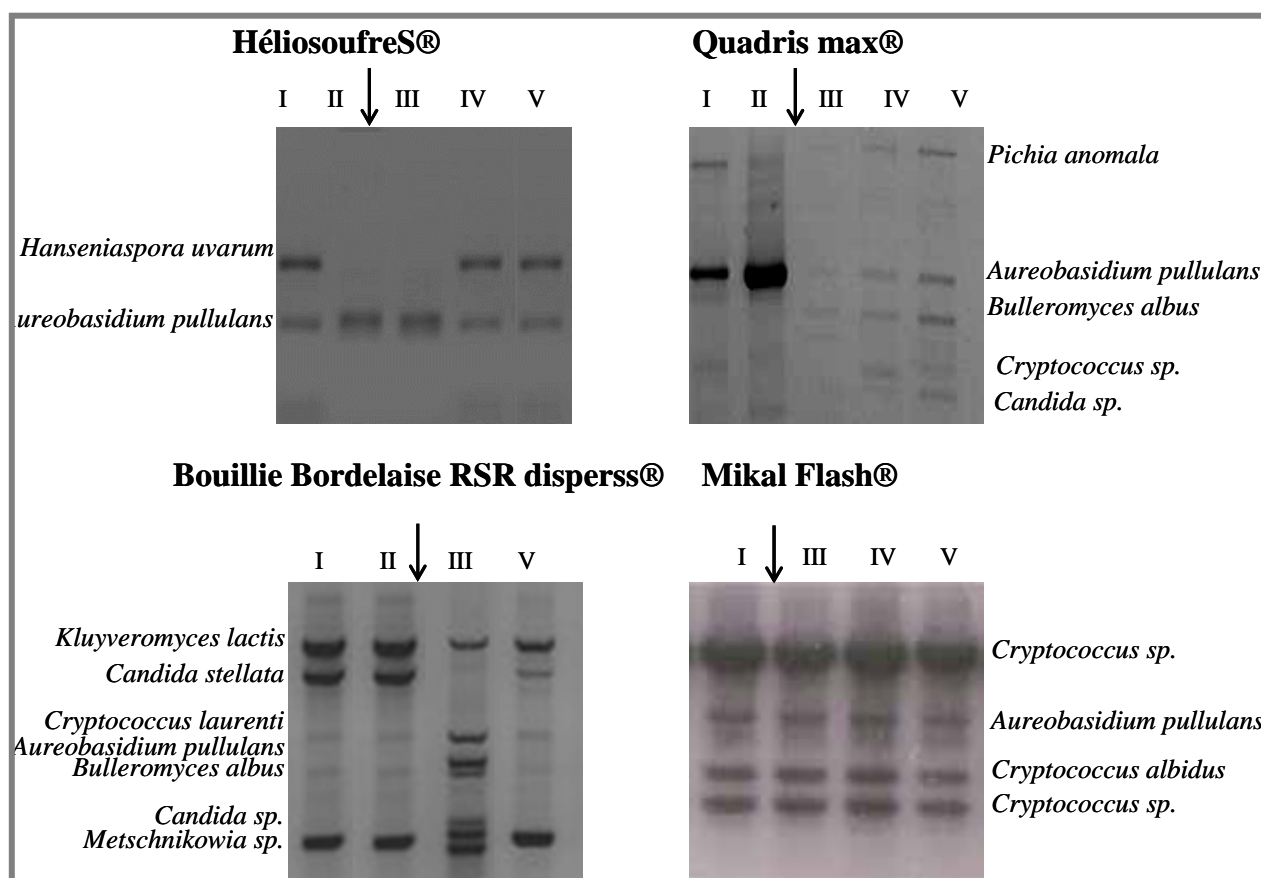




**Figure 53:** Effets des précipitations, des températures et d'un traitement phytosanitaire sur la population en LT du raisin.

Ces facteurs affectent la quantité de levures sur la baie de raisins mais également les espèces présentes. Les plus sensibles disparaissent après le stress, comme le montre les gels d'électrophorèse de la figure 54. Par exemple lors de l'application d'HeliosoufreS®, la bande caractéristique de l'espèce *Hanseniaspora uvarum* disparaît à la suite du traitement, tandis que celle de l'espèce *Aureobasidium pullulans* persiste. Mais seulement trois jours sont nécessaires pour voir réapparaître l'espèce *Hanseniaspora uvarum*. En ce qui concerne la bouillie bordelaise, les bandes qui apparaissent plus nettement après l'application doivent correspondre à des espèces présentes avant le traitement, mais minoritaires et masquées par les espèces majoritaires. Ces dernières ont réagi au choc consécutif au traitement. Les bandes correspondantes ont soit disparu du gel (*Candida stellata*) soit diminué d'intensité (*Kluyveromyces lactis*), ce qui a permis l'observation des autres bandes. Trois jours après l'application on retrouve le profil initial, même si la bande de *Candida stellata* est restée moins intense. Tout s'est probablement passé comme si les espèces majoritaires étaient

affectées par le traitement. Leur domination s'est affaiblie ce qui a permis de révéler les espèces initialement minoritaires moins affectées par le traitement.



**Figure 54:** Profils de PCR-ITS lors des traitements phytosanitaires (I : 3 à 5 jours avant le traitement, II : juste avant le traitement, III : entre 6 et 24 h après le traitement, IV : 2 jours après le traitement, V : entre 3 et 5 jours après le traitement).

Tous les traitements phytosanitaires n'entraînent pas non plus systématiquement de modification. Par exemple, le Mikal Flash® pourtant composé de substances actives d'un point de vue microbiologique n'a pas d'effet sur le profil des levures majoritaires.

Généralement, après chaque perturbation les rapports entre les espèces redeviennent favorables aux espèces sensibles. Ces résultats soulignent la stabilité du système biologique autour d'une position d'équilibre consolidée par les interactions entretenues entre chaque composante du système. Mais des études (Navarro et *al.* 1999, Spera et *al.* 2004) prouvent néanmoins que la persistance dans le moût des fongicides appliqués au vignoble peut être problématique lors des vinifications où les espèces alors présentes sont plus sensibles à leur

---

*Résultats et discussion -La flore microbienne sur le raisin*

effet inhibiteur (Calhelha et *al.* 2006). En outre, les suivis des principaux travaux de la vigne comme l'effeuillage, l'éclaircissage et le griffage (Chapitre I.1.2.2) n'ont pas révélés de variations significatives.

## CONCLUSIONS.

Les bactéries et les levures tapissent en nombre la surface de la baie de raisins à laquelle elles adhèrent. Les populations augmentent au fur et à mesure que la baie se développe : l'augmentation du diamètre accroît la surface disponible et des modifications de la composition chimique de la baie et des propriétés de la pellicule favorisent l'adhésion des cellules. Les populations sont à leur apogée au moment des vendanges (environ  $10^4$ - $10^5$  UFC/baie). Elles varient cependant selon les cépages, les domaines mais surtout des millésimes.

L'identification des espèces, par PCR-DGGE notamment, révèle une diversité importante qui évolue au cours de la maturation. La levure *Aureobasidium pullulans* domine nettement sur la baie verte, puis, au moment de la véraison, elle cède sa place aux espèces plus couramment décrites en œnologie (*Candida* sp., *Pichia* sp...). Les principales espèces de la vinification : *S. cerevisiae* et *O. oeni* sont également présentes mais elles sont minoritaires.

En fait, les espèces majoritaires de la baie ne sont jamais détectées dans le moût après le pressurage, mais elles doivent jouer un rôle important dans le maintien de la microflore de la baie. Tout laisse penser que les micro-organismes s'organisent en biofilm. Certaines espèces produiraient des exopolysaccharides qui lieraient les cellules entre-elles et avec la baie, mais aussi les protégeraient. D'autres espèces dégraderaient le tissu végétal et approvisionneraient la communauté en nutriments. Enfin d'autres interagiraient avec les moisissures. Cette organisation stabiliserait le système qui doit faire face aux nombreuses contraintes environnementales. Lorsque le système est perturbé, par un traitement phytosanitaire par exemple, il retrouve rapidement son équilibre.

Au final, il est clairement établi que le raisin est bien la première source de micro-organismes susceptibles d'intervenir durant l'élaboration du vin. Certaines espèces sont même spécifiques de certains domaines. Elles pourraient participer à l'originalité du vin et feraient partie intégrante du terroir.

Mais la présence de *B. bruxellensis* est plus problématique. Lors des analyses directes des baies de raisin, *B. bruxellensis* peut-être mis en évidence mais uniquement après

l'enrichissement. Sa population doit donc être encore plus faible que celle de *S. cerevisiae* et d'*O. oeni* qui ne sont déjà pas bien élevées (Mortimer et Posinelli 1999, Bae 2006). Mais elle est bien présente sur la baie ce qui n'avait jamais été clairement établi auparavant. Donc en dépit des efforts d'hygiène réalisés ces dernières années dans les chais d'après les résultats qui ne suspectaient qu'une voie de contamination externe, il est normal de retrouver des traces de *B. bruxellensis* dans le vin puisque celle-ci est apportée à chaque vendange par le raisin lui-même. Ce constat ne règle pas totalement la question de l'origine des souches de *B. bruxellensis* responsables de la production des phénols volatils. Car les souches du raisin ne sont probablement pas les seules. Des souches résidentes dans la niche écologique du chai sont également envisageables. Les souches d'altération qui se développent dans le vin sont-elles issues du raisin ou sont-elles apportées par le matériel vinicole usagé ? Une identification des souches aux différentes étapes de la vinification depuis le vignoble est indispensable pour répondre à cette question. Il est aussi probable que des souches de *B. bruxellensis* du vignoble perdurent à chaque récolte, si bien qu'elles finissent par s'approprier également l'écosystème du chai.

Lire  
la seconde partie  
de la thèse